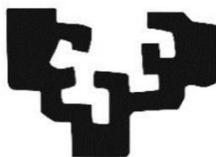


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Tesis Doctoral

Etiología, epidemiología y control de las virosis del
cultivo de pimiento en Euskadi

Mikel Ojinaga Juárez

Directores:

Santiago Larregla del Palacio

Jesus Ángel Sánchez Navarro

2024

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos 15-00131-TOBAMOPIM, 20-00032-VIRUSPIM y 21-00110-GOVIRGIN del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca (Gobierno Vasco). El autor de esta Tesis (Mikel Ojinaga) recibió el contrato predoctoral “Introducción de Resistencias a Tobamovirus y otros Virus en Variedades Locales de Pimiento de Gernika y Guindilla de Ibarra” (Orden de 24 de octubre de 2018 del Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco).

El centro al que se adscribió la beca fue NEIKER, el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, en cuya finca experimental e instalaciones de Derio se realizaron los ensayos de campo, así como los análisis de laboratorio. Específicamente el trabajo fue realizado en el departamento de Producción y Protección vegetal en la sección de Horticultura.

Al llegar al final de la elaboración de la Tesis, no puedo dejar de reflexionar sobre el viaje que ha supuesto completar este trabajo. Ha sido un periodo de aprendizaje, desafíos y, sobre todo, de crecimiento personal y científico. Sin embargo, no habría sido posible llegar a este punto sin el apoyo, la orientación, la dedicación y el esfuerzo de muchas personas e instituciones, a quienes les gustaría agradecer su labor en las siguientes líneas.

En primer lugar, quiero expresar un profundo agradecimiento a mi director de Tesis el Dr. Santiago Larregla, sin el cual, este trabajo no habría salido adelante. Le estaré eternamente agradecido por la guía, paciencia, dedicación, compromiso y pasión que le ha dedicado a esta Tesis. También le quisiera agradecer el haber facilitado los medios necesarios para la consecución de este trabajo dentro del laboratorio de "Horticultura" y por haber compartido generosamente sus conocimientos en patología vegetal, lo cual me han enriquecido profesionalmente. Por último y no menos importante, gracias por crear un ambiente de confianza mutua y de amistad que han permitido desarrollar los trabajos de una forma muy plena.

También quisiera agradecerle al Dr. Jesus Ángel Sánchez-Navarro, mi director a distancia, por haber facilitado los medios para la elaboración de esta tesis dentro de su laboratorio y por haber compartido generosamente su vasto conocimiento y experiencia en virología y en técnicas de detección de virus, lo cual ha enriquecido enormemente mi investigación. Estoy profundamente agradecido por su paciencia, compromiso y dedicación, siempre de buen humor, que me han inspirado para superar algunos desafíos académicos de carácter molecular. Espero en el futuro poder decir muchas más veces ¡¡¡Seguimos!!!

Tampoco me puedo olvidar de Ana Aragonés y de la Dra. Mónica Hernández ya que han sido unas de las personas más importantes en la consecución de este trabajo. Han sido ellas las que nos han guiado siempre en la parte molecular de la Tesis, sobre todo a la hora de seleccionar por marcadores moleculares los genotipos resistentes a varios virus. Ha sido un placer trabajar junto a ellas, siempre dispuestas y motivadas con el proyecto e imperando el buen humor. ¡Por fin hemos sacado "la gabarra", Ana!

Al centro IBMCP-CSIC de Valencia (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) por habernos ayudado a poner a punto la tecnología de detección por Hibridación Molecular en nuestro laboratorio y por haber realizado tanto las sondas individuales como las polisondas de detección de virus por Hibridación Molecular. Por otro lado, les agradezco el trabajo desempeñado en su laboratorio para obtener el genoma completo del nuevo Tobamovirus identificado.

También quisiera agradecer al Laboratorio Nacional de Referencia para la identificación y diagnóstico de virus en especies no leñosas de la Universidad Politécnica de Valencia, por prestar sus instalaciones para realizar la validación de las polisondas de Hibridación Molecular con la técnica DAS-ELISA. Además, también contribuyeron en diferentes análisis para la identificación del nuevo Tobamovirus y en las inoculaciones de variedades locales de pimiento de Euskadi con este nuevo virus. Ambas contribuciones han dado mucho cuerpo a la Tesis y les estoy muy agradecido tanto a la Dra. Ana Alfaro como a la Dra. Maria Isabel Font por su dedicación, buen hacer y por haber compartido información esencial para este trabajo.

A la Dra. Sorkunde Mendarte por haberme ayudado en los muestreos de identificación de especies de flora silvestre en las parcelas al aire libre de guindilla de Ibarra con las “Claves ilustradas de la Flora del País Vasco”. Me ha ayudado a identificar muchas especies que no conocía y con ello a obtener mayor conocimiento sobre la situación epidemiológica en cuanto a hospedantes de CMV en las parcelas de guindilla de Gipuzkoa.

A Berdaitz Juaristi por ser mi escudero fiel y ayudarme a desempeñar multitud de tareas a lo largo de estos años. Su compañía y amistad han sido incondicionales, siempre con ganas de ayudar. Oso profesional!

A las demás compañeras de laboratorio Maite Gandariasbeitia, Silvia Loscos y Leyre Benedicto, junto a las que he pasado muchas horas de trabajo mientras escuchábamos música en “Gaztea”. Me llevo grandes momentos junto a ellas tanto dentro como fuera de NEIKER y sobre todo grandes amistades que espero que duren muchos años.

A los compañeros de NEIKER de los “inver” Javi Elorrieta, Oier Bilbao y especialmente a Leire Abaunza, por haber ayudado a hacer frente a los retos propuestos en la finca experimental de NEIKER en Derio y por ser un ejemplo de lucha, trabajo y compañerismo. Siempre han sido una parte esencial ayudando en los ensayos de inoculación, germinación, selección o producción y un largo etcétera. Sin ellos tampoco hubiera sido posible realizar esta Tesis.

A la Asociación de Horticultores de Bizkaia (BIHOEL) y a los agricultores que forman parte de ella por haber realizado ensayos de producción y comportamiento agronómico de las nuevas variedades resistentes obtenidas. Destacaría la colaboración de Joshua Rios, Lapikote, La Gilda del Norte y los hermanos Pildain. También quisiera agradecer a la cooperativa Barrenetxe por haber participado en los muestreos y por su buena disposición a probar genotipos resistentes a Tobamovirus en sus parcelas desde el principio del proyecto. A Goretti de LORRA por haber ayudado en las prospecciones de campo realizadas. A Erlantz Gorbea por coordinar algunas tareas entre los agricultores y NEIKER y por dejarme entrar al Kafe Antzoki sin hacer cola.

A los técnicos de la Asociación de Horticultores de Gipuzkoa (GILBE), especialmente a Jorge Arizmendi y Amaia Otaño por hacerme llegar los principales problemas del sector hortícola en Gipuzkoa y por habernos ayudado a conocer mejor la situación de las parcelas de guindilla en cuanto a virus transmitidos por pulgón (especialmente CMV). Ambos han contribuido a realizar las prospecciones a gran escala en parcelas profesionales de Gipuzkoa. Si no fuera por ellos no tendríamos de mucha información valiosa como las incidencias de virosis en cultivo, los picos de vuelos de pulgón y la importancia de cada especie de pulgón (no publicado en la Tesis). A los horticultores de Gipuzkoa Mikel Yurramendi, Paco Orbegozo, Pedro Zubelzu, Gustavo Ramos, Bolubarri y Mikel Eizagirre (Arane) por habernos permitido realizar diferentes estudios en sus parcelas. También agradecerle a Leo Argote su buen hacer y sus ganas de seguir mejorando en el manejo del cultivo de guindilla buscando activamente soluciones para los problemas que tienen los guindilleros.

No me quiero olvidar de los laboratorios de Sanidad Vegetal de las Diputaciones de Bizkaia (Andoni Zabala y Ana Feijoo) y Gipuzkoa (Amaia Urkola) por la información de diagnósticos de sus laboratorios que han compartido para la escritura de la Tesis, así como por las colaboraciones puntuales que hemos tenido a lo largo de este camino.

A Alfredo Lacasa por estar siempre dispuesto a ayudar y compartir su extenso conocimiento agronómico y epidemiológico. Sus consejos han sido de gran ayuda para afrontar nuevos retos y obtener conocimientos sobre las virosis transmitidas por pulgones.

A todos los que habéis participado activamente realizando prácticas, trabajos finales de grado o de máster: Kimetz Lloidi, Salva Fernández, Eneko Suarez, Patirke Ibarondo, Nerea Rubio, Arantza Revillas y Estefanía Ascensio. A Unai Apodaka por participar activamente en los muestreos de flora silvestre y en el procesado de las muestras.

Me acuerdo con mucho cariño de la familia de Arteaga por haberme tratado siempre como a un hijo y especialmente de Ibane por haberme apoyado en el camino durante gran parte de la Tesis. Aunque nuestros caminos han tomado rutas diferentes, valoro y reconozco la influencia positiva que tuviste en mi vida y por ende en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos, a los de toda la vida y a los que he hecho durante esta etapa, por estar siempre ahí, por las distracciones bienvenidas y por su apoyo que ha sido un pilar fundamental en este trayecto.

Por último, pero no menos importante, a mis padres, a Xabi y a Amuma por su amor inquebrantable, y por ser siempre un ejemplo de valores como el esfuerzo, la perseverancia y la solidaridad, en estos tiempos que escasean tanto estos valores. Eskerrik asko bihotzez.

ÍNDICE

RESUMEN	V
ABSTRACT	IX
LABURPENA	XIII
LISTA DE ESPECIES VIRALES Y ACRÓNIMOS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
0. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Cultivo de pimiento en el Mundo	2
1.2. Cultivo de hortalizas en Euskadi y la importancia del pimiento.	6
1.3. Tipos de pimiento cultivados en Euskadi	9
1.3.1. Pimiento de Gernika.....	10
1.3.1.1. Freír	11
1.3.1.2. Choricero	12
1.3.2. Guindilla de Ibarra.....	13
1.3.3. Otros pimientos cultivados en Euskadi	15
1.4. Origen y dispersión en el mundo del cultivo de pimiento	17
1.5. Taxonomía y morfología de <i>Capsicum annuum</i> L.	18
1.6. Organización molecular del pimiento	18
1.7. Estado fitosanitario del pimiento en Euskadi.....	19
1.7.1. Factores abióticos	19
1.7.2. Factores bióticos	21
1.7.2.1. Hongos.....	21
1.7.2.1.1. “Tristeza” o seca del pimiento	21
1.7.2.1.2. Fusariosis.....	22
1.7.2.1.3. <i>Rhizoctonia solani</i>	22
1.7.2.1.4. Oidiopsis	22
1.7.2.1.5. <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22
1.7.2.1.6. <i>Pythium</i> spp.....	23
1.7.2.1.7. <i>Botrytis cinerea</i>	23
1.7.2.2. Bacteriosis	23
1.7.2.3. Plagas.....	24
1.7.2.4. Nemátodos	25
1.7.2.5. Virosis	26
1.8. Los virus.....	26

1.8.1.	Ciclo infectivo de los virus	27
1.8.2.	Formas de transmisión de los virus.....	28
1.8.3.	Principales virosis en el cultivo de pimiento en Euskadi según la forma de transmisión del virus	30
1.8.4.	Estructura molecular y control genético de los principales virus que afectan al cultivo de pimiento en Euskadi	31
1.8.4.1.	Potyvirus.....	31
1.8.4.2.	Cucumovirus.....	34
1.8.4.3.	Orthotospovirus	37
1.8.4.4.	Tobamovirus.....	40
1.9.	Técnicas de detección de virus.....	43
1.9.1.	Técnicas de detección serológicas	43
1.9.2.	Técnicas de detección moleculares.....	44
1.9.2.1.	PCR Convencional.....	44
1.9.2.2.	Hibridación molecular	47
1.9.2.3.	Otras técnicas moleculares	49
1.9.3.	Resistencia en plantas	49
1.9.3.1.	Genes mayores de resistencia.....	49
1.9.3.2.	Genes recesivos.....	51
1.9.3.3.	SAR (systemic acquired resistance).....	52
1.9.3.4.	La resistencia horizontal (poligénica).....	52
1.9.3.5.	Silenciamiento	52
1.9.4.	Mejora genética de plantas.....	53
1.9.4.1.	Mejora por Retrocruzamiento	54
2.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1.	Hipótesis.....	57
2.2.	Objetivos	57
3.	MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	58
3.1.	Área de estudio	58
3.2.	Prospecciones de virus en parcelas de agricultores.....	59
3.2.1.	Prospección a gran escala en parcelas profesionales de pimiento de Euskadi.....	59
3.2.2.	Análisis de muestras y análisis estadístico	59
3.2.3.	Determinación del patotipo de PMMoV en parcelas de pimiento de Euskadi a partir de ensayos de inoculación.....	60
3.2.4.	Muestreos realizados durante los años 2017-2018.....	60
3.2.5.	Prospección a gran escala en parcelas de agricultores de Euskadi 2019.....	61

3.2.6.	Muestreo de flora silvestre en parcelas de guindilla para ver si actúan como huéspedes de CMV y PVY.....	61
3.3.	Hibridación Molecular no radioactiva.....	62
3.3.1.	Obtención de sondas específicas, sus controles positivos y polisondas para Hibridación molecular.....	62
3.3.2.	Marcaje de las sondas con digoxigenina.....	68
3.3.3.	Generación de stock 1000X de las sondas individuales, polisondas y controles positivos.....	68
3.3.4.	Procedimiento de análisis por Hibridación Molecular no radioactiva en plantas de pimiento.....	68
3.3.5.	Validaciones para evaluar comportamiento de las polisondas diseñadas.....	69
3.3.5.1.	Límites de detección de sondas individuales y polisondas con transcritos no marcados sintetizados en laboratorio.....	70
3.3.5.2.	Límites de detección de sondas individuales y polisondas en tejido infectado naturalmente.....	71
3.3.5.3.	Análisis rutinario de muestras de campo con sondas individuales, polisondas y DAS-ELISA.....	71
3.4.	Secuenciación y estudio epidemiológico de un nuevo Tobamovirus.....	72
3.5.	Programa de mejora genética por retrocruzamiento para obtener variedades resistentes a virus en pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra.....	85
3.5.1.	Material vegetal y programa de mejora para obtener genotipos resistentes a Tobamovirus.....	85
3.5.2.	Evaluación de marcadores moleculares en el material de mejora obtenido.....	86
3.5.3.	Desarrollo de marcador SNP para L4.....	87
3.5.4.	Resistencia a Tobamovirus: Genotipado.....	87
3.5.5.	Resistencia a tobamovirus: fenotipado.....	88
3.5.6.	Ensayo de Producción de los genotipos obtenidos y su comportamiento agronómico.....	89
3.5.7.	Evaluación de genotipos con otros genes de resistencia.....	90
4.	RESULTADOS.....	93
4.1.	Prospecciones y muestreos en parcelas de agricultores.....	93
4.1.1.	Prospección a gran escala con DAS-ELISA en 2014.....	93
4.1.1.1.	Incidencia de los virus en cultivo.....	93
4.1.1.2.	Virus detectados.....	94
4.1.1.3.	Importancia de los virus según el sistema de cultivo.....	96
4.1.1.4.	Infecciones simples y múltiples.....	97
4.1.1.5.	Bioensayo de determinación de patotipos de PMMoV.....	99
4.1.2.	Muestreos con DAS-ELISA en 2017-2018.....	101
4.1.3.	Prospección a gran escala con Hibridación molecular (HM) en 2019.....	103

4.1.4.	Muestreo de flora silvestre en parcelas de guindilla para ver si actúan como huéspedes de CMV y PVY.....	106
4.1.5.	Discusión	109
4.2.	Validación polisondas de hibridación molecular para la detección múltiple de virus en cultivos de pimiento	116
4.2.1.	Límite de detección de las sondas individuales	116
4.2.2.	Límite de detección de las polisondas respecto a las sondas individuales	117
4.2.3.	Sensibilidad de sondas individuales y polisondas con muestras infectadas de campo	119
4.2.4.	Análisis de muestras de campo con sondas individuales, polisondas y DAS-ELISA	121
4.2.5.	Discusión	126
4.3.	Análisis molecular de un aislado de chili pepper mild mottle virus (CPMMoV) y evaluación de la transmisión por semillas y genes de resistencia	129
4.3.1.	Caracterización del genoma completo del nuevo tobamovirus y análisis filogenético.....	129
4.3.2.	Clones infectivos de CPMMoV-Sp.....	134
4.3.3.	Desarrollo de técnica de detección mediante hibridación molecular no radiactiva y con la técnica RT-PCR.....	135
4.3.4.	Transmisión de semilla a planta de CPMMoV en pimiento	138
4.3.5.	Determinación del patotipo de CPMMoV en variedades de pimiento con diferentes genes de Resistencia a Tobamovirus.	139
4.3.6.	Discusión	142
4.4.	Programa de mejora genética por retrocruzamiento para obtener variedades resistentes de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra a Tobamovirus y otros virus.....	145
4.4.1.	Marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia L3 y L4 probados en el material vegetal de mejora.....	145
4.4.2.	Genotipado de la resistencia a tobamovirus.....	146
4.4.3.	Inoculación de diferentes tobamovirus en los genotipos obtenidos.....	148
4.4.4.	Comportamiento agronómico de los genotipos y la selección de los más productivos.....	152
4.4.5.	Obtención de genotipos resistentes a otros virus	156
4.4.6.	Discusión	157
5.	DISCUSIÓN GENERAL	161
6.	CONCLUSIONES Y TESIS.....	177
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	180
	ANEXOS.....	224

RESUMEN

Las enfermedades virales se han convertido en uno de los principales problemas fitosanitarios para los productores de variedades locales de pimiento de Euskadi. En 2014 se realizó una prospección para determinar la importancia de los virus más comunes en las variedades de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra cultivadas en Bizkaia y Gipuzkoa principalmente. Se tomaron muestras de un total de 97 parcelas, clasificadas según el sistema de cultivo: al aire libre, en invernadero de suelo o invernadero hidropónico. Se recolectaron muestras de 1.107 plantas y se analizaron mediante el test DAS-ELISA para detectar los virus: tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), pepper mild mottle virus (PMMoV), paprika mild mottle virus (PaMMV), potato virus Y (PVY), y tomato spotted wilt virus (TSWV). Se obtuvieron positivos para todos los virus evaluados, pero los más frecuentes resultaron ser PVY y TMGMV, con un 19,8 % y 10,6 % de las plantas analizadas, respectivamente. Se encontraron diferencias entre los sistemas de cultivo para la mayoría de los virus analizados. PVY tuvo un mayor nivel de infección en condiciones al aire libre (27,3%) que en condiciones de invernadero (12,3 %). Por el contrario, los virus pertenecientes al género Tobamovirus y TSWV prevalecieron en condiciones de invernadero (28,9 % y 5,2 %) en comparación con el cultivo al aire libre (11,2 % y 1,1 %), respectivamente. Se encontraron infecciones simples (28,0 %) y múltiples (8,9 %). Aunque por DAS-ELISA se trataría de la primera detección de PaMMV en pimiento a nivel de España, los resultados obtenidos mediante la técnica de hibridación molecular no radiactiva aplicando sonda específica del virus fueron negativos, sugiriendo que los positivos iniciales obtenidos mediante la técnica DAS-ELISA podrían corresponder a reacciones cruzadas con otros Tobamovirus. Todos los aislados de PMMoV se clasificaron como patotipo P1.2 después de realizar ensayos de inoculación en variedades que portaban diferentes alelos de resistencia del gen L.

En 2019 se realizó otra prospección a gran escala en parcelas de 81 productores profesionales de pimiento en Euskadi, centrándose el muestreo principalmente en Bizkaia y Gipuzkoa. Se muestrearon 1.199 muestras que fueron analizadas mediante la técnica de Hibridación molecular no radioactiva (HM). Con esta técnica se analizaron 21 virus y 2 viroides en todas las muestras. Se detectaron 10 virus y no hubo ningún caso de infección por viroides. Los virus detectados, en orden de prevalencia, fueron: cucumber mosaic virus (CMV), TSWV, PVY, TMGMV, bell pepper mosaic virus (BPeMV), ToMV, PMMoV, alfalfa mosaic virus (AMV), pepper vein yellow virus (PeVYV), y potato virus X (PVX). El virus más detectado fue CMV (20,1 %) mostrando una incidencia alarmante, en particular en cultivos al aire libre (33,4 %), atribuible a su forma de transmisión no persistente. Otros virus con alta incidencia fueron TSWV (14,3 %) y PVY (11,3 %). TSWV tuvo una presencia notable en cultivos bajo invernadero, similar a lo observado en 2014, mientras que PVY afectó tanto a cultivos en invernadero como al aire libre. En general, los Tobamovirus presentaron mayores tasas de incidencia en cultivos bajo invernadero, siendo TMGMV (6,6 %) el más importante con una tasa de infección de 15,2 % en estas condiciones. En esta campaña se volvió a confirmar la ausencia del Tobamovirus PaMMV, de la misma forma que no fue detectado TMV, sugiriendo que en la prospección de 2014, los positivos iniciales obtenidos mediante DAS-ELISA, podrían corresponder a reacciones cruzadas con otros Tobamovirus. Se detectaron infecciones múltiples en el 19,4 % de las muestras analizadas, con coinfecciones de hasta 5 virus. Sin embargo, al analizar por HM, se

observó que las coinfecciones entre Tobamovirus se redujeron drásticamente, evidenciando una mayor especificidad de esta técnica en comparación con DAS-ELISA. En las dos prospecciones realizadas (2014 y 2019) se destacó la necesidad de combatir virus como CMV, PVY, TSWV y a los virus del género Tobamovirus, controlando la transmisión por los insectos e introduciendo genes de resistencia en las variedades cultivadas.

Debido a las elevadas tasas de infección detectadas por virus de transmisión no persistente, como CMV y PVY, durante 2021 y 2022, se llevaron a cabo análisis de la vegetación silvestre circundante a varias parcelas de cultivo de guindilla de Ibarra al aire libre. En el año 2021, se examinaron cuatro parcelas tanto antes como después de la temporada de cultivo, mientras que en 2022, solo se examinó una parcela antes de iniciar el cultivo. Los resultados de 2021 mostraron la presencia de CMV en dos de las cuatro parcelas antes de empezar el cultivo (en marzo), y en tres de las cuatro al concluir la campaña (septiembre). Durante el análisis previo al cultivo de marzo de 2022, también se encontraron plantas de vegetación silvestre infectadas por CMV. En ninguno de estos análisis se detectó la presencia de PVY en la vegetación silvestre. Estos resultados indican que algunas especies de flora silvestre que se encuentran en las parcelas de guindilla al aire libre pueden ser hospedantes de CMV, lo cual podría explicar la persistencia y propagación del virus en estos cultivos. Además, se detectaron varias especies que no se habían citado como hospedantes de CMV previamente. La ausencia de PVY en la vegetación silvestre sugiere que este virus puede tener otras fuentes de infección o vectores más específicos que no fueron identificados en estas parcelas. Este hallazgo subraya la importancia de manejar y monitorear la vegetación silvestre circundante como parte de las estrategias integradas de control de virus en los cultivos de pimiento.

Por otro lado, se analizó el comportamiento de varias polisondas de HM diseñadas para detectar simultáneamente varios virus que afectan al cultivo de pimiento. Esta tecnología ha demostrado ser exitosa en la detección de una gran cantidad de virus y/o viroides de plantas en un solo análisis, según investigaciones previas. Sin embargo, no se ha explorado cómo influyen la longitud de la polisonda o la posición de las sondas individuales de cada virus dentro de ellas en la sensibilidad de las polisondas. En este estudio, se han desarrollado tres polisondas con capacidad para detectar 9 (poli9), 12 (poli12) o 21 (poli21) virus que representan los virus menos prevalentes, los virus más prevalentes o la combinación de ambos tipos de virus, respectivamente, en los cultivos de pimiento de Euskadi. Se utilizaron cantidades conocidas de transcritos complementarios a las sondas y extractos diluidos en serie de diferentes plantas de pimiento infectadas individualmente. En general, se observó que el límite de detección de las polisondas poli12 y poli21 fue 5 veces y 25/125 veces menor que el de las sondas individuales, respectivamente. Una excepción fue la detección de CMV y ToMV, que se detectaron mejor utilizando poli21 que poli12, posiblemente debido a la posición más central de estas dos sondas dentro de la poli21 frente a la poli12. El análisis de 85 muestras de campo utilizando sondas individuales, poli12 y poli21 (confirmando los resultados por DAS-ELISA) reveló más muestras positivas con poli12 que con poli21, lo que confirma, en general, un mayor límite de detección de poli12 frente a poli21. Finalmente, se analizaron 236 plantas de campo con sondas individuales y con las polisondas poli12 y poli21, observándose nuevamente una menor detección de plantas infectadas con poli21, especialmente cuando se trataba de plantas infectadas por CMV y PVY. En este trabajo se discute sobre el tamaño y la temperatura óptima de hibridación con las polisondas para la detección eficiente de virus utilizando esta

tecnología. Además, se explora el impacto de la posición de sondas individuales dentro de las polisondas.

A partir de 2017, se empezaron a detectar en Bizkaia muestras con síntomas típicos de Tobamovirus que daban resultados discordantes al ser analizadas por DAS-ELISA con sueros de diferentes marcas comerciales. Además, en la prospección 2019 se detectaron muestras positivas pero muy tenues para el Tobamovirus bell pepper mosaic virus (BPeMV) mediante HM, lo que llevó a pensar que se trataba de este Tobamovirus o un virus que tuviera una secuencia parecida a BPeMV. Paralelamente, el laboratorio de referencia de virus en hortícolas (UPV-Valencia) recibió muestras de Granada que mostraron un comportamiento similar. El análisis de RT-PCR utilizando cebadores universales para Tobamovirus, permitió la amplificación de una banda específica. La secuenciación de esta banda reveló una alta homología con (BPeMV) tanto en los aislados de Bizkaia como en los de Granada. Tras analizar 8 muestras infectadas, seis resultaron positivas a BPeMV por DAS-ELISA. Los resultados obtenidos indicaron la posible presencia de un nuevo Tobamovirus en pimiento o, alternativamente, de un aislado del BPeMV. Se procedió entonces a obtener la secuencia completa del virus. La secuenciación del genoma completo reveló que se trataba de un aislado de chili pepper mild mottle virus (CPMMV-Sp; GenBank OQ920979) con una identidad del 99,2 % con otro aislado de CPMMV (GenBank MN164455.1). El análisis RACE, realizado utilizando un cebador de bucle de tallo desarrollado para su anillamiento al extremo 3' terminal de la cola poli(A)/(U) introducida en el RNA viral, reveló la presencia de 22 nt adicionales en el extremo 5' en comparación con la secuencia de referencia, comenzando con una citosina, que fueron esenciales para generar infección. Sin embargo, la citosina 5'-terminal era prescindible para iniciar la infección. Por otro lado, se diseñaron dos ribosondas de digoxigenina específicas para este virus, dirigidas al área más divergente de CPMMV-Sp en comparación con BPeMV, con un porcentaje de identidad del 80,6 % y 75,8 %, respectivamente. Ambas sondas detectaban específicamente CPMMV-Sp cuando la hibridación se realizó a 68 °C y 60 °C, respectivamente. Sin embargo, la sonda específica de BPeMV, dirigida a una región con un porcentaje de identidad del 89,4 % con CPMMV-Sp, mostró hibridación cruzada a 60 °C pero no a 68 °C. La comparación de los límites de detección entre las técnicas de hibridación molecular y RT-PCR reveló que la primera era 125 veces menos sensible que la RT-PCR. El análisis de la transmisión vertical de CPMMV-Sp utilizando semillas procedentes de plantas de pimiento infectadas de forma natural o mecánica reveló un porcentaje de transmisión que osciló entre el 0,9 % y el 8,5 %. Finalmente, se analizó la resistencia de variedades de pimiento portadoras de diferentes alelos del gen *L'* (L1, L2, L3 y L4). Las variedades con el gen L1 se infectaban parcialmente por CPMMV-Sp (20-40 % de las plantas inoculadas), mientras que las variedades con los genes L2, L3 y L4 resultaron resistentes.

Tras la prospección realizada en 2014, los tobamovirus supusieron una amenaza para las variedades locales de pimiento de Gernika (cv. "Derio") y guindilla de Ibarra (cv. "Ibarroria"), provocando una disminución sustancial tanto en el rendimiento como en la calidad de los frutos, especialmente en cultivo bajo invernadero. Los Tobamovirus, como ToMV, TMGMV o PMMoV, son los virus que mayor impacto causan en los cultivos de pimiento en Euskadi. Además, la aparición de nuevos Tobamovirus, como el recientemente identificado CPMMoV (GenBank MN164455.1; primera aparición en Europa), incrementa las posibilidades de generar epidemias por virus de este género en parcelas de pimiento en Euskadi sin genes de resistencia

a Tobamovirus. Ante la inquietud causada por estos virus, se puso en marcha un programa de mejora genética mediante retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares (MABC). El objetivo de este programa fue incorporar los genes de resistencia L3 y L4 en las variedades locales que son susceptibles a estas enfermedades. MABC consistió en un cruce seguido de cuatro retrocruzamientos y dos autofecundaciones. Después de cada cruzamiento, los criterios de selección de plantas se basaron en la resistencia de las plantas y el parecido de los frutos con las variedades sensibles originales. Este programa de mejora permitió la introgresión en homocigosis de genes de resistencia en los nuevos genotipos obtenidos, reduciendo la dependencia de la producción de semillas híbridas y los costos asociados. Los genotipos resultantes demostraron una fuerte resistencia cuando se inocularon con PMMoV 1.2, PMMoV 1.2.3 y CPMMoV. Además, se llevaron a cabo ensayos de rendimiento en invernadero durante dos años consecutivos para identificar y seleccionar los genotipos resistentes más productivos, con el objetivo de registrar algunos de ellos como variedades comerciales. La productividad de los nuevos genotipos seleccionados no mostró diferencias significativas con respecto a las variedades sensibles originales. La introducción de resistencia genética en estas variedades locales de pimiento no sólo mitiga el peligro inmediato de infección por Tobamovirus, sino que también fomenta la preservación de los recursos genéticos agrícolas locales, asegurando su cultivo continuo y su sostenibilidad económica.

ABSTRACT

Viral diseases have become one of the main phytosanitary problems for producers of local pepper varieties in the Basque Country. In 2014, a survey was carried out to determine the importance of the most common viruses in the Gernika pepper and Ibarra chili pepper varieties grown mainly in Bizkaia and Gipuzkoa. Samples were taken in a total of 97 plots and these were classified according to the cultivation system: open field, soil greenhouse or a hydroponic greenhouse. Within these plots, samples were taken from 1,107 plants and analyzed by the DAS-ELISA test to detect several viruses: tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), pepper mild mottle virus (PMMoV), paprika mild mottle virus (PaMMV), potato virus Y (PVY), and tomato spotted wilt virus (TSWV). All the viruses evaluated were detected, but the most frequent viruses were PVY and TMGMV, with 19.8% and 10.6% of positive results in the analyzed plants, respectively. Differences between cultivation systems were found for most of the viruses tested. PVY had a higher level of infection in open field conditions (27.3 %) than in greenhouse conditions (12.3 %). On the contrary, viruses belonging to the genus Tobamovirus and TSWV prevailed in greenhouse conditions (28.9 % and 5.2 %) when compared to open field cultivation (11.2 % and 1.1 %), respectively. Simple (28.0 %) and multiple (8.9 %) infections were found. Although it was the first detection in Spain of PaMMV in pepper crops according to DAS-ELISA test, verification through non-radioactive molecular hybridization (MH) yielded negative results when using the virus-specific probe. This suggests that the initial positive results from the DAS-ELISA test could be due to cross-reactivity with other Tobamoviruses. All the detected PMMoV isolates were classified as pathotype P1.2 after inoculation tests with varieties carrying different 'L' resistance alleles.

In 2019, another large-scale survey was carried out on plots of 81 professional pepper producers in the Basque Country, with sampling basically focusing on Bizkaia and Gipuzkoa. A total of 1,199 samples were sampled and analyzed this time by the non-radioactive Molecular Hybridization (HM) technique. Using this detection technique, 21 viruses and 2 viroids were analyzed in all samples. Out of these, 10 viruses were detected and there were no cases of viroid infection. The viruses detected in order of importance were: cucumber mosaic virus (CMV), TSWV, PVY, TMGMV, bell pepper mosaic virus (BPemV), ToMV, PMMoV, alfalfa mosaic virus (AMV), pepper veinal yellow virus (PeVYV), and potato virus X (PVX). The most detected virus was CMV (20.1 %) showing an alarming incidence, particularly in open field crops (33.4 %), attributable to its non-persistent mode of transmission by aphids. Other viruses such as TSWV (14.3 %) and PVY (11.3 %) also stood out for their high incidence in 2019. While TSWV had a notable presence in greenhouse crops (as occurred in 2014), PVY affected both greenhouse and open field crops. In general, Tobamoviruses presented higher incidence rates in greenhouse crops, with TMGMV (6.6 %) being the most important with an infection rate of 15.2 % under these conditions. In this campaign, the absence of Tobamovirus PaMMV was confirmed again in the same way that TMV was not detected, suggesting that in the 2014 survey, the initial positives obtained by DAS-ELISA could correspond to cross reactions with other Tobamoviruses. Multiple infections (19.4 % of the samples analyzed) of up to 5 viruses were detected again. However, analyzing by HM it was seen that coinfections between Tobamovirus were drastically reduced, showing greater specificity than by DAS-ELISA. In the two surveys carried out (2014 and 2019), the need to combat viruses such as CMV, PVY, TSWV

and viruses of the Tobamovirus genus was highlighted, controlling transmission by insects and introducing resistance genes into cultivated varieties.

Due to the high infection rates detected by non-persistently transmitted viruses, such as CMV and PVY, during 2021 and 2022, analyzes of the wild vegetation surrounding several open field Ibarra chili pepper plots were carried out. In 2021, four plots were examined both before and after the growing season, while in 2022, only one plot was examined, and this was only done before starting cultivation. The 2021 results showed the presence of CMV in two of the four plots before starting cultivation (in March), and in three of the four plots at the end of the campaign (September). During the March 2022 pre-crop analysis, CMV-infected wild vegetation plants were also found. In none of these analyzes was the presence of PVY detected in wild vegetation. These results indicate that some species of wild flora found in open field chili pepper plots may be hosts of CMV, which could explain the persistence and spread of this virus in these crops. In addition, several species that had not previously been mentioned as hosts of CMV were detected. The absence of PVY in wild vegetation suggests that this virus may have other sources of infection or more specific vectors that were not identified in these plots. These findings underline the importance of managing and monitoring surrounding wild vegetation as part of integrated virus control strategies in pepper crops.

On the other hand, the behavior of several MH polyprobes designed to simultaneously detect various viruses affecting pepper crops was analyzed. This technology has been proven successful in detecting numerous plant viruses and viroids in a single analysis, according to previous research. However, the impact of polyprobe length or the position of individual virus probes within them on sensitivity of the polyprobes has not yet been addressed. In this study we have developed three polyprobes with the capacity to detect 9 (poly9), 12 (poly12) or 21 (poly21) viruses, which represent the least prevalent viruses, the most prevalent viruses or the combination of both types of viruses, respectively, in the Euskadi pepper crops. Using known amounts of transcripts complementary to the probes and serially diluted extracts from different individually infected pepper plants, we observed that, in general, the detection limit of the poly12 and poly21 polyprobes was 5-fold and 25/125-fold lower than the individual probes, respectively. One exception was the detection of CMV and ToMV, which were better detected using poly21 than poly12, possibly due to the more central position of these two probes within the corresponding polyprobes. Analysis of 85 field samples using individual probes, poly12 and poly21 (confirming the results by DAS-ELISA) also revealed more positive samples with poly12 than with poly21, confirming, in general, a higher limit of detection for poly12. Finally, 236 field plants were analyzed with individual probes and with the poly12 and poly21, again showing a lower detection of infected plants with poly21, especially when the samples were infected by CMV and PVY. This work examines the size and optimal hybridization temperature of polyprobes for the efficient detection of viruses using this technology. Additionally, it explores the impact of the position of individual probes within the polyprobes.

Moreover, starting in 2017, samples with typical symptoms of Tobamovirus began to be detected in Bizkaia, giving discordant results when analyzed by DAS-ELISA with sera from different commercial brands. Furthermore, in the 2019 survey, positive but very faint samples were detected for the Tobamovirus bell pepper mosaic virus (BPeMV) using HM, which led to the belief that if it was this Tobamovirus or a virus that had a similar sequence to BPeMV. At

the same time, the reference laboratory for viruses in horticultural crops (UPV-Valencia) received samples from Granada that showed similar behavior. RT-PCR analysis using universal primers for Tobamovirus allowed the amplification of a specific band. Sequencing of this band revealed high homology with (BPeMV) in both the Bizkaia and Granada isolates. After analyzing 8 infected samples, six were positive for BPeMV by DAS-ELISA. The obtained results indicated the possible presence of a new Tobamovirus in pepper or, alternatively, a new isolate of BPeMV. The complete sequence of the virus was then obtained. Whole genome sequencing revealed that it was an isolate of chili pepper mild mottle virus (CPMMoV-Sp; GenBank OQ920979) with 99.2 % identity with another CPMMoV isolate (GenBank MN164455.1). RACE analysis, performed using a stem-loop primer developed for annealing to the 3' terminus of the poly(A)/(U) tail introduced into the viral RNA, revealed the presence of an additional 22 nt at the 5' end compared to the reference sequence, starting with a cytosine, which were essential to generate infection. However, the 5'-terminal cytosine was dispensable to initiate infection. On the other hand, two digoxigenin labelled riboprobes specific for this virus were designed, targeting the most divergent area of CPMMoV-Sp compared to BPeMV, with an identity percentage of 80.6 % and 75.8 %, respectively. Both probes specifically detected CPMMoV-Sp when hybridization was performed at 68 °C and 60 °C, respectively. However, the BPeMV-specific probe, targeting a region with 89.4 % identity to CPMMoV-Sp, showed cross-hybridization at 60 °C but not at 68 °C. Comparison of detection limits between molecular hybridization and RT-PCR techniques revealed that the former was 125 times less sensitive than RT-PCR. Analysis of vertical transmission of CPMMoV-Sp using seeds from naturally or mechanically infected pepper plants revealed a transmission percentage that ranged between 0.9 % and 8.5 %. Finally, the resistance of pepper varieties carrying different alleles of the L gene (L1, L2, L3 and L4) was analyzed. The varieties with the L1 gene were partially infected by CPMMoV-Sp (20-40% of the inoculated plants), while the varieties with the L2, L3 and L4 genes were resistant.

After the survey carried out in 2014, tobamoviruses posed a threat to the local varieties of Gernika pepper (cv. "Derio") and Ibarra chili pepper (cv. "Ibarroria"), causing a substantial decrease in both yield and quality of the fruits, especially in greenhouse cultivation. Tobamoviruses such as ToMV, TMGMV or PMMoV are the viruses that cause the greatest impact on pepper crops in the Basque Country. Furthermore, the emergence of new Tobamoviruses, such as the recently identified CPMMoV (first identification in Europe), raises the risk of epidemics caused by viruses of this genus in pepper plots of the Basque Country that lack Tobamovirus resistance genes. Given the concern caused by these viruses, a genetic breeding program was initiated using molecular marker-assisted backcrossing (MABC). The objective of this program was to incorporate the L3 and L4 resistance genes into local varieties that are susceptible to these diseases. MABC consisted of one cross followed by four backcrosses and two selfings. After each crossing, plant selection criteria were based on plant resistance and fruit resemblance to the original susceptible varieties. This breeding program allowed the homozygous introgression of resistance genes in the new obtained genotypes obtained, reducing dependence on hybrid seed production and the associated costs. The resulting genotypes demonstrated strong resistance when inoculated with PMMoV 1.2, PMMoV 1.2.3, and CPMMoV. In addition, greenhouse performance trials were carried out for two consecutive years to identify and select the most productive resistant genotypes, with the

aim of registering some of them as commercial varieties. The productivity of the new selected genotypes did not show significant differences when compared to the original sensitive varieties. The introduction of genetic resistance in these local pepper varieties not only mitigates the immediate danger of Tobamovirus infection, but also encourages the preservation of local agricultural genetic resources, ensuring their continued cultivation and economic sustainability.

LABURPENA

Birusek eragindako gaixotasunak Euskadiko piper barietateen ekoizleentzat arazo fitosanitario nagusietakoa bihurtu dira azken urteotan. Hori dela eta, 2014an prospekzio bat egin zen Bizkaian eta Gipuzkoan landatutako Gernikako piper eta Ibarako pipermin barietateetan ohikoenak diren birusen garrantzia zehazteko. Laginketa 97 lursailetan egin zen, eta lursail horiek hiru mailatan sailkatu ziren, erabilitako laborantza-sistemaren arabera: aire zabalean, lurzoru-berotegian edo berotegi hidroponikoan. Guztira 1.107 landare lagindu ziren eta DAS-ELISA testaren bidez aztertu, zazpi birus detektatzeko: tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), pepper mild mottle virus (PMMoV), paprika mild mottle virus (PaMMV), potato virus Y (PVY), eta tomato spotted wilt virus (TSWV). Aztertutako birus guztiak detektatu ziren, baina birus ohikoenak PVY eta TMGMV izan ziren, aztertutako landareen % 19,8 eta % 10,6tan, hurrenez hurren. Aztertutako birus gehienetan laborantza-sistemen arteko desberdintasunak aurkitu ziren. PVYk infekzio-maila handiagoa izan zuen aire zabaleko baldintzetan (% 27,3), berotegi-baldintzetan baino (% 12,3). Aitzitik, *Tobamovirus* generoko birusak eta TSWV birusak prebalentzia handiagoa izan zuten berotegi-baldintzetan (% 28,9 eta % 5,2) aire zabaleko laborantzaren baino (% 11,2 eta % 1,1). Infekzio sinpleak (% 28,0) eta anizkoitzak (% 8,9) aurkitu ziren. Bestalde, espainiar estatuan piper laborean egindako PaMMVen lehen detekzioa izan bazen ere, birusaren zunda espezifikoarekin hibridazio molekular ez-erradioaktiboaren bidez egiaztatu zen, laginak ez zeudela birus honekin infektaturik eta DAS-ELISA bidez izandako PaMMVen emaitza positiboak beste tobamobirus batzuekin positibo gurutzatuak izan zitezkeela. Prospekzioan detektatutako PMMoV-en isolatu guztiak P1.2 patotipo gisa sailkatu ziren, L genearen erresistentzia-alelo desberdinak zituzten barietateekin inokulazio-saiakuntzak egin ostean.

2019an, eskala handiko beste prospekzio bat egin zen Euskadiko 81 piper-ekoizle profesionalen lursailetan, eta laginketa hori ere, funtsean, Bizkaian eta Gipuzkoan egin zen. Prospekzio horretako lursailak ere laborantza-sistemaren arabera sailkatu ziren. Azterketa honetan 1.199 lagin analizatu ziren, baina oraingoan hibridazio molekular ez-erradioaktiboa (HM) erabiliz. Detekzio-teknika horren bidez, 21 birus eta 2 biroide aztertu ziren lagin guztietan, eta horietatik 10 birus detektatu ziren eta ez zen biroide bidezko infekzio kasurik izan. Hauek dira detektatutako birusak, prebalentziaren arabera sailkatuta: cucumber mosaic virus (CMV), TSWV, PVY, TMGMV, bell pepper mosaic virus (BPeMV), ToMV, PMMoV, alfalfa mosaic virus (AMV), pepper vein yellow virus (PeVYV), eta potato virus X (PVX). Gehien detektatutako birusa CMV izan zen (% 20,1) eta eragin kezagarria izan zuen, bereziki aire zabaleko laboreetan (% 33,4), birus honen transmisio-modu ez-iraunkorrari egotz dakiokena. Beste birus batzuk ere nabarmendu ziren, hala nola TSWV (% 14,3) eta PVY (% 11,3). TSWVk presentzia nabarmena izan zuen berotegiko laboreetan (2014an gertatu zen bezala), eta PVYk, berriz, eragina izan zuen berotegiko zein aire zabaleko laborantzetan. Oro har, tobamobirusek intzidentzia-tasa handiagoak izan zituzten berotegiko laboreetan, eta TMGMV (% 6,6) izan zen garrantzitsuena, berotegi-baldintzetan % 15,2ko infekzio-tasarekin. Kanpaina horretan, berriro baieztatu zen ez zegoela PaMMV tobamobirusik, eta TMVrik ere ez zen detektatu; beraz, litekeena da 2014ko prospekzioan beste tobamobirusen batekin gurutzatutako erreakzioak gertatu izana, DAS-ELISA bidez aztertu zirenean. Infekzio anizkoitzak detektatu ziren berriro (aztertutako laginen % 19,4) eta 5 birusekin ere kutsatuta zegoen laginen bat ere aurkitu zen. Hala ere, HMz aztertuta, tobamobirusen arteko koinfekzioak izugarri murriztu ziren, eta DAS-

ELISAz baino espezifikotasun handiagoa nabarmen antzeman zen. Egindako bi prospekzioetan (2014 eta 2019) agerian geratu zen beharrezkoa zela CMV, PVY, TSWV eta *Tobamovirus* generoko birusei aurre egitea, birusak transmititzen dituzten intsektuak kontrolatuz eta landutako barietateetan erresistentzia-geneak sartuz.

Transmisio ez-iraunkorra duten birusetan (CMV eta PVY, esaterako) hautemandako infekzio-tasa altuak zirela eta, 2021ean eta 2022an, Ibarrako pipermina aire zabalean lantzen zuten zenbait lursailen inguruko basa-landaredian analisiak egin ziren, birus horien presentzia detektatzeko asmoarekin: 2021ean, lau partzela aztertu ziren; bai laborantza-sasoiaren aurretik, bai ondoren. 2022an, berriz, partzela bakarra aztertu zen, eta laborantzari ekin aurretik baino ez zen egin laginketa. 2021eko emaitzek CMVren presentzia erakutsi zuten lau lursailetatik bitan laborea hasi aurretik (martxoan), eta lauretatik hirutan kanpaina amaitzean (irailean). 2022ko martxoko laborantzaren aurreko analisisian, CMVz kutsatutako basa-landarediko landareak aurkitu ziren berriro. Analisi horietan, ez zen detektatu lursailen inguruko landaredian PVYren presentziarik. Lortutako emaitzen arabera, argi ikusi da aire zabaleko Ibarrako pipermin sailetan dauden basa-florako espezie batzuk CMVren ostalari izan daitezkeela, eta horrek azal lezake birusak labore horietan hedatzea eta irautea. Gainera, CMVren espezie ostalari berri batzuk aurkitu ditugu lursail horietan. Analizatutako basa-landaredian PVYrik detektatu ezenez, birus horrek beste infekzio-iturri batzuk edo bektore espezifikokoagoak izan ditzake, lursail horietan identifikatu ez zirenak. Aurkikuntza hauek azpimarratzen dute garrantzitsua dela inguruko basa-landaredia monitorizatzea eta beraiekin maneiu egokia egitea, piper sailetan birusak kontrolatzeko estrategia integratuen parte gisa.

Bestalde, piperraren laborean eragina duten zenbait birus aldi berean detektatzeko diseinatutako HM polizunda batzuen portaeraren azterketa egin dugu. Polizunden teknologia arrakastaz erabili izan dute beste ikertzaile batzuek analisi bakar batean landareen birus eta/edo biroide ugari detektatzeko. Hala ere, orain arte ez da aztertu polizundaren luzerak edo birus bakoitzaren zunda indibidualek polizunden barruan duten posizioak nola eragiten duten sentikortasunean. Azterlan honetan hiru polizunda garatu ditugu, 9 (poli9), 12 (poli12) edo 21 (poli21) birus detektatzeko gaitasuna dutenak. Birus horiek Euskadiko piperraren laboreetan gutxien detektatzen diren birusak, birus prebalenteenak eta bi birus moten konbinazioak detektatzen dituzte, hurrenez hurren. Banaka infektatutako piper-landare desberdinen estraktuak seriean diluituz eta zunden osagarri diren transkribatu kopuru ezagunak erabiliz, ikusi ahal izan dugu, oro har, poli12 eta poli21 polizunden detekzio-muga banakako zundena baino 5 aldiz eta 25/125 aldiz txikiagoa izan zela, hurrenez hurren. Salbuespena CMV eta ToMV detektatzerako orduan izan zen, hobeto detektatu baitziren poli21 erabiliz poli12 erabiliz baino, ziurrenik bi zunda horiek dagokien polizunden barruan duten posizio zentralagoa dela eta. Gainera, 85 laginen analisiak egin ziren, banakako zunda espezifikokoak, poli12 eta poli21 erabiliz eta emaitza hauek DAS-ELISA bidez berretsiz. Berriz ikusi zen poli12k poli21ek baino lagin positibo gehiago detektatu zituela, eta horrek, oro har, lehen polizundaren detekzio-muga altuagoa berresten du. Azkenik, banakako zundak eta poli12 eta poli21 polizundak erabili ziren, 236 lagin aztertzeko, eta berriz ere hauteman ziren poli21ekin, infektatutako landare batzuk ez zirela ondo detektatzen, batez ere CMV eta PVYz infektatutako landareak zirenean. Lan honetan, teknologia hori erabiliz birusak modu eraginkorrean detektatzeko polizunden tamainari buruz eta hibridazio tenperatura egokiari buruz eztabaidatzen da, bai eta zunda indibidualek polizundetan duten kokapenari buruz ere.

Bestalde, 2017tik aurrera, Bizkaian tobamobirusen ohiko sintomak zituzten laginak detektatzen hasi ziren, eta emaitzak DAS-ELISA bidez, bi markatako serumekin aztertzerakoan ez ziguten argitzen ze *Tobamovirus* zen gaitza sortzearen arduraduna. Gainera, 2019ko prospekzioan HMrekin lagin positiboak detektatu ziren bell pepper mosaic virus (BPeMV) tobamobirusa analizatzean. Detektatutako positibo horiek argiak izan ziren, baina oso ahulak. Horrek pentsarazi zigun tobamobirus hau izan zitekeela, edo BPeMVn antzeko sekuentzia zuen beste tobamobirus bat izan zitekeela. Bestalde, erreferentziako barazkien birusen laborategira (UPV-Valentzia) Granadako beste lagin batzuk ere iritsi ziren, eta antzeko portaera erakutsi zuten DAS-ELISArekin analizatzean. Tobamobirusentzako zebadore unibertsalak erabiliz egindako RT-PCR analisiak banda espezifiko bat amplifikatzea ahalbidetu zuen. Banda horren sekuentziarioak homologia handia erakutsi zuen BPeMVekin, bai Bizkaiko eta bai Granadako isolatuetan. Kutsatutako 8 lagin aztertu ondoren, seik positibotasuna erakutsi zuten DAS-ELISA bidez BPeMVri. Emaitza hauek argitzeko asmotan, birusaren sekuentzia osoa lortzeki ekin genion. Genoma lortu eta datu-basearekin alderatu ondoren, chili pepper mild mottle virus isolatu bat zela konfirmatu zen (CPMMoV-Sp; GenBank OQ920979), % 99ko identitatea zuena CPMMoVrekin (GenBank MN164455.1). Hala ere, RACE analisiak (Rapid amplification of cDNA ends) agerian utzi zuen 22 nt gehiago zeudela gure birusaren sekuentziaren 5' muturrean, erreferentzia-sekuentziarekin alderatuta, zitosina batekin hasita, eta horiek funtsezkoak izan zirela infekzioa sortzeko. Hala ere, 5' terminaleko zitosina baztergarria izan zen infekzioa eragiteko orduan. Bestalde, birus hau detektatzeko digoxigeninazko bi erribosonda espezifiko diseinatu ziren, lotura estua duten CPMMoV-Sp-ren eta BPeMV eremu dibergenteenera zuzenduak (nortasun-ehunekoa % 80,6 eta % 75,8, hurrenez hurren). Ikusi zen bi zundek berariaz detektatzen zutela CPMMoV, hibridazioa 68 °C-an eta 60 °C-an egin zenean, hurrenez hurren. Hala ere, BPeMV zunda espezifikoak, CPMMoV-Sp-rekin % 89,4ko identitate-ehunekoa duen eskualde batera bideratuak, hibridazio gurutzatua erakutsi zuen 60 °C-tan, baina ez 68 °C-tan. Hibridazio molekularreko tekniken eta RT-PCR tekniken arteko detekzio-mugen konparazioak erakutsi zuen RT-PCR 125 aldiz sentikorragoa zela. CPMMoV-Sp-ren transmisio bertikalaren analisiak, modu naturalean edo mekanikoan infektatutako piper-landareetatik eratorritako haziak erabiliz, % 0,9 eta % 8,5 arteko transmisio tasa erakutsi zuen. Azkenik, L geneko hainbat alelo (L1, L2, L3 eta L4) daramatzaten piper-**barietateetan** birus hau inokulatu ostean, ikusi zen L1 genea zuten barietateak CPMMoV-Sp bidez partzialki infektatzen zirela (inokulatutako landareen % 20 eta % 40 artean), eta L2, L3 eta L4 geneak zituzten barietateak erresistenteak izan zirela.

2014an egindako prospekzioaren ondoren, tobamobirusak hartu ziren mehatxu nagusitzat bertako barietateetan, Gernikako piperrean (cv. "Derio") eta Ibarako piperminean (cv. "Ibarroria"), fruituen errendimendua eta kalitatea nabarmen murriztuz, batez ere berotegian egindako laborantzetan. *Tobamovirus* generoko ToMV, TMGMV edo PMMoV dira Euskadin berotegiko piperraren laborantzan inpaktu handiena eragiten duten birusak. Gainera, tobamobirus berrien agerpenak, duela gutxi identifikatutako CPMMoV (lehen agerpena Europan) kasu, areagotu egiten ditu Euskadin tobamobirusetikiko erresistentzia-generik gabeko piper sailetan genero horretako birusek eragindako epidemiak sortzeko probabilitatea. Birus horiek eragindako ziurgabetasunaren aurrean, hobekuntza genetikoko programa bat jarri zen abian, markatzaile molekularrez lagundutako atzerako gurutzaketa (MABC) bidez. Programa honen helburua L3 eta L4 erresistentzia-geneak gaixotasun horiek jasan ditzaketan bertako

barietateetan txertatzea izan da. MABCK hasierako gurutzaketa, lau atzerako gurutzaketa eta bi autopolinizazio izan zituen jarraian. Gurutzaketa bakoitzaren ondoren, landareak hautatzeko irizpideak landareen erresistentzian eta fruituek jatorrizko bariedade sentikorren fruituekin zuten antzekotasunean oinarritu ziren. Hobekuntza-programa horri esker, lortutako genotipo berrietan erresistentzia-geneak homozigosian barneratzea lortu zen; eta horrela, hazi hibridoek ekoizpenarekiko mendekotasuna eta horri lotutako kostuak murriztu. Azkenean, garatutako genotipoek erresistentzia erakutsi zuten PMMoV 1.2, PMMoV 1.2.3 eta CPMMoVrekin inokulatu zirenean. Gainera, berotegiko errendimendu-saiakuntzak egin ziren ondoz ondoko bi urtetan, genotipo erresistente produktiboenak identifikatzeko eta hautatzeko, horietako batzuk bariedade komertzial gisa erregistratzeko helburuarekin. Hautatutako genotipo berrien produktibitateak ez zuen desberdintasun esanguratsurik ikusi jatorrizko bariedade sentikorrekin konparatuz. Tokiko piper bariedade horietan erresistentzia genetikoak sartzeak tobamobirusek berehala infektatzeko arriskua murrizteaz gain, tokiko nekazaritzako baliabide genetikoek babesa ere sustatzen du, haien etengabeko laborantza eta iraunkortasun ekonomikoa ziurtatuta.

LISTA DE ESPECIES VIRALES Y ACRÓNIMOS

 Acrónimos virus/viroide	(virus/Género)
alfalfa mosaic virus	(AMV; Alfamovirus)
bell pepper mosaic virus	(BPeMV, Tobamovirus)
broad bean wilt virus	(BBWV, Fabavirus)
cauliflower mosaic virus	(CaMV; Caulimovirus)
chili pepper mild mottle virus	(CPMMoV, Tobamovirus)
cucumber green mottle mosaic virus	(CGMMV; Tobamovirus)
cucumber mosaic virus	(CMV, Cucumovirus)
eggplant mottled dwarf virus	(EMDV; Nucleorhabdovirus)
impatiens necrotic spot virus	(INSV, Orthotospovirus)
lettuce infectious yellows virus	(LIYV; Crinivirus)
obuda pepper virus	(ObPV; Tobamovirus)
paprika mild mottle virus	(PaMMV, Tobamovirus)
parietaria mottle virus	(PMoV; Ilarvirus)
pepino mosaic virus	(PepMV; Potexvirus)
pepper chat fruit viroid	(PCFVd; Pospiviroid)
pepper mild mottle virus	(PMMoV, Tobamovirus)
pepper vein yellows virus	(PeVYV; Polerovirus)
plumeria mosaic virus	(PluMV; Tobamovirus)
potato spindle tuber viroid	(PSTVd; Pospiviroid)
potato virus X	(PVX; Potexvirus)
potato virus Y	(PVY, Potyvirus)
prunus necrotic ringspot virus	(PNRSV; Ilarvirus)
tobacco etch virus	(TEV; Potyvirus)
tobacco mosaic virus	(TMV, Tobamovirus)
tomato brown rugose fruit virus	(ToBRFV; Tobamovirus)
tomato bushy stunt virus	(TBSV; Tombusvirus)
tomato chlorosis virus	(ToCV; Crinivirus)

tomato leaf curl New Delhi virus	(ToLCNDV; Begomovirus)
tomato mild green mosaic virus	(TMGMV, Tobamovirus)
tomato mosaic virus	(ToMV, Tobamovirus)
tomato mottle mosaic virus	(ToMMV; Tobamovirus)
tomato spotted wilt virus	(TSWV, Orthospovirus)
tomato yellow leaf curl virus	(TYLCV; Begomovirus)

LISTA DE ABREVIATURAS

6K1	6 kDa protein 1
6K2	6 kDa protein 2
A	Abscisión
AGO	Familia de proteínas Argonata
AL	Cultivo al aire libre
ALH	Cultivo hidropónico al aire libre
Avr	Factor de avirulencia
Cas	Enzimas con actividad endonucleasa asociadas a CRISPR
CC	Coiled coil
CDP-STAR	Substrato quimioluminiscente CDP-STAR
CH₂	Etileno
CI	Proteína de inclusión cilíndrica / Cylindrical inclusion protein
CP	Coat protein, Cápside Protéica ó cubierta protéica
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSPD	Substrato quimioluminiscente CSPD
DAS-ELISA	Double-antibody sandwich ELISA
DCL	Dicer like protein / Proteína tipo Dicer
DDI	Días después de inoculación
DDS	Días después de la siembra
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
dsRNA	Double strand RNA / RNA bicatenario
EB	Euskal Baserri
EL	Eusko Label
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ExB	Extraction buffer o Tampón de extracción para DAS-ELISA
GILBE	Asociación de horticultores de Gipuzkoa

H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HC-Pro	Helper component-protein
Hel	Helicasa
HR	Hypersensitive response o respuesta de hipersensibilidad
HRM	High Resolution Melting
HRS	Respuesta de hipersensibilidad sistémica
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IH	Invernadero hidropónico
IS	Invernadero suelo
IT	Invernadero Total
JA	Ácido jasmónico
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
L (1, 2, 3, 4)	Gen de resistencia a Tobamovirus en <i>Capsicum</i> spp.
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
M	Mosaico
MCS	Sitio de clonaje múltiple
MH/HM	Molecular hybridization/ Hibridación molecular
(mi)RNA	Micro RNA
MP	Proteína de movimiento
mRNA	RNA mensajero
Mtr	metiltransferasa
NB-LRR	Nucleotide binding- Leucine Rich Repeat
NGS	Next Generation Sequencing
Nla	Nuclear inclusion a (proteínase)
NlaPro	Dominio proteasa de Nla
Nlb	Nuclear inclusion b (viral RNA polymerase)
NO	Óxido nítrico
ORF	Open Reading Frame
P3	Protein 3

pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa
PIPO	Pretty Interesting Potyvirus ORF
pMOG 800	plásmido binario pMOG 800 resistente kanamicina
PN	Puntos necróticos
pSK+	pBluescript II SK (+)
pUC18	plásmido pUC18 resistente a ampicilina y sitio de clonaje múltiple
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PVP	Precio venta al público
qPCR	Quantitative PCR / PCR cuantitativa
QTL	Quantitative Trait Loci
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RC (1, 2, 3, 4)	Retrocruzamiento o backcross
RDR	RNA polimerasas dependientes del RNA del huésped
RdRp	RNA dependent RNA polimerasa
RE	Resistencia extrema
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RISC	RNA induced silencing complex / complejo silenciador inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA silencing o RNA de interferencia
RNAss+	RNA de cadena simple y polaridad positiva
RNP	Ribonucleoproteínas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPA	Recombinase polymerase amplification
RT-PCR	Reverse transcription PCR / PCR de transcripción inversa
SA	Ácido salicílico
SAP	Fosfatasa alcalina termosensible
SAR	Systemic Acquired Resistance
SIMA	Servicio Investigación y Mejora Agraria Gobierno Vasco (actualmente NEIKER)
siRNA	Small interfering RNA

SNP	Single nucleotide polymorphism
TE	Tampón de extracción (Tris HCl 10 mM + EDTA 10 mM, pH 8,0)
TIR	Toll and Interleukin-1 Receptor
TM	Tampón de muestra (citrato sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5)
UTR	Untranslated region ó regiones no traducidas
VPg	Viral genome-linked protein
VRC	Virus Replication Complex

0. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis se organiza en cinco bloques principales. El primer bloque, que se desarrolla a lo largo de la Introducción, aborda exhaustivamente el cultivo de pimiento en Euskadi, detallando las principales variedades locales cultivadas, los sistemas de cultivo empleados, así como su estado fitosanitario. El segundo bloque expone las diversas prospecciones y muestreos realizados en parcelas de agricultores, tanto en cultivos de pimiento como en flora silvestre en parcelas al aire libre, empleando diferentes métodos de detección. La tercera parte describe la validación de polisondas de hibridación molecular (HM) que pueden detectar simultáneamente 9, 12 y 21 virus que afectan globalmente al cultivo de pimiento, comparando estas polisondas frente a sondas individuales de HM y test de DAS-ELISA, analizando la influencia de la longitud y posición de las sondas individuales dentro de las polisondas en la sensibilidad de detección. En la cuarta sección, se examina el análisis molecular de un nuevo tobamovirus, su transmisión de semilla a planta y su efecto tras la inoculación en variedades con diferentes alelos de resistencia 'L' a tobamovirus. Finalmente, la quinta sección presenta los resultados de un programa de mejora genética por retrocruzamiento asistido con marcadores moleculares para incorporar genes de resistencia a tobamovirus en variedades locales de Euskadi.

A continuación, se describen los diferentes estudios abordados y su interrelación con el ánimo de mostrar el hilo conductor de la estructura de la tesis y facilitar la comprensión al lector.

Las variedades locales de pimiento de Euskadi, entre las que destacan los tipos varietales pimiento de Gernika (cv. Derio) y guindilla de Ibarra (cv. Ibarroria), son sensibles a varias enfermedades que ponen en peligro el futuro de su cultivo. Entre estas patologías destacan las enfermedades de suelo y las virosis, siendo estas últimas las que han producido mayor incertidumbre entre los agricultores en los últimos años.

Esta preocupación conllevó a que varios agricultores y asociaciones de horticultores tanto de Bizkaia como de Gipuzkoa se pusieran en contacto con el Gobierno Vasco (GV) en el año 2013, para manifestar su preocupación por las pérdidas que venían ocasionando las virosis en cultivo de Pimiento en Euskadi. Los responsables del Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del GV se pusieron en contacto con NEIKER para que se estudiase la problemática y se le intentase dar una solución.

En 2014, se llevó a cabo una prospección a gran escala en 97 parcelas profesionales de pimiento pertenecientes a 44 localidades de Euskadi, muestreándose 1.107 plantas individualmente, con el objetivo de determinar qué virus eran los más importantes y los que mayores daños estaban causando en el cultivo. El análisis de las muestras fue realizado por DAS-ELISA, analizándose 7 virus (5 Tobamovirus, PVY y TSWV). Estas analíticas fueron encargadas a otro laboratorio (COMAV, UPV-Valencia) ya que en el laboratorio de Horticultura de NEIKER no se disponía de herramientas para analizar virosis. Además, se determinó el patotipo al que pertenecían los diferentes aislados de tobamovirus obtenidos mediante un

bioensayo de inoculación sobre un conjunto de variedades de pimiento con diferentes genes de resistencia.

Vista la importancia de disponer de herramientas analíticas para la detección de virosis, en el Laboratorio de Horticultura de NEIKER se puso a punto la técnica de Hibridación Molecular (HM). Esta técnica de detección nos permitiría detectar virus a bajas concentraciones, analizar nuevos virus que no se habían evaluado en la zona y además su procedimiento permitía cribar gran cantidad de material vegetal. También se trataba de una técnica asumible económicamente para el departamento. Para ello, NEIKER se puso en contacto con el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV-Valencia). Junto a ellos, se diseñaron sondas específicas que permitían detectar hasta 21 virus y 2 viroides que afectan al cultivo de pimiento a nivel mundial. Además, también se diseñaron 3 polisondas con capacidad para detectar 9 (poly9), 12 (poly12) o 21 (poly21) virus simultáneamente, que representaban los virus menos comunes, los más prevalentes o todos juntos, respectivamente, que afectan al cultivo de pimiento en Euskadi. En este trabajo se ha evaluado el comportamiento de estas polisondas comparando sus resultados con los obtenidos con las sondas individuales y con DAS-ELISA. Además, con las sondas individuales en 2019 se realizó otra prospección a gran escala en parcelas profesionales de pimiento, analizando 1.199 plantas de forma individualizada y evaluando 21 virus y 2 viroides.

Dada la alta incidencia de virus transmitidos por áfidos de forma no persistente, como CMV y PVY, en el cultivo al aire libre de guindilla de Ibarra, se realizaron muestreos en la flora silvestre de las parcelas y sus alrededores y fueron analizados con sondas específicas de ambos virus. Esto tenía como objetivo confirmar si la flora silvestre podría ser una de las fuentes primarias de inóculo de estos virus.

A partir de 2017, comenzaron a llegar muestras con síntomas típicos de tobamovirus al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Diputación de Bizkaia. Las muestras daban resultados negativos a todos los tobamovirus evaluados con los sueros de la casa Loewe y resultaban positivas a TMGMV con los sueros de la casa Bioreba. Además, en la prospección 2019 se detectaron muestras positivas por HM al tobamovirus bell pepper mosaic virus (BPeMV), siendo estos positivos claros pero muy tenues. Esto nos hizo pensar que podría tratarse de este tobamovirus u otro que tuviera una secuencia parecida a BPeMV. Por otro lado, al laboratorio de referencia de virus herbáceos (UPV-Valencia) también llegaron otras muestras de Granada que mostraron un comportamiento similar, aunque con pequeñas diferencias, al analizarlos serológicamente. El análisis de RT-PCR utilizando cebadores universales para tobamovirus, permitió la amplificación de una banda específica. La secuenciación de esta banda reveló una alta homología con BPeMV, tanto en los aislados de Bizkaia como en los de Granada. Tras analizar 8 muestras infectadas, seis mostraron positividad a BPeMV por DAS-ELISA. Los resultados obtenidos indicaron la posible presencia de un nuevo tobamovirus en pimiento, o alternativamente, de un aislado del virus BPeMV. Para salir de dudas se procedió a obtener la secuencia completa de ambos aislados (Bizkaia y Granada). En este trabajo, además se han evaluado aspectos epidemiológicos de estos aislados, como son la transmisión de semilla a planta en las variedades "Derio" y "Celta", así como bioensayos de determinación de patotipo del tobamovirus en variedades de pimiento con diferentes genes de resistencia.

Una vez evaluados los resultados de la prospección realizada en 2014, se decidió comenzar un programa mejora genética para introducir genes de resistencia a tobamovirus en las variedades locales de pimiento. En 2015, se inició un programa por retrocruzamiento asistido con marcadores moleculares para transferir los genes de resistencia L3 y L4 a las variedades locales sensibles a tobamovirus “Derio” e “Ibarroria”. Tras las siete generaciones del programa de mejora, se procedió a evaluar la resistencia de los genotipos obtenidos en ensayos de inoculación con diferentes patotipos de pepper mild mottle virus (PMMoV). Estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos con marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia L3 y L4. Finalmente, durante 2 campañas se realizaron ensayos de producción para determinar qué genotipos eran los más productivos y para ver su comportamiento a lo largo del ciclo de cultivo.

En el siguiente esquema gráfico se muestra la estructura de la tesis (Figura 0.1).

ESTRUCTURA GRÁFICA DE LA TESIS

VIROSIS EN PIMIENTOS DE EUSKADI



Figura 0.1. Guía de la estructura de la Tesis, que detalla los principales apartados estudiados durante su desarrollo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cultivo de pimiento en el Mundo

El cultivo de pimientos picantes y dulces (*Capsicum* spp.) es uno de los cultivos de hortalizas y de especias más importantes a nivel global (Gniffke et al., 2013), con una producción actual de 41 millones de toneladas (Faostat, 2021). La superficie cultivada de pimiento en todo el mundo alcanzó casi 2 millones de hectáreas en 2018, liderando la mayor parte de la producción mundial el continente asiático, que contribuyó con el 66,6 % del área cultivada. Le siguieron África y América con un 15,7 % y 12,2 % respectivamente (Figura 1.1). Ese mismo año, en el continente europeo se cultivaron 106.904 has, representando el 5,4 % de la superficie mundial cultivada. En Oceanía solo se cultivó el 0,1 % de la superficie global de pimiento (Faostat, 2020). La producción mundial de pimiento tuvo un crecimiento constante durante las últimas 3 décadas, principalmente debido a las nuevas áreas cultivadas en Asia y al aumento del rendimiento a nivel global (Faostat, 2020).

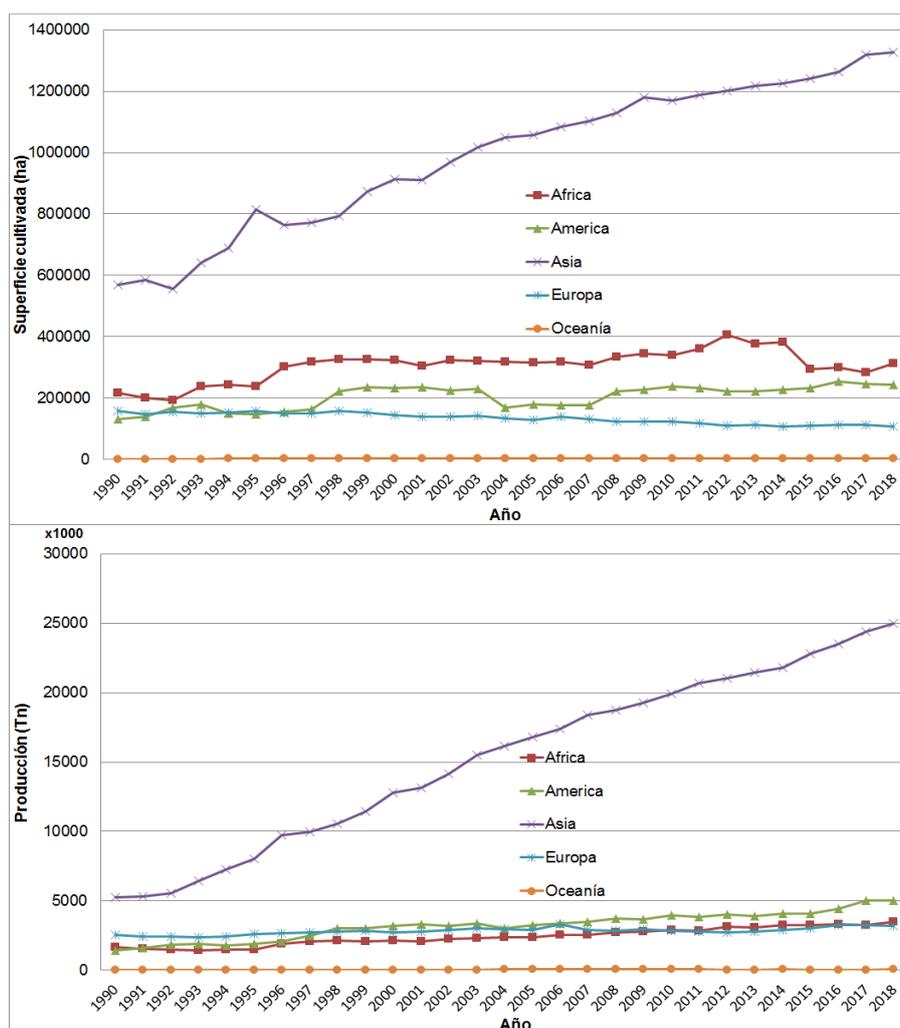


Figura 1.1. Evolución de la superficie y de la producción del cultivo de pimiento (*Capsicum* spp.) en los diferentes continentes durante el período 1990-2018 (Fuente: FAOSTAT, 2020).

En 2018, China fue el mayor productor de pimienta en el mundo, ocupando el 38,6 % de la superficie global cultivada (769.078 has) y el 49,4 % de la producción mundial (Figura 1.2), con más de 18 millones de toneladas. Indonesia fue el segundo país en cuanto a superficie cultivada de pimienta (15,5 %), seguido por México (7,8 %), Nigeria (4,9 %) y Turquía (4,6 %). En cuanto a producción, México ocupó el segundo lugar, contribuyendo con el 9,2 % de la producción mundial, seguido por Turquía (6,9 %) e Indonesia (6,9 %).

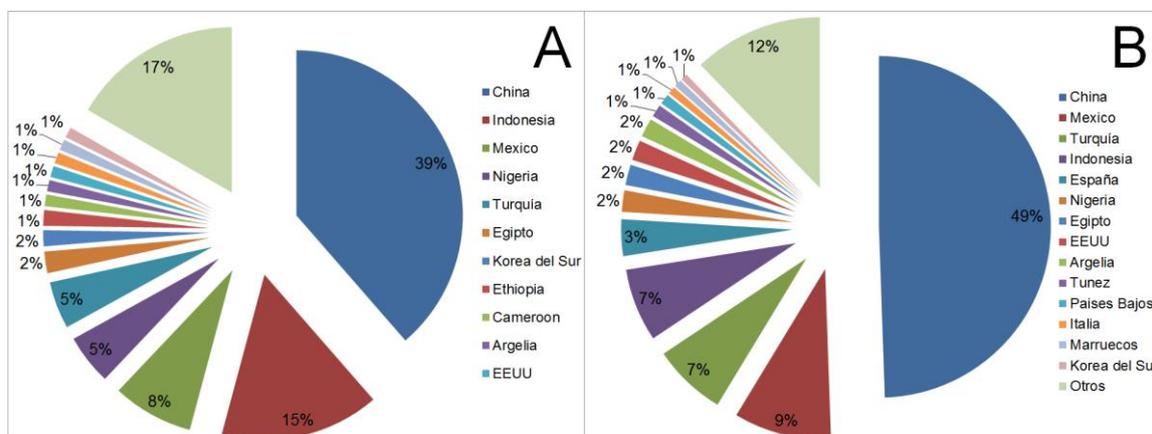


Figura 1.2. Reparto del cultivo de pimienta en el mundo por países en el año 2018. A) Porcentajes de superficie cultivada; B) Porcentajes de producciones obtenidas (Fuente: FAOSTAT, 2020).

En 2018, España ocupaba el 1,0 % (20.580 has) de la superficie cultivada de pimienta en el mundo. Sin embargo, era el quinto mayor productor de pimienta a nivel global (3,5 %), produciendo casi 1,3 millones de toneladas. Este hecho está relacionado con el elevado rendimiento y tecnificación de los cultivos intensivos protegidos del sureste del país (Almería y Murcia). En ese mismo año, España era el mayor productor de pimienta de Europa, representando el 19,2 % de la superficie cultivada y el 39,6 % de la producción total europea (Figura 1.3). En cuanto a superficie cultivada le seguían Rumanía (16,8 %) y Ucrania (14,2 %). Países Bajos fue el segundo mayor productor de Europa, contribuyendo con un 11,0 % de la producción, seguido por Italia (8,1 %) y Rumanía (7,1 %).

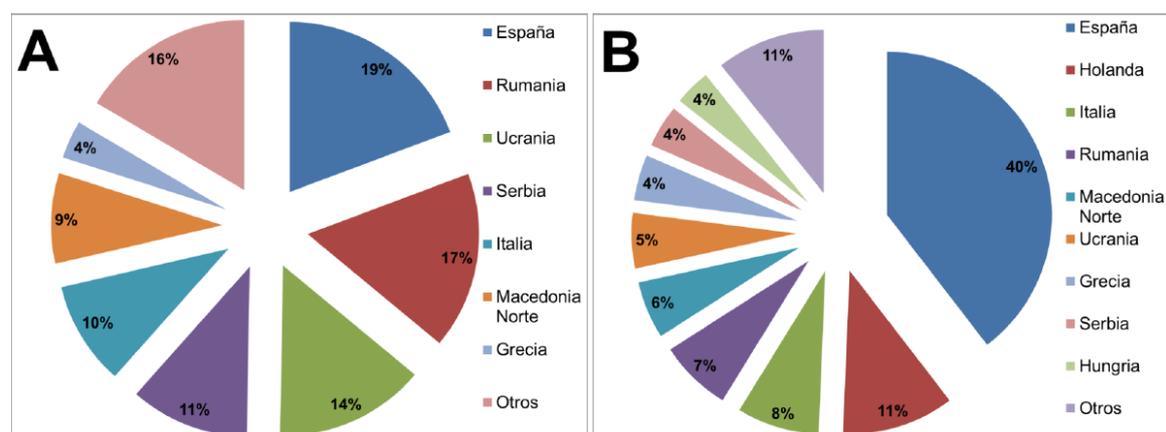


Figura 1.3. Reparto del cultivo de pimienta en los países de Europa en el año 2018. A) Porcentajes de superficie. B) Porcentajes de producción (Fuente: FAOSTAT, 2020).

Destaca el alto rendimiento que se obtiene en los Países Bajos en comparación con otros países del continente, con una producción media de casi 271.000 kg ha⁻¹, mientras que en España el rendimiento medio fue de 62.000 kg ha⁻¹. Es decir, en 2018, los Países Bajos

produjeron 4,4 veces más por unidad de superficie cultivada que España. Esta diferencia en el rendimiento del cultivo se debe a la alta tecnificación del sector agrícola en este país.

La superficie cultivada de pimiento en España experimentó una reducción considerable desde 1990 hasta 2012 (Figura 1.4), con una pérdida de 11.000 has en este periodo. Sin embargo, a partir de 2012 se observó un cambio de tendencia y la superficie cultivada de pimiento comenzó a aumentar nuevamente hasta 2018. Mientras que en 1990 se cultivaban 28.400 has, en 2018 la superficie cultivada se redujo a 20.580 has (casi 8.000 has menos). No obstante, el rendimiento del cultivo no ha dejado de crecer en las tres últimas décadas en España. Si en 1991 se obtenían rendimientos medios de 28.400 kg ha⁻¹, en 2018 se logró más del doble, con un rendimiento de 61.975 kg ha⁻¹.

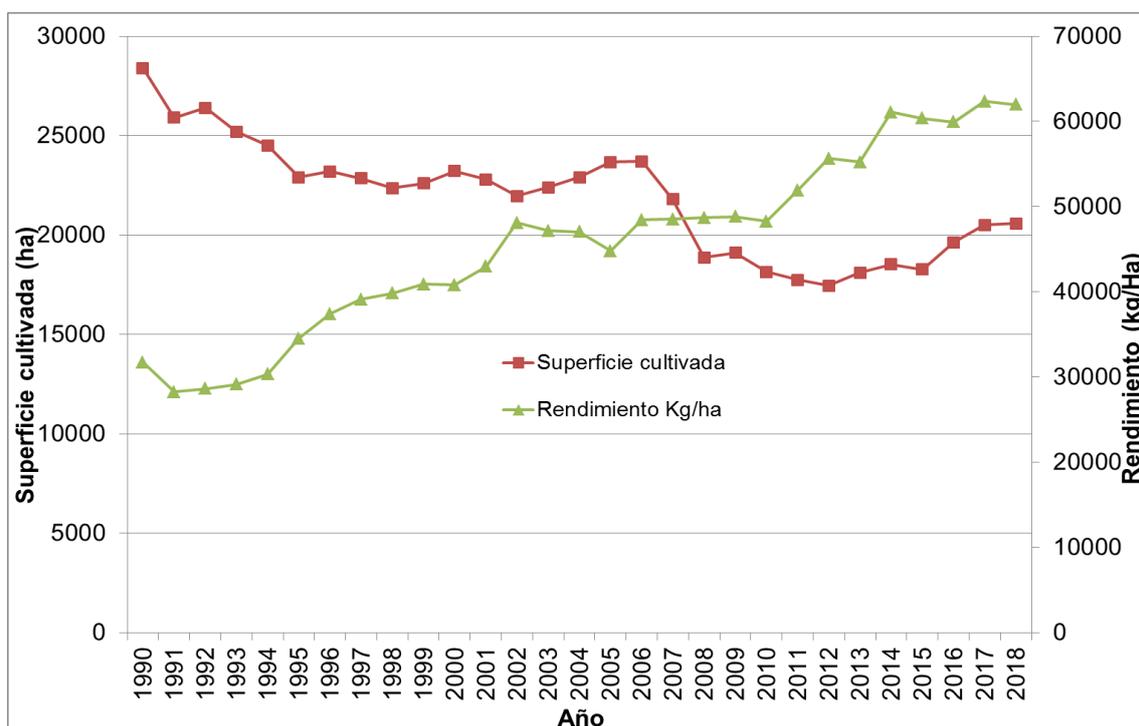


Figura 1.4. Evolución de la superficie cultivada y del rendimiento del cultivo de pimiento (*Capsicum* spp.) en España durante el período 1990-2018. (Fuente: FAOSTAT, 2020).

La producción de pimiento en España representó el 8,5 % del total de la producción de hortalizas en el país en 2018, situándose por detrás del tomate, que representó el 31,8 %, e igualada con la cebolla. Le siguieron de cerca la sandía (7,3 %) y la lechuga (6,2 %) (Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura, 2018).

Las principales comunidades autónomas productoras de pimiento son Andalucía y Murcia, que representaron el 65,6 % y el 12,9 % de las producciones a nivel estatal, respectivamente (Tabla 1.1). Tras estas Comunidades autónomas, en orden de importancia, se encuentran Galicia, Valencia, Castilla la Mancha, Extremadura, Navarra y Canarias. Estas Comunidades Autónomas citadas, según los datos del 2018, representaron el 98,0 % de la producción de pimiento del Estado. En España, en 2018, se produjeron 147 has de pimiento en secano (0,7 %), 6.792 has al aire libre con regadío (33,3 %) y 13.460 has en invernadero (66,0 %). Los rendimientos fueron de 6.603 kg ha⁻¹, 36.379 kg ha⁻¹ y 76.053 kg ha⁻¹ para cada sistema de cultivo, respectivamente. A pesar de los bajos rendimientos obtenidos en Euskadi, que presentó el 1,0 % de la superficie

cultivada y el 0,2 % de la producción estatal, el cultivo de pimiento tiene un gran arraigo a nivel cultural, gastronómico y de cultivo. Esto se debe a la existencia de variedades locales muy valoradas por su elevada calidad organoléptica y diferentes características, lo que ha posibilitado la creación de distintivos especiales de origen y calidad que permiten diferenciar el producto y comercializarlo a precios más elevados.

Tabla 1.1. Análisis por Comunidades Autónomas de superficie, rendimiento y producción del cultivo de pimiento para el año 2018. FUENTE: Anuario de Estadística Agraria, 2018

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Galicia	–	562	628	1.190	–	52.949	61.690	68.499
Asturias	50	20	–	70	8.000	15.000	–	700
Cantabria	1	5	1	7	12.000	12.600	50.400	126
Euskadi	68	107	38	213	5.559	12.513	29.053	2.821
Navarra	–	971	29	1.000	–	29.400	35.000	29.562
La Rioja	–	198	3	201	–	29.000	41.000	5.865
Aragón	–	135	3	138	–	15.719	47.000	2.263
Cataluña	2	208	46	256	4.600	21.826	41.555	6.461
Baleares	–	75	36	111	–	22.800	41.000	3.187
Castilla León	–	104	12	116	–	16.733	29.708	2.097
Madrid	–	12	2	14	–	27.000	50.000	424
Castilla Mancha	17	972	1	990	5.529	41.648	48.000	40.624
C. Valenciana	–	444	386	830	–	39.086	105.537	58.092
Murcia	–	281	1.268	1.549	–	78.194	112.000	163.989
Extremadura	–	784	12	796	–	40.842	200.800	34.430
Andalucía	6	1.851	10.799	12.656	8.667	30.522	72.025	834.336
Canarias	3	63	196	262	8.500	40.883	79.865	18.245
España	147	6.792	13.460	20.399	6.603	36.379	76.053	1.271.721

Los sistemas de cultivo empleados en España son muy variados, así como los destinos de la producción (en fresco, industria conservera y obtención de pimentón). Aunque sea una generalización bastante amplia, podría decirse que la producción para consumo en fresco, que se exporta a Europa (tipos Lamuyo y California), suele concentrarse en la franja litoral mediterránea, en sistemas de cultivo protegido. Para la obtención de pimentón, tradicionalmente se ha cultivado en regadío al aire libre en Murcia y Extremadura, aunque a partir de finales de los 90, se ha comenzado a extender por Albacete. La producción destinada a la industria conservera se ha situado en Aragón, Navarra y La Rioja.

El año 2017, las 20.300 has de pimiento cultivadas en España produjeron 1,27 millones de toneladas y se estima que tuvieron un valor de mercado de unos 1.000 millones de euros, ya que se vendió a 0,79 € kg⁻¹. El precio medio percibido por los agricultores entre los años 2007 y 2017 fue de 0,76 € kg⁻¹. Este valor ha oscilado en este periodo entre 0,61 € kg⁻¹ (año 2012) y 0,91 € kg⁻¹ (año 2015) (Anuario de Estadística Agraria de 2018).

Además, el Anuario de Estadística agraria de 2018 ofrece información sobre el cultivo de guindilla (Tabla 1.2), y en él se observa que Navarra fue la comunidad autónoma que más

guindilla produjo a nivel estatal (52,4 %), seguida de Andalucía (19,8 %) y Euskadi (11,5 %). En España se produjeron 11 has en condiciones de secano (6,1 %), 160 has al aire libre con regadío (89,4 %) y 8 has en protegido con regadío (4,5 %). Los rendimientos fueron de 4468 kg ha⁻¹, 20.765 kg ha⁻¹ y 34.000 kg ha⁻¹ en cada sistema de cultivo, respectivamente.

Tabla 1.2. Análisis por Comunidades Autónomas de superficie, rendimiento y producción del cultivo de guindilla el año 2018 en diferentes sistemas de cultivo. FUENTE: Anuario de Estadística Agraria, 2018

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			Total	Rendimiento (kg/ha)		Producción (toneladas)	
	Secano	Regadío			Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido					Aire libre
Euskadi	11	21	2	34	4.468	14.379	36.000	423
Navarra	–	61	5	66	–	28.000	35.000	1.883
La Rioja	–	5	–	5	–	10.800	–	54
Aragón	–	2	–	2	–	20.952	–	42
Cataluña	–	11	–	11	–	12.909	–	142
Baleares	–	1	–	1	–	18.000	–	18
Extremadura	–	9	–	9	–	14.000	–	126
Andalucía	–	26	–	26	–	26.558	–	691
Canarias	–	24	1	25	–	10.000	25.000	265
España	11	160	8	179	4.468	20.765	34.000	3.644

1.2. Cultivo de hortalizas en Euskadi y la importancia del pimiento.

Los principales cultivos de hortalizas de Euskadi son lechuga, tomate, judía verde y pimiento. En 2018, se produjeron 9.052 toneladas de lechuga (34,9 %), casi 6.000 toneladas de tomate (23,1 %), 2.900 toneladas de judía verde (10,9 %) y 2.821 toneladas de pimiento (10,8 %) (Figura 1.5). En los últimos años, ha habido una drástica caída en la producción de pimiento, perdiendo así el tercer lugar que venía mantenido durante la última década. Esta disminución en la producción podría estar relacionada con la jubilación de algunos agricultores y la falta de relevo generacional, así como con los cambios en los hábitos alimenticios.

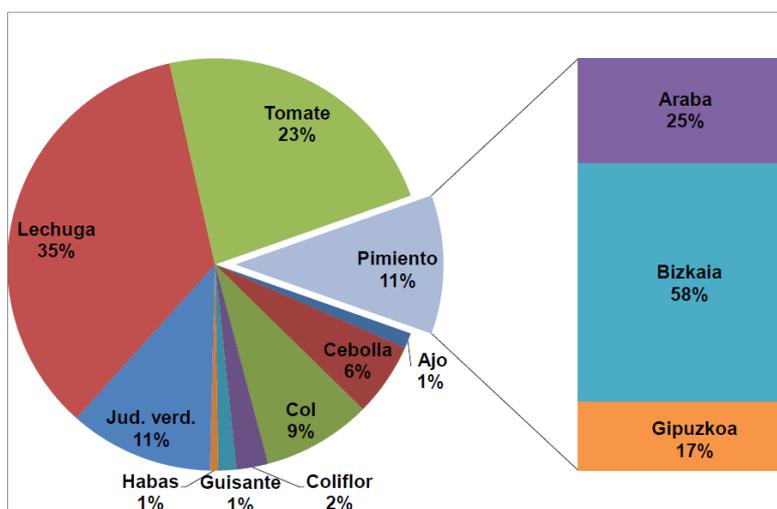


Figura 1.5. Importancia de la producción del cultivo de pimiento en Euskadi en comparación con el resto de las hortalizas y porcentaje de producción de pimiento por provincias durante el año 2018. FUENTE: Servicio de Estadística del Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Vasco.

El sector hortícola vasco se caracteriza por la pequeña superficie dedicada al cultivo de hortalizas y el reducido tamaño de las explotaciones, factores que limitan su competitividad y exigen la implementación de estrategias de mercado distintas a la producción a gran escala para competir con precios bajos. En este contexto, la adopción de certificaciones de calidad para los productos agrarios, como Euskal Baserri (EB) y Eusko Label (EL), emerge como una estrategia prometedora para aquellas explotaciones que, al no poder incrementar su capacidad productiva, se enfocan en la producción de un producto con características especiales de origen y calidad. El objetivo es incrementar el valor añadido del producto, facilitando su venta a los consumidores locales (Alberdi-Collantes, 2002).

EB es un distintivo que trata de garantizar el origen de las hortalizas de Euskadi y está pensado para que los consumidores identifiquen fácilmente los géneros ofertados por los horticultores de Euskadi. Con el objeto de desarrollar aún más este tipo de producciones y aprovechando la demanda que tienen en el mercado, se optó por desarrollar certificados de calidad, con su propio sistema de control, diferenciación y garantía de calidad (entidad certificadora HAZI Fundazioa) mediante la marca EL. Los objetivos de la marca EL son proporcionar a los consumidores un medio que les permita distinguir los productos cuya calidad supera la media general dentro del conjunto de la oferta alimentaria; y por otro, que los agricultores de productos agroalimentarios de alta calidad puedan disponer de elementos distintivos que les permitan destacarse y salir del anonimato (Alberdi-Collantes, 2002).

Actualmente, seis productos hortícolas están regulados por un sello de calidad: la Guindilla de Ibarra, el Pimiento de Gernika, el Tomate, la Patata de Álava y las Legumbres de Euskadi (Alubia de Tolosa, Alubia Pinta Alavesa, Alubia Arrocinca Alavesa, y Garbanzo de Álava) (HAZI, 2024). La estrategia de estos productores consiste en enfocarse en la calidad y singularidad de sus productos en lugar de la cantidad producida, creando un valor añadido que los distingue en el mercado.

La mayor producción de Pimiento en Euskadi en 2018 se realizó en Bizkaia, donde se cultivaron 132 ha (61,9 % de la superficie cultivada) y se produjeron 1632 toneladas, lo que representó el 57,8 % de la producción de pimiento en la comunidad autónoma (Tabla 1.3). En Araba se obtuvo el 25,6 % de la producción de pimiento y en Gipuzkoa el 16,6 % restante. Por otro lado, la provincia más productora de guindilla fue Gipuzkoa donde se cultivaron 20 hectáreas (54,1 %) y se produjeron 240 toneladas, lo que representó el 56,1 % de la producción a nivel autonómico. Le siguieron Bizkaia y Araba produciendo el 39,5 % y 5,4 %, respectivamente.

Tabla 1.3. Análisis por provincias de la comunidad autónoma de Euskadi en cuanto a superficie, rendimiento y producción del cultivo de pimiento y de guindilla el año 2018 en diferentes sistemas de cultivo. FUENTE: Anuario de Estadística Agraria, 2018.

Cultivo	Provincia	Superficie (hectáreas)			Total	Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
		Secano	Regadío			Secano	Regadío		
			Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Pimiento	Araba	–	39	6	45	–	12.780	37.000	720
	Gipuzkoa	10	19	7	36	5.900	12.000	26.000	469
	Bizkaia	58	49	25	132	5.500	12.500	28.000	1.632
	Euskadi	68	107	38	213	5.559	12.513	29.053	2.821

Cultivo	Provincia	Superficie (hectáreas)			Total	Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
		Secano	Regadío			Secano	Regadío		
			Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Guindilla	Araba	–	3	–	3	–	7.800	–	23
	Gipuzkoa	5	15	–	20	5.000	14.300	–	240
	Bizkaia	7	5	2	14	3.645	13.500	36.000	165
	Euskadi	12	23	2	37	4.210	13.278	36.000	428

De acuerdo con los datos proporcionados por la entidad certificadora HAZI, entre 2013 y 2019, se produjo un notable descenso en la superficie cultivada de pimiento tipo Gernika (Tabla 1.4). Esta disminución ha tenido un impacto significativo en la producción de este tipo de pimiento. Aunque las producciones de pimiento en EL se mantuvieron estables en 2019, hubo una disminución drástica en la producción bajo el distintivo EB. Desde 2013 hasta 2019, los precios tanto de EB como de EL para Gernikako Piperra presentaron una tendencia ascendente. Los precios medios de EB variaron entre 1,30 y 1,66 € docena⁻¹, mientras que los precios de EL oscilaron entre 1,98-2,32 € docena⁻¹. A pesar de que el número de envasadores de EL se mantuvo constante, hubo una reducción de productores a partir de 2013, lo que podría explicar la disminución de la superficie cultivada y de la producción de pimiento en este periodo. Este descenso en el número de productores puede relacionarse con la falta de relevo generacional, ya comentada inicialmente, y también con la disminución de la rentabilidad de las explotaciones ocasionada por una evolución ascendente de los problemas fitosanitarios en el cultivo.

Tabla 1.4. Evolución del número de productores, envasadores, superficie cultivada, producciones y precios del cultivo de pimiento tipo Gernika registrados en las certificaciones de Gernikako piperra Eusko label (EL) y Euskal Baserri (EB) entre los años 2013 y 2019 (Fuente: HAZI Fundazioa).

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Productores EL	29	26	22	22	24	25	25
Envasadores EL	9	9	8	7	9	8	9
Superficies EL (ha)	8,86	8,20	6,78	5,32	6,97	6,97	6,03
Superficies Pimiento (ha)	10,10	9,62	7,92	5,91	7,84	7,52	7,53
Doc. envasadas EB	372.581	435.097	334.097	398.791	467.837	479.688	292.878
Precio EB (€/docena)	1,30	1,16	1,17	1,40	1,23	1,41	1,66
Doc. envasadas EL	201.942	223.397	195.686	216.408	194.838	166.564	212.284
Precio EL (€/docena)	1,99	1,98	2,10	2,23	2,24	2,11	2,32
Total docenas (EB+EL)	574.523	658.494	529.783	615.199	662.675	646.252	505.162

Los productores de guindilla en Euskadi (Tabla 1.5) producen sobre todo guindilla Ibarrao piparra certificada con calidad EL. En el año 2019, hubo 25 productores de Ibarrao piparra (EL) y 7 productores con la certificación de producto local EB, que cultivaron casi 30 has de guindilla, según HAZI Fundazioa. En 2018 y 2019, se registró una disminución en la producción de guindillas en comparación con los dos años anteriores. Este producto tiene una alta demanda, por lo que esta disminución podría estar relacionada con los problemas fitosanitarios que han afectado a las últimas cosechas. Es un producto con gran valor añadido, y gran parte de la producción se destina a producto transformado para encurtido. Los precios de los botes en diferentes formatos se mantuvieron más o menos estables entre 2013 y 2019,

en contraposición al incremento del coste de los insumos para el agricultor, y la consiguiente reducción en el tiempo de la rentabilidad económica obtenida al producto.

Según datos proporcionados por la asociación de horticultores de Gipuzkoa (GILBE), el precio percibido por los agricultores en las envasadoras fue de 2,8 € kg⁻¹ el año 2018 y de 3 € kg⁻¹ el año 2019. Esta subida fue debida a la bajada de producción asociada a los problemas fitosanitarios. Un productor que a su vez envasaba la guindilla, en 2010 pagaba 2,7 € kg⁻¹. Esto indica que el precio se ha mantenido durante la última década, con un aumento en los precios en los últimos años.

Tabla 1.5. Evolución del número de productores, envasadores, superficie cultivada, producciones y precios del cultivo de guindilla de Ibarra registrados en las denominaciones de Ibarra Eusko Label (EL) y Euskal Baserri (EB) entre los años 2013 y 2019 (Fuente: HAZI Fundazioa).

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Productores EL	30	30	27	26	26	27	25
Productores EB	-	-	4	8	8	10	7
Superficie EL (ha)	23,99	21,95	22,60	24,68	30,11	23,84	28,54
Superficie EB (ha)	-	-	0,73	1,47	1,50	0,72	1,13
PVP 212 mL (€)	3,98	3,87	3,66	3,84	3,85	3,94	3,92
PVP 370 mL (€)	4,57	4,67	4,74	4,61	4,36	4,51	4,83
PVP 446 mL (€)	4,81	4,82	4,86	4,71	4,35	4,66	4,60
Kg entregados EL	181.418	237.160	257.630	302.472	300.217	252.533	278.945
Kg envasados EB	7.817	16.758	17.607	19.917	26.672	14.658	7.342
Total kg (EB+EL)	189.235	253.918	275.237	322.389	326.889	267.191	286.287

1.3. Tipos de pimiento cultivados en Euskadi

El uso, conservación, selección y mejora de variedades autóctonas adquieren importancia cuando se destinan a mercados locales, donde estos productos son muy valorados. De esta manera, se pueden obtener cultivos competitivos en comparación con otras variedades comerciales o con hortalizas de otras regiones, incluso si esto implica una disminución en la producción unitaria. Esta estrategia destaca la calidad y la especificidad de los productos locales, reforzando su posición en el mercado frente a la competencia (Mancho, 1988).

Los dos principales tipos varietales de pimiento que se cultivan en Euskadi son el pimiento de Gernika y la guindilla de Ibarra (Mancho, 1988; Nuez-Viñals et al., 1996; Mantxo et al., 1998). Estos dos tipos varietales tienen un gran prestigio en el mercado local, ya que disponen de características organolépticas muy apreciadas por determinados grupos de consumidores sensibles a la calidad del producto, a un sistema de producción tradicional y a producto local.

El Pimiento de Gernika se encuentra amparado por una Denominación de Origen Protegida desde el año 2007 y por una Indicación Geográfica Protegida de la Unión Europea desde finales del año 2010 (Euskadi, 2015a). Por el contrario, la Guindilla de Ibarra no posee denominación de origen, aunque se encuentra amparada bajo un certificado de Calidad Alimentaria Eusko Label, certificado por HAZI Fundazioa desde octubre de 1997 (Euskadi, 2015b). El tercer

pimiento en importancia es el pimiento de asar de Bizkaia (Larregla et al., 2008), que no está amparado bajo denominaciones de origen ni de calidad y que está asociado a la provincia de Bizkaia. Además, hay otras variedades tradicionales en Euskadi que se cultivan en menor medida y que están asociadas a una producción y consumo muy local y de autoconsumo. En este grupo están el morrón de Loiola y el pimiento corigero.

1.3.1. Pimiento de Gernika

El Pimiento de Gernika es el tipo varietal más cultivado en Euskadi. Su fruto se parece mucho al tipo varietal "dulce italiano" o "cristal", pero tiene la piel más dura en maduración, carne menos gruesa, color rojo intenso en maduración y posee una mayor capacidad de reflorcer. La planta tiene un porte medio-alto y un ciclo precoz. Los frutos son del tipo B3-B4 en la clasificación de Pochard (1966), son péndulos y pesan en torno a 40 gramos en el estado de fruto maduro. Además, es una variedad que puede ser picante debido a la capsicina presente en los frutos. La cantidad de este alcaloide viene determinada por la genética de la variedad y por el ambiente, pudiendo aumentar cuando la planta se encuentra expuesta a algún tipo de estrés ambiental (elevada temperatura, baja higrometría y déficit de riego).

El pimiento de Gernika se produce principalmente en la provincia de Bizkaia, donde este producto es especialmente apreciado y reconocido. Esta variedad se cultiva a nivel profesional en invernaderos, y a nivel de autoconsumo en pequeñas huertas al aire libre. Este pimiento es también conocido por los nombres de "Choricero", "del País" o "Gernikako piperra".

El pimiento de Gernika suele ser cultivado en diferentes sistemas de cultivo como son aire libre, invernadero en suelo e invernadero hidropónico. La plantación al aire libre se suele realizar a mediados de mayo, con una densidad de plantación de 3 a 6 plantas m^{-2} , disponiendo las plantas en líneas sencillas (3 plantas m^{-2} ; marco cultivo 1m x 0.33 m), muchas veces colocando 2 plantas en cada golpe (6 plantas m^{-2}). Las primeras cosechas se suelen dar a principios de julio y el cultivo suele durar hasta finales de septiembre. Sin embargo, en invernaderos en suelo, la plantación se suele realizar al principio de la primavera (mediados de marzo - principios de abril) y el ciclo del cultivo suele durar hasta octubre-noviembre, con una densidad de plantación de 3,5 a 4,3 plantas m^{-2} (marco cultivo 0.85 m x 0.33 m a 0.70 m x 0.33 m). Se suele utilizar acolchado plástico negro de polietileno (400 galgas) para controlar la flora adventicia. El riego suele ser por goteo y puede estar acompañado de fertirrigación (consistente en la aplicación de solución nutritiva o agua de riego con abonos disueltos). En cuanto a los invernaderos hidropónicos, se suelen realizar dos ciclos al año, de enero a finales de julio (apoyando el inicio de cultivo con calefacción) y de agosto a diciembre. Un cultivo hidropónico es un sistema de cultivo en el que las raíces de la planta se encuentran fuera del suelo y crecen en un medio o material denominado sustrato, dentro de un contenedor (saco de plástico o maceta), al que se aporta la solución nutritiva mediante el sistema de riego. Aquellos invernaderos que no disponen de sistemas de calefacción suelen optar por un ciclo de cultivo más largo (mediados de marzo - noviembre). La plantación se realiza en sacos que contienen un sustrato que puede ser lana de roca, perlita o fibra de coco mayoritariamente. Se estima que la distribución de la superficie de cultivo con estos sustratos es similar. Las tablas de lana de roca se suelen reutilizar durante dos ciclos, y los sacos de perlita durante 3 y hasta 5 años, lo que equivale de 6 a 10 ciclos de cultivo. Hoy en día se está utilizando cada vez más

como sustrato la fibra de coco (biodegradable) que va desplazando a otros sustratos. Los sacos de fibra de coco se suelen cambiar cada 3-4 años (6-8 ciclos de cultivo), pudiéndose utilizar como enmienda orgánica al suelo una vez acabada su vida útil como sustrato. La densidad de cultivo en hidropónico suele ser de 2,3 plantas m⁻². El agua empleada en la composición de la solución nutritiva proviene principalmente de pozos y ríos, y en ocasiones de agua de lluvia, que se almacenan en depósitos cubiertos o balsas. La gestión de la frecuencia y del volumen del riego se realiza mediante sistemas automatizados con sensores (bandejas de demanda con medición del nivel de líquido o por acumulación de radiación solar), que se ajustan para obtener un porcentaje de drenaje del 30 al 40 % con respecto al volumen del riego.

Es un tipo varietal de pimiento al que tradicionalmente se le han dado dos usos de consumo: para freír en verde (fruto inmaduro) y como carne desecada de pimiento choricero (fruto maduro).

1.3.1.1. Freír

El uso principal por el que actualmente se cultiva esta solanácea es para freír sus frutos recolectados en verde cuando su tamaño aún se encuentra comprendido entre los 6 y 9 cm de longitud y en torno a los 10-12 gramos de peso. Su coloración es verde, de medio a verde oscuro, siendo uniforme en todo el pimiento. La forma es estrecha y alargada, con sección triangular, con dos o tres lóculos poco marcados. También es característico por su pedúnculo o rabo, estrecho y alargado (Figura 1.6).



Figura 1.6. Detalle de varios frutos de pimiento de Gernika variedad "Derio" en estado maduro e inmaduro y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo (Fuente: NEIKER).

Durante los años 1986 y 1987, el Servicio de Investigación y Mejora Agraria del Gobierno Vasco (SIMA, actualmente NEIKER) realizó una descripción y caracterización varietal del Pimiento de Gernika a partir de seis selecciones pertenecientes a agricultores destacados de Euskadi, no encontrándose diferencias significativas entre las diferentes selecciones. A partir de esta caracterización, entre los años 1989 y 1992, SIMA realizó un programa de selección genealógica que condujo a la obtención de 14 líneas, dos de las cuales fueron inscritas en el Registro de Variedades Comerciales del Instituto de Semillas y Plantas de Vivero bajo las denominaciones "Derio" e "Iker". La selección genealógica se llevó a cabo para obtener

variedades con buena aptitud para freír, destacando la capacidad para producir frutos inmaduros en verde.

Debido a la calidad comercial del fruto, la línea “Derio” fue la mejor valorada y es la más cultivada en la actualidad (Euskadi, 2015a). Esta variedad presenta frutos con menor tendencia a formar “gabardina” en las épocas calurosas y secas, además de una mayor estabilidad en la morfología de los frutos durante todo el ciclo. La “gabardina” es un término utilizado por agricultores, técnicos y consumidores para referirse al desarrollo excesivo del grosor de la piel del fruto que lo deprecia para su principal uso como pimiento de freír. Algunos agricultores y técnicos han observado que la morfología del fruto de esta variedad, con su elevada sinuosidad, forma alargada y estrecha, y menor tendencia a la formación de “gabardina”, se asemeja más al tipo Dulce Italiano que al tipo Pimiento de Gernika, lo que sugiere una posible hibridación entre ambos tipos. La otra variedad registrada, “Iker”, apenas se cultiva en la actualidad.

En ensayos de producción realizados por NEIKER durante los años 2005 y 2006, utilizando el sistema de cultivo en invernadero con suelo y fertirrigación, se obtuvieron producciones en la variedad “Derio” de 1,8 kg planta⁻¹ y 2,5 kg planta⁻¹, respectivamente, con ciclos de cultivo que abarcaron desde finales de marzo a finales de septiembre.

1.3.1.2. Choricero

El otro uso de consumo por el que tradicionalmente ha sido cultivado este pimiento, es para la obtención de carne desecada de sus frutos, para lo que éstos se dejan madurar sobre la planta hasta que alcancen su tamaño definitivo y un color rojo uniforme. Posteriormente, se disponen en ristras para su secado, conservándolos para su uso en la elaboración de diversas especialidades culinarias como chorizos o platos típicos de la cocina tradicional vasca (marmitako, salsa vizcaína, bacalao a la vizcaína, porrusalda, alubias,...). Este uso es muy apreciado, como lo muestra el hecho de que este tipo de pimiento sea conocido como “choricero”.

Dado que las variedades de pimiento de Gernika tradicionalmente cultivadas en Euskadi fueron seleccionadas para su consumo en estado inmaduro (fritos), los pimientos obtenidos de las variedades registradas “Derio” e “Iker” no tenían las características óptimas para producir pimiento choricero o seco, debido su carne muy fina. Por este motivo, en 2012, el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario del Gobierno Vasco (NEIKER) inició un programa de selección para obtener variedades de pimiento con las cualidades adecuadas para el secado o el uso como choricero. Durante los años 2010 y 2011, se recopilieron semillas de 29 variedades de pimiento seleccionadas por diferentes agricultores locales. A su vez, NEIKER ya disponía de 39 entradas de este mismo tipo varietal en su banco de semillas de múltiples procedencias. Además, se probó una variedad comercial registrada (Cristal Chor). A partir de estas 69 líneas, se llevó a cabo la selección, incorporando otras 3 líneas interesantes de productores de pimiento choricero en los años siguientes, lo que sumó un total de 72 líneas evaluadas. En la selección se valoró que los frutos tuviesen una carne más gruesa que las variedades registradas de “pimiento de Gernika”, que fueran de mayor tamaño, que se adaptasen bien al proceso de secado, que conservaran una coloración roja intensa después del secado y que

fueran productivas. Teniendo en cuenta estas características, en 2013 se comenzó una selección masal con 20 líneas. En 2019, NEIKER procedió a inscribir en el Registro de Variedades Comerciales del Instituto de Semillas y Plantas de Vivero dos líneas bajo las denominaciones de Izartxo y Maddiper (Figura 1.7), que son adecuados para el uso como choricero.



Figura 1.7. Detalle de varios frutos de pimiento de Gernika de la variedad “Maddiper” en estado maduro e inmaduro, así como desecados y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo (Fuente: NEIKER).

Las producciones obtenidas por las variedades de pimiento choricero registradas fueron de promedio de $1,4 \text{ kg planta}^{-1}$ y $28,2 \text{ frutos planta}^{-1}$ en ensayos realizados por NEIKER durante 2 campañas en el sistema de cultivo de invernadero en suelo con fertirrigación.

1.3.2. Guindilla de Ibarra

El cultivar de guindilla de Ibarra es una planta de porte bajo, con tallos ramosos que nacen de un tallo principal que se ramifica en dos o tres ramos, los cuales vuelven a ramificarse. Los frutos son estrechos y alargados (entre 5 y 12 cm de longitud), con sección redonda, carne fina y de color verde amarillento con ligero brillo y uniforme en su coloración. El fruto es del tipo C1 (sección longitudinal triangular, muy largo, puntiagudo) según la clasificación de Pochard (1966) y suele pesar unos 10-13 g en estado maduro (Figura 1.8). Debido a su contenido en el alcaloide capsicina, presentan un sabor ligeramente picante. Este picor no suele ser muy elevado debido a la escasa insolación, temperaturas suaves, nubes y nieblas abundantes, incluso en pleno verano que se dan en la zona de producción, provocando que la planta no se estrese mucho. Además, el hecho de recolectar los frutos en estado inmaduro también contribuye a que el picor no sea excesivo (Mantxo et al., 1998).



Figura 1.8. Detalle de varios frutos de guindilla de Ibarra variedad “Ibarroria” en estado maduro e inmaduro y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo (Fuente: NEIKER).

La guindilla de Ibarra se cultiva principalmente en una pequeña zona de Gipuzkoa conocida como “Vega de Ibarra”, siendo uno de los cultivos más importantes para los viveristas hortícolas de esta comarca (Mantxo et al., 1998). Estos viveristas suelen adquirir plántulas en viveros de otras Comunidades Autónomas, luego las “engordan” (la crecen en sus invernaderos) y las venden a agricultores y a aficionados. Sin embargo, el cultivo también se ha extendido a otras zonas de Gipuzkoa, a Bizkaia y a otras comunidades autónomas como Navarra.

Gran parte de la producción se realiza en parcelas al aire libre, con o sin regadío. La densidad de cultivo es de 5 plantas m^{-2} , con acolchado de plástico negro. Se plantan dos plantas por hoyo, debido al escaso vigor inicial de las plántulas. El cultivo tiene una duración aproximada de siete a ocho meses, comenzando con la siembra en semillero a mediados de marzo y el trasplante a mediados de mayo o principios de junio. La recolección se extiende desde julio hasta octubre, cuando llegan las temperaturas nocturnas frías. La producción por planta puede superar los 300 frutos.

El cultivo de esta variedad supone una elevada necesidad de mano de obra para la recolección. En Gipuzkoa, la producción de guindilla es el sector que más empleo genera dentro de la actividad hortícola. Durante la temporada de recolección, que va desde julio a octubre, se emplean aproximadamente 7 personas por hectárea de cultivo y se suman otros 3 trabajadores por hectárea en el proceso de envasado. En total, cada hectárea emplea a 10 personas. Se estima que alrededor de 500 trabajadores están asociados al cultivo de guindilla de forma directa, considerando exclusivamente la producción en EL. Además, la producción destinada a consumo en fresco emplea a un número significativo de personal, por lo que el impacto global de empleo es realmente mayor.

La guindilla de Ibarra es el segundo tipo de pimiento más cultivado en Euskadi. Puede denominarse como “guindilla de Ibarra”, “Ibarrako piparra”, “guindilla amarilla” o “guindilla de Tolosa”. Se utiliza principalmente para encurtidos y, en menor medida, para consumo frito. Este segundo tipo de consumo ha ido en aumento en los últimos años. En la comarca de Tolosa, los frutos verdes fritos se conocen como “Langostinos de Ibarra”. Algunos agricultores también producen pimentón a partir de frutos maduros secos de esta guindilla, aunque este mercado es minoritario. Los frutos destinados al encurtido se seleccionan por tamaño después de la cosecha, se embotellan en tarros de cristal y se cubren con una solución de vinagre.

El Servicio Investigación y Mejora Agraria Gobierno Vasco (SIMA) llevó a cabo un programa de mejora por selección genealógica en Guindilla de Ibarra entre 1995 y 1997, utilizando líneas facilitadas por cinco agricultores de la zona de Ibarra (Gipuzkoa). Este programa dio lugar a tres líneas mejoradas (2738, 3526 y 4509), una de las cuales, la línea 2738, fue inscrita en el Registro de Variedades Comerciales como “Berezi” en 2005 y en el Registro de Variedades Protegidas como “Ibarroria” en 2011 (Euskadi, 2015b), siendo este último el nombre con el que se conoce actualmente.

En el año 2019, el cultivo de guindilla produjo 286 toneladas en unas 30 has aproximadamente, localizadas en su mayoría en la provincia de Gipuzkoa (Tabla 3 y Tabla 5). Según los datos aportados por GILBE, en cultivo al aire libre en suelo se pueden obtener rendimientos de 1,1 a 2,2 kg m⁻². En parcelas vírgenes, donde no se había cultivado guindilla previamente, se obtuvieron rendimiento de 2,6 kg m⁻² en 2019. En parcelas del mismo productor, que el año 2018 presentaron una elevada incidencia de enfermedades de suelo y/o virosis, se evaluó en 2019 un sistema de cultivo mixto (colocando bloques de fibra de coco), logrando rendimientos de 2,1 kg m⁻², finalizando el cultivo en septiembre y pudiéndose alargar el ciclo productivo. Además, en 2019, otro agricultor en Gipuzkoa realizó un cultivo hidropónico al aire libre y obtuvo rendimientos de 2,6 kg m⁻².

1.3.3. Otros pimientos cultivados en Euskadi

En Euskadi, se conocen principalmente dos ecotipos de pimientos de asar. El primero, conocido como el pimiento grueso de asar de Bizkaia (Figuras 1.9 y Figura 1.10), se ha venido produciendo en la zona entre Gernika y Mungia. Es un pimiento apreciado en el mercado local y diferenciable de otros pimientos de carne gruesa. El segundo ecotipo, conocido como morrón de Loiola (Figura 1.11), se cultiva en las inmediaciones de Loiola (Azpeitia y Azkoitia). Ambos ecotipos tienen dos principales usos culinarios: pueden ser consumidos como condimento de diferentes guisos o asados como acompañamiento de algunos platos y, por otro lado, también son utilizados para la elaboración de conservas (pimientos en tiras).



Figura 1.9. Detalle de varios frutos de pimiento de asar variedad “Leuna” (línea 3E) en estado maduro y entreverado y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo (Fuente: NEIKER).



Figura 1.10. Detalle de varios frutos de pimiento de asar variedad “Luzea” (línea 9E) en estado maduro e entreverado y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo (Fuente: NEIKER).



Figura 1.11. Detalle de varios frutos maduros del pimiento grueso de asar tipo Loiola y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo donde se ven frutos maduros e inmaduros (Fuente: NEIKER).

El pimiento grueso de asar de Bizkaia es principalmente producido en invernaderos en Bizkaia. El interés de este cultivo radica en que se requiere mucha menos mano de obra en comparación con el pimiento de Gernika, la guindilla de Ibarra o el cultivo de tomate. Por ello, podría ser una alternativa muy interesante para pequeñas empresas familiares con superficie de invernaderos que no desean contratar mano de obra externa (Larregla et al., 2008). Por otro lado, el ecotipo Loiola es cultivado en pequeñas parcelas al aire libre en la zona de Azpeitia y Azkoitia (Gipuzkoa). El destino de este pimiento suele ser el autoconsumo y la venta directa en mercados locales.

Otro ecotipo cultivado al aire libre y en invernadero en la zona de Loiu y Derio (Bizkaia), es el pimiento Corigero. Este pimiento también está mayoritariamente destinado al autoconsumo y a la venta directa de cercanía. Es un fruto de carne gruesa (5 mm) pero de forma longitudinal triangular (Figura 1.12). Esta variedad, al igual que los de asar mencionadas anteriormente,

suele ser consumida como condimento de diferentes guisos o asados y como acompañamiento de algunos platos.



Figura 1.12. Detalle de varios frutos maduros del pimiento tipo corigero y su comportamiento en cultivo en invernadero en suelo con frutos inmaduros (Fuente: NEIKER).

Todas las variedades citadas arriba se han mostrado sensibles a varios patógenos que pueden ser limitantes, como es el caso de los hongos de suelo y las virosis, entre otros. Los principales problemas fitosanitarios asociados a este cultivo se comentan a continuación en el apartado 1.7.

1.4. Origen y dispersión en el mundo del cultivo de pimiento

Existen 5 especies domesticadas dentro del género *Capsicum* sp. (*C. annum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *C. pubescens*), además de al menos otras 40 especies no domesticadas (Barboza et al., 2019). La génesis del género *Capsicum* aparentemente ocurrió en los Andes, en una amplia área que abarca Perú, Ecuador y Colombia (Carrizo-García et al., 2016). La expansión posterior del género ocurrió en un sentido horario alrededor del subcontinente, abarcando Colombia, centro-este de Brasil, Paraguay, norte de Argentina, Bolivia y Perú, para luego retornar al noroeste de Sudamérica. Bolivia y Perú destacaron como importantes centros de diversificación y origen de algunas especies cultivadas. La propagación posterior de los pimientos andinos hacia América Central resultó en un clado *Annuum* que incluye la especie *C. annum*, la cual probablemente se domesticó en México a partir del pimiento silvestre *C. annum* var. *Glabriusculum* (Carrizo-García et al., 2016; Kraft et al., 2014). El pimiento fue introducido en Europa tras el descubrimiento de América en el siglo XV, siendo el punto de entrada la península ibérica. Las rutas comerciales promovieron su dispersión geográfica hacia la cuenca mediterránea, y de ahí a África, India, China e Indonesia, convirtiéndose en nuevas áreas o regiones secundarias de diversificación (Andrews, 1984).

1.5. Taxonomía y morfología de *Capsicum annuum* L.

La taxonomía de los pimientos que se han utilizado en esta tesis doctoral es la siguiente: Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Capsicum annuum* L. Taxonomy ID: 4072. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=4072>).

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta (angiospermas)
Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase: Ateridae
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Subfamilia: Solanoideae
Tribu: Capsiceae
Género: *Capsicum*
Especie: *Capsicum annuum* L.
Nombre común: Pimiento

Sin embargo, a lo largo de este trabajo también se han utilizado y mencionado otras especies del género *Capsicum*.

Además del pimiento, la familia *Solanaceae* incluye otros géneros que contienen especies cultivadas de gran importancia a nivel mundial, como la patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*).

El pimiento es una planta herbácea, cultivada anualmente, que puede variar en altura según la variedad y las condiciones climáticas y de cultivo. Tiene un tallo principal que se ramifica en dos o tres en forma dicotómica. Las hojas son verdes brillantes (claros- oscuros), y son enteras, lobuladas y lisas, con un ápice pronunciado y un pecíolo largo. Sus flores blancas, pequeñas (2-3 cm diámetro) y solitarias con pétalos puntiagudos, aparecen en los nudos del tallo y suelen ser autógamas, variando el número según las condiciones ambientales. La planta comienza a florecer con 10-15 hojas verdaderas. Los frutos son bayas huecas semi-cartilagosas en forma de cápsula, de piel lisa y con cambios de color de verde a amarillo, naranja o rojo al madurar. El tamaño y peso de los frutos varían según la variedad. Las semillas, redondeadas, aplanadas y amarillentas, varían en tamaño y forma, mientras que el número suele depender de factores como la polinización y el tamaño del fruto (FAO, 2002; Reche-Mármol, 2010).

1.6. Organización molecular del pimiento

Capsicum annuum es una especie diploide que presenta un número básico de 12 pares de cromosomas, característica que comparte con la mayoría de las especies de su género y otras especies de solanáceas de gran importancia en la agricultura, como el tomate, la patata y la berenjena (Kim et al., 2014; Qin et al., 2014).

La secuenciación del genoma del pimiento cultivado, *C. annuum*, realizada en dos proyectos separados (Kim et al., 2014; Qin et al., 2014), marca un hito en la comprensión genética de

esta especie. Las principales características de su genoma, junto con las del tomate y la patata se muestran en la Tabla 1.6. Al comparar los tres genomas, resalta el tamaño del genoma del pimiento, siendo cuatro veces mayor que el de la patata y el tomate. No obstante, esto se debe a una mayor cantidad de DNA repetitivo (principalmente elementos transponibles), asociado con la diferenciación evolutiva entre el género *Capsicum* y el género *Solanum* (Qin et al., 2014). La secuenciación también ha revelado el número de codones de inicio de transcripción, estimando más de 35.000 genes, una cantidad similar a las estimaciones para la patata y el tomate. La incorporación de esta información en los mapas genéticos de referencia previamente creados está facilitando la creación de mapas físicos, la secuenciación de numerosos genes, el desarrollo de marcadores moleculares de genes más precisos y el estudio de nuevos genes (Devran et al., 2015; Mao et al., 2015; Wang et al., 2015). Además, la comparación con genomas de otras especies ofrece nuevas perspectivas sobre la evolución y domesticación de las solanáceas (Xie et al., 2015).

Tabla 1.6: Las principales características del genoma de tres especies cultivadas de solanáceas (Qin et al., 2014; Kim et al., 2014).

Características	Qin et al., 2014				Kim et al., 2014
	Pimiento cultivado	Pimiento salvaje	Tomate	Patata	Pimiento (CM334)
Tamaño del genoma ensamblado (Mb)	3349	3480	760	727	3480
Contenido en GC (%)	34,9	35	34	34,8	35,03
Tasa de repetición (%) (transposones)	80,9	81,4	61,3	61,6	76,4
Número de genes	35336	34476	33726	38492	34903
Longitud media secuencia génica (pb)	3363	3235	3006	2476	-
Longitud media secuencia codificante (pb)	1020	1006	1063	928	1010
Promedio de exones/gen	4,27	4,04	4,6	3,49	-
Secuencia localizada en los cromosomas (%)	78,95	69,68	NA	NA	-
Genes situados en cromosomas (%)	88,29	87,37	NA	NA	-

1.7. Estado fitosanitario del pimiento en Euskadi

Aunque en el cultivo de pimiento se busca la sostenibilidad y la obtención de plantaciones productivas y saludables, no está exento de problemas fitosanitarios que pueden limitar su productividad y, por ende, el rendimiento económico de los agricultores. Entre las principales causas de pérdida en el cultivo de pimiento, destacan las enfermedades virales y las enfermedades causadas por patógenos de suelo. Además, existen algunos factores abióticos que también afectan al cultivo de pimiento en las condiciones agroclimáticas de Euskadi. Empezaremos por estos últimos.

1.7.1. Factores abióticos

Los principales factores abióticos que afectan al cultivo de pimiento en las condiciones agroclimáticas de Euskadi son la asfixia radicular, la podredumbre apical, el golpe de sol, el estrés hídrico y la salinidad (Larregla, 2003).

El pimiento es una especie muy sensible a la asfixia radicular y los síntomas pueden ser confundidos con los que producen patógenos de suelo como *Phytophthora* spp. (Tello y Lacasa, 1997). Estas alteraciones están asociadas a zonas con mal drenaje y/o con excesivos aportes hídricos. En *C. annuum*, se suelen observar signos de excesivo crecimiento de lenticelas en la corteza de la parte baja del tallo, así como muerte o engrosamiento de los tejidos corticales y leñosos. Estos síntomas provocan un ensanchamiento en la base del tallo, el cuello y las raíces principales, obstruyendo los vasos y obstaculizando el flujo de savia. Además, se reportó la descomposición de las raíces secundarias y el marchitamiento de la parte superior de la planta (Matta y Garibaldi, 1980). En cultivos al aire libre en Euskadi, si el trasplante se hace pronto y el suelo está frío, las plantas suelen sufrir amarilleo y un lento desarrollo, pudiéndose quedar la planta estancada en su crecimiento durante todo el ciclo del cultivo.

Otra alteración abiótica es la podredumbre apical del fruto o "Blossom end rot", la cual causa muerte del tejido en los frutos, reduciendo su valor comercial. Este problema fisiológico afecta a cultivos como tomates, pimientos, berenjenas y sandías. El "Blossom end rot" puede estar asociado a varios factores, incluyendo alta salinidad, niveles elevados de magnesio (Mg) y amonio (NH₄) y/o potasio (K), desarrollo deficiente del tejido del xilema, crecimiento acelerado, condiciones de humedad no óptimas (altas, bajas o variables), baja solubilidad del calcio (Ca) en el suelo, temperaturas altas y tasas de transpiración variables. Sin embargo, la razón principal de este trastorno es debida a la insuficiente velocidad con la que el calcio (Ca) se transloca hacia las zonas de elevado crecimiento activo como el ápice del fruto, donde se requiere una cantidad suficiente de este elemento para formar la estructura de las pectinas que componen las paredes de las células vegetales. Esta alteración está causada por el colapso de las paredes celulares vegetales, lo que provoca la formación de manchas necróticas hundidas en el extremo del fruto donde estaba la flor (Taylor y Locascio, 2004).

En verano destacan afecciones abióticas como el "asolado", también conocido como "golpe de sol" o "planchado de frutos". Esta afección está generalmente vinculada a la exposición a intensas radiaciones solares, lo que resulta en quemaduras en los frutos convirtiéndolos en no comerciales (Reche-Marmol, 2010). El sombreado en los invernaderos es la forma más eficaz de reducir estas pérdidas.

En el cultivo de pimiento, se identifican factores limitantes adicionales como el estrés hídrico y la salinidad, los cuales provocan alteraciones significativas en el crecimiento de las plantas a causa del estrés osmótico resultante. Estas perturbaciones afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que a su vez impacta en la producción de frutos. Según estudios previos (Lurie et al., 1986; Yanez et al., 1992; De Pascale et al., 2003), estos problemas agronómicos conducen a una reducción en la cantidad de frutos producidos y a la abscisión de flores. Además, los frutos que se desarrollan tienden a ser más pequeños, con un aumento en su nivel de picante y un incremento en el contenido de antioxidantes (Hall et al., 1987; Kopta et al., 2020; Zamljen et al., 2020; Mahmood et al., 2021).

1.7.2. Factores bióticos

La gama de patógenos que afectan al cultivo de pimiento es muy amplia e incluye “hongos” (*Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Leveillula taurica*, *Fusarium* spp.,...), bacterias (*Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Erwinia* spp.), virus (Tospovirus, Potyvirus, Tobamovirus, Cucumovirus, Begomovirus, etc...), nematodos (*Meloidogyne* spp.) e insectos (ácaros, pulgones, lepidópteros y trips) (Parisi et al., 2020).

1.7.2.1. Hongos

1.7.2.1.1. “Tristeza” o seca del pimiento

Las enfermedades de suelo que destacan tanto a nivel de Euskadi como a nivel estatal son los patógenos *Phytophthora* spp. y *Verticillium dahliae* principalmente (Andrés et al., 2003; Rodríguez-Molina et al., 2010; Blaya et al., 2015; Larregla et al., 2015; Gandariasbeitia et al., 2019; Ojinaga et al., 2020), produciendo podredumbre de raíz y del cuello de la planta, también conocida como “Tristeza” o “Seca” del pimiento debido al decaimiento generalizado que se produce en hojas seguido de la muerte de las plantas.

El principal patógeno de suelo que produce la “tristeza” del pimiento en Euskadi es *Phytophthora capsici* (Larregla, 2003). Suele resultar muy destructivo cuando las condiciones del suelo son de elevada humedad (encharcamiento) y la temperatura del suelo es media a elevada (15-23 °C) (Quirin et al., 2005). Este oomiceto termófilo (crecimiento miceliar a 35 °C) produce síntomas de pudrición en la corteza de la raíz y el cuello del tallo, marchitamiento súbito en verde, decaimiento, retraso del crecimiento, y muerte de plantas. También son considerables las pérdidas ocasionadas por *Phytophthora cryptogea*, que es un patógeno endémico mesófilo que se puede encontrar en las parcelas de pimiento de Euskadi. Los dos patógenos anteriores causan grandes pérdidas en los cultivos que se llevan a cabo en suelo, tanto al aire libre (*P. cryptogea*) como en invernadero (*P. capsici*) (Larregla, 2003). En los invernaderos del sudeste de España el oomiceto más predominante es *P. parasítica*, siendo también una especie termófila como *P. capsici* (Lacasa et al., 2013). El desarrollo de estos patógenos se ve favorecido en condiciones de encharcamiento y presencia de agua libre en el entorno radicular del suelo (Sanogo, 2006).

El segundo patógeno en importancia involucrado en la tristeza del pimiento en Euskadi es *Verticillium dahliae*, hongo patógeno vascular que penetra en las plantas directamente o a través de heridas y se propagan acrópetamente a través del xilema, provocando pardeamiento del tejido vascular, retraso del crecimiento, epinastia foliar, marchitez unilateral, clorosis, necrosis, y muerte de toda la planta (Larregla, 2003). Es una enfermedad que normalmente empieza a producir daños cuando el cultivo está avanzando (agosto - septiembre) en las condiciones agroclimáticas de Euskadi. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un decaimiento y seca de plantas por *V. dahliae* desde el comienzo del cultivo, lo que podría atribuirse a problemas en el manejo del cultivo y al monocultivo que se viene practicando.

Se han descrito resistencias genéticas a *P. capsici*, medidas por QTLs (Quantitative Trait Loci) mayores y menores, principalmente localizados en el cromosoma 5 (Walker et al., 1999;

Thabuis et al., 2003; Quirin et al., 2005), y mediados por genes mayores (Wang et al., 2016; Xu et al., 2016), siendo específicas de raza. En cuanto a la resistencia a *V. dahliae* en pimiento, no es muy común en los cultivares producidos a nivel comercial (González-Salán y Bosland, 1991), aunque recientemente se han presentado varios trabajos donde se han observado resistencias genéticas a la raza 1 de este patógeno (Gurung et al., 2015; Barchenger et al., 2017).

1.7.2.1.2. Fusariosis

El patógeno vascular *Fusarium oxysporum* suele actuar como un parásito invasor secundario, penetrando en la planta a través de daños o heridas producidos por otros patógenos (Black, 2003). Sin embargo, recientemente se ha descrito una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *radiciscapsici* que actúa como parásito invasor primario en viveros de Almería (Lomas-Cano et al., 2014). Esta cepa produce síntomas como marchitamiento sin clorosis de las hojas y retraso del crecimiento de las plantas. Además, las plantas afectadas muestran necrosis en los cuellos que se extienden a través de la raíz principal, sin afectar el xilema.

1.7.2.1.3. Rhizoctonia solani

El patógeno de suelo *Rhizoctonia solani* es muy destructivo y capaz de generar algunos síntomas tales como la caída de plantas en semilleros (damping-off) y la pudrición de raíces y tallo (Mannai et al., 2018). Sin embargo, se dispone de una amplia diversidad genética de resistencias a *R. solani* en accesiones de varias especies de *Capsicum* (Muhyi y Bosland, 1995; Anaya-López et al., 2011).

1.7.2.1.4. Oidiopsis

La enfermedad de oidiopsis o micosis foliar, causada por el hongo *Leveillula taurica*, es común hacia el final del ciclo de cultivo (septiembre-octubre) en invernaderos de Euskadi. Este hongo se caracteriza por generar manchas blanquecinas grisáceas en el envés de las hojas y lesiones de color verde amarillento en el haz, lo que a menudo conduce a una severa defoliación. La enfermedad es un problema global, particularmente severo en climas cálidos tanto secos como húmedos, causando importantes pérdidas de rendimiento (Parisi et al., 2020). Este patógeno es semi-interno, penetrando en la hoja a través de los estomas del envés y es endémico en varios cultivos de la región. Se conocen varias fuentes de resistencias genéticas a este patógeno en pimiento (Lee et al., 2001; De Souza y Café-Filho, 2003; Lefebvre et al., 2003; Jo et al., 2017).

1.7.2.1.5. Sclerotium rolfsii y Sclerotinia sclerotiorum

Sclerotium rolfsii y *Sclerotinia sclerotiorum* son dos hongos que afectan al cultivo de pimiento, generando lesiones tanto en el tallo como en las ramas de las plantas. Estas lesiones provocan marchitez generalizada en los tejidos que están por encima de la lesión. Ambas enfermedades destacan por el micelio blanco que generan en la zona infectada de la planta y por los esclerocios que generan en el mismo micelio (Yanar y Miller, 2003; Remesal et al., 2010).

Sclerotium rolfsii es un hongo altamente polífago propio de las regiones tropicales submediterráneas o de clima oceánico cálido. La gravedad de los ataques viene determinada por el número, la aptitud para germinar de los esclerocios (esféricos de aproximadamente 2 mm) que se conservan en el suelo y el vigor del crecimiento del micelio en la superficie. Un clima lluvioso (como pueden ser algunos veranos en Euskadi) y el riego por aspersión favorecen la aparición de este hongo. Los esclerocios constituyen la principal forma de supervivencia en el suelo pudiendo perdurar mucho tiempo en suelo seco, germinando rápidamente en cuanto se humedecen (Remesal et al., 2010).

Sclerotinia sclerotiorum es también un hongo polífago que afecta además a cultivos como la lechuga o el tomate en Euskadi. Los daños de este patógeno son esporádicos coincidiendo los ataques con períodos lluviosos y frescos (Yanar y Miller, 2003), así como en túneles mal ventilados. Los esclerocios que produce son más grandes e irregulares. Además, este patógeno tiene un ciclo aéreo asociado a las ascosporas (Albert et al., 2022). Se conocen accesiones de pimiento resistentes a *S. sclerotiorum* (Yanar y Miller, 2003).

1.7.2.1.6. *Pythium* spp.

El género *Pythium* alberga numerosas especies que son principalmente saprofitas en el suelo y muy ocasionalmente pueden infectar plantas. Estas especies suelen ser capaces de provocar pérdidas de plantas tanto durante la fase de semillero como en los momentos inmediatamente posteriores al trasplante (damping-off), disminuyéndose las pérdidas a medida que la planta crece (Arora et al., 2021).

1.7.2.1.7. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un parásito inespecífico que afecta a diversas especies de plantas, incluyendo hortalizas, ornamentales, cultivos extensivos, frutales y árboles forestales jóvenes, sin mostrar preferencia por un huésped específico. Este hongo puede comportarse tanto como saprofito como patógeno (Dik y Wubben, 2007). Generalmente, infecta a las plantas a través de tejidos muertos o envejecidos, o mediante heridas, desarrollando un micelio de color grisáceo (Larregla, 2003). Es particularmente dañino en ambientes húmedos y con temperaturas bajas. Durante el invierno, *Botrytis cinerea* suele sobrevivir como micelio saprofito en restos de plantas infectadas, los cuales pueden ser una fuente significativa de inóculo. Este inóculo puede dispersarse por el viento y la lluvia, adhiriéndose a las superficies húmedas de las plantas.

1.7.2.2. Bacteriosis

Las bacterias que mayores daños causan a nivel mundial en cultivo de pimiento son *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp y *Erwinia* spp. (Jones et al., 2004; Elphinstone et al., 2005). Sin embargo, no hay constancia de que estas bacterias provoquen excesivos daños en cultivos de pimiento en Euskadi (Comunicación Laboratorios Sanidad Vegetal de Bizkaia y Gipuzkoa).

1.7.2.3. Plagas

Hay varias plagas que pueden causar pérdidas en los cultivos de pimiento. Destacan los daños producidos por pulgones, trips, mosca blanca, larvas de lepidópteros y ácaros.

Los pulgones pueden formar colonias en el cultivo desde estadios muy tempranos del cultivo llegando a causar grandes pérdidas de cultivo si no se controlan adecuadamente (Sánchez et al., 2011). Los principales pulgones que afectan al cultivo de pimiento son *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. craccivora*, *Macrosiphum euphorbiae* o *Aulacortum solani*, entre otros (Sánchez et al., 2011). Los áfidos se alimentan succionando la savia de la planta y la presencia de grandes colonias de pulgones pueden causar síntomas como deformación de hojas, clorosis, defoliación, frutos abortados y necrosis (Sánchez et al., 2007; Sun et al., 2018). Además, los pulgones provocan que las hojas y frutos de pimiento se llenen de melaza y esta sea colonizada por hongos saprofitos como la “fumagina” o “negrilla” (Sánchez et al., 2011; Sun et al., 2018). Esta alteración devalúa la calidad de los frutos y disminuye el rendimiento del cultivo. Se suelen emplear para el control parasitoides del género *Aphidius*, así como depredadores como *Aphidoletes aphidimyza*. Una de las formas más eficaces para controlar a los pulgones es el empleo de “banker system”, empleando franjas de cereales con pulgones específicos de cereal (*Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae*), seguido de la suelta de los parasitoides (Andorno et al., 2014). Sin embargo, el establecimiento de estos “banker system” debe realizarse previo al cultivo para poder controlar eficientemente a los pulgones. Las colonias de pulgones en los cultivos de pimiento de Euskadi suelen ser más importantes en cultivo protegido. Sin embargo, en cultivo al aire libre, aunque normalmente no se generen colonias de pulgones, el gran número de vuelos que se produce en las parcelas (Pérez et al., 2003) puede llevar a cabo la transmisión de virus como CMV y PVY a partir de flora silvestre infectada con estos virus (Janzac et al., 2008; Moury y Verdin, 2012).

Los principales trips que se han identificado en Euskadi son *Frankliniella occidentalis* y *Thrips tabaci*. Estos insectos suelen generar daños directos provocados por su alimentación sobre la planta, pero el principal problema que pueden causar es la transmisión de tomato spotted wilt virus (TSWV), tal y como se explica más adelante detalladamente. La presencia de la especie *Heliethrips haemorrhoidalis* destaca en plantas ornamentales (Comunicación personal Laboratorio de Sanidad Vegetal de Bizkaia). El control de los trips se debe realizar con lucha biológica, realizando sueltas de ácaros depredadores como *Amblyseius swirskii* y heterópteros como *Orius laevigatus* (Colomer et al., 2011, Bouagga et al., 2018).

La principal especie de mosca blanca en Euskadi es *Trialeurodes vaporariorum*, aunque *Bemisia tabaci* también puede ser detectada. Según el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Bizkaia, cada vez hay menos *Bemisia tabaci* y es controlado eficientemente con lucha biológica. Ambas especies dañan la planta chupando la savia de las hojas. Grandes poblaciones de estos insectos pueden provocar clorosis de las hojas y un deterioro general de la planta. Al igual que con los pulgones, la alimentación de la mosca blanca también produce la formación de melaza, lo que puede reducir la producción y calidad de los frutos al generarse “negrilla” en su superficie. La presencia de esa “negrilla” en las hojas puede reducir la productividad de la hoja al reducir la cantidad de luz que llega a la superficie de la hoja (Cameron et al., 2014). Además, estos insectos suelen ser transmisores de virus del género Begomovirus (Fiallo-Olivé et al., 2020;

Ghosh et al., 2021), no habiendo constancia de la presencia de estos virus en cultivo de pimiento y tomate en Euskadi (Comunicación personal Sanidad Vegetal de Bizkaia). Sin embargo, existen registros de casos en los que lettuce infectious yellows virus (Crinivirus) ha sido transmitido a la lechuga por *B. tabaci* en Bizkaia. El control de estas plagas en cultivo de pimiento se suele realizar mediante control biológico.

Helicoverpa armígera y *Spodoptera exigua* son especies polífagas de lepidópteros de la familia Noctuidae que generan pérdidas en varios cultivos de la zona. Tanto en pimiento como en tomate, las larvas entran dentro de los frutos y se alimentan en su interior, devaluando las producciones de las parcelas. El control de estas plagas se suele realizar con aplicaciones de *Bacillus* spp., virus de la poliedrosis, feromonas de confusión sexual o tratamientos químicos (Lasa et al., 2007; Burgio et al., 2020; Cao et al., 2023; Baranek et al., 2023; Ghazaryan, 2023).

Los principales ácaros que se encuentran en las plantaciones de pimiento de Euskadi son la araña roja (*Tetranychus urticae*) y la araña blanca (*Polyphagotarsonemus latus*). En Euskadi el principal ácaro que afecta al pimiento es *Polyphagotarsonemus latus*, provocando deformaciones en brotes y hojas que se recurvan hacia el envés alargándose (Larregla, 2003). También genera sinuosidad en los nervios foliares, así como la decoloración y bronceamiento de la superficie afectada por el insecto. Las flores suelen abortar o forman frutos deformes que acaban adquiriendo un tono “pardo” tipo piel de sapo que los deja inservibles para la comercialización.

1.7.2.4. Nemátodos

Los nematodos son un grupo zoológico de invertebrados no segmentados con capacidad para habitar en una amplia gama de entornos ambientales, llegando a colonizar tanto a plantas como a animales. Algunas especies que viven en el suelo son patógenas y pueden infectar cultivos, causando pérdidas económicas significativas (Pires et al., 2022). En cultivos bajo invernadero en Euskadi, se han visto puntualmente afecciones por nematodos en la temporada de verano, cuando el suelo alcanza temperaturas más altas, siendo en parcelas de lechuga donde se han visto los mayores daños, provocando nodulaciones en las raíces (en forma de rosario) y una parada en el crecimiento de la planta, impidiendo que alcance un tamaño comercial (Gandariasbeitia et al., 2021). En cultivos de hortalizas bajo invernadero de Euskadi destaca la presencia del género *Meloidogyne*. *Meloidogyne incognita* ha sido identificado como un problema fitosanitario significativo en los suelos de los invernaderos de Euskadi al igual que el sudeste de España. Sin embargo, se ha observado la presencia de otras especies como *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. hapla* en la Región de Murcia, en cultivos de pimiento (Robertson et al., 2006, 2009). En parcelas con problemas de nematodos, cuando no se toman medidas preventivas en pre-plantación (como pueden ser la biosolarización y el uso de patrones resistentes), se pueden ocasionar grandes problemas (Ros et al., 2004, 2008).

Se conocen varios genes de resistencia a especies del género *Meloidogyne*, que han sido caracterizados como dominantes. Por un lado, está el gen *N* (Hare, 1957), que no se presenta tan eficaz a altas temperaturas (Thies y Fery, 2000). Por otro lado, destacan los genes de resistencia *Me* (*Me1-Me6*) (Barbary et al., 2015). Concretamente *Me1*, *Me3* y *N* son los genes

que se muestran eficaces frente a *M. incognita*, encontrándose en el cromosoma 9 (Djian-Caporalino et al., 2007; Barbary et al., 2015; Fazari et al., 2012).

1.7.2.5. Virosis

Los virus son uno de los principales patógenos que causan enfermedades infecciosas emergentes en las plantas (Anderson et al., 2004) y se han convertido en uno de los factores más limitantes que producen pérdidas significativas de rendimiento en los cultivos de todo el mundo (Boualem et al., 2016). Cada vez se están encontrando mayor número de especies de virus en cultivos hortícolas en todo el mundo (Simón et al., 2016). En particular, los pimientos cultivados son relativamente susceptibles a virus (Kenyon et al., 2014), provocando importantes pérdidas de producción y calidad en este cultivo (Laprom et al., 2019). Se han citado al menos 68 especies de virus en cultivos de pimiento (Pernezny et al., 2003), pero aproximadamente 20 especies pertenecientes a 15 grupos taxonómicos diferentes causan daños en el pimiento (Moury y Verdin, 2012), destacando los géneros de *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus*, *Cucumovirus* y *Begomovirus*.

En los laboratorios de Sanidad Vegetal de Bizkaia y Gipuzkoa, en plantas de pimiento analizadas desde 1997, se han detectado varios virus, entre los que se encuentran los siguientes: tomato mosaic virus (ToMV, Tobamovirus), tomato mild green mosaic virus (TMGMV, Tobamovirus), pepper mild mottle virus (PMMoV, Tobamovirus), chili pepper mild mottle virus (CPMMoV, Tobamovirus), broad bean wilt virus (BBWV, Fabavirus), cucumber mosaic virus (CMV, Cucumovirus), potato virus Y (PVY, Potyvirus) y tomato spotted wilt virus (TSWV, Tospovirus) (Anexo I).

1.8. Los virus

La palabra "virus" proviene del latín y su significado original es "veneno" o "toxina" (Matthews, 1992). Los virus actúan como agentes causales de diversas enfermedades, afectando a una amplia gama de seres vivos, tales como arqueas, bacterias, hongos, plantas, animales y humanos (Hull, 2009; Woolhouse et al., 2012; Pietilä et al., 2014; Ghabrial et al., 2015).

El primer virus fue identificado en plantas de tabaco donde una enfermedad desconocida provocaba un sabor amargo en las plantas, así como síntomas de mosaicos verde claro y verde oscuro (Mayer, 1882). Mayer inicialmente pensaba que una bacteria era la causante de la enfermedad. Tras varios estudios (Mayer, 1886; Ivanovski, 1892; Beijerinck, 1898), observaron que se trataba de un nuevo agente infeccioso, diferente de las bacterias, al que se le llamó fluido vivo contagioso (*contagium vivum fluidum*) (Beijerinck, 1898). Más adelante, Beijerinck renombró a este agente como virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus, TMV). Loeffler y Frosch (1898) también identificaron un agente contagioso similar (virus) en animales, siendo responsable de la fiebre aftosa en el ganado. El primer virus descubierto en humanos fue la fiebre amarilla transmitido por mosquitos (Oldstone, 2014).

El aspecto más destacado de los virus es su naturaleza de parásitos intracelulares obligados, y su infección puede acarrear consecuencias perjudiciales para el huésped (Read, 1994). En plantas, las enfermedades virales son los parásitos más importantes después de los hongos,

representando casi la mitad de las enfermedades emergentes en plantas (Anderson et al., 2004). Los virus en plantas causan severas enfermedades que suelen provocar pérdidas de producción y calidad en cultivos agrícolas (Tatineni y Hein, 2023). Sin embargo, los virus vegetales no son exclusivos de los cultivos, estando extendidos en ecosistemas silvestres (Cooper y Jones, 2006).

Por lo general, los virus se componen de un elemento genómico de DNA (ácido desoxirribonucleico) o RNA (ácido ribonucleico). Este componente puede ser de cadena sencilla o doble, lineal, circular o segmentada, y puede tener polaridad positiva o negativa (Mahmoudabadi y Phillips, 2018). Además, tienen un componente protéico conocido como cubierta protéica o cápside protéica (CP). En ciertos casos, este componente puede estar revestido por una bicapa lipídica (Matthews, 1992; Hull, 2009).

La mayoría de los virus que infectan plantas suelen tener RNA de cadena simple como material genético, siendo esta cadena de polaridad positiva, lo que permite que el RNA tenga la capacidad de codificar y actuar como un RNA mensajero (mRNA) directamente (Hyodo y Okuno, 2016). La gran mayoría de los virus que producen daños en los cultivos pertenecen a este grupo (RNAss+: RNA de cadena simple y polaridad positiva) (Gergerich y Dolja, 2006; Hyodo y Okuno, 2016; Choudhary et al., 2020).

El genoma de los virus de plantas tiene un tamaño que oscila entre 3-10 kilobases (kb), y excepcionalmente puede alcanzar hasta unos 30 kb (King et al., 2011). Esta limitación en el tamaño del genoma hace que el número de genes que poseen los virus sea reducido y codifiquen un número limitado de proteínas que no son suficientes para la completa replicación de su genoma. Por ello, utilizan la maquinaria de las plantas para completar su replicación y los convierte en parásitos obligados (Hipper et al., 2013; García y Pallás, 2015; Hyodo y Okuno, 2016; Choudhary et al., 2020). Las proteínas codificadas por los virus suelen ser utilizadas muy eficientemente para la replicación del genoma, modulando el metabolismo de las células del huésped (Hyodo y Okuno, 2016).

1.8.1. Ciclo infectivo de los virus

Los virus se distinguen por su dependencia de los huéspedes en su ciclo de infección. Son parásitos intrínsecamente dependientes que requieren invadir células huésped para replicarse (Hipper et al., 2013; García y Pallás, 2015; Choudhary et al., 2020) y completar su ciclo infectivo, que incluye la replicación, encapsulación, movimiento intercelular y transporte a larga distancia (Hipper et al., 2013). La infección efectiva ocurre cuando el virus encuentra factores de apoyo adecuados en el huésped y logra evadir sus defensas (García y Pallás, 2015) y la patogénesis se da cuando la infección viral altera la fisiología del huésped, causando anomalías en su desarrollo y otros síntomas considerados como signos de enfermedad (Mandadi y Scholthof, 2013).

Los viriones (formas extracelulares completas e infecciosas de un virus) penetran en las células de las plantas a través de la pared celular mediante heridas mecánicas en las células epidérmicas o por la acción de insectos, ácaros, nemátodos u hongos que se alimentan de la planta (Scholthof, 2005; Navarro et al., 2019). Una vez dentro de la célula vegetal, los viriones

se desensamblan, un proceso que puede ser provocado por varias causas, entre ellas las alteraciones del pH y los cambios en el Ca^{2+} intracelular que pueden desestabilizar la cubierta (Hipper et al., 2013). Las proteínas de replicación viral reclutan proteínas del huésped junto con los RNA virales para formar nuevas estructuras membranosas similares a orgánulos, denominadas complejo de replicación viral (VRC; "Virus Replication Complex") (Hyodo et al., 2014; Choudhary et al., 2020). La formación del VRC, estrechamente asociado con las membranas e induciendo la proliferación y cambios morfológicos de las membranas intracelulares del huésped, es un sello distintivo de la replicación de los virus de RNA (+) (Hyodo et al., 2014).

A través de la traducción, se producen proteínas estructurales como la cápside protéica (CP) y otras no estructurales como la replicasa y la proteína de movimiento (MP), además de otras proteínas virales específicas. Después, el material viral se transporta desde las células inicialmente infectadas hacia las células adyacentes o cercanas, un proceso que ocurre a través de los plasmodesmos, que suelen ser modificados por las MP (Scholthof, 2005; Schoelz et al., 2011; Navarro et al., 2019). Una vez infectadas las células vecinas, el virus entra al sistema vascular para infectar las partes distantes de la planta a través del floema (Pallás et al., 2011; Hipper et al., 2013; Iftikhar et al., 2020). Finalmente, el virus sale de los tejidos vasculares, dando lugar nuevamente a la infección de las células adyacentes al tejido vascular mediante el transporte a corta distancia (Hipper et al., 2013; Scholthof, 2005). El éxito de la infección se basa en una estrecha relación entre las proteínas del virus y las proteínas estructurales y reguladoras del huésped (Hollander et al., 2016).

1.8.2. Formas de transmisión de los virus

La forma en que los virus de plantas comienzan a colonizar un huésped no infectado se ve significativamente determinada por la forma de transmisión de cada virus (Roossinck, 2010). Destacan dos formas generales de transmisión de virus. Por un lado, está la propagación horizontal de virus de una planta a otra, que ocurre entre plantas de la misma generación. Por otro lado, está la transmisión vertical que consiste en la transmisión del virus a través de la semilla a la descendencia.

La transmisión horizontal suele suceder mediante vectores como artrópodos, nematodos, hongos o oomicetos, así como a través de la reproducción vegetativa usando injertos o tubérculos, o por contacto directo entre plantas (Hull, 2009; Navarro et al., 2019). También puede ocurrir durante las actividades agrícolas llevadas a cabo por los trabajadores. La forma más común de transmisión horizontal de virus es a través de insectos hemípteros, como áfidos y moscas blancas, habiendo más de 500 virus transmitidos de esta manera (Feres y Raccah, 2015). Otros insectos, como los trips, también juegan un papel crucial en este tipo de transmisión (Pappu et al., 2009). La transmisión de virus a través de estos insectos se categoriza en tres tipos: persistente, semi-persistente y no persistente, basándose en el tiempo que el insecto necesita para adquirir y transmitir el virus. Los virus de transmisión persistente requieren un período de tiempo para ser adquiridos y transmitidos que va desde minutos hasta días, incluyendo un periodo de latencia (Makkouk y Kumari, 2009; Feres y Raccah, 2015). Una vez adquiridos, estos virus pueden ser transmitidos por los vectores (trips y moscas blancas principalmente) durante toda su vida, siendo el número de insectos vectores

limitado pero específicos del cultivo infectado. Los virus transmitidos de manera no persistente son adquiridos y transmitidos en unos pocos segundos, permanecen infectivos por un corto período de tiempo y generalmente no tienen un período de latencia, transmitiéndose principalmente por muchas especies de áfidos que no colonizan el cultivo (Ferreles y Raccah, 2015). Algunos virus, sin embargo, tienen períodos de adquisición y transmisión más largos (horas) por sus vectores, clasificándose como semi-persistentes (Raccah, 1986). Estos tienen un rango más limitado de vectores, no necesitan un período de latencia y pierden su capacidad infectiva cuando el vector pasa por una muda (Ferreles y Raccah, 2015). La transmisión de virus por insectos se clasifica en dos rutas principales: la circulativa o interna, en la que el virus atraviesa las barreras intestinales del insecto, ingresa a su sistema circulatorio y se acumula en las glándulas salivales; y la no circulativa o externa, donde el virus se adhiere a la cutícula del aparato bucal o al intestino anterior del insecto sin cruzar las barreras intestinales (Ferreles y Raccah, 2015; Navarro et al., 2019). Otra de las formas importantes en la transmisión horizontal de los virus sería la que se produce de forma mecánica por contacto entre plantas o transmitido por trabajadores agrícolas con las labores de cultivo, destacando los virus del género Tobamovirus (Sacristán et al., 2011; Kenyon et al., 2014).

La transmisión vertical se trata de la transmisión del virus a la descendencia a partir de la semilla. Aproximadamente entre el 18 % y el 20 % de los virus de las plantas se transmiten por semillas (Singh y Mathur, 2004; Hull, 2009). La transmisión de virus por semillas se puede clasificar en dos tipos principales. La primera es la contaminación externa, como se observa en los tobamovirus, que infectan principalmente los tejidos externos de la semilla como la testa, el perispermo o el endotelio, permitiendo la infección de las plántulas durante el proceso de germinación, pero no suelen infectar el embrión ni el endospermo (Genda et al., 2011; Dombrovsky et al., 2017). La segunda es la transmisión interna, que se produce principalmente a través de embriones infectados por la vía paterna o materna, transmitiendo los virus a la descendencia de manera muy eficiente (Dombrovsky et al., 2017; Sastry, 2013). Por lo tanto, solo unos pocos de los virus transmitidos por las semillas pueden transmitirse como contaminantes de la superficie, como tobamovirus, mientras que el resto se transmite a través del embrión y se consideran verdaderos virus transmitidos por las semillas (Bhat y Rao, 2020). La transmisión por semillas es una estrategia de supervivencia eficaz para los virus de las plantas, especialmente para aquellos virus con rangos estrechos de huéspedes y que infectan especies de plantas anuales (Sandra et al., 2020). Estos virus pueden dispersarse a largas distancias mediante el comercio de semillas (Hull, 2002; Genda et al., 2005) y sobrevivir dentro de la semilla mientras sigan siendo viables (Sastry, 2013). Los diferentes grupos de virus muestran diferentes tasas de transmisión por semillas. Los tobamovirus suelen mostrar tasas de transmisión por semillas del 1 al 20 %, mientras que los potyvirus han causado transmisiones por semillas del 1 al 80 %. Si bien la tasa de transmisión de semilla a plántula suele ser baja en los tobamovirus, estos focos de infección son suficientes para posteriormente propagarse por contacto mecánico y generar epidemias en los cultivos (Dombrovsky et al., 2017).

1.8.3. Principales virosis en el cultivo de pimiento en Euskadi según la forma de transmisión del virus

En las condiciones agroclimáticas de Euskadi se pueden distinguir tres grupos de virus que afectan considerablemente al cultivo de pimiento y que pueden clasificarse según su modo de transmisión.

En primer lugar, están los Tobamovirus, destacando virus como TMGMV, PMMoV y ToMV (Anexo I). Estos virus son transmitidos por semilla y eficientemente transmitidos por contacto (Kenyon et al., 2014). Además, los restos de cosecha en el suelo que provienen del cultivo anterior infectado, así como la entrada del virus a partir del plantel suelen ser fuentes de inóculo importantes, provocando epidemias graves en el cultivo. En cultivo bajo invernadero las incidencias de Tobamovirus suelen ser mayores que al aire libre debido al mayor número de labores de cultivo realizados en este sistema de cultivo, favoreciendo así su transmisión por contacto.

En el segundo grupo de virus destacan PVY y CMV, que son virus transmitidos por pulgones de forma no persistente (Blanchard et al., 2008; Matthews, 1992). La transmisión es extraordinariamente rápida, adquiriendo los pulgones el virus en su estilete en pocos segundos al picar en plantas infectadas e infectando a la siguiente planta sana también en breves minutos. Estos pulgones pierden rápidamente la capacidad de infectar plantas al perder los viriones (partículas virales) que llevan en el estilete. Estos virus suelen ser transmitidos por varias especies de pulgones de forma muy eficaz (Janzac et al., 2008). Las epidemias producidas por virus de este grupo se dan sobre todo en cultivo al aire libre. En los últimos años (a partir de 2019) se ha visto incrementada la incidencia de virus CMV en los cultivos al aire libre de guindilla en Gipuzkoa (Sanidad Vegetal Diputación Gipuzkoa), produciéndose importantes epidemias y pérdidas de producción debido a la deformación que produce en los frutos convirtiéndolos en no comerciales.

En el tercer grupo de virus destaca TSWV, que es transmitido por los trips. Este virus infecta principalmente al cultivo de pimiento, tomate y lechuga, siendo la principal especie vectora *Frankliniella occidentalis* (Pappu et al., 2009). La transmisión se realiza de forma persistente circulativa propagativa (Rotenberg et al., 2015). Las larvas de *Frankliniella occidentalis*, adquieren el virus al alimentarse sobre plantas infectadas, pero solo los adultos realizan la infección. Los individuos adultos no pueden adquirir el virus, aunque se alimenten en plantas infectadas. Tras adquirir el virus por las larvas hay un periodo de latencia o incubación (4-18 días). Los trips virulíferos pueden invernar en estado de ninfas y ser portadores del virus en la campaña siguiente, cuando aparecen en forma de adultos. El virus se multiplica en el interior del insecto y su concentración aumenta con la edad de éste (Pappu et al., 2009; Rotenberg et al., 2015). Este virus causa mayores problemas en invernaderos que al aire libre ya que el vector se desarrolla mejor en estas condiciones. El trips *Frankliniella occidentalis*, vector del TSWV, se detectó por primera vez en 1989 en Gipuzkoa y en 1992 en Bizkaia. El primer diagnóstico de TSWV en Euskadi data de 1991 en el cultivo de tomate en Gipuzkoa y el primer diagnóstico en el cultivo de pimiento se registró en Bizkaia en el año 1993 (Comunicaciones con los laboratorios de Sanidad Vegetal de las Diputaciones de Bizkaia y Gipuzkoa). En las

condiciones del País Vasco, *Frankliniella occidentalis* pasa el invierno en forma de ninfa enterrada en el suelo o en forma de adulto, en el suelo o protegido entre las plantas.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, no se conocen problemas asociados a *Begomovirus* en las condiciones agroclimáticas de Euskadi (Laboratorios de Sanidades Vegetales de Bizkaia y Gipuzkoa), pero podrían ser una amenaza ya que los vectores transmisores, como *Bemisia tabaci* se encuentran en la región.

1.8.4. Estructura molecular y control genético de los principales virus que afectan al cultivo de pimiento en Euskadi

1.8.4.1. Potyvirus

Entre los virus de plantas, el género *Potyvirus* es uno de los más amplios con más de 200 especies y con distribución a nivel mundial infectando a más de 500 especies y 60 familias de plantas (Janzac et al., 2008). Los viriones de los potyvirus son varillas filamentosas y flexibles de aproximadamente 720-850 nm de largo y 12-15 nm de diámetro, con simetría helicoidal. Éstos contienen una única molécula de RNA lineal de sentido positivo, ssRNA(+), de 9,7-11 kb con un extremo 3'poli(A) y se caracterizan por codificar una poli proteína que se escinde en 10 proteínas funcionales mediante 3 proteinasas virales (Adams et al., 2005; ICTV: <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus>) (Figura 1.13). La proteína P1 actúa como una proteasa de serina, jugando un papel clave en las etapas iniciales de la replicación de los potyvirus (Pasin et al., 2014). HC-Pro, por otro lado, está involucrado en la transmisión por pulgones, la replicación del genoma, el movimiento sistémico, la transmisión por semillas de algunos potyvirus y también se ha descrito como supresor de la respuesta de silenciamiento del RNA de la planta (Valli et al., 2018). La proteína P3 se encarga de la replicación viral, la patogenicidad y está implicada en el desarrollo de síntomas (Cui et al., 2010), mientras que el cistron PIPO es esencial para la infección (Chung et al., 2008). Las proteínas 6K1 y 6K2 también están involucradas en la replicación viral y el ensamblaje del virus, interactuando con el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para facilitar la formación de las vesículas de replicación viral (Wei y Wang, 2008). La proteína de inclusión cilíndrica (CI) es parte del complejo de replicación viral y participa en el movimiento entre células (Deng et al., 2015). La NIa es una poliproteína que consta de dos dominios: la proteína viral ligada al genoma (VPg) y la proteasa (NIaPro). La VPg participa en la replicación, traducción y movimiento del virus, mientras que NIaPro es una proteinasa de serina (Martínez et al., 2016). La proteína NIb es absolutamente necesaria para la replicación del virus y presenta los motivos de secuencia conservados de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) (Li et al., 1997). Por último, la CP está involucrada en el ensamblaje de viriones, el movimiento entre células y la transmisión por pulgón (Dolja et al., 1994; Wylie et al., 2002).

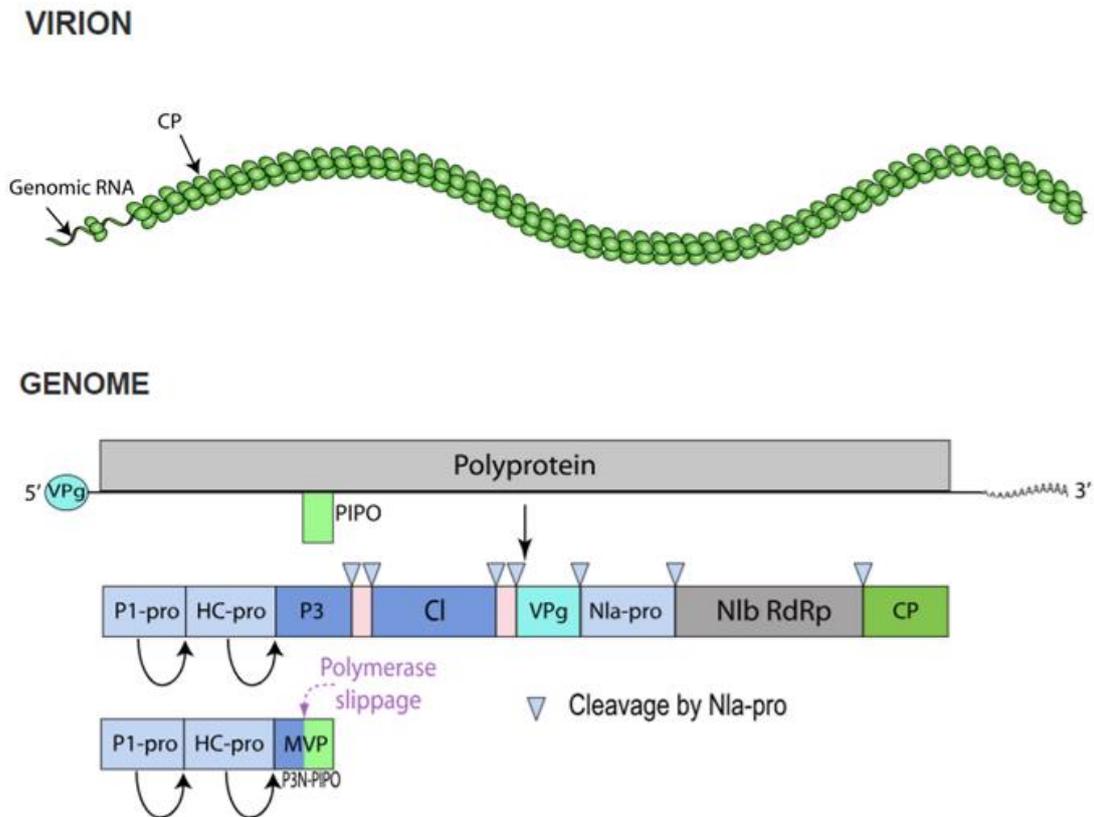


Figura 1.13. Esquema de los viriones y la organización genómica de Potyvirus. Arriba, la estructura de viriones de los potyvirus con forma de varillas filamentosas y flexibles de aproximadamente 720-850 nm de largo y 12-15 nm de diámetro, con simetría helical. Abajo, representación esquemática del genoma del *potyvirus* PVY. El genoma (ssRNA+) está representado por una línea y el marco de lectura abierta (ORF, Open Reading Frames) de la poliproteína por un recuadro abierto con los productos proteolíticos maduros nombrados. Las regiones no traducidas (UTR) están representadas por líneas en cada extremo del ORF grande, con un extremo 3' poli(A) y un extremo 5' con genome linked protein (VPg). P1: Protein 1; HC-Pro: Helper component-protein; P3: Protein 3; PIPO: Pretty Interesting Potyviridae ORF; 6K1: 6 kDa protein 1; CI: Cylindrical inclusion protein; 6K2: 6 kDa protein 2; VPg: Viral genome-linked protein; NIa: Nuclear inclusion a (proteínase); NIB: nuclear inclusion b (viral RNA polymerase); CP: Coat protein. La proteína PIPO está representada por un recuadro pequeño gris. No está a escala (Fuente: Viralzone; <https://viralzone.expasy.org/50>).

Los potyvirus son agentes patógenos que se transmiten de manera no persistente por varias especies de pulgones, causando significativas pérdidas en cultivos hortícolas como el tomate, la patata y el pimiento (Janzac et al., 2008). De las 9 Potyvirus que infectan al pimiento (Janzac et al., 2008), sólo dos especies destacan en los cultivos de pimiento de Europa: potato virus Y (PVY) y tobacco etch virus (TEV), siendo el primero prevalente en todo el continente y el segundo solamente en Turquía (Moury y Verdin, 2012). En Euskadi, PVY provoca epidemias importantes sobre todo en cultivo al aire libre, causando daños que pueden ser importantes (Figura 1.14).

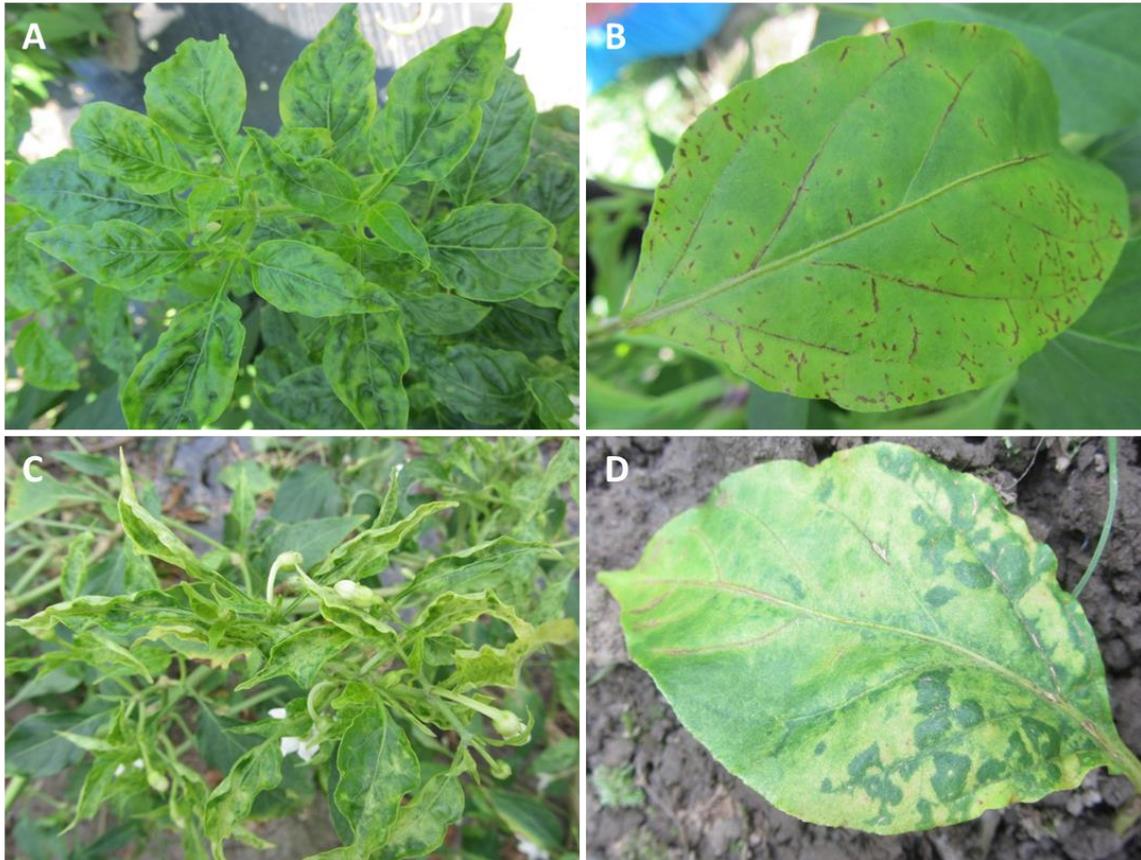


Figura 1.14. Síntomas producidos por PVY en cultivo al aire libre de guindilla de Ibarra variedad “Ibarroria”: A) Mosaicos suaves de forma generalizada en toda la planta; B) Necrosis nerviales; C) Mosaicos y deformación de las hojas enrollándolas hacia arriba; D) Mosaicos más fuertes y necrosis nervial en hoja (Fuente: NEIKER).

Se han identificado tres patotipos de PVY en pimiento (PVY-0, PVY-0.1 y PVY-0.1.2) (Blanchard et al., 2008). Por otro lado, existen varios genes de resistencia a potyvirus en pimiento, que proporcionan resistencia a varios patotipos (Tabla 1.7). El locus *pvr1*, que muestra varios alelos (*pvr1*, *pvr1*¹, *pvr1*²; identificados en accesiones de *C. chinense*, *C. annuum* y *C. frutescens*), da resistencia a TEV (*pvr1*, *pvr1*²) y a PVY-0 (*pvr1*, *pvr1*¹, *pvr1*²) (Yeam et al., 2005; Di Dato et al., 2015). Los alelos del locus *pvr2* (*pvr2*¹, *pvr2*²), son efectivos frente a TEV, PVY-0 y PVY-0.1 y han sido identificados en *C. annuum*, utilizándose ampliamente en mejora. Hasta la fecha, se han descrito algunos aislados que remontan los genes *pvr2*¹ y *pvr2*² (Arteaga y Ortega, 1986), sin embargo, se siguen utilizando en programas de mejora ya que estos aislados no son predominantes. Ambos locus (*pvr1* y *pvr2*) se encuentran en el cromosoma 4 y son genes recesivos (Parisi et al., 2020). También han sido identificados otros genes dominantes como el *pvr4* y el *pvr7*, que algunos autores sugieren que están estrechamente ligados entre sí (Caranta et al., 1999; Grube et al., 2000), mientras que otros confirman que se trata del mismo gen (Venkatesh et al., 2018). El gen *pvr4* ha sido encontrado en varias especies de *Capsicum* en el cromosoma 10 (Caranta et al., 1999; Di Dato et al., 2015) y confiere resistencia a PVY-0, PVY-0.1, PVY-1.2 y a otros potyvirus (Janzac et al., 2008); también está estrechamente ligado al gen *tsw* de resistencia a TSWV (Grube et al., 2000). Además, en pimiento han sido descritos varios QTLs que confieren resistencia parcial o completa a algunos patotipos de PVY, reduciendo la gravedad de los síntomas y haciendo más duradera la resistencia asociada a algunos genes como *pvr2*³ (Palloix et al., 2009).

Table 1.7. Genes de resistencia a diferentes patotipos de potiviruses en variedades de pimiento (Fuente: International Seed Federation: ISF; 2015).

Variedad	Gen	PVY 0	PVY 1	PVY 1.2	TEV	PepMoV
Early Cal Wonder, Yolo Wonder	<i>pvr0</i>	S ^a	S	S	S	S
PI152225	<i>pvr1</i>	R	R	R	R*	R
Yolo Y	<i>pvr1</i> ¹ (<i>pvr2</i> ¹)	R	S	S	S	S
Florida VR 2	<i>pvr1</i> ² (<i>pvr 2</i> ²)	R	R	S	R	S
Florida VR 4, Del Rey Bell, Agronomico 10	<i>pvr3</i>	R	R	R	R	S
Serrano Criollo de Morelos 334	<i>pvr4</i>	R	R	R	S	R

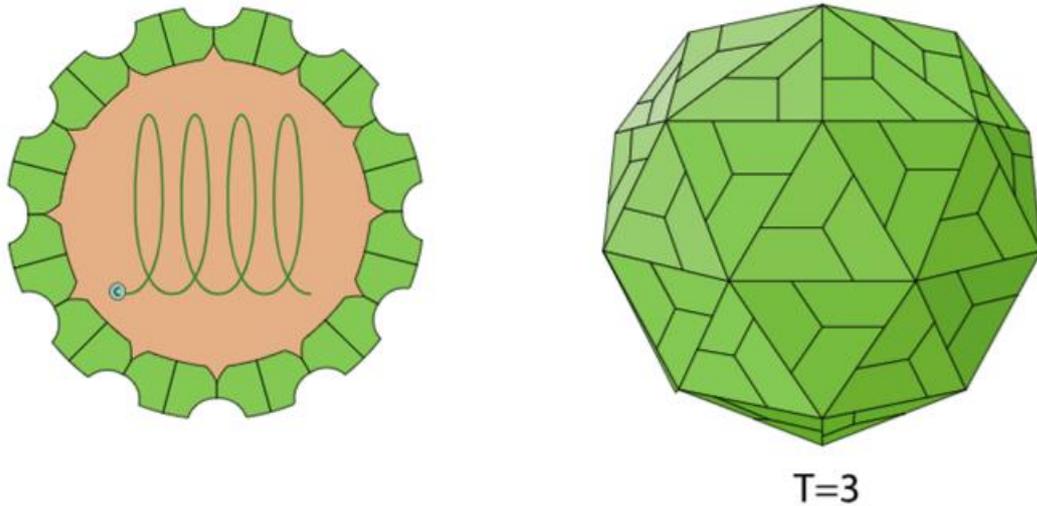
^a S = sensible; R = resistente; * El genotipo PI152225 se ha visto que es sensible a varios aislados de TEV

1.8.4.2. Cucumovirus

Cucumber mosaic virus (CMV) destaca como el virus más relevante de los *cucumovirus*, provocando significativas mermas tanto en la cantidad como en la calidad de la producción de pimientos a nivel mundial, siendo transmitido de forma no persistente por varias especies de pulgón (Moury y Verdin, 2012).

Los viriones de CMV son esféricos, con un diámetro de alrededor de 29 nm y simetría icosaédrica (T3: la cápside está compuesta por 60 unidades asimétricas hechas de 3 proteínas) (Figura 1.15). El genoma del CMV consta de tres cadenas simples de RNA de sentido positivo que codifican cinco proteínas (Palukaitis y García-Arenal, 2003). Las proteínas 1a y 2a están codificadas por RNA1 (3,4 kb) y RNA2 (3,1 kb), respectivamente, y forman parte del complejo de la replicasa viral. La proteína replicasa 1a alberga dominios de N-terminal metiltransferasa (Mtr) y C-terminal helicasa (Gorbalenya et al., 1988; Rozanov et al., 1992) y está implicada en la regulación de la infección sistémica (Palukaitis y García-Arenal, 2003), mientras que la proteína 2a codifica una segunda subunidad de la replicasa con un dominio polimerasa (RdRp) (Bruenn, 1991) y juega un papel en el movimiento a corta y larga distancia (Hwang et al., 2005). La proteína 2b, es codificada por el RNA2 y se expresa a través de un RNA sub-genómico o RNA4A, cuya función está relacionada con la supresión del silenciamiento del huésped y la transmisión por los vectores (Ding et al., 1994; Guo y Ding, 2002; Palukaitis, 2019). El RNA3 (2,2 kb) codifica la proteína 3a, o proteína de movimiento (MP), la cual actúa modificando el tamaño de exclusión de los plasmodemas y posibilitando el movimiento a corta y larga distancia del virus (Li y Palukaitis, 1996; Sasaki et al., 2006). Por otro lado, el RNA4 sub-genómico (1,0 kb) codifica la proteína 3b o proteína de cubierta (CP) y está involucrada en la encapsidación de RNAs virales, la transmisión del virus a través de sus vectores y en el movimiento dentro de la planta, tanto de célula a célula como a las partes distales de la planta a través del tejido vascular (Boccard y Baulcombe, 1993; Perry et al., 1994).

VIRION



GENOME

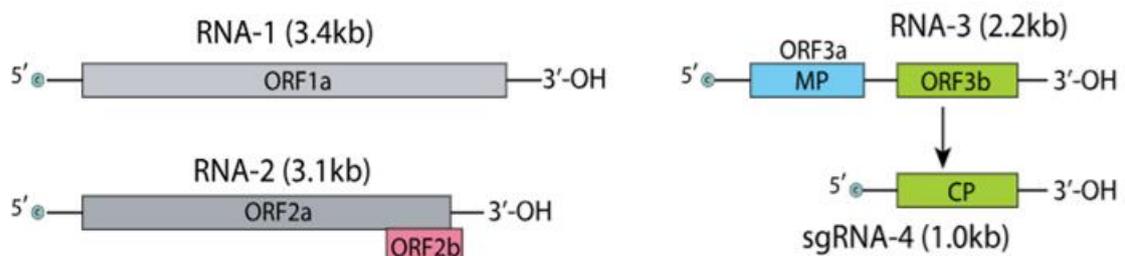


Figura 1.15. Esquema de los viriones y la organización genómica de Cucumovirus. Arriba, los viriones esféricos de Cucumovirus, de aproximadamente 29 nm de diámetro, con simetría icosaédrica (T3: la cápside está compuesta por 60 unidades asimétricas hechas de 3 proteínas). Abajo, la organización del genoma de los cucumovirus consta de tres RNAs genómicos monocatenarios de polaridad positiva (RNA 1 a 3) y dos RNAs subgenómicos (RNA4 y RNA4A). El RNA1 genómico codifica una subunidad de la replicasa (1a) que alberga dominios de metiltransferasa (Mtr) y helicasa. El RNA2 genómico codifica la segunda subunidad de la replicasa (2a) con un dominio polimerasa (RdRp). Se requieren tanto 1a como 2a, junto con factores del huésped, para iniciar la replicación. Una tercera proteína no estructural, 2b, se expresa, como RNA subgenómico (RNA4A), a partir de RNA2, y está involucrado en el movimiento de célula a célula y en el silenciamiento de genes post-transcripcionales. El RNA3 codifica la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cubierta (CP). La CP se expresa a través del RNA4 subgenómico. El extremo 5' de las moléculas está protegido por una estructura cap M⁷G y el extremo 3' contiene una estructura tRNA-like. (Fuente: Viralzone; <https://viralzone.expasy.org/135>)

Los aislados de CMV se clasifican en los subgrupos I y II, que están relacionados lejanamente según los análisis moleculares del genoma y pueden distinguirse serológicamente (Owen y Palukaitis, 1988), compartiendo un 67-69 % de identidad de nucleótidos dependiendo del RNA genómico y de los aislados (Palukaitis y García-Arenal, 2003). El estudio de los ORF de RNA3 reveló la existencia de dos subgrupos dentro del subgrupo I: el subgrupo IA, que estaba formado por aislados extremadamente similares entre ellos, y el subgrupo IB, por aislados más diversos (Roossinck et al., 1999).

Este patógeno se transmite a través de más de 80 especies de pulgones de forma no persistente (Palukaitis y García-Arenal, 2003), siendo *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* los áfidos más destacados en este proceso (Moury y Verdin, 2012). La vegetación silvestre actúa como principal fuente inicial de inóculo en las parcelas (Kazinczi et al., 2004), desde donde los pulgones lo transmiten a los cultivos de forma muy eficaz. Se conocen más de 1200 especies de plantas hospedadoras de CMV pertenecientes a más de 100 familias, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Palukaitis y García-Arenal, 2003). No obstante, existe la posibilidad de que este virus se introduzca en los cultivos de pimiento a través del plantel previamente infectado en viveros. Se ha descrito algún caso de transmisión por semilla en algunas variedades de pimiento (Ali y Kobayashi, 2010; Arogundade et al., 2019). En los últimos años ha habido grandes epidemias de CMV en cultivo al aire libre de guindilla de Ibarra en Gipuzkoa, produciéndose grandes pérdidas de producción desde casi el comienzo del cultivo (Figura 1.16).



Figura 1.16. Síntomas producidos por CMV en cultivo al aire libre de guindilla de Ibarra variedad "Ibarroria": A) Mosaicos generalizados en toda la planta; B) Frutos deformes y engrosados; C) Frutos deformes y engrosados con cambio de coloración y necrosis en la punta del fruto y en el pedúnculo; D) Crecimiento irregular de la planta con clorosis y enrollado de hojas (Fuente: NEIKER).

Se dispone de algunos genes de resistencia a CMV. Uno de ellos es el gen dominante *cmr1* que se identificó en la variedad Bukang (*C. annuum*) y se encuentra en el cromosoma 2 (Kang et al., 2010). Este gen de resistencia fue superado en Corea por un aislado llamado CMV-P1 (subgrupo IB) (Lee et al., 2006; Kang et al., 2012). Posteriormente, en la variedad india Lam-32 (*C. annuum*) se identificó el gen recesivo de resistencia *cmr2* en el cromosoma 8, que proporcionaba resistencia a CMV-P1 además de a otros aislados de CMV (Choi et al., 2018). Hay otras resistencias parciales a CMV que son regulados por muchos genes, como se pudo observar en la variedad Perennial (*C. annuum*), que actúa sobre el virus mediante varios mecanismos, como resistencia parcial a la infección viral inicial, inhibición de la multiplicación y la inhibición del virus a larga distancia (Caranta et al., 1997; Nono-Womdim et al., 1993a, 1993b). En la línea BG2814-6 (*C. frutescens*) se han observado los mecanismos de reducción del nivel de replicación y del transporte célula a célula del virus (Grube et al., 2000). También han sido descritos varios QTLs responsables de la resistencia CMV en varios cromosomas, algunos de los cuales ayudan a mantener la durabilidad de los genes de resistencia (Quenouille et al., 2014; Chaim et al., 2001; Caranta et al., 2002; Yao et al., 2013; Guo et al., 2017; Li et al., 2018a).

1.8.4.3. Orthotospovirus

Los virus del género *Orthotospovirus* (familia: *tospoviridae*; orden: *Bunyavirales*) causan graves daños a una amplia gama de hospedadores, siendo transmitidos de forma persistente circulativa propagativa (Rotenberg et al., 2015) por hasta 15 especies de trips (*Thysanoptera: Thripidae*) (Oliver y Whitfield, 2016). En el orden *Bunyavirales* hay muchos virus que generan severas enfermedades en humanos, animales y cultivos; siendo los *tospovirus* una de las 2 familias del orden que infectan plantas (Adams et al., 2017; Maes et al., 2018). Dentro del género, el virus más importante es TSWV, que infecta a más de 900 especies pertenecientes a más de 90 familias de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, dentro de las cuales se encuentran flora silvestre y cultivos importantes como lechuga, tomate, patata, tabaco y pimiento (Pappu, 2008) produciendo cuantiosas pérdidas económicas (Mandal et al., 2012; Riley et al., 2011). El hecho de que tenga tantos huéspedes complica su posible control ya que con facilidad el virus encuentra un huésped alternativo. El principal vector de TSWV, *Frankliniella occidentalis* (Pappu, 2008), muestra una gran predilección por las flores del pimiento donde se esconde y alimenta de su polen (Hansen et al., 2003), siendo las larvas (hasta estadio larvario II de neánida) las que adquieren el virus al alimentarse sobre las plantas enfermas, y el adulto el que realiza la infección (Tsuda et al., 1996; Whitfield et al., 2005; Pappu 2008). TSWV también se replica dentro del insecto vector desde la adquisición y durante el desarrollo del mismo (Whitfield et al., 2005; Pappu, 2008). Los trips adultos pueden adquirir el virus, pero no son capaces de transmitirlo (Pappu et al., 2009). No hay evidencia de transmisión transovárica, por lo que el virus debe ser adquirido por cada generación de trips (Pappu, 2008).

F. occidentalis fue detectado por primera vez en 1989 en Gipuzkoa y en 1992 en Bizkaia. El primer diagnóstico de TSWV en Euskadi data de 1991 en el cultivo de tomate en Gipuzkoa y el primer diagnóstico en pimiento se registró en Bizkaia en 1993 (Laboratorios de Sanidad Vegetal de las Diputaciones de Bizkaia y Gipuzkoa). Durante algunos años, este virus ha

producido mermas muy importantes en el cultivo de pimiento bajo invernadero en Euskadi (Figura 1.17).



Figura 17. Síntomas producidos por TSWV en: A) Frutos de pimiento del tipo Gernika; B) Frutos de pimiento del tipo Loiola; C) Hojas de pimiento de Gernika variedad Derio; D) Hojas de guindilla de Ibarra variedad "Ibarroria"; E) Fruto de pimiento de Gernika variedad "Derio" (Fuente: Fotos A y B pertenecen al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Diputación Foral de Gipuzkoa; Foto C pertenece a NEIKER)

Los viriones de los *tospovirus* suelen tener forma pleomórfica (80–120 nm) y estar envueltos en una doble membrana, conteniendo RNA de cadena tripartita (Figura 1.18). Los 3 RNAs se

han denominado como L (Large; 8.9kb), M (Medium; 4.8kb) y S (Small; 2.9kb) (ICTV: https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Bunyaviridae; Pappu, 2008). El RNA L es de sentido negativo, mientras que M y S tienen una parte de polaridad positiva y otra de polaridad negativa en su organización del genoma. El RNA L codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). El RNA M es el precursor de dos glicoproteínas (G_N y G_C , codificado en orientación negativa) y una proteína no estructural (NSm; codificado en orientación positiva). El RNA S codifica la proteína N (codificado en orientación negativa) y otra proteína no estructural (NSs, codificado en orientación positiva). Se ha demostrado que NSm y NSs funcionan como proteína de movimiento y supresor de silenciamiento, respectivamente. Los tres RNA genómicos están estrechamente vinculados con la proteína N formando ribonucleoproteínas (RNP). Estas RNPs están encerradas dentro de una envoltura lipídica que consta de dos glicoproteínas codificadas por el virus y una membrana derivada del huésped (Pappu 2008; Oliver y Whitfield, 2016).

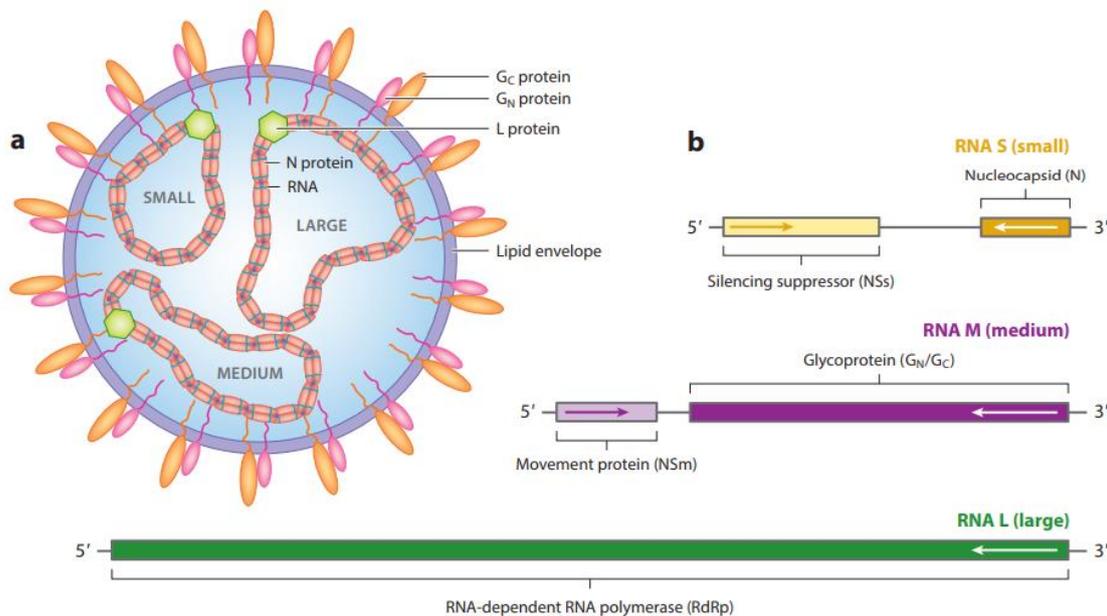


Figura 1.18. (a) Representación del virión del tospovirus. El virión está formado por una envoltura lipídica, que encapsula los tres RNAs genómicos virales, denominados según su tamaño: pequeño (S: small), mediano (M: medium) y grande (L: large), respectivamente. El RNA viral está encapsidado por la proteína nucleocápsida (N), que se ha demostrado que interactúa con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas virales que atraviesan la membrana (G_N y G_C). (b) Organización del genoma del tospovirus, que indica los marcos de lectura abierta (ORF, Open Reading frames) de los genes virales que se encuentran en cada RNA genómico. Los RNAs genómicos de tospovirus codifican productos genéticos en sentido negativo (RNA L) o en orientación ambisentido (RNA M y RNA S) (Fuente: Oliver y Whitfield 2016).

El control de la enfermedad está ligado al de su agente transmisor. Sin embargo, los tratamientos químicos no se muestran muy eficaces debido a la dificultad de acceder hasta donde se encuentra el vector (flores) y a la rápida generación de resistencias a los insecticidas (Espinosa et al., 2002; Rodríguez et al., 2007; Bielza et al., 2007; Kenyon et al., 2014). Es conveniente utilizar mallas como barreras en las aberturas del cultivo protegido para limitar la entrada a la parcela de trips virulíferos, una vez eliminadas las fuentes de inóculo tanto dentro como alrededor del invernadero. Hay que tener en cuenta que, una vez introducido el binomio

“enfermedad-vector” en el interior del invernadero, el desarrollo de la infección es mucho mayor que en los cultivos al aire libre al presentarse condiciones ambientales más favorables para la multiplicación del trips (Lacasa et al., 1991; Lacasa y Contreras, 1993). El control del vector mediante control biológico con la suelta de insectos depredadores como *Orius laevigatus*, *Orius albidipennis*, *Amblyseius cucumeris* y *Amblyseius swirskii* se ha visto que es la forma más eficaz de controlar al vector y al virus (Sánchez et al., 1997; Calvo et al., 2012).

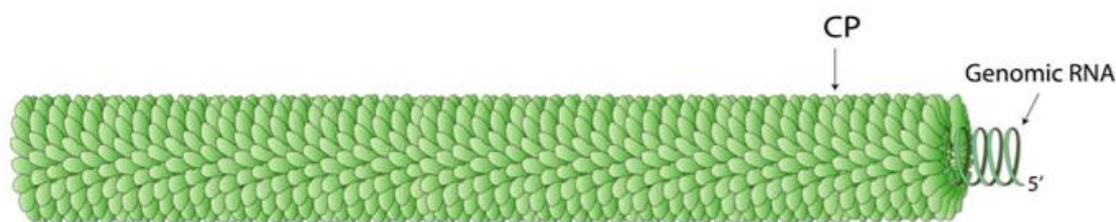
Se ha identificado resistencia al TSWV basada en HR en varias accesiones de *C. chinense* (Boiteux y De Avila, 1994), siendo el gen dominante *tsw*, ubicado en el cromosoma 10, el responsable (Jahn et al., 2000). Este gen de resistencia también ha sido identificado en otras especies de *Capsicum* (Di Dato et al., 2015). La resistencia conferida por el gen *tsw* se ve superada en condiciones de altas temperaturas (28-33 °C) y cuando las inoculaciones de virus se realizan en plantas jóvenes de 2-4 hojas verdaderas (HV) (Moury et al., 1998).

1.8.4.4. Tobamovirus

Los Tobamovirus son un género de virus pertenecientes a la familia *Virgaviridae*, que infectan cultivos importantes de solanáceas y cucurbitáceas, así como ornamentales y flora adventicia, causando enfermedades que pueden resultar en pérdidas económicas considerables (Smith y Dombovsky, 2020). Según ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) hay 37 especies conocidas dentro del género Tobamovirus en todo el mundo (<https://ictv.global/report/chapter/virgaviridae/virgaviridae/tobamovirus>; consultado: 23/10/2023), siendo la especie tipo el TMV. Los Tobamovirus son los únicos miembros de la familia que tienen un genoma no segmentado. Además, tienen una proteína de movimiento tipo ‘30K’ pero no son transmisibles por vectores y cuando se transmiten por semillas, el embrión no se ve afectado (Gibbs et al., 2015, Lartey et al., 1996, Stobbe et al., 2012).

Los Tobamovirus tienen un genoma de RNA monocatenario positivo (+ssRNA), no segmentado, que varía en tamaño de 6,3-6,6 kb y cuyas partículas son muy estables (ICTV). Los viriones son rígidos y filamentosos, con un diámetro de 18 nm y una longitud predominante de 300-310 nm (Figura 1.19) (ICTV), con una cavidad central y simetría helicoidal que contiene el RNA genómico (Moury y Verdin, 2012). La región no traducida del extremo 5' (Untranslated región; UTR) tiene aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, es rica en residuos adenina (A) y citosina (C), con pocos o ningún nucleótido guanina (G) y un grupo 7-metilguanosina trifosfato, conocido como estructura CAP (Ishibashi e Ishikawa, 2016). La UTR del extremo 3' tiene aproximadamente 200 nucleótidos de longitud y contiene una estructura similar al RNA de transferencia (tRNA-like) (Ishibashi e Ishikawa, 2016). Tanto el RNA genómico como los RNAm subgenómicos tienen una estructura tipo CAP en el terminal 5' y una estructura tRNA-like en el extremo 3' (Ishibashi e Ishikawa, 2016).

VIRION



GENOME

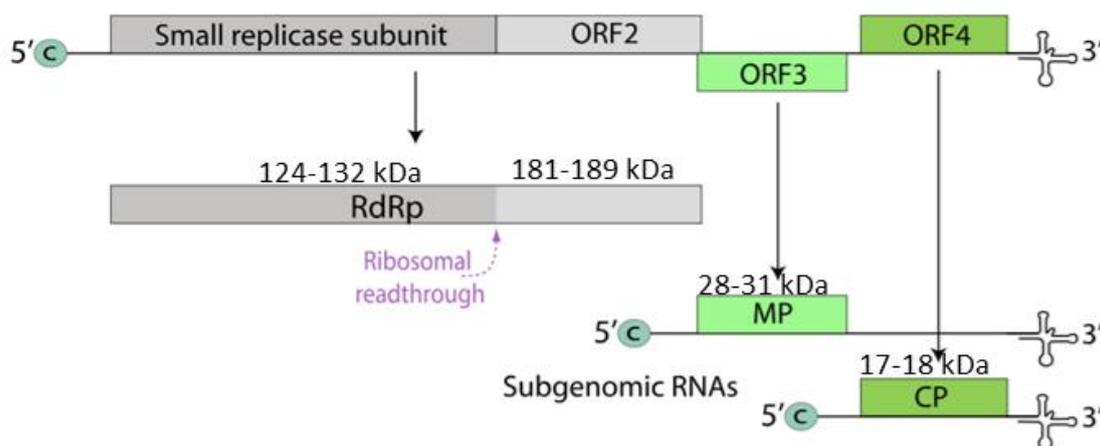


Figura 1.19. Esquema de los viriones y la organización genómica de los Tobamovirus. Arriba, partícula de virión de los Tobamovirus, donde se muestra que la capsida protéica (CP) protege al RNA genómico del virus. El virión suele tener 18 nm de diámetro y 300-310 nm de longitud. Abajo, estructura del genoma de los Tobamovirus. El RNA genómico tiene una estructura CAP (C; nucleótido metilado m⁷G5'pppG) en el extremo 5' y sirve de molde para la expresión de las proteínas de ORF1 y ORF2, expresándose esta última a partir de un stop de parada débil. Los ORFs de la proteína de movimiento ORF3 y de la proteína de la cápside ORF4 se expresan a partir de dos RNAs subgenómicos (sgRNA) 3' co-terminales con una estructura C en el extremo 5'. La UTR del extremo 3' contiene una estructura similar al RNA de transferencia (tRNA-like) (Fuente: Viralzone; <https://viralzone.expasy.org/51>).

El genoma de los Tobamovirus codifica al menos cuatro proteínas (Figura 19). Las proteínas no estructurales de replicación ORF1 y ORF2 (124-132 kDa y 181-189 kDa) se traducen directamente desde el extremo 5' proximal del RNA genómico. Mientras que el ORF1 se para en un codón de parada débil (UAG), la ORF2 continúa hasta el segundo cocón de parada compartiendo, ambas proteínas las misma secuencia de aminoácidos N-terminales (Moury y Verdin, 2012). Las dos proteínas son parte del complejo de replicación (RdRp), donde la proteína de 124-132 kDa contiene los dominios metiltransferasas (Mtr) o guanilil transferasa y helicasa (Hel), y la proteína de 181-189 kDa contiene además el dominio polimerasa (ICTV). La replicación del genoma viral ocurre en el citoplasma de las células huésped y se basa en la replicasa viral, que es un complejo enzimático que contiene proteínas virales y celulares, requeridas para la generación de la progenie viral (Ishibashi y Ishikawa, 2016). La proteína de movimiento (MP; 28-31 kDa) y la proteína de la cápside (CP; 17-18 kDa) son traducidas a partir de sus respectivos RNAs mensajeros (mRNA) subgenómicos 3' co-terminales. La MP es una proteína no estructural que es crucial para la propagación del virus de célula a célula y a larga distancia, y pertenece a superfamilia de las MPs `30K', descritas en 18 géneros de virus y

relacionados con MP del TMV de 30kDa (Melcher et al., 2000; Mushegian y Elena, 2015). La CP es la única proteína estructural y desempeña un papel importante en el tejido vascular, posibilitando la acumulación del virus (ICTV). Los ORFs de las proteínas RdRp, MP y CP están localizados de manera secuencial en el RNA genómico de Tobamovirus. En los miembros de algunas especies, el ORF MP se superpone tanto a la proteína de 181-189 kDa como a la de CP, mientras que en otras especies no se superpone a ninguno de los ORF o se superpone a uno de ellos (Ishibashi e Ishikawa, 2016)

Los Tobamovirus pueden transmitirse mecánicamente por contacto directo entre plantas, a través de herramientas agrícolas contaminadas, o a partir de las labores de cultivo realizadas por los operarios (Moury y Verdin, 2012). Además, pueden ser transmitidos por semillas sin que se llegue a infectar el embrión, no transmitiéndose por vectores (Dombrovsky y Smith, 2017). Estos virus pueden causar síntomas de mosaicos, enanismo, deformación y clorosis en las plantas huésped (Figura 1.20), desencadenando en una disminución en la calidad y el rendimiento de los cultivos (Moury y Verdin, 2012).

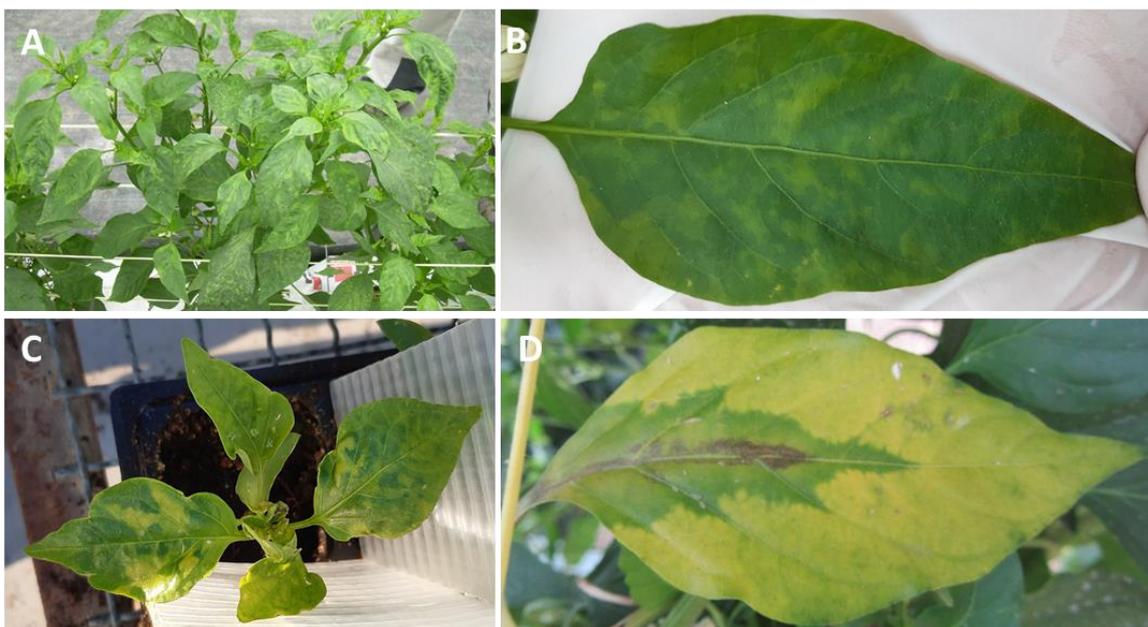


Figura 1.20. Síntomas producidos por diferentes tobamovirus en pimiento de Gernika variedad "Derio". A) Mosaicos suaves generalizados en toda la planta producidas por el virus PMMoV. B) Mosaicos suaves en hoja producidos por CPMMoV. C) Síntomas producidos en plantel joven por CPMMoV. D) Mosaicos más fuertes y necrosis en hoja producidos por ToMV.

Dentro del género *Capsicum* existen varias especies y variedades que portan los genes L de resistencia, los cuales confieren resistencia al tobamovirus a través de cuatro genes alélicos (L1, L2, L3 y L4) (Tomita et al., 2008, 2011). La resistencia a los tobamovirus está regulada por un único gen de resistencia monogénico en el pimiento (Di Dato et al., 2015). Existen diferentes patotipos entre los Tobamovirus –P0, P1, P1.2 o P1.2.3-, que están determinados por su capacidad para superar la resistencia mediada por diferentes alelos del gen L (Genda et al., 2007). En consecuencia, los virus con el patotipo P0 no pueden infectar plantas que porten ningún gen L, mientras que los virus con los patotipos P1, P1.2 o P1.2.3 pueden infectar plantas con el gen L1, los genes L1 y L2, y genes L1, L2 y L3, respectivamente (Tabla 1.8).

Table 1.8. Genes de resistencia a diferentes patotipos de Tobamovirus en variedades de pimiento (Fuente: International Seed Federation: ISF; 2012).

Patotipos	P0	P1	P1.2	P1.2.3
Codigo ISF	TMV: 0	TMV: 1	PMMoV: 1.2	PMMoV: 1.2.3
	ToMV: 0	TMGMV: 1		
	TMGMV: 0	PaMMV: 1		
	BPMoV: 0			

Variedades	Gen resistencia				
Calu, Early Calwonder	-	S ^a	S	S	S
Tisana, Yolo Wonder	L1	R	S	S	S
Tabasco	L2	R	R	S	S
Solario F1, PI159236	L3	R	R	R	S
Tom4, PI260429	L4	R	R	R	R

^a S = sensible; R = resistente; * El gen L2 es remontado fácilmente y no se utiliza en variedades comerciales

1.9. Técnicas de detección de virus

Los virus y viroides de las plantas siguen siendo una preocupación importante en la agricultura moderna, causando pérdidas económicas sustanciales en muchos cultivos importantes (Pallás et al., 2018). Por ello, la detección temprana de estos patógenos sigue siendo una de las principales formas de controlar el desarrollo de estas enfermedades. Además, para el cribado masivo de material vegetal es interesante el desarrollo de técnicas que permitan detectar más de un patógeno en una misma analítica (detección múltiple o multiplex detection). Los mayores avances en el diagnóstico de virus vinieron con el descubrimiento de los ensayos serológicos desarrollando la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) por Clark y Adams (1977) y con las técnicas basadas en la amplificación in-vitro de DNA, comúnmente llamado PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis et al., 1987). En este trabajo se han utilizado tanto técnicas serológicas (DAS-ELISA) como moleculares (PCR e Hibridación molecular: HM), además de desarrollar técnicas de detección múltiple por hibridación molecular.

1.9.1. Técnicas de detección serológicas

La técnica ELISA se basa en la interacción específica entre las proteínas del virus (antígeno) y anticuerpos unidos a enzimas (Clark y Adams, 1977). Este método es altamente eficaz para identificar plantas infectadas por virus en el ámbito de laboratorio, gracias a su capacidad para procesar muestras rápidamente, su simplicidad, sensibilidad (1 a 10 ng ml⁻¹) y la posibilidad de examinar numerosas muestras simultáneamente. Los resultados, que son fáciles de leer, ofrecen una cuantificación aproximada de la presencia viral (Baranwal et al., 2020). La concentración del virus generalmente se correlaciona con la cantidad de anticuerpos enzimáticamente marcados, detectables mediante una reacción colorimétrica con el sustrato de la enzima (Clark y Adams, 1977). De las diversas variantes de ELISA existentes, el DAS-ELISA (double antibody sándwich ELISA) es el más empleado para la detección de virus en plantas. Es una prueba específica de virus y se requiere de anticuerpos específicos de detección que se encuentra conjugado con la enzima. La mayor mejora de la técnica vino con la introducción de

anticuerpos monoclonales que permiten detectar específicamente un virus en particular, pudiendo diferenciar hasta diferentes serotipos o cepas (Permar et al., 1990; Boonham et al., 2014). En la Figura 1.21 se puede ver la representación del funcionamiento de la técnica DAS-ELISA.

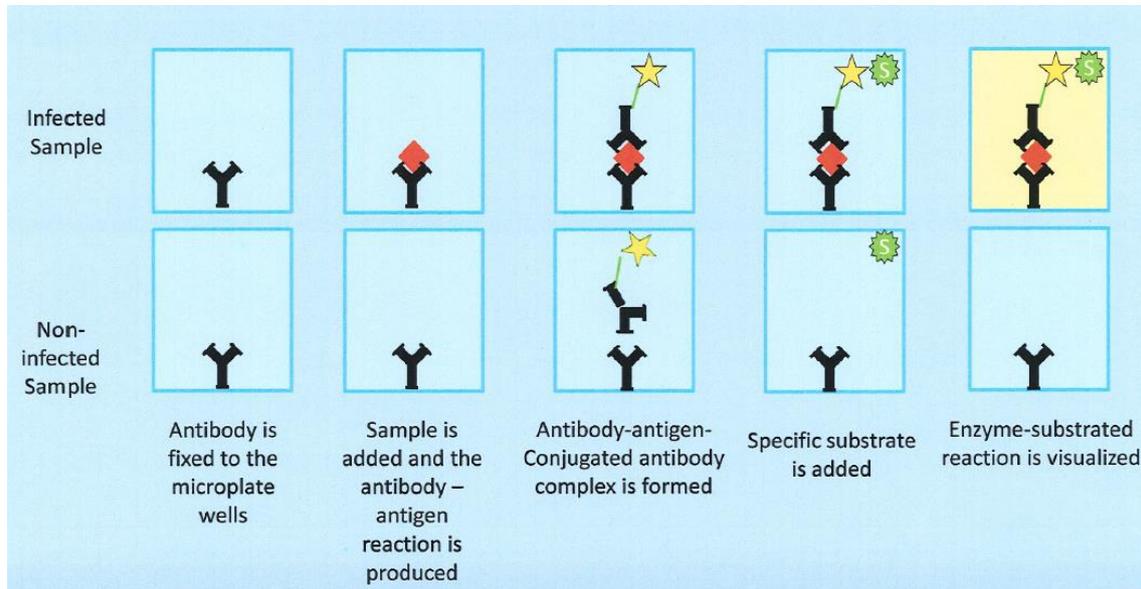


Figura 1.21. Representación del funcionamiento de la técnica DAS-ELISA tanto con muestras infectadas como no infectadas. Un anticuerpo específico para el antígeno de interés se une a la superficie de un pozo de una placa de ELISA. La muestra, que puede contener el antígeno, se añade al pozo y se incuba por un tiempo determinado. Si el antígeno está presente, se unirá al anticuerpo inmovilizado. Tras realizar una serie de lavados, se añade un segundo anticuerpo específico para el antígeno, que ha sido previamente conjugado con una enzima. Si el antígeno está presente, este anticuerpo secundario se unirá a él, formando un "sándwich" entre el anticuerpo primario, el antígeno y el anticuerpo secundario. Se lavan los pozos para eliminar cualquier anticuerpo secundario no unido. Luego, se añade un sustrato químico que es convertido por la enzima del anticuerpo secundario en un producto detectable, generalmente un cambio de color que es medido en un espectrofotómetro (Fuente: Adaptado de Matthews, 1992).

1.9.2. Técnicas de detección moleculares

1.9.2.1. PCR Convencional

La técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa, en inglés "polymerase chain reaction" (PCR), es un método que permite amplificar fragmentos específicos de ácidos nucleicos (DNA), en un entorno de laboratorio (Mullis y Faloona, 1987). Esta técnica también permite la amplificación de fragmentos de RNA mediante la incorporación de una reacción previa de transcripción reversa (RT-PCR; Powell et al., 1987). Este procedimiento se realiza mediante ciclos repetitivos que incluyen: la desnaturalización térmica del DNA, el anillado de cebadores a las cadenas complementarias y la extensión de estos cebadores con la ayuda de una enzima llamada DNA polimerasa termoestable. Como resultado, después de cada ciclo, la cantidad de fragmentos de DNA se duplica (Figura 22).

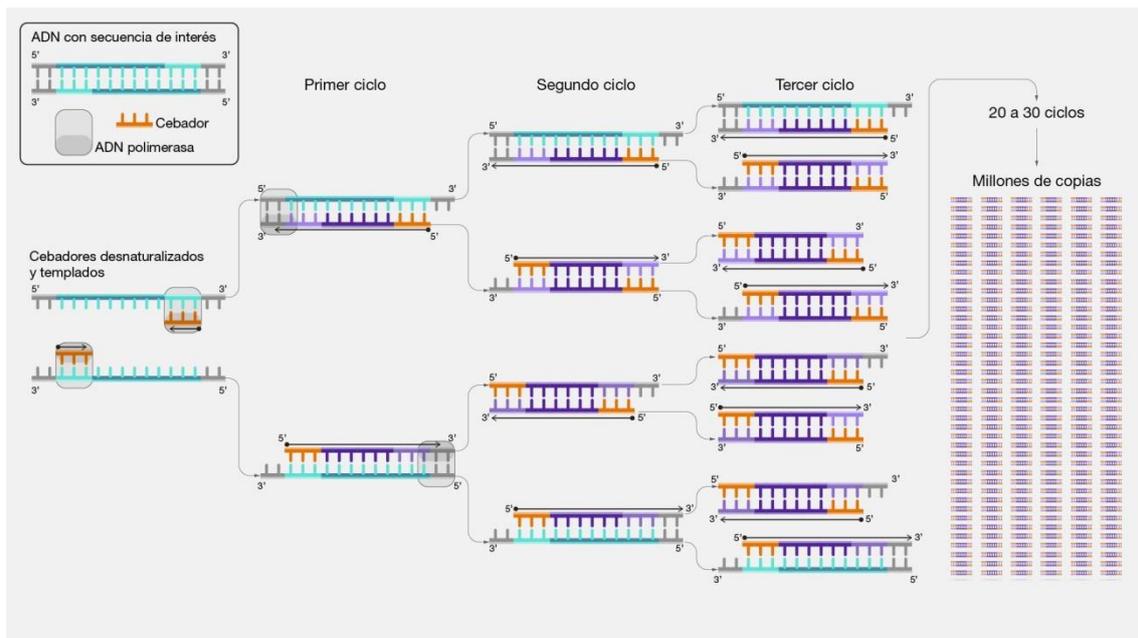


Figura 1.22. Esquema del funcionamiento de la técnica PCR para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos determinada. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>.

Debido a su gran sensibilidad, la técnica de PCR se ha convertido en el principal método aplicado para la detección de virus. El diagnóstico basado en PCR es capaz de detectar genomas tanto de DNA como de RNA, y ha sido aplicada satisfactoriamente para detectar virus en plantas (Thomson y Dietzgen, 1995). Para virus de una sola cadena de RNA, se suele realizar primero una transcripción inversa a DNA complementario (cDNA) utilizando la enzima de transcriptasa inversa (Reverse transcriptasa, RT, en inglés) seguida de una PCR (Hoffmeisterová et al., 2022). Es importante que la calidad de este DNA sea buena (libre de polifenoles, polisacáridos y nucleasas endógenas) para que la reacción de PCR sea efectiva. Es esencial evitar cualquier contaminación durante su manipulación, por lo que se deben seguir protocolos estrictos (Llácer et al., 1996). Las PCRs convencionales suelen estar mediadas por cebadores específicos, también conocidos como primers, que son pequeños fragmentos de DNA o RNA, generalmente alrededor de 18 nucleótidos de longitud. Estos cebadores son de cadena sencilla y diseñados para unirse a secuencias de nucleótidos complementarias, actuando como punto de inicio para la síntesis de nuevas cadenas de ácidos nucleicos durante la amplificación (Baranwal et al., 2020). Los primers pueden ser diseñados y sintetizados a partir de las secuencias de virus u otros patógenos que se encuentran en diferentes bases de datos.

Muchos virus del mismo género comparten regiones de alta homología en sus genomas. Por tanto, es común el uso de cebadores degenerados para la detección de estos organismos. Los cebadores degenerados son secuencias de oligonucleótidos diseñados para amplificar regiones de DNA o RNA que tienen variabilidad de secuencia entre diferentes especies o cepas de un organismo (Wyatt y Brown, 1996; Li et al., 2018b; Ha et al., 2008). Estos cebadores contienen una mezcla de nucleótidos en posiciones específicas para abarcar todas las posibles combinaciones de secuencias en esa posición. Suelen ser complementarios a zonas altamente conservadas del genoma, lo que permite la detección de distintas especies virales de un género contenidas en una muestra. El diagnóstico de virus utilizando la técnica de PCR con

cebadores degenerados, seguido del análisis de los fragmentos producidos al procesar los amplicones con diversas enzimas de restricción, conocido en inglés como “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLPs), facilita la identificación de las especies virales en la muestra (Wyatt y Brown, 1996; Accotto et al., 2000; Li et al., 2018b; Ha et al., 2008).

Se han realizado varias modificaciones y mejoras de la técnica de PCR basadas en la técnica original. Éstas incluyen la reverse transcription PCR (RT-PCR), quantitative PCR (qPCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP) y recombinase polymerase amplification (RPA), entre otros (Baranwal et al., 2020).

Los análisis de PCR y RT-PCR para detectar virus suelen ser unas medidas semi-cuantitativas, aunque con la qPCR, también conocida como PCR en tiempo real, se puede cuantificar el nivel de carga viral en las muestras midiendo la concentración de DNA después de cada paso de amplificación durante el proceso de PCR (Taylor et al., 2010). Varios estudios han demostrado que la RT-PCR es más sensible que ELISA para la detección de virus en plantas, con menos resultados de falsos negativos (Mekuria et al., 2003; Vigne et al., 2018). La técnica de qPCR, es más sensible en comparación con la PCR convencional, la hibridación molecular y los métodos serológicos (Hu et al., 1995; Schaad y Frederick, 2002). Para realizar la qPCR es esencial contar con ciertos componentes y condiciones específicas. En primer lugar, es necesario incluir al menos un fluorocromo en la solución de reacción, como SYBR® Green o sondas TaqMan. Además, se debe utilizar una polimerasa termoestable de tipo "Hot-Start", que sólo comienza a polimerizar al alcanzar una determinada temperatura, lo que reduce la generación de amplicones heterólogos. Finalmente, es crucial que la reacción se desarrolle en un termociclador equipado con un sistema de lectura de fluorescencia (Higuchi et al., 1992, 1993).

La mayoría de los cultivos hortícolas suelen estar infectados por varios virus, por lo cual es interesante desarrollar técnicas de detección que permitan detectar más de un virus simultáneamente, con el objetivo de reducir gastos y tiempos de análisis. La Multiplex PCR se ha utilizado para detectar simultáneamente varios virus en diferentes cultivos en una sola reacción (Saade et al., 2000; Sánchez-Navarro et al., 2005; Tao et al., 2012; Cating et al., 2015; Gambino, 2015), llegándose a detectar hasta 9 patógenos. Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica está influenciada por el número de virus a detectar (Sánchez-Navarro et al., 2005; Tao et al., 2012), viéndose disminuida a partir de 7 pares de cebadores (Sánchez-Navarro et al., 2005).

A partir de reacciones de PCR se pueden obtener genomas completos de los virus que afectan a los cultivos. De esta forma, se pueden identificar y caracterizar los virus que están causando daños en las plantas. Este proceso es fundamental para entender la diversidad viral, la evolución, la epidemiología y para el desarrollo de estrategias de manejo y control de enfermedades virales en los cultivos. El proceso suele consistir en amplificar el material genético mediante PCR (DNA o RNA viral). El material genético amplificado se secuencia utilizando técnicas de secuenciación como Sanger, Illumina, o secuenciación Nanopore, entre otras (Blawid et al., 2016). Estas tecnologías permiten obtener una gran cantidad de datos sobre la secuencia genética del virus. Los datos de secuencia se analizan mediante software especializado para ensamblar las secuencias, identificar el virus o los virus presentes y

comparar las secuencias con bases de datos genéticas existentes para determinar la identidad y las características del virus (Kearse et al., 2012)

1.9.2.2. Hibridación molecular

La hibridación molecular (MH) opera mediante el emparejamiento complementario de las bases de ácidos nucleicos (Maule et al., 1983; Hull y Al-Hakim, 1988). Esto conduce a la formación de un híbrido estable, compuesto parcial o totalmente por la secuencia de ácidos nucleicos del patógeno que se quiere detectar (es decir, la molécula objetivo) y su secuencia complementaria marcada (radioactivamente o no radioactivamente), que llamamos "sonda". Las sondas pueden crearse como moléculas de RNA (ribosondas) o de DNA (sondas de DNA) (Pallás et al., 2018). Hoy en día, las sondas marcadas no radioactivamente, como la digoxigenina, son ampliamente utilizadas (Más et al., 1993; Peiró et al., 2012), aunque esta técnica de detección comenzó con sondas marcadas radioactivamente (Owens y Diener 1981).

El sistema digoxigenina representa un método no radiactivo para marcar y detectar ácidos nucleicos en diversas aplicaciones. Esta tecnología utiliza un esteroide derivado de plantas de *Digitalis* spp. (*Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*). La digoxigenina, que se encuentra exclusivamente en estas plantas, es clave para el funcionamiento del sistema, ya que el anticuerpo anti-Digoxigenina se une exclusivamente a él, evitando otros materiales biológicos y garantizando un marcaje específico. Esta especificidad ha permitido obviar el uso de precursores radiactivos y, en consecuencia promover un uso más extendido. El proceso implica hibridar ácidos nucleicos inmovilizados con una sonda marcada con Digoxigenina. Luego, la detección se lleva a cabo utilizando anticuerpos anti-Digoxigenina que están unidos a enzimas como la fosfatasa alcalina (AP). Esta configuración permite varios métodos de detección, incluidas técnicas colorimétricas, quimioluminiscentes y fluorescentes (Figura 1.23).

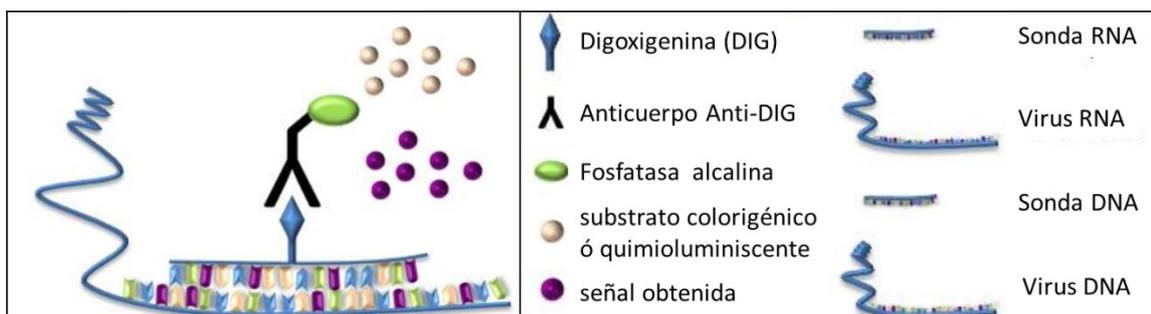


Figura 1.23. Esquema del funcionamiento de la técnica de Hibridación Molecular (HM). Las sondas marcadas con digoxigenina (DIG) pueden tener longitudes variables y pueden estar compuestas de DNA o RNA, siendo capaces de detectar ácidos nucleicos virales y viroidales. La señal observada se logra mediante la hibridación de la sonda con la secuencia del patógeno de interés. Esta interacción se visualiza utilizando un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina, que reacciona con un sustrato quimioluminiscente o colorigénico, produciendo una señal detectable. Fuente: Pfankuche et al., 2018.

La mayoría de los virus de plantas y todos los viroides tienen RNA como su material genético y los híbridos que se forman entre dos secuencias de RNA son más estables que los formados entre RNA y DNA o entre dos secuencias de DNA (Pallás et al., 2011, 2018). Por estas razones las ribosondas son las más utilizadas en la detección de virus y viroides en plantas (Pallás et al., 2018), permitiendo aplicar condiciones de hibridación más restrictivas (Pallás et al., 2011). Esta

técnica se aplicó por primera vez en plantas para detectar viroides (Owens y Diener, 1981), ya que no podían ser detectados por métodos serológicos debido a su falta de componentes proteicos (los viroides carecen de cápsides protéicas). Posteriormente, se utilizó para detectar también virus de plantas (Garger et al., 1983; Maule et al., 1983).

La estabilidad y, por lo tanto, la fiabilidad del híbrido que se forma depende tanto de las fuerzas electrostáticas como de las fuerzas hidrofóbicas, que están influenciadas por las condiciones bajo las que se realiza la hibridación (temperatura, concentración de sales, la longitud de la sonda y la utilización de agentes desnaturizantes como la Formamida), el contenido de adeninas y guaninas que contienen las sondas, el tipo de sonda (DNA o RNA) y del número de desajustes en nucleótidos que pueda haber entre la secuencia del patógeno y de la sonda (Rubio et al., 2020). Los detalles sobre la síntesis de la sonda marcada, la preparación de la muestra y cómo se llevan a cabo la hibridación y la detección han sido descritos en varios trabajos previos (Hull, 1993; Más et al., 1993; Pallás et al., 1998; Pallás et al., 2017; Mühlbach et al., 2003).

La sensibilidad de la hibridación molecular se encuentra entre la de los métodos serológicos y los métodos basados en PCR (Rubio et al., 2020), manteniendo la facilidad de uso de los métodos serológicos y evitando las principales desventajas de los métodos basados en PCR, como la posibilidad de obtener falsos positivos y la contaminación. Esta técnica es ampliamente utilizada tanto para analizar un gran número de plantas al mismo tiempo como para hacer prospecciones de virus a gran escala (Hull, 2009). Aunque la hibridación molecular es una técnica sólida y confiable, también tiene sus debilidades, como la producción de señales falsas cuando se presentan similitud en las secuencias de RNA del huésped (planta) y la sonda del virus o viroides que se van a detectar (Cañizares et al., 1999).

La técnica de hibridación molecular más frecuentemente utilizada es conocida como hibridación dot-blot. Este método implica la colocación directa de una solución de ácidos nucleicos sobre un soporte firme de nitrocelulosa o de nailon, seguido por la hibridación con sondas específicas (Pallás et al., 2011).

Lo interesante de la hibridación molecular es que se puede adaptar para detectar varios virus y/o viroides al mismo tiempo en un solo ensayo de hibridación (James et al., 2006). Esto se puede hacer mezclando diferentes sondas en la misma solución de hibridación (Saldarelli et al., 1996; Sánchez-Navarro et al., 1999; Saade et al., 2000; Ivars et al., 2004; Minutillo et al., 2012), o creando una única sonda o 'polisonda', que contenga las diferentes secuencias complementarias de los virus o viroides que se quieren detectar (Herranz et al., 2005a; Aparicio et al., 2009; Torchetti et al., 2012; Sánchez-Navarro et al., 2019). Las polisondas se crean fusionando en tándem varias secuencias parciales complementarias, generalmente de 200 a 400 pb, de diferentes virus/viroides, seguidas de la región promotora de una RNA polimerasa que permite la síntesis de un transcripto en presencia de un precursor no radiactivo como la digoxigenina (Aparicio et al., 2009; Más et al., 1993; Peiró et al., 2012).

Las polisondas de HM han demostrado ser efectivas en la detección de varias combinaciones de bacterias, virus y/o viroides que afectan a diversos cultivos (Aparicio et al., 2009; Herranz et al., 2005a; Peiró et al., 2012). En general, las polisondas permiten detectar varios patógenos con una ligera disminución de la sensibilidad en comparación con las sondas individuales (Peiró

et al., 2012), lo cual se suele mitigar reduciendo las temperaturas de hibridación (Sánchez-Navarro et al., 2019).

1.9.2.3. Otras técnicas moleculares

Un método alternativo con un enfoque amplio para identificar simultáneamente varios virus en plantas es la tecnología de microarrays de DNA (Hadidi et al., 2004; Boonham et al., 2007). Dada la capacidad de procesamiento en masa de esta tecnología, ofrece un potencial para el diagnóstico exhaustivo de diversos virus y viroides en plantas (Boonham et al., 2003; Nam et al., 2014). Sin embargo, la aplicación de esta técnica se ve limitada por su compleja puesta a punto.

Otra técnica molecular con gran potencial es el sistema CRISPR-Cas, que además de ser utilizada para la edición del genoma (Chertow, 2018; Mali et al., 2013) y para la regulación genética (Gilbert et al., 2013), también puede ser aplicada para el diagnóstico *in vitro* (Aman et al., 2020a, 2020b; Jiao et al., 2021; Marqués et al., 2022). Esta técnica puede ser empleada para detectar infecciones simples y mixtas de virus (Gootenberg et al., 2018).

Por último, las mejoras en las tecnologías de secuenciación de DNA han permitido el desarrollo de herramientas que posibilitan la rápida detección de virus y viroides. La tecnología basada en la secuenciación masiva de ácidos nucleicos, en inglés 'Next Generation Sequencing' (NGS), ha hecho posible la detección, identificación y descubrimiento de nuevos virus (Wang y Metzloff, 2005; Kreuze et al., 2009; Villamor et al., 2019).

1.9.3. Resistencia en plantas

En las últimas décadas, se ha confirmado que las plantas tienen un sistema de defensa complejo que les permite evitar, suprimir o defenderse de patógenos como hongos, bacterias, nematodos y virus (de Ronde et al., 2014).

1.9.3.1. Genes mayores de resistencia

Las primeras respuestas de resistencia a virus fueron descubiertas en plantas de *Nicotiana glutinosa* al inocular TMV (Holmes, 1929). Al inocular este virus, aparecían puntos necróticos en las hojas inoculadas, asociados con el gen de resistencia N (Necrotic lesion response). Holmes demostró que la resistencia a TMV estaba asociada a un gen dominante, proporcionando evidencias genéticas y fisiológicas sobre cómo las plantas pueden restringir las infecciones virales a partir de su maquinaria de defensa (Holmes 1936). Además, Holmes estuvo involucrado en la identificación de variedades de tomate y pimiento resistentes a TMV (Holmes, 1937, 1954). Estos descubrimientos marcaron un hito en el campo de la patología vegetal y sentaron las bases para el desarrollo de conceptos clave en la resistencia de las plantas a las enfermedades.

Esta respuesta de las plantas es denominada respuesta de hipersensibilidad (Hypersensitive response, HR) y está asociada con genes R de resistencia a patógenos. Los genes R de resistencia detectan directa o indirectamente la presencia de un patógeno específico mediante

su efector, llamado factor de avirulencia (Avr), evitando así la infección exitosa por parte del patógeno (Moffett, 2009; Mandadi y Scholthof, 2013; de Ronde et al., 2014). Muchas proteínas virales diferentes pueden actuar como factor de Avr, como la proteína de cubierta, la proteína de movimiento, la proteína replicasa o la proteína supresora de RNAi, actuando como inductores de resistencia (Meshi et al., 1989; Ishibashi et al., 2012; Moury y Verdin, 2012). Se han descrito algunos casos en los que el producto del gen R dominante reconoce una proteína Avr mediante interacción directa (Ueda et al., 2006). Sin embargo, en la mayoría de los genes R conocidos, el reconocimiento del patógeno ocurre indirectamente e involucra a otras proteínas del huésped (Jones y Dangl, 2006; Van Der Hoorn y Kamoun, 2008; Collier y Moffett, 2009).

La activación de los genes R generalmente se asocia con una inducción de muerte celular programada, produciendo una rápida aparición de lesiones necróticas (HR) o, en raras ocasiones, resistencia extrema (RE), cuando la reacción solamente ocurre en una célula, durante la cual no se produce necrosis (Maule et al., 2007; de Ronde et al., 2014). Debido a estas respuestas, los virus (y otros patógenos) quedan confinados en el sitio de entrada en la planta, previniendo las infecciones (Moffett, 2009; de Ronde et al., 2014). A diferencia de la acción más lenta del RNAi antiviral (que se tratará a continuación), la respuesta del gen R generalmente es rápida y en aproximadamente 3-4 días contiene al virus. Aunque la mayoría de estos genes se activan por un virus específico y confieren resistencia solo a él, otros son efectivos contra varios virus que están relacionados (de Ronde et al., 2014).

Este reconocimiento por parte de la planta desencadena cambios hormonales significativos, incluyendo alteraciones en las concentraciones de ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y óxido nítrico (NO), así como un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el O_2^- y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tanto en tejidos infectados como en los no infectados (Carr et al., 2010; Pallás y García, 2011). A este proceso se le denomina “estallido oxidativo”.

El SA juega un papel crucial en la respuesta de las plantas a enfermedades (Palukaitis y Carr, 2008; Vlot et al., 2009). Actúa estimulando la expresión de genes que codifican proteínas esenciales para combatir patógenos y desarrollar resistencias. Su influencia se extiende tanto a la replicación como al movimiento de patógenos, tanto a corta distancia a través de los plasmodesmos como a larga distancia a través del tejido vascular. La mayoría del SA producido se transforma en glucosa conjugada y se acumula en las vacuolas. Además, el SA funciona como un antioxidante, potenciando genes que protegen contra el daño oxidativo (Vlot et al., 2009).

El JA y el etileno también pueden funcionar como señales inductoras, activando las vías de transducción de señales. El JA es un ácido graso oxigenado que regula la expresión de genes implicados en el desarrollo de las plantas y en su respuesta a estreses. Por otro lado, el etileno (C_2H_4) juega un papel clave en el crecimiento, desarrollo y muerte celular de las plantas, además de participar activamente en su defensa. Es especialmente abundante durante la HR, induciendo genes relacionados con la patogénesis y es vital para mantener la resistencia basal contra bacterias y hongos, aunque no parece esencial en la defensa contra virus (Palukaitis y Carr, 2008; Pacheco et al., 2012).

A nivel celular, la HR afecta a la homeostasis del ion calcio (Ca^{2+}) y altera el potencial y la permeabilidad de la membrana (Mur et al., 2008). Este flujo de cationes; en las células animales suele regular la síntesis de óxido nítrico (NO), sugiriendo una función similar en las plantas durante su respuesta defensiva. Se cree que los niveles relativos de NO y H_2O_2 en el tejido de la planta regulan la muerte celular programada durante la HR. El NO, a su vez, regula la expresión de genes de defensa, tanto en el lugar de infección como en tejidos más distantes, mediante la inducción de la biosíntesis de ácido salicílico (SA) (Palukaitis y Carr, 2008)

Además, en este proceso, se activan varias proteinasas similares a caspasas, como las enzimas procesadoras vacuolares que actúan principalmente como efectores de la muerte celular o necrosis durante la HR (Mur et al., 2008). A nivel molecular y bioquímico, durante la HR se activan varias cascadas de señalización genética para inducir múltiples proteínas relacionadas con patogénesis, como glucanasas, quitinasas y defensinas (Mur et al., 2008).

La mayoría de los genes R dominantes codifican las proteínas de unión de nucleótidos (NB; Nucleotide binding) conservadas de la familia LRR (Leucine Rich Repeat) (Moffett, 2009). Estas proteínas NB-LRR también contienen dominios N-terminales adicionales, como el dominio de homología TIR (Toll and Interleukin-1 Receptor) o CC (Coiled coil), entre otros. Hasta hace poco, se pensaba que el dominio LRR era el principal dominio crítico para la función de la proteína R. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que indican que tanto el dominio LRR como el N terminal (TIR o CC) son críticos para respuestas de resistencia adecuadas. Los dos dominios funcionan a través de interacciones moleculares o con otras proteínas (cofactores R) para mediar en el reconocimiento del patógenos y la respuesta de resistencia (Moffett, 2009). La mayoría de los productos del gen R conocidos son del tipo CC-NB-LRR. Los genes L de resistencia a Tobamovirus en pimiento son de este tipo (Tomita et al., 2008, 2011). El determinante Avr para las cuatro proteínas L es la CP de los tobamovirus (Berzal-Herranz et al., 1995; Gilardi et al., 2004). Por otro lado, sólo un pequeño grupo pertenece al grupo TIR-NB-LRR (de Ronde et al., 2014).

Se han descrito otros genes R dominantes contra virus que no pertenecen al tipo de genes NB-LRR. Destacan los genes RTM1, RTM2, RTM3 y JAX en *Arabidopsis thaliana* que previenen la propagación sistémica de varios potyvirus y potexvirus. En esos casos, el virus no puede acceder al floema impidiendo la infección de las partes distales del huésped. Además, tampoco se produce HR o un aumento en la producción de ácido salicílico (SA), como ocurre con las respuestas de resistencia mediadas por NB-LRR (Cosson et al., 2012; Yamaji et al., 2012). Otro tipo de gen R distinto es el *Tm-1*, que se encuentra en la especie de tomate silvestre *Solanum hirsutum*, y que codifica una proteína que contiene un barril TIM que se une a las proteínas de replicación de ToMV, inhibiendo así la replicación del RNA. (Ishibashi et al., 2007). En este caso tampoco se induce ninguna respuesta típica asociada al tipo NB-LRR, como la HR.

1.9.3.2. Genes recesivos

Otro mecanismo ampliamente utilizado por los mejoradores en muchos cultivos son los genes recesivos de resistencia, que suelen ser introducidos por cruzamiento o por mutagénesis y selección (Truniger y Aranda, 2009; Wang y Krishnaswamy, 2012; Piron et al., 2010). La resistencia recesiva es definida como la interacción incompatible entre el virus y el huésped. La

mayoría de los genes de resistencia recesiva aislados son factores de iniciación de la traducción eucariotas (eIF)4E y eIF4G, y sus isoformas (eIF4Es) (Hashimoto et al., 2016). Las mutaciones en eIF4E confieren pérdida de susceptibilidad a potyvirus y otros virus. En la mayoría de los casos, la resistencia se expresó en protoplastos, en hojas inoculadas y/o pareció afectar el movimiento del virus de célula a célula (Kang et al., 2005). La resistencia mediada por eIF4Es contra los potyvirus también ha sido descrito en pimiento (*Capsicum annuum*) y es mediado por los genes recesivos *pvr1*, *pvr2* y *pvr6* que confieren resistencia a varios potyvirus como TEV, PepMoV, PVY y PVMV (Ruffel et al., 2002; Kang et al., 2005; Ruffel et al., 2005; Ruffel et al., 2006).

1.9.3.3. SAR (systemic acquired resistance)

De manera similar a la HR, la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés 'systemic acquired resistance') se activa durante una interacción incompatible que involucra a las proteínas Avr y R en las células primarias infectadas. Sin embargo, la resistencia se transmite a los tejidos distantes no infectados. Aunque los mecanismos exactos de SAR no están definidos, se inicia a través de una interacción local entre las proteínas Avr y R y da como resultado la acumulación de fitohormonas como SA y JA en los tejidos distantes (Vlot et al., 2008), que provocan cambios en la expresión de genes de defensa (Dong, 2004). SAR es una respuesta inmune duradera preparada para proporcionar resistencia a los tejidos distantes contra infecciones posteriores.

1.9.3.4. La resistencia horizontal (poligénica)

En la resistencia horizontal o poligénica, que suele estar ligada a varios genes, no se produce una interacción "gen a gen" que produzca HR en la planta. Este tipo de resistencia supone una reducción de los índices de infección de la enfermedad, que tiene como consecuencia un retraso en su desarrollo. Además, suelen ofrecer una protección completa al operar contra todos los patotipos del patógeno. Se expresa por mecanismos de resistencia pasivos (Simmonds, 1991; Keane, 2012). Estas resistencias poligénicas son consideradas más duraderas en el tiempo que las resistencias verticales (genes mayores), que suelen ser menos estables y más fácilmente remontables por los patógenos (Palloix et al., 2009). Este hecho es debido a que, al no ser la resistencia horizontal absoluta, no produce extrema presión de selección en el patógeno para el desarrollo de nuevos patotipos (Maramorosch y Loebenstein, 2009).

1.9.3.5. Silenciamiento

Una de las respuestas de inmunidad innata que tienen las plantas y las protege de los virus, consiste en el silenciamiento del RNA antiviral (Antiviral RNA silencing o RNA de interferencia, RNAi) (Voinnet et al., 2005; Xie et al., 2004). El silenciamiento del RNA es una respuesta del huésped, desencadenada por RNAs bicatenarios (dsRNA). Las moléculas implicadas en RNAi son las conocidas como micro-RNA (mi)RNA y los pequeños RNA de interferencia (si, small interfering – RNA). Estas estructuras son detectadas por una enzima similar a la RNAasa tipo III del huésped, llamada proteína tipo Dicer (DCL), que los escinden en siRNA cortos de 20-26 nucleótidos (nt) de tamaño (Sharma et al., 2013; Chapman y Carrington, 2007).

Los siRNA generados se desenrollan y solo una de las cadenas, la llamada cadena guía, se carga en un complejo proteico funcional denominado complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Este complejo activado, vigila y degrada las moléculas diana de RNA (virales) con la secuencia complementaria a la cadena guía. La degradación del RNA diana está mediada por el componente central de RISC, el cortador, representado por un miembro de la familia de proteínas Argonauta (AGO) (Vaucheret, 2008; Sharma et al., 2013). Después de que se han generado los siRNA primarios, en las plantas sigue una amplificación de los siRNA, que es necesaria para generar una respuesta de RNAi para combatir eficazmente las infecciones virales a nivel local y sistémico. Esta amplificación involucra a las RNA polimerasas (RDR) dependientes del RNA del huésped, las cuales son capaces de convertir RNA(m) virales (aberrantes) en dsRNA de una manera dependiente e independiente del siRNA (Csorba et al., 2009). Su procesamiento posterior por parte de DCL conduce a la generación de siRNAs secundarios que corresponden a secuencias fuera de la secuencia objetivo primaria (Sijen et al., 2001). La respuesta antiviral de RNAi actúa contra todos los virus de RNA y DNA, pero en general es un proceso relativamente lento que no conduce a la eliminación completa de las infecciones virales (Incarbone y Dunoyer, 2013).

Los virus necesitan evadir o suprimir la respuesta de inmunidad de las plantas y para lograrlo codifican proteínas efectoras que interfieren con el reconocimiento por parte de los receptores de las plantas. Una de las estrategias más comunes que utilizan los virus de las plantas para contrarrestar el RNAi es codificar supresores del silenciamiento del RNA (RSS), proteínas virales que interfieren con una parte específica de la vía del RNAi y, por tanto, reducen su eficacia contra los virus de las plantas (Burgyan y Havelda, 2011). La mayoría de las proteínas RSS de virus vegetales ejercen esta actividad a través de la unión con (si)RNAs, o a veces dsRNA, y por lo tanto evitan su carga en RISC y DCL, respectivamente (Lakatos et al., 2006). La supresión viral de RNAi conduce a establecer una infección exitosa (de Ronde et al., 2014).

1.9.4. Mejora genética de plantas

La diversidad de productos agrícolas y ganaderos que tenemos hoy en día está directamente relacionada con el proceso de selección al que se han sometido plantas y animales desde el inicio de la agricultura (Harlan, 1992). Aunque en el pasado, y todavía en algunas regiones, los agricultores y ganaderos eran quienes realizaban esta selección según sus preferencias o necesidades, actualmente son los mejoradores quienes llevan a cabo la tarea de seleccionar y mejorar plantas o animales. El material vegetal utilizado en la mejora genética de plantas incluye desde variedades cultivadas hasta especies silvestres estrechamente relacionadas, abarcando variedades locales, modernas, sintéticas, híbridos, clones, silvestres, y “malas hierbas compañeras”. Es decir, cualquier material que ofrezca variabilidad genética y del que se puedan extraer caracteres útiles puede ser empleado en la mejora genética de plantas (Cubero, 2013). La biología molecular ha revelado una base genética muy estrecha entre las variedades cultivadas, especialmente en especies autógamias, donde la domesticación podría haber ocurrido en una única población silvestre o en unas pocas. Por lo tanto, la variabilidad que tenemos hoy en día se debe a procesos de mutación, recombinación, segregación, deriva

genética, cruzamientos intra e interespecíficos y selección (Sánchez-Monje, 1974; Cubero, 2013).

Durante el proceso de domesticación de las especies silvestres, se realizaron automáticamente cambios en la información hereditaria del material cultivado, siempre a favor de las necesidades de la humanidad, solo con el simple hecho de cultivarlas (Harlan, 1992). Las primeras mejoras en agricultura fueron a partir de una selección *intuitiva*, que produjo diferentes variedades a causa de los diferentes ambientes, diferentes materiales de partida y los gustos de las poblaciones humanas, produciéndose variedades locales heterogéneas a partir de la selección masal (Sánchez-Monje, 1974; Cubero, 2013). A partir del descubrimiento de la reproducción sexual de las plantas en el siglo XVII la mejora se tecnificó y comenzaron a realizarse cruzamientos entre variedades a finales del XVIII. Además, se comenzó a investigar sobre nuevos métodos de selección (evaluando la descendencia) y a estudiar las bases biológicas de la herencia, el vigor híbrido y sobre las consecuencias de las autofecundaciones (Cubero, 2013).

El redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900 permitió un desarrollo espectacular en la mejora genética. Además, se comenzaron a aplicar técnicas como la poliploidía y la mutagénesis, lo que condujo a la creación de nuevas especies y genes (Cubero, 2013). Se describieron los efectos de la heterosis y la consanguinidad, iniciando la producción de líneas puras e híbridos. Se introdujo el término "cultivar" para distinguir las nuevas variedades altamente uniformes de las que se habían obtenido anteriormente. Durante el siglo XX, se continuó trabajando con cruzamientos y selección siempre que fuera posible el cruzamiento sexual entre plantas, así como con mutagénesis o poliploidía, clasificando estas técnicas dentro de la mejora clásica o convencional (Cubero, 2013).

En las últimas décadas, se han utilizado técnicas de mejora genética clásica para introducir resistencias a patógenos, mejorar la calidad del producto o adaptar mejor los cultivos al medio. Sin embargo, los métodos de mejora clásica que se han venido aplicando requieren de mucho tiempo de ejecución, ya que es necesario realizar varios cruzamientos para que la información hereditaria se transmita adecuadamente en un genotipo de interés (Cubero et al., 2013). Por ello la aplicación de las técnicas de ingeniería molecular como los organismos genéticamente modificados (OGM) o la utilización de la edición genética como los CRISPR/Cas marcarán el futuro de la mejora genética vegetal (Permyakova y Deineko, 2024).

1.9.4.1. Mejora por Retrocruzamiento

Uno de los métodos de mejora clásica más empleados para la introducción de genes en genotipos es el del retrocruzamiento. Este método tiene interés cuando se dispone de una variedad con buenas características agronómicas, pero que posee una deficiencia específica que se pretende superar (Fita et al., 2008; Cubero 2013), como por ejemplo que sea sensible a enfermedades. Suele ser empleado frecuentemente en mejora para introducir genes de resistencia a enfermedades (hongos, nematodos, bacterias, virus, etc.) (Miedaner, 2016). El retrocruzamiento es muy útil cuando se desea incorporar a un genotipo recurrente, uno o pocos genes de un genotipo llamado donante, conservando en todo lo posible el resto de los genes del recurrente (Figura 1.24). Suele ser un método exitoso y fácil de aplicar cuando se

quieren introducir genes dominantes, siendo menos cómodo cuando se trata de genes recesivos. Además, cuanto menor sea el número de genes a introducir más fácil es la ejecución de este método de mejora (Fita et al., 2008).

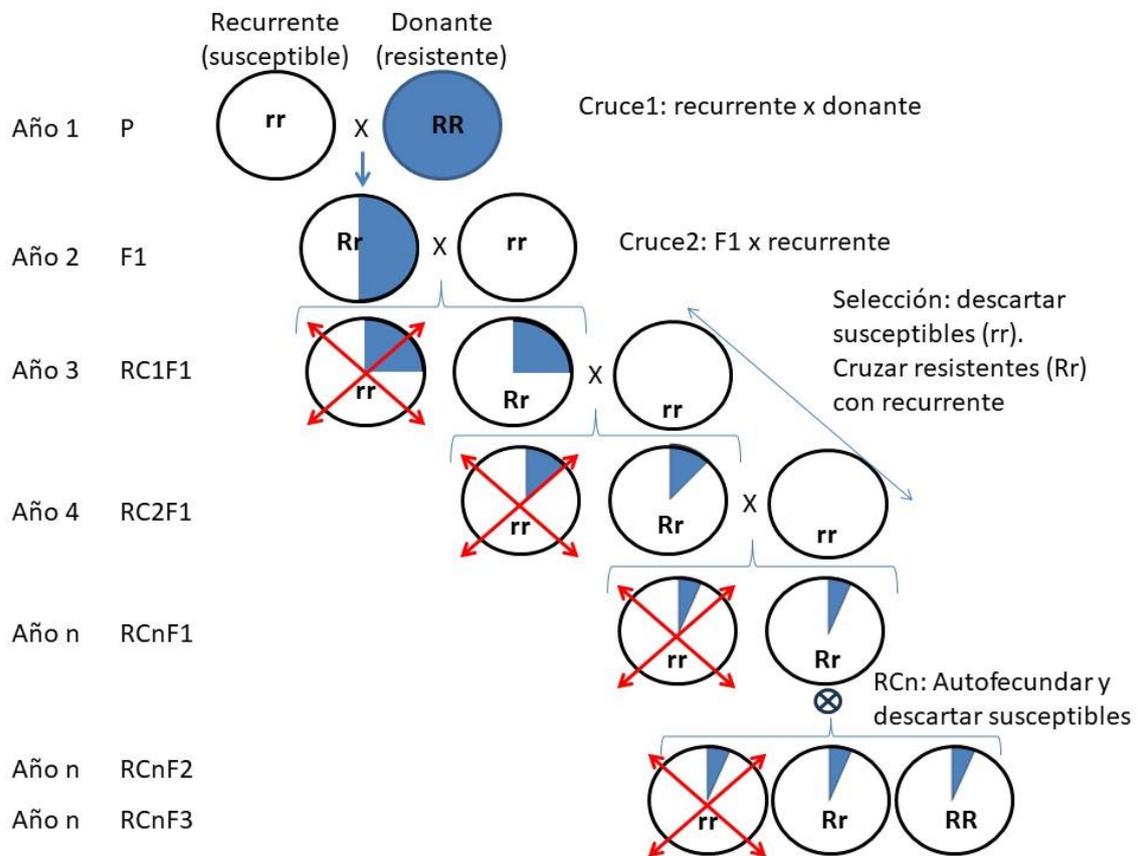


Figura 1.24. Esquema de programa de mejora genética por retrocruzamientos para introgresar un gen dominante R de resistencia a un patógeno en una variedad de interés agronómico. En Azul se representa el porcentaje del genoma del parental donante en las sucesivas generaciones del programa. Fuente: Fita et al., 2008.

En cada generación de retrocruzamiento con el parental recurrente se recupera el 50% del fondo genético de la variedad de interés agronómica y habrá que seleccionar aquellas plantas que tengan el gen que deseamos introducir. Para agilizar este proceso de selección se suelen emplear marcadores moleculares ligados a los genes que interesa introducir en la variedad recurrente (sigla en inglés MABC: marker assisted backcrossing) (Kang et al., 2014; Jo et al., 2023; Ro et al., 2024). Una vez realizados los suficientes retrocruzamientos como para haber recuperado las características de la variedad recurrente, se pueden fijar los genes de interés en la variedad recurrente realizando autofecundaciones y seleccionando los genotipos de interés (Fita et al., 2008).

En el contexto de esta Tesis, se debe resaltar la necesidad de desarrollar nuevas herramientas analíticas para detectar los principales virus que afectan al cultivo de pimiento en Euskadi. Primero, en 2014, se realizó una prospección a gran escala aplicando la técnica DAS-ELISA en cultivo de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra. Posteriormente, se puso a punto la técnica de hibridación molecular con ribosondas individuales y polisondas. Con las sondas individuales se volvió a realizar una prospección a gran escala en parcelas de agricultores en 2019. Además,

se investigó si la flora silvestre actuaba como reservorio de algunos virus prevalentes en cultivo al aire libre, como CMV y PVY. En cuanto a las polisondas, se desarrollaron tres que eran capaces de detectar simultáneamente 9, 12 y 21 virus que afectan al cultivo de pimiento a nivel global (menos prevalentes, más prevalentes y totales, respectivamente). Se realizó la validación de estas polisondas comparándolas con las sondas individuales y con test DAS-ELISA, evaluando el efecto de la longitud de las polisondas, así como de la posición de las sondas individuales dentro de la polisonda sobre la sensibilidad de detección. Las polisondas podrían ser herramientas muy útiles para cribar una gran cantidad de material y detectar múltiples virus en un solo análisis. Estas herramientas analíticas permitieron identificar un nuevo Tobamovirus, del cual se obtuvo la secuencia completa y se realizaron investigaciones epidemiológicas sobre su transmisión de semilla a planta, así como sobre su patotipo mediante inoculaciones sobre variedades con diferentes alelos del gen 'L' de resistencia a tobamovirus. Finalmente, tras analizar los resultados de las prospecciones, se decidió comenzar un programa de mejora genética por retrocruzamientos asistido por marcadores moleculares, con el objetivo de obtener variedades de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra resistentes a tobamovirus.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El conocimiento de la etiología de las virosis que afectan al cultivo en un área agroclimática, mediante la aplicación de técnicas de detección específicas, junto a la introducción de genes de resistencia en las variedades locales sensibles de pimiento, puede constituir una estrategia de control eficaz y duradera, siempre y cuando se complemente con medidas culturales orientadas a la reducción de la carga viral en el patosistema.

2.2. Objetivos

La presente Tesis tiene como objetivo principal la identificación de los virus que afectan significativamente a los cultivos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra en el entorno agroclimático de Euskadi. Para alcanzar este fin, se han implementado metodologías avanzadas de detección, incluyendo el uso de sondas individuales y polisondas mediante la técnica de Hibridación Molecular. Una vez determinados los virus más perjudiciales, se han realizado programas de mejora genética orientados a la incorporación de genes de resistencia para algunos de los virus en las anteriores variedades. Este enfoque busca mejorar la viabilidad, salud y producción de los cultivos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra, asegurando su sustentabilidad.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar los principales virus que afectan a los cultivos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra en Euskadi mediante prospecciones a gran escala, aplicando las técnicas de detección DAS-ELISA e Hibridación Molecular (HM).
- 2) Validar el uso de tres polisondas de HM en los cultivos de pimiento, con capacidad para detectar los 9 virus menos frecuentes (poli9), los 12 virus más frecuentes (poli12) y todos los virus anteriores (poli21), mediante su comparación tanto con sondas individuales de HM como con la técnica DAS-ELISA.
- 3) Caracterización molecular de un nuevo Tobamovirus que ha generado problemas en algunas parcelas de pimiento de Euskadi.
- 4) Determinar la tasa de transmisión por semilla del nuevo Tobamovirus y evaluar su comportamiento frente a los diferentes alelos del gen 'L' de resistencia (serie alélica L1-L4).
- 5) Obtener genotipos resistentes a varios Tobamovirus en las variedades de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra mediante programas de mejora genética por retrocruzamientos asistidos por marcadores moleculares y su posterior evaluación mediante inoculaciones de distintos patotipos en condiciones controladas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1. Área de estudio

Este trabajo aborda la problemática de las enfermedades virales en Euskadi, principalmente en las provincias de Bizkaia y Gipuzkoa, situadas al norte de la Península Ibérica (Figura 3.1). Esta región junto con el litoral del mar Cantábrico se caracteriza por un clima templado y húmedo que contrasta con el del resto del territorio peninsular, donde predominan temperaturas más cálidas, una mayor radiación solar y menor precipitación. La zona climática donde se realizan los ensayos de este trabajo se clasifica como templada húmeda sin estación seca, también conocida como clima atlántico. Esta clasificación implica una región con altas precipitaciones y temperaturas moderadas, con variaciones térmicas pequeñas entre invierno y verano. La proximidad al mar y la configuración geográfica contribuyen a las frecuentes lluvias en esta área, con una precipitación media anual que oscila entre 1.200 y 2.000 mm, pudiendo superar los 2.000 mm (AEMET, 2024).

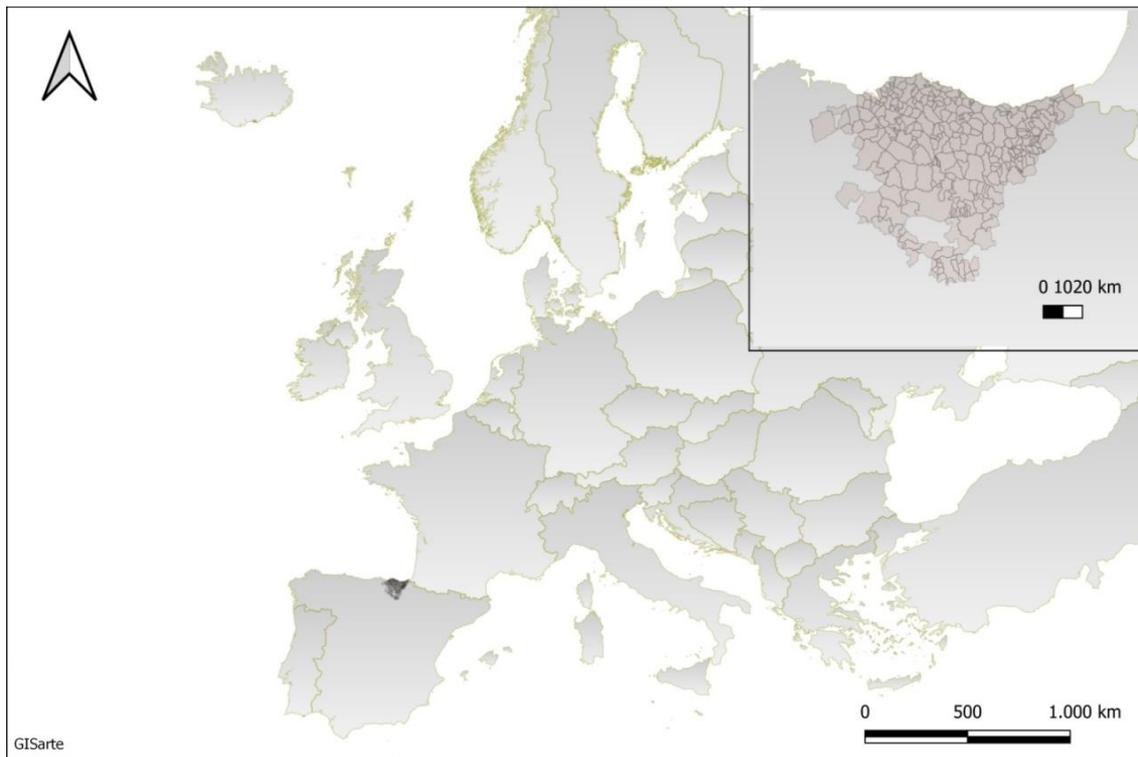


Figura 3.1. Mapa de Europa con un enfoque ampliado de Euskadi, destacando el área específica donde se han llevado a cabo los estudios descritos en esta Tesis.

3.2. Prospecciones de virus en parcelas de agricultores

3.2.1. Prospección a gran escala en parcelas profesionales de pimiento de Euskadi

En octubre de 2014, hacia el final del ciclo de cultivo, se llevó a cabo una prospección a gran escala en parcelas profesionales de pimiento pertenecientes a 44 localidades de Euskadi, con el objetivo de determinar qué virus más prevalentes y los que mayores daños causaban en el cultivo. Este estudio abarcó el 77 % del área de cultivo profesional de pimientos en Bizkaia y Gipuzkoa.

Las muestras de plantas fueron recolectadas individualmente y almacenadas en bolsas de polietileno, que a su vez se guardaron en contenedores refrigerados con bloques de hielo. Estas muestras se transportaron al laboratorio al final de la jornada y fueron conservadas a 5 °C hasta su análisis que demoró entre 7-14 días. El número de muestras recolectadas por parcela dependió del tamaño las mismas. En las parcelas pequeñas de menos de 1000 m² (61,8 % de las parcelas), se tomaron 6 muestras; en parcelas de entre 1000 a 2000 m² (18,8 %) se tomaron 10 muestras; en parcelas de entre 2000 a 4000 m² (12,3 %) se recogieron 16 muestras; y en las parcelas más grandes de más de 4000 m² (7,1 %), se recolectaron 40 muestras. Durante las inspecciones realizadas en estas parcelas, se dio prioridad a muestrear aquellas plantas que mostraran síntomas de virosis, con el fin de identificar los virus que estaban causando los mayores daños en los cultivos de pimiento de la zona de estudio. En las parcelas donde no se detectaron suficientes muestras sintomáticas, se muestrearon plantas asintomáticas aleatoriamente.

Se prospectaron un total de 97 parcelas, lo que representó una superficie de 24,3 ha. La superficie de parcelas en las que se muestreó correspondió a parcelas al aire libre (78 %), invernaderos de suelo (7 %) e invernaderos hidropónicos (15 %). De 1107 plantas muestreadas, el 50 % fueron tomadas en parcelas al aire libre y el 50 % en condiciones de invernadero. Dentro de las muestras de invernadero, el 53 % de las muestras se tomaron en invernaderos de suelo y el 47 % en invernaderos hidropónicos. De las 1107 muestras, el 53 % fueron muestras del tipo guindilla de Ibarra, el 42 % del tipo pimiento de Gernika y el 5 % restante del tipo pimiento de asar de Bizkaia.

3.2.2. Análisis de muestras y análisis estadístico

Las muestras se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA (Clark y Adams 1977) utilizando sueros específicos de TMV, ToMV, TMGMV, PaMMV, PMMoV, PVY y TSWV. Los sueros utilizados en este trabajo fueron de la marca Loewe Biochemica (Alemania) siguiendo las indicaciones del proveedor para el análisis de las muestras. La absorbancia de la reacción serológica se midió con un lector de microplacas (Bio Rad modelo 550, Hércules, CA, EEUU). Se determinó que las muestras estaban infectadas si su absorbancia superaba tres veces la absorbancia promedio de los controles negativos obtenidos de hojas sanas.

Para evaluar la relevancia de las variaciones en los porcentajes de plantas y parcelas infectadas, considerando tanto el tipo de pimiento como el sistema de cultivo, se aplicaron

pruebas de Chi-cuadrado (χ^2) para verificar la igualdad en las distribuciones. Se estableció un umbral de significación estadística en un valor $P < 0,05$.

3.2.3. Determinación del patotipo de PMMoV en parcelas de pimiento de Euskadi a partir de ensayos de inoculación.

Los genes de resistencia a los patotipos P1.2 y P1.2.3 de PMMoV confieren resistencia al resto de los tobamovirus presentes en la zona de estudio (Tomita et al., 2008). Por ello, se llevó a cabo un bioensayo de inoculación tanto para determinar los patotipos de PMMoV presentes en Euskadi como para identificar qué genes de resistencia serían necesarios introducir en las variedades locales sensibles.

Las 36 muestras en las que se detectó infección por PMMoV fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas muestras fueron inoculadas en tres cultivares de pimiento con diferentes niveles de resistencia a patotipos de Tobamovirus: a) Variedad “Negral” (sensible a todos los patotipos de Tobamovirus), b) Variedad híbrida “Padua” (gen L3; resistente a los patotipos P0, P1 y P1.2; Rijk Zwaan) y c) Variedad híbrida “Giulio” (gen L4; resistente a los patotipos P0, P1, P1.2 y P1.2.3; Rijk Zwaan). Además, en cada uno de los tres cultivares de pimiento se incluyeron tres tratamientos control: i) control negativo de plantas no inoculadas; ii) control positivo de un aislado PMMoV P1.2 y iii) control positivo de PMMoV P1.2.3.

Cada uno de los 36 aislados de PMMoV fueron inoculados en cinco plantas de cada uno de los cultivares en el estado fenológico de 6 hojas verdaderas (6 HV) completamente desarrolladas. Para preparar cada suspensión de inóculo, se aplicaron 10 ml de tampón fosfato (NaH_2PO_4 — Na_2HPO_4 , 50 mM a pH 7,5) y 1 g de tejido foliar infectado. Este tejido, que se había conservado a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trituró previamente en un mortero para asegurar una mezcla homogénea. Se añadió carborundo (carburo de silicio) con el objetivo de generar un efecto abrasivo en las hojas y de esa manera conseguir una inoculación del virus más efectiva. Las plantas fueron inoculadas frotando las dos primeras hojas verdaderas con el inóculo del virus. Para el control negativo de plantas no inoculadas se preparó una suspensión con tejido de hojas sanas de pimiento y tampón fosfato. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ día y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ noche), con un fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas noche. Los síntomas se registraron en cada una de las plantas inoculadas a los 15 y 30 DDI. Las plantas sensibles a los virus mostraron síntomas de mosaico (M) en las hojas superiores no inoculadas. Las plantas se consideraron resistentes cuando se observaron lesiones necróticas localizadas o puntos necróticos (PN) en hojas inoculadas (respuesta de Hipersensibilidad; HR), seguidas de abscisión (A) (Suzuki et al., 2003). Se utilizó la prueba DAS-ELISA para determinar la presencia o ausencia de PMMoV en hojas sistémicas a los 15 y 30 DDI, realizando la analítica con sueros específicos de PMMoV (Loewe Biochemica) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La absorbancia fue medida por el mismo lector de micro-placas descrito anteriormente y la positividad fue determinada tal y como se ha descrito antes.

3.2.4. Muestreos realizados durante los años 2017-2018

Durante 2 temporadas consecutivas (2017-2018) del cultivo de pimiento en Euskadi, se realizaron muestreos para conocer mejor qué virus estaban causando los mayores problemas

en las parcelas de agricultores. Se volvieron a muestrear preferentemente muestras con síntomas de virosis. Las muestras fueron analizadas por la técnica DAS-ELISA y se realizaron tres muestreos por año (junio-julio, agosto y septiembre). Los virus analizados fueron TSWV, TMGMV, ToMV, PMMoV, CMV y PVY.

En 2017, se muestrearon 5 parcelas de agricultores, siendo tres en condiciones de cultivo al aire libre, una en invernadero hidropónico y otra en invernadero de suelo. En junio se analizaron 31 muestras, distribuidas en 25 de cultivo al aire libre, 3 de invernadero de suelo y 3 de invernadero hidropónico. En agosto, la cantidad de muestras aumentó a 81, con 32 de aire libre, 45 de invernadero de suelo y 4 de invernadero hidropónico. En septiembre, se estudiaron 4 parcelas y se recogieron 92 muestras, siendo 67 de aire libre y 25 de invernadero hidropónico.

En 2018, se llevaron a cabo muestreos en 7 parcelas de pimiento. De éstas, tres fueron dedicadas a cultivos al aire libre, otras tres a cultivos en invernaderos hidropónicos y una a cultivo en invernadero de suelo. En el mes de julio, se analizaron un total de 48 muestras, distribuidas en 23 muestras de cultivo al aire libre, 5 de invernadero de suelo y 20 de invernadero hidropónico. En agosto, el número de muestras aumentó a 65, con una composición de 35 muestras de cultivo al aire libre, 25 de invernadero de suelo y 5 de invernadero hidropónico. Finalmente, en septiembre se muestrearon 6 parcelas, de las cuales se obtuvieron 90 muestras en total, siendo 41 de cultivo al aire libre, 44 de invernadero hidropónico y 5 de invernadero de suelo.

3.2.5. Prospección a gran escala en parcelas de agricultores de Euskadi 2019

En 2019, se realizó otra prospección a gran escala en parcelas de 81 agricultores profesionales y se analizaron 1190 muestras individualmente. Fueron muestreadas prioritariamente muestras con síntomas de virosis. Los criterios de muestreo fueron los mismos que en la prospección de 2014, teniendo en cuenta la superficie de la parcela. En Araba, solo se muestrearon 6 muestras en una parcela, mientras que en Bizkaia y Gipuzkoa se muestrearon 555 y 638 muestras, respectivamente. En cuanto al sistema del cultivo, 664 muestras fueron muestreadas en cultivo al aire libre, 15 en hidropónico al aire libre, 260 en invernaderos de suelo y 260 en invernadero hidropónico. En cuanto al material vegetal, 716 muestras fueron clasificadas como del tipo varietal guindilla de Ibarra, 426 del tipo Gernika, 49 del tipo asar de Bizkaia, y 8 del tipo italiano. Las muestras fueron analizadas por Hibridación molecular (HM) con sondas individuales (Tabla 3.2, sección 3.3.1). Se utilizaron sondas individuales para analizar 21 virus y 2 viroides que suelen afectar al cultivo de pimiento.

3.2.6. Muestreo de flora silvestre en parcelas de guindilla para ver si actúan como huéspedes de CMV y PVY

En 2021, se llevó a cabo un estudio sobre la flora silvestre en cuatro parcelas de guindilla de Ibarra en Gipuzkoa, examinando las plantas tanto en los bordes de cada parcela como dentro de las áreas cultivadas. El objetivo de este estudio fue determinar si la flora silvestre que estaba situada alrededor de las parcelas actuaba como huésped de virus transmitidos por pulgones, como CMV y PVY. Dos de estas parcelas estaban situadas en Ibarra, una en Hernani y

la cuarta en Usurbil. El estudio comprendió dos fases de muestreo: la primera antes del cultivo, en marzo, y la segunda hacia el final del cultivo, en septiembre. Durante la primera fase de muestreo, se recolectaron aleatoriamente 1140 muestras de plantas silvestres de las cuatro parcelas mencionadas. En la fase final del cultivo, se recolectaron 1183 plantas. La distribución detallada de las muestras se expone en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Muestreo de flora silvestre en 4 parcelas de guindilla al aire libre en Gipuzkoa en la campaña 2021. Se especifican el número de muestras que se cogieron en cada momento de muestreo, así como la ubicación de estas muestras en la propia parcela.

Parcela	Localización	Superficie Cultivada (m²)	Perímetro borde parcela (m)	Muestras borde Marzo	Muestras parcela Marzo	Muestras borde Septiembre	Muestras parcela Septiembre
1	Ibarra	6315	375	207	47	164	114
2	Ibarra	4158	275	320	-	190	121
3	Hernani	4964	383	464	58	159	136
4	Usurbil	3354	260	208	43	147	152

Las plantas de flora silvestre se recolectaron mediante un método de muestreo aleatorio utilizando un marco cuadrado de 0,5 m x 0,5 m. Este cuadrado se dispuso al azar en los bordes de las parcelas de guindilla de Ibarra, y se muestrearon todas las plantas dicotiledóneas (preferentemente aunque también se muestrearon algunas monocotiledóneas, arbustos o incluso hojas de manzanos de forma aislada) dentro de sus límites, cubriendo meticulosamente todo el perímetro del área designada aleatoriamente. Tras realizar el muestreo perimetral de los bordes de las parcelas, se realizó un proceso de muestreo aleatorio similar dentro de la zona interna de cultivo de las parcelas. Después del proceso de muestreo, todas las plantas recolectadas fueron identificadas y preparadas para su posterior análisis en el laboratorio. La identificación de todas las plantas muestreadas se llevó a cabo a partir de claves ilustradas de la flora del País Vasco y territorios limítrofes (Aizpuru et al., 1999). Se hizo un esfuerzo por identificar las especies, pero en ciertos casos, la clasificación se limitó al nivel de género debido a incertidumbres. Adicionalmente, algunas plantas (pocas) no pudieron ser identificadas ya que no había información en la clave. Todas las muestras fueron analizadas por HM con sondas específicas de CMV y PVY (Tabla 3.2; sección 3.3.1).

En 2022 se volvió a realizar el muestreo de la misma manera que en la campaña anterior, pero esta vez solamente se muestreó una de las parcelas, la que estaba situada en Hernani y que presentó los mayores problemas de CMV en el cultivo de guindilla de la campaña anterior (2021). En este ensayo se muestrearon 322 plantas del borde de la parcela y 76 muestras dentro de la zona interna de cultivo. Estas muestras fueron analizadas solo para CMV por HM.

3.3. Hibridación Molecular no radioactiva

3.3.1. Obtención de sondas específicas, sus controles positivos y polisondas para Hibridación molecular

Para generar las sondas individuales de hibridación molecular se utilizó el plásmido pSK+ (pBluescript II SK (+)), el cual posee un sitio de clonaje múltiple (MCS) y resistencia a

ampicilina. Este plásmido contiene los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7, los cuales permiten generar transcritos de las dos polaridades de los fragmentos clonados en el MCS. En general, la polimerasa T7 se utilizó para la síntesis de sondas individuales y/o polisondas mientras que la polimerasa T3 se utilizó para la síntesis de los controles positivos específicos de cada virus. Este plásmido fue cortado con la enzima de restricción *XhoI*, debido a su ubicación cercana a la secuencia promotor de la RNA polimerasa T7, evitando así la inclusión de secuencias no relacionadas con las sondas virales. Para evitar la religación del plásmido se realizó una digestión con fosfatasa. La inserción de las diferentes secuencias virales y/o viroidales se llevó a cabo mediante amplificación por PCR, a partir de tejido infectado, utilizando cebadores específicos que contenían las secuencias de las enzimas de restricción *XhoI* (extremo 5') y *Sall* (externo 3') (Tabla 3.2). Los extremos generados por estas enzimas de restricción son compatibles entre sí, permitiendo ligar un extremo cortado por *XhoI* con un extremo cortado por *Sall*. Una vez ligados los extremos, se forma un sitio "híbrido" que no puede ser cortado por ninguna de las dos enzimas. Este hecho, permite ligar los productos de PCR, previamente digeridos con los enzimas *XhoI* y *Sall*, en el plásmido pSK+ cortado con *XhoI* y desfosforilado. La correcta orientación del producto de PCR permite anular el híbrido *Sall/XhoI* del extremo 3', dejando un único sitio *XhoI* en el extremo 5' del inserto para posteriores inserciones o para la síntesis de la correspondiente sonda (Peiró et al., 2012).

Tabla 3.2. Pares de cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de los virus correspondientes.

Virus/Viroide	Secuencia cebadores 5'-3' ^b	Fragmento esperado	Localización ^c	Nº acceso GenBank
Potato virus Y, PVY	S ^a <u>CTCGAGATTTGGAACGGATCATTGAA</u> aS <u>GAGCTGTGGTACTCTCTTAATAGGTG</u>	470	7513-7982	AJ890346
Tobacco etch virus, TEV	S <u>GTTCGAGGAAGCTGGGAATTTGGAATG</u> aS <u>GAGCTGGTACTCACACAACAGGTGGT</u>	480	7468-7947	DQ986288
Bell pepper mottle virus, BPeMV	S <u>GTTCGAGGTGTAAGGTTCCCGGCTAG</u> aS <u>GATGCCACATCATCAGGTCCATTCA</u>	292	5873-6164	DQ355023
Obuda pepper virus, ObPV	S <u>GTAGGGCGGATCCGATTACATTTAT</u> aS <u>GATGTGCGACTCACTGCCTTCGATG</u>	295	5807-6101	L11665
Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV	S <u>GTAGGACAGTGAGATTTCTGCATC</u> aS <u>GAGCTCTCATCGGCCTCAACACCAGG</u>	300	5843-6143	MF139550
Pepper mild mottle virus, PMMoV	S <u>CTCGAGTCGAATCAGTTCCAATGGCT</u> aS <u>GAGCTGATTGCGGCTTCATGTGTCTA</u>	280	5501-5780	MN267901
Potato virus X, PVX	S <u>GTTCGAGAAGAGGTGTGCACACTTAGG</u> aS <u>GAGCTCACTGTGCGAGTAGATCCGACC</u>	300	6002-6301	M95516
Cucumber mosaic virus, CMV	S <u>GTTCGAGAAGCTTGTTCGCGCATCA</u> aS <u>GAGCTGCTCCTGCCGCATGAAAGAGTA</u>	257	1537-1793	LC066515
Alfalfa mosaic virus, AMV	S <u>GTTCGAGAAGTTCGGGTTTGAGTTGGTC</u> aS <u>GAGCTGCTGCTAGTTCTAGCAGTCGAA</u>	241	540-780	L00162
Tomato spotted wilt virus, TSWV	S <u>GTTCGAGTTTTGCCTGCTTTTTAACCCC</u> aS <u>GAGCTGGAGCCCTAGCTGGGTTTCTTC</u>	231	529-759	FR693175
Tobacco mosaic virus, TMV	S <u>CTCGAGTTTGAGAGAGAAGATTACAAA</u> aS <u>GAGCTCCATTCTGTATAAAATTTTGCTT</u>	300	5421-5720	MK087763
Tomato mosaic virus, ToMV	S <u>CTCGAGAATGTTCCAATGTCGGTTAGA</u> aS <u>GAGCTGGATTGCTTAAACATGTTTGCA</u>	297	5503-5799	MN267904
Paprika mild mottle virus, PaMMV	S <u>GTTCGAGAGATTTAGTGACGGTGAGAAC</u> aS <u>GATGACATCATCGACGCCATCAGGT</u>	300	5931-6230	AB089381
Broad bean wilt virus 2, BBWV2	S <u>GTAGGCTCATGAGAATAGTCTTAGT</u> aS <u>GATGTATGAACTAACAGAATTTTTA</u>	300	3120-3419	KJ789137
Pepper vein yellows virus, PeVYV	S <u>GTAGACAAGTCTTCAATAGCCAAA</u> aS <u>GATGCCTGGCGGAAACTTACACCT</u>	300	5540-5839	AB594828
Tomato bushy stunt virus, TBSV	S <u>GTAGGGAAAGTTGTATTTAAGAGAT</u> aS <u>GAGCTGAGAGTCATGGAAGTCCCGTAG</u>	300	4084-4383	M21958
Parietaria mottle virus, PMoV	S <u>GTTCGAGCCAAGATTCTGATGCCAACGA</u> aS <u>GAGCTCGCCGTAAACATGCACACGAAG</u>	223	1568-1790	FJ858204
Tomato mottle mosaic virus, ToMMV	S <u>CTCGAGATTACAAGAGTGATGACGCA</u> aS <u>GTTCGAGGATTTGATAGTGATTGAGGTA</u>	220	5441-5660	KU594507
Eggplant mottled dwarf virus, EMDV	S <u>GTTCGAGCTGAACTCATGTGCATCAAAA</u> aS <u>CAGCTGCCCATCATAACCTAGTCTTGA</u>	313	7-319	HM636918
Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV	S <u>GTTCGACGACCAGGCGATATAATCATTT</u> aS <u>GAGCTGTATCTTTATCTACGATAAAA</u>	750	476-1225	AB116630
Tomato chlorosis virus, ToCV	S <u>GTTCGAGGTGGTATTCTGTTTTGTTTTA</u> aS <u>GAGCTGATTTAGATGGTTCCAATGCA</u>	350	4084-4383	KJ200309
Potato spindle tuber viroid, PSTVd	S <u>CTCGAGCGAACTGGCAACAAGGACGGT</u> aS <u>GAGCTGAAGGGGCCCTAGGACTTCGC</u>	337	22-358	M25199
Pepper chat fruit viroid, PCFVd	S <u>CTCGAGAATCCCCGCTGAAACAGGGT</u> aS <u>GAGCTGAAGGGGCCCTAGGACTTC</u>	294	154-447	JF446901

^a S: cebadores sentido; aS: cebadores antisentido.

^b Los nucleótidos subrayados representan sitios de restricción diseñados.

^c Los números se refieren al nucleótido correspondiente de la secuencia disponible en el número de acceso de GenBank.

Los productos de PCR fueron obtenidos a partir de tejido infectado, utilizando para ello RNA total. Para extraer la fracción de RNA totales se partió de 0,1 g de tejido infectado que se trituró con nitrógeno líquido. Posteriormente se añadieron 1.000 μl de reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se dejó reposar 5 min para después añadir 200 μl de cloroformo. Se esperó 15 minutos y se centrifugó en frío (4 °C) durante 15 minutos a 13.000 rpm. Al sobrenadante obtenido se le añadió 0,5 ml de isopropanol, se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 100 μl de agua estéril y se volvió a precipitar añadiendo 10 μl de acetato sódico 3M (pH: 5,5) y 2,5-3 volúmenes de etanol. Tras incubar a -80 °C/15 minutos o -20 °C/30 minutos, se centrifugó a 13.000 durante 15 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en un volumen inicial de 50 μl de agua estéril, se cuantificó con NanoDrop™ OneC (Thermo Fisher Scientific Inc.) para dejar todas las muestras a una concentración de 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y se guardó a -80 °C hasta su uso.

Con el fin de amplificar la región del virus que se quería clonar para generar la sonda el primer paso fue la obtención del DNAc a partir de reacciones de transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de RNA total extraído del material vegetal infectado. Para estas reacciones se utilizó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen Inc.). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μl conteniendo: 5 μl de la mezcla de reacción 2X, 1 μl de polyvinylpyrrolidone (PVP) al 10 %, 1 μl de la mezcla de cebadores 10X (5 μM), 0,1 μl Ribolock RNase (40 U μl^{-1}), 0,4 μl de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix y 0,6 μl del RNA extraído. Las condiciones de las reacciones fueron: reacción de transcripción reversa durante 30 minutos a 50 °C e incubación durante 2 minutos a 96 °C para la desnaturalización de la enzima RT y para la amplificación (PCR): desnaturalización durante 10 segundos a 96 °C, alineamiento durante 10 segundos a 53 °C y extensión a 68 °C a razón de un minuto por kb durante 30 ciclos.

Los fragmentos amplificados por PCR posteriormente purificados, fueron digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *Sall* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Todos los cebadores sentido-diseñados para generar las sondas de los diferentes virus contenían la secuencia de la enzima de restricción *XhoI* mientras que los cebadores antisentido contenían la secuencia de la enzima de restricción *Sall*. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 30 μl conteniendo 3 μl del tampón O 10X, 1 μl de cada enzima (10 U μl^{-1}) y los 25 μl en los que se habían resuspendido los amplicones tras fenolizar y precipitar con etanol. La digestión se incubó a 37 °C durante 2 horas, tras lo cual se procedió a extraer los fragmentos de gel de agarosa o a inactivar la reacción mediante incubación a 80 °C durante 20 minutos. La purificación de los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción se realizó cargando todo el volumen de la reacción en gel de agarosa/TAE al 1 % y utilizando el Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). La elución de los fragmentos se realizó en un volumen final de 15 μl del tampón de elución.

Los fragmentos de DNA se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligase (Promega). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 8 μl conteniendo: 0,8 μl del tampón de la ligasa 10X, 0,8 de ATP 10 mM, 1 μl de polietilenglicol (PEG 3000) al 40 %, 0,5 μl de la T4 DNA ligasa, 0,5 μl del vector de clonación pSK+ (25 ng), previamente digerido con *XhoI* y desfosforilado y 1 μl del inserto de DNA correspondiente (50 ng). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente

durante al menos 30 minutos. No obstante, la mayoría de las ligaciones se dejaron incubando toda la noche a temperatura ambiente.

La reacción de desfosforilación del vector pSK+ se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 1 μ l de *Xho*I, 1 μ l de fosfatasa alcalina termosensible (SAP) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2 μ l del tampón R 10X y 200 ng del vector plasmídico. Tras incubar la reacción a 37 °C durante 2 horas, se inactivó la reacción incubando a 80 °C durante 20 minutos.

Con el fin de seleccionar bacterias recombinantes que contuvieran nuestro inserto de interés, se analizaron las colonias obtenidas directamente en la placa de LB mediante PCR. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 5 μ l conteniendo: 1 μ l de tampón 5X Green GoTaq Flexi (Promega), 0,4 μ l MgCl₂ 25 mM, 0,1 μ l dNTPs 10 mM, 0,5 μ l Mix de cebadores 10X (5 mM), 0,03 μ l GoTaq G2 Flexi DNA polimerasa (Promega) y la colonia correspondiente mediante la introducción, en la mezcla de reacción, de una punta de pipeta de 10 μ l que previamente había tocado la colonia seleccionada. Las condiciones para la PCR fueron las mencionadas anteriormente pero reduciendo los ciclos a 25.

Para estas reacciones se utilizaron cebadores específicos tanto del vector plasmídico como del inserto. Para comprobar la correcta inserción y orientación del inserto se utilizaron los siguientes cebadores: como cebador sentido se utilizó uno específico del plásmido pSK+ (reverso) y como cebador antisentido se utilizó el correspondiente específico para cada fragmento de virus del cual se quería generar la sonda (Tabla 3.2). Los productos de PCR obtenidos se cargaron en gel de agarosa/TAE al 1 %. Las colonias en las que se consiguió amplificar la banda esperada se consideraron colonias positivas. Estas colonias se crecieron en medio LB líquido con su antibiótico correspondiente a 37 °C durante 18-24 horas en agitación. Transcurrido el periodo de incubación de los cultivos se purificó el DNA plasmídico utilizando el GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Para comprobar la correcta inserción del fragmento de interés en el vector de clonación la secuencia nucleotídica fue determinada por el Servicio de Secuenciación del IBMCP (CSIC-UPV).

En el presente trabajo hemos desarrollado tres polisondas con capacidad para detectar 9 (poly9), 12 (poly12) o 21 (poly21) virus (Figura 3.2) que representan los virus menos comunes, los más prevalentes o todos juntos, respectivamente, que afectan al cultivo de pimiento en España y a nivel mundial.

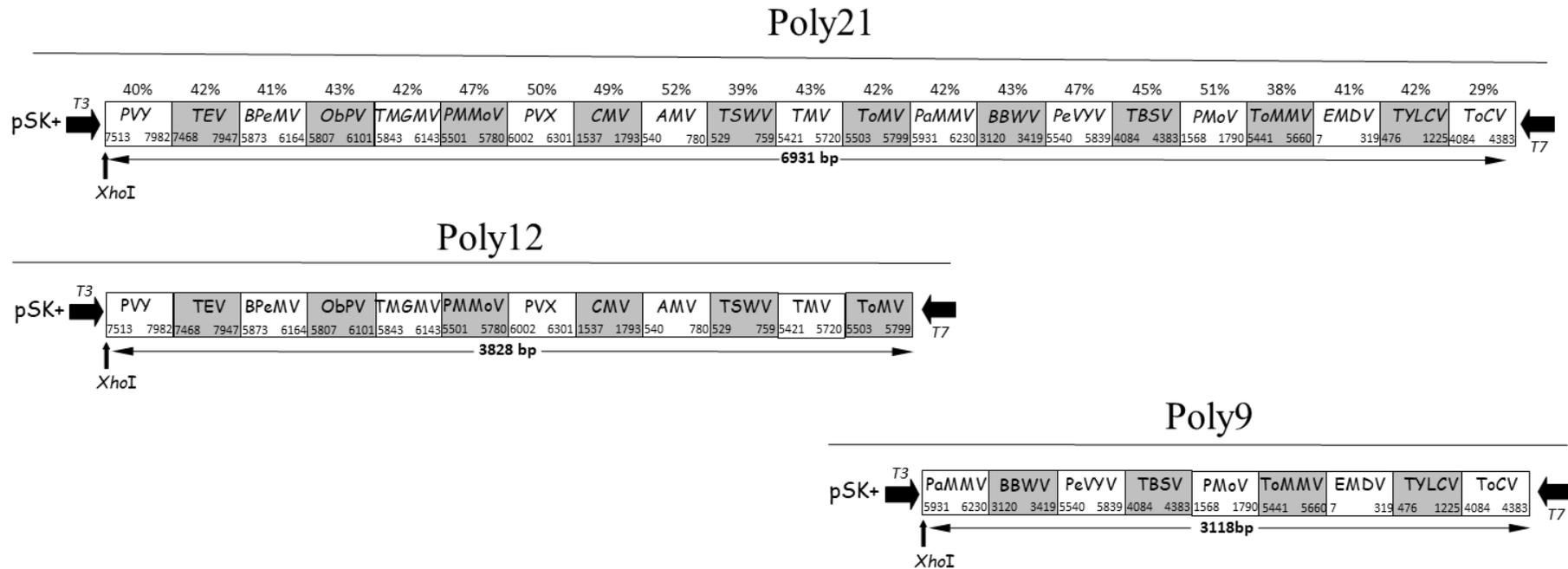


Figura 3.2. Representación esquemática de las diferentes polisondas diseñadas generadas a partir del plásmido pSK+. Los fragmentos virales correspondientes a cada virus se indican mediante un cuadro en el que los números representan el nucleótido correspondiente del número de acceso de GenBank: AJ890330 (potato virus Y, PVY), DQ986288 (tobacco etch virus, TEV), DQ355023 (bell pepper mottle virus, BPeMV), L11665 (obuda pepper virus, ObPV), MF139550 (tobacco mild green mosaic virus, TMGMV), MN267901 (pepper mild mottle virus, PMMoV), M95516 (potato virus X, PVX), LC066515 (cucumber mosaic virus, CMV), L00162 (alfalfa mosaic virus, AMV), FR693175 (tomato spotted wilt virus, TSWV), MK087763 (tobacco mosaic virus, TMV), MN267904 (tomato mosaic virus, ToMV), AB089381 (paprika mild mottle virus, PaMMV), KJ789137 (broad bean wilt virus 2, BBWV2), AB594828 (pepper vein yellows virus, PeVYV), M21958 (tomato bushy stunt virus, TBSV), FJ858204 (parietaria mottle virus, PMoV), KU594507 (tomato mottle mosaic virus, ToMMV), HM636918 (eggplant mottled dwarf virus, EMDV), AB116630 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) and KJ200309 (tomato chlorosis virus, ToCV). Se indica el sitio de restricción *XhoI* utilizado para sintetizar la ribosonda con la RNA polimerasa T7 o para insertar sondas de cDNA adicionales. El número debajo de cada polisonda indica el tamaño total de la sonda en pares de bases (pb). Los números encima de cada secuencia representan el porcentaje de adenina y timina en las secuencias de nucleótidos de cada virus. T3 y T7 indican la localización de las secuencias promotoras de la RNA polimerasa T3 y T7, respectivamente.

Tanto las ribosondas específicas como las polisondas se sintetizaron utilizando el promotor de la RNA polimerasa T7, el cual permite la síntesis de cadenas de RNA de polaridad negativa a las secuencias virales clonada. Por otro lado, el promotor de la RNA polimerasa T3 se utilizó para la síntesis de cadenas de RNA de polaridad positiva, las cuales se utilizaron como controles positivos específicos para cada virus o viroide (Peiró et al., 2012).

3.3.2. Marcaje de las sondas con digoxigenina

La síntesis de los transcritos correspondientes a las sondas individuales y polisondas se llevaron a cabo con la T7 RNA polimerasa (Roche Diagnostics GmbH) en un volumen final de 10 μl conteniendo: 1 μl tampón de transcripción 10X (Roche Diagnostic GmbH), 1 μl del Mix labelling mix RNA 10X dig-UTP (10 mM), 0,15 μl de inhibidor de RNAsas (Ribolock RNase/Thermo Fisher Scientific 40 U μl^{-1}), 0,2 μl T7 RNA polymerase (Takara Bio Inc.; 50 U μl^{-1}) y 100-200 ng del molde de DNA. Como molde se utilizó el correspondiente plásmido pSK+ conteniendo el fragmento de DNA de la sonda a sintetizar, previamente digerido con la enzima de restricción *XhoI*.

3.3.3. Generación de stock 1000X de las sondas individuales, polisondas y controles positivos.

Una vez generados los transcritos, tanto los de las sondas como los de los controles positivos, se procedió a determinar su concentración. Para ello se realizó una dilución 1:20 (0,5 μl de la reacción de transcripción y 9,5 μl de tampón de carga). Después, se analizaron volúmenes de 1, 3 y 6 μl de esta dilución en un gel de agarosa al 1 %. Junto a estas muestras, se corrió 0,83 μl del marcador de RNA, RNALadder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), donde cada banda representaba 50 ng de RNA. Tras cuantificar los transcritos, se procedió a desnaturalizarlos calentándolos a 100 °C durante 5 minutos y luego enfriándolos rápidamente en hielo durante otros 5 minutos. A continuación, se añadieron a cada sonda la cantidad necesaria de formamida desionizada para alcanzar una concentración final del 50 % de Formamida y ajustar la concentración de las sondas a 20 ng μl^{-1} . Esto permitió preparar un stock concentrado 1000X, el cual se almacenó a -80 °C hasta su uso en análisis posteriores.

3.3.4. Procedimiento de análisis por Hibridación Molecular no radioactiva en plantas de pimiento

Para analizar muestras de campo, se tomaron dos hojas de cada planta de pimiento o flora silvestre y se colocaron en bolsas individuales. Estas hojas fueron homogeneizadas en 1-2 ml de tampón de muestra (TM: citrato sódico 50 mM, EDTA 5 mM pH 8,5; Ivars et al., 2004; Sánchez-Navarro et al., 1996; 1999), con la ayuda de un homogeneizador adaptado a un taladro. Se aplicaron 0,8-1 μl de cada preparación en membranas de nailon cargadas positivamente (Sigma-Aldrich Corp., Darmstadt, Alemania). Los ácidos nucleicos fueron fijados a la membrana mediante exposición a luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm utilizando un UVP crosslinker (Vilberlourmat a 700 x 100 $\mu\text{l cm}^{-2}$, 0,180 Jouls). Además, en todas las membranas se dejó siempre espacio para poner el control positivo correspondiente

al virus analizado. Por cada membrana, se prepararon varias réplicas para poder analizar varios virus y/o polisondas.

Tras haber fijado los ácidos nucleicos se procedió a incubar las membranas en un horno de hibridación en rotación a 68 °C durante 1-2 horas con la solución de prehibridación (10 ml por membrana) compuesta de 50 % de formamida desionizada, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM, pH 7,0), N-lauroilsarcosina 0,1 % (p/v), SDS 0,5 % (p/v) y 2 % agente bloqueante (Roche Diagnostics GmbH). La prehibridación permite preparar la membrana para la hibridación, eliminando posibles compuestos que puedan interferir con el proceso, al mismo tiempo que bloquea la unión inespecífica de la sonda correspondiente a la membrana. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la de hibridación, que contenía la misma composición que la anterior, pero conteniendo la sonda (individual o polisondas) a una concentración final de 20 ng/ml. La hibridación se realizó a 68 °C ó 45-50 °C para las ribosondas individuales o las polisondas, respectivamente. Tras dejar hibridando las membranas durante toda la noche, la solución de hibridación conteniendo la sonda fue recuperada y guardada a -20 °C para usos posteriores. Una vez recuperadas las sondas, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con la solución de lavado I (2 x SSC y SDS 0,1 %) y a continuadamente se lavaron 2 veces durante 15 minutos a 68 °C con el tampón de lavado II (0,1 x SSC y SDS 0,1 %).

La detección inmunológica se realizó a temperatura ambiente. Primero, las membranas se lavaron durante 5 minutos en el tampón I (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH: 7,5) para posteriormente incubarse durante 30 minutos con la solución de bloqueo (9 ml tampón I + 1 ml de agente bloqueante al 10 % - Roche Diagnostics GmbH). Seguidamente se incubaron las membranas durante otros 30 minutos con la solución de bloqueo, pero esta vez añadiendo el anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics GmbH) a una dilución 1:10.000. Para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron 2 veces durante 15 minutos con el tampón de lavado I (Tampón I + 0,3 % Tween 20). Posteriormente se lavaron durante 5 min en el tampón III (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM pH 9,5) para equilibrar las membranas.

El proceso de revelado se llevó a cabo con el sustrato quimioluminiscente CDP-Star ó CSPD (Roche Diagnostics GmbH) diluido 1:300 en tampón III. Las membranas se incubaron durante 5 minutos con 5 ml de solución/100 cm² de membrana. Tras retirar el sustrato, las membranas se expusieron con película Kodak X-Omat AR o en un fotodocumentador (Amersham ImageQuant™ 800 or Fujifilm LAS-3000) durante aproximadamente 15-60 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió al revelado las películas.

3.3.5. Validaciones para evaluar comportamiento de las polisondas diseñadas

En este estudio se evaluaron varios aspectos del uso de polisondas para la detección de virus en el cultivo de pimiento. En primer lugar, se compararon los límites de detección de las tres polisondas (poli9, poli12 y poli21) con los obtenidos con sondas individuales utilizando cantidades conocidas de controles positivos artificiales. En segundo lugar, se determinaron los límites de detección en tejido infectado de campo, utilizando muestras que presentaran

infecciones únicas para los virus: CMV, PVY, TMGMV, ToMV y PMMoV, empleando la HM con las tres polisondas y sondas individuales, así como la técnica DAS-ELISA. En tercer lugar, se realizó el análisis de 85 muestras de campo mediante el uso de cinco sondas individuales (CMV, PVY, ToMV, TMGMV y PMMoV) y las tres polisondas (poli9, poli12 y poli21), confirmando los resultados de algunas muestras con la técnica DAS-ELISA. Por último, se realizó una analítica de 236 muestras de campo tanto con sondas individuales (CMV, PVY, TMGMV, ToMV y PMMoV) como con las polisondas (poli12 y poli21).

3.3.5.1. Límites de detección de sondas individuales y polisondas con transcritos no marcados sintetizados en laboratorio

Se evaluó el límite de detección tanto de las sondas individuales como de las tres polisondas de HM. La sensibilidad de las sondas individuales se evaluó utilizando 11 virus correspondientes a la poli12 (CMV, PVY, TMV, TMGMV, BPeMV, ToMV, PMMoV, AMV, PVX, ObPV y TSWV). Para ello, se aplicaron cantidades conocidas de transcritos no marcados de estos virus complementarios a cada sonda ($40 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$) y sus diluciones seriadas (1:5) en tampón de TE (Tris HCl 10 mM + EDTA 10 mM, pH 8,0) en membranas de nylon cargadas positivamente (Sigma-Aldrich Corp., Darmstadt, Alemania). En estas mismas membranas se aplicaron extractos de tejido sano de pimiento, después de homogeneizarlos en un mortero (1 g/3 ml) con TM. Los ácidos nucleicos se fijaron a las membranas de nailon mediante exposición de luz UV (tal como se ha descrito anteriormente). Se hibridaron réplicas de la misma membrana utilizando ribosondas individuales marcadas con digoxigenina (sondas específicas de virus) a 68 °C (Sánchez-Navarro et al., 1999).

Después de confirmar la sensibilidad y especificidad de las sondas individuales, se seleccionaron algunos virus para realizar pruebas adicionales. Estos virus fueron seleccionados en base a la disponibilidad de tejido de campo infectado y a la presencia de sueros comerciales para análisis por DAS-ELISA. Los virus elegidos fueron CMV, PMMoV, PVY, ToMV y TMGMV, que tuvieron un impacto notable en los cultivos de pimiento en el área estudiada. Además, también se analizó un virus del grupo poli9, pepper vein yellows virus (PeVYV), que fue detectado en dos muestras en la prospección de 2019, aunque en este caso los ensayos se realizaron con los transcritos correspondientes al control positivo sintetizados en el laboratorio.

El análisis se realizó aplicando en las membranas de nailon, cargadas positivamente (Sigma-Aldrich Corp., Darmstadt, Alemania), cantidades conocidas de transcritos no marcados de los virus seleccionados (CMV, PMMoV, PVY, ToMV, TMGMV y PeVYV), así como sus diluciones seriadas, utilizando ribosondas individuales (sondas específicas de virus) o las polisondas marcadas con digoxigenina (Sánchez-Navarro et al., 1999). La hibridación se realizó a 68 °C o 50 °C para las ribosondas individuales o las polisondas, respectivamente. La detección quimioluminiscente se realizó utilizando el sustrato CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) después de una exposición fotográfica de 60 minutos.

3.3.5.2. Límites de detección de sondas individuales y polisondas en tejido infectado naturalmente

Los límites de detección de las sondas individuales y polisondas también se evaluaron utilizando diluciones seriadas de muestras de pimientos de campo infectadas con varios virus. Se realizaron diluciones seriadas (1:5) de siete muestras positivas para algunos de los virus más importantes en el cultivo del pimiento mediante sondas individuales de HM (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV), polisondas (poli12 y poli21) así como por DAS-ELISA. Las diluciones seriadas de las muestras positivas se realizaron utilizando TM para HM o el tampón de extracción para DAS-ELISA (extraction buffer: ExB), siguiendo las indicaciones del fabricante (Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach, Alemania). En el análisis por HM, los films fueron revelados después de una exposición de 30 minutos tras aplicar el sustrato CDP-STAR.

3.3.5.3. Análisis rutinario de muestras de campo con sondas individuales, polisondas y DAS-ELISA

Con el fin de analizar el comportamiento de la técnica de HM en el análisis rutinario de muestras de campo, se procedió a analizar 85 muestras de campo utilizando tanto sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) como las tres polisondas. Las hibridaciones se realizaron a 68 °C para las sondas individuales y a 50 °C para poli 21 y poli12, además de realizarse a 45 °C específicamente para poli12, con el fin de evaluar el efecto de esa reducción de 5 °C en el análisis de hibridación. Parte de las muestras analizadas por HM fueron también analizadas por DAS-ELISA para confirmar los resultados obtenidos.

Por último, se realizó el análisis rutinario de 236 muestras de pimiento mediante HM utilizando tanto sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) como polisondas (poli12 y poli21). Las hibridaciones se realizaron a 68 °C y 50 °C para las sondas individuales y las polisondas, respectivamente. Las muestras analizadas en este estudio se mantuvieron congeladas a -20 °C en TM durante 12 meses antes de ser aplicadas en membranas de nylon para su análisis por HM.

3.4. Secuenciación y estudio epidemiológico de un nuevo Tobamovirus

3.4.1. Secuenciación del nuevo Tobamovirus

3.4.1.1. Material vegetal infectado

En unos invernaderos comerciales de Gatika (Bizkaia) donde habitualmente se cultivan pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra en sistema hidropónico, además de otras hortalizas como el tomate, se identificaron plantas con síntomas de virosis en plántulas de la variedad "Derio" de pimiento Gernika a partir del año 2017. Estas plántulas fueron producidas en el vivero comercial Barbas-SAT, ubicado en la localidad de Rada (Cantabria).

Las plantas que presentaron estos síntomas de virosis fueron analizadas por DAS-ELISA en el laboratorio de Sanidad Vegetal de Bizkaia con sueros de la casa Loewe, mostrando resultados negativos a los Tobamovirus analizados (ToMV, TMGMV, PMMoV). Sin embargo, réplicas de las mismas muestras, al ser analizadas en el laboratorio del propio vivero Barbas-SAT con sueros de la marca Bioreba, resultaron positivas al virus TMGMV. Las muestras infectadas fueron enviadas al laboratorio de la Estación Fitopatológica de Do Areiro (Galicia), donde se analizaron por RT-PCR para los virus PMMoV y PaMMV, mostrando resultados negativos.

Tras observar resultados discordantes entre ambas marcas de sueros de DAS-ELISA al analizar el virus TMGMV en los laboratorios mencionados, se decidió enviar algunas muestras infectadas al Laboratorio de Virología Vegetal del Instituto Agroforestal del Mediterráneo (Laboratorio de referencia en la Universidad Politécnica de Valencia). Las muestras fueron analizadas por DAS-ELISA a los virus TSWV, PMMoV, TMGMV, CMV, PVY e impatiens necrotic spot virus (INSV) (Loewe Biochemica GmbH), mostrando todas las muestras negatividad a estos virus. Al analizar estas muestras por RT-PCR con cebadores específicos de TMGMV (Letschert et al., 2002) los resultados fueron negativos. Sin embargo, al aplicar esta técnica con cebadores específicos de PMMoV (Robles, 2009), las muestras mostraron resultados positivos tenues. El análisis de RT-PCR utilizando cebadores universales para Tobamovirus (Li et al., 2018), permitió la amplificación de una banda específica. La secuenciación de esta banda reveló una alta homología con bell pepper mosaic virus (BPeMV) (Anexo II). Tras analizar 8 muestras infectadas, seis mostraron positividad a BPeMV por DAS-ELISA. Los resultados obtenidos en el Laboratorio de referencia indicaron la posible presencia de un nuevo tobamovirus en pimiento, o alternativamente, de un aislado del virus BPeMV.

Por otro lado, al laboratorio de referencia de virus también llegaron otras muestras de Granada que mostraron un comportamiento similar al analizarlas serológicamente, aunque con pequeñas diferencias. Se observaron positivos suaves a los virus ToMV, TMGMV Y PMMoV. Sin embargo, al analizarlos por RT-PCR con cebadores específicos de TMGMV (Letschert et al., 2002) y PMMoV (Robles, 2009), las muestras dieron negativo a ambos virus. Al utilizar los cebadores universales para tobamovirus (Li et al., 2018), también amplificaron una banda que tras secuenciarla presentó gran homología con BPeMV. Estos resultados indicaron que podría tratarse del mismo virus. Por ello se procedió a realizar la secuenciación de ambas cepas.

3.4.1.2. Obtención y purificación de dsRNA

Para la purificación de la fracción de RNA de doble cadena (dsRNA), se partió de 3,5 g de tejido de hojas infectadas con las cepas de Bizkaia y Granada por separado. Los tejidos fueron triturados aplicando nitrógeno líquido y mezclados con 10 ml de buffer STE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH: 8), 1 ml de SDS al 10 %, 500 µl de bentonita al 2 % y 9 ml de fenol-STE 1X. Esta mezcla se agitó durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos y se separó la fase acuosa. A esta fase se le añadió 1/5 de su volumen en etanol (96 %) y un 2,5 % (p/v) de celulosa CF-11. La mezcla fue agitada durante una hora y luego centrifugada a 3.000 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. El precipitado resultante se lavó con 20 ml de STE 1X (16 % etanol), seguido de una centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido fue suspendido en 1 ml de agua libre de nucleasas, se incubó a 70 °C durante 4 minutos, y posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante, enriquecido en dsRNAs, se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

3.4.1.3. Amplificación de fragmentos del nuevo Tobamovirus

El cDNA se sintetizó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), utilizando el kit SuperScript[®] III HiFi OneStep RT-PCR System-Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección molecular del tobamovirus se realizó con pares de cebadores universales (Li et al., 2018). El cDNA fue obtenido a partir de dsRNA extraído de material vegetal infectado (expuesto en el apartado anterior), utilizando cebadores específicos (Anexo III) que permitieron la amplificación de diferentes fragmentos solapantes del virus, cubriendo todo el genoma viral. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl: 5 µl del tampón 2X, 1 µl de la mezcla 10X de cebadores (5 µM cada cebador), 0,15 µl Inhibidor RNAsas (40 U µl⁻¹), 0,1 µl de SSIII RT/Platinum[®] Tag HiFi enzyme Mix (2,5 U µl⁻¹) y 0,3 µl del RNA extraído. Los parámetros de RT-PCR para los cebadores utilizados en este estudio fueron los siguientes: síntesis inicial de cDNA a 50 °C durante 30 min, seguida de un ciclo de 94 °C durante 2 min para la desnaturalización de la enzima RT y activación de la polimerasa. Posteriormente se incluyeron 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s y 68 °C por 1 min/kb.

El producto de cDNA generado por RT-PCR se usó como molde para una segunda PCR usando polimerasa PrimeSTAR (Takara Bio Inc.). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo: 4 µl tampón 5X primeStar (Mg²⁺ plus), 0,4 µl del stock de dNTPs 10 mM, 2 µl del stock de cada cebador (Anexo III) 10X (5 µM), DNA molde (200 ng) y 0,2 µl de la enzima PrimeStar HS DNA polimerasa (2,5 U µl⁻¹). Las condiciones seleccionadas durante la amplificación fueron: 30 ciclos de 94 °C por 15 s, 58 °C por 15 s y 72 °C por 1 min/kb durante 30 ciclos.

Estas condiciones fueron las aplicadas al resto de RT-PCRs y PCRs realizadas en este trabajo, adaptando los tiempos de extensión dependiendo de los tamaños de las regiones correspondientes en cada caso. Tanto las RT-PCR como las PCRs se realizaron con el termociclador Mastercycler pro de Eppendorf.

3.4.1.4. Amplificación de los extremos 5' y 3' del DNAC del tobamovirus

La estrategia que se utilizó para determinar la secuencia de nucleótidos de los extremos 5' y 3' del tobamovirus fue una técnica basada en el cebador stem-loop oligo-dT (Varkonyi-Gasic et al., 2007) con el extremo 3' con una secuencia de timinas que asegura la unión al extremo 3' de la cola poli(A) adicionada al RNA viral. De esta manera se identifican con certeza cuáles son el primer y último nucleótido del genoma del virus. Esta técnica fue puesta a punto en el laboratorio del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP/CSIC-UPV).

El protocolo se inició con la incubación de la muestra de dsRNA en un volumen total de 12,5 µl que incluyó 2,5 µl de tampón 5X, 0,65 µl de ATP a 10 mM y 1 µl de polimerasa PolyA (*polyA Polymerase, Yeast -Affymetrix-*). Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37 °C, seguido de un calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. El uso de dsRNA en la reacción de poliadenilación facilitó la adición de colas poli(A) en ambos extremos 3' de las cadenas de RNA, tanto positiva como negativa. Este paso fue crucial para posibilitar la posterior amplificación de los extremos 5' y 3' de la cadena positiva del RNA.

Para amplificar el extremo 3' del RNA del nuevo Tobamovirus, se empleó la técnica de RT-PCR utilizando cebadores específicos (Anexo III). Por un lado, se empleó el cebador sentido, 3337, diseñado para adherirse cerca del extremo 3' terminal del RNA del virus, mientras que se utilizó el cebador antisentido 2721-T, que se adhiere específicamente al extremo de la cola poli(A). Esta estrategia difiere de las técnicas convencionales de determinación de extremos 5' y 3' basadas en el protocolo RACE (Rapid amplification of cDNA ends), que se adhieren al inicio de la cola poli(A) y obtienen el primer y último nucleótido en base a la selección del oligo (Figura 3.3). El cebador 2721-T posee una estructura secundaria en horquilla (tipo stem-loop), diseñada para hibridar con el extremo 3' terminal de la cola poli(A) del RNA, sin afectar al último nucleótido del RNA viral. Como los tobamovirus normalmente suelen acabar con una adenina en el extremo 3', se procedió a determinar la secuencia del extremo 3' del virus introduciendo tanto una cola de poli(A) como una cola poli(U). Para la introducción de la cola poly(U) en el extremo 3' del virus, se realizó la misma reacción descrita para la cola poli(A) pero utilizando UTP (10 mM) en lugar de ATP. Tras añadir la cola poli(U), se procedió a realizar la reacción de RT-PCR utilizando el cebador sentido 3337 que se adhiere cerca del extremo 3' y el antisentido 2721-A que se vincula específicamente al extremo 3' terminal de la cola poly(U). Las PCRs posteriores a la reacción de RT-PCR se realizaron con los oligos 2721-bis y 3339.

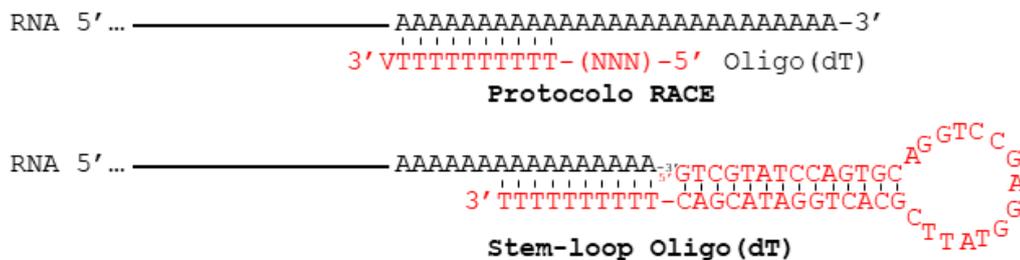


Figura 3.3. Diferentes estrategias para determinar los extremos 3'. Arriba se observa el protocolo RACE donde el oligo se adhiere al principio de la cola poly(A) y se obtiene el último nucleótido en base a la selección del oligo (V = A, C o G). Abajo se observa el protocolo stem-loop (Varkonyi-Gasic et al., 2007) que consiste en una estructura diseñada para hibridar con el extremo 3' terminal de la cola poli(A) del RNA, sin intervenir en el extremo terminal 3' de la secuencia del virus.

Para la amplificación del extremo 5', se siguió un procedimiento similar al del extremo 3', pero en este extremo sólo se utilizó RNA poliadenilado. La RT-PCR y PCR posterior se realizaron con el par de cebadores 2721-T/3346 y 2721-bis/3345, respectivamente.

3.4.1.5. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis del DNA se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1 %, utilizando un tampón TAE 1X (40 mM de Tris, 20 mM de acetato de sodio y 1 mM de EDTA). Para la visualización de las moléculas de DNA, previamente a la solidificación del gel, se incorporaron 0,5 µl de Midori Green Advance (0,1 µg µl⁻¹) por cada 50 ml de solución de agarosa. Posteriormente, una vez solidificado el gel, se aplicaron las muestras de DNA, las cuales habían sido preparadas previamente con la adición de un tampón de carga LB 6X (10 mM Tris-HCl a pH 7,6, 60 % de glicerol, 60 mM de EDTA a pH 8,0), junto con 0,03 % de azul de bromofenol y 0,03 % de xilencianol para facilitar la visualización durante la electroforesis. Para la estimación del tamaño de los fragmentos de DNA, se empleó como referencia el marcador de tamaño de 1 kb Plus DNALadder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific). Finalmente, tras 25 minutos de electroforesis a 100 V, los fragmentos de DNA se hicieron visibles mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta, modelo UVIDOC HD6.

3.4.1.6. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

El proceso de purificación del DNA obtenido se efectuó conforme a las especificaciones del *Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit*. Inicialmente, los fragmentos de DNA seleccionados se extrajeron del gel utilizando un bisturí, bajo iluminación ultravioleta, y se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml. A estos tubos, por cada 0,1 g de gel añadidos se les incorporó una proporción de un volumen de tampón de unión. La disolución de la agarosa se realizó incubando los tubos a una temperatura entre 50 y 60 °C durante 10 minutos. Posteriormente, la solución obtenida se transfirió a una columna de sílice posicionada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Este conjunto se sometió a una centrifugación a 13.400 rpm durante un minuto. Tras la centrifugación, se eliminó el líquido sobrenadante y se procedió al lavado de la columna con 700 µl de tampón de lavado, repitiendo el proceso de centrifugación a 13.400 rpm durante un minuto y descartando nuevamente el sobrenadante. Para la fase final, la columna se colocó de nuevo en el tubo de 2 ml y se centrifugó (en seco) a 13.400 rpm durante un minuto para asegurar la eliminación total de los residuos del tampón de lavado. Acto seguido, la columna se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. La elución del DNA retenido en la columna se llevó a cabo añadiendo 20 µl de tampón de elución, incubando la columna durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 13.400 rpm durante 1 minuto. Concluido este proceso, se descartó la columna, obteniendo así en el tubo la solución purificada que contiene el fragmento de DNA de interés.

3.4.1.7. Vectores de clonación utilizados

pUC18

El plásmido pUC18 se caracteriza por albergar un gen que confiere resistencia a la ampicilina y posee un sitio de clonaje múltiple ubicado dentro del marco de lectura del gen de la β -galactosidasa (Figura 3.4). Este diseño específico facilita la selección basada en el color cuando se utiliza en conjunto con el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Además, su región polylinker incorpora una variedad de secuencias reconocibles por distintas enzimas de restricción. A pesar de su tamaño relativamente pequeño, con solo 2686 pares de bases (pb), el pUC18 es capaz de albergar inserciones de DNA de hasta aproximadamente 10.000 pb. Este plásmido tiene la capacidad de producir hasta 500 copias de cualquier fragmento de DNA insertado por célula, lo que demuestra su eficacia como herramienta en la biotecnología molecular. En este trabajo, el vector pUC18 desempeñó un papel crucial en la clonación fraccionada del nuevo tobamovirus, facilitando así la secuenciación de su genoma completo.

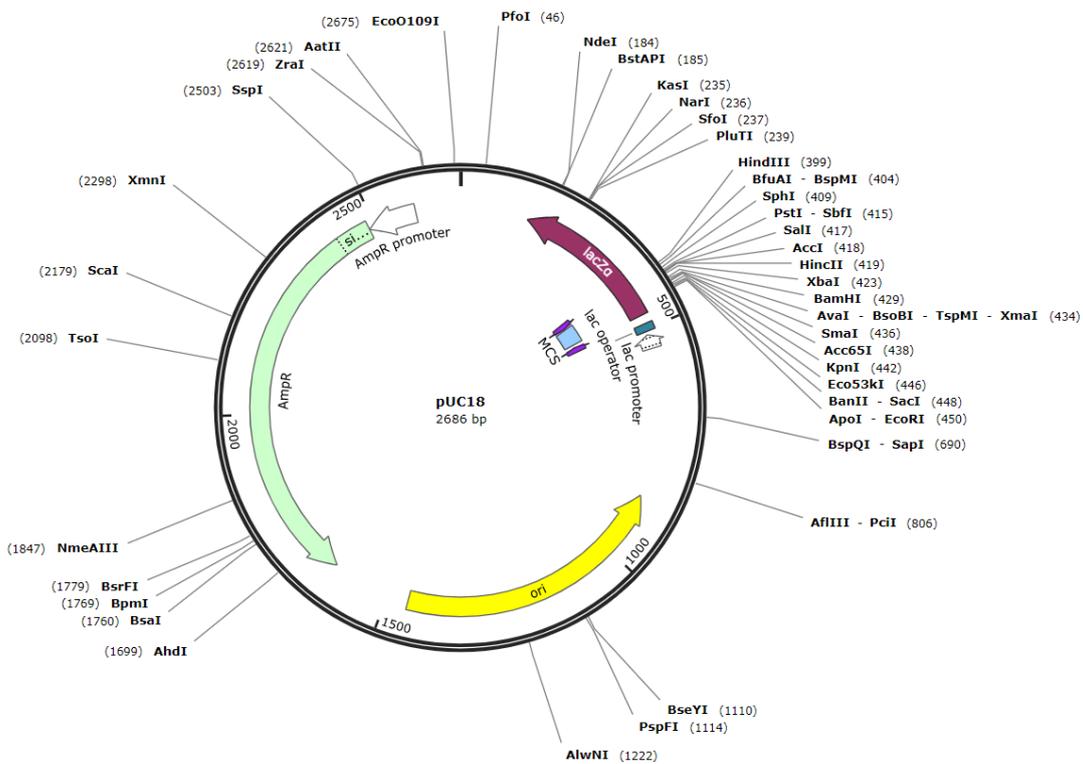


Figura 3.4. Representación del plásmido pUC18. Disponible en: https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/pUC18.

pBluescript II SK (+) (pSK +)

Es un plásmido que facilita la clonación gracias a su sitio de clonaje múltiple y presenta resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 3.5). Este plásmido (pSK+), contiene las secuencias promotoras de las RNA polimerasas T3 y T7 flanqueando la región de clonaje múltiple, lo que permite sintetizar transcritos de ambas polaridades de los fragmentos introducidos en dicha región. Este plásmido fue utilizado para la clonación de sondas individuales y polisondas de HM, así como para incorporar el promotor 35S y crear clones infecciosos.

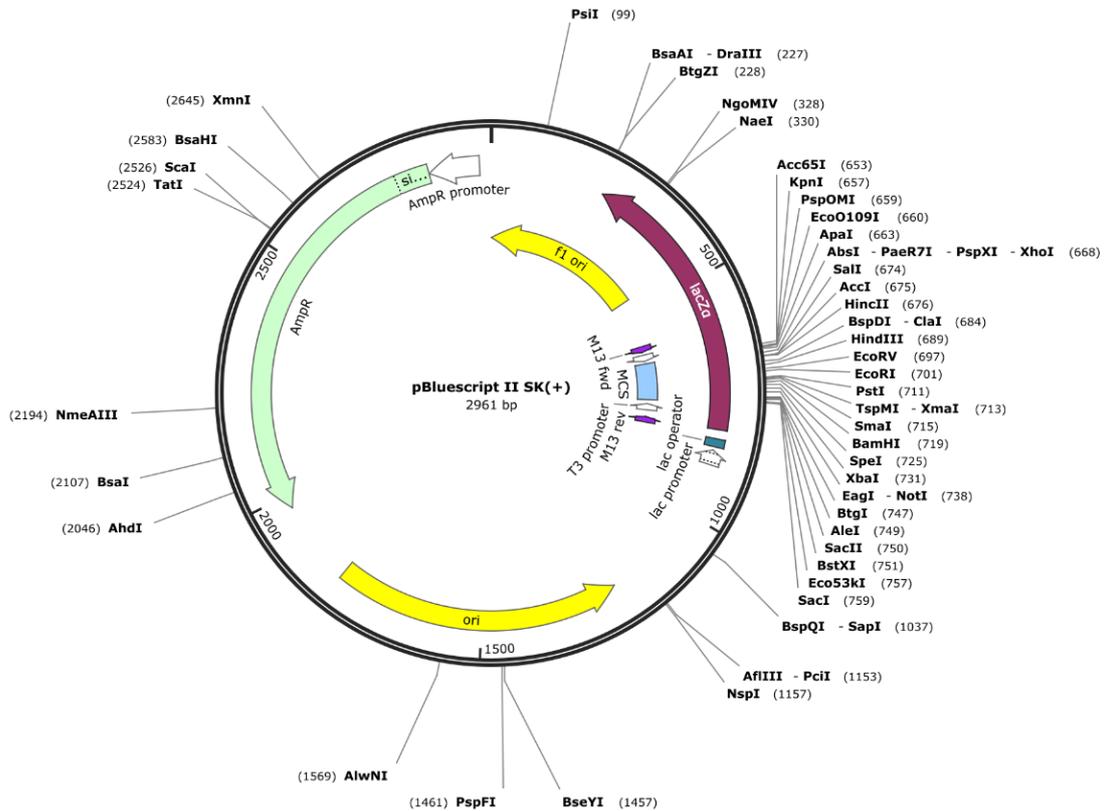


Figura 3.5. Representación del plásmido pBluescript II SK (+). Disponible en: [https://www.snapgene.com/plasmids/image_consortium_plasmids/pBluescript_II_SK\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/image_consortium_plasmids/pBluescript_II_SK(%2B)).

pMOG 800

El plásmido binario pMOG 800 (Ohl et al., 2001) presenta el gen *ntpII*, que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa y es resistente a kanamicina (Figura 3.6). Este plásmido tiene dos orígenes de replicación (ORI) que permite su replicación tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa C58 de *A. tumefaciens* en los experimentos de expresión transitoria en planta.

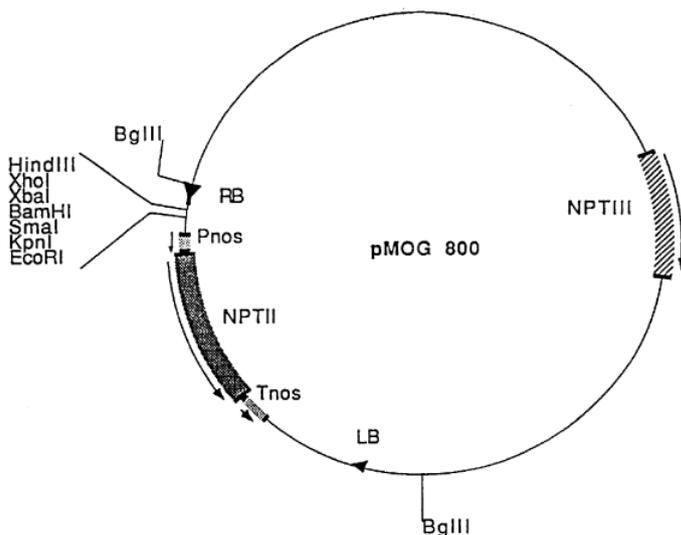


Figura 3.6. Representación del plásmido pMOG 800 (Ohl et al., 2001).

3.4.1.8. Ligación de DNA

En los fragmentos de DNA obtenidos, se utilizó la enzima T4 DNA ligase (Promega) en una mezcla de reacción con un volumen total de 8 μl , para realizar la reacción de ligación de los fragmentos de DNA. Esta mezcla incluyó: 0,8 μl de tampón 10X, 0,8 μl de ATP (10 mM), 1 μl de polietilenglicol 3350 al 40 %, y 0,5 μl de T4 DNA ligasa (3 U μl^{-1}). Además, se añadieron 200 ng del plásmido vector y entre 400-500 ng del inserto de DNA deseado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 40 minutos.

3.4.1.9. Electroporación de plásmidos en *Escherichia coli*

La bacteria empleada para la clonación y purificación de los plásmidos fue la cepa DH5 α de *E. coli*. Los productos de ligación fueron introducidos en células competentes mediante electroporación. Para ello, 4 μl de la mezcla de ligación se mezclaron con 50 μl de células competentes de *E. coli*. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación equipada con electrodos de aluminio separados por 0,1 cm, y se aplicó un pulso eléctrico de 1400 V utilizando el electroporador Bio-RAD GenePulser XcellTM. Inmediatamente después, se añadieron 350 μl de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro) a las células transformadas y se incubaron a 37 °C durante al menos 30 minutos. Tras la incubación, 150 μl de la suspensión de células transformadas se esparcieron en placas de LB-Agar con el antibiótico específico y se mantuvieron a 37 °C durante 16 horas. Para la discriminación por color, se agregaron previamente 40 μl de X-gal a la placa de agar y se dejaron secar antes de añadir y esparcir las células transformadas.

3.4.1.10. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de colonias

Para la identificación de las bacterias que portaban un plásmido con el inserto de interés, se implementó un protocolo de análisis directo sobre las colonias desarrolladas en placas de LB-Agar, empleando la técnica PCR. Este procedimiento implicó el uso de cebadores específicos, tanto para el vector plasmídico como para el inserto. La preparación de la mezcla de reacción para la PCR se efectuó en un volumen total de 5 μl , que incluyó: 1 μl de Tampón 5X Green GoTaq® Flexi de Promega, 0,4 μl de MgCl_2 a 25 mM, 0,1 μl de dNTPs a 10 mM, 0,5 μl de cada cebador (Anexo III) a 5 μM , 0,03 μl de DNA polimerasa GoTaq® G2 Flexi de Promega a 5 U μl^{-1} , y el volumen hasta 5 μl se completó con agua estéril. Para la reacción PCR, se utilizó una punta de pipeta que había estado previamente en contacto con la colonia seleccionada. Las condiciones térmicas para las reacciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, alineamiento a 55 °C por 15 segundos, y extensión a 72 °C a un ritmo de 1 minuto por kb durante 25 ciclos.

Posteriormente, los productos de PCR se sometieron a un análisis directo mediante electroforesis en geles de agarosa/TAE al 1 %. Las colonias que exhibieron una banda específica correspondiente al tamaño del fragmento esperado se clasificaron como positivas. Estas colonias seleccionadas se cultivaron en agitación a 37 °C durante un período de 18-24 horas en medio líquido LB, suplementado con el antibiótico correspondiente.

3.4.1.11. Purificación de plásmidos recombinantes

Concluida la fase de incubación de los cultivos bacterianos, se procedió a la centrifugación de las muestras en tubos a 4.500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante, y se llevó a cabo una purificación del DNA plasmídico utilizando el GeneJET™ *Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). El precipitado resultante se resuspendió en 250 µl del tampón de resuspensión provisto por el kit, el cual contenía RNasa A (0,1 mg ml⁻¹), utilizando para ello vórtex. Acto seguido, se añadió una cantidad igual de solución de lisis celular (250 µl) y se mezcló cuidadosamente por inversión del tubo Eppendorf varias veces. Se incorporaron después 350 µl de solución de neutralización, mezclando nuevamente por inversión, seguido de una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó a la misma velocidad durante 1 minuto.

Después de eliminar la solución filtrada, se procedió a añadir 500 µl de solución de lavado y se centrifugó 60 segundos a 13.000 rpm. Se descartó el filtrado y se repitió el proceso de lavado, seguido de una centrifugación adicional (en seco) de 1 minuto a 13.000 rpm para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf para eluir el DNA purificado, añadiendo 50 µl de una solución de elución exenta de nucleasas. Tras una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, se realizó una centrifugación final durante 2 minutos a 13.000 rpm.

Para verificar la correcta inserción de los fragmentos de DNA, se realizaron inicialmente reacciones de digestión con las enzimas de restricción correspondientes y, posteriormente, se procedió a la secuenciación del DNA plasmídico. El DNA eluido se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su posterior uso.

3.4.1.12. Cuantificación y secuenciación del DNA recombinante

Para la cuantificación del DNA plasmídico aislado, se empleó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, utilizando el software ND-1000 V3.8. La determinación de la concentración de DNA se efectuó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, utilizando una alícuota de 2 µL de la muestra. La concentración, expresada en ng µl⁻¹, se calculó en relación con un blanco, que consistía en agua mili Q o en el tampón de extracción utilizado durante el proceso de purificación, según correspondiese.

La secuenciación de los nucleótidos de las distintas construcciones plasmídicas desarrolladas se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP/CSIC-UPV). Para ello, se utilizaron los cebadores específicos detallados en el Anexo III, aplicando el método de secuenciación de Sanger.

3.4.2. Generación de clones infecciosos del genoma completo e infección de plantas de *N. benthamiana*

Los clones infecciosos se generaron mediante dos aproximaciones técnicas diferentes. En la primera, se utilizó el promotor de la RNA polimerasa T7 para generar los transcritos correspondientes, que se inocularon directamente en las hojas tras una reacción de capeado. En la segunda, el genoma viral completo se clonó en un plásmido binario bajo el control del

promotor 35S del cauliflower mosaic virus (CaMV) y el terminador del inhibidor II de la proteínasa de la patata (PopIt), para posteriormente agroinfiltrarlo en la planta.

A partir del RNA total de tejido infectado por el nuevo Tobamovirus, se realizó una RT-PCR para sintetizar y amplificar la secuencia viral. Para la RT-PCR, se utilizó la mezcla de enzimas SuperScript III RT/Platinum® Taq HiFi (Thermo Fisher Scientific Inc.), junto con los cebadores 3585 y 3586, que están diseñados para hibridar con los extremos 5' y 3' de la secuencia viral, respectivamente. El cebador sentido 3585 incluía la secuencia del promotor T7, seguida de la secuencia del extremo 5' terminal del virus. El producto resultante de esta RT-PCR fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI* e introducido en el vector plasmídico pUC18, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción resultante, denominada pUC18T7CPMMoV, se utilizó como molde para la amplificación del genoma viral completo, así como para obtener diversas secuencias de los extremos 5'. Para esta amplificación se empleó la DNA polimerasa PrimeStar HS (Takara Bio Inc.). Los diferentes clones infecciosos fueron obtenidos a partir de los cebadores sentido 3666, 3667 y 3668 (mostrando diferentes terminaciones de extremo 5') y el cebador antisentido 3339 (Anexo III). Los fragmentos de PCR amplificados fueron tratados con la enzima de restricción *DpnI* durante 60 minutos a 37 °C para eliminar cualquier residuo del plásmido utilizado en la amplificación. Tras esta digestión los productos fueron purificados y precipitados. Posteriormente se les añadió una estructura tipo cap en el extremo 5' (para protegerlos y para que el RNA comenzara a traducirse) utilizando el sistema de tapado Scriptcap m7G (Cellscript Inc.). Los transcritos generados a partir de los 3 clones infecciosos fueron inoculados directamente en hojas de *N. benthamiana* utilizando carborundo como abrasivo.

Por otro lado, también se generaron clones infecciosos a partir de plásmidos binarios que contenían la secuencia viral bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador PopIt, utilizando para ello la enzima de restricción *BsaI*. Esta enzima tiene la particularidad de digerir el DNA fuera del sitio de la secuencia específica que reconoce, lo que facilita la creación de extremos compatibles para la ligación de fragmentos de DNA. El proceso comenzó con la amplificación de las secuencias del doble promotor 35S y del terminador PopIt, utilizando como molde el plásmido pSK + 35S-MPTMV: HA (Peiro et al., 2014). Para esto, se emplearon los pares de cebadores 3533/3519 y 3670/3534, respectivamente. La digestión del fragmento del promotor 35S amplificado con *BsaI* produjo un extremo 5' compatible con el sitio de restricción *HindIII*, mientras que el extremo 3' quedó listo para la ligación, conteniendo un extremo 5' saliente que contenía los 4 nt terminales del promotor 35S. De manera similar, la digestión del fragmento del terminador PopIt con *BsaI* resultó en un extremo 5' que contenía los primeros 4 nt del inicio del terminador PopIt, preparado para la ligación con fragmentos compatibles, y un extremo 3' compatible con el sitio *EcoRI*. Además, se amplificó el genoma completo del CPMMoV utilizando los cebadores sentido 3672, 3673 y 3674, que incorporaban diferentes secuencias terminales 5' del virus, y el cebador antisentido 3671, utilizando la construcción pUC18T7CPMMoV como molde. Tanto los cebadores sentido como los antisentido contenían el sitio de restricción *BsaI* y 6 nucleótidos adicionales que, tras la digestión con *BsaI*, generaron extremos de DNA compatibles con los extremos 3' del promotor 35S (cebadores sentido) o los extremos 5' del terminador PopIt (cebador antisentido). Los tres fragmentos digeridos con *BsaI* (35S, PopIt y secuencia completa CPMMoV) se ligaron

conjuntamente con el plásmido binario pMOG800, que previamente había sido digerido con *HindIII* y *EcoRI*, en una reacción de ligación siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega Inc.). Las construcciones resultantes fueron secuenciadas para confirmar la correcta orientación de los extremos 5' y 3' del genoma viral. Finalmente, estas construcciones se introdujeron en la cepa C58 de *A. tumefaciens* para realizar ensayos de agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Herranz et al., 2005a; 2005b).

Mediante ambas aproximaciones, se generaron tres construcciones diferentes, que se diferenciaban en el nucleótido inicial en el extremo 5': nt + 1 (la citosina identificada en nuestra secuencia), nt + 2 (una guanina, como el 95 % de los tobamovirus en la base de datos) o nt + 23 (el nt 5' terminal descrito en el CPMMoV presente en la base de datos; accesión: MN164455.1) (Figura 3.7).

Finalmente, plantas de *Nicotiana benthamiana* en un estadio de 6 hojas verdaderas e inoculadas tanto con transcritos derivados de promotor T7, como mediante infiltración del correspondiente cultivo de agrogacterium (OD: 0,1), se mantuvieron a 24 °C día y 18 °C noche, con 16 horas día y 8 horas noche.

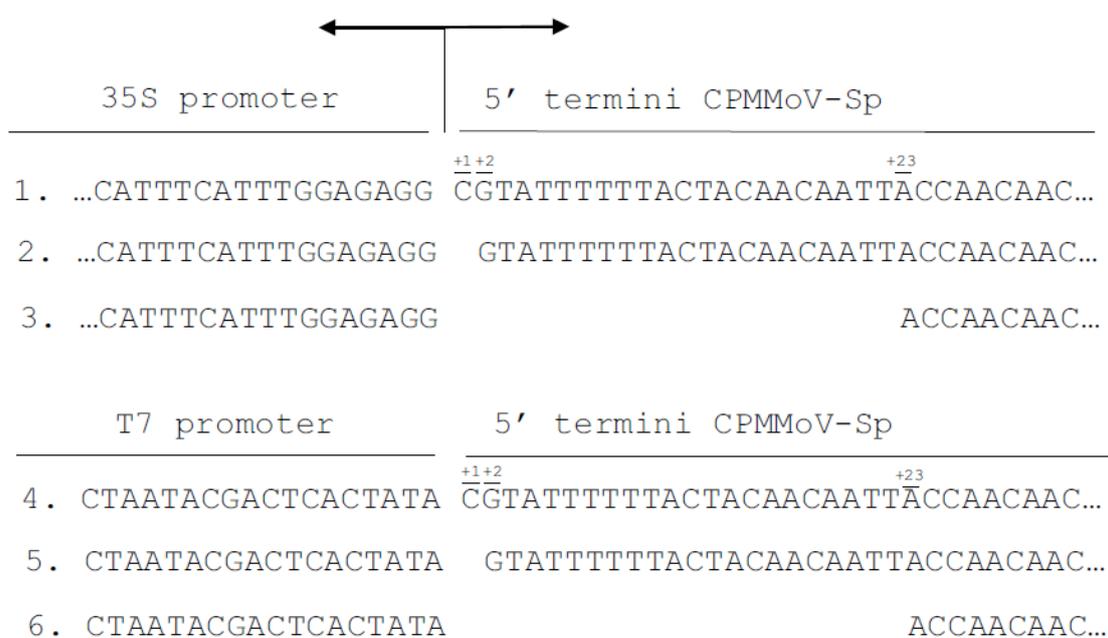


Figura 3.7. Esquema de los extremos 5' de los clones infecciosos que se generaron bajo el control del promotor 35S (clones 1, 2 y 3) o del promotor T7 (clones 4, 5 y 6). Estos clones llevan la secuencia terminal 5' completa identificada en este estudio con (clones 1 y 4) o sin el residuo de citosina (clones 2 y 5) o sin los 22 nucleótidos adicionales en comparación con la secuencia CPMMoV depositada en la base de datos GenBank (accesión: MN164455.1) (clones 3 y 6).

3.4.2.1. Northern blot e hibridación

Los análisis Northern blot se realizaron utilizando RNA total extraído de plantas de *N. benthamiana* que fueron inoculadas con los diferentes constructos del Tobamovirus citados en el apartado anterior. Las hojas inoculadas fueron muestreadas y analizadas a los 5 DDI, mientras que las hojas no inoculadas lo fueron a los 10 DDI. El análisis de RNA se realizó en geles de agarosa al 1,5 %. Una vez se igualaron las concentraciones de las diferentes muestras,

se llevaron a un volumen final de 10 μ l y se les añadió 1 volumen del tampón de carga (Formamida 56,25 %, Formaldehído 31,06 %, MOPS 10x 10,91 %, Tampón de carga LB 6x 1,7 % y Bromuro de etidio 0,08 %). A continuación, se mezcló la muestra con el tampón de carga y se calentó a 60 °C durante 10 min para desnaturalizar el RNA. Se cargaron 20 μ l de cada muestra en el gel de agarosa y se separaron mediante electroforesis en tampón MOPS 1X a 100 V durante 70 minutos, visualizando el gel en un transiluminador de luz UV. Tras la electroforesis, los RNAs se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Mannheim, Germany), en tampón de transferencia SSC 10X (0,75 M cloruro de sodio, 0,075 M citrato de sodio pH 7) durante toda la noche. Después, se procedió a fijar el RNA a la membrana mediante exposición a luz UV en un cross-linker (700 x 100 μ J cm⁻²).

La membrana con los RNA fijados, se analizó mediante hibridación tal y como se describió anteriormente (Pallás et al., 1998), utilizando una ribsonda marcada con digoxigenina, complementaria a la región 5449–5800 del nuevo Tobamovirus (352 nt, aplicando los cebadores 3596/3597; Anexo III). Las membranas se expusieron con película Kodak X-Omat AR durante 30 minutos. Alternativamente, la señal quimioluminiscente se detectó utilizando el sistema de imágenes LAS 3000 del sistema digital Fuji.

3.4.3. Obtención de las sondas del nuevo tobamovirus con los sitios de restricción *Xho*I y *Sal*I

Para la detección específica del nuevo virus CPMMoV, se generaron dos sondas de hibridación molecular. Estas sondas se localizaron en las regiones genéticas donde se observó la mayor divergencia entre el nuevo Tobamovirus y BPeMV. Para ello se compararon las secuencias en las bases de datos de CPMMoV (GenBank MN164455) y BPeMV (GenBank NC_009642.1), seleccionando aquellas regiones que presentaban menor porcentaje de identidad.

Reacciones de PCR fueron llevadas a cabo aplicando cebadores específicos con sitios de restricción *Xho*I y *Sal*I, que amplificaban las dos regiones mencionadas del CPMMoV (Anexo III) utilizando el pUC18T7CPMMoV como molde. Los amplicones de PCR obtenidos fueron introducidos en un plásmido pSK+, tras digerirlo con la enzima *Xho*I y desfosforilarlo, para generar los constructos pSK+CPMMoV#1 y pSK+CPMMoV#2. La primera sonda de 143 nt (cebadores 3604/3605; entre los nt 1501–1643) tuvo un porcentaje de identidad con BPeMV del 80,6 %. La segunda sonda de 352 nt (cebadores 3596/3597; entre los nt 5449–5800) tuvo un porcentaje de identidad con BPeMV del 75,8 %.

Además, se generó una polisonda o Poli2, que llevaba las dos sondas obtenidas de CPMMoV fusionadas en tandem. Para generar la construcción pSK+Poli2, el fragmento de PCR que llevaba los nt 1501–1643 se introdujo en el plásmido pSK+CPMMoV#2, tras digerirlo con la enzima *Xho*I y desfosforilarlo. Con esta prueba se quería observar si al añadir varias secuencias de regiones diferentes del virus se mejoraba la sensibilidad de la técnica de HM.

Por otro lado, se generó una sonda específica de BPeMV de 292 nt (desde nt 5873 hasta nt 6164; GenBank DQ355023; Tabla 3.2 en la sección 3.3.1) que mostró un porcentaje de identidad del 89,4 % con CPMMoV. El proceso de síntesis fue similar al descrito para las sondas de CPMMoV, donde el amplicón obtenido con cebadores específicos y conteniendo los sitios

de restricción *Xho*I y *Sal*I, se introdujo en el plásmido pSK+, tras digerirlo con la enzima *Xho*I y desfosforilarlo.

Todos los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la presencia de los fragmentos incorporados. La síntesis de las correspondientes ribosondas marcadas con digoxigenina se realizó como se ha descrito previamente (Peiró et al., 2012).

3.4.4. Análisis de alineamiento y filogenia

El ensamblaje de las diferentes secuencias de ácidos nucleicos obtenidas se realizó con el software Geneious 2019.2.3 (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012). Los contigs resultantes se examinaron con BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y se calculó la identidad de los nucleótidos (nt) y de los aminoácidos deducidos (aa) mediante el programa ClustalX2 (Thompson et al., 1994) y el software MEGA X 10.1 BETA (Kumar et al., 2018). Para construir los árboles filogenéticos, se empleó el método NeighborJoin (Saitou y Nei, 1987), con 10.000 réplicas de arranque en MEGAX, utilizando secuencias completas de tobamovirus disponibles en bases de datos. Al análisis filogenético se le añadió la secuencia de potato virus X (PVX) como grupo externo, debido a su organización genómica similar, a excepción de la proteína de movimiento (MP). Para el árbol filogenéticos basado en la MP se utilizó como MP externa la correspondiente al alfalfa mosaic virus (AMV), por pertenecer ambas MPs (tobamovirus y alfamovirus) a la familia `30K` (Melcher, 2000; Mushegian y Elena, 2015).

3.4.5. Bioensayo de transmisión de semilla a planta de CPMMoV

Se utilizaron dos fuentes diferentes de semillas de pimiento infectados con CPMMoV-Sp en el bioensayo de transmisión de semilla a planta: (i) semillas de plantas infectadas naturalmente en un invernadero comercial y (ii) semillas de plantas infectadas en laboratorio (inoculadas mecánicamente) con CPMMoV-Sp y cultivadas en cámara de cultivo. Las semillas utilizadas en los ensayos de transmisión no fueron tratadas para eliminar ningún virus ubicado en la superficie de la semilla.

En la primera fuente de semillas (i), se identificaron plantas de pimiento variedad “Derio” que mostraron síntomas de enfermedad viral en un invernadero comercial de pimiento en Gatika (Bizkaia). Estas plantas fueron analizadas en laboratorio mediante HM para CPMMoV (pSK+Sonda#2). Se detectaron tres plantas infectadas con este virus. De cada una de las plantas se cosecharon frutos y se extrajeron sus semillas individualmente, lo que dio como resultado a tres lotes de semillas infectadas con este virus. Cada lote de semillas se sembró en 8 bandejas, con 28 semillas sembradas en cada bandeja (para un total de 224 semillas por lote), utilizando sustrato de turba autoclavada. Estas bandejas se mantuvieron en condiciones de invernadero de vidrio (25-28 °C día/18-20 °C noche). Los síntomas se registraron para cada planta individual. Todas las plantas fueron analizadas a los 52 días después de la siembra (DDS).

En la segunda fuente de semilla (ii), se inocularon mecánicamente 30 plantas de pimiento de la variedad “Celta” cuando estas tenían cuatro hojas completamente desarrolladas. Para la inoculación se utilizaron tres aislados de CPMMoV-Sp procedentes de Granada y Bizkaia, con 10 plantas por aislado. Además, se obtuvo un lote como control libre de CPMMoV, aplicando

sobre las plantas carborundo con tampón de inoculación en 10 plantas de pimiento. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas (25 °C día/18 °C noche, 12 h día/noche y 70 % de humedad relativa) durante tres meses. Tras 20 DDS, todas las plantas fueron analizadas por MH (pSK+Sonda#2) para confirmar la presencia o ausencia del virus en CPMMoV. Los frutos de cada lote fueron recogidos separadamente y se dejaron secar. Posteriormente se extrajeron las semillas de los frutos secos, dando como resultado tres lotes de semillas contaminadas con el virus. También se extrajeron semillas obtenidas de frutos no infectados y conformaron el lote de semillas no infectadas. Se sembraron un total de 80 semillas por lote sobre sustrato de turba autoclavada y se cultivaron en condiciones controladas en una cámara de cultivo. Los síntomas fueron registrados periódicamente y las plantas se muestrearon individualmente a los 35 DDS para analizar la presencia de CPMMoV mediante MH (pSK+Sonda#2).

3.4.6. Bioensayo de determinación de patotipo CPMMoV en variedades de pimiento con diferentes genes de resistencia

La determinación del patotipo del aislado CPMMoVSp procedente de Bizkaia (Euskadi) se realizó mediante un bioensayo en el que se evaluaron variedades de pimiento portadoras de diferentes alelos del gen de resistencia 'L' a tobamovirus, así como algunas variedades sin resistencia. Se inocularon un total de veintidós variedades de pimiento. Las variedades con diferentes genes L de resistencia a tobamovirus fueron: "Garbino F1", "2168" y "2171" (*C. annuum* L. con gen L1; resistente al patotipo P0), "BGHZ 3789" y "BGHZ 3353" (*C. baccatum* L. var. pendulum con gen L2; resistente a los patotipos P0 y P1), "Salvatore F1", "104216" y "2166" (*C. annuum* L. con gen L3; resistente a los patotipos P0, P1 y P1.2) y "Medulas F1", "El Lobo", "Sanakka Ichnigo" y "10255" (*C. annuum* L. con gen L4; resistente a los patotipos P0, P1, P1.2 y P1.2.3). Además, también se incluyeron variedades de pimiento que no tenían genes resistencia (*C. annuum* L; susceptible a todos los patotipos de tobamovirus), como los híbridos comerciales "Gaitanes F1" y "Celta F1", así como variedades locales del País Vasco como "Iker", "Sima-334", "Maddiper", "Izartxo", "Leuna", "Luzea", "Cor-01" y "Loiola19.1".

El inóculo del virus fue preparado utilizando tejido de hojas infectadas (congeladas) con el aislado CPMMoV-Sp y homogeneizado con tampón fosfato 50 mM (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7,5) en una relación 1:8 (p/v). El inóculo del virus fue aplicado con carborundo como abrasivo. La inoculación se realizó frotando la suspensión sobre las dos hojas basales verdaderas de 20 plantas de cada variedad cuando se encontraban en el estado de seis hojas verdaderas. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero de vidrio o cámara de cultivo (25-28 °C/18-20 °C día/noche). Los síntomas se registraron para cada planta inoculada individualmente a los 7, 13, 20 y 27 DDI. Se utilizó la sonda de HM (pSK+CPMMoV#2) para determinar la presencia o ausencia de CPMMoV en hojas no inoculadas de cada planta individual a 34 DDI. Además, también se analizaron mediante RT-PCR hojas no inoculadas de 7 plantas que portaban los genes de resistencia L3 (cv. 2166) o L4 (cvs. Sanakka Ichnigo, 10255 F1) utilizando los cebadores generales de tobamovirus descritos por Li et al. (2018).

3.5. Programa de mejora genética por retrocruzamiento para obtener variedades resistentes a virus en pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra

En 2015 se inició un programa de mejora genética por retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares para transferir los genes de resistencia L3 y L4 a las variedades locales sensibles a tobamovirus “Derio” e “Ibarroria”. Para conseguir este objetivo, el primer paso en el programa de mejora fue cruzarlos con variedades híbridas comerciales de pimiento italiano “Palermo” y “Giulio”, que portan los genes de resistencia L3 y L4, respectivamente. A continuación, se describe el programa de mejora.

3.5.1. Material vegetal y programa de mejora para obtener genotipos resistentes a Tobamovirus

Por un lado, se emplearon cultivares seleccionados de las variedades locales de pimiento que más se cultivan en Euskadi, “Derio” e “Ibarroria”, que son susceptibles a tobamovirus. Estos cultivares tradicionales, utilizados en el programa de mejora, fueron obtenidos a través de selección genealógica o pedigrí para mejorar su homogeneidad, productividad y calidad de los frutos. Por otro lado, se adquirieron híbridos comerciales de pimiento italiano resistentes a tobamovirus de la empresa de semillas Rijk Zwaan. Las variedades híbridas seleccionadas fueron “Palermo”, con el gen de resistencia L3, y “Giulio”, portadora del gen L4. Estas se cruzaron con las variedades susceptibles “Derio” e “Ibarroria” (Figura 3.8). Para realizar este primer cruce, se obtuvo el polen de las variedades híbridas resistentes y fueron polinizadas las flores

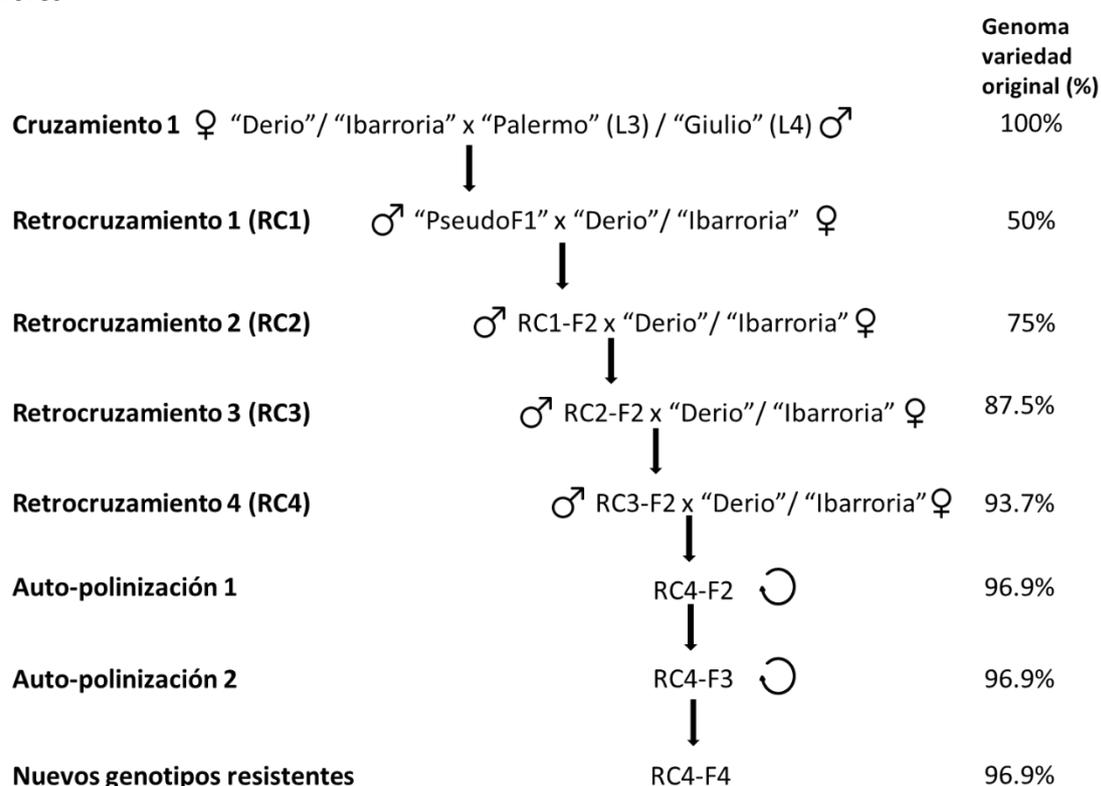


Figura 3.8. Esquema del programa de mejora genético por retrocruzamiento asistido con marcadores moleculares para la obtención de genotipos resistentes a tobamovirus de pimientos de Gernika y guindillas de Ibarra. El programa de mejora genética por retrocruzamientos estuvo compuesto por 7 generaciones: PseudoF1, 4 retrocruzamientos y 2 auto-polinizaciones. Se obtuvieron cuatro materiales

de mejora diferentes cruzando las variedades susceptibles "Derio" e "Ibarroria" con las variedades heterocigóticas resistentes "Palermo" y "Giulio": "Ibarroria" x "Palermo" (genotipos IP, guindilla de Ibarra con gen L3), "Ibarroria" x "Giulio" (genotipos IG, guindilla de Ibarra con gen L4), "Derio" x "Palermo" (genotipos DP, pimiento de Gernika con gen L3) y "Derio" x "Giulio" (genotipos DG, pimiento de Gernika con gen L4).

Tras realizar estos primeros cruces, se obtuvieron cuatro generaciones PseudoF1 (Figura 3.8). El término PseudoF1 se refiere a la descendencia obtenida tras cruzar líneas puras con genotipo homocigoto sensible con híbridos F1 que tienen genotipo heterocigoto resistente. Como resultado de este cruce, la descendencia suele presentar variabilidad en cuanto al carácter de resistencia: aproximadamente la mitad suele ser resistente (heterocigótico), mientras que la otra mitad suele ser sensible. Los cuatro tipos de PseudoF1 obtenidos fueron: "Ibarroria" con "Palermo" (genotipos IP; guindilla de Ibarra con el gen L3), "Ibarroria" con "Giulio" (genotipos IG; guindilla de Ibarra con gen L4), "Derio" con "Palermo" (genotipos DP; pimiento de Gernika con gen L3) y "Derio" con "Giulio" (genotipos DG; pimiento de Gernika con gen L4).

Posteriormente, se efectuaron cuatro retrocruzamientos (RC1, RC2, RC3 y RC4; backcross en inglés = BC) y dos autopolinizaciones para cada tipo de cruce. Durante cada generación del programa de mejora, se llevó a cabo una evaluación visual con el fin de identificar plantas resistentes cuyos frutos presentasen el mayor parecido posible con el de las variedades sensibles "Derio" e "Ibarroria".

En la etapa final del programa de mejora (tras la segunda autopolinización) uno de los objetivos fue desarrollar genotipos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra resistentes a tobamovirus, manteniendo la similitud morfológica de los frutos con las variedades originales sensibles (tras 4 retrocruzamientos). Otro de los objetivos de este programa de mejora genético fue confirmar que en los genotipos obtenidos en la última generación (segunda autopolinización), los genes de resistencia L3 y L4 estuvieran presentes en estado homocigótico.

3.5.2. Evaluación de marcadores moleculares en el material de mejora obtenido

Para evaluar la resistencia a tobamovirus en el material de mejora obtenido, se realizaron pruebas con varios marcadores moleculares asociados a los genes L3 y L4, que ya se habían descrito previamente por varios autores. Respecto al gen L3, se probaron los siguientes marcadores: A214(YB), A339(NK), A339(YB), IH1-04(NK&YB), IH1-18(YB), 189D23M(NB), 189D23M(YB), 253A1R(YB), YB2A14(NB), YB2A25(NK&YB), YB2A19(NK) (Tomita et al., 2008), así como PMFR11 y PMFR21 (Sugita et al., 2004). En cuanto al gen L4, se examinaron los siguientes marcadores: 087H3T7, 087H3T7HRM, L4seg, 189D23M, 158K24HRM (Yang et al., 2009, 2012), L4SC340 (Kim et al., 2008) y AP7/AP8 (Özkaynak et al., 2014). Se seleccionaron aquellos marcadores que mejores resultados mostraron al aplicarlos en el material de mejora obtenido. El material de mejora evaluado correspondió a la primera generación segregante que se obtuvo en el programa de mejora, PseudoF2, autopolinizando la generación PseudoF1.

3.5.3. Desarrollo de marcador SNP para L4.

Para identificar y diferenciar genotipos resistentes homocigotos y heterocigotos para el gen L4, se aplicó un procedimiento utilizando el marcador molecular 087H3T7 (Yang et al., 2009). Este proceso implicó la amplificación de una región ligada al gen L4, obteniendo amplicones de igual tamaño en “Derio” (susceptible), y “Giulio” (heterocigoto resistente con gen L4). Tras aislar, purificar y secuenciar estos amplicones, y alinear sus secuencias utilizando el software *BioEdit*, se detectaron tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Anexo IV).

Para diferenciar estos SNP, se diseñaron cebadores específicos para dos de ellos. Sin embargo, estos cebadores no permitieron distinguir entre plantas resistentes y susceptibles. En el caso del tercer SNP, se descubrió que la enzima de restricción *SspI* cortaba precisamente en el sitio del SNP diferencial, lo que posibilitó identificar los diferentes genotipos para el gen L4.

3.5.4. Resistencia a Tobamoviruses: Genotipado

Tras evaluar cómo se comportaban los diferentes marcadores moleculares que se han mencionado en los epígrafes anteriores, se seleccionaron algunos que nos permitían diferenciar entre genotipos resistentes y sensibles a tobamovirus.

En las fases iniciales del programa de mejora genética (Figura 3.8), se realizó la selección de genotipos heterocigotos resistentes empleando marcadores moleculares específicos. Para el gen L3, se utilizó el marcador YB2A-19 (Tomita et al., 2008), mientras que para el gen L4, se empleó L4SC340 (Kim et al., 2008). No obstante, en las etapas finales del programa (RC4-F3 y RC4-F4), se hizo necesario seleccionar genotipos homocigotos resistentes. Para el gen L3, se siguió aplicando el marcador molecular codominante YB2A-19. Sin embargo, el marcador L4SC340, que había sido efectivo en las generaciones anteriores, no logró diferenciar entre genotipos resistentes homocigotos y heterocigotos. En este contexto, se optó por el uso del marcador CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 087H3T7 (Yang et al., 2009), para la selección de homocigotos resistentes en el gen L4 (apartado anterior). El producto de PCR obtenido mediante este marcador fue digerido con la enzima de restricción *SspI* (Thermo Scientific™, digestión rápida), facilitando así la diferenciación entre genotipos heterocigotos y homocigotos resistentes. Esta enzima escinde el alelo recesivo en dos fragmentos, lo que permite identificar los tres genotipos distintos asociados al gen L4 en geles de agarosa al 2 %.

Para realizar la extracción de DNA se utilizaron las dos primeras hojas verdaderas de las plantas. A estas hojas se les aplicó el kit de extracción de DNA (Analytik Jena) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para la detección de los genes L3 y L4 se aplicaron protocolos de PCR específicos con los marcadores moleculares mencionados anteriormente (Tabla 3.3).

Table 3.3. Protocolos de Polymerase Chain Reaction (PCR) para la detección de genes L3 y L4 en el material de mejora, especificando los diferentes marcadores, volúmenes y componentes de las mezclas de reacción, así como las condiciones de ciclado térmico para cada programa de PCR.

Gen	Marcador	DNA (μ l)	ddH ₂ O (μ l)	Tampón (10x) (μ l)	dNTPs (2,5 mM) (μ l)	Cebador (10 μ M) (μ l)	Taq Pol ^a (μ l)	Programa de PCR
L3	YB2A-19 (Tomita et al., 2008)	2.5	13	2	1.6	0.4	0.1	95 °C 5', 35x (95 °C 30", 57 °C 30", 72 °C 45"), 72 °C 7', 4 °C
L4	L4SC340 (Kim et al., 2008)	3	11.6	2	1.2	1	0.2	95 °C 5', 30x (95 °C 30", 60 °C 30", 72 °C 45"), 72 °C 7', 4 °C
L4	087H3T7 (Yang et al., 2009)	2.5	13	2	1.6	0.4	0.1	94 °C 5', 35x (94 °C 30", 53 °C 30", 72 °C 45"), 72 °C 7', 4 °C

* Los productos de PCR de todas las reacciones de la tabla se ejecutaron en geles de agarosa al 2 % con 1x TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). ^a Taq Polimerasa.

Una vez realizada la PCR con el marcador 087H3T7, al producto obtenido se le realizó una nueva reacción (antes de aplicar el producto PCR en geles de agarosa) aplicando 5 μ l del amplicón, 8 μ l de ddH₂O, 1,5 μ l de tampón (10x) y 0,5 μ l de la enzima de restricción *Ssp*I (Thermo Scientific™, digestión rápida). Esta reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos y luego se almacenó a 4 °C para detener la reacción.

3.5.5. Resistencia a tobamovirus: fenotipado

La inoculación mecánica de los patotipos PMMoV P1.2 y P1.2.3 se realizó en las plantas de la generación RC4-F4 para asegurar la presencia de los genes L3 o L4 y evaluar su comportamiento en los genotipos obtenidos. El inóculo se preparó utilizando 1 g de hojas de pimiento infectadas con los patotipos P1.2 y P1.2.3 (por separado), las cuales se trituraron con ayuda de un mortero y se mezclaron con 9 ml de solución tampón fosfato 50 mM (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7,5), quedando el virus en suspensión. Esta suspensión se frotó sobre las dos primeras hojas verdaderas de cada plántula aplicando carborundo como abrasivo. Las plantas se distribuyeron en tres compartimentos diferentes de un invernadero. El primer compartimento constaba de plantas de control frotadas únicamente con tampón y carborundo. En el segundo compartimento se colocaron las plantas a inocular con el patotipo P1.2, y en el tercero con el patotipo P1.2.3. En el compartimento 1 se colocaron los parentales a modo de control: las variedades sensibles "Derio" e "Ibarroria", y los híbridos comerciales resistentes "Palermo" (resistente a P1.2) y "Giulio" (resistente a P1.2.3), utilizando 20 plantas por cada una de las variedades. El compartimento 2 estuvo formado por los genotipos DP e IP, portadores del gen de resistencia L3, con 20 plantas por genotipo. Además, 20 plantas de cada uno de los parentales "Derio", "Ibarroria", "Palermo" y "Giulio" sirvieron como variedades de control de referencia. El compartimento 3 estuvo compuesto por los genotipos DG e IG, que

portaban el gen de resistencia L4, con 20 plantas por genotipo, así como las mismas dos variedades sensibles y las dos resistentes utilizadas como parentales.

El aislado CPMMoV-Sp se inoculó mecánicamente en diversas variedades de pimiento (parentales resistentes: "Palermo" y "Giulio"; parentales sensibles: "Derio" e "Ibarroria"), así como en los genotipos con gen L3 y L4 homocigóticos obtenidos en el programa de mejora. El inóculo del virus se preparó de la misma forma como se ha detallado anteriormente. La inoculación de este virus también se realizó en las dos primeras hojas basales, aplicando el inóculo en 20 plantas de cada variedad o genotipo obtenido.

Tras la inoculación con estos tobamovirus, las plantas se mantuvieron en un invernadero de cristal (25-28 °C día/ 18-20 °C noche). Los síntomas se observaron y registraron a los días 7, 13, 20 y 27 DDI, y la presencia de PMMoV y CPMMoV en hojas no inoculadas se determinó mediante la prueba de hibridación molecular (HM) no radiactiva (Pallás et al., 1998) a los 34 DDI, utilizando ribosondas específicas.

Para generar estas ribosondas específicas, las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Herranz et al., 2005a, 2005b) utilizando cebadores específicos de PMMoV y CPMMoV (Tabla 3.4) y tejido infectado con cada uno de los virus. Los fragmentos de PCR que comprenden los nt 5501-5780 (GenBank MN267901) para detectar PMMoV y 5449–5800 (GenBank OQ920979) para detectar CPMMoV, se introdujeron en el plásmido pSK+, previamente digerido con la enzima *Xho*I y desfosforilado, para generar las sondas pSK+Probe#PMMoV y pSK+Probe#CPMMoV, respectivamente. Ambos plásmidos fueron secuenciados para confirmar la presencia de los fragmentos PMMoV y CPMMoV introducidos. La síntesis de las sondas marcadas con digoxigenina se realizó como se describió anteriormente (Pallas et al., 1998).

Tabla 3.4. Pares de cebadores empleados para la amplificación de los fragmentos de PMMoV y CPMMoV.

Virus	Secuencia cebadores 5'-3' ^b	Fragmento esperado	Localización ^c	n° acceso GenBank
PMMoV	S ^a <u>CTCGAGTCGAATCAGTTCCAATGGCT</u> aS <u>GAGCTGATTGCGGCTTCATGTGTCTA</u>	280	5501-5780	MN267901
CPMMoV	S <u>CACACTCGAGGTGACCGACAAAGGACC</u> aS <u>CACAGTCGACTAAAAGGTCTGTGGGATC</u>	352	5449–5800	OQ920979

^a S, cebador sentido; aS, cebador anti-sentido.

^b Los nucleótidos subrayados representan zonas de restricción de ingeniería.

^c Los números representan la localización de los nucleótidos amplificados en las secuencias disponibles en el GenBank al utilizar los cebadores indicados.

3.5.6. Ensayo de Producción de los genotipos obtenidos y su comportamiento agronómico.

Para evaluar la productividad de los genotipos obtenidos en el programa de mejora, se realizaron ensayos de producción durante dos años sucesivos, 2021 (generación RC4F4) y 2022 (generación RC4F5), seleccionando los genotipos con mayor rendimiento.

En 2021 se realizó el ensayo de producción evaluando 16 genotipos: 4 genotipos DP, 4 DG, 4 IP y 4 IG. Adicionalmente se evaluaron las dos variedades sensibles "Derio" e "Ibarroria". El

ensayo se dispuso siguiendo un diseño de tres bloques completos al azar con parcelas elementales (unidad experimental) de 6 plantas y una densidad de cultivo de 18.939 plantas ha⁻¹. Este ensayo se llevó a cabo en un invernadero de suelo donde se aplicó fertirrigación.

En 2022, se volvieron a evaluar algunos genotipos en el mismo invernadero con fertirrigación. Específicamente, se evaluaron las dos líneas genéticas de mejor rendimiento del ensayo del año 2021 de los genotipos DP e IP, al igual que los tres mejores genotipos DG e IG. Además, también se evaluaron las producciones de las variedades sensibles para tener controles de referencia. El ensayo de 2022 también siguió un diseño de tres bloques completos al azar con parcelas de 9 plantas y una densidad de cultivo de 15.150 plantas ha⁻¹.

En ambos años, el trasplante se realizó a principios de abril y las primeras cosechas de frutos verdes inmaduros comenzaron a principios de junio y continuaron hasta finales de agosto, representando un total de 26 recolecciones de frutos inmaduros cada año, con una duración total del periodo de recolección de tres meses. El número y peso (gramos) total de frutos inmaduros cosechados en cada parcela elemental fueron registrados y fueron analizados como una variable dependiente continua y normal. Las diferencias entre genotipos se determinaron con análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento de modelo lineal mixto generalizado (proc GLIMMIX) de SAS 9.4. El modelo lineal mixto utilizado para el análisis paramétrico contenía efectos fijos y aleatorios. La variedad o genotipos obtenidos (GENOTIPO) se consideró un factor fijo y la parcela elemental (BLOQUE) se consideró un factor aleatorio. Las medias para el efecto principal GENOTIPO se separaron con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) de rango múltiple en $P < 0,05$. Cada año y tipo varietal (tipo varietal Ibarra: "Ibarroria", IP e IG; tipo varietal Gernika: "Derio", DP y DG) se analizaron de forma independiente para garantizar que las diferencias observadas no estuvieran influenciadas por interacciones entre año y tipo varietal.

Por último, se realizó un ensayo de germinación con todos los genotipos obtenidos en el programa de mejora genética para comprobar su futuro comportamiento en los viveros comerciales de planta. Para ello se recolectaron semillas maduras y bien formadas de cada una de las parcelas elementales del ensayo de producción de 2021. De cada parcela elemental, se sembraron 100 semillas en sustrato de perlita y se colocaron en una cámara de cultivo a 25 °C (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad; 70 % de humedad relativa). La tasa de germinación de estas semillas se evaluó a los 21 días tras la siembra. Además, se evaluó el comportamiento de estos genotipos en un vivero comercial, después de sembrar varios genotipos en sus instalaciones.

3.5.7. Evaluación de genotipos con otros genes de resistencia

Con el programa de mejora en marcha, en la generación RC3-F2, se quiso comprobar si alguna de las líneas de mejora obtenidas disponía de resistencia a otros virus importantes que afectan al cultivo de pimiento como son PVY y TSWV. Esta determinación se tomó debido a que la variedad "Giulio" utilizada como parental, disponía de genes de resistencia a estos virus (además del gen L4). Por ello, se evaluaron plantas de esta generación (genotipos IG y DG) con marcadores moleculares ligados a estos genes de resistencia.

Se intuyó que el gen de resistencia a PVY se trataba del *pvr4* que confiere resistencia a todos los patotipos del PVY, tal como aseguraba la empresa de semillas Rijk Zwaan. El gen que produce la resistencia a TSWV fue el *Tsw* (único gen descrito en pimiento). Ambos genes están en el cromosoma 10 de *Capsicum annuum* (aproximadamente a 15 cM de distancia) (Jahn et al., 2000).

Los marcadores moleculares utilizados para identificar genotipos resistentes a PVY y TSWV fueron E41/M49 (CSO) (Caranta et al., 1999) y SCAC568 (Moury et al., 2000), respectivamente.

Para PVY, al aplicar el marcador molecular E41/M49 (CSO) (Caranta et al., 1999) sobre muestras sensibles (“Derio” e “Ibaroria”) y muestras resistentes heterocigóticas (“Giulio” y “Palermo Radius”: variedad comercial de la casa Rijk Zwaan con gen L3 y resistencia a PVY y TSWV) obtuvimos amplicones tanto en genotipos sensibles como en resistentes, pero al tratar con el enzima de restricción que indicaban en un ensayo previo (*A/wNI*) (Caranta et al., 1999), no se obtuvo digestión, no pudiendo diferenciar entre genotipos. Tras aislar, purificar y secuenciar los amplicones obtenidos con el marcador CSO tanto de genotipos resistentes como de sensibles (“Derio” y “Palermo Radius”), las secuencias fueron alineadas usando el software *BioEdit*. Se detectó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que diferenciaba los genotipos resistentes de los sensibles. Justamente en ese SNP cortaba el enzima de restricción *HindIII*, con el cual se obtuvo digestión de la banda en los genotipos resistentes (GCT), mientras que los sensibles no se digirieron (GCA). Hicimos un ensayo utilizando individuos de la PseudoF2 (autofecundación de la generación PseudoF1) y vimos que se distinguían claramente los individuos sensibles y los resistentes homocigóticos como heterocigóticos (Anexo IV).

Para TSWV, al aplicar el marcador SCAC568 (Moury et al., 2000) sobre muestras sensibles (“Derio” e “Ibaroria”) y muestras resistentes heterocigóticas (“Giulio” y “Palermo Radius”) se obtuvieron amplicones. Al digerir estos con el enzima de restricción *XbaI*, tal y como venía descrito por Moury et al., (2000), pudimos distinguir claramente los genotipos sensibles y los resistentes. El alelo sensible no se digería mientras que el resistente sí. Se realizaron los primeros ensayos también con la generación PseudoF2, donde se podían distinguir claramente los individuos sensibles y los resistentes (homocigóticos y heterocigóticos).

Para realizar la extracción de DNA se utilizaron las dos primeras hojas verdaderas del material de mejora. A estas hojas se les aplicó el kit de extracción de DNA (Analytik Jena) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para la detección de los genes *pvr4* y *tsw* se aplicaron protocolos de PCR específicos con los marcadores moleculares mencionados anteriormente (Table 3.5)

Tabla 3.5. Protocolos de Polymerase Chain Reaction (PCR) para la Detección en el material de Mejora de genes *Pvr4* y *Tsw*, que confieren resistencia a los virus PVY y TSWV, respectivamente, especificando los diferentes marcadores, volúmenes y componentes de las mezclas de reacción, así como las condiciones de ciclado térmico para cada programa de PCR.

Gen	Marcador	DNA (10ng/ μl)(μl)	ddH ₂ O (μl)	Tampón (10x) (μl)	dNTPs (2,5 mM) (μl)	Cebador (10μM) (μl)	Taq Pol ^a (μl)	Programa PCR
<i>Pvr4</i>	E41/M49(CSO) (Caranta et al., 1999)	2.5	13	2	1.6	0.4	0.1	95 °C 5', 35 cycles (95 °C 30", 50 °C 30", 72 °C 45"), 72 °C 7', 4 °C
<i>Tsw</i>	SCAC568 (Moury et al., 2000)	2.5	13	2	1.6	0.4	0.1	95°C 5', 30 ciclos (95 °C 30", 58 °C 30", 72 °C 45"), 72 °C 7', 4 °C

^a Taq Polimerasa

Una vez realizada la PCR con ambos marcadores moleculares, al producto obtenido se le realizó una última reacción antes de aplicarlo en geles de agarosa. Se aplicaron 10 μl del amplicón obtenido, 16 μl de ddH₂O, 3 μl de tampón (10x) y 1 μl de la enzima de restricción *HindIII* o *XbaI* (Thermo Scientific™, Digestión rápida) dependiendo del marcador molecular. Esta reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos y luego se almacenó en frío (4 °C) para detener la reacción.

Los productos de PCR tras la reacción con la enzima de restricción fueron suministrados en geles de agarosa al 2 % con 1x TBE.

4. RESULTADOS

4.1. Prospecciones y muestreos en parcelas de agricultores

4.1.1. Prospección a gran escala con DAS-ELISA en 2014

4.1.1.1. Incidencia de los virus en cultivo

En el estudio realizado en parcelas profesionales de pimiento de Euskadi en 2014, con el objetivo de determinar la incidencia de virosis en cultivo, se analizaron un total de 1107 muestras individuales mediante DAS-ELISA para siete virus: PVY, TSWV, TMV, ToMV, TMGMV, PaMMV y PMMoV. De estas muestras, 408 (36,9 %) resultaron positivas para al menos uno de los virus analizados (Tabla 4.1). Al desglosar los resultados por los diferentes sistemas de cultivo, se observó que el 34,1 % de las plantas de cultivo al aire libre (AL), el 38,3 % de las de invernadero en suelo (IS) y el 41,1 % de las de invernadero hidropónico (IH) estaban infectadas. Considerando el porcentaje total de muestras infectadas, no hubo diferencias significativas entre los tipos varietales de pimiento ($\chi^2_{2,1107} = 0,88$; $P = 0,6443$) ni entre los sistemas de cultivo evaluados ($\chi^2_{2,1107} = 2,55$; $P = 0,2796$) (Tabla 1).

Tabla 4.1. Número y porcentaje de plantas muestreadas de forma individual (parte superior) y de parcelas prospectadas (parte inferior) que resultaron positivas para al menos uno de los virus evaluados mediante DAS-ELISA, en función del tipo varietal de pimiento y el sistema de cultivo. Se añade la probabilidad resultante de la prueba de χ^2 para verificar la igualdad de proporciones entre los distintos tipos varietales de pimiento y los sistemas de cultivo.

Tipo de pimiento	Aire libre		Invernadero suelo		Invernadero Hidropónico		Total		χ^2 value (sistema cultivo)	P value (sistema cultivo)
	Plantas	% Plantas infectadas	Plantas	% Plantas infectadas	Plantas	% Plantas infectadas	Plantas	% Plantas infectadas		
Guindilla Ibarra	495	34,5	66	56,1	32	62,5	593	38.4	12.12	0.0023
Pimiento Gernika	38	28,9	200	31,5	225	39,1	463	35.0	2.18	0.3355
Pimiento asar	21	33,3	24	45,8	6	0,0	51	35.3	2.89	0.2351
Total	554	34,1	290	38,3	263	41,1	1107	36.9	2.55	0.2796
χ^2 (Tipo pimiento)	0,33		8,20		6,25		0,88			
P (Tipo pimiento)	0,8486		0,0165		0,044		0,6443			

Tipo de pimiento	Aire libre		Invernadero suelo		Invernadero Hidropónico		Total		χ^2 value (sistema cultivo)	P value (sistema cultivo)
	Parcelas	% Parcelas infectadas	Parcelas	% Parcelas infectadas	Parcelas	% Parcelas infectadas	Parcelas	% Parcelas infectadas		
Guindilla Ibarra	21	90,5	10	90,0	4	75,0	35	88.6	0.09	0.9541
Pimiento Gernika	4	100,0	28	67,9	23	65,2	55	69.1	0.61	0.7374
Pimiento asar	2	50,0	4	100,0	1	0,0	7	71.4	1.30	0.5219
Total	27	88,9	42	76,2	28	64,3	97	76.3	1.09	0.5797
χ^2 (Tipo pimiento)	0,40		0,80		0,72		1,08			
P (Tipo pimiento)	0,8180		0,6693		0,6983		0,5807			

Al evaluar las parcelas, se observó que el 76,3 % de parcelas prospectadas fueron infectadas por alguno de los virus en estudio. A pesar de esta alta incidencia, el análisis de igualdad de proporciones no mostró diferencias significativas ni entre los tipos varietales de pimiento ($\chi^2_{2,97} = 1,08$; $P= 0,5807$) ni entre los sistemas de cultivo ($\chi^2_{2,97} = 1,09$; $P= 0,5797$) evaluados (Tabla 4.1).

En el tipo varietal guindilla de Ibarra, el porcentaje de infección fue significativamente superior ($\chi^2_{2,593} = 12,12$; $P= 0,0023$) bajo condiciones de invernadero (56.1 % en invernaderos de suelo y 62.5 % en invernaderos hidropónicos) en comparación con las condiciones de cultivo al aire libre (34,5 %) (Tabla 4.1). Sin embargo, se debe tener en cuenta que las muestras analizadas de cultivo al aire libre fueron considerablemente más numerosas (83,4 %).

También se encontraron diferencias significativas en la infección viral entre los tipos de pimiento producidos en condiciones de invernadero en suelo ($\chi^2_{2,290} = 8,20$; $P= 0,0165$) e invernadero hidropónico ($\chi^2_{2,263} = 6,25$; $P= 0,044$). En condiciones de invernadero en suelo, la infección viral fue del 56,1 % en guindilla de Ibarra, del 31,5 % en pimiento de Gernika y del 45,8 % en pimiento de asar. En los invernaderos hidropónicos, la infección viral fue del 62,5 % en guindilla de Ibarra, del 39,1 % en pimiento de Gernika y no se detectó infección viral en pimiento de asar.

4.1.1.2. Virus detectados

En todos los sistemas de cultivo examinados se detectaron todos los virus analizados (PVY, TSWV, TMV, ToMV, TMGMV, PaMMV y PMMoV) (Tabla 4.2). Respecto a los tipos varietales, se observó la presencia de todos los virus mencionados tanto en guindilla de Ibarra como en pimiento Gernika. Sin embargo, en el pimiento de asar no se detectaron TMV y PaMMV, aunque es relevante señalar que sólo se analizaron 51 muestras de este tipo varietal.

Tabla 4.2. Número y porcentaje de plantas muestreadas (parte superior) y parcelas prospectadas (parte inferior) que dieron positivo a cada uno de los virus analizados por DAS-ELISA en cada sistema de cultivo, y probabilidad de las pruebas de χ^2 para igualdad de proporciones entre los diferentes sistemas de cultivos.

	Aire libre	Invernadero suelo	Invernadero Hidropónico	Total	χ^2 value	P value
Número plantas	554	290	263	1107		
Infección Virus (%)						
PVY	151 (27,3 %)	43 (14,8 %)	25 (9,5 %)	219 (19,8 %)	33,28	<0,0001
TSWV	6 (1,1 %)	14 (4,8 %)	16 (6,1 %)	36 (3,3 %)	16,71	0,0002
TMV	36 (6,5 %)	14 (4,8 %)	19 (7,2 %)	69 (6,2 %)	1,40	0,4975
ToMV	10 (1,8 %)	32 (11 %)	10 (3,8 %)	52 (4,7 %)	35,11	<0,0001
TMGMV	10 (1,8 %)	44 (15,2 %)	63 (24,0 %)	117 (10,6 %)	90,66	<0,0001
PaMMV ^a	2 (0,4 %)	6 (2,1 %)	7 (2,7 %)	15 (1,4 %)	8,44	0,0147
PMMoV	13 (2,3 %)	9 (3,1 %)	15 (5,7 %)	37 (3,3 %)	6,08	0,0478
	Aire libre	Invernadero suelo	Invernadero Hidropónico	Total	χ^2 value	P value
Numero parcelas	27	42	28	97		
Infección Virus (%)						
PVY	21 (77,8 %)	17 (40,5 %)	8 (28,6 %)	46 (47,4 %)	7,77	0,0205
TSWV	5 (18,5 %)	5 (11,9 %)	6 (21,4 %)	16 (16,5 %)	1,02	0,6014
TMV	11 (40,7 %)	4 (9,5 %)	6 (21,4 %)	21 (21,6 %)	7,40	0,0247
ToMV	4 (14,8 %)	12 (28,6 %)	5 (17,9 %)	21 (21,6 %)	1,70	0,4278

TMGMV	4 (14,8 %)	13 (31 %)	12 (42,9 %)	29 (29,9 %)	3,64	0,1617
PaMMV ^a	2 (7,4 %)	4 (9,5 %)	4 (14,3 %)	10 (10,3 %)	0,68	0,7135
PMMoV	5 (18,5 %)	7 (16,7 %)	5 (17,9 %)	17 (17,5 %)	0,03	0,9828

^a/ PaMMV fue detectado mediante DAS-ELISA, pero tras ser analizado mediante la técnica de hibridación molecular no radiactiva los resultados fueron negativos.

Los virus más frecuentes fueron PVY y TMGMV, detectándose en 19,8 % y 10,6 % de las plantas analizadas y en el 47,4 % y 29,9 % de las parcelas prospectadas, respectivamente (Tabla 2). Los siguientes virus más relevantes fueron TMV y ToMV con una incidencia del 6,2 % y 4,7 % de las plantas analizadas y del 21,6 % de las parcelas prospectadas en ambos virus. PMMoV, TSWV y PaMMV mostraron una menor incidencia, con 3,3 %, 3,3 % y 1,4 % de las plantas infectadas y 17,5 %, 16,5 % y 10,3 % de las parcelas, respectivamente. Algunos de los síntomas más llamativos provocados por virosis en esta prospección se pueden observar en la Figura 4.1.

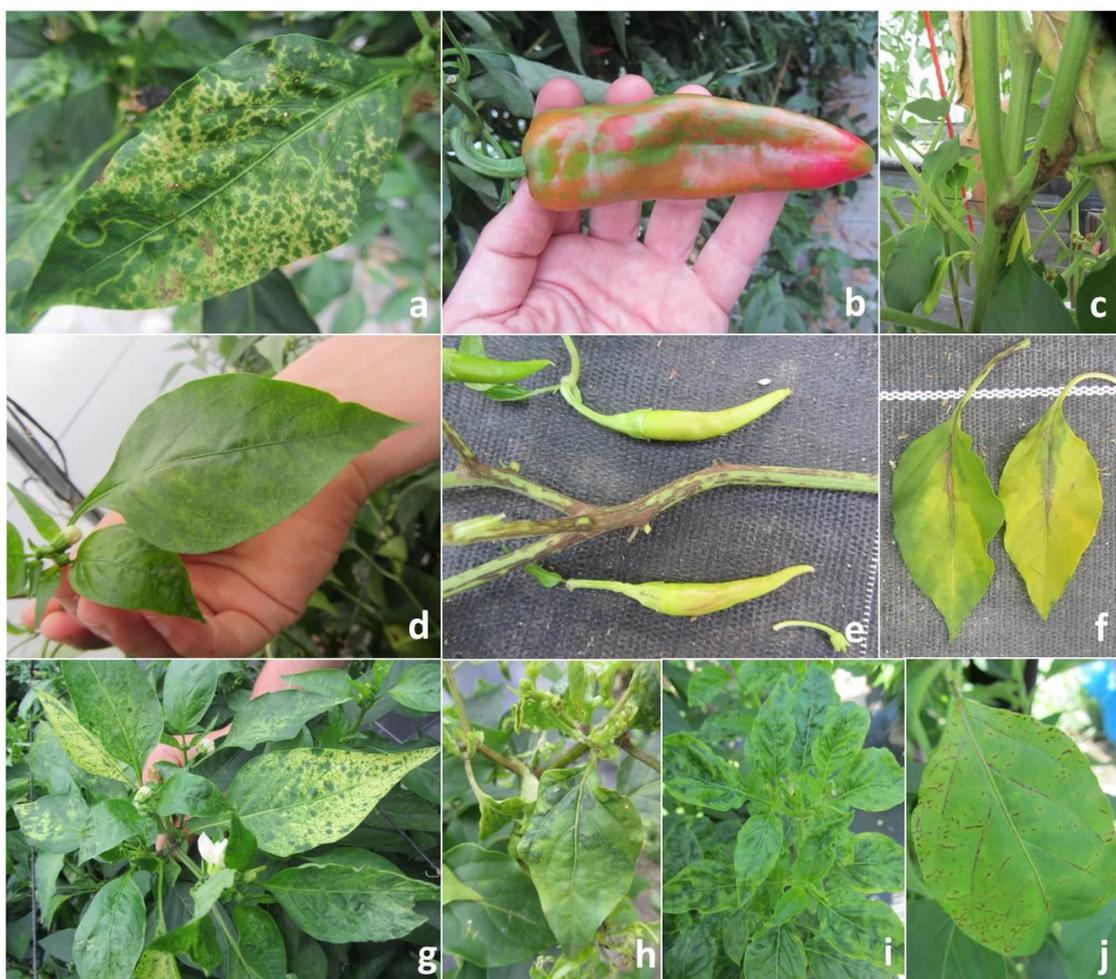


Figura 4.1. Síntomas en hojas, frutos y tallos producidos por virus en parcelas de pimiento tipo Gernika y guindilla de Ibarra. a) Formación de anillos y patrones cloróticos y necróticos causados por TSWV. b) Maduración irregular en fruto de pimiento de Gernika causada por TSWV. c) Necrosis del tallo causada por ToMV; d) Mosaico suave causado por TMGMV. e) Necrosis en tallo y ramas causada por PMMoV en guindilla de Ibarra. f) Clorosis y necrosis en hojas causadas por ToMV. g) Patrones cloróticos y moteados leves causados por la coinfección de TMGMV y ToMV. h) Deformación foliar, clorosis y mosaicos provocados por PVY. i) Mosaico causado por PVY. j) Necrosis nerviales provocadas por PVY.

Del total de plantas muestreadas, 753 (68 %) presentaron síntomas, mientras que 354 (32 %) fueron asintomáticas. Entre las plantas sintomáticas, 343 (45,6 %) resultaron positivas a alguno de los virus analizados. En cambio, entre las plantas asintomáticas, solo 64 (18,1 %) mostraron

resultados positivos. Los virus más importantes detectados entre las plantas sintomáticas fueron PVY (24,5 %) y TMGMV (12,1 %), al igual que en las plantas asintomáticas (8,1 y 8,1 %, respectivamente).

En lo que respecta al sistema de cultivo, entre las plantas evaluadas en condiciones al aire libre, 509 (91,9 %) fueron sintomáticas y 45 (8,1 %) asintomáticas. En este sistema de cultivo, el número de plantas positivas a virus fue de 185 (36,3 %) en plantas sintomáticas y 2 (4,4 %) en plantas asintomáticas. En cultivos protegidos, 309 (55,9 %) fueron plantas sintomáticas y 244 (44,1 %) asintomáticas. En este sistema de cultivo, el número de plantas positivas a virus fue de 158 (64,7 %) en plantas sintomáticas y 62 (20,1 %) en plantas asintomáticas. En la Figura 4.2 se pueden observar los virus detectados en cada localidad muestreada en 2014.

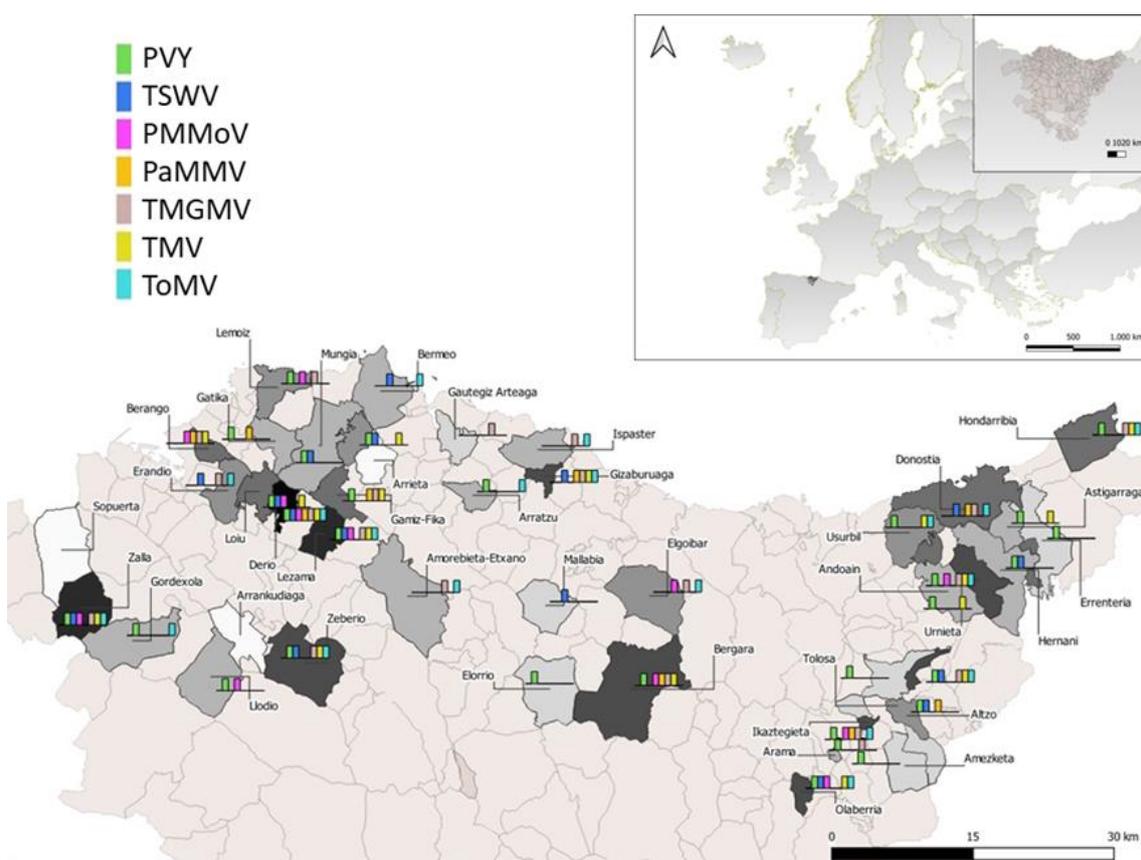


Figura 4.2. Mapa de Euskadi que muestra la distribución de los virus evaluados en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en las localidades prospectadas en 2014.

4.1.1.3. Importancia de los virus según el sistema de cultivo.

Hubo diferencias significativas en el porcentaje de plantas infectadas entre los diferentes sistemas de cultivo para todos los virus evaluados, excepto TMV ($\chi^2_{2,1107} = 1.40$; $P = 0.4975$) (Tabla 4.2). Sin embargo, los únicos dos virus que mostraron diferencias significativas en el porcentaje de parcelas infectadas comparando sistemas de cultivo fueron PVY ($\chi^2_{2,97} = 7,77$; $P = 0,0205$) y TMV ($\chi^2_{2,97} = 7,40$; $P = 0,0247$). Las parcelas infectadas por PVY fueron el 77,8 % en condiciones al aire libre, el 40,5 % en invernaderos de suelo y el 28,6 % en invernaderos hidropónicos. En cuanto a las parcelas infectadas por TMV fueron el 40,7 %, el 9,5 % y el 21,4 %, respectivamente. PVY tuvo mayor presencia en las plantas tomadas en condiciones de aire

libre (27,3 %) que en las plantas bajo invernadero (14,8 % en invernaderos de suelo y 9,5 % en invernaderos hidropónicos) ($\chi^2_{2,1107} = 33,28$; $P < 0,0001$). Sin embargo, TSWV y todos los tobamovirus, excepto TMV, mostraron mayor importancia en condiciones de invernadero ($P < 0,05$) (Tabla 4.2).

Los virus pertenecientes al género Tobamovirus predominaron sobre los virus TSWV y PVY cuando se evaluaron conjuntamente. Los virus de este género se encontraron en el 20,1 % de las plantas muestreadas (Tabla 4.2), mientras que PVY y TSWV se observaron en el 19,8 % y 3,3 % de las plantas analizadas, respectivamente. En cultivo protegido, los tobamovirus mostraron mayor incidencia (28,9 %), mientras que PVY (12,3 %) y TSWV (5,2 %) no fueron tan prevalentes. Sin embargo, en condiciones al aire libre, la prevalencia de PVY (27,3 %) fue significativamente superior que la de la suma de tobamovirus (11,2 %) y TSWV (1,1 %).

4.1.1.4. Infecciones simples y múltiples.

Se detectaron infecciones simples en el 28,0 % de las muestras analizadas, mientras que las infecciones múltiples fueron observadas en el 8,9 % de ellas (Tabla 4.3). PVY fue el virus más común en infecciones individuales, con una tasa de incidencia del 14,2% de las plantas analizadas. Se detectó infección simple por PVY en el 22,0 % de las muestras en cultivo al aire libre, pero estuvo presente en sólo el 6,3 % de las muestras en cultivo protegido. El segundo virus más común en infecciones simples fue TMGMV, que estuvo presente en el 5,6 % de las plantas analizadas (Tabla 4.3). Se observó infección simple por TMGMV en sólo el 0,4 % de las plantas en el sistema de cultivo al aire libre, mientras que se encontró en el 10,8 % de las muestras en condiciones de invernadero. Las infecciones simples con PMMoV y PaMMV fueron las más escasas en este estudio, estando presentes en sólo el 1,1 % y el 0,45 % de las plantas analizadas, respectivamente.

En el análisis de las muestras, se identificaron 15 combinaciones distintas de infecciones dobles, 10 combinaciones de infecciones triples, 4 de infecciones cuádruples y 2 de infecciones quintuples. Los virus PVY y TMGMV, siendo los más comunes, estuvieron presentes en el 91,4 % de las infecciones dobles y en el 100 % de las infecciones triples, cuádruples y quintuples (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Infecciones virales simples o múltiples en cultivo de pimiento en diferentes sistema de cultivo expresadas como porcentaje de plantas que resultaron positivas para cada uno de los virus analizados por DAS-ELISA.

Virus detectados	Infecciones detectadas				
	Aire libre (%), n = 554	Invernadero suelo (%), n = 290	Invernadero hidropónico (%), n = 263	Total Invernadero (%), n = 553	Total (%), n = 1107
Infecciones Simples					
PVY	22,0	7,6	4,9	6,3	14,18
TSWV	0,5	4,5	3,8	4,2	2,35
TMV	3,2	0,3	1,9	1,1	2,17
ToMV	1,4	5,2	0,4	2,9	2,17
TMGMV	0,4	6,9	15,2	10,8	5,60
PaMMV ^a	0,0	0,7	1,1	0,9	0,45
PMMoV	0,9	1,4	1,1	1,3	1,08
Total	28,5	26,6	28,5	27,5	28,00
Infecciones Dobles					
PVY + TSWV	0,4	0,0	0,4	0,2	0,27
PVY + TMV	2,7	0,7	0,0	0,4	1,54
PVY + ToMV	0,2	0,7	0,0	0,4	0,27
PVY + TMGMV	0,5	0,7	2,3	1,4	0,99
PVY + PaMMV ^a	0,2	0,3	0,0	0,2	0,18
PVY + PMMoV	0,5	0,7	0,0	0,4	0,45
TSWV + TMV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
TSWV + ToMV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
TSWV + PaMMV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
TMV + ToMV	0,0	0,0	0,8	0,4	0,18
TMV + TMGMV	0,0	0,7	1,1	0,9	0,45
TMV + PMMoV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
ToMV + TMGMV	0,0	2,1	0,4	1,3	0,63
TMGMV + PaMMV ^a	0,0	1,0	0,0	0,5	0,27
TMGMV + PMMoV	0,2	0,3	2,3	1,3	0,72
Total	4,7	7,2	8,7	8,0	6,32
Infecciones Triples					
PVY + TSWV + PMMoV	0,2	0,0	0,0	0,0	0,09
PVY + TMV + ToMV	0,2	0,3	0,4	0,4	0,27
PVY + TMV + TMGMV	0,0	1,0	0,4	0,7	0,36
PVY + TMV + PMMoV	0,0	0,3	0,4	0,4	0,18
PVY + ToMV + TMGMV	0,0	1,0	0,0	0,5	0,27
PVY + TMGMV + PMMoV	0,2	0,0	0,0	0,0	0,09
TMV + ToMV + TMGMV	0,0	0,0	0,8	0,4	0,18
TMV + TMGMV + PMMoV	0,2	0,0	0,0	0,0	0,09
ToMV + TMGMV + PMMoV	0,0	0,3	0,0	0,2	0,09
TMGMV + PaMMV ^a + PMMoV	0,0	0,0	0,8	0,4	0,18
Total	0,7	3,1	2,7	2,9	1,81
Infecciones Cuádruples					
PVY + TSWV + TMV +	0,0	0,3	0,0	0,2	0,09

Virus detectados	Infecciones detectadas				
	Aire libre (%), n = 554	Invernadero suelo (%), n = 290	Invernadero hidropónico (%), n = 263	Total Invernadero (%), n = 553	Total (%), n = 1107
ToMV					
PVY + TMV + ToMV + TMGMV	0,0	1,0	0,0	0,5	0,27
PVY + TMGMV + PaMMV ^a + PMMoV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
TSWV + TMV + ToMV + TMGMV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
Total	0,0	1,4	0,8	1,1	0,54
Infecciones Quintuples					
PVY + TSWV + TMV + ToMV + PMMoV	0,0	0,0	0,4	0,2	0,09
PVY + TMV + TMGMV + PaMMV ^a + PMMoV	0,2	0,0	0,0	0,0	0,09
Total	0,2	0,0	0,4	0,2	0,18

^a PaMMV fue detectado por DAS-ELISA, pero tras ser analizado por la técnica de hibridación molecular no radiactiva, se observó que estas muestras eran negativas.

4.1.1.5. Bioensayo de determinación de patotipos de PMMoV.

Todos los aislados de PMMoV (obtenidos en la prospección 2014) que fueron inoculados en plantas del cultivar sensible Negral causaron enfermedad, mostrando el típico síntoma de mosaico suave en hojas superiores no inoculadas (Tabla 4.4). Estos síntomas fueron confirmados con resultados positivos obtenidos por DAS-ELISA a los 15 y 30 DDI con PMMoV. Sin embargo, todos los aislados inoculados en los híbridos comerciales Padua F1 (con gen de resistencia L3 a los patotipos P0, P1 y P1.2) y Giulio F1 (con gen de resistencia L4 a los patotipos P0, P1, P1.2 y P1.2.3) mostraron síntomas de respuesta hipersensible (HR) en hojas inoculadas, como puntos necróticos (PN) (Figura 4.3) seguidos de abscisión (A). En estos híbridos comerciales, todas las plantas inoculadas resultaron negativas al virus mediante DAS-ELISA al analizar hojas sistémicas a los 30 DDI. Sólo dos aislados dieron resultados positivos por DAS-ELISA en el cultivar Padua a los 15 DDI (sólo en una de las cinco plantas inoculadas con cada aislado). Sin embargo, las dos plantas tuvieron síntomas de hipersensibilidad (PN + A) en hojas inoculadas y ambas plantas dieron resultados negativos por DAS-ELISA en hojas no inoculadas a los 30 DDI.

Tabla 4.4. Determinación del patotipo de aislados de PMMoV en el bioensayo de inoculación en diferentes genotipos de pimiento con diferentes fuentes de resistencia al virus.

(x/5) ^a	15 días			30 días		
	N ^c	P ^c	G ^c	N	P	G
0/5	Ctr-(<u> </u>)	Ctr-(<u> </u>) Ctr+P _{1.2} (PN) Ctr+P _{1.2.3} (PN) ₃ 34 (PN ^d)	Ctr-(<u> </u>) Ctr+P _{1.2} (PN) Ctr+P _{1.2.3} (PN) 36 (PN)	Ctr-(<u> </u>)	Ctr-(<u> </u>) Ctr+P _{1.2} (PN; A) 36 (PN; A ^d)	Ctr-(<u> </u>) Ctr+P _{1.2} (PN; A) Ctr+P _{1.2.3} (PN; A) 36 (PN; A)
1/5		2 (PN)				
2/5		Ctr+P _{1.2.3} (PN) ₂				
3/5	1 ^b (M ^d)					
4/5	4 (M)					
5/5	Ctr+P _{1.2} (M) Ctr+P _{1.2.3} (M) 31 (M)			Ctr+P _{1.2} (M) Ctr+P _{1.2.3} (M) 36 (M)	Ctr+P _{1.2.3} (M)	

Los 36 aislados de PMMoV muestreados en la prospección 2014 se inocularon en 5 plantas de cada cultivar en estado fenológico de 6 hojas verdaderas.

En el ensayo de inoculación se incluyeron tres tratamientos testigo: (Ctr-) Control negativo de plantas no inoculadas; (Ctr+P_{1.2}) Control positivo de un aislado perteneciente al patotipo 1.2 de PMMoV; (Ctr+P_{1.2.3}) Control positivo de un aislado perteneciente al patotipo PMMoV 1.2.3.

^a x es el número de plantas con resultados positivos con DAS-ELISA a los 15 y 30 días después de la inoculación con los 36 aislados de PMMoV obtenidos en la prospección 2014. ^b Número de aislados de PMMoV que mostraron el mismo patrón de resultados de DAS-ELISA en las plantas inoculadas. ^c Variedades inoculadas: N= Negral, variedad sensible a todos los patotipos de tobamovirus; P=Híbrido comercial Padua RZ F1 con gen de resistencia L3 a los patotipos de tobamovirus P0, P1 y P1.2; G= Híbrido comercial Giulio RZ F1, con gen de resistencia L4 a los patotipos P0, P1, P1.2 y P1.2.3. ^d Síntomas: PN: Puntos necróticos en hojas inoculadas; A: Abscisión en hojas inoculadas; M: Mosaico en hojas no inoculadas; (): Sin síntomas. Entre paréntesis se muestran los síntomas observados en el ensayo de inoculación. Los números de subíndice fuera del paréntesis indican el número de plantas en el tratamiento Ctr+P1.2.3 que mostraron el mismo tipo de síntomas pero con diferentes resultados con DAS-ELISA. Los síntomas de las plantas inoculadas se muestran en la Figura 4.3.

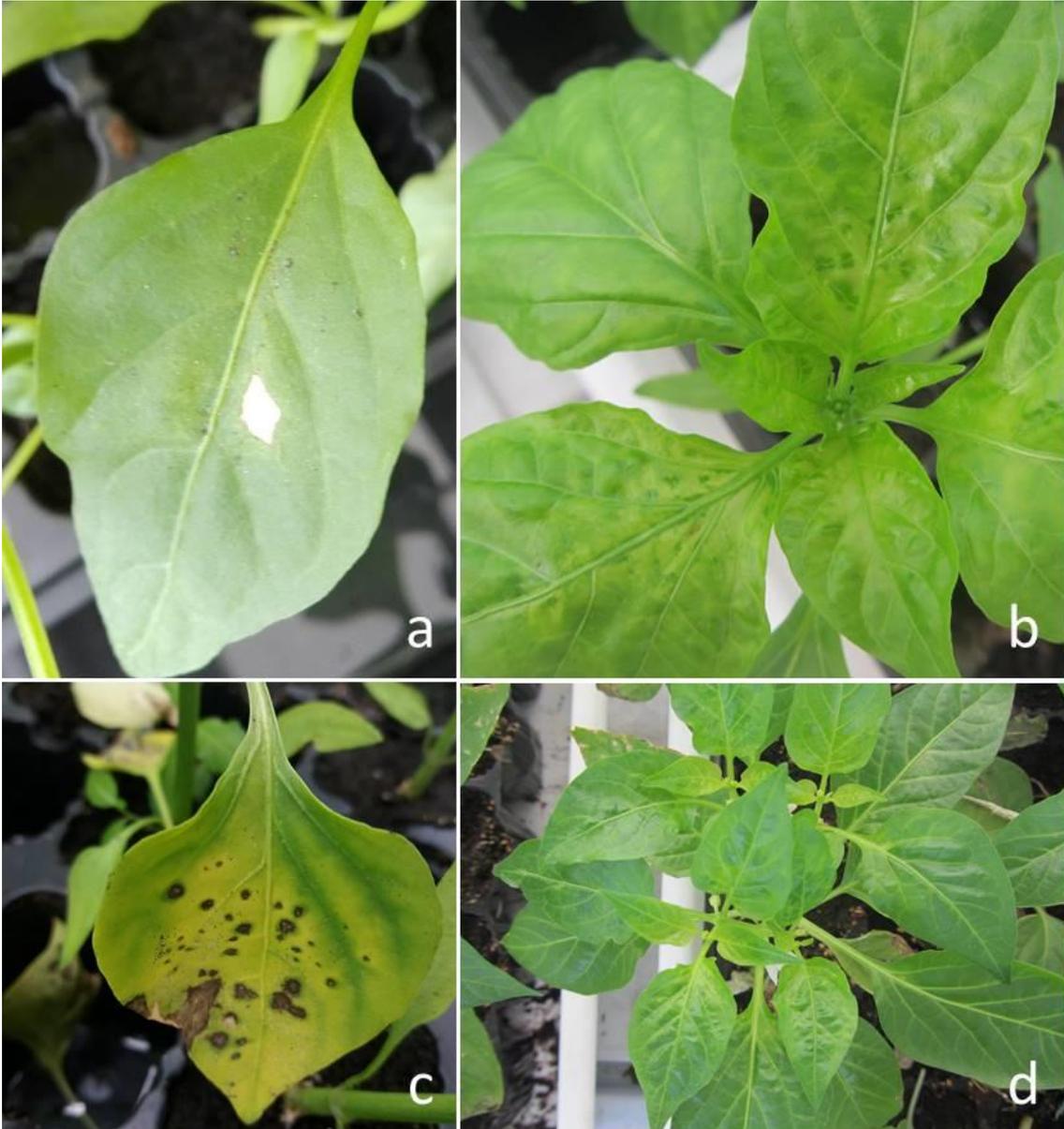


Figura 4.3. Síntomas observados en el bioensayo de inoculación de PMMoV. a) Abrasión mecánica en hojas inoculadas tras frotar el inóculo con carborundo en una planta sensible (cv. Negral) a los 15 días después de inoculación (DDI). b) Mosaico leve en hojas no inoculadas en una planta sensible (cv. Negral) a los 15 DDI. c) Puntos necróticos en hoja inoculada asociadas a la HR de una planta resistente (cv. Giulio con gen de resistencia L4) a los 15 DDI. d) Ausencia de síntomas en hojas no inoculadas de una planta resistente (cv. Giulio con gen de resistencia L4) a los 15 DDI.

4.1.2. Muestreos con DAS-ELISA en 2017-2018

En las campañas 2017 y 2018, se realizaron visitas a varias parcelas profesionales de pimiento, donde se muestrearon plantas con síntomas de virosis prioritariamente. Estas muestras representaron diversos sistemas de cultivo (Aire libre, invernadero suelo e invernadero hidropónico) a lo largo de tres periodos de muestreo específicos: junio, agosto y septiembre, representando estas fechas al principio de cultivo, pleno cultivo y final del cultivo, respectivamente. Las muestras fueron analizadas mediante DAS-ELISA para los virus TMGMV, ToMV, PMMoV, TSWV, CMV, y PVY (Tabla 4.5 y 4.6).

Tabla 4.5. Número y porcentaje de plantas que dieron positivo a cada uno de los virus analizados por DAS-ELISA en cada sistema de cultivo en los 3 muestreos que se realizaron en 2017 sobre plantas sintomáticas.

Junio							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL ^a	25	2 (8,0 %)	1 (4 %)	1 (4 %)	0	14 (56 %)	3 (12 %)
IH	3	0	1 (33 %)	0	0	0	0
IS	3	1 (33,3 %)	0	0	0	0	0
Total	31	3 (9,7 %)	2 (6,5 %)	1 (3,2 %)	0	14 (45,2 %)	3 (9,7 %)
Agosto							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL	32	18 (56,3 %)	12 (37,5 %)	24 (75,0 %)	0	15 (46,9 %)	13 (40,6 %)
IH	4	0	0	0	0	0	0
IS	45	2 (4,4 %)	0	0	0	4 (8,9 %)	0
Total	81	20 (24,7 %)	12 (14,8 %)	24 (29,6 %)	0	19 (23,5 %)	13 (16,0 %)
Septiembre							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL	67	1 (1,5 %)	11 (16,4 %)	15 (22,4 %)	1 (1,5 %)	33 (49,3 %)	8 (11,9 %)
IH	25	0	3 (12,0 %)	5 (20,0 %)	1 (4,0 %)	0	1 (4,0 %)
Total	92	1 (1,1 %)	14 (15,2 %)	20 (21,7 %)	2 (2,2 %)	33 (35,9 %)	9 (9,8 %)
TOTAL 2017	204	24(11,8 %)	28 (13,7 %)	45 (22,1 %)	2 (1,0 %)	66(32,4 %)	25 (16,0 %)

^aAL: Aire libre; IH: Invernadero Hidropónico; IS: Invernadero Suelo.

En total, durante el año 2017 se analizaron 204 muestras, siendo CMV el virus más detectado (32,4 %), seguido por PMMoV (22,1 %), ToMV (13,7 %), TMGMV (11,8 %) y PVY (9,8 %). La incidencia de TSWV, fue relativamente baja en estas muestras. En junio, comenzaron a observarse infecciones por CMV (45,2 %), TMGMV (9,7 %) y PVY (9,7 %). La mayoría de las muestras analizadas pertenecieron al sistema de cultivo al aire libre. En agosto, las infecciones por CMV continuaron altas en cultivos al aire libre y se observó un notable incremento en la incidencia de todos los virus analizados, especialmente PMMoV (75,0 %), TMGMV (56,3 %), PVY (40,6 %) y ToMV (37,5 %), en el mismo sistema de cultivo. Los invernaderos (hidropónicos y suelo), presentaron poca o ninguna detección de virus. Hacia el final del cultivo (septiembre), se vio una disminución de las infecciones por TMGMV en comparación con el muestreo de agosto (debido a que no se muestrearon parcelas con este virus). La presencia de CMV (35,9 %), ToMV (15,2 %), PMMoV (21,7 %) y PVY (9,8 %) fue considerable, especialmente en cultivos al aire libre.

Tabla 4.6. Número y porcentaje de plantas que dieron positivo a cada uno de los virus analizados por DAS-ELISA en cada sistema de cultivo en los 3 muestreos que se realizaron el año 2018 sobre plantas sintomáticas.

Junio							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL ^a	23	0	0	0	0	7 (30,4 %)	0
IH	20	3 (15,0 %)	0	0	1 (5,0%)	0	0
IS	5	0	0	0	4 (80,0 %)	0	0
Total	48	3 (6,3 %)	0	0	5 (10,4 %)	7 (14,6 %)	0
Agosto							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL	35	0	0	0	4 (11,4 %)	14 (40,0 %)	13 (37,1 %)
IH	25	11 (44,0 %)	2 (8,0 %)	0	2 (8,0 %)	1 (4,0 %)	0
IS	5	0	0	0	3 (60 %)	0	0
Total	65	11 (16,9 %)	2 (3,1 %)	0	9 (13,8 %)	15 (23,1 %)	13 (20,0 %)
Septiembre							
Sistema cultivo	nº muestras	TMGMV	ToMV	PMMoV	TSWV	CMV	PVY
AL	41	0	0	1 (2,4 %)	0	4 (9,8 %)	7 (17,1 %)
IH	44	26 (59,1%)	1 (2,3 %)	0	0	2 (4,5 %)	1 (2,3 %)
IS	5	0	0	0	0	1 (20 %)	0
Total	90	26 (28,9%)	1 (1,1 %)	1 (1,1 %)	0	7 (7,8 %)	8 (8,9 %)
TOTAL 2018	203	40 (19,7%)	3 (1,4 %)	1(0,5 %)	14 (6,9 %)	29 (14,3 %)	21 (10,3 %)

^aAL: Aire libre; IH: Invernadero Hidropónico; IS: Invernadero Suelo.

El análisis anual de 2018 reveló que, de un total de 203 muestras analizadas, TMGMV fue el virus con la mayor incidencia (19,7 %), seguido por CMV (14,3 %) y PVY (10,3 %). La presencia de ToMV y PMMoV fue notablemente baja a lo largo de la campaña. La incidencia de TSWV fue moderada (6,9 %). En junio, se analizaron 48 muestras, detectándose los virus TMGMV, TSWV y CMV. En cultivos al aire libre solo se detectó CMV (30,4 %), mientras que en los invernaderos hidropónicos se detectaron algunas muestras positivas a TMGMV y TSWV, mientras que en los invernaderos en suelo tuvieron presencia las infecciones por TSWV (80 %, solo 5 muestras analizadas). En agosto, el número de muestras aumentó a 65, observándose un incremento en la incidencia de CMV (40 %) y PVY (37,1 %) en cultivos al aire libre, mientras que los invernaderos hidropónicos mostraron una alta incidencia de TMGMV (44 %). Los invernaderos en suelo tuvieron una incidencia significativa de TSWV (60 %, solo 5 muestras analizadas). En septiembre, se analizaron 90 muestras, con los invernaderos hidropónicos mostrando una incidencia particularmente alta de TMGMV (59,1 %). La incidencia de CMV y PVY en cultivos al aire libre fue menor en comparación con el muestreo de agosto. Los invernaderos de suelo mostraron una baja incidencia de virus en general.

4.1.3. Prospección a gran escala con Hibridación molecular (HM) en 2019

En el estudio realizado en la campaña 2019, se analizaron 21 virus y dos viroides por HM en 1199 muestras de pimiento pertenecientes a diferentes parcelas profesionales de Euskadi. Se detectaron diez patógenos virales: CMV (20,1 %), TSWV (14,3 %), PVY (11,3 %), TMGMV (6,6 %), BPeMV (4 %), ToMV (2,9 %), PMMoV (1,8 %), AMV (0,7 %), PeVYV (0,15 %), y PVX (0,08 %) (Tabla 4.7). Sin embargo, en esta prospección no se detectaron problemas asociados a los

viroides evaluados (potato spindle tuber viroid: PSTVd y pepper chat fruit viroid: PCFVd). De todas las muestras analizadas, se detectó al menos uno de los virus evaluados en 596 muestras (50,3 %). Los virus más frecuentemente encontrados fueron aquellos transmitidos por insectos vectores como CMV, PVY y TSWV. Además, destacó la presencia de los tobamovirus en el 15,3 % de las muestras, siendo TMGMV el más prevalente, seguido por BPeMV y ToMV. Cabe señalar que esta fue la primera vez que se reportó la presencia de BPeMV en las condiciones agroclimáticas de Euskadi.

En Gipuzkoa, donde predominan las muestras de cultivo al aire libre asociado al cultivo de guindilla de Ibarra, destacó la alta incidencia de CMV con un 28,3 %, indicando un problema significativo con este virus en esta provincia. En cuanto a Bizkaia, se obtuvo una menor incidencia de CMV (10,3 %), pero destacó por tener infecciones más altas de TSWV (16,9 %) y TMGMV (14,1 %). En Araba, aunque solo se analizaron 6 muestras de una sola parcela, solo se obtuvo un positivo para TSWV, lo que dificulta sacar conclusiones sobre la incidencia de virosis en esta provincia.

Considerando el sistema de cultivo, se observa que las muestras de cultivo al aire libre (AL) mostraron la mayor incidencia de CMV, con un 33,4 %. En el sistema de cultivo al aire libre hidropónico (ALH), con solo 15 muestras analizadas, se obtuvo una incidencia del 26,7 % de CMV, sin la presencia de los otros virus evaluados. En cuanto a las parcelas de invernadero de suelo (IS), se destacó una alta incidencia de TSWV (24,2 %), pero una moderada incidencia de CMV (5,8 %). Las parcelas de invernadero hidropónico (IH) también mostraron altas incidencias de TSWV (15,4 %), pero en este sistema destacó principalmente la presencia de TMGMV (23,5 %). En cuanto al cultivo bajo invernadero (IS+IH), destacó la alta incidencia de TSWV (19,8 %) y TMGMV (15,2 %).

Los virus menos frecuentemente detectados fueron PMMoV, que mostró una mayor presencia en invernaderos de Gipuzkoa; AMV, encontrado principalmente en cultivos al aire libre en Bizkaia; PeVYV, con solo 2 muestras positivas; y PVX, con solo una muestra positiva. Estos resultados sugieren que estos virus tuvieron una menor incidencia en las parcelas de pimiento examinadas en 2019.

Al analizar las diferentes combinaciones de infecciones virales detectadas durante la prospección 2019, se observaron hasta 36 combinaciones diferentes de infecciones (Figura 4.4). Aunque las infecciones simples fueron las más comunes (80,6 %), también se detectaron infecciones mixtas de 2 (16,1 %), 3 (2,8 %), 4 (0,3 %) y hasta 5 (0,2 %) virus.

Tabla 4.7. Número y porcentaje de plantas que mostraron positividad a los virus analizados por HM en una prospección a gran escala que se realizó durante la campaña 2019, principalmente muestreando plantas sintomáticas. Los datos están clasificados por territorio y sistema de cultivo.

		Muestras analizadas	CMV	TSWV	PVY	TMGMV	BPeMV	ToMV	PMMoV	AMV	PeVYV	PVX
Total		1199	241 (20,1 %)	172 (14,3 %)	136 (11,3 %)	79 (6,6 %)	48 (4,0 %)	35 (2,9 %)	22 (1,8 %)	8 (0,7 %)	2 (0,15 %)	1 (0,08)
Territorio	Gipuzkoa	638	184 (28,3 %)	77 (12,1 %)	72 (11,3 %)	1 (0,2 %)	33 (5,2 %)	2 (0,3 %)	18 (2,8 %)	2 (0,3 %)	1 (0,1 %)	0
	Bizkaia	555	57 (10,3 %)	94 (16,9 %)	64 (11,5 %)	78 (14,1 %)	15 (2,7 %)	33 (5,3 %)	4 (0,7 %)	6 (1,1 %)	1 (0,1 %)	2 (0,1 %)
	Araba	6	0	1 (16,7 %)	0	0	0	0	0	0	0	0
Sist cultivo	AL	664	222 (33,4 %)	69 (10,4 %)	84 (12,7 %)	0	33 (5,0 %)	2 (0,3 %)	5 (0,8 %)	6 (0,9 %)	1 (0,1 %)	0
	ALH	15	4 (26,7 %)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IS	260	15 (5,8 %)	63 (24,2 %)	16 (6,2 %)	18 (6,9 %)	6 (2,3 %)	7 (2,7 %)	3 (1,2 %)	0	1 (0,4 %)	0
	IH	260	0	40 (15,4 %)	36 (13,8 %)	61 (23,5 %)	9 (3,5 %)	26 (10,0 %)	14 (5,4 %)	2 (0,8 %)	0	1 (0,4 %)
	IT	520	15 (2,9 %)	103 (19,8 %)	52 (10,0 %)	79 (15,2 %)	15 (2,9 %)	33 (6,3 %)	17 (3,3 %)	2 (0,4 %)	0	0

Los sistemas de cultivo evaluados fueron los siguientes: Aire libre (AL), Aire Libre hidropónico (ALH), Invernadero suelo (IS), Invernadero hidropónico (IH) e Invernadero Total (IT).

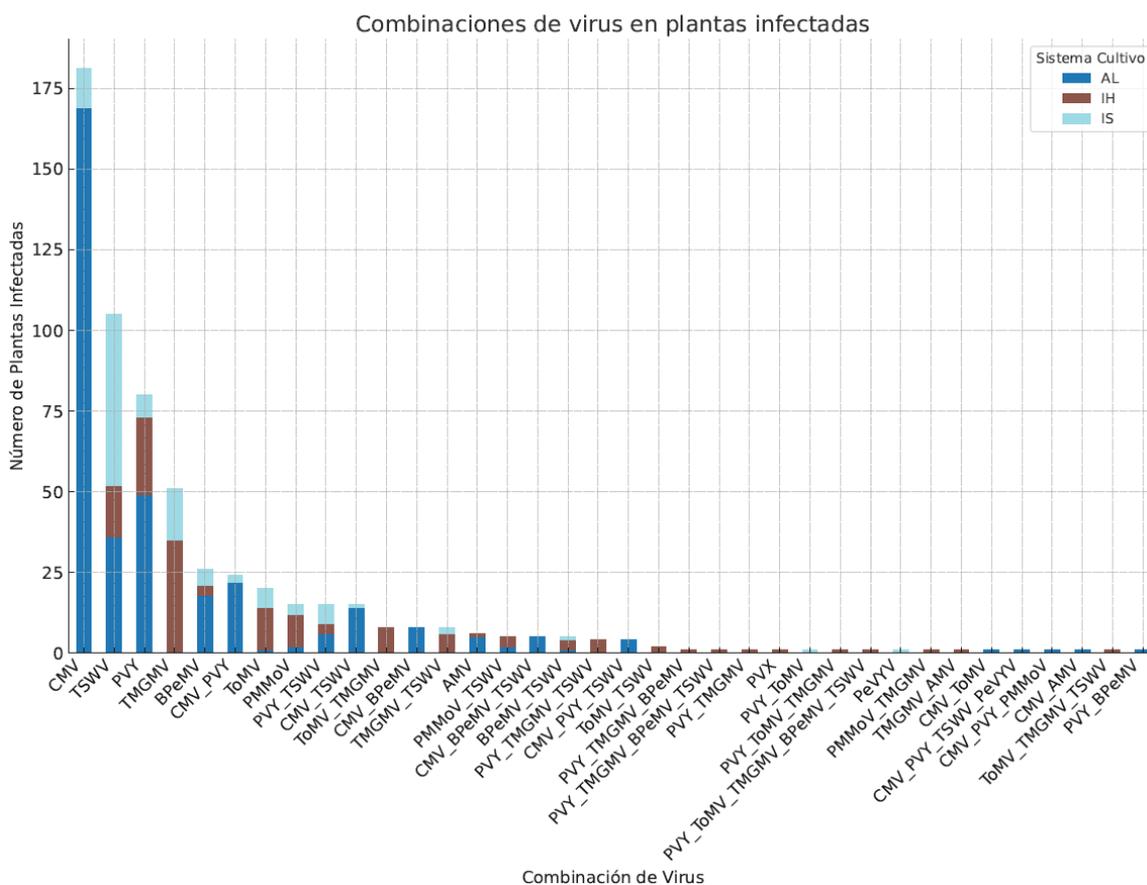


Figura 4.4. Análisis de las diferentes combinaciones de infecciones virales detectadas durante la prospección de 2019 en parcelas de agricultores profesionales. Cada barra se asocia con una combinación específica de virus, ilustrando la relevancia y el impacto de dicha combinación en el contexto estudiado. La segmentación de las barras en distintos colores facilita la distinción entre los sistemas de cultivo evaluados (AL: Aire Libre; IH: Invernadero hidropónico; IS: Invernadero suelo), permitiendo una comprensión visual de cómo se distribuyen las infecciones en cada sistema.

4.1.4. Muestreo de flora silvestre en parcelas de guindilla para ver si actúan como huéspedes de CMV y PVY

Con el objetivo de conocer cuáles eran los principales huéspedes de CMV y PVY en la flora silvestre alrededor de las parcelas de guindilla al aire libre de Gipuzkoa, se muestrearon preferentemente plantas dicotiledóneas que podrían ser huéspedes de estos virus. Se realizaron 2 rondas de muestreo: una antes de iniciar el cultivo (marzo) y otra al final del ciclo de cultivo (septiembre). No se encontraron plantas infectadas por PVY en ninguno de los muestreos realizados. Sin embargo, se identificaron plantas infectadas por CMV en ambos muestreos.

En marzo de 2021, únicamente se encontraron plantas positivas a CMV en 2 de las 4 parcelas evaluadas (Parcelas 2 y 3; Anexo V) y solo el 2,3 % de las 1140 plantas muestreadas resultó infectada por el virus. Las especies que dieron resultado positivo a CMV se pueden observar en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Número de plantas por especie de flora silvestre muestreadas en marzo previo al cultivo de guindilla 2021, que resultaron infectadas por CMV en distintos hábitats (borde o área de cultivo).

Especies por parcela	Borde	Cultivo	Total
Parcela 2 (Ibarra)^a	13/320 (4,3 %)	a	14/320 (4,3 %)
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	5/8 (62,5 %)		5/8 (62,5 %)
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	1/66 (1,5 %)		1/66 (1,5 %)
<i>Lamium purpureum</i> L.	1/9 (11,1 %)		1/9 (11,1 %)
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér ex Aiton	2/44 (4,5 %)		2/44 (4,5 %)
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	3/6 (50 %)		3/6 (50 %)
<i>Veronica persica</i> Poiret	1/57 (1,7 %)		1/57 (1,7 %)
Parcela 3 (Hernani)	3/257 (1,2 %)	10/58 (17,2 %)	13/315 (4,1 %)
<i>Cardamine hirsuta</i> L.		5/5 (100 %)	5/9 (55,5 %)
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.		3/12 (25 %)	3/70 (4,3 %)
<i>Fumaria officinalis</i> L.		1/2 (50 %)	1/2 (50 %)
<i>Geranium dissectum</i> L.	1/12 (8,3 %)		1/12 (8,3 %)
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.		1/2 (50 %)	1/7 (14,3 %)
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	1/8 (12,5 %)		1/17 (5,6 %)
Sin identificar ^b	1/3 (33,3 %)		1/3 (33,3 %)
Total*	16/992 (1,6 %)	10/148 (6,7 %)	26/1140 (2,3 %)

^a En esta parcela solo se muestrearon plantas del borde de la parcela ya que habían pasado el rotavator en la zona de cultivo. ^b Esta planta no fue identificada ni a nivel de género siguiendo las claves de identificación de flora de Euskadi (Aizpuru et al., 1999). *Para obtener los porcentajes totales se han considerado las plantas muestreadas en las 4 parcelas muestreadas.

En la parcela 2 (Ibarra), destacó la presencia de CMV en las especies *Cardamine flexuosa*, *Oenothera rosea* y *Stellaria media*. También se detectó el virus en otras especies como *Cerastium glometatum*, *Lamium purpureum* y *Veronica persica*. Todas estas plantas fueron muestreadas en el borde de la parcela de guindilla.

En la parcela 3 (Hernani), la mayoría de las plantas positivas a CMV se muestrearon en el área de cultivo, próxima al borde del fondo junto al río, donde había habido cultivo de puerro durante la campaña de invierno. *Cardamine hirsuta* y *C. glomeratum* fueron las especies con mayor incidencia de CMV en el área de cultivo. También se encontraron plantas infectadas de *Fumaria officinalis* y *Sonchus asper* en este hábitat. En el borde del cultivo se detectaron 3 plantas positivas a CMV pertenecientes a especies diferentes. Una de las especies quedó sin identificar y las otras fueron *Geranium dissectum* y *S. media*.

En el muestreo realizado al final del ciclo del cultivo (septiembre 2021), se muestrearon 1183 plantas de flora silvestre en las 4 parcelas piloto. Se observaron plantas positivas a CMV en 3 de las 4 parcelas evaluadas (Parcelas 1, 2 y 3). El 3,2 % de las plantas muestreadas dio positividad a CMV. Las especies positivas a CMV se muestran en la Tabla 4.9. Todas las plantas que se analizaron en este muestreo se pueden consultar en el ANEXO VI.

Tabla 4.9. Número de plantas por especie de flora silvestre muestreadas en septiembre 2021 (fin del cultivo guindilla), que resultaron infectadas por CMV en diferentes hábitats (borde o área de cultivo).

Especies por parcela	Borde	Cultivo	Total
Parcela 1 (Ibarra)		14/114 (12,2 %)	14/278 (5%)
<i>Cardamine flexuosa</i> With.		2/5 (40%)	2/5 (40%)
<i>Geranium molle</i>		1/1 (100 %)	1/3 (33,3 %)
<i>Lamium hybridum</i> Vill.		1/1 (100 %)	1/1 (100 %)
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill		10/18 (55,5 %)	10/18 (55,5 %)
Parcela 2 (Ibarra)	8/159 (5 %)	3/136 (2,2 %)	11/295 (3,7 %)
<i>Amaranthus blitum</i> L.	1/36 (2,8 %)		1/78 (1,3 %)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus		1/7 (14,3 %)	1/10 (10 %)
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	1/4 (25 %)		1/4 (25 %)
<i>Euphorbia peplus</i> L.	1/27 (3,7 %)		1/44 (2,3 %)
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.		2/21 (9,5 %)	2/28 (7,1 %)
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér ex Aiton	4/31 (12,9%)		4/36 (11,1 %)
<i>Senecio vulgaris</i> L.	1/7 (14,3 %)		1/9 (11,1 %)
Parcela 3 (Hernani)	6/190 (3,1 %)	7/121 (5,8%)	13/311 (4,2 %)
<i>Amaranthus blitum</i> L.	1/3 (33,3 %)		1/23 (4,3 %)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	1/1 (100 %)	1/4 (25 %)	2/5 (40 %)
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	1/1 (100 %)		1/1 (100 %)
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	1/14 (7,1 %)	1/2 (50 %)	2/16 (12,5 %)
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.		1/48 (2,1 %)	1/67 (1,5 %)
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	2/4 (50 %)	4/25 (16 %)	6/29 (20,7 %)
Total*	14/660 (2,1 %)	24/523 (4,6 %)	38/1183 (3,2 %)

*Para obtener el total se han considerado las plantas muestreadas en las 4 parcelas

En la parcela 1 (Ibarra), todas las muestras positivas a CMV fueron detectadas en la zona de cultivo. La especie que destacó fue *S. media*. También se detectaron otras especies hospedantes del virus como *C. flexuosa*, *Geranium molle* y *Lamium hybridum*.

En la parcela 2 (Ibarra), destacaron como especies hospedantes *Oenothera rosea* en el borde del cultivo y *Galinsoga parviflora* dentro del cultivo. Otras especies como *Amaranthus blitum*, *Capsella bursa-pastoris*, *C. flexuosa*, *Euphorbia peplus* y *Senecio vulgaris* también resultaron hospedantes de CMV.

En la parcela 3 (Hernani), destacó la especie *Stellaria media* como hospedadora de CMV tanto en el borde como en el cultivo. Otras especies como *Amaranthus blitum*, *Capsella bursa-pastoris*, *C. flexuosa*, *C. glomeratum* y *Galinsoga parviflora* también resultaron hospedantes del virus.

En el muestreo realizado en el año 2022 en la parcela 3 (Hernani), se volvieron a detectar plantas de flora silvestre infectadas por CMV antes del cultivo (marzo). En el borde de la parcela, solamente fue detectada una planta de *C. bursa-pastoris* positiva a CMV de las 322 muestras analizadas en este hábitat (0,3 % de las plantas analizadas). Dentro del área de cultivo, se encontraron otras 2 plantas infectadas de las 76 muestras analizadas (2,6 %), pertenecientes a las especies *S. media* y *C. flexuosa*. (Anexo VII).

4.1.5. Discusión

Las prospecciones efectuadas durante las campañas 2014 (empleando DAS-ELISA) y 2019 (mediante Hibridación molecular no radiactiva, HM) en las variedades locales de pimiento cultivadas en Euskadi, destacando el pimiento de Gernika y la guindilla de Ibarra, revelaron una amplia diversidad de infecciones virales de gran relevancia en los cultivos de pimiento a escala mundial, según se documenta en estudios previos (Pernezny et al., 2003; Kenyon et al., 2014). La aplicación de estas técnicas analíticas permitió la detección de una amplia gama de patógenos virales, evidenciando la evolución en la precisión diagnóstica a favor de la HM (Kummert et al., 1995; Boonham et al., 2014). La HM presenta una mayor especificidad que los métodos serológicos (Kummert et al., 1995; Boonham et al., 2014), permitiendo obtener sensibilidades similares o algo superiores a DAS-ELISA (Sánchez-Navarro et al., 1998, Pallás et al., 2018). Sin embargo, ambas técnicas de detección resultaron adecuadas para realizar prospecciones a gran escala y cribar una gran cantidad de material, tal y como confirmaron otros autores (Hull 2009; Rubio et al., 2020). Los ensayos serológicos generalmente ofrecen un método fiable en prospecciones a gran escala para la detección de aquellos virus que se espera que estén en altas concentraciones, aunque pueden conllevar el riesgo de detecciones erróneas debido a su baja especificidad (Maliogka et al., 2019). La HM se ha mostrado como una herramienta de detección muy útil, no solo para determinar la incidencia de virus y viroides en los cultivos de una forma más específica, sino también para examinar la flora silvestre cercana a las parcelas de pimiento como potencial portadora de virus.

Durante la campaña de 2014, la aplicación de la técnica DAS-ELISA permitió la detección de todos los virus evaluados, observándose que las infecciones virales estaban asociadas a los diferentes sistemas de cultivo empleados (Simón et al., 2016). El virus más frecuentemente detectado en la prospección 2014 fue PVY, que tuvo mucha mayor presencia en cultivo al aire libre que en condiciones de invernadero, tal y como se ha descrito previamente (Hiskias et al., 1999; Arli-Sokmen et al., 2005; Soler et al., 2010; Simón et al., 2016; Milošević et al., 2018). Sin embargo, la presencia de tobamovirus fue mayor en condiciones de invernadero que al aire libre. En estos sistemas de cultivo intensivo bajo invernadero, el elevado número de cosechas y labores puede favorecer la propagación de los tobamovirus a través de la transmisión mecánica por las labores de cultivo que realizan los trabajadores (Arogundade et al., 2019). Al igual que con los tobamovirus, la incidencia del TSWV fue mayor en cultivos protegidos. La mayor incidencia de TSWV en este sistema de cultivo podría asociarse a la falta de mallas anti-trips en los invernaderos de Euskadi, así como al modo de transmisión de este virus y al ciclo de vida más rápido del insecto vector en estas condiciones (Pappu, et al., 2009; Rotenberg et al., 2015). Las suaves condiciones climáticas de Euskadi favorecen el desarrollo del vector trips y, con ello, la propagación del virus en los invernaderos. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que confirmaron altas incidencias de TSWV en cultivos de pimiento protegidos ubicados en las regiones de clima más templado de Andalucía (Simón et al., 2016). Según los resultados obtenidos en esta prospección, hubiese sido la primera detección de PaMMV a nivel de España en cultivo de pimiento. Sin embargo, tras verificarlo mediante la técnica de hibridación molecular no radiactiva, se demostró que estas muestras resultaban negativas para este virus, confirmando la reactividad cruzada observada entre los anticuerpos comerciales de algunos tobamovirus (Luria et al., 2018).

Tras la prospección a gran escala realizada por DAS-ELISA en la campaña 2014, en 2019 se realizó una prospección similar, pero esta vez analizando las muestras con sondas específicas de HM. Se llegaron a detectar hasta 10 virus de un total de 21 virus analizados. Además, se evaluaron 2 viroides mediante esta técnica, no observándose problemas asociados a estos patógenos en el cultivo de pimiento de la zona estudiada. Hoy en día, no hay constancia de infecciones por viroides en cultivos de pimiento de Euskadi. Si bien CMV no se incluyó en el análisis de la prospección de 2014 mediante DAS-ELISA, se reveló como el patógeno más importante en la campaña 2019, mostrando una incidencia alarmante, especialmente en cultivos al aire libre, atribuible posiblemente a su forma de transmisión no persistente por áfidos (Moury y Verdin 2012). En muestreos realizados en los años 2017 y 2018 también se observaron incidencias importantes de este virus. También destacaron otros virus como TSWV y PVY por su alta incidencia en esa campaña. Mientras que TSWV tuvo una presencia notable en cultivos bajo invernadero (tal como ocurrió en 2014), PVY afectó tanto a cultivos en invernadero como al aire libre, mostrando un comportamiento diferente al de los resultados de 2014. En general, se observó que los tobamovirus presentaron mayores tasas de incidencia en cultivos bajo invernadero, tal y como se evidenció en 2014, con la excepción del BPeMV, que mostró una mayor presencia en cultivo al aire libre. En este estudio, el tobamovirus de mayor relevancia resultó ser TMGMV, al igual que en la anterior prospección. De manera similar a lo ocurrido con el ToMV, las incidencias más altas de este virus se detectaron en cultivos hidropónicos. Esto sugiere que los tobamovirus se propagan de manera muy efectiva en este sistema de cultivo, probablemente a través de la solución nutritiva recirculada (Pategas, 1989; Pares et al., 1992). En muestras preferentemente sintomáticas analizadas por DAS-ELISA en 2017, los tobamovirus PMMoV (22,1 %), ToMV (13,7 %) y TMGMV (11,8 %) mostraron incidencias significativas en las parcelas muestreadas. Sin embargo, en las muestras analizadas en 2018 destacó la incidencia de TMGMV sobre el resto de tobamovirus.

Es importante señalar que, aunque los análisis de BPeMV mediante HM mostraron resultados positivos claros en 2019, éstos fueron positivos débiles y poco intensos indicando, tanto la presencia de este virus en bajas concentraciones como la de otro tobamovirus con una secuencia genética muy similar, lo cual resultaría en una hibridación de secuencias subóptima y, por ende, en señales más tenues, tal y como observaron en virus del género potyvirus (Sánchez-Navarro et al., 2018). En otro estudio también se reportó hibridación cruzada entre diferentes fabavirus al aplicar una sonda específica (Ferriol et al., 2015). Por ello, convendría confirmar los resultados positivos obtenidos para BPeMV con otras técnicas moleculares, tal y como se ha abordado en las secciones 3.4 y 4.3 de la presente Tesis. En 2019 se volvió a confirmar la ausencia del tobamovirus PaMMV, pudiendo haberse dado la reacción cruzada con algún otro tobamovirus en la prospección 2014 por DAS-ELISA (Luria et al., 2018; Maliogka et al., 2019). Curiosamente tampoco fue detectado TMV en esta prospección indicando también otra posible reacción cruzada por DAS-ELISA con otros tobamovirus en 2014.

Respecto a los virus que se detectaron en menor cuantía en 2019 (PVX, PeVYV, AMV), sería interesante seguir monitoreando la presencia de estos virus en las siguientes campañas para poder observar su evolución en los cultivos. Especial atención merece el polerovirus PeVYV (Murakami et al., 2011), data su transmisión de forma persistente (circulativa) no propagativa por áfidos como *Myzus persicae* o *Aphis gossypii* (Feres y Raccah, 2015; Dombrovsky et al.,

2010), que está causando grandes pérdidas en cultivos del sureste de España desde 2012 (Villanueva et al., 2013). Sería un virus para tener muy en cuenta en las siguientes campañas.

Es importante señalar que, en ambas prospecciones realizadas, se observaron plantas con síntomas de virosis que resultaron negativas a los virus evaluados en cada prospección. Estos síntomas podrían deberse a la presencia de otros virus descritos en el cultivo de pimiento, y que no fueron evaluados en los estudios realizados (Svoboda y Svobodová-Leisová, 2012), o incluso a la posible existencia de nuevos virus que aún no se han caracterizado (Roossinck et al., 2015). También es relevante considerar que estos síntomas podrían estar causados por otros estreses, tanto bióticos como abióticos (Svoboda y Svobodová-Leisová, 2012). Por otro lado, la detección de virus en plantas asintomáticas complica la implementación de estrategias efectivas de control en los cultivos (Nicaise, 2014; Anikina et al., 2023).

La detección de infecciones virales múltiples, de hasta cinco virus, en ambas prospecciones es un hallazgo significativo. Estas coinfecciones pueden tener efectos sinérgicos que resulten, a menudo, en enfermedades más devastadoras (Martin et al., 2004; Alcaide et al., 2020; Xu et al., 2022). Estas interacciones pueden provocar una mayor acumulación viral y/o mayor movimiento de los virus en las plantas, tal y como se determinó en estudios con cucurbitáceas, boniato y pimiento (Zhang et al., 2001; Wang et al., 2002; Arli-Sokmen et al., 2005; Murphy y Bowen, 2006; Untiveros et al., 2007). A pesar del elevado porcentaje de infecciones mixtas observadas, no podemos descartar que sea consecuencia del enfoque del muestreo, en el cual se dio prioridad a las hojas sintomáticas, las cuales pueden ser consecuencia de los efectos sinérgicos de las coinfecciones. Las infecciones mixtas de dos virus, que fueron las coinfecciones predominantes en este estudio, también permiten la recombinación, que además de la mutación, es otra fuente de variación genética y aparición de nuevos virus o cepas en plantas (Chare y Holmes, 2006; Weng et al., 2007; Davino et al., 2012; Lian et al., 2013; Ferriol et al., 2014).

Las infecciones mixtas son bastante comunes en la naturaleza y ocurren en áreas donde hay diversidad de vectores como trips y pulgones, o donde un solo vector puede transmitir diferentes especies de virus (Arli-Sokmen et al., 2005). En plantas de *Capsicum* spp. han sido identificados casos de infecciones múltiples virales tras aplicar secuenciación masiva de RNA (Jo et al., 2017; Safari y Roossinck, 2018; Tomašechová et al., 2020). Los inóculos primarios de los tobamovirus, que pueden encontrarse en la materia orgánica del sustrato o del suelo, o incluso en semillas infectadas (Kenyon et al., 2014), también pueden contribuir a estas coinfecciones. En el estudio realizado en 2014, el 68 % de las coinfecciones se encontraron en condiciones de invernadero y el 70 % de estas estuvieron asociados con TMGMV. De manera similar, el 93 % de las coinfecciones se asociaron con PVY en condiciones al aire libre. Aunque en la prospección de 2019 el 80,6 % de las infecciones detectadas fueron simples, se volvieron a detectar infecciones virales múltiples (117 muestras; 19,4 %) y todas asociadas con CMV, PVY o algún tobamovirus. En este estudio, solo 14 de las muestras coinfectadas (12 %) resultaron infecciones mixtas entre dos o más tobamovirus. Este resultado es notablemente diferente al número de infecciones mixtas entre tobamovirus identificadas respecto al total de coinfecciones en el estudio de 2014 mediante DAS-ELISA (53/98; 54 %), lo cual podría indicar la detección de falsos positivos por reacción cruzada en la detección de tobamovirus mediante DAS-ELISA (Pumrachat y Hongprayoon, 2021). Esta situación plantea dudas sobre la

especificidad de este método de detección, tal como se ha evidenciado en investigaciones anteriores utilizando análisis serológicos (Frison et al., 1992; Souiri et al., 2014). Además, la reactividad cruzada en la detección de ToMV con el uso de anticuerpos policlonales, fue observada por varios autores e instituciones (Sui et al., 2018; ISF, 2019; Maliogka et al., 2019), así como por los propios productores de kits comerciales de diagnóstico ELISA y de anticuerpos para ToMV (Mrkvová et al., 2022). Mrkvová et al. (2022) observaron en sus propios ensayos que los anticuerpos policlonales de ToMV mostraban reacciones cruzadas con TMV y PMMoV.

Las altas incidencias de virus transmitidos por insectos, como CMV y PVY en parcelas al aire libre, así como TSWV en parcelas protegidas, fueron evidentes en ambas prospecciones. Los tres virus mencionados suelen tener un elevado número de especies de flora silvestre que actúan como reservorios, permaneciendo estos en los márgenes de los cultivos entre campañas (Kazinczi et al., 2004; Janzac et al., 2008; Pappu, 2008; Palukaitis y García-Arenal 2019) y complicando el control de estas enfermedades. En el contexto de nuestro estudio, el clima templado y húmedo del área de estudio es muy adecuado para el desarrollo de algunas especies de flora silvestre, que pueden convertirse en reservorios de este virus (Hobbs et al., 2000; Rodríguez-Alvarado et al., 2002; Massumi et al., 2009). En los muestreos realizados en la flora silvestre en 4 parcelas al aire libre de guindilla de Ibarra el año 2021, en dos de las parcelas se detectó el virus CMV antes del trasplante del cultivo (muestreo marzo, 2,3 % de positividad de 1140 plantas analizadas), indicando que el virus ya estaba en la parcela antes del momento de trasplante del cultivo. Al final del cultivo (septiembre) se repitió el muestreo en las mismas parcelas, detectándose flora silvestre infectada por CMV en 3 de las 4 parcelas (3,2 % de positividad de las 1183 plantas analizadas). Sin embargo, al analizar estas mismas plantas para PVY, el virus no fue detectado en ninguno de los muestreos, dejando abierta la posible fuente de inóculo primario de este virus. Otros autores han demostrado (Svoboda y Svobodová 2012) que en cultivo al aire libre de pimiento, los pulgones alados migran desde la flora silvestre hasta el cultivo, contribuyendo a la introducción de este virus de transmisión no persistente en los cultivos. Esto resalta la importancia de proteger los cultivos de pimiento contra los pulgones después del trasplante en campo. Este virus (PVY) rara vez causó daños en condiciones de invernadero en 2014, observando resultados similares a los obtenidos con los virus transmitidos por pulgones de forma no persistente en una prospección realizada previamente en Andalucía (Simón et al., 2016). Sin embargo, en 2019 sí se observaron mayores daños bajo condiciones de invernadero.

Es importante destacar que CMV es conocido por su amplia gama de huéspedes, con más de 1200 especies reconocidas (Palukaitis y García-Arenal 2019). Este virus a menudo se transmite a los cultivos a través de áfidos vectores, provenientes de la flora silvestre, tal y como se ha documentado en otros estudios (Palukaitis y García-Arenal 2003; Moury y Verdin 2012). En este estudio se detectaron hasta 18 especies de flora silvestre alrededor de las parcelas como hospedadoras del virus. Las principales especies hospedadoras identificadas fueron: *Cardamine flexuosa*, *C. hirsuta*, *Cerastium glomeratum*, *Oenothera rosea* y *Stellaria media*. Además, se han encontrado algunas especies huéspedes de CMV que no habían sido reconocidas como tal hasta el momento: *C. flexuosa*, *O. rosea*, *Geranium molle* y *Lamium hybridum* (Palukaitis y García-Arenal 2019).

El pimiento de Gernika y la guindilla de Ibarra, dos variedades cosechadas principalmente cuando los frutos aún están inmaduros, requieren numerosas cosechas por temporada durante su cultivo. Este aspecto cobra particular importancia en ambientes de invernadero, donde la densidad de cultivo más alta y condiciones térmicas óptimas no solo favorecen el crecimiento de las plantas, sino también la replicación de virus (Liu et al., 2014). Estas condiciones facilitan la dispersión de los tobamovirus entre las plantas, elevando así el riesgo de epidemias. Los tobamovirus tienen la capacidad de transmitirse durante el proceso de trasplante de las plántulas y mediante las actividades agrícolas posteriores a las infecciones primarias, las cuales pueden originarse a partir de semillas infectadas (Arli-Sokmen et al., 2005) o por residuos del cultivo anterior que estaban infectados (Kenyon et al., 2014). La tasa de infección relativamente alta por tobamovirus en ambas prospecciones, constata la necesidad de reducir el riesgo de transmisión de estos virus por semilla. Tras los resultados obtenidos, se han tenido que implementar sistemas de certificación para la producción de semillas libres de virus de las variedades “Derio” e “Ibarroria”. Este proceso reduce la probabilidad de introducir inóculo primario en las parcelas de producción a partir de semillas. Así, la desinfección de semillas con termoterapia (tomate) o con productos químicos oxidantes como el fosfato trisódico (pimiento) debería ser una de las medidas obligatorias para producir plantas libres de tobamovirus (Córdoba et al., 2007; Herrera et al., 2009). Sin embargo, algunos agricultores todavía utilizan semillas de producción propia no desinfectadas que pueden provocar epidemias en los cultivos (Soler et al., 2010). Además, como se ha mencionado anteriormente, la solución nutritiva de los cultivos hidropónicos puede contribuir a la infección de tobamovirus como TMGMV y ToMV de forma muy eficiente (Pategas 1989; Pares et al., 1992).

El estado actual de las infecciones virales en la zona estudiada y el uso de variedades locales sin genes de resistencia a virus podrían provocar epidemias en los cultivos de estas variedades de pimientos locales. Por ello, será muy importante para el futuro de estos cultivos de carácter tradicional, ir introduciendo resistencias a los principales virus que afectan el cultivo en la zona de estudio.

El uso de variedades resistentes a tobamovirus podría ser un método eficaz para controlar estas enfermedades virales (Choi et al., 2005) en las variedades locales de pimiento antes mencionadas. En el bioensayo de inoculación realizado en 2014 para determinar el patotipo de PMMoV presente en el cultivo de pimiento de Euskadi, todas las cepas de PMMoV evaluadas pertenecieron al patotipo P1.2. Por tanto, sería suficiente introducir el gen L3 en las variedades locales cultivadas en esta zona para conseguir resistencia a todas las cepas de tobamovirus muestreadas (Boukema 1982, 1984). En dos de los 36 aislados de PMMoV que fueron inoculados en el cultivar con el gen de resistencia L3 (cv. Padua), se produjo una infección sistémica transitoria en sólo una de las 5 plantas inoculadas. Sin embargo, esta infección estuvo acompañada por síntomas de resistencia al virus (HR) en hojas inoculadas. La infección sistémica transitoria fue confirmada mediante ELISA en un primer análisis a 15 DDI, pero no en un segundo análisis a los 30 DDI. Estos hechos indicarían una multiplicación inicial del virus en las plantas inoculadas que finalmente fue controlada por el gen de resistencia L3. El estado fenológico temprano de la inoculación y la alta carga viral del inóculo pueden provocar que el virus pueda translocarse a tejidos alejados del punto de inoculación, provocando una respuesta de hipersensibilidad sistémica (HRS) (Boukema 1984; Culver et al., 1991; Kim et al.,

1997; Dinesh-Kumar et al., 2000; Hajimorad et al., 2003). Este mecanismo puede deberse a una respuesta bioquímica y fisiológica tardía asociada a la HR (Dinesh-Kumar et al., 2000).

En 2015 se inició un programa de mejora genética en estas variedades locales aplicando la técnica de retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares, con el objetivo de introducir genes de resistencia a los tobamovirus en pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra (Ojinaga et al., 2018; secciones 3.5 y 4.4 de esta Tesis). Para garantizar que la resistencia genética introducida sea duradera y no se vea superada por estos virus, es importante combinar la utilización de variedades resistentes (Tomita et al., 2008, 2011) junto con otras medidas de control, como son aumentar las medidas de higiene para reducir la carga viral y la producir semillas certificadas libres de virus.

Dada la alarmante situación en las parcelas al aire libre de guindilla de Ibarra, con elevadas incidencias de PVY en 2014 y de CMV en 2019, y en las parcelas de invernadero afectadas por TSWV en ambas prospecciones, resulta pertinente considerar la incorporación de genes de resistencia no solo contra los tobamovirus mencionados previamente, sino también contra estos virus que han generado impactos negativos significativos en los cultivos de pimientos en Euskadi (Jahn et al., 2000; Janzac et al., 2008; Choi et al., 2018). Por otro lado, también sería conveniente disponer de más información de carácter epidemiológico para establecer estrategias de control. En las futuras campañas sería interesante conocer, además de las incidencias de estos virus a nivel de cultivo, cuáles son las principales fuentes primarias del inóculo (semilla, plantel, flora silvestre, etc) (Ali y Kobayashi 2010; Arogundade et al., 2019; Yoon et al., 2019). Por otro lado, también sería muy valioso conocer la dinámica de vuelos de los pulgones alados, que son los principales transmisores de PVY y CMV, e identificar qué pulgones son los que principalmente vuelan sobre los campos de guindilla (Pérez et al., 2003). Esta información podría influir en la decisión sobre la época de trasplante de cultivo y ayudar a establecer estrategias de control biológico con parasitoides de pulgones y arbustos que no sean huéspedes de virus, favoreciendo la fauna auxiliar (Sánchez-Balibrea et al., 2020). Los resultados obtenidos subrayan la importancia de mejorar el control de los insectos vectores en la medida de lo posible (Sánchez et al., 1997; Calvo et al., 2012), de eliminar fuentes de inóculo primarias como la flora silvestre que se localiza en los bordes y en la parcelas (Kazinczi et al., 2004; Ormeño et al., 2004), así como la necesidad de incorporar genes de resistencia a estos virus en las variedades locales susceptibles (Caranta et al., 1999; Kang et al., 2010; Di Dato et al., 2015; Choi et al., 2018).

En cuanto al sistema de cultivo y las estrategias de control de virus bajo invernaderos de suelo, una de las soluciones para inactivar los tobamovirus sería realizar una biodesinfección con enmiendas orgánicas o compostar los residuos de cultivos para el control de estos virus y otros patógenos del suelo (Aguilar et al., 2010; Alfaro et al., 2013; Ojinaga et al., 2020). En invernaderos hidropónicos, la carga de tobamovirus podría reducirse cambiando los sacos de sustrato, eliminando los residuos de cultivos infectados y desinfectando el sistema de riego mediante tratamientos térmicos, radiación ultravioleta y ozonización (Runia 1994; Mehle y Ravnikar 2012). Además, las altas tasas de infección por TSWV en condiciones de invernadero podrían reducirse aplicando mallas antitrips y combatiendo al insecto vector mediante control biológico (Sánchez et al., 1997; Calvo et al., 2012). Finalmente, en el caso de virus transmitidos por pulgones en cultivos al aire libre, el control de los insectos vectores, de la flora silvestre

reservorio de virus y la modificación de fechas de siembra y trasplante a momentos más adecuados podrían contribuir en gran medida a reducir el riesgo de epidemias (Montasser et al., 1998; Arli-Sokmen et al., 2005; Soler et al., 2010).

4.2. Validación polisondas de hibridación molecular para la detección múltiple de virus en cultivos de pimiento

4.2.1. Límite de detección de las sondas individuales

El límite de detección observado para todas las sondas individuales de HM osciló entre 0,06 y 1,6 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de los transcritos complementarios diseñados en laboratorio (Figura 4.5). Todas las sondas se comportaron de manera específica, sin presentar positivos cruzados entre los diferentes virus analizados ni entre el RNA total extraído de tejido sano.

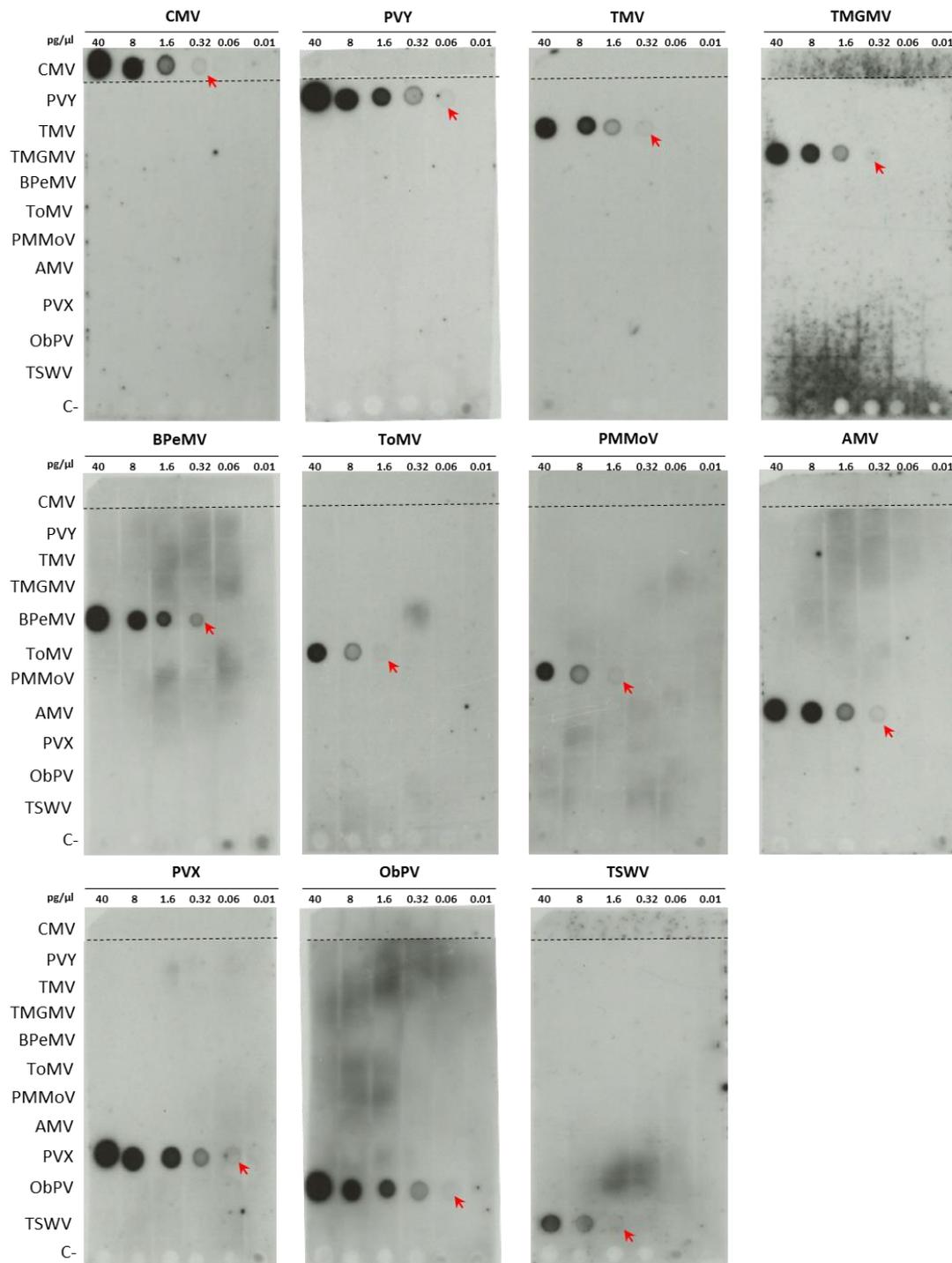


Figura 4.5. Determinación del límite de detección para hibridación molecular no radioactiva utilizando

sondas individuales. Se aplicaron cantidades conocidas de transcritos no marcados complementarios a cada sonda en las membranas de nailon. Réplicas de la misma membrana, portando las mismas diluciones virales, se hibridaron utilizando las ribosondas individuales (nombre de la sonda del virus). Se aplicaron extractos de tejido sano en la última fila de la membrana (C-: control negativo). La hibridación se realizó a 68 °C. La detección se llevó a cabo después de una exposición de 60 minutos con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche Diagnostic, S.L.U.). Se compusieron y editaron varios films para garantizar que todos los virus aparezcan claramente en el mismo orden en la imagen. La parte editada se indica con una línea de puntos. Los números en la parte superior de la imagen indican la concentración de los controles positivos en picogramos por microlitro ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$). Las flechas rojas indican la última dilución positiva detectada por cada sonda individual.

4.2.2. Límite de detección de las polisondas respecto a las sondas individuales

Tras confirmar la sensibilidad y especificidad de las sondas individuales, se seleccionaron algunos virus para análisis adicionales en función de la disponibilidad de tejido de campo infectado y antisueros comerciales para las pruebas DAS-ELISA. Los virus seleccionados fueron CMV, PMMoV, PVY, ToMV y TMGMV, que infectaron significativamente a los cultivos de pimiento de Euskadi (Sección 4.1 de esta Tesis) durante la campaña de 2019. Además, también se analizó un virus de la polisonda poli9, pepper vein yellows virus (PeVYV) que fue detectado en 2 muestras de la prospección mencionada.

Las polisondas detectaron todos los virus probados que estaban incorporados en la secuencia de cada una de ellas (Figura 4.6). Es decir, poly9 detectó PeVYV, poly12 detectó todos los virus probados excepto PeVYV y poly21 detectó todos los virus probados. En este caso, el límite de detección observado para las sondas individuales osciló entre 0,06 y 0,32 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ de transcritos complementarios. Además, en esta prueba tampoco se observó hibridación cruzada entre transcritos complementarios no relacionadas, lo que confirmaba la especificidad tanto de las sondas individuales como de las polisondas evaluadas.

La sensibilidad de la técnica no se vio afectada cuando se utilizó poli9, detectando concentraciones de hasta 0,32 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$. Sin embargo, la sensibilidad se redujo entre 5 y 25 veces cuando se utilizaron las polisondas poli12 y poli21, respectivamente. Con poli12, se detectaron concentraciones de RNA viral de hasta 1,6 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$, mientras que con poli21, las concentraciones oscilaron entre 1,6 y 8 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$. Por lo tanto, el límite de detección disminuyó ligeramente cuando las membranas se hibridaron con las dos polisondas más largas (poli12 y poli21) a pesar de bajar la temperatura de hibridación.

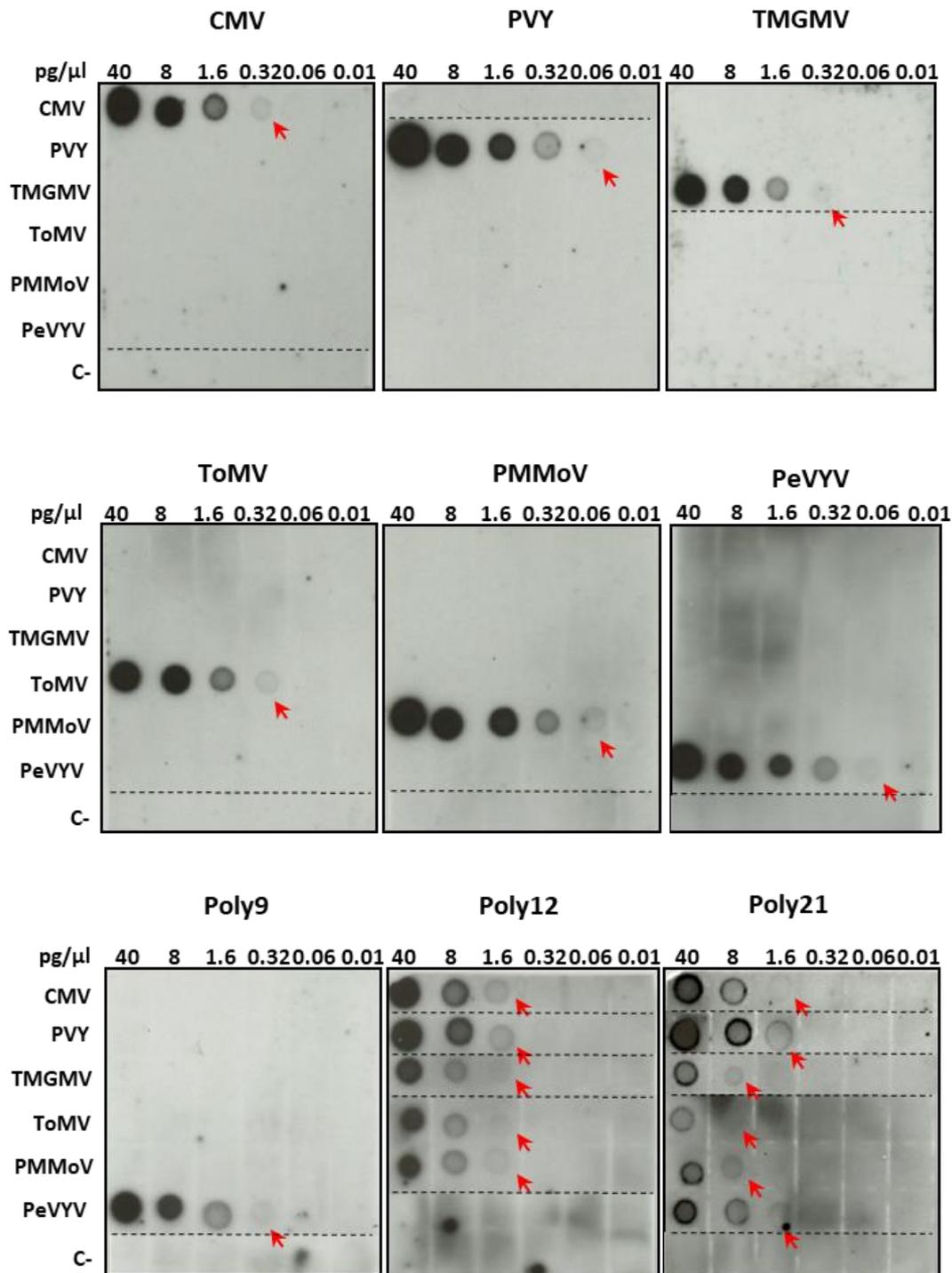


Figura 4.6. Determinación del límite de detección de hibridación molecular no radioactiva mediante sondas individuales y polisondas (poli9, poli12 y poli21). Se aplicaron cantidades conocidas de transcritos no marcados complementarios a cada sonda en membranas de nailon. Réplicas de la misma membrana, portando las mismas diluciones virales, se hibridaron utilizando las ribosondas individuales (nombre de la sonda del virus) o las polisondas correspondientes con capacidad para detectar 9 virus (poli9), 12 virus (poli12) o 21 virus (poli21). Se aplicaron extractos de tejido sano en la última fila de la membrana (C-: control negativo). La detección se llevó a cabo después de una exposición de 60 minutos con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche Diagnostic, S.L.U.). Se compusieron y editaron varios films para garantizar que todos los virus aparezcan claramente en el mismo orden en la imagen. La parte editada se indica con una línea de puntos. Los números en la parte superior de la imagen indican la concentración de los controles positivos en picogramos por microlitro ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$). Las flechas rojas indican la última dilución positiva detectada por cada sonda individual.

4.2.3. Sensibilidad de sondas individuales y polisondas con muestras infectadas de campo

El análisis de extractos de muestras de campo infectadas y sus diluciones seriadas puso de manifiesto que tanto la HM, utilizando sondas individuales hibridadas a 68 °C, como la técnica DAS-ELISA presentaron límites de detección similares, detectándose hasta 5 diluciones en algunas muestras infectadas (Figura 4.6 y Tabla 4.10). Sin embargo, al utilizar las polisondas (hibridadas a 50 °C), se observó una reducción significativa en la sensibilidad de la técnica que varió entre 5 y 25 veces al utilizar las polisondas poli12 y poli21, respectivamente. Estos resultados coincidieron con los obtenidos al analizar los controles positivos sintetizados en laboratorio. No obstante, también se observó que los límites de detección de CMV y ToMV fueron mayores cuando se utilizó poli21 en comparación con poli12. Además, se destacó la notable pérdida de sensibilidad de poli21 al detectar PVY, con una reducción de entre 125 y 25 veces en comparación con las sondas individuales y con poli12, respectivamente (Tabla 4.10).

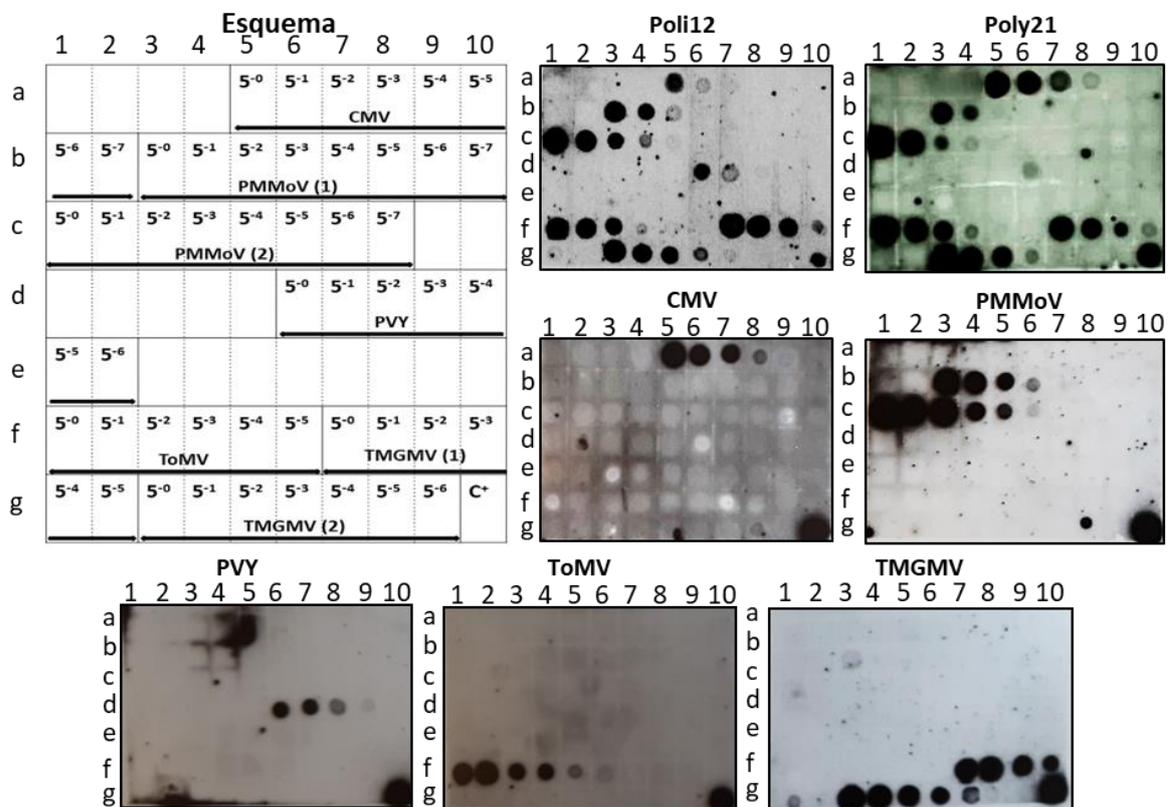


Figura 4.7. Determinación del límite de detección de hibridación molecular no radioactiva utilizando sondas individuales o polisondas (poli12 y poli21). Análisis de muestras de pimiento de campo infectadas por un único virus, así como sus diluciones seriadas (1:5), mediante la técnica de hibridación molecular (HM) no radioactiva utilizando sondas individuales y polisondas. La localización de las diluciones seriadas del virus correspondiente se indica en el croquis. Réplicas de la misma membrana, con las mismas diluciones seriadas, fueron analizadas utilizando la ribosondas individuales (sondas con el nombre del virus hibridadas a 68 °C) o polisondas (poli12 o poli21 hibridadas a 50 °C). Para cada virus analizado se aplicó un control positivo correspondiente a transcritos no marcados complementarios a cada sonda (40 pg μl⁻¹) en la casilla g10 de cada membrana. Para poli12 y poli21, el control positivo corresponde a transcritos de CMV no marcados. En todos los casos, las películas se revelaron después de una exposición de 30 minutos tras aplicar el sustrato CDP-STAR.

Tabla 4.10. Determinación del límite de detección de la técnica DAS-ELISA. Resumen comparativo de los resultados obtenidos mediante hibridación molecular (Figura 3) y DAS-ELISA, tras analizar el mismo tejido infectado de pimiento junto con sus diluciones seriadas.

Virus analizados Técnica			Diluciones									
			5 ⁰	5 ⁻¹	5 ⁻²	5 ⁻³	5 ⁻⁴	5 ⁻⁵	5 ⁻⁶	5 ⁻⁷		
ToMV	DAS-ELISA	Abs	1,404	1,563	1,517	0,946	0,383	0,115	nr	nr		
			1,230	1,463	1,578	0,926	0,392	0,135	nr	nr		
		Abs Media	1,317	1,513	1,548	0,936	0,388	0,125				
		Punto corte placa	0,082									
	HM		+	+	+	+	+	+				
	Poli12		+	+	+	+	-	-				
Poli21		+	+	+	+	+	-					
TMGMV (1)	DAS-ELISA	Abs	0,973	1,312	1,410	0,933	0,450	0,189	nr	nr		
			0,671	1,272	1,406	0,956	0,441	0,201	nr	nr		
		Abs Media	0,822	1,292	1,408	0,945	0,446	0,195				
		Punto corte placa	0,178									
	HM		+	+	+	+	+	+				
	Poli12		+	+	+	+	+	-				
Poli21		+	+	+	+	-	-					
TMGMV (2)	DAS-ELISA	Abs	0,913	1,209	1,095	0,630	0,228	0,086	nr	nr		
			0,905	1,274	1,198	0,648	0,246	0,115	nr	nr		
		Abs Media	0,909	1,242	1,147	0,639	0,237	0,101				
		Punto corte placa	0,178									
	HM		+	+	+	+	+	+	-			
	Poli12		+	+	+	+	+	-	-			
Poli21		+	+	+	+	-	-	-				
PMMoV (1)	DAS-ELISA	Abs	4,026	3,516	2,261	1,087	0,376	0,082	nr	nr		
			4,013	3,517	2,536	1,201	0,405	0,139	nr	nr		
		Abs Media	4,020	3,517	2,399	1,144	0,391	0,111				
		Punto corte placa	0,030									
	HM		+	+	+	+	+	-	-	-		
	Poli12		+	+	+	-	-	-	-	-		
Poli21		+	+	-	-	-	-	-	-			
PMMoV (2)	DAS-ELISA	Abs	4,008	4,008	4,008	2,148	0,911	0,295	nr	nr		
			3,426	3,426	3,426	2,136	0,864	0,286	nr	nr		
		Abs Media	3,717	3,717	3,717	2,142	0,888	0,291				
		Punto corte placa	0,030									
	HM		+	+	+	+	+	+	-	-		
	Poli12		+	+	+	+	+	-	-	-		
Poli21		+	+	+	+	-	-	-	-			
CMV	DAS-ELISA	Abs	0,947	1,426	1,165	1,861	0,937	0,142	nr	nr		
			0,720	1,249	1,215	1,67	1,001	0,164	nr	nr		
		Abs Media	0,834	1,338	1,190	1,766	0,969	0,153				
		Punto corte placa	0,134									
	HM		+	+	+	+	+	-	-	-		
	Poli12		+	+	+	-	-	-	-	-		
Poli21		+	+	+	+	-	-	-	-			
PVY	DAS-ELISA	Abs	0,162	0,068	0,072	0,032	0,015	0,018	nr	nr		
			0,199	0,071	0,071	0,033	0,016	0,019	nr	nr		
		Abs Media	0,181	0,070	0,072	0,033	0,016	0,019				
		Punto corte placa	0,018									
	HM		+	+	+	+	-	-	-			
	Poli12		+	+	+	-	-	-	-			
Poli21		+	-	-	-	-	-	-				

4.2.4. Análisis de muestras de campo con sondas individuales, polisondas y DAS-ELISA

Tras determinar el límite de detección de la técnica de HM con controles positivos sintéticos y/o tejido infectado, se procedió a realizar una comparación directa entre HM (sondas individuales y polisondas) y DAS-ELISA, mediante el análisis de 85 muestras de campo. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que el 96 % de las muestras de campo positivas (48/50) detectadas por HM aplicando sondas individuales también se detectaron usando poli12 y poli21. No se detectaron muestras infectadas con poli9 (datos no mostrados). La reducción de 5 °C en la temperatura de hibridación con poli12 (de 50 °C a 45 °C) dio como resultado una señal de hibridación más robusta, sin que se observaran señales inespecíficas en el tejido sano. Al aplicar esta reducción de temperatura de hibridación, se pudieron detectar claramente algunas muestras infectadas (Figura 4.8 y Tabla 4.11; muestras d5, d7 y e3), cuya señal a 50 °C era dudosa.

Los resultados obtenidos para las mismas muestras por HM y DAS-ELISA, en la mayoría de los casos, mostraron concordancia. La técnica DAS-ELISA se aplicó a 62 de las 85 muestras, debido al espacio limitado en cada placa ELISA para cada virus, aplicándose solo una placa por virus. Por un lado, hubo algunas muestras (d8, d9, g1 y g2) que fueron detectadas por la técnica DAS-ELISA, pero no por HM, ni con sondas individuales ni con polisondas. Por otro lado, también se encontraron dos muestras (h1 y h4) que fueron identificadas mediante DAS-ELISA como positivas para PVY y PMMoV, respectivamente (absorbancia baja). A pesar de que estas muestras fueron detectadas por las polisondas, posiblemente debido a la coinfección con CMV, los resultados obtenidos con las sondas individuales de PVY y PMMoV fueron negativos. Otra situación peculiar se observó con la muestra b3, que resultó positiva para ToMV mediante DAS-ELISA con un alto valor de absorbancia. Sin embargo, no fue detectada por Poli12 en ninguna de las temperaturas de hibridación, pero sí por poli21 (a 50 °C de hibridación). Por el contrario, también encontramos una muestra (a5) que resultó positiva para HM (individual y polisondas) pero resultó negativa mediante la técnica DAS-ELISA.

Finalmente, al comparar los resultados positivos de las muestras de DAS-ELISA con las sondas individuales, poli12 y poli21, encontramos una coincidencia del 89,6 % (43 de 48), 89,6 % (43 de 48) y 87,5 % (42 de 48) respectivamente (Tabla 4.11). Se detectaron por DAS-ELISA dos muestras positivas a CMV (d8 y d9) y otras dos a ToMV (g1 y g2) que no fueron detectadas ni por sondas individuales ni por polisondas. Hubo otra muestra positiva a CMV por DAS-ELISA que solamente fue detectada por la sonda individual de HM y no por polisondas (g9). También se detectó un caso de positivo a PVY por DAS-ELISA que no se detectó por polisondas a 50 °C, pero sí por poli12 a 45 °C y por la sonda individual (e3). Finalmente hubo otra muestra (b8) que dio una señal cercana del límite de detección por DAS-ELISA, pero resultó negativa mediante la sonda individual de HM y positiva con polisondas posiblemente debido a una coinfección con ToMV.

Cuando se compararon poli12 y poli21, poli21 detectó el 90 % (47 de 52) y el 92 % (47 de 51) de las muestras positivas identificadas por poli12 hibridadas a 45 °C o 50 °C, respectivamente. Sólo una muestra, infectada con ToMV (b3), fue detectada con poli21, pero no con poli12.

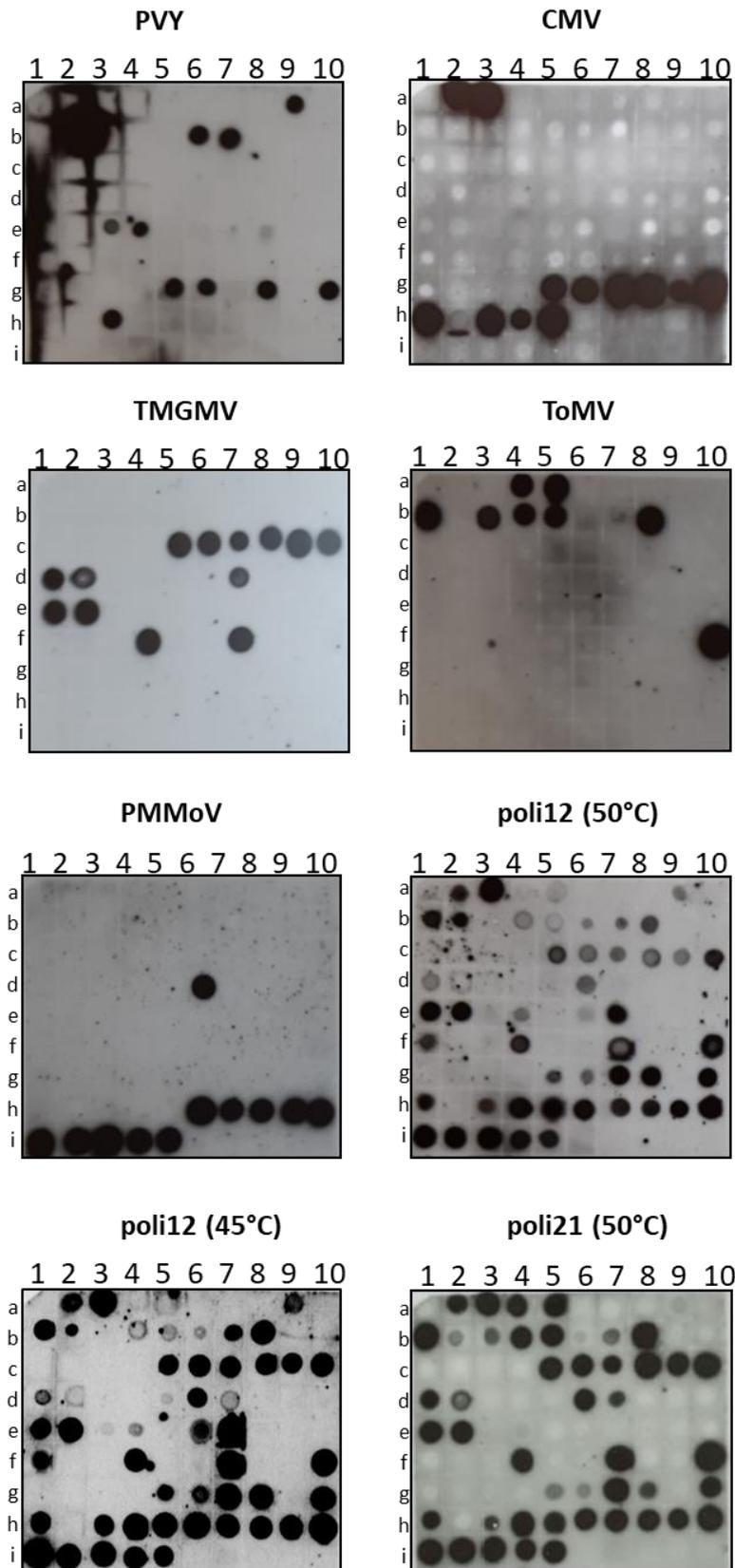


Figura 4.8. Análisis de 85 muestras de pimiento mediante hibridación molecular no radioactiva utilizando sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) y polisondas (poly12 y poli21). La poli12 se analizó a dos temperaturas de hibridación diferentes (45 °C y 50 °C), mientras que las sondas individuales y la poli21 se hibridaron a 68 °C y 50 °C, respectivamente. En todos los casos, los films se revelaron tras una exposición de 30 minutos.

Tabla 4.11. Análisis de 85 muestras de pimiento de campo mediante hibridación molecular no radiactiva, utilizando sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) y polisondas (poli12 y poli21). La poli12 se analizó a dos temperaturas de hibridación diferentes (45 °C y 50 °C). Se analizaron réplicas de la misma membrana utilizando ribosondas individuales (nombre de la sonda del virus) o polisondas (ver Figura 4). En todos los casos, las películas se revelaron tras una exposición de 30 minutos. Estas muestras también fueron analizadas mediante DAS-ELISA, permitiendo realizar una comparación entre ambas técnicas. Se muestran datos del análisis DAS-ELISA (las absorbancias obtenidas/punto de corte positivo)

Posición	PVY	CMV	TMGMV	ToMV	PMMoV	Poli12 (45°C)	Poli12 (50°C)	Poli21 (50°C)	DAS-ELISA
a1									CMV (-) (0.037/0.134)
a2		+				+	+	+	CMV (+) (0.566/0.134)
a3		+				+	+	+	CMV (+) (1.351/0.134)
a4				+		+	+	+	ToMV (+) (1.588/0.082)
a5				+		+	+	+	ToMV (-) (0.018/0.082)
a6									No diagnostico
a7									CMV (-) (0.005/0.134)
a8									No diagnostico
a9	+					+	+	+	PVY (+) (0.252/0.018), ToMV (-) (0.022/0.082)
a10									No diagnostico
b1				+		+	+	+	ToMV (+) (0.478/0.082)
b2	+					+	+	+	PVY (+) (0.166/0.018)
b3				+				+	ToMV (+) (0.975/0.082)
b4				+		+	+	+	ToMV (+) (1.143/0.082)
b5				+		+	+	+	ToMV (+) (0.689/0.082)
b6	+					+	+	+	PVY (+) (0.345/0.018), ToMV (-) (0.026/0.082)
b7	+					+	+	+	PVY (+) (0.042/0.018)
b8				+		+	+	+	PVY (+/-) (0.023/0.018)
b9									No diagnostico
b10									PMMoV (-) (-0.03/0.03)
c1									No diagnostico
c2									No diagnostico
c3									No diagnostico
c4									TMGMV (-) (0.004/0.178)
c5			+			+	+	+	TMGMV (+) (1.238/0.178)
c6			+			+	+	+	TMGMV (+) (1.45/0.178)
c7			+			+	+	+	No diagnostico
c8			+			+	+	+	TMGMV (+) (0.366/0.178)
c9			+			+	+	+	No diagnostico
c10			+			+	+	+	No diagnostico
d1			+			+	+	+	No diagnostico
d2			+			+	+	+	TMGMV (+) (1.116/0.178)
d3									No diagnostico
d4									TMGMV (-) (0.085/0.178)
d5						+			No diagnostico
d6					+	+	+	+	PMMoV (+) (4.019/0.03)
d7			+			+	+/-	+	TMGMV (+) (1.451/0.178)
d8									CMV (+) (0.84/0.134)
d9									CMV(+) (1.228/0.134)
d10									CMV (-) (0.058/0.134)
e1			+			+	+	+	TMGMV (+) (1.521/0.178)
e2			+			+	+	+	TMGMV (+) (0.822/0.178)
e3	+					+	+/-		PVY (+) (0.109/ 0.018)

e4	+			+	+	+	PVY (+) (0.051/ 0.018)
e5							PVY (-) (0.008/ 0.018)
e6				+*	+*		No diagnostico
e7				+*	+*		No diagnostico
e8							No diagnostico
e9							No diagnostico
e10							No diagnostico
f1				+*	+*		No diagnostico
f2							TMGMV (-) (0.11/0.178)
f3							TMGMV (-) (0.03/0.178)
f4		+		+	+	+	TMGMV (+) (1.274/0.178)
f5							No diagnostico
f6							TMGMV (+/-) (0.245/0.178) ^b
f7		+		+	+	+	TMGMV (+) (0.972/0.178)
f8							TMGMV (-) (0.034/0.178)
f9							No diagnostico
f10			+	+	+	+	ToMV (+) (0.135/0.082)
g1							ToMV (+) (0.289/0.082)
g2							ToMV (+) (0.1135/0.082)
g3							PVY (-) (0.019/0.018)
g4							ToMV (-) (0.014/0.082), PMMoV(-) (0.027/0.03), PVY (-) (0.022/0.018)
g5		+	+		+	+	PVY (+) (0.054/0.018)
g6		+	+		+	+	CMV (+)(0.531/0.134)
g7			+		+	+	No diagnostico
g8		+	+		+	+	CMV (+) (1.177/0.134)
g9			+				CMV (+) (1.801/0.134), PVY (-) (0.014/0.018)
g10		+	+		+	+	CMV (+) (2.976/0.134)
h1			+		+	+	PVY (+) (0.450/0.018), ToMV (-) (0.028/0.082)
h2							CMV (+/-) (0.294/0.134) ^b
h3		+	+		+	+	CMV (+) (0.651/0.134)
h4			+		+	+	CMV (+) (0.773/0.134), PVY (-) (0.024/0.018), PMMoV (+) (0.083/0.03)
h5			+		+	+	CMV (+) (3.351/0.134), PVY (+/-) (0.023/ 0.018)
h6				+	+	+	PMMoV (+) (3.305/0.03)
h7				+	+	+	PMMoV (+) (3.221/0.03)
h8				+	+	+	PMMoV (+) (3.128/0.03)
h9				+	+	+	PMMoV (+) (3.221/0.03)
h10				+	+	+	PMMoV (+) (0.554/0.03)
i1				+	+	+	PMMoV (+) (3.577/0.03)
i2				+	+	+	PMMoV (+) (3.717/0.03)
i3				+	+	+	PMMoV (+) (0.208/0.03)
i4				+	+	+	PMMoV (+) (3.24/0.03)
i5				+	+	+	PMMoV (+) (3.558/0.03)

*La señal positiva solo se detectó con poli12. Todas estas muestras dieron positivo para TSWV utilizando los métodos HM y DAS-ELISA. ^a No todas las muestras analizadas por HM fueron analizadas mediante la técnica DAS-ELISA. ^b En el análisis DAS-ELISA, una de las réplicas dio positivo y la otra dio negativo. Estas muestras se consideraron negativas.

Finalmente, se analizaron 236 muestras de campo procedentes de cultivos de pimiento con síntomas de infección viral, mediante sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) y tres polisondas (Poli9, Poli12 y Poli21). De las muestras analizadas, 159 (67,4 %) dieron positivo para al menos uno de los virus analizados con sondas individuales, entre las cuales, 149 (93,7 %) y 142 (89,3 %) fueron detectadas con poli12 y poli21, respectivamente (Figura 4.9). No se detectaron muestras infectadas al aplicar poli9 (datos no mostrados). Las muestras positivas no identificadas por poli12 y poli21 pero que sí fueron identificadas por sondas individuales correspondieron a los virus CMV (predominantemente) y PVY. Sin embargo, tanto poli12 como poli21 permitieron detectar 5 muestras positivas que no se detectaron con sondas individuales llegando a detectar un total de 154 (poli12) y 147 (poli21) muestras positivas a algún virus.

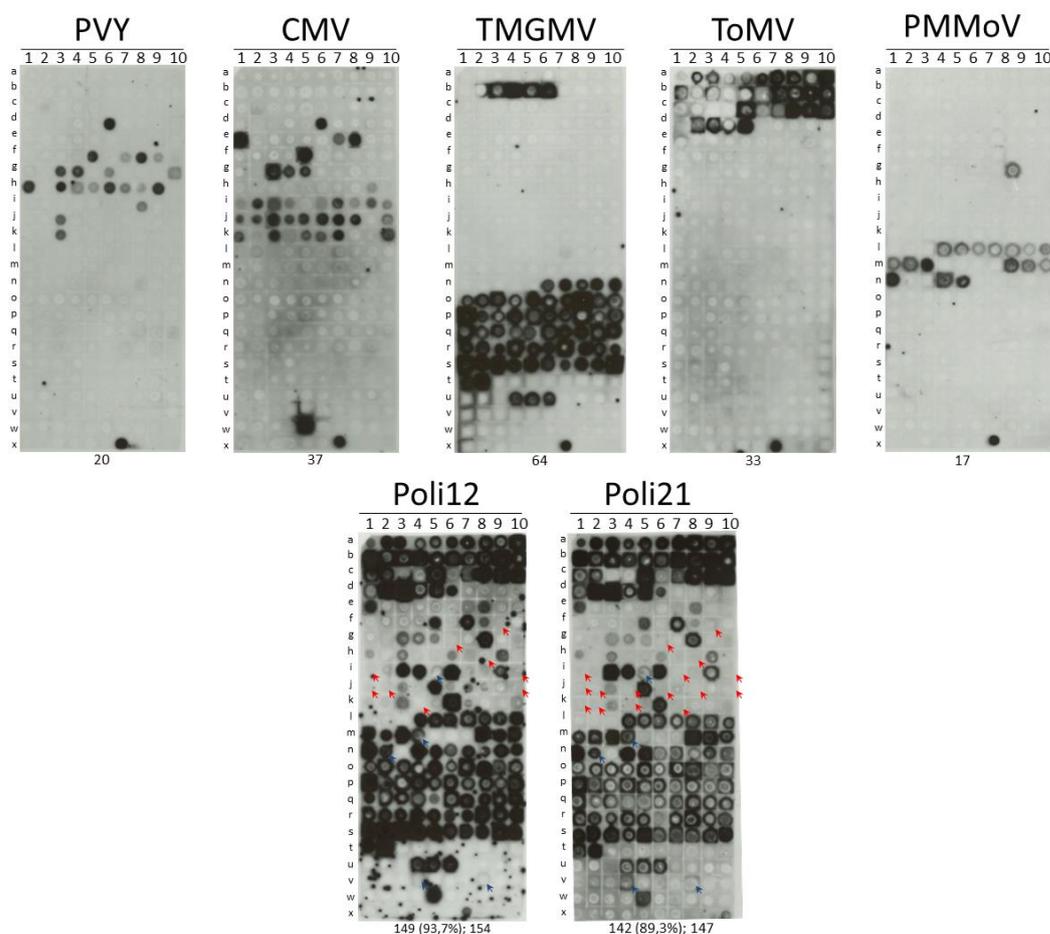


Figura 4.9. Análisis de 236 extractos congelados de muestras de pimiento mediante hibridación molecular no radiactiva utilizando sondas individuales (PVY, CMV, TMGMV, ToMV y PMMoV) y polisondas (poli12 y poli21). Se analizaron réplicas de la misma membrana utilizando ribosondas individuales (nombre de la sonda de virus) o polisondas. Se aplicaron controles positivos ($40 \mu\text{l}^{-1}$) para cada uno de los virus analizados en la casilla x7 de cada réplica de membrana, excepto a la membrana poli21, que se aplicó en la casilla x10. En todos los casos, las películas se revelaron después de una exposición de 30 minutos. En las membranas pertenecientes a las polisondas (poli12 y poli21), es posible observar aquellas muestras que han dado positivo con las sondas individuales pero negativas con las polisondas (flecha roja), y aquellas muestras que han dado positivo con las polisondas pero no con los individuales (flecha azul). Los números en la base de cada membrana corresponden a los positivos totales identificados. En las membranas hibridadas con polisondas, el primer número indica los resultados positivos que coinciden con los resultados de las sondas individuales, indicando el porcentaje de acierto entre paréntesis; el segundo número indica el total de muestras positivas detectadas.

4.2.5. Discusión

En este estudio se han evaluado varios aspectos referentes a varias polisondas de hibridación molecular diseñadas para detectar hasta 21 virus que afectan al cultivo de pimiento. Anteriormente, esta técnica fue aplicada para detectar simultáneamente virus y viroides que afectaban a otros cultivos importantes a nivel mundial (Herranz et al., 2005; Aparicio et al., 2009; Peiró et al., 2012; Zamora-Macorra et al., 2015; Pallás et al., 2018; Sánchez-Navarro et al., 2018b; Sánchez-Navarro et al., 2019) o para detectar todos los virus pertenecientes a un género de virus, como los potyvirus (Sánchez-Navarro et al., 2018a). Este trabajo pretende determinar la sensibilidad y precisión de las tres polisondas diseñadas, comparándolas con sondas individuales específicas de HM, así como con la técnica DAS-ELISA.

El límite de detección observado para todas las sondas individuales osciló entre 0,06 y 1,6 pg μl^{-1} de transcritos complementarios, dentro del rango de sondas descritas previamente por otros autores (Peiró et al., 2012; Sánchez-Navarro et al., 2019) y además se mostraron específicas para los virus que se probaron. Las polisondas detectaron todos los virus evaluados que estaban incorporados en cada una de ellas, comportándose de forma específica tal y como se habían diseñado. Aunque la sensibilidad de la técnica no se vio afectada cuando se aplicó una polisonda capaz de detectar nueve virus (0,32 pg μl^{-1}), sí que se observó que la sensibilidad se redujo considerablemente al aplicar polisondas de mayor tamaño (1,6 pg μl^{-1} con poli12 y 1,6-8 pg μl^{-1} con poli21). Es decir, la reducción de temperatura de hibridación para compensar la menor estabilidad termodinámica de las polisondas fue efectiva para ribosondas con capacidad para detectar aproximadamente 9 patógenos, pero menos eficaz para polisondas más grandes, tal y como se demostró en un estudio precedente (Peiró et al., 2012). Este hecho sugiere que el tamaño de la cola de la sonda no hibridada que se genera cuando se produce el híbrido entre el RNA viral y la polisonda es fundamental para su estabilidad y una correcta hibridación.

El análisis comparativo entre la HM y la técnica DAS-ELISA reveló que ambas metodologías presentaron límites de detección similares, permitiendo detectar hasta la quinta dilución seriada de muestras de campo infectadas. No obstante, estudios previos indicaron que la sensibilidad de la HM es igual o ligeramente superior a la de DAS-ELISA (Sánchez-Navarro et al., 1996; Pallás et al., 2018). Sin embargo, el uso de polisondas de mayor longitud (poli12 y poli21), aplicadas sobre estas muestras a una temperatura de hibridación de 50 °C, resultó en una menor sensibilidad de la técnica. Generalmente, la sensibilidad se redujo entre 5 y 25 veces cuando se utilizaron las polisondas poli12 y poli21, respectivamente, reflejando así la misma reducción en la sensibilidad observada que cuando se aplicaron sobre los controles positivos sintetizados en el laboratorio. En los casos específicos de CMV y ToMV, se observó que los límites de detección resultaron mayores cuando se utilizó poli21 en comparación con poli12, lo que sugiere que la localización de la sonda correspondiente dentro de cada polisonda podría ser determinante para una óptima hibridación. En este contexto, la secuencia de la sonda de ToMV en poli12 se ubicó al final de la sonda mientras que en poli 21 se localiza en una posición central, lo cual podría favorecer la nucleación o la formación de tres o más pb adyacentes, promoviendo la hibridación a través del 'mecanismo de cierre' ('zippering mechanism' en inglés) (Wong y Liu, 2021). Un argumento similar podría explicar los diferentes

límites de detección observados entre los controles positivos sintéticos y el tejido infectado, ya que la falta de secuencia adicional en los extremos 5' y 3' de los controles positivos podría afectar negativamente a la nucleación. Otra particularidad adicional del estudio fue la notable disminución de la sensibilidad observada al detectar PVY utilizando poli21, siendo 125 veces menor en comparación con las sondas individuales y 25 veces en comparación con poli12. Esta significativa disminución en la sensibilidad de poli21 para detectar PVY podría atribuirse a la ubicación del fragmento de PVY en la secuencia de la polisonda, situado al final de ambas sondas poli12 y poli21. En esta región, la hibridación de la sonda de PVY con la secuencia viral implica la presencia de una cola de ribosonda no hibridada de 6442 nt (poly21) o 3340 nt (poly12), lo que afectaría de manera diferente a la estabilidad del híbrido RNA viral:ribosonda durante la hibridación molecular (Wong y Liu, 2021). Otro factor que podría influir en las condiciones de hibridación es el porcentaje de adeninas y uracilos en la secuencia de nucleótidos de la ribosonda (Kessler, 2000; Wong y Liu, 2021). Los pares A-T y A-U, al tener dos puentes de hidrógeno, son menos estables que los pares C-G, que tienen tres. Sin embargo, el porcentaje de estos nucleótidos en la ribosonda PVY (40 %) estuvo en el rango del resto de virus analizados (40 % a 47 %) (Figura 3.2). Finalmente, los diferentes límites de detección de CMV observados para poli12 y poli21 siguen siendo una cuestión abierta. La colocación de la sonda CMV en la parte interna de ambas sondas sugiere que la estructura secundaria y/o la accesibilidad de la sonda CMV en ambas polisondas podrían ser diferentes.

No se detectaron muestras infectadas con poli9, lo que indica que los virus incluidos en esta polisonda no eran prevalentes en el área prospectada, tal y como se preveía. Sin embargo, la disposición de este tipo de herramientas para detectar simultáneamente virus poco frecuentes en el cultivo de pimiento en Euskadi podría tener su interés para la identificación temprana nuevos virus potencialmente peligrosos, de una forma económica, práctica y eficaz (James et al., 2006). De hecho, algunos virus poco frecuentes ya han sido identificados en parcelas de pimiento de Euskadi mediante el uso de sondas individuales de HM, aunque sin provocar grandes epidemias, como se detalla en el capítulo de prospecciones (Sección 4.1).

La reducción de 5 °C en la temperatura de hibridación de poli12 (de 50 °C a 45 °C) dio como resultado una señal de hibridación en general más fuerte, sin que se observaran señales no específicas en el tejido sano y permitiendo la detección de muestras con virus que estaban en el límite de detección a 50 °C. Estos resultados indican que disminuir la temperatura de hibridación en 5 °C mejora la sensibilidad de poli12, lo que sugiere la posibilidad de realizar la hibridación con polisondas de este tamaño a esta temperatura, a menos que se observe alguna señal inespecífica en tejido sano, como se ha reportado en otros estudios con sondas individuales y polisondas (Cañizares et al., 1999; Sánchez-Navarro et al., 2019). Algunas muestras de campo dieron una señal positiva sólo con poli12, indicando la presencia de otros virus diferentes a los evaluados por las sondas individuales en este estudio. Estas muestras fueron analizadas mediante HM con las sondas individuales restantes incluidas en la poli12. Las cuatro muestras resultaron positivas para TSWV, tanto por HM como por DAS-ELISA (datos no mostrados). Sin embargo, no está claro por qué estas muestras no dieron señal con poli21. Una única muestra infectada con el virus ToMV (b3), solo se detectó con poli21, sin mostrar señal con poli12. Esto indica que poli21 tiene un límite de detección superior al de poli12 para este virus. Este fenómeno podría deberse también con la localización de la sonda de ToMV dentro de las diferentes polisondas, tal como se ha explicado previamente (Wong y Liu, 2021).

En el muestreo a mayor escala realizado en este estudio se utilizaron extractos de muestras (preparados con tampón rápido de citrato sódico) que habían estado congelados durante 12 meses a -20 °C. Estos extractos fueron homogeneizados, almacenados y aplicados en membranas de nailon para su posterior análisis en el laboratorio. Hasta donde sabemos, no existen estudios previos que aborden la conservación a largo plazo de estos extractos crudos para su análisis por HM. Sería de interés llevar a cabo investigaciones futuras que aborden la conservación de estos extractos de plantas a lo largo de tiempo bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Durante el período en el que los extractos permanecieron congelados, es posible que el RNA de ciertos virus se haya degradado, lo que podría haber afectado la precisión de la detección, especialmente con el uso de polisondas, las cuales detectan el componente genómico del virus. Este fenómeno se evidenció en el caso de los virus PVY y CMV, que suelen ser menos duraderos y estables que los Tobamovirus (Dombrovsky y Smith, 2017), los cuales se detectaron satisfactoriamente tanto con sondas individuales como con polisondas.

En resumen, los resultados presentados evidencian que el empleo de polisondas gran tamaño tiene un efecto adverso sobre el límite de detección y, en consecuencia, sobre la capacidad de detectar muestras de campo infectadas. Durante nuestros experimentos, observamos que la polisonda con capacidad para detectar 21 patógenos (cada patógeno representado por una sonda de 220-480 nt generalmente) detectó entre un 5 % y un 10 % menos de positivos que las polisondas con capacidad para detectar 12 patógenos. Nuestros resultados también indican que el uso de polisondas con capacidad para detectar aproximadamente entre 9 y 12 patógenos, hibridadas a 45 °C (cuando sea factible), podría representar el enfoque óptimo para utilizar esta tecnología, reproduciendo resultados similares a los obtenidos con sondas individuales. Si bien, esta limitación podría restringir la cantidad de patógenos detectables, se puede superar mezclando 2 o 3 polisondas, proceso que no aumenta la señal de fondo como se demostró previamente (Saldarelli et al., 1996; Sánchez-Navarro et al., 1999; Saade et al., 2000). Además, el uso de polisondas podría ser un enfoque valioso para la detección de nuevos virus que aún no se han descubierto y poseen secuencias muy parecidas (con un porcentaje de identidad del 69 % o superior) a los virus incorporados en las polisondas, un escenario que se encuentra frecuentemente con tobamovirus y potyvirus (Ontañón et al., 2024; Sánchez-Navarro et al., 2018a). Otra estrategia alternativa para detectar simultáneamente un mayor número de virus podría ser el uso de secuencias conservadas que den hibridación cruzada entre virus filogenéticamente cercanos, como en el caso de Potyvirus y Tobamovirus (Ontañón et al., 2024; Sánchez-Navarro et al., 2018a).

4.3. Análisis molecular de un aislado de chili pepper mild mottle virus (CPMMoV) y evaluación de la transmisión por semillas y genes de resistencia

4.3.1. Caracterización del genoma completo del nuevo tobamovirus y análisis filogenético.

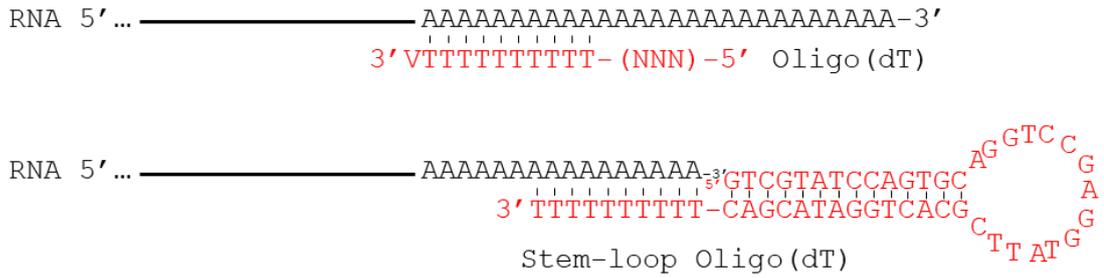
El análisis RACE utilizando un cebador tipo stem-loop modificado permitió la caracterización de las secuencias de nucleótidos terminales 5' y 3', encontrando una citosina en el extremo 5' y una adenina en el extremo 3' (Figura 4.10a). La secuencia completa del genoma del virus identificado mostró una longitud de 6405 nt (GenBank: OQ920979; Anexo VIII) y presentó una identidad de secuencia del 99,2 % con el genoma de referencia denominado chili pepper mild mottle virus (CPMMoV) (GenBank: MN164455.1; Anexo IX), recientemente depositado en la base de datos GenBank. Con estos resultados, el nuevo aislado debe considerarse como CPMMoV del género Tobamovirus, en lugar de un aislado BPeMV, con el que mostró una identidad de secuencia del 83,8 % (Anexo X). A partir de ahora, nos referiremos al nuevo virus como un aislado del chili pepper mild mottle virus (aislado de España, CPMMoV-Sp).

El nuevo virus mostró la organización genómica típica de los tobamovirus, con regiones no codificantes 5' y 3' de 72 nt y 203 nt, respectivamente. Posee dos ORF 5'-proximales (ORF 1 y ORF 2) de 3351 nt y 4853 nt que codifican dos subunidades de la RNA polimerasa de 128 kDa y 187 kDa, respectivamente. Además, tiene un tercer ORF (ORF 3) de 812 nt que codifica la proteína de movimiento (MP) del virus de 27,8 kDa, y un cuarto ORF (ORF 4) cerca del final de 476 nt que genera la proteína de la cápside (CP) de 19,2 kDa (Figura 4.10b).

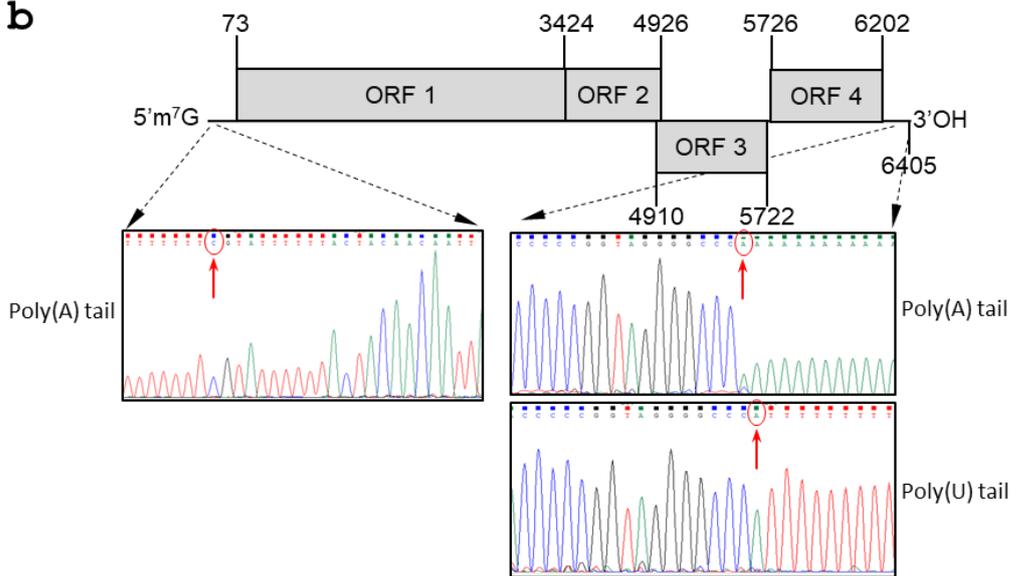
El análisis de comparación de secuencias entre CPMMoV-Sp y CPMMoV (GenBank: MN164455.1) reveló que el aislado en la base de datos carecía de 22 nt en el extremo 5', lo que sugiere una posible secuenciación parcial de esta región (Figura 4.10c).

El análisis filogenético se realizó utilizando la secuencia de nucleótidos del genoma completo de CPMMoV-Sp y 37 secuencias de tobamovirus disponibles en la base de datos GenBank (Figura 4.11). El árbol filogenético revela la presencia de tres subgrupos (I, II, III) según la clasificación histórica basada en el rango natural de huéspedes, la organización genómica y el agrupamiento filogenético (Salgado-Ortíz et al., 2020). CPMMoV-Sp se clasificó en el subgrupo I y mostró una estrecha relación con BPeMV (GenBank: NC_009642.1) y CPMMoV (GenBank: MN164455.1), con un valor de arranque del 100 %. Se obtuvieron resultados similares cuando se realizaron análisis filogenéticos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de movimiento y la proteína de cubierta (Figura 4.12 y Figura 4.13), lo que respalda la inclusión de CPMMoV-Sp en el subgrupo I entre los tres grupos filogenéticos observados.

a



b



c

CPMMoV	1	-----ACCAACAACAACAACAACAACAACAT	28
CPMMoV-Sp	1	CGTATTTTTTACTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAT	50
CPMMoV	29	TACATTACTTTTAACAACACTACAATGGCATAACACAACAACCGCGTCTTCCG	78
CPMMoV-Sp	51	TACATTACTTTTAACAACACTACAATGGCATAACACAACAACAACCGCGTCTTCCG	100
CPMMoV	79	CCGCTTTGTTAGACACAGTCCGTTGGTAACAATACCATGGTCAACGATCTA	128
CPMMoV-Sp	101	CCGCTTTGTTAGACACAGTCCGTTGGTAACAATACCATGGTCAACGATCTA	150

Figura 4.10. Organización genómica de CPMMoV-Sp (GenBank: OQ920979) y caracterización de las secuencias terminales 5' y 3'. a) Representación esquemática del cebador Oligo(dT) utilizado en el análisis RACE estándar, que lleva un nucleótido 'V' degenerado (C, A o G) en el extremo 3', y el Oligo(dT) tipo stem-loop diseñado en este estudio para que se adhiriera al final de la cola poli (A) y asegurar la determinación sin ambigüedades del primer y último nucleótidos del genoma completo. b) Organización del genoma CPMMoV-Sp. Los números indican el primer y último nucleótido de cada Open Reading Frame (ORF) y el genoma completo. Se muestra el cromatograma obtenido durante el análisis RACE de los extremos 5' y 3' utilizando colas poli(A) o poli(U) (Anexo XI). c) Alineación de los extremos 5' de 150 nt obtenidos para el aislado CPMMoV-Sp y el CPMMoV presente en la base de datos (GenBank nº: MN164455.1).

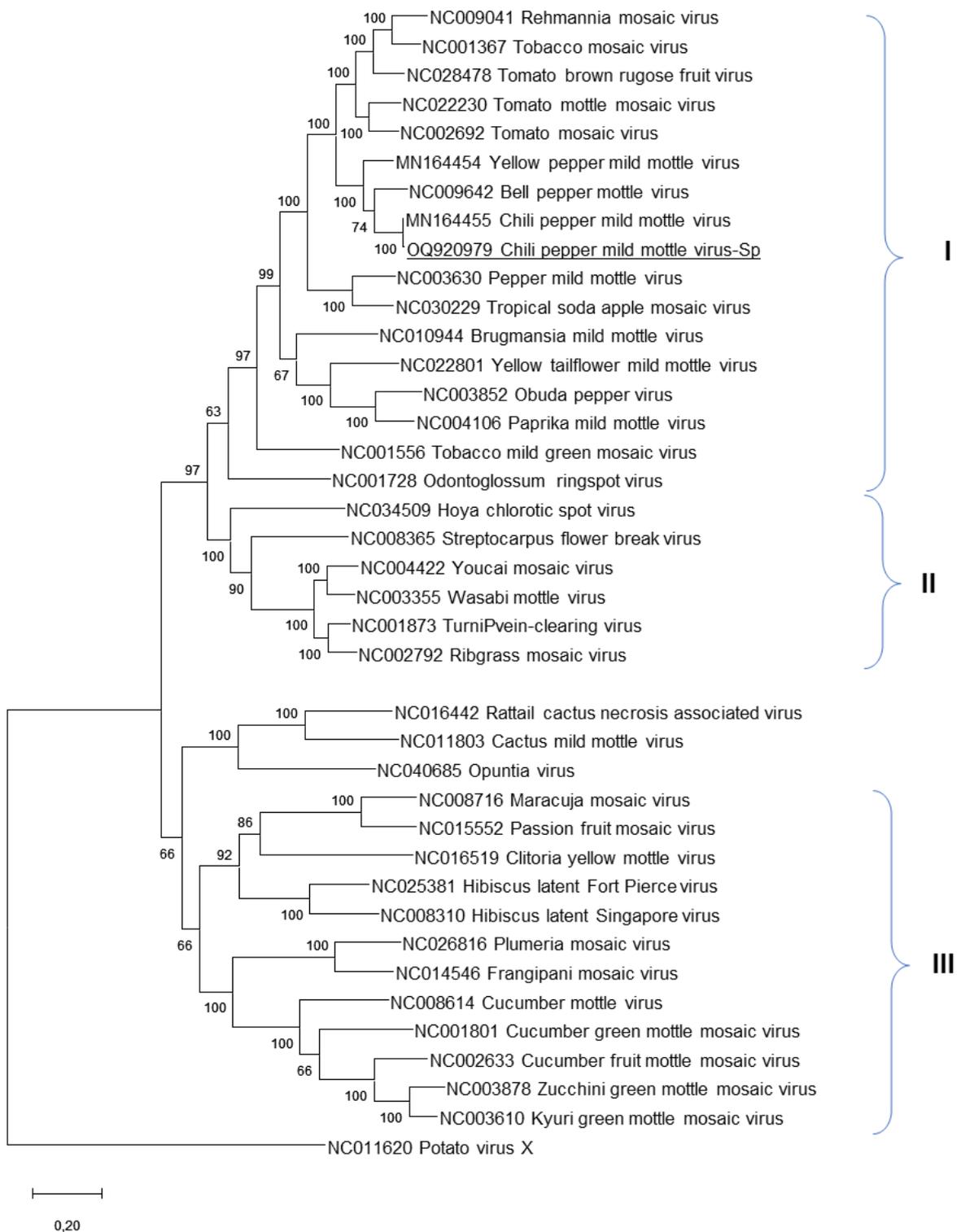


Figura 4.11. Árbol filogenético basado en la secuencia genómica completa de nucleótidos de 37 virus del género Tobamovirus disponibles en la base de datos GenBank junto con el nuevo virus CPMMoV-Sp. El análisis Bootstrap se realizó con 1000 réplicas y los números indican el valor porcentual de bootstrap para cada nodo. Los subgrupos I, II y III se han establecido según la clasificación histórica basada en el rango de la planta huésped, la organización genómica y la relación filogenética. La secuencia genómica completa de potato virus X (PVX) se utilizó como grupo externo. Las barras de escala representan sustituciones por sitio de nucleótido. Los códigos de acceso a la base de datos GenBank están indicados junto al nombre del virus correspondiente.

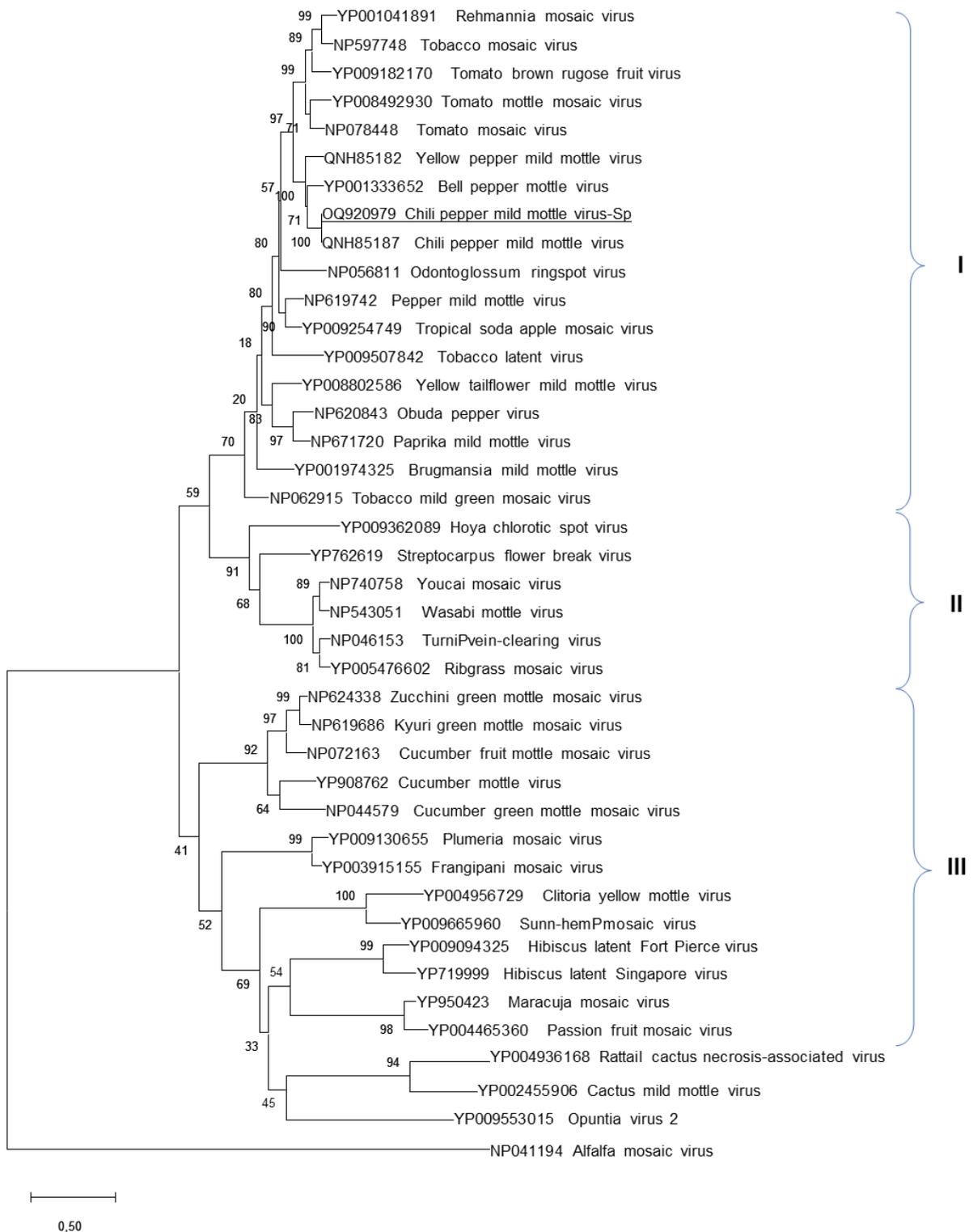


Figura 4.12. Árbol filogenético basado en la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de movimiento (MP) de todos los tobamovirus cuyo genoma completo está disponible en la base de datos GenBank, además del nuevo virus CPMMoV-Sp. El análisis Bootstrap se realizó con 1000 réplicas y los números indican el valor porcentual de bootstrap para cada nodo. Los subgrupos I, II y III se han establecido según la clasificación histórica basada en el rango de la planta huésped, la organización genómica y la relación filogenética. Como grupo externo se utilizó la secuencia completa de aminoácidos de la MP de alfalfa mosaic virus (AMV). Las barras de escala representan sustituciones por sitio de aminoácido. Los códigos de acceso a la base de datos GenBank están indicados junto al nombre del virus correspondiente.

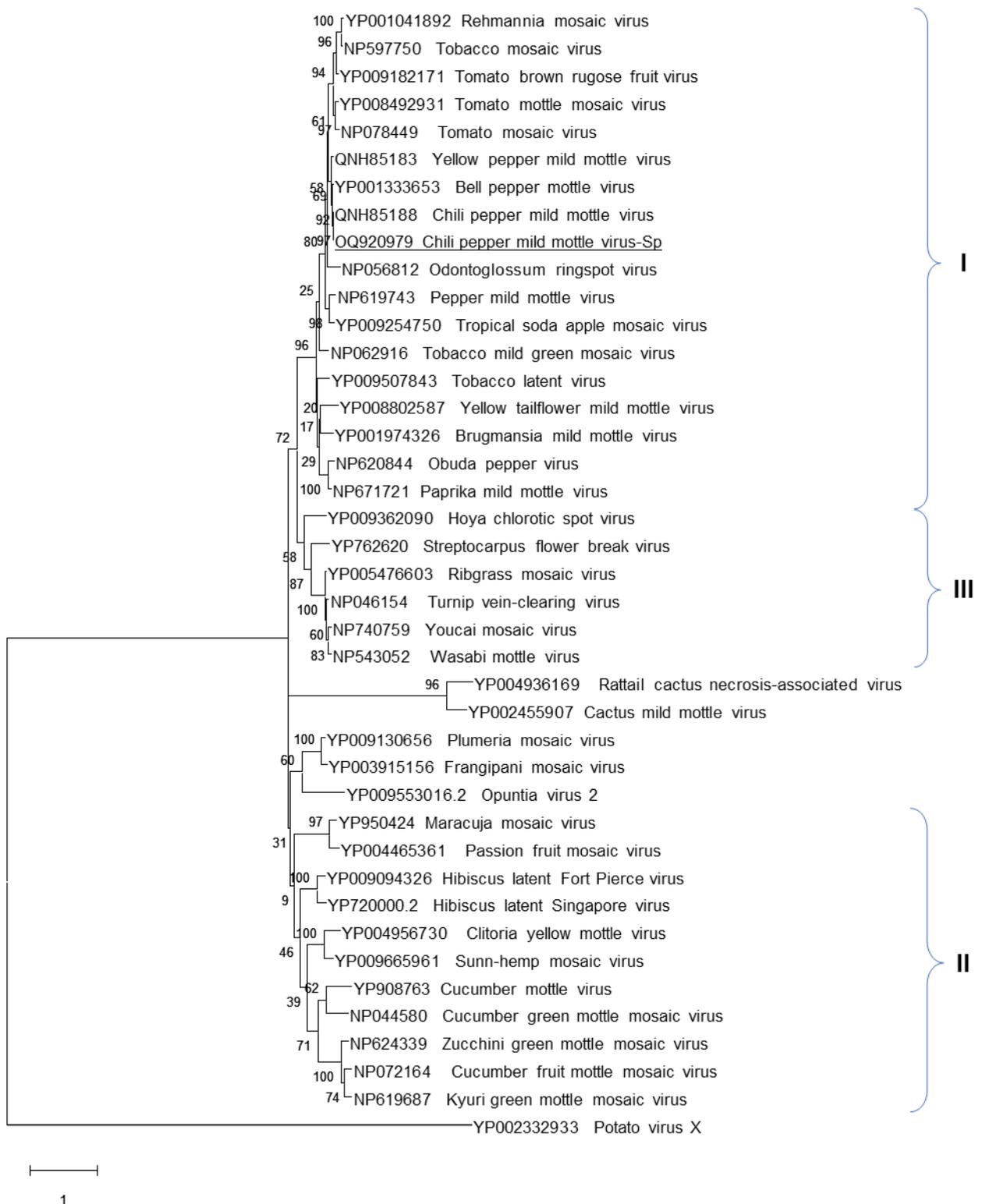


Figura 4.13. Árbol filogenético basado en la secuencia completa de aminoácidos de la cápside protéica (CP) de todos los tobamovirus cuyo genoma completo está disponible en la base de datos GenBank, además del nuevo virus CPMoV-Sp. El análisis Bootstrap se realizó con 1000 réplicas y los números indican el valor porcentual de bootstrap para cada nodo. Los subgrupos I, II y III se han establecido según la clasificación histórica basada en el rango de la planta huésped, la organización genómica y la relación filogenética. Como grupo externo se utilizó la secuencia completa de aminoácidos de la CP del potato virus X (PVX). Las barras de escala representan sustituciones por sitio de aminoácido. Los códigos de acceso a la base de datos GenBank están indicados junto al nombre del virus correspondiente.

4.3.2. Clones infecciosos de CPMMoV-Sp

Los clones infecciosos se generaron mediante dos aproximaciones diferentes. La primera consistió en clonar el genoma viral completo en un plásmido binario bajo el control del promotor 35S y el terminador PopIt y posteriormente agroinfiltrarlo en la planta. En la segunda, se utilizó el promotor T7 y se generaron los correspondientes transcritos que se inocularon directamente en las hojas utilizando carborundo después de realizar una reacción de capeado. En ambos enfoques, se generaron tres construcciones diferentes, que se diferenciaban en el inicio del extremo 5': nt +1 (la citosina identificada en este trabajo), nt +2 (una guanina, como el 95 % de los tobamovirus en la base de datos) o nt +23 (el punto de partida de CPMMoV; GenBank: MN164455.1) (Figura 4.14a). Se obtuvieron resultados similares cuando las plantas se inocularon mediante agroinfiltración o mediante inoculación directa de los transcritos derivados de la RNA polimerasa T7. El análisis de transferencia Northern blot de las hojas inoculadas (5 DDI) y sistémicas (10 DDI) mostró una clara acumulación de RNA viral de las construcciones CPMMoV-Sp comenzando en nt +1 o nt +2, mientras que no se observó señal para las construcciones comenzando en nt + 23 (Figura 4.14b), lo que indica que los 22 nucleótidos del terminal 5' de CPMMoV-Sp eran necesarios para iniciar la infección viral.

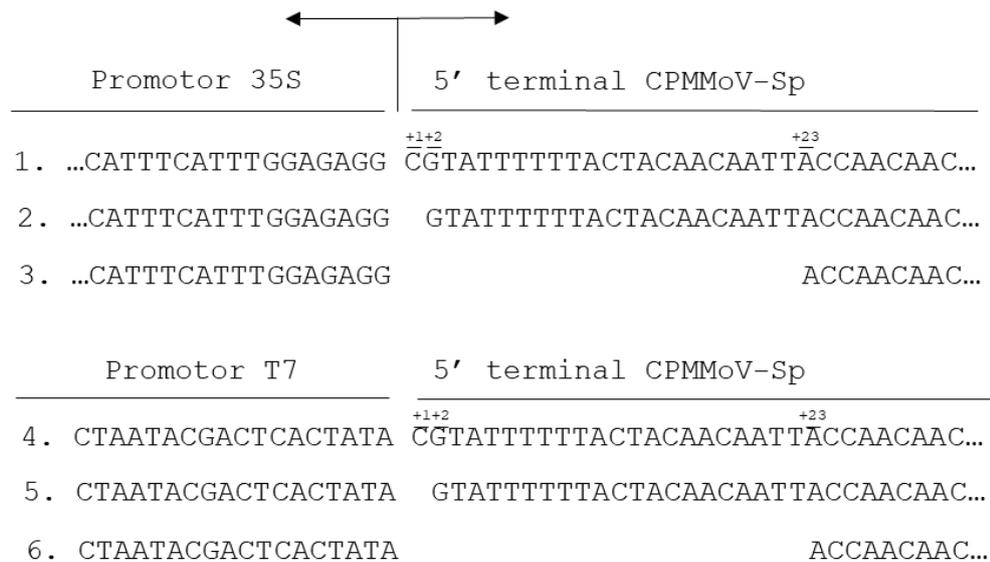
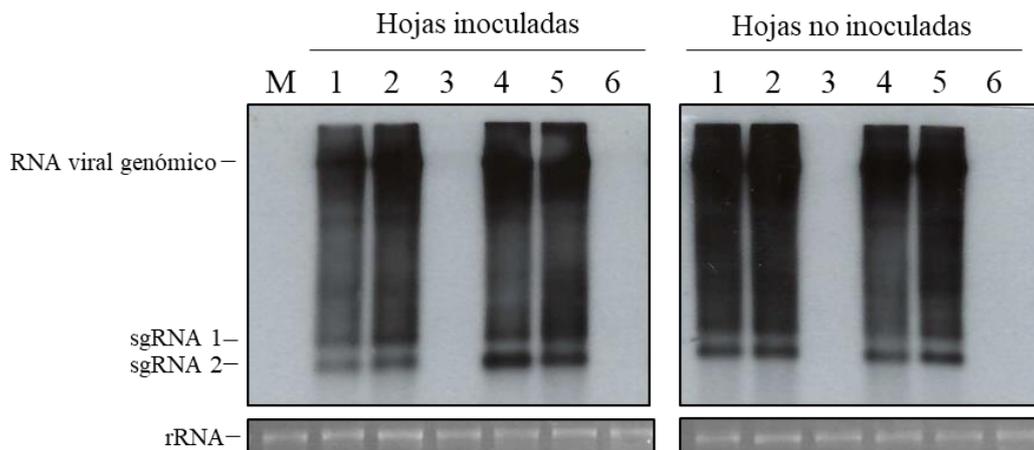
a**b**

Figura 4.14. Análisis de clones infecciosos de CPMMoV-Sp que portan diferentes secuencias del extremo 5' y que fueron inoculados sobre plantas de *Nicotiana benthamiana*. a) esquema de los extremos 5' de los clones infecciosos que se generaron bajo el control del promotor 35S (clones 1, 2 y 3) o del promotor T7 (clones 4, 5 y 6). Estos clones llevan la secuencia terminal 5' completa identificada en este estudio (clones 1 y 4), sin el residuo de citosina (clones 2 y 5), o sin los 22 nucleótidos adicionales en comparación con la secuencia CPMMoV depositada en la base de datos GenBank (MN164455.1) (clones 3 y 6). b) Análisis de transferencia Northern de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con las construcciones indicadas en a. Se hibridó un microgramo de RNA total extraído de hojas inoculadas a los 5 días después de la inoculación (DDI) y hojas no inoculadas a los 10 DDI con una ribosonda marcada con digoxigenina (Sonda CPMMoV#2). Las películas se expusieron durante 30 minutos y se indican las posiciones de los RNAs virales genómicos y subgenómicos. M indica plantas no inoculadas.

4.3.3. Desarrollo de técnica de detección mediante hibridación molecular no radiactiva y con la técnica RT-PCR

En el siguiente paso, se desarrolló un método de detección basado en hibridación molecular no radiactiva utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina para la detección específica

de CPMMoV. Se analizaron dos sondas de RNA específicas, CPMMoV#1 y CPMMoV#2, dirigidas a las regiones más divergentes entre los virus CPMMoV y BPeMV, con un porcentaje de identidad del 80,6 % y 75,8 %, respectivamente. Además, se examinó una polisonda, Poli2, que combinaba ambas sondas en una secuencia en tándem. Junto con las sondas para CPMMoV, también se evaluó una sonda específica para BPeMV de 291 nt, que mostraba un porcentaje de identidad del 89,4 % con CPMMoV. La sensibilidad y especificidad de cada sonda y polisonda individual se evaluaron utilizando tejido sano (pimiento) e infectado con CPMMoV-Sp (pimiento) o BPeMV (*Nicotiana clevelandii*). El RNA total (25 nanogramos) fue diluido en serie en tampón TE (Tris HCl 10 mM + EDTA 10 mM, pH 8,0) (5^{-1}) y estas diluciones seriadas fueron aplicadas sobre membranas de nailon. Se hibridaron réplicas de la misma membrana con las tres sondas individuales a 68 °C y 60 °C, para evaluar cómo la temperatura podría influir en la especificidad. Los resultados obtenidos a 68 °C revelaron que las tres sondas eran específicas, no mostrando hibridación cruzada entre el tejido infectado con CPMMoV y BPeMV y sin señal en el tejido sano. La sonda CPMMoV#2, complementaria a parte de los genes MP y CP, produjo una señal de hibridación positiva hasta la dilución 5^{-3} , un límite de detección 25 veces superior al observado para la sonda CPMMoV#1 (5^{-1}), sonda dirigida únicamente al gen de la replicasa. Cuando se hibridaron réplicas de las mismas membranas con las sondas individuales a 60 °C, observamos una señal de hibridación cruzada clara con la sonda de BPeMV, mientras que no se observó ninguna hibridación cruzada con la CPMMoV#1 y solo se observó una señal de hibridación cruzada suave con la muestra sin diluir del BPeMV (25 ng μl^{-1}) al aplicar la sonda CPMMoV#2 (Figura 4.15a).

En el siguiente paso, se evaluó el límite de detección y la especificidad de poli2. La hibridación se realizó a 55 °C y no se observó señal de hibridación en el tejido sano. Los resultados obtenidos revelaron una señal de hibridación hasta la dilución 5^{-3} , similar a la obtenida con CPMMoV#2, indicando que la fusión de dos sondas del mismo virus no incrementó el límite de detección. La sonda poli2 también mostró una señal de hibridación cruzada con el tejido infectado por BPeMV, lo que indica que las sondas se hibridan con secuencias que muestran una identidad del 75-80 % cuando la hibridación se realiza a 55 °C.

Finalmente, se comparó el límite de detección de CPMMoV entre la técnica de HM utilizada en el presente estudio y la RT-PCR. En este sentido, las mismas diluciones de RNA total extraídos de tejido infectado con CPMMoV-Sp que fueron analizados mediante hibridación molecular, también fueron analizados mediante RT-PCR con los dos mismos conjuntos de cebadores utilizados para amplificar las dos sondas de CPMMoV. Los resultados mostraron que se detectaron amplicones específicos de 144 nt (con cebadores CPMMoV#1) o 350 nt (con cebadores CPMMoV#2) hasta la dilución de 5^{-6} , lo que representa un límite de detección 125 veces mayor que el observado con HM (5^{-3}), mientras que no se observó producto de PCR en la muestra de pimiento sana (Figura 4.15b).

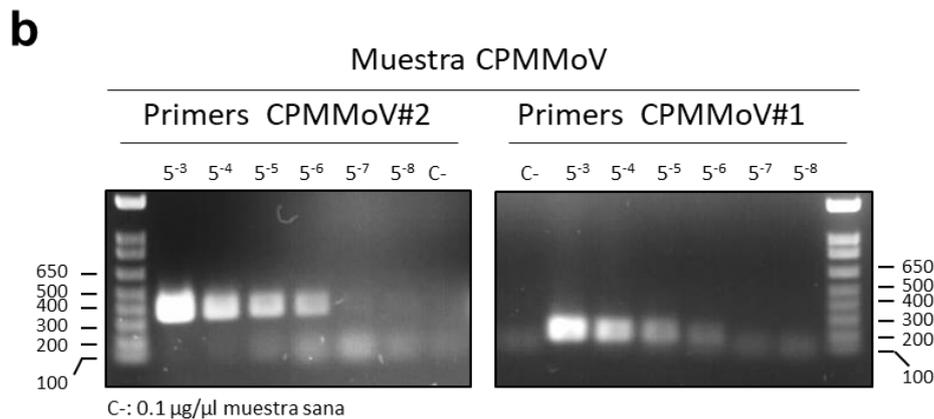
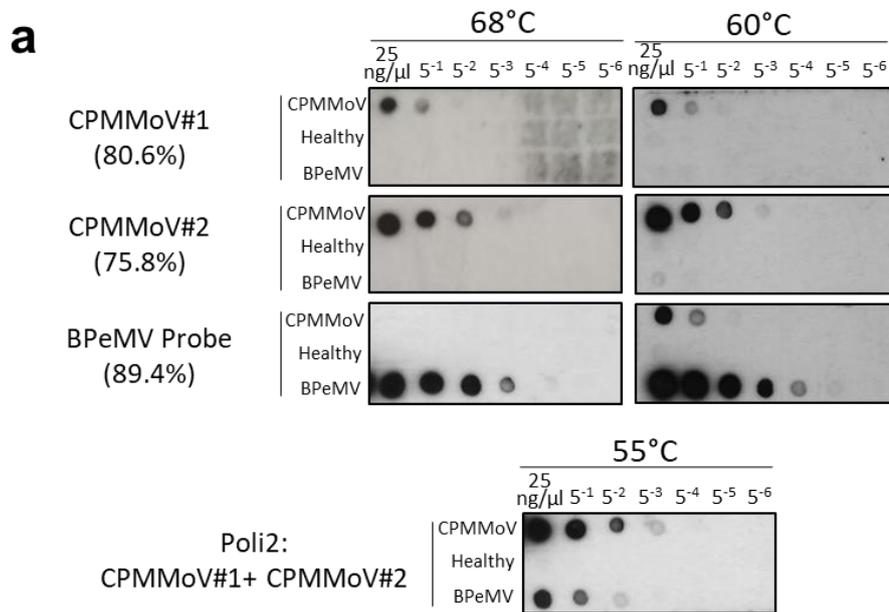
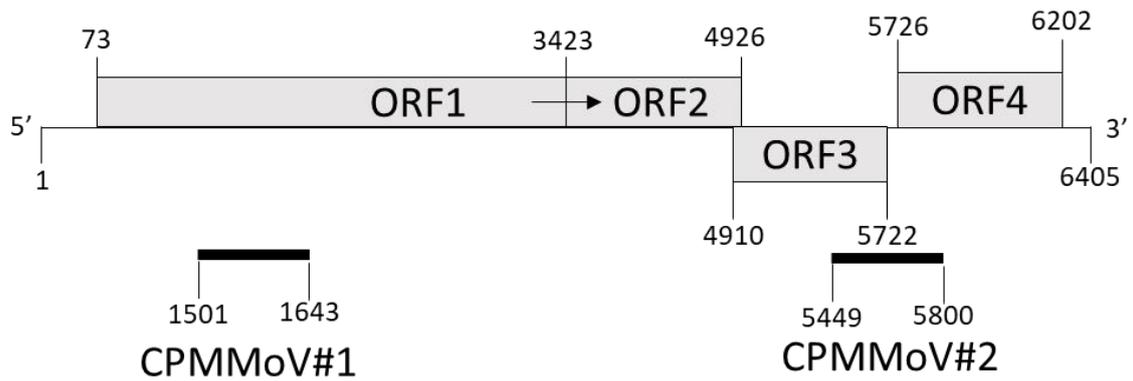


Figura 4.15. Detección de CPMMoV mediante hibridación molecular y RT-PCR y evaluación de la hibridación cruzada entre tejido infectado con CPMMoV y BPeMV. a) El RNA total (25 ng/µl) extraído de plantas de pimienta infectadas por CPMMoV y BPeMV se diluyó en serie (5⁻¹) en tampón TE y se aplicó a membranas de nailon. Se utilizaron plantas de pimienta sanas como control negativo. Se hibridaron réplicas de la misma membrana con dos sondas de CPMMoV (indicadas en el esquema) y la sonda de BPeMV a 68 °C y 60 °C, mientras que la sonda poli2 CPMMoV, que lleva las dos sondas CPMMoV fusionadas en tándem, se hibridó a 55 °C. Los films fueron expuestos durante 30 min. El porcentaje debajo de cada sonda indica su identidad con las secuencias virales BPeMV (sondas CPMMoV) o

CPMMoV (sonda BPeMV). b) Análisis por RT-PCR de las mismas diluciones de CPMMoV analizadas mediante hibridación molecular utilizando el conjunto específico de cebadores para la sonda CPMMoV#1 y CPMMoV#2. La última dilución positiva correspondió a 5^{-6} para ambos conjuntos de cebadores, 125 veces más sensible que el ensayo de hibridación molecular (5^{-3}). C- representa el RNA total extraído de tejido sano de pimiento. Los números en los bordes derecho o izquierdo de los gels indican el tamaño del DNA en pares de bases (pb).

4.3.4. Transmisión de semilla a planta de CPMMoV en pimiento

En el siguiente paso, se analizó la transmisión vertical de CPMMoV-Sp (transmisión de semilla a planta) utilizando seis lotes de semillas obtenidos de plantas de pimiento infectadas naturalmente en un invernadero comercial (cv. Derio) o de plantas de pimiento mecánicamente inoculadas con CPMMoV-Sp (cv. Celta). El análisis de todas las plantas evaluadas realizado mediante HM aplicando la sonda CPMMoV#2, reveló un porcentaje de transmisión que osciló entre 0,9 y 8,5 % (Tabla 4.12). Ambas fuentes de semillas, extraídas de plantas infectadas de forma natural o de plantas inoculadas mecánicamente con CPMMoV-Sp, mostraron transmisión de semilla a planta, excepto el lote 5 de semillas (Tabla 4.12). Algunas de las plantas que resultaron infectadas en el ensayo de transmisión con semillas infectadas naturalmente mostraron síntomas de coloración amarillenta y patrones de mosaico en hojas (Figura 4.16). Los resultados indican claramente que CPMMoV se transmite por semilla, aunque el porcentaje de transmisión podría estar influenciado por el cultivar y/o las condiciones de cultivo.

Tabla 4.12. Porcentajes de transmisión de CPMMoV-Sp de semilla a planta en lotes de semilla obtenidos a partir de plantas infectadas naturalmente (Cv. Derio) o mecánicamente (Cv. Celta).

Fuente de semilla	Lote semilla	Total plantas	Plantas Infectadas	Virus transmission (%)
Plantas infectadas naturalmente (Cv. Derio)	1	224	19	8,5 %
	2	224	9	4,0 %
	3	224	2	0,9 %
Plantas inoculadas mecánicamente (Cv. Celta)	4	68	2	2,9 %
	5	68	0	0,0 %
	6	68	1	1,4 %
Plantas sanas (Cv. Celta)	7	68	0	0,0 %



Figura 4.16. Síntomas de clorosis y mosaicos observados en algunas de las plantas infectadas por CPMMoV-Sp en el bioensayo de transmisión realizado con semillas infectadas naturalmente en campo del Cv. Derio a los 52 días después de la siembra.

4.3.5. Determinación del patotipo de CPMMoV en variedades de pimiento con diferentes genes de Resistencia a Tobamovirus.

Finalmente, el patotipo CPMMoV-Sp se determinó mediante la inoculación de varias variedades de pimiento que portaban distintos alelos del gen de resistencia 'L'. Todas las variedades de pimiento que portaban estos genes de resistencia produjeron una respuesta hipersensible (HR) en las hojas inoculadas a los 7 DDI, una respuesta que no se observó en las variedades no resistentes (Tabla 4.13). Sin embargo, se observaron síntomas de virosis en las hojas superiores no inoculadas en los cultivares sin el gen de resistencia y solo en las variedades que portaban los alelos resistentes L1 y L2 (Tabla 4.13 y Figura 4.17). El análisis por HM (CPMMoV#2) para la presencia de CPMMoV-Sp en las hojas no inoculadas reveló que las variedades con genes L2, L3 y L4 fueron resistentes (0 % de muestras positivas), mientras que en las variedades con alelo L1 algunas plantas resultaron infectadas, mostrando infecciones del

20 al 40 % de las plantas inoculadas. Las variedades sin genes de resistencia mostraron una alta susceptibilidad a CPMMoV-Sp, con infecciones superiores al 87 % de las plantas inoculadas. Para garantizar la ausencia de infección viral en plantas portadoras de los genes L3 (cv. 2166) y L4 (cvs. Sanakka Ichnigo, 10255 F1), se recolectaron hojas sistémicas de 7 plantas de cada variedad a los 34 DDI y se analizaron mediante RT-PCR utilizando cebadores generales de tobamovirus descritos por Li et al. (2018). Una ligera banda fue amplificada en todas las hojas sistémicas recolectadas de plantas con L3 (cv. 2166), los cuales fueron secuenciados, mostrando una identidad del 100 % de nt con CPMMoV-Sp.

Tabla 4.13. Determinación del patotipo de CPMMoV a partir de un ensayo de inoculación en variedades con diferentes genes de resistencia a tobamovirus

Variedad de pimiento (Gen de Resistencia a Tobamovirus)	Días Después Inoculación (DDI)		
	13	27	34
Gaitanes F1	– ^a / –	– / D, Cl, N	95 ^b
Celta F1	– / M, N	– / M, N, Mch	100
Iker	LN / M, N	LN / D, N, M, Cl, NA	87
Sima-334	Y / Cl	Y / Cl, Abu	100
Maddiper	LN / MS, N	LN / MS, D, N	100
Izartxo	Am / Mo, MS	Am / Mo, D, Abu, MS, N	100
Leuna	LN, Am / M, Cl	LN, Am / M, D, Abu, Cl	94
Luzea	Am / Cl, Mo, M	Am / Cl, D, M, Mo, Abu, Y	100
Cor-01	LN / M	LN / D, M, N, Abu	93
Loiola 19.1	Am / M, Abu	Y / M, Abu, D	100
Garbino F1 (L1)	HR, A / –	HR, A / N, D, Cl	35 ^b
2168 (L1)	HR / MS	HR / MS, Abu	40
2171 (L1)	– / MS	– / MS, NN	20
BGHZ 3789 (L2)	A / –	A / N, Cl	0
BGHZ 3353 (L2)	A / –	A / N, Cl	0
Salvatore F1 (L3)	HR, A / –	HR, A / –	0
10416 (L3)	HR / –	HR / –	0
2166 (L3)	HR / –	HR / –	0
Medulas (L4)	A / –	A / –	0
El Lobo (L4)	HR / –	HR / –	0
10258 (L4)	HR / –	HR, Am / –	0
Sanakka Ichnigo (L4)	HR / –	HR, D / –	0
10255 F1 (L4)	HR / –	HR / –	0

El aislado CPMMoV-Sp proveniente de un muestreo en campo fue inoculado en veinte plantas de cada variedad en las dos primeras hojas verdaderas. ^a Los síntomas se registraron en hojas inoculadas y no inoculadas (lado izquierdo y derecho de la barra inclinada respectivamente) en diferentes días después de inoculación (DDI). Tipo de síntomas: (HR) Respuesta Hipersensible, (A) Abcisión, (NA) Necrosis Apical, (Abu) Abullonado, (Cl) Clorosis, (D) Deformación, (MS) Mosaico suave, (M) Mosaico, (N) Necrosis, (LN) Lesiones Necróticas, (Mo) Moteado, (NN) Necrosis Nervial, (Mch) Marchitez, (Am) Amarilleamiento.

^b Porcentaje de plantas inoculadas con resultado positivo a CPMMoV tras analizar hojas no inoculadas por hibridación molecular (HM) a los 34 DDI.



Figura 4.17. Síntomas de variedades de pimiento inoculadas con CPMMoV-Sp a los 27 días después de inoculación (DDI). Los números 1 y 2 se refieren a las hojas inoculadas y sistémicas no inoculadas, respectivamente. a) Ausencia de síntomas en hojas inoculadas y deformación, clorosis y necrosis en hojas sistémicas en la variedad no resistente Gaitanes; b) Respuesta de hipersensibilidad (HR) difusa en hojas inoculadas y deformación, clorosis y necrosis en hojas sistémicas en la variedad Garbino (L1); c) HR seguida de abscisión en hojas inoculadas y necrosis y clorosis en hojas sistémicas en la variedad BGHZ 3789 (L2); d) HR en hojas inoculadas y sin síntomas en hojas sistémicas de la variedad Salvatore (L3); e) HR en hojas inoculadas y sin síntomas en hojas sistémicas de la variedad Medulas (L4); f) Mosaico, abullonamiento y deformación observados en la variedad no resistente Leuna; g) Amarilleamiento y mosaico en hojas sistémicas en la variedad no resistente Luzea; h) Amarilleamiento en hoja inoculada en la variedad no resistente Luzea; i) Abullonado en hojas apicales en la variedad no resistente Sima-334; j) Mosaico y abullonado en la variedad no resistente Cor-01; k) Necrosis apical en la variedad no resistente Iker; l) Necrosis internerval en hojas sistémicas de la variedad no resistente Iker; m) Mosaico leve en hojas sistémicas de la variedad 2171 (L1).

4.3.6. Discusión

En el presente estudio hemos identificado un nuevo aislado del CPMMoV (CPMMoV-Sp; GenBank: OQ920979), detectándose tanto en Bizkaia como en Granada y siendo la primera vez que se identifica a nivel del continente europeo. La secuencia obtenida presentó un porcentaje de identidad del 99,2 % con CPMMoV (MN164455.1) presente en la base de datos GenBank. Sin embargo, las principales diferencias se localizaron en los extremos 5' de ambas secuencias, observándose una extensión de 22 nt en la secuencia obtenida en este trabajo. La caracterización de la secuencia terminal 5' se realizó utilizando una variante del protocolo RACE en el que se desarrolló un cebador tipo stem-loop para unirse al final de la cola poli(A) introducida, sin modificar ningún nucleótido de la secuencia viral. Este protocolo RACE modificado también reveló que el primer nucleótido terminal 5' era una citosina en lugar de la guanina presente en el 97,3 % (37 de 38) de los tobamovirus cuyos genomas completos estaban depositados en la base de datos. Sólo plumeria mosaic virus (NC_026816.1) presentó una citosina en los extremos 5'. La interrogante clave radica en si la presencia del residuo de citosina detectado en la secuencia de CPMMoV-Sp constituye una anomalía dentro del género Tobamovirus o si, por el contrario, resulta ser un efecto derivado de la aplicación del protocolo RACE modificado empleado en este estudio. En este sentido, el uso del protocolo RACE modificado también identificó una citosina en los extremos 5' del RNA 3 del prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) y alfalfa mosaic virus (AMV) que no estaba presente en todas las secuencias de ambos virus depositadas en la base de datos (datos no mostrados). En cualquier caso, la presencia o ausencia del residuo de citosina no afectó a la infectividad de los clones infectivos generados por el promotor 35S y el terminador PopI o por el promotor T7. Sin embargo, la extensión de 22 nt identificados en este trabajo en el extremo 5' fue crítica para la infección del virus, lo que sugiere que el CPMMoV depositado en la base de datos (MN164455.1) corresponde a una secuencia parcial.

Se ha demostrado que el uso de HM es una técnica poderosa para el diagnóstico rutinario de virus en plantas (Pallas et al., 2018; Sánchez-Navarro et al., 2019; Sánchez-Navarro et al., 2018). En el presente estudio hemos analizado cómo la hibridación molecular podría discriminar entre CPMMoV-Sp y BPeMV, dos virus con una identidad del 84,4 %, mediante el diseño de tres sondas diferentes que comparten porcentajes de identidad del 75,8 % y 80,6 % (sondas CPMMoV) o 89,4 % (sonda BPeMV). Los resultados revelaron que la hibridación molecular podía discriminar entre los dos patógenos que compartían un porcentaje de identidad de hasta el 89,4 % cuando la hibridación se realizaba a 68 °C. Sin embargo, cuando la temperatura se redujo en 8 °C, se produjo una hibridación cruzada con regiones que tenían porcentajes de identidad superiores al 80,6 %. Se realizaron observaciones similares con sondas dirigidas a regiones conservadas de potyvirus, donde la hibridación cruzada se produjo a 60 °C en regiones que mostraron hasta un 72,5 % de identidad (Sánchez-Navarro et al., 2018). También se ha explorado la posibilidad de incrementar el límite de detección de la técnica de hibridación molecular fusionando diferentes sondas del mismo virus en tándem. Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron que la fusión de dos sondas no mejoraba el límite de detección. Se realizarán más análisis para ver si la fusión de fragmentos adicionales podría tener un impacto en este aspecto. Finalmente, la comparación de los límites de detección entre hibridación molecular y RT-PCR para el análisis de CPMMoV reveló que la RT-PCR era 125

veces más sensible que la hibridación molecular, estando en el rango de estudios previos realizados con otros virus (Sánchez-Navarro et al., 1996; Sánchez-Navarro et al., 1998).

La transmisión de Tobamovirus por semillas es muy relevante en cultivos de pimiento, tomate y pepino (Genda et al., 2005). Debido a la alta estabilidad de las partículas virales de tobamovirus (Genda et al., 2005), estos virus suelen tener una alta capacidad para infectar plántulas mediante contacto mecánico con semillas o tejidos infectados (Genda et al., 2011). En el presente estudio, las tasas de transmisión de CPMMoV de semillas a planta variaron entre 0,9-8,5 % o 0-2,9 % en lotes de semillas no tratadas provenientes de plantas infectadas de forma natural o inoculadas mecánicamente, respectivamente. Se ha observado una fluctuación similar en la tasa de transmisión de semillas para otros tobamovirus. Por ejemplo, cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) presentó tasas de transmisión por semillas de 0,08-2,83 % dependiendo de la especie de cucurbitáceas (Al-Tamimi et al., 2010; Hui et al., 2011), mientras que tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) presentó tasas de transmisión por semillas de 0,08-1,8 % (Davino et al., 2020; Salem et al., 2022). En las especies de *Capsicum*, también se observaron tasas de transmisión de tobamovirus en las semillas desde 0 a 65,3 % (Demski, 1981; McKinney, 1952; Tosic et al., 1980; Nagai, 1981). Esto indica que la transmisión de semillas de tobamovirus podría verse influenciada no sólo por el virus y/o la especie huésped, sino también por las condiciones ambientales. En este sentido, los factores que afectan a las tasas de transmisión del virus de semilla a planta incluyen el cultivar, los aislados del virus, las condiciones ambientales, el momento de la infección y/o incluso los fenómenos de sinergismos virales (Montes y Pagán, 2019; Simmons y Munkvold, 2014). Las semillas utilizadas en este estudio se extrajeron directamente de frutos infectados y no se les aplicó ningún tratamiento físico, químico o enzimático antes de la siembra. Los tratamientos de desinfección utilizados por las empresas de semillas podrían disminuir la tasa de transmisión en las semillas comerciales; sin embargo, se necesitan pruebas específicas para determinar qué método de desinfección es el más eficaz para prevenir la transmisión por semilla del CPMMoV.

Algunas especies de *Capsicum* expresan resistencia mediante el mecanismo de HR contra los tobamovirus, que es proporcionada por alelos del gen 'L': L1, L2, L3 y L4 (Tomita et al., 2008, 2011). En el presente estudio, las variedades con genes de resistencia L2, L3 y L4 fueron resistentes al CPMMoV-Sp, mientras que algunas plantas (20-40 %) de las tres variedades con el gen L1 resultaron infectadas. El hecho de que sólo un 20-40 % de las plantas L1 estuvieran infectadas podría sugerir que la resistencia a L1 inhibe parcialmente la infección del virus, aunque no podemos descartar otros factores como la concentración del virus en el inóculo, la penetrancia del gen L1, y las condiciones climáticas, entre otras variables (Gallois et al., 2018). Nuestros resultados contrastan con un estudio previo (Vélez-Olmedo et al., 2021) que informaron que toda la serie alélica L1-L4 era resistente a CPMMoV, abriendo la posibilidad de que el aislado CPMMoV-Sp superara específicamente la resistencia L1. En la investigación de Vélez-Olmedo et al. (2021), se registró una reacción de HR difusa atípica, produciendo lesiones necróticas locales débiles, así como necrosis en los nervios de las hojas inoculadas de plantas con el gen de resistencia L1. De manera similar, en este estudio también se observó una HR difusa, pero sin necrosis nervial en las hojas inoculadas de las variedades con L1 (Tabla 2 y Figura 8). Además, en las hojas superiores no inoculadas de las variedades que portaban genes de resistencia L1 y L2 se observaron síntomas como mosaicos suaves, necrosis, necrosis nervial

y clorosis. No obstante, únicamente resultaron positivas por HM las variedades con L1 al analizar hojas sistémicas. Los resultados fenotípicos positivos observados en las hojas superiores no inoculadas de la variedad portadora de L3 se correlacionaron con una carga viral baja (virus detectado sólo por RT-PCR), lo que plantea la cuestión de si la acumulación de virus observada podría ser suficiente para transmitir CPMMoV mecánicamente. Será necesario realizar análisis adicionales para responder a esta pregunta.

Finalmente, se hicieron análisis mediante la HM durante varios años con el objetivo de determinar la prevalencia e impacto de CPMMoV-Sp en cultivos de pimiento y guindilla en el País Vasco. En 2019, se detectó CPMMoV-Sp en 10 de 128 parcelas prospectadas, lo que indica una prevalencia del 7,8 %. Estas muestras fueron identificadas como positivas con la sonda de HM diseñada para detectar BPeMV ya que todavía no se tenía constancia de este virus. Tras las investigaciones realizadas en este trabajo se confirmó que realmente se trataba de CPMMoV-Sp. En muestreos realizados en 2021 de forma aleatoria en cuatro parcelas de agricultores de guindilla de Ibarra en condiciones de cultivo al aire libre, se detectó CPMMoV-Sp en una de las parcelas. La incidencia de virus en esta parcela fue del 52,5 % (21 de 40) al final del ciclo de cultivo. En algunas de estas muestras también se detectaron co-infecciones con CMV. En muestreos realizados en la misma parcela al final de la siguiente campaña (2022), se detectaron incidencias de CPMMoV-Sp del 16,6 %, con 5 plantas positivas sobre 30 muestreadas aleatoriamente, en el cultivar sensible "Ibarroria", mostrando todas ellas coinfección con CMV. Sin embargo, la incidencia fue nula (55 plantas muestreadas al azar) en el cultivar resistente "Irribarra" que portaba el gen de resistencia L3, lo que indica que esta resistencia controla eficazmente al tobamovirus en condiciones de campo. Recientemente, CPMMoV también ha sido identificado en plantas solanáceas ornamentales como calibrachoa (*Calibrachoa* spp.) en Estados Unidos (Groth-Helms et al., 2022), lo que representa un riesgo epidemiológico para otros cultivos hortícolas y ornamentales de la familia *Solanaceae*, y confirma la expansión de este virus a otras regiones alejadas del foco inicial de identificación en Perú (Vélez-Olmedo et al., 2021). En consecuencia, es recomendable realizar estudios en cultivos y flora silvestre cercana a los cultivos, así como análisis de lotes de semillas, con el fin de prevenir una mayor propagación de CPMMoV y mitigar así su impacto en especies de plantas agrícolas y ornamentales que no dispongan de resistencias a este virus.

4.4. Programa de mejora genética por retrocruzamiento para obtener variedades resistentes de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra a Tobamovirus y otros virus

4.4.1. Marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia L3 y L4 probados en el material vegetal de mejora

Al analizar el comportamiento de distintos marcadores moleculares en el material vegetal de mejora, únicamente 5 de los 13 marcadores evaluados para el gen L3 lograron distinguir entre plantas susceptibles y resistentes (Tabla 4.14). Estos marcadores fueron YB2A25, YB2A19, 189D23M (YB), A214(YB) y A339(YB). De ellos, 189D23M(YB) y A339(YB) también resultaron efectivos en amplificar productos de PCR en plantas portadoras del gen L4. No obstante, solamente YB2A19 demostró ser un marcador codominante, facilitando la diferenciación entre plantas homocigotas resistentes y heterocigotas. La validez de este marcador se corroboró en la generación RC4-F3 (Anexo XII).

Tabla 4.14. Marcadores moleculares asociados al gen de resistencia a Tobamovirus L3 que fueron evaluados para ver su comportamiento al analizar plantas del programa de mejora resistentes y sensibles.

Marcador	Tipo	Primer sequences	Amplification	Observations
PMFR11	SCAR	5'-CTGCAGAACAACAAATGGCACG-3' 5'-GGACTGCAGAGGAGGAAGC-3'	Si	
253A1R	SCAR	5'-GCTTCTCCCAAATGTAGCA-3' 5'-CTCAAACGAGTCATGGCTGA-3'	Si	
189D23M(NB)	SCAR	5'-ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA-3' 5'-TACTATGCACAGGGTCTAGG-3'	Si	Amplifica tanto positivos como negativos
YB2A14	SCAR	5'-GCGCTTCTGATGATAAGCCA-3' 5'-GCATCTGATTCTCACGTTGA-3'	Si	
IHI-18	SNPs	5'-TTTTTCTCAACATAAAGGAGAAGTCG-3' 5'-CCACAGAAGTTGCAGGTGTTCT-3'	Si	
A214(YB)	SCAR	5'-ATGAGAAAAAGATCTGTGTTTTTC-3' 5'-CATGGTTTTAGGGTTGGGATA-3'	Si	Marcador dominante
YB2A25(NK&YB)	SCAR	5'-ATGTCCGTCACGGCCAGGCA-3' 5'-CGGCAAATCCCCGTTAGTT-3'	Si	
189D23M(YB)	SCAR	5'-ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA-3' 5'-AACGACAAGGGTTTATTGTATGC-3'	Si	Marcador dominante.
A339(YB)	SCAR	5'-GTTTTACATGAAACGCGTTC-3' 5'-GAAGATAGTGGTGGAGAAAA-3'	Si	También amplifica plantas con gen L4
YB2A19(NK)	SCAR	5'-TATGCTGCTGCGGAAAATG-3' 5'-CACCGAACAAATCTACGAGC-3'	Si	Marcador codominante
A339(NK)	SCAR	5'-TCTCGGTAGGCCATTTTGCT-3' 5'-GTAAGTTGCTATGCCACCA-3'	No	
IHI-04	SCAR	5'-GGAAGTAAGATCATTGTGACGACTA-3' 5'-CCCTATTTTCTAGAGAATGTCGT-3'	No	
PMFR21	SCAR	5'-GCCAAAATGGTAATTGAAAC-3' 5'-GGACTGCAGAGGAGGAAGC-3'	No	

De los siete marcadores moleculares utilizados para identificar plantas con el gen L4, solo dos (L4SC340, 189D23M) permitieron la correcta identificación de plantas resistentes y susceptibles en nuestro material de mejora (Tabla 4.15). Estos marcadores moleculares fueron

descritos como codominantes y deberían discriminar plantas homocigotas de las heterocigotas. Sin embargo, estos dos marcadores no discriminaron entre plantas resistentes homocigotas y heterocigotas en las generaciones segregantes como la RC4-F3 del programa de mejora (Anexo XII), comportándose en nuestro material vegetal como marcadores dominantes. Finalmente, entre los marcadores descartados algunos no funcionaron, otros amplificaron dando falsos positivos y otros amplificaron tanto positivos como negativos, no permitiendo la discriminación del material evaluado.

Tabla 4.15. Marcadores moleculares asociados al gen de resistencia a Tobamovirus L4 que fueron evaluados para ver su comportamiento al analizar plantas del programa de mejora resistentes y sensibles.

Marker	Type	Primer sequences	Amplificación	Observations
189D23M(YB)	SCAR	5'-ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA-3' 5'-AACGACAAGGGTTTATTGTATGC-3'	Si	Marcador dominante
L4SC340	SCAR	5'-AAGGGGCGTTCTTGAGCCAA-3' 5'-TCCATGGAGTTGTTCTGCAT-3'	Si	
158K24HRM	SCAR	5'-CAGATTAAGTGTTCAAAATGAGTGATG-3' 5'-TGATTCCATGAAAATAAATTGTAAGA-3'	Si	Falsos positivos
087H3T7	SNPs	5'-CCTTGCCTGCATTATTCTTG-3' 5'-GCCCAAATTTATTCCCAAATGC-3'	Si	Amplifican tanto los resistentes como los sensibles
L4seg	SNPs	5'-TGTGAGAATCTTGAATATTTTCGG-3' 5'-CTTTGCGCAAGAGTGGATATTC-3'	No	
AP7/AP8	SCAR	5'-CGTACTGTGGCTCAAACCTC-3' 5'-ATTCGCACCGTTTAGCCCGT-3'	No	
087H3T7HRM	SNPs	5'-CATGATTACATTTTATGTTGC-3' 5'-AAAAGGAAGTTCTCATTGTT-3'	No	

4.4.2. Genotipado de la resistencia a tobamovirus

En el marco del programa de mejora, se llevó a cabo la evaluación de la generación RC4-F3, obtenida tras la primera autofecundación de los genotipos del RC4-F2 (Figura 3.8). De esta generación en particular, se seleccionaron exclusivamente aquellas plantas que eran homocigotas resistentes (Anexo XII) para someterlas a una segunda autopolinización y así fijar el gen de resistencia en homocigosis para las futuras generaciones. A partir de la evaluación de la generación RC4-F3, se observó que los alelos L3 y L4 seguían un modelo de herencia dominante monogénica. Así, para la siguiente generación, RC4-F4, tras haber seleccionados los genotipos homocigóticos resistentes, se esperaba que el 100 % de las plantas resultantes fueran homocigotas resistentes.

Centrándonos en la última generación del programa de mejora (RC4-F4), los resultados obtenidos con el marcador codominante YB2A-19 en diferentes genotipos con gen L3, mostraron que todas las plantas evaluadas fueron homocigotas resistentes para el gen L3, observándose una banda única de 750 pb (Figura 4.18a). De las 20 plantas de genotipos DP evaluadas, 17 (85 %) se identificaron como homocigotos resistentes, mientras que 3 (15 %) se clasificaron como N/A porque no hubo amplificación por PCR. Además, las 20 plantas evaluadas de los genotipos IP (100 %) fueron homocigotas resistentes para el gen L3 (mostrando la banda mencionada anteriormente), mientras que la variedad híbrida "Palermo F1" con el gen L3 mostró el gen de resistencia en heterocigosis, dando como resultado dos bandas (750 pb el alelo resistente y 660 pb el alelo recesivo) al realizar la reacción de PCR con

este cebador. En contraste, las variedades "Derio" e "Ibarroria" no exhibieron un gen de resistencia, manifestando una sola banda (660 pb), que representaba el alelo sensible.

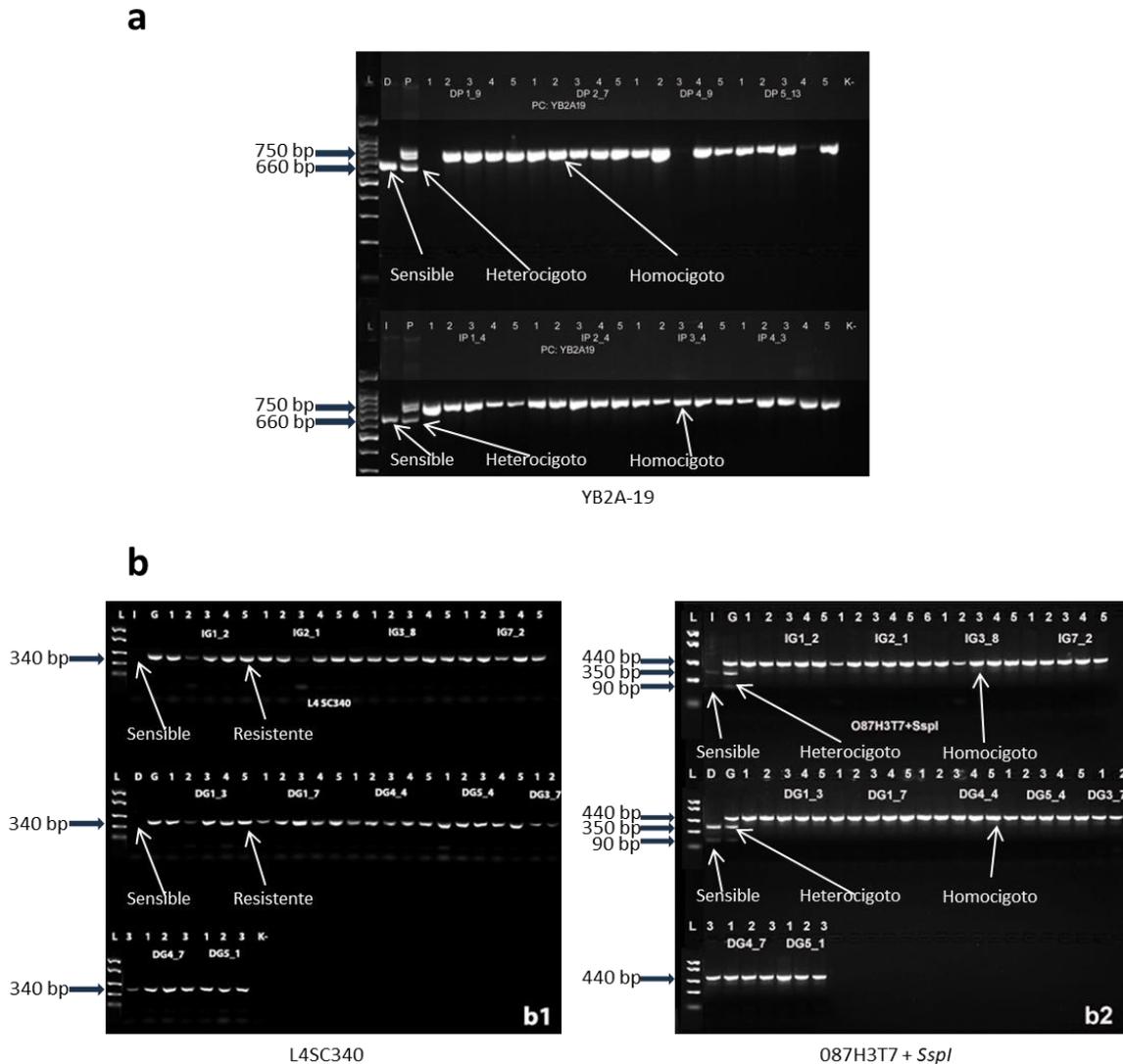


Figura 4.18. Análisis PCR de la generación RC4-F4. a) Análisis con el marcador YB2A-19 ligado al gen L3, mostrando resultados para cuatro genotipos del cruce "Derio" x "Palermo" (DP1-9, DP2-7, DP4-9, DP5-13) y cuatro genotipos del cruce "Ibarroria" x "Palermo" (IP1-4, IP2-4, IP3-4, IP4-3). b1) Datos obtenidos con el marcador L4SC340, relacionado con el gen L4, para cuatro genotipos del cruce "Ibarroria" x "Giulio" (IG1-2, IG2-1, IG3-8, IG7-2) y siete genotipos del cruce "Derio" x "Giulio" (DG1-3, DG1-7, DG4-4, DG5-4, DG3-7, DG4-7, DG5-1). b2) Resultados con el marcador O87H3T7 y la enzima de restricción *SspI*, analizando los mismos genotipos que en b1. Las siglas representan: D = "Derio"; I = "Ibarroria"; P = "Palermo"; G = "Giulio"; L = Marcador de peso molecular; K = Control negativo. Todas las muestras se procesaron en geles de agarosa al 2 % en buffer 1xTBE.

Todas las plantas de los genotipos IG y DG evaluadas mediante el marcador L4SC340 exhibieron una banda de amplificación de 340 pb, confirmando la presencia del gen L4 en estas plantas (Figura 4.18, b1). Esto contrasta con las variedades sensibles "Ibarroria" y "Derio", que no mostraron amplificación, de la misma forma que se observó en la generación previa (Anexo XII). Posteriormente, se analizaron todas las muestras utilizando el marcador O87HT7 en conjunto con la enzima de restricción *SspI*, la cual dividía el alelo recesivo en dos segmentos (350 y 90 pb). Los resultados indicaron que el 100 % de las plantas de ambos tipos de genotipos, tanto IG como DG, eran homocigotas resistentes, evidenciado por una única

banda de 440 pb tras la reacción PCR y la aplicación del enzima de restricción mencionada (Figura 4.18, b2). Sin embargo, la variedad híbrida “Giulio” se identificó como heterocigótica para el gen de resistencia L4, presentando tres bandas (440, 350 y 90 pb). En contraste, las variedades sensibles “Derio” e “Ibarroria” no demostraron tener el gen de resistencia, revelando dos bandas tras realizar la PCR (350 y 90 pb).

4.4.3. Inoculación de diferentes tobamovirus en los genotipos obtenidos

Tras la inoculación mecánica con los patotipos de PMMoV (P1.2 y P1.2.3) y con el nuevo tobamovirus CPMMoV, se monitorearon semanalmente durante un mes los síntomas provocados por los virus en los diferentes genotipos obtenidos (RC4-F4) así como en los parentales empleados en el programa de mejora (sensibles y resistentes). En los genotipos resistentes a los virus inoculados, se detectó una respuesta de hipersensibilidad (HR) que consistió en el desarrollo de lesiones necróticas locales en el punto de contacto con el virus. Esta respuesta estuvo seguida por la abscisión de las hojas afectadas, un mecanismo para evitar la transmisión del virus al resto de la planta. Por el contrario, las variedades sensibles “Derio” e “Ibarroria” no mostraron HR en las hojas inoculadas, aunque presentaron síntomas de enfermedad (o ausencia de estos) en las hojas no inoculadas. Todos estos síntomas fueron documentados (Tabla 4.16) y permitieron clasificar a los distintos genotipos en resistentes o sensibles frente a estos virus.

Para el virus CPMMoV (Figura 4.19), todas las variedades y genotipos obtenidos con genes de resistencia (L3 y L4) exhibieron una respuesta hipersensible (HR) a los 7 DDI. La abscisión de las hojas inoculadas en los genotipos obtenidos ocurrió a los 13 DDI, de la misma manera que en los híbridos comerciales. Por el contrario, las variedades sensibles como “Derio” e “Ibarroria” comenzaron a mostrar síntomas de la enfermedad a los 20 DDI, siendo “Derio” la que manifestó necrosis (27 DDI) y ambas variedades clorosis y mosaicos. A los 34 DDI, entre el 95 % y el 100 % de las plantas que carecían de genes de resistencia resultaron infectadas, mientras que las variedades resistentes y los genotipos obtenidos no se vieron afectados, aunque algunas plantas mostraron síntomas en hojas sistémicas.

Tabla 4.16. Evaluación de la resistencia de los genotipos de la generación RC4-F4 inoculados con los virus a PMMoV (Patotipos 1.2 y 1.2.3) y CPMMoV. Los síntomas mostrados por cada genotipo fueron registrados semanalmente y el análisis por HM para confirmar la infección se realizó a los 34 días después de la inoculación (DDI). Se evaluaron tanto los cultivares locales sensibles (“Derio” e “Ibarroria”) como las variedades híbridas resistentes (“Palermo” y “Giulio”) empleadas en la obtención de los nuevos genotipos resistentes. Los genotipos DP e IP con el gen L3 fueron inoculados con el patotipo P1.2, mientras que los genotipos DG e IG con el gen L4 fueron inoculados con el patotipo P1.2.3. Todos los genotipos fueron inoculados con CPMMoV.

Genotipo- Variedad	CPMMoV					PMMoV					
	DDI					DDI					
	7	13	20	27	Plantas infectadas (%)	Patotipo	7	13	20	27	Plantas infectadas (%)
“Derio”	^a _/ _	_/ _	_/Cl, M	_/ Chl, M, N	95 ^b	1.2	^a _/ _	_/ _	_/M	_/Cl, M, N	95 ^b
“Ibarroria”	_/ _	_/ _	_/Cl, M	_/ Chl, M	100	1.2	_/ _	_/ _	_/M	_/Cl, M, N	100
“Palermo” (L3)	HR/ _	HR, A / _	HR, A / _	A / _	0	1.2	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0
“Giulio” (L4)	HR/ _	A / _	A / _	A / _	0	1.2	HR/ _	HR, A / _	HR, A / _	A / _	0
DP1-9	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / Cl(1), PN (1)	0	1.2	HR, A/ _	HR, A / _	A /PN (2)	A /NP(3)	0
DP2-7	HR/ _	HR, A / _	A / _	A /Cl(1)	0	1.2	HR, A/ _	HR, A / _	A /PN (4)	A /PN (4), Cl(4)	0
DP4-9	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN (1)	A /PN (1)	0
DP5-13	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN (1)	A /PN (3)	0
IP1-4	HR/ _	A / _	A / N (1)	A / PN(1), N(1)	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN(2), Cl(2)	A /PN (2), Cl(2)	0
IP2-4	HR/ _	A / _	A / _	A / _	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN(2), Cl(2)	A /PN (2), Cl(2)	0
IP3-4	HR/ _	A / _	A / _	A /PN(1)	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN(2), Cl(1)	A /PN (2), Cl(2), N(1)	0
IP4-3	HR/ _	A / _	A / _	A / _	0	1.2	HR, A/ _	A / _	A /PN(1), Cl(1)	A /PN (1), Cl(1), N(4)	0
“Derio”	-	-	-	-	-	1.2.3	_/ _	_/ _	_/ D	_/ D	95
“Ibarroria”	-	-	-	-	-	1.2.3	_/ _	_/ _	_/ M	_/ M	100
“Palermo” (L3)	-	-	-	-	-	1.2.3	_/ _	_/ _	_/ _	_/ _	95
“Giulio” (L4)	-	-	-	-	-	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0
DG1-7	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1), Cl(2)	A /Cl(3)	0
DG3-3	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	HR, A / _	A / _	0
DG3-7	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / N(1)	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1)	A /PN (1), Cl(1)	0
DG4-4	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1), Cl(1)	A / Cl(1), N(1)	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1)	A /PN (2)	0
DG5-1	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	HR, A / _	A /PN (3), Cl(1)	0
IG1-2	HR/ _	A / _	A / _	A / _	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A / _	A / _	0
IG2-1	HR/ _	A / _	A / _	A / _	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1)	A /NP(2)	0
IG3-8	HR/ _	A / N(1)	A / N(1)	A / N (1)	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (2), Cl(2)	A /PN (2), Cl(2)	0
IG7-2	HR/ _	A / N(1)	A / N(1), Cl(1)	A / N (7)	0	1.2.3	HR/ _	HR, A / _	A /PN (1), Cl(1)	A /PN (1), Cl(1)	0

Se inoculó un lote separado de 20 plantas por cada genotipo con uno de los tres tobamovirus en las dos primeras hojas verdaderas basales. ^a Los síntomas en hojas inoculadas y no inoculadas (en los lados izquierdo y derecho de la barra inclinada, respectivamente) se registraron en varios días después de inoculación (DDI). Tipos de síntomas: (HR) Respuesta Hipersensible, (A) Abscisión, (Cl) Clorosis, (D) Deformación, (M) Mosaico, (N) Necrosis, y (PN) Puntos Necróticos. ^b Porcentaje de plantas inoculadas con resultado positivo a CPMMoV o PMMoV analizadas en las hojas no inoculadas por HM a 34 DDI. Los números arábigos entre paréntesis indican la cantidad de plantas que mostraron ese síntoma en particular. Como control se utilizaron parentales resistentes (“Palermo” y “Giulio”) y sensibles (“Derio” e “Ibarroria”), a los que solo se les frotó con carborundo y tampón sin virus (datos no mostrados en la tabla), que no mostraron ni síntomas ni infección.

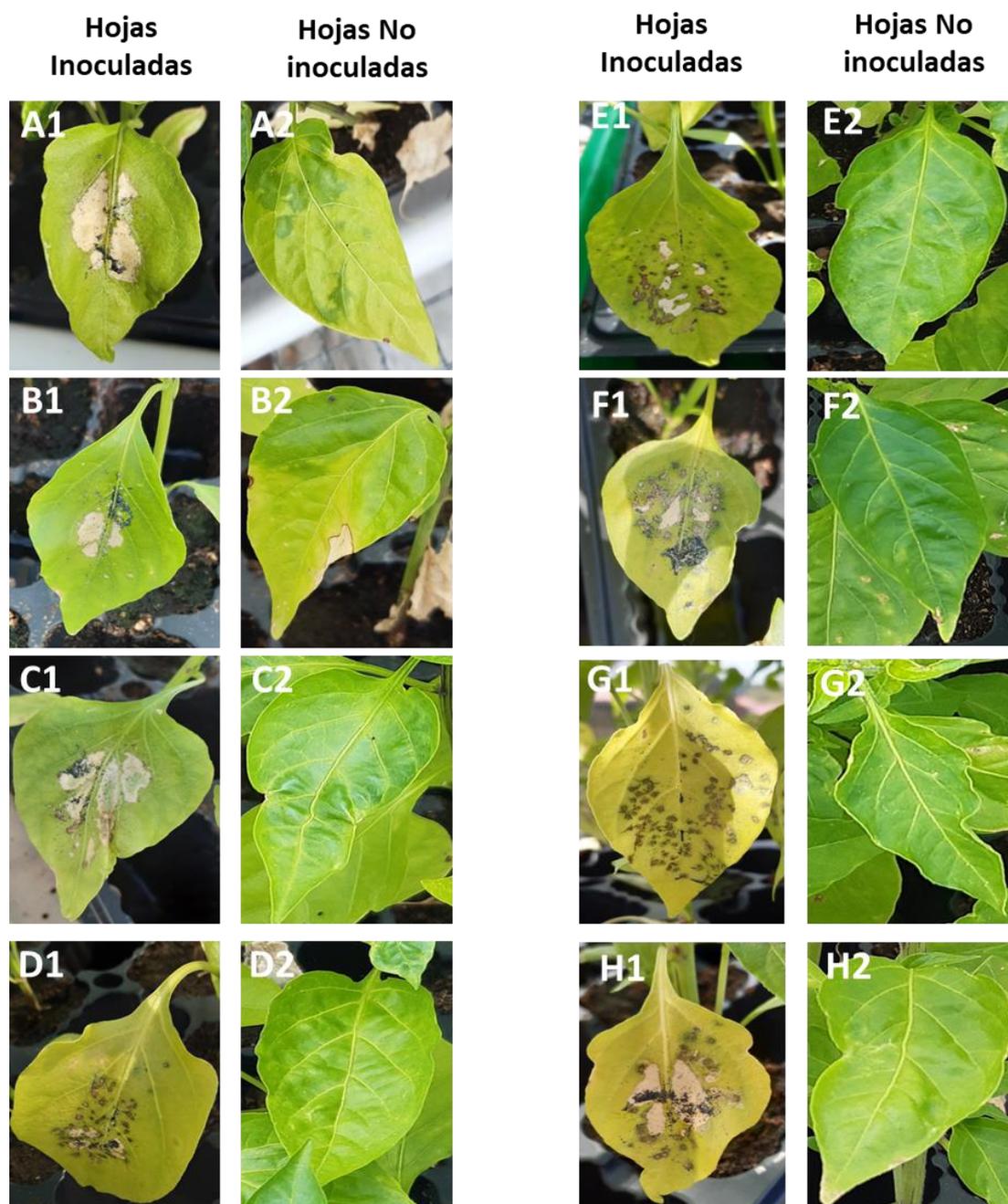


Figura 4.19. Síntomas observados en el bioensayo de inoculación de CPMMoV. Los números 1 (a 7 DDI: días después de inoculación) y 2 (a 27 DDI) se refieren a las hojas inoculadas y sistémicas no inoculadas, respectivamente. Las letras A-H se refieren a diferentes genotipos inoculados con CPMMoV. A) "Ibarrorria"; B) "Derio"; C) "Palermo"; D) "Giulio"; E) DP49; F) DG47; G) IP24; H) IG72.

Cuando las plantas fueron inoculadas con el patotipo P1.2 de PMMoV, los genotipos obtenidos que poseían el gen de resistencia L3 mostraron síntomas de HR en las hojas inoculadas (Figura 4.20A) y la abscisión fue observada en tan solo una semana. Por el contrario, las variedades híbridas resistentes "Palermo" y "Giulio" sólo mostraron HR a 7 DDI. A los 20 DDI, las variedades sensibles comenzaron a presentar síntomas típicos de virosis en hojas no inoculadas, como son los mosaicos, que fueron acompañados a los 27 DDI por necrosis y clorosis. Casi todas las plantas sin genes de resistencia sucumbieron a la infección (95-100 %) a 34 DDI cuando fueron analizadas por HM. Por el contrario, los genotipos DP e IP, junto con

"Palermo" y "Giulio", demostraron resistencia, aunque se observaron algunos síntomas en algunas hojas no inoculadas de estas plantas al final del ensayo.

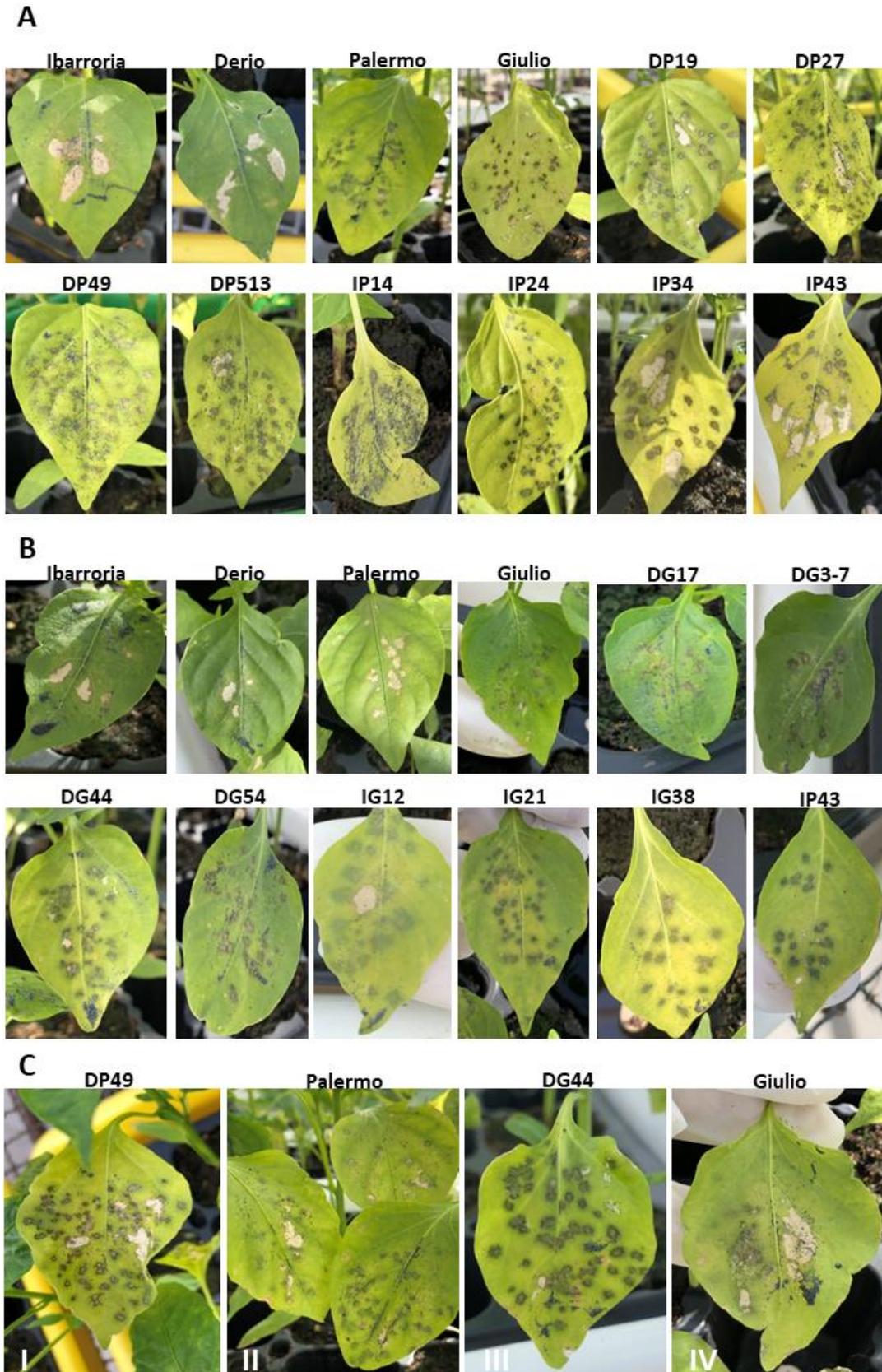


Figura 4.20. Síntomas observados en el bioensayo de inoculación de PMMoV a los 7 días después inoculación (DDI) en hojas inoculadas. A) Genotipos inoculados con el patotipo P1.2. B) Genotipos

inoculados con el patotipo P1.2.3. C) Evaluación de síntomas de hojas inoculadas con PMMoV en I) genotipo DP4-9 con gen L3 homocigótico e inoculado con patotipo P1.2; II) variedad híbrida “Palermo” con gen L3 heterocigoto e inoculada con patotipo P1.2; III) genotipo DG4-4 con gen L4 homocigoto e inoculado con el patotipo P1.2.3; y IV) variedad híbrida “Giulio” con gen L4 heterocigoto e inoculada con el patotipo P1.2.3. Se observó una HR más rápida en los genotipos homocigotos.

Tras la inoculación con el patotipo P1.2.3 de PMMoV, tanto la variedad comercial “Giulio” como los genotipos obtenidos en el programa de mejora que portaban el gen de resistencia L4 mostraron HR a los 7 DDI (Figura 4.20B). Sin embargo, las variedades sensibles “Derio” e “Ibarroria” comenzaron a manifestar síntomas de enfermedad a los 20 DDI, mostrando “Derio” deformación en las hojas e “Ibarroria” mosaicos. Cabe destacar que la variedad “Palermo” no exhibió síntomas ni en hojas inoculadas ni en las sistémicas. Los genotipos obtenidos con el gen L4 homocigoto exhibieron HR a 7 DDI y abscisión de hojas a 13 DDI, y solo unas pocas plantas mostraron síntomas aislados en hojas no inoculadas. La mayoría de las plantas no resistentes, incluida “Palermo”, se encontraban infectadas a los 34 DDI, mientras que la variedad “Giulio” con el gen L4 resistió a la infección.

La evaluación de los síntomas después de una semana de inoculación con PMMoV determinó que generalmente la muerte celular asociada a HR ocurrió más rápidamente en plantas homocigotas resistentes con genes L3 y L4 que en los híbridos heterocigotos comerciales (Figura 4.20C).

4.4.4. Comportamiento agronómico de los genotipos y la selección de los más productivos.

En 2021 se observaron diferencias significativas entre genotipos del tipo varietal Gernika, tanto en el número de frutos total por planta ($P < 0,0001$) como en el peso de frutos total por planta (gramos) ($P = 0,0009$) (Figura 4.21). El genotipo que produjo mayor número de frutos por planta fue DG37 (199.9), siendo significativamente superior a todas las demás líneas y a la variedad “Derio”. La siguiente línea más productiva fue DG44 (172,1) seguida por DP49 (151,6), DP513 (149,5) y “Derio” (144,1). Sin embargo, los genotipos que produjeron mayor peso de fruto por planta (gramos) fueron “Derio” (2085.9), DP513 (2045.3) y DP49 (2029.0). El genotipo DG37, que produjo más frutos por planta, presentó una producción significativamente menor en peso (1723,2). Este suceso se produjo debido a que el promedio de peso por fruto resultó ser significativamente más bajo en este genotipo, así como en los genotipos DG13 y DG44, en contraste con los otros genotipos y la variedad conocida como “Derio”, pertenecientes al tipo varietal Gernika (Figura 4.22). En el tipo varietal de guindilla de Ibarra se observaron diferencias significativas entre genotipos, tanto en el número ($P = 0.0003$) como en el peso (gramos) ($P = 0.0004$) de frutos inmaduros por planta. Los genotipos que produjeron más frutos por planta fueron la línea IP24 (386.3) y la variedad “Ibarroria” (375.2), siendo también los que produjeron mayor peso total de frutos por planta, 1413.2 y 1551.5 gramos, respectivamente. Para seleccionar los genotipos más productivos, se priorizó la variable peso total de frutos por planta sobre la variable número total de frutos por planta. Las líneas de mayor rendimiento del tipo varietal Gernika seleccionadas para el próximo año fueron DP49, DP513, DG37, DG44 y DG47 y para el tipo varietal guindilla de Ibarra fueron IP24, IP43, IG28, IG38 e IG72. En general, los genotipos DG produjeron un menor peso total de frutos por planta

que los genotipos DP. En cuanto al tipo varietal guindilla de Ibarra, IP24 destacó frente a los demás genotipos obtenidos y mostró un rendimiento muy parecido a la variedad “Ibarroria”.

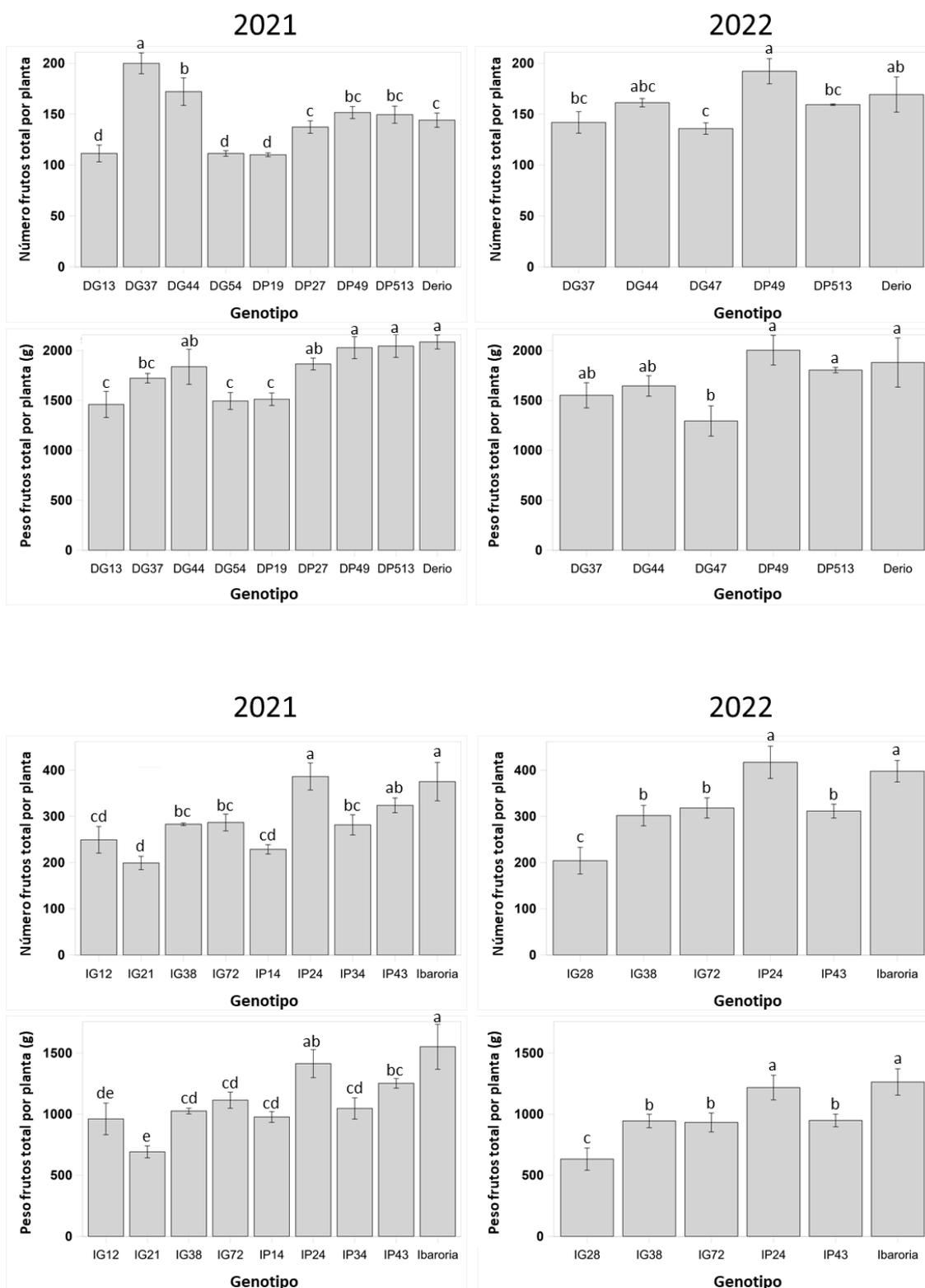


Figura 4.21. Efecto del genotipo del pimiento sobre la producción del cultivo. Número total y peso total (gramos) de frutos inmaduros por planta ordenados por año (2021; 2022) y tipo varietal (Pimiento de Gernika: “Derio”, DP, DG; Guindilla de Ibarra: “Ibarroria”, IP, IG). Valores medios (altura de columnas) ($n=3$) \pm error estándar (barras verticales). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD) ($P<0,05$). La densidad de cultivo fue

de 18.939 y 15.150 plantas ha⁻¹ en 2021 y 2022, respectivamente. El sistema de cultivo fue en invernadero en suelo con fertirrigación.

En 2022, el tipo varietal Gernika mostró diferencias significativas entre genotipos, tanto en el número ($P = 0,023$) como en el peso (gramos) ($P = 0,0008$) de frutos por planta. El genotipo que más produjo en número total de frutos por planta fue DP49 (192.2), seguido de “Derio” (169.3), DG44 (161.3) y DP513 (159.3). El genotipo DP49 no mostró diferencias significativas con “Derio” y DG44, pero sí con los demás genotipos de pimiento. Los genotipos que mejor se comportaron en peso total de frutos por planta fueron DP49 (2003.9), “Derio” (1880.4), DP513 (1804.3) y DG44 (1645.7), sin diferencias significativas entre ellos. Los mejores genotipos de pimiento de Gernika con el gen L3 fueron DP49 y DP513, mostrando DP49 una mejor producción temprana (datos no mostrados) en comparación con la variedad “Derio”. Los mejores genotipos de pimiento de Gernika con el gen L4 fueron DG37 y DG44, sin diferencias significativas con respecto a la variedad “Derio”. En el tipo varietal guindilla de Ibarra se observaron diferencias significativas entre genotipos, tanto en el número ($P = 0.0008$) como en el peso (gramos) ($P = 0.0021$) de frutos por planta. Los mejores genotipos fueron IP24 e “Ibarroria” en términos de número total de frutos por planta (417,1 y 397,8, respectivamente) y también en términos de peso total de frutos por planta (1217,8 y 1263,2, respectivamente) y se diferenciaron significativamente del resto de genotipos. Sin embargo, hubo diferencias significativas en el peso medio por fruto entre “Ibarroria” e IP24 (Figura 4.22). Los mejores genotipos con el gen L4 fueron IG38 e IG72, pero mostraron menor rendimiento que “Ibarroria” e IP24.

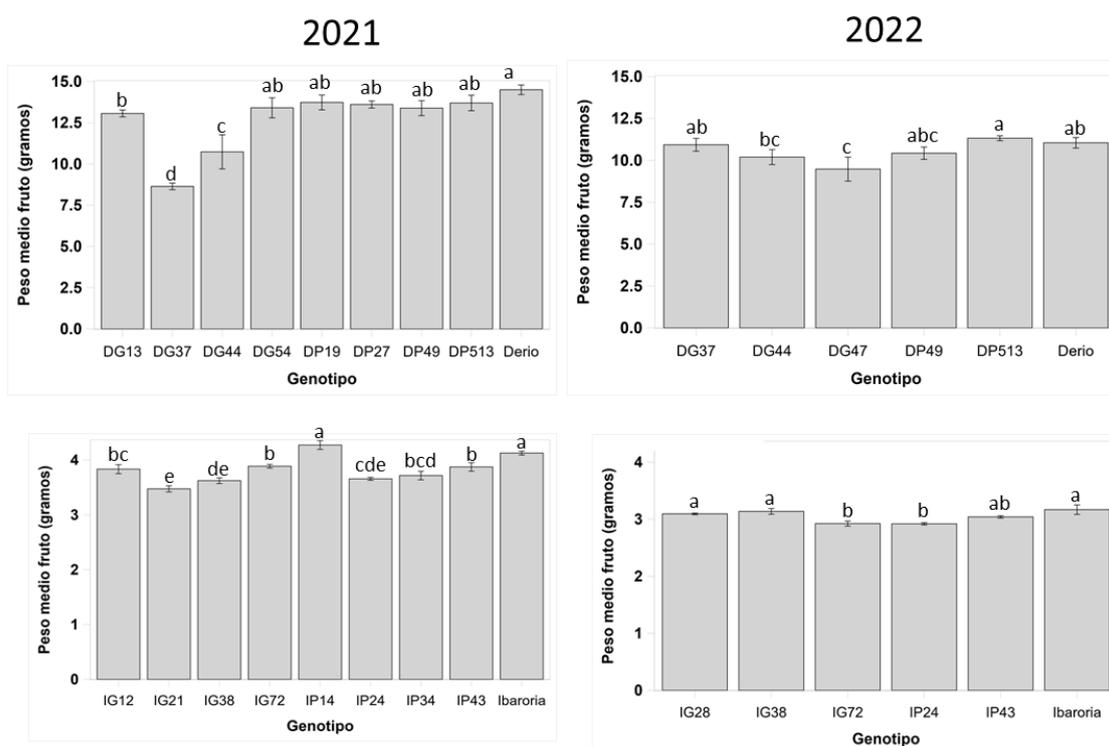


Figura 4.22. Comparación del peso medio de los frutos de varios genotipos obtenidos y de las variedades sensibles evaluadas en los ensayos de producción de 2021 y 2022, categorizados por tipos varietales: Pimiento de Gernika (Sección superior: Derio, DP y DG) y Guindilla de Ibarra (Sección inferior: Ibarroria, IP e IG).

Tras el ensayo de germinación, se detectaron problemas de germinación en los genotipos DG de la generación RC4-F5. Las tasas de germinación oscilaron entre el 40 % (mínimo) y el 88 % (máximo) en las distintas parcelas evaluadas para estos cruces (DG), con una media del 66.9 % (Tabla 4.17). La mayoría de los otros genotipos evidenciaron tasas de germinación satisfactorias, con la excepción del genotipo DP49 del pimiento de Gernika, el cual registró una tasa de germinación del 71,7 %.

Tabla 4.17. Tasas de germinación de los genotipos evaluados en la generación RC4-F5, tras obtener las semillas de cada parcela del ensayo de producción realizado en 2021.

Genotipo	Germinación (%)	*EE	Tipo cruzamiento (%)	EE Tipo cruzamiento
DP1-9	93,7	2,3	86,9	3,2
DP2-7	92,3	3,2		
DP4-9	71,7	5,8		
DP5-13	90,0	3,6		
DG1-3	65,0	3,5	66,9	4,0
DG3-7	60,7	14,3		
DG4-4	75,0	2,5		
DG5-4	67,0	8,7		
IP1-4	96,0	0,6	95,5	0,7
IP2-4	96,3	1,2		
IP3-4	94,0	2,0		
IP4-3	95,7	1,5		
IG1-2	95,7	1,9	92,8	1,4
IG2-1	87,3	2,2		
IG3-8	92,3	3,3		
IG7-2	96,0	1,0		
Derio	91,0	0,6	91	0,6
Ibarroia	92,0	0,6	92	0,6

*EE: Error estándar (Desviación estándar/ $\sqrt{3}$)

Además, las plantas de genotipos DG experimentaron una germinación más tardía, irregular, con menor vigor y deformaciones en el ápice principal de las plantas. En un ensayo realizado en condiciones de un vivero comercial, de un total de 720 plántulas pertenecientes al genotipo DG37, se registró que un 25 % mostró un crecimiento reducido y un 10 % presentó anomalías en el desarrollo de los tallos apicales (Figura 4.23).



Figura 4.23. Plántulas del genotipo DG37 mostrando anomalías en la germinación llevada a cabo en un vivero de hortícolas profesional de Lezama (Bizkaia). La variabilidad en la germinación se muestra en el

lado izquierdo, destacando varias plántulas que exhiben un vigor de crecimiento reducido. En el lado derecho, una imagen detallada muestra las anomalías en el desarrollo del ápice, destacando las diferencias morfológicas respecto a los patrones de crecimiento normales esperados en pimiento tipo Gernika.

4.4.5. Obtención de genotipos resistentes a otros virus

En el marco del programa de mejora genética en la generación RC3-F2, se llevó a cabo una evaluación del material vegetal para identificar la presencia de resistencia a otros virus relevantes en el cultivo de pimiento, específicamente PVY y TSWV. Esta evaluación fue motivada por el uso de la variedad "Giulio" como parental, conocida por portar genes de resistencia a estos patógenos además del gen L4. Para verificar la presencia de estos genes de resistencia, se analizaron plantas de los genotipos IG y DG empleando marcadores moleculares específicos asociados a la resistencia genética frente a dichos virus.

En la generación RC3-F2 solamente se detectó un genotipo (IG2-4) que mostró positividad a los marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia *pvr4* y *tsw* que confieren resistencia a PVY y TSWV, respectivamente. En ese genotipo se detectaron 4 plantas que tuvieron ambos genes de resistencia, habiendo además una planta que dio positivo también al marcador asociado al gen L4 de resistencia a tobamovirus (Anexo XIII y Anexo XIV). Fue esta última planta (IG2-4 planta 9) la que se utilizó para hacer el último retrocruzamiento RC4-F2. Tras realizar este retrocruzamiento se procedió a evaluar la descendencia. De las 20 plantas que se genotiparon, se detectaron 2 plantas que mostraron resultados positivos para los genes de resistencia *pvr4* y *tsw* (planta 1 y 9; Figura 4.24). Además, una de las dos plantas también presentó gen de resistencia L4 frente a tobamovirus.

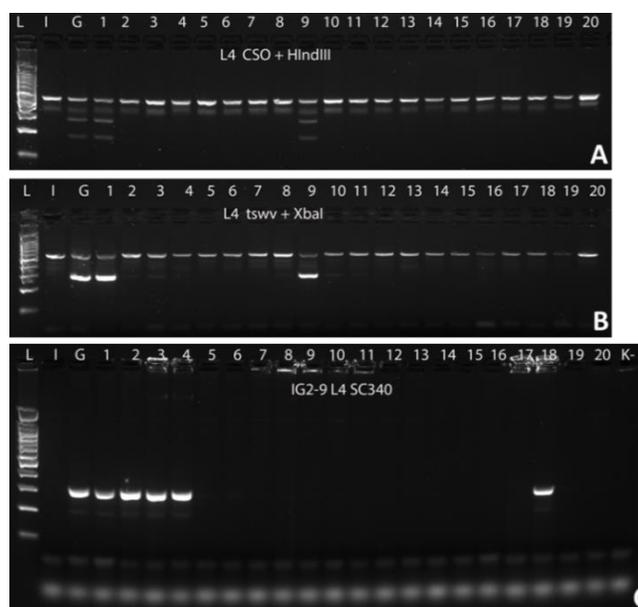


Figura 4.24. Resultados obtenidos en plantas de la generación RC4-F2 (genotipo IG2-9; descendencia de la única planta que mostró en la generación anterior posible resistencia a Tobamovirus, PVY y TSWV) al aplicarles los marcadores moleculares: A) E41/M49 (CSO) (Caranta et al., 1999) asociado al gen de resistencia *pvr4* que confiere resistencia a PVY una vez aplicado el enzima de restricción HindIII; B) SCAC568 (Moury et al., 2000) asociado al gen de resistencia *tsw* que confiere resistencia a TSWV una vez aplicado el enzima de restricción XbaI; C) L4SC340 (Kim et al., 2008) asociado al gen de resistencia L4 que confiere resistencia a tobamovirus. Se observan dos plantas con genes de resistencia a PVY y TSWV (genes ligados), una de las plantas mostrando además resistencia a tobamovirus (L4).

Las dos plantas que presentaron resistencias fueron autofecundadas y su descendencia fue evaluada para seleccionar aquellos genotipos homocigotos resistentes para cada uno de los genes mencionados en la generación RC4-F3 (Figura 4.25). En el genotipo IG2-1 las plantas 2 y 7 mostraron presencia de ambos genes en homocigosis (*pvr4* y *tsw*), mientras que la planta 8 solo mostró en homocigosis el gen de resistencia a PVY. Además, las plantas 2 y 8 también mostraron gen de resistencia L4. En el genotipo IG2-9 las plantas 1, 3 y 5 mostraron genes de resistencia *pvr4* y *tsw*.

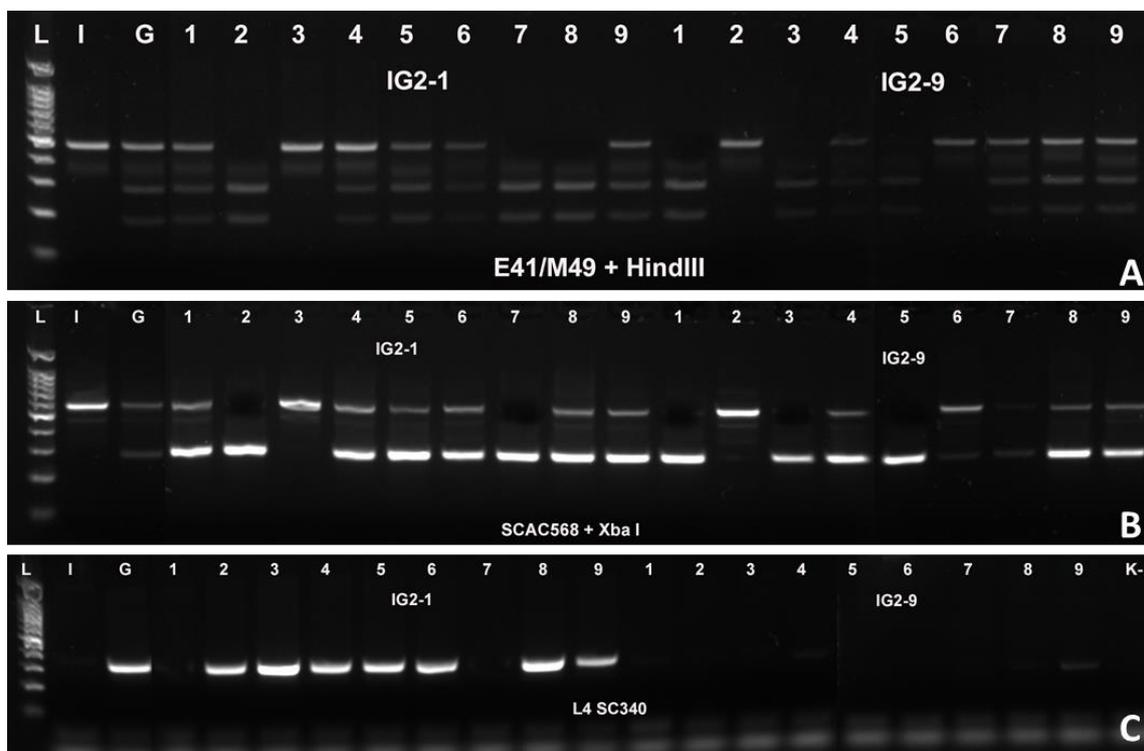


Figura 4.25. Resultados obtenidos en plantas de la generación RC4-F3 (genotipos IG2-1 y IG2-9) al aplicarles los marcadores moleculares: A) E41/M49 (CSO) (Caranta et al., 1999) asociado al gen de resistencia *pvr4* que confiere resistencia a PVY una vez aplicado el enzima de restricción HindIII; B) SCAC568 (Moury et al., 2000) asociado al gen de resistencia *tsw* que confiere resistencia a TSWV una vez aplicado el enzima de restricción Xba I; C) L4SC340 (Kim et al., 2008) asociado al gen de resistencia L4 que confiere resistencia a tobamovirus. Las plantas 2 y 7 del genotipo IG2-1 presentaron genes *pvr4* y *tsw* en homocigosis. La planta 8 del genotipo IG2-1 dio homocigosis para gen *pvr4*. En el genotipo IG2-9 las plantas 1, 3 y 5 mostraron genes de resistencia *pvr4* y *tsw*.

4.4.6. Discusión

Una amplia gama de virus que infectan los cultivos de pimientos ocasiona considerables pérdidas económicas al reducir su rendimiento (Parisi et al., 2020). En los últimos años, los tobamovirus están provocando grandes pérdidas en los cultivos de pimiento de Euskadi, especialmente en variedades locales de pimiento sensibles a estos virus (Sección 4.1). Se ha demostrado que la utilización de variedades resistentes es el método más rentable y eficiente para controlar enfermedades virales en algunos cultivos importantes, como el pimiento (Kim et al., 2016; Pitrat 2012; Parisi et al., 2020). Por este motivo, se puso en marcha un programa de mejora genética mediante retrocruzamientos, asistido por marcadores moleculares, con el objetivo de desarrollar genotipos productivos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra que incorporaran los genes L3 y L4, confiriéndoles resistencia a los tobamovirus.

Después de haber realizado la selección de las plantas homocigotas resistentes a los genes L3 y L4 en la anterior generación RC4-F3 mediante marcadores moleculares (Anexo XII), se verificó el comportamiento de su descendencia (RC4-F4) tras realizar la autofecundación. Los genotipos evaluados resultaron homocigotos resistentes para los genes L3 (DP-IP) o L4 (DG-IG), lo que indicó la consecución exitosa de uno de los objetivos perseguidos: la adquisición de genotipos homocigotos resistentes L3 y L4. Esto fue crucial para reducir los costos asociados con la producción de híbridos (Riggs, 1988; Ficiciyan et al., 2018), que era inasequible para los productores de estas variedades locales. Al establecer estos genes de resistencia en homocigosis, se asegura la preservación y continuación de esta resistencia en generaciones posteriores. Esto no sólo aborda las preocupaciones inmediatas, sino que también contribuye a la estabilidad y viabilidad a largo plazo de estas variedades. Esta estrategia merece su aplicación en aquellas variedades que se cultivan en pequeñas cantidades y áreas reducidas, pero que son de importancia culinaria y cultural para una región o país.

La evaluación de síntomas tras la inoculación mecánica en genotipos de la generación RC4-F4 portadores de los genes L3 y L4 reveló una resistencia completa, del 100 %, contra los patotipos PMMoV P1.2 y P1.2.3, respectivamente. Los síntomas de HR se hicieron evidentes en las hojas a la semana de la inoculación (Tomita et al., 2008, 2011). Posteriormente se observó una rápida abscisión de las hojas inoculadas (Suzuki et al., 2003). No obstante, se observó una diferencia significativa en el tiempo de abscisión de las hojas inoculadas, la cual se retrasó una semana en las plantas con el gen L4 en comparación con las plantas con el gen L3. Aunque algunas plantas aisladas mostraron síntomas de manchas necróticas y clorosis en hojas no inoculadas tanto en plantas con L3 como con L4, estas no mostraron infección por ningún patotipo de PMMoV después del análisis por HM (34 dpi). Además, la HR fue más rápida en las plantas de los genotipos homocigotos obtenidos (DP, IP, DG e IG) en comparación con las variedades híbridas (“Palermo” y “Giulio”). En los genotipos heterocigotos, la resistencia a veces no se manifiesta de forma completamente dominante, lo que conduce a un nivel de resistencia más bajo. (Boukema et al., 1980; Messiaen et al., 1995). Además, Antignius et al., (2008) confirmaron mediante inoculación que las plantas heterocigotas con genes L3 y L4 eran sensibles al PMMoV P1.2, mientras que las plantas homocigotas mostraron resistencia. Asimismo, PaMMV solo promovió la inducción de resistencia mediada por L1a en plantas homocigotas, pero no contribuyó a la inducción en ninguna planta con el gen en heterocigosis (Matsumoto et al., 2008). Al obtener estos genotipos con genes de resistencia homocigotos L3 y L4, logramos respuestas de resistencia más eficientes que con los híbridos comerciales.

En los últimos años, el descubrimiento de un nuevo tobamovirus, CPMMoV, que se detectó por primera vez en esta región en 2018 y que es la primera vez que se identifica a nivel de continente europeo, ha comenzado a causar graves daños a los cultivos de pimiento de la zona (Ontañón et al., 2024). Dada la emergencia del CPMMoV y su impacto negativo en los cultivos de pimiento, se hizo imperativo evaluar la respuesta de los genotipos desarrollados frente a este virus. La investigación demostró que los 17 genotipos que portaban los genes L3 o L4 mostraron resistencia al CPMMoV. Por el contrario, las variedades locales “Derio” e “Ibarroria” resultaron ser sensibles a este patógeno, situación que se repite en otras variedades de pimiento del País Vasco (Sección 4.3; Ontañón et al., 2024). En este trabajo previo se evaluó la determinación del patotipo CPMMoV mediante un bioensayo de inoculación, utilizando diferentes variedades de pimiento, tanto con genes de resistencia (L1-L4) como sin resistencia.

Se observó que el alelo L1 no controlaba bien la enfermedad, pero sí que se controlaba con los alelos L2-L4. Sin embargo, en el estudio mencionado anteriormente se sometieron a análisis por RT-PCR hojas de tres variedades diferentes, una con el gen L3 y dos con el gen L4, tras la inoculación con CPMMoV. La expresión de los síntomas de HR fueron observadas en las tres variedades, pero sólo la variedad que contenía el gen L3 mostró una infección sistémica leve sin presentar síntomas de enfermedad. En experimentos futuros, sería interesante examinar si los genotipos obtenidos con gen L3 en este programa de mejora exhiben un comportamiento similar e investigar si la acumulación de virus observada en las hojas sistémicas, a pesar de tener una carga viral baja (ya que solo fue detectado el virus por PCR y no por HM), podría potencialmente facilitar la transmisión mecánica de CPMMoV. Incorporar genes de resistencia contra los tobamovirus en variedades de pimiento sensibles ofrece una solución eficaz para enfrentar la amenaza de este y otros tobamovirus. Estos virus pueden introducirse en nuevas regiones a través de semillas o plántulas infectadas importadas de otros países, representando un riesgo significativo para la agricultura local. Esta forma de transmisión se describe como la principal entrada de nuevos virus en áreas de cultivo, especialmente aquellos como los tobamovirus que se transmiten por semillas en cultivos hortícolas (Dombrovsky et al., 2017; Dall et al., 2023; Schoen et al., 2023). En 2020, se reportó desde un invernadero hidropónico en Gatika (Bizkaia) una preocupante incidencia del 80 % de CPMMoV en la variedad de pimiento sensible "Derio". Este dato se basó en un muestreo aleatorio de 15 plantas, de las cuales 12 resultaron infectadas. Sin embargo, en la campaña siguiente se observó un cambio significativo en la incidencia del virus en cultivo, gracias a la utilización de genotipos homocigotos resistentes portadores de los genes L3 y L4. El cultivo de estos genotipos permitió un control efectivo de la enfermedad, demostrando la eficiencia de estos genes de resistencia en la lucha contra CPMMoV a nivel de parcela comercial.

Los genes de interés agronómico que están estrechamente ligados con otros genes que no son deseables agronómicamente, podrían provocar resultados con efectos adversos en programas de mejora por retrocruzamiento, debido al fenómeno conocido como arrastre de ligamiento (Allard 1960). La incorporación del gen de resistencia a tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), *Ty-1*, que proviene de *Solanum chilense*, en variedades cultivadas de tomate (*S. lycopersicum*) del sureste de España, provocó una reducción considerable de la producción (García-Martínez et al., 2012). En relación con la resistencia del pimiento a tobamovirus, algunos mejoradores consideraron que el alelo L4 de PI260429 (*Capsicum chacoense*) es problemático en cuanto a su heredabilidad (van Duin et al., 1998). En plantas homocigotas con L4 de *C. annuum* se observó reducción de la fertilidad (baja producción de polen y semillas) y enanismo. Otros autores plantearon la hipótesis de que la introgresión de segmentos de *C. chacoense* que contiene el gen L4 en *C. annuum* inhibe el alineamiento regular de los cromosomas durante la meiosis (Allersma et al., 2007). Sin embargo, estos problemas podrían resolverse reduciendo el material genético de *C. chacoense* y aumentando la introgresión de material genético de *C. annuum* en las líneas de mejora. En este programa de mejora, en general se observó que las plantas homocigotas para L4 mostraron una menor producción en gramos (aunque algunos genotipos no mostraron diferencias significativas), en comparación con los genotipos homocigotos L3 y las variedades sensibles. En este caso particular, los genotipos homocigotos L4 no exhibieron síntomas de enanismo, aunque si mostraron problemas de germinación en los genotipos DG de la generación RC4-F5 (tras 4 retrocruzamientos), con tasas de germinación

entre 61-75 % y un promedio de 66,9 %. Además, plantas de estos genotipos mejorados tuvieron una germinación más retrasada, menor vigor de crecimiento y anomalías en el desarrollo de los tallos apicales, lo que podría causar problemas en el manejo rutinario de los viveros. Estos problemas de germinación podrían estar relacionados con la falta de fertilidad mencionada anteriormente en líneas homocigotas para L4 (van Duin et al., 1998; Allersma et al., 2007). Es importante resaltar que tales anomalías de germinación estuvieron ausentes en las líneas IG homocigotas para el gen L4, que mostraron una tasa de germinación del 92,6 %. Por lo tanto, el gen L4 se integró con mayor éxito en la variedad "Ibarroria" en comparación a la variedad "Derio", lo que sugiere que el fondo genético ("background" genético) puede ser importante al introducir estos genes de resistencia en variedades sensibles (Gallois et al., 2018; Quenouille et al., 2016). El genotipo de pimiento de Gernika más productivo (DP4-9) también mostró una disminución en la tasa de germinación a pesar de ser un genotipo con L3. En el futuro, sería necesario evaluar si estas bajas tasas de germinación se debieron a la introducción de genes nocivos o a condiciones abióticas durante la producción y germinación de las semillas. Si esta mala germinación se debiera a genes nocivos, sería necesario eliminarlos del genoma mediante la aplicación de técnicas moleculares como el genotipado masivo, next generation sequencing (NGS) y la utilización de bioinformática (Allersma et al., 2007; Osei et al., 2017; Sun et al., 2023; Carbonell et al., 2018).

Se han desarrollado y enviado a la Oficina Española de Variedades Vegetales dos genotipos resistentes a tobamovirus para su inscripción en el Registro de Variedades Protegidas y en el Registro de Variedades Comerciales, ambos con el gen L3 en homocigosis que resiste a los patotipos P0, P1 y P1.2 de los tobamovirus. El genotipo de pimiento de Gernika DP49 fue inscrito con la denominación "Gudari" (octubre 2021), y el genotipo de guindilla de Ibarra IP24 fue inscrito con la denominación "Irribarra" (octubre 2022). A las dos variedades se las someterá a la evaluación oficial, y al examen DUS (distinta, uniforme y estable). Se trata de genotipos que no se diferencian productivamente de las variedades que actualmente se cultivan en la zona y solucionarían el problema de los tobamovirus como el CPMMoV que amenazan el cultivo de estas variedades locales.

Por último, también se han seleccionados algunos genotipos de guindilla de Ibarra que podrían ser resistentes a otros virus como PVY y TSWV. Estas resistencias han sido identificadas molecularmente utilizando marcadores moleculares asociados a genes de resistencia (Caranta et al., 1999; Moury et al., 2000). Estos genes también fueron fijados en homocigosis por lo que su carácter se mantendrá en las futuras generaciones. Sería conveniente comprobar si estos genotipos se comportan como resistentes al inocularlos con PVY y TSWV en bioensayos. Por último, habría que ver su comportamiento productivo comparándolo con la variedad sensible "Ibarroria" que se viene cultivando hoy en día en las parcelas profesionales de guindilla de Ibarra.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Variedades locales

Las variedades locales o tradicionales son poblaciones de cultivos con gran diversidad genética, adaptadas a condiciones geográficas específicas y a prácticas agrícolas tradicionales. Estas variedades se adaptan a factores abióticos y bióticos de una zona determinada (Zeven, 2002; Villa et al., 2005; Sumalan et al., 2021; Azeez et al., 2018), tras haber sido seleccionadas durante generaciones por sus cualidades morfológicas y organolépticas. Este es el caso de los dos principales tipos varietales de pimiento que se cultivan en Euskadi: pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra (Mancho, 1988; Nuez-Viñals et al., 1996; Mantxo et al., 1998). Ambas variedades locales gozan de gran prestigio en el mercado local debido a sus destacadas características organolépticas, las cuales son muy valoradas por consumidores que aprecian la calidad del producto, y asocian estos productos a métodos de producción tradicionales y a producto de proximidad (Mancho, 1988). La utilización, conservación, selección y mejora de estas variedades locales son actividades esenciales cuando la producción es destinada a mercados locales. De esta manera, se pueden obtener cultivos competitivos en comparación con otras variedades comerciales o con hortalizas de otras regiones, lo que hace posible la continuidad de estos tipos varietales en la zona.

Históricamente, las variedades locales han sido sustituidas por variedades comerciales debido a su menor productividad y mayor sensibilidad a plagas y enfermedades, además de tener una vida útil post-cosecha más corta (Van De Wouw et al., 2010). Sin embargo, variedades como la guindilla de Ibarra y el pimiento de Gernika forman parte de un reducido número de variedades hortícolas locales que conforman lo más valioso del patrimonio agrario y gastronómico en Euskadi, siendo variedades dinámicas y considerándose como unas de las mejores referencias de la horticultura vasca (HAZI, 2024). Estas variedades siguen siendo fundamentales en la producción agrícola actual, representando una oportunidad para las pequeñas y medianas empresas agrícolas y ayudando a mantener la actividad en zonas rurales (Pérez-Caselles et al., 2020). En el contexto globalizado actual, se valora cada vez más la capacidad de diferenciación mediante la recuperación de activos territoriales, tanto a nivel cultural como gastronómico. En Euskadi, se trabaja para proyectar una imagen moderna y actual, al mismo tiempo que se valora el origen y patrimonio cultural y gastronómico. La demanda de productos locales y de alta calidad ha revitalizado el cultivo de algunas variedades locales de pimiento, generando nuevas oportunidades de mercado. A pesar de que estas variedades pueden ser menos productivas que las modernas, suelen ofrecer rendimientos estables y son adaptables a los escenarios locales de cambio climático (Missio et al., 2018; Martínez-Carrasco et al., 2015; Zeven 2002; Azeez et al., 2018). Además, normalmente esta merma en la producción se suele compensar con un precio más alto pagado por el consumidor ante la mayor calidad del producto.

Las variedades locales son esenciales para la conservación de la diversidad genética ya que presentan el potencial de conservar genes que confieren resistencia a enfermedades o adaptabilidad a condiciones ambientales adversas. Por este motivo, las variedades locales

constituyen una fuente de germoplasma para revertir la pérdida de variabilidad genética (Bosland, 2010; Azeez et al., 2018; Sumalan et al., 2021) y pueden ser de gran utilidad en programas de mejora genética que persiguen el desarrollo de nuevas variedades comerciales. La pérdida de especies y variedades locales a menudo conduce a la pérdida irreversible de la diversidad genética, lo que se conoce como erosión genética (Esquinas-Alcázar, 2005; Cebolla-Cornejo et al., 2007), ya que cada variedad tradicional constituye una combinación única de genes (Bosland, 2010). Las principales aportaciones de las variedades locales a la mejora genética radican en sus características para un mejor aprovechamiento de nutrientes, así como en su resistencia a condiciones ambientales adversas como la sequía, salinidad, altas temperaturas y estreses bióticos. Además, estas variedades son valoradas por su alto valor nutritivo, al haber sido seleccionadas por sus destacadas propiedades organolépticas (Azeez et al., 2018; Martínez-Carrasco et al., 2015).

El sector hortícola de Bizkaia y Gipuzkoa se caracteriza por su limitada área de cultivo y el pequeño tamaño de las explotaciones, factores que limitan su competitividad y exigen la implementación de estrategias de mercado distintas a la producción a gran escala para competir con precios bajos (Alberdi-Collantes, 2002). En este contexto, la adopción de certificaciones de calidad y de origen para los productos agrarios, como Euskal Baserri (acredita que es producto local) y Eusko Label (acredita que es local y cumple unos requisitos de calidad), emerge como una estrategia prometedora para aquellas explotaciones que, al no poder incrementar su capacidad productiva, se enfocan en productos con características especiales de origen y calidad (Alberdi-Collantes, 2002). La certificación y protección del origen también son importantes para asegurar la autenticidad y las preferencias de los consumidores hacia los productos regionales (Coelho et al., 2018). El Pimiento de Gernika se encuentra amparado por la Denominación de Origen Protegida desde el 2007 y por la Indicación Geográfica Protegida de la Unión Europea desde finales del 2010 (Euskadi, 2015a), además de disponer de un sello de Calidad Alimentaria Eusko Label (HAZI, 2024). Por el contrario, la guindilla de Ibarra no posee denominación de origen, aunque se encuentra amparada bajo el certificado de Calidad Alimentaria Eusko Label (Euskadi, 2015b; HAZI, 2024). En Euskadi, además existen otras variedades locales de pimientos que no cuentan con protección de denominaciones de origen o sellos de calidad, pero son cultivadas a menor escala y destinadas principalmente al autoconsumo y la venta en mercados locales.

NEIKER dispone de un banco de germoplasma donde se conserva la diversidad genética de varias especies vegetales que se han venido cultivando en Euskadi. La preservación de la diversidad genética de los cultivos locales que están adaptados al entorno local no solo fortalece la soberanía alimentaria y la seguridad alimentaria de una región (Murua et al., 2006), sino que también ofrece recursos valiosos para la agricultura y la mejora genética del futuro (Esquinas-Alcázar, 2005; Arguello et al., 2021; Priyanka et al., 2021).

La estrategia de NEIKER respecto a las principales variedades de pimiento cultivadas en Euskadi consiste en inscribir estas variedades en los registros de variedades comerciales estatal y en el de variedades protegidas europeo (Community Plant Variety Office) al mismo tiempo. Así, NEIKER posee los derechos exclusivos para la comercialización de estas variedades, proporcionándoles protección legal contra la producción no autorizada (Consejo Unión Europea, 1994). El objetivo de esta protección no responde a beneficios económicos,

sino a proteger las variedades locales de pimientos de ser cultivadas fuera de Euskadi. Esta medida busca prevenir situaciones como las que ocurren recurrentemente con el pimiento de Gernika, donde productos importados de características morfológicas semejantes de países terceros con mano de obra más barata llegaron a MERCABILBAO a precios significativamente más bajos (HAZI, 2018). Al registrar las variedades en el registro de variedades protegidas europeo, se intenta asegurar que el cultivo de estas variedades permanezca exclusivo de los agricultores locales de Euskadi, fortaleciendo así la agricultura regional y manteniendo la identidad y calidad del producto local. NEIKER, que desarrolla estas variedades, proporciona las semillas a los agricultores de la región de forma gratuita. Posteriormente, las asociaciones de horticultores locales son las encargadas de multiplicar estas semillas bajo la supervisión de NEIKER, el Servicio de Semillas del Gobierno Vasco y las Sanidades Vegetales de las diputaciones, produciendo semilla certificada libre de virus.

El cultivo de variedades locales, adaptadas a zonas agroclimáticas específicas, facilita la conservación de la diversidad genética y reduce la necesidad de insumos químicos y fertilizantes, apoyando simultáneamente a las economías locales. Promover estas variedades incrementa la soberanía alimentaria y disminuye la dependencia de los sistemas alimentarios en cadenas de suministro largas y vulnerables. Así, el uso de variedades locales se alinea con el “Pacto Verde Europeo” y esta práctica va en concordancia con las estrategias europeas “Farm to Fork” y de “Biodiversidad”, ambas promovidas por la Comisión Europea, lo que demuestra un compromiso con la sostenibilidad ambiental y la resiliencia económica y social (Comisión Europea, 2020a; 2020b). Otro de los objetivos de la estrategia de “Biodiversidad” es llegar al 25 % de agricultura ecológica para 2030 y estas variedades tienen buenas aptitudes para adaptarse a este tipo de agricultura.

Amenazas y oportunidades del sector agrícola

Sin embargo, parece que lo que pueden poner en jaque al sector hortícola en Euskadi son temas de mayor calado socio-económico, como la falta de relevo generacional, el acceso a las tierras y los problemas asociados al sector a nivel más global.

Por un lado, el porcentaje de población activa en el sector agrario es proporcionalmente bajo y no se está dando un relevo generacional suficiente para asegurar el futuro del sector a nivel de la Unión Europea (Parlamento europeo, 2023). A pesar de que se hayan implementado algunas medidas por parte de las instituciones a nivel local para revertir esta situación (Alberdi-Collantes, 2017, 2023; Euskadi, 2023; Gipuzkoa, 2023), no se están viendo resultados suficientes para asegurar el futuro de la agricultura en Euskadi. Este relevo generacional es vital para la sostenibilidad social, económica y medioambiental de las zonas rurales. Sin embargo, al asociarse la agricultura todavía hoy en día a un modo de vida muy sacrificado, las nuevas generaciones optan por otras salidas profesionales. Para asegurar una producción de hortalizas local, en el futuro habrá que implementar medidas que mejoren las condiciones de vida de los horticultores e igualar las condiciones laborales, en la medida de lo posible, a otros sectores para que sean atractivas para las nuevas generaciones (Parlamento europeo, 2023). Las dificultades para acceder a la actividad agrícola se conocen desde hace tiempo e incluyen varios aspectos cruciales como el acceso a la tierra (especialmente para aquellos que acceden a la actividad desde fuera de un contexto familiar) y la falta de financiación justa y segura.

Además, los mercados no proporcionan compensaciones adecuada por el trabajo realizado y hay una falta de conocimiento y capacitación para trabajar en esta actividad. Estos elementos destacan la necesidad de políticas públicas para enfrentar estos desafíos (Parlamento europeo, 2023).

Por otro lado, muchos “baserris” que en el pasado constituyeron el pilar económico de numerosas familias en Euskadi y abastecían alimentos a nivel local, ahora se han transformado en viviendas sin actividad agrícola. Especialmente el cultivo de hortalizas ha sido dejado de lado, alejándose del modelo mixto de horticultura y ganadería que previamente se aplicaba (Alberdi-Collantes, 2002, 2017). Estas tierras han sido ocupadas principalmente por ganaderos que utilizan extensiones cada vez mayores para la producción de carne, o por pequeños rebaños de ovejas que no están vinculados a fines productivos (Alberdi-Collantes, 2002). Además, muchas familias que antes se dedicaban a la mencionada agricultura mixta, han optado por diversificar sus actividades, transitando hacia la silvicultura, principalmente plantaciones de pino y eucalipto (destinadas a la industria papelera), lo que les permite emplearse fuera del hogar en sectores más estables y mejor remunerados en Euskadi, como son la industria y los servicios (Murua et al., 2006). Sin embargo, otras familias han optado por orientarse hacia el negocio de los agroturismos, pasando a desempeñar una actividad centrada en servicios y dejando de lado la agricultura (Murua et al., 2006).

La creciente tendencia a desvincular la actividad agraria de las zonas rurales tendrá implicaciones significativas en la conservación de los paisajes del medio rural y del medio natural. Históricamente, la agricultura ha jugado un papel crucial en la preservación de estos paisajes, ya que las prácticas agrícolas han modelado y mantenido la diversidad ecológica y el carácter de muchas áreas rurales a lo largo de generaciones. Además, la agricultura ha contribuido a la conservación de hábitats naturales y la biodiversidad, a menudo integrando elementos naturales en el manejo del paisaje y jugando un papel importante en la conservación de suelo (Tilman et al., 2002; Altieri, 2009; Murua et al., 2006; Perfecto y Vandermeer, 2010). Sin embargo, la desconexión de las actividades agrícolas en estas regiones puede llevar a un deterioro de estos paisajes, con consecuencias como la erosión del suelo, la pérdida de hábitats, la disminución de la diversidad biológica, el aumento del riesgo de incendios, etc., lo que subraya la necesidad de políticas y prácticas que pongan en valor el papel de la agricultura en la conservación del entorno rural y natural.

Las amenazas del subsector hortícola en Euskadi no están exentas de los problemas a los que se enfrentan los agricultores a nivel global, y que últimamente se han dedicado a reivindicar en numerosas manifestaciones y protestas. El Alza de los costes de energía e insumos, junto con la reducción de los márgenes para el productor debido al colapso en los precios reales que perciben (Climent y Ávila, 2013; Schmidhuber y Qiao, 2022), la alta demanda de mano de obra y su difícil disponibilidad (Christiaensen et al., 2020), el bajo prestigio social del oficio y la falta de relevo generacional ya mencionada en la agricultura (Sutherland, 2023), se suman a cambios ambientales y globales que incrementan la incertidumbre en la productividad y rentabilidad económica (Raza et al., 2019).

Para activar el sector agrario y, con ello, garantizar la producción de alimentos seguros y saludables que todo sistema social necesita para su bienestar, es necesaria la búsqueda e

implantación de mejoras que reactiven la situación, así como prácticas de manejo que mejoren la rentabilidad económica y la sostenibilidad de las explotaciones. Para abordar estos desafíos de una forma efectiva, es necesario un enfoque integral que considere la implantación de innovación tecnológica (World Bank, 2007), apoyado en investigación y desarrollo de nuevos cultivos competitivos. Además, resulta indispensable incentivar el relevo generacional mediante ayudas al establecimiento de jóvenes profesionales capacitados y brindar apoyo financiero para reducir los riesgos de emprendimiento en el sector (Parlamento europeo, 2023). La búsqueda de nuevos modelos de comercialización de los productos a nivel local para que los productores cuenten con mayores márgenes económicos es otra de las medidas a tener en cuenta para hacer más atractivo el sector (Feenstra, 1997). Finalmente, impulsar la creación de cooperativas y asociaciones de agricultores que compartan recursos, conocimientos y acceso a mercados y financiación, es una estrategia (Iliopoulos y Hendrikse, 2009; Bijman et al., 2011) que ha demostrado ser muy beneficiosa en sectores como la industria en Euskadi y que ha permitido aumentar su resiliencia a los mercados (Tkacz et al., 2015). Sin embargo, en la agricultura no ha tenido el mismo desarrollo que en la industria hasta el momento, y explorar esta opción podría ser muy interesante. Todas estas medidas podrían tener un efecto beneficioso en la activación de algunas comarcas que se están “desagrarizando” (Murua et al., 2006; Alberdi-Collantes 2002, 2017). Estas soluciones deberán ser medioambientalmente sostenibles y se deberán adaptar al cambio climático (Pretty, 2008; De Schutter, 2010) que ya afecta a ciertos cultivos en Euskadi (Gobierno Vasco, 2011).

Una posible estrategia para fomentar la agricultura sostenible, saludable y local sería establecer redes de producción y consumo que operen a nivel comarcal. En los últimos años, se han lanzado iniciativas y se han implementado proyectos piloto en dos comedores escolares en Gernika (Bizkaia), a los cuales han mostrado interés en unirse muchas otras escuelas de la comarca de Urdaibai. De esta manera, los padres quieren promover el consumo de productos locales de calidad, saludables y de temporada para sus hijos. Esta iniciativa puede servir como modelo para otras escuelas y residencias de ancianos en la comarca, lo que incrementaría la cantidad de consumidores diarios de productos locales y brindaría un impulso notable a los sectores hortofrutícola y ganadero de la región. Este enfoque también ha sido implementado en otros municipios de Euskadi, como Markina, Orduña, Erandio y Laukariz, así como en otras poblaciones de España y Europa, donde destacan particularmente las experiencias de Italia (<https://www.gureplateragureaukera.eus/es/>; Sonnino, 2007).

Otro factor importante a tener en cuenta son los cambiantes hábitos de consumo en la sociedad. Por ejemplo, la demanda del pimiento de Gernika de Eusko Label está decreciendo en los últimos años. Esta tendencia se atribuye principalmente al elevado costo del producto, relacionado con la intensa necesidad de mano de obra. A menudo, los consumidores no perciben este valor añadido, especialmente cuando encuentran pimientos de otras regiones a precios mucho más económicos (Hazi, 2018). Además, el consumo típico de este pimiento es en frito, siendo una práctica que los jóvenes realizan cada vez menos (precio del aceite, comodidad, etc.) aunque sigue siendo popular en la hostelería. Según la información proporcionada por BIHOEL, la asociación encargada de distribuir la semilla de pimiento de Gernika a los agricultores, se registró una disminución del 25 % en el reparto de semilla durante la campaña de 2022, y una posterior bajada del 9 % en el año 2023. En contraste, el consumo de guindillas, especialmente encurtidas, está en aumento. Este crecimiento se debe a

su vinculación con la socialización en el "poteo", donde las "gildas" (pintxos que combinan guindilla, aceituna y anchoa con un toque de ajo y aceite) son especialmente populares. Los operadores Eusko Label están enfocados en maximizar su potencial de desarrollo para responder a las nuevas demandas del mercado. Esto incluye ofrecer nuevos formatos y presentaciones de productos, así como una mayor variedad, incluyendo opciones ecológicas. Esta estrategia también busca enfrentar la competencia de grandes conglomerados empresariales que intentan replicar y comercializar productos similares bajo nombres como "piparras", a menudo importados de regiones fuera de Euskadi, incluso de otros países, y a precios más bajos. La necesidad de abordar esta competencia desleal es crucial para proteger la singularidad y el valor del sector, asegurando que las prácticas comerciales promuevan la equidad y el reconocimiento adecuado de los productos locales auténticos.

Globalización y cambio climático

La globalización y el cambio climático podrían provocar la aparición de nuevas plagas y enfermedades en cultivos de hortícolas en el futuro, lo cual podría resultar en problemas significativos a nivel productivo (Bebber et al., 2013).

La aparición de nuevos virus procedentes de otras zonas agrícolas lejanas mediante la transmisión por semilla puede ser uno de los problemas a tener en cuenta en el futuro en cultivos de solanáceas. La globalización facilita el tránsito de lotes de semilla de todo el mundo que pueden estar infectados por virus como los tobamovirus (Genda et al., 2005; Hull, 2009; Dombrovsky y Smith, 2017; Dall et al., 2023). En este estudio se identificó un nuevo tobamovirus (CPMMoV) en plantaciones de pimiento en Bizkaia (pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra) y en Granada (pimiento del padrón), mostrando ambas cepas la misma secuencia genómica. Las dos explotaciones compartieron un factor común: en algún momento utilizaron semillas provenientes de una misma empresa que producía sus semillas en terceros países donde la mano de obra es más barata. Hasta este momento este virus no había sido identificado en Europa, habiendo sido detectado recientemente en Perú y Estados Unidos (Velez-Olmedo et al., 2021; Groth-Helms et al., 2022). Otra de las formas de entrada de tobamovirus en nuevas áreas podría ser el tránsito de plantas ornamentales de la familia de las solanáceas, ya que el recientemente identificado CPMMoV ha sido detectado en viveros de Michigan (Estados Unidos), causando mosaicos en flores y hojas de *Calibrachoa* sp. (Groth-Helms et al., 2022).

Por otro lado, en Hernani (Gipuzkoa) se detectó por primera vez en noviembre de 2023 el tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en plantaciones de tomate transplantadas en julio (variedad Jack). Los síntomas observados incluyeron frutos que maduraban de forma irregular y amarilleo intenso en algunas hojas (muy pocas). Aunque inicialmente se pensó que podría tratarse de pepino mosaic virus (PepMV), solo se obtuvieron resultados positivos para ToBRFV. El pasaporte fitosanitario indicaba que las plantas se habían producido en un vivero navarro. Sin embargo, este vivero también suele traer planta de viveros del sureste de la península (Murcia), donde este virus está causando grandes daños (Montserrat et al., 2024), y para el cual no se dispone de genes de resistencia en los tomates comerciales (Hak y Spiegelman, 2021). No podemos confirmar si el virus fue introducido en la parcela a través de semilla o plantel de vivero o fue transmitido de otra manera una vez establecido el cultivo, ya que los síntomas se

empezaron a ver con el cultivo avanzado. Este virus también afecta al cultivo de pimiento (Bananej et al., 2023) y podría causar daños importantes en las variedades locales de Euskadi. Sin embargo, hay estudios que indican que los diferentes alelos del gen 'L' de resistencia a tobamovirus amortiguan los graves síntomas causados por este virus en pimientos sin genes de resistencia (Eldan et al., 2022). En un estudio realizado por otros autores para observar la transmisión de semilla a planta de ToBRFV en diferentes solanáceas, observaron que plantas de pimiento con el gen de resistencia L3 no se infectaban sistémicamente y sus semillas no se contaminaban por el virus (Matsushita et al., 2024). Todos estos resultados confirman la importancia de disponer de genotipos con genes de resistencia a enfermedades, incluso para controlar o mitigar los daños que puedan producir los nuevos patógenos que vayan introduciéndose en futuros cultivos. En las siguientes campañas habrá que poner el foco en ver cómo evolucionan las incidencias de este virus en cultivos de tomate y pimiento y ver si los genes de resistencia introducidos en las variedades de pimiento resultan eficaces para evitar o mitigar las infecciones por ToBRFV.

Según los estudios realizados durante este trabajo y la información proporcionada por los Laboratorios de Sanidad Vegetal de Bizkaia y Gipuzkoa, no se han identificado problemas relacionados con begomovirus en solanáceas bajo las condiciones agroclimáticas de Euskadi. Sin embargo, los virus de este género podrían ser una amenaza en el futuro cercano, ya que los vectores transmisores como *Bemisia tabaci* (Navas-Castillo et al., 2011) inciden en las parcelas de la zona. Además, los begomovirus como tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) son patógenos que se han extendido por la península ibérica en los últimos años y podrían llegar a los cultivos de pimiento, tomate o cucurbitáceas de Euskadi (Navas-Castillo et al., 2011; Juárez et al., 2014; Ruiz et al., 2015; Font y Alfaro-Fernandez, 2015; EPPO, 2024). No obstante, sí que existen registros de casos del crinivirus lettuce infectious yellows virus (LIYV) en lechuga transmitido por *B. tabaci* en Bizkaia.

En el escenario actual de globalización y calentamiento global, es probable que los sistemas agrícolas se enfrenten a la invasión de nuevas plagas (Skendžić et al., 2021). Esto se debe a varios factores: un aumento en el número de generaciones de plagas que pueden desarrollarse debido a temperaturas más cálidas, la capacidad de estos organismos para sobrevivir durante el invierno, y un desajuste temporal entre los insectos y sus depredadores o fauna auxiliar. Estos cambios pueden resultar en daños significativos a los cultivos, tanto por efectos físicos directos como por la transmisión de nuevas enfermedades virales (Canto et al., 2009; Sharma 2014).

En el contexto del cambio climático actual, será fundamental adaptar las variedades de cultivos para mejorar su resistencia a los desafíos ambientales futuros. Esto implica, por ejemplo, aumentar su tolerancia a la sequía y su capacidad para soportar temperaturas elevadas. Además, resulta crucial desarrollar variedades que resistan mejor los altos niveles de salinidad y que sean más resistentes a nuevas plagas y enfermedades. Estas adaptaciones serán clave para mantener la sostenibilidad de la producción agrícola ante un clima en cambio constante (Saint-Pierre et al., 2008; Munns et al., 2012; Bebbler et al., 2013; Schönhals et al., 2017). Dicho de otra forma, habrá que desarrollar variedades resilientes que permitan adaptarse a diferentes perturbaciones, sin alterar demasiado sus características productivas en este contexto de cambio climático que estamos viviendo (Cuevas-Reyes, 2010; Darnhofer,

2014). Para optimizar el rendimiento y la resiliencia de los cultivos, es de suma importancia hacer uso de la diversidad genética, implementar policultivos y priorizar la conservación de los suelos (Altieri y Nicholls, 2013).

Técnicas de detección

En la obra "Novum Organum" de Francis Bacon, considerado el padre del empirismo, se destaca la importancia de la medición en ciencia. Bacon argumenta que medir y observar de manera precisa es esencial para desarrollar un verdadero conocimiento científico y para avanzar en la comprensión de los sistemas naturales. Uno de los mayores avances desarrollados en este trabajo está relacionado con la implantación de la técnica de detección por HM, la cual nos ha proporcionado valiosa información y la capacidad de analizar de forma autónoma una amplia gama de materiales vegetales para virus y viroides, permitiendo el desarrollo de investigaciones en varias direcciones. Es importante destacar que, en nuestro laboratorio, en el que hasta ahora principalmente se había trabajado con patógenos de suelo, no disponíamos de métodos para detectar virus cuando comenzamos este trabajo. Inicialmente, dependíamos de servicios externos para la detección de virus, como los análisis DAS-ELISA contratados en 2014 al Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) y los realizados en el laboratorio de Sanidad Vegetal de Bizkaia durante los muestreos de 2017 y 2018. Sin embargo, a partir de 2019 se implementó la técnica de detección de virus por HM en el laboratorio de NEIKER que nos ha dado el potencial de realizar ensayos de diversa índole: seleccionar genotipos resistentes a tobamovirus tras realizar ensayos de inoculación, prospecciones a gran escala, evaluar la transmisión de virus de semilla a planta, analizar la flora silvestre alrededor de las parcelas, así como examinar lotes de semillas infectadas. Estos usos demuestran la versatilidad y la eficacia que ofrece la técnica de HM en diversos ámbitos de estudio.

En un laboratorio de patología vegetal es fundamental contar con una herramienta analítica ágil y práctica como la HM para determinar el estado fitosanitario en una zona determinada de cultivo y para poder establecer las medidas de control correspondientes (Rubio et al., 2020). Para detectar virus aplicando este método analítico, diseñamos sondas específicas capaces de detectar 21 virus y 2 viroides que afectaban al cultivo de pimiento a nivel mundial. Esta técnica de detección no solo ofrece una sensibilidad similar o incluso superior, sino que también es más específica que el método DAS-ELISA, ya que se trabaja con secuencias específicas de los virus (Hull y Al-Hakim 1988; Sánchez-Navarro et al., 1996; Pallás et al., 2018). La investigación comparativa entre la HM y la técnica DAS-ELISA realizada en este trabajo revela que ambas metodologías presentaron sensibilidades de detección similares, capaz de detectar virus hasta concentraciones de unos $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de tejido infectado. En cuanto a la especificidad de la HM, se observó que 3 sondas específicas, 2 de CPMMoV y una de BPeMV, con un porcentaje de identidad entre secuencia de ambos virus de la región que detectaba cada sonda del 80,6 %, 75,8 % y 89,4 % respectivamente, permitieron una detección específica de cada virus cuando se hibridaron a 68 °C, no mostrando hibridación cruzada entre el tejido infectado con CPMMoV y BPeMV y sin señal en el tejido sano. Sin embargo, se dio hibridación cruzada al hibridarlos a temperaturas de 60 °C o inferiores. Una de las sondas de CPMMoV (CPMMoV#2), diseñada para hibridar con parte de los genes MP y CP, mostró un límite de detección 25 veces superior al observado para la sonda CPMMoV#1, sonda dirigida únicamente al gen de la replicasa,

indicando la importancia que tiene el lugar del genoma dónde se diseñan las sondas. No obstante, la combinación de ambas sondas de CPMMV en una única sonda o poli2, no incrementó la sensibilidad obtenida con CPMMoV#2. Cuando se comparó la sensibilidad de la sonda más sensible de HM (CPMMoV#2) con la técnica de PCR, utilizando los mismos cebadores, resultó ser 125 veces menos sensible, una relación de sensibilidad que se encuentra dentro del rango previamente descrito (Sánchez-Navarro et al., 1996; Sánchez-Navarro et al., 1998).

Por otro lado, se desarrollaron polisondas de HM que nos permiten detectar hasta 21 virus en un solo ensayo, siendo una adaptación de la tecnología para cribar mucho material, así como muchos virus y viroides simultáneamente (Pallás et al., 2018; Sánchez-Navarro et al., 2018a; Sánchez-Navarro et al., 2018b, Sánchez-Navarro et al., 2019). Durante este trabajo, se han discutido las ventajas e inconvenientes de utilizar polisondas de HM. Los resultados obtenidos en presente estudio pusieron de manifiesto que la sensibilidad de las polisondas se ve significativamente afectada tanto por el número de virus/viroides que pueden detectar como por la posición de las sondas individuales dentro de las polisondas. El conjunto de resultados ha permitido proponer que el uso de polisondas con capacidad para detectar entre 9-12 patógenos (cada uno con sondas de 200-300 nt) e hibridadas a 45 °C, representa la situación ideal para utilizar esta tecnología en el análisis rutinario de muestras vegetales, obteniéndose límites de detección similares a los observados con sondas individuales.

En el futuro, queremos continuar desarrollando y mejorando la técnica de HM para implementar pruebas rápidas basadas en esta metodología. Es crucial que el sector agrario disponga de herramientas analíticas rápidas para identificar patógenos que afecten a sus cultivos y tomar medidas de control de manera rápida y eficaz. Según el Real Decreto 1054/2021, se establecen medidas obligatorias para los viveros, debido a los riesgos asociados a la introducción de nuevas plagas y enfermedades cuarentenarias a partir de esta actividad. La experiencia previa con plagas cuarentenarias en territorios específicos de España sugiere que los esfuerzos de control deberían enfocarse en prevenir su incidencia en el material vegetal de reproducción. Ante este riesgo, la implementación de medidas fitosanitarias adicionales es esencial, tal y como lo estipula la Ley 43/2002 de sanidad vegetal. El RD 1054/2021 resalta la importancia del autocontrol por parte del operador y la realización de exámenes fitosanitarios durante la producción en vivero. Además, se recomienda proteger las plantas con mallas contra insectos vectores o implementar un programa de vigilancia de plagas. Tomando en cuenta el RD 739/2021, que alinea la legislación española de sanidad vegetal con el marco fitosanitario de la Unión Europea, se dictan directrices nacionales sobre el manejo de plagas cuarentenarias y prioritarias de la Unión, así como sobre plagas cuarentenarias en zonas protegidas y plagas reguladas no cuarentenarias de la Unión, especificando además los controles requeridos. Por todas estas razones, consideramos que sería muy útil disponer de pruebas rápidas para detectar diversos virus que afectan a las hortalizas, especialmente en viveros. En los últimos años se están desarrollando varios métodos de detección rápida basados en diferentes métodos moleculares como RPA, LAMP o Isothermal amplification, combinado con CRISPR/Cas12a (Aman et al., 2020a, 2020b), o basados en inmunoensayos y amplificaciones isotérmicas de ácidos nucleicos por “lateral flow” (Byzova et al., 2018; Song et al., 2024). Dada la capacidad que presenta la HM para la detección polivalente de virus y viroides, sería muy interesante adaptar esta tecnología para su

uso directamente en campo mediante test rápidos, un aspecto que ya se ha contemplado en futuros proyectos de investigación.

También sería muy interesante aplicar nuevas tecnologías de detección e identificación de virus y viroides como Next generation sequencing (NGS). Esta técnica permite la identificación de virus y viroides de diferentes géneros y familias, incluyendo tanto a patógenos conocidos como desconocidos en plantas y animales (Adams et al., 2009; Kreuze et al., 2009; Barzon et al., 2011; Kim et al., 2014; Barba y Hadidi, 2015; Roossinck et al., 2015; Wu et al., 2015; Rott et al., 2017; Jo et al., 2018). Es una herramienta muy poderosa para detectar y cuantificar virus, incluso en plantas asintomáticas (Nagano et al., 2015; Roossinck, 2012) y sería interesante para determinar el estado actual de virosis en los cultivos de pimiento de Euskadi y sus interacciones con el entorno, proporcionando datos significativos para análisis ecológicos más profundos (Stobbe y Roossinck, 2014; Roossinck, 2012; Kamitani et al., 2016). Esta herramienta también ha sido empleada para la detección de infecciones múltiples de virus en las muestras (Jones et al., 2017; Kreuze et al., 2009; Pallás et al., 2018), tal y como se ha citado en varias especies de *Capsicum* mediante análisis de secuencias de RNA (Jo et al., 2017; Safari y Roossinck, 2018; Tomašechová et al., 2020). Esta tecnología podría permitir la identificación de un mayor número de especies que afectan al cultivo de pimiento y la determinación de nuevas especies de virus que actualmente son desconocidas en el cultivo de pimiento de Euskadi o incluso que no hayan sido detectados a nivel global. Sería aconsejable que en el futuro se emplee como herramienta de diagnóstico de rutina para protocolos de certificación, así como en protocolos sanitarios, especialmente si se reduce el costo y se mejoran los procedimientos de estos análisis (Adams et al., 2009; Boonham et al., 2014). Para aplicar correctamente esta tecnología se necesitan herramientas bioinformáticas adecuadas y personal formado para interpretar los datos obtenidos (Roossinck, 2017; Wu et al., 2015; Jo et al., 2017). A pesar de ser una herramienta analítica sensible también presenta algunos inconvenientes como la posibilidad de contaminación cruzada con muestras que contengan micovirus y/o virus de insectos (Rott et al., 2017), límite de detección inferior al observado por RT-PCR (Jo et al., 2018) o la posibilidad de que las secuencias de virus detectadas por esta tecnología sean restos de secuencias virales incorporadas a los genomas del huésped (Martin et al., 2016).

Aunque las tecnologías de secuenciación masiva son excelentes para identificar nuevos virus, una vez identificado el virus, se requiere el uso de métodos clásicos como la secuenciación RACE (Yeku y Frohman, 2011) para determinar el genoma completo del virus, especialmente los extremos 5' y 3' del mismo. En el presente estudio observamos que, aunque el CPMMoV (GenBank MN164455.1) fue detectado inicialmente en Perú mediante secuenciación masiva (Velez-Olmedo et al., 2021), la secuencia reportada como completa en la base de datos GenBank era en realidad parcial. Mediante la aplicación de la secuenciación RACE clásica, descubrimos que al genoma de referencia del CPMMoV le faltaban 22 nucleótidos en el extremo 5', los cuales son esenciales para iniciar la infección.

Mejora genética: presente y perspectivas para el futuro

Siempre hemos intentado enfocar nuestro trabajo aplicando ciencia y tecnología para resolver los problemas de patología vegetal que demanda solucionar el sector hortícola de Euskadi. Este tipo de investigación es fundamental para abordar los desafíos contemporáneos del

sector, asegurando no solo la viabilidad económica de las prácticas agrícolas, sino también su compatibilidad con el medio ambiente, la adaptación al cambio climático, la sostenibilidad a largo plazo y la mejora en la calidad de los productos.

En este estudio, se llevó a cabo un programa de mejora genética de plantas aplicando el método de retrocruzamiento y apoyándonos en marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia. El objetivo fue incorporar genes de resistencia a los tobamovirus en variedades locales de pimiento que originalmente eran susceptibles a estos virus. Estos genotipos obtenidos conservaron las características organolépticas de las variedades locales de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra, pero con resistencia a tobamovirus. Como se describe en este estudio, al concluir el programa de mejora se lograron desarrollar genotipos resistentes a tobamovirus que poseen los genes L3 y L4 en estado homocigótico. Esta estrategia fue elegida para evitar la necesidad de producir híbridos resistentes anualmente, lo que resultaría en un aumento en el costo de las semillas y un incremento de los costes fijos para los agricultores (Ficiyan et al., 2018). Además, facilita el manejo de las variedades y permite que las semillas estén disponibles rápidamente para los agricultores, aspectos que están en línea con la soberanía alimentaria y la seguridad alimentaria mencionadas anteriormente.

Al tratarse de variedades que se producen a escala muy local, las casas de semillas no están interesadas en mejorar estas variedades ya que el volumen de negocio no justifica la inversión que debería realizar estas empresas en su desarrollo. En este contexto, instituciones como NEIKER desempeñan un rol muy importante, siendo el centro de referencia para los agricultores locales a nivel científico-técnico. Por ello, debe seguir mejorando estas variedades adaptándolas a las necesidades actuales y del futuro. Hoy en día preocupan mucho a los agricultores las grandes pérdidas que están produciendo virus como CMV y PVY, sobre todo en las parcelas al aire libre. Además, también ha resultado problemático TSWV en cultivo bajo invernadero durante algunas campañas en las que los trips infectivos no son controlados correctamente. Sería muy interesante para el sector disponer de genotipos resistentes a estos virus (Caranta et al., 1999; Moury et al., 2000; Choi et al., 2018), ya que el control de los insectos transmisores resulta muy difícil o ineficaz en algunos casos.

Para llevar a cabo la introducción de genes de resistencia a estos virus es fundamental aplicar marcadores moleculares, para poder realizar una selección precoz de genotipos resistentes aplicando la técnica PCR (Hasan et al., 2021). Para ello se pueden aplicar marcadores descritos en la bibliografía, así como diseñar nuevos marcadores que se adapten al material de mejora (Ojinaga et al., 2018). Una de las opciones que se podrían implementar en futuros programas de mejora para identificar plantas resistentes y sensibles a virus, diferenciando entre homocigotos y heterocigotos, es el uso de la técnica de "High Resolution Melting" (HRM). Esta técnica permite, a través de curvas de fusión de DNA, reflejar los amplicones presentes permitiendo distinguir entre diferentes genotipos y alelos, sin la necesidad de utilizar geles de agarosa (Yang et al., 2009 y 2012).

Una vez seleccionadas las plantas resistentes aplicando marcadores moleculares, es imprescindible comprobar en ensayos de inoculación que los resultados proporcionados por los marcadores son válidos (Moodley et al., 2019). Los genotipos resistentes a tobamovirus obtenidos en este estudio mostraron resultados de resistencia tanto con marcadores

moleculares como tras realizar ensayos de inoculación. En estos ensayos, los genotipos homocigotos resistentes mostraron síntomas de HR más rápidamente que las variedades comerciales híbridas, con resultados de infección negativos tanto para PMMoV como para CPMMoV. Por otro lado, también se han seleccionado algunos genotipos resistentes de guindilla de Ibarra a TSWV y PVY solamente por marcadores moleculares, cuyos resultados deberán ser confirmados en futuros ensayos de inoculación con estos virus.

También sería interesante emplear marcadores moleculares y otras técnicas avanzadas como el genotipado masivo y NGS (Next Generation sequencing), combinadas con análisis bioinformáticos, para identificar y eliminar posibles genes perjudiciales ligados a los genes de resistencia que puedan ocasionar reducciones de producción y complicaciones en el manejo agrícola (Allersma et al., 2007; Osei et al., 2017; Sun et al., 2023; Carbonell et al., 2018). Esta estrategia es relevante dado que en varios de los genotipos resistentes a tobamovirus desarrollados en este estudio, principalmente en los genotipos de pimiento de Gernika con gen L4, se observaron reducciones en la producción y en las tasas de germinación, generando inconvenientes para el agricultor y el viverista, respectivamente. Problemas similares han sido reportados por otros investigadores al introducir genes de resistencia provenientes de especies distantes filogenéticamente en tomate, lo cual también afectó negativamente a la producción (García-Martínez et al., 2012). No obstante, al aplicar el genotipado masivo de SNPs para estudios de asociación genética y para seleccionar plantas con el gen de resistencia (*Ty-1*) pero con menor arrastre de ligamiento de genes deletéreos, redujeron los problemas de mermas de producción (Carbonell et al., 2018). La optimización de los genotipos resistentes con el locus L4 obtenidos en este trabajo para aumentar su producción y las tasas de germinación tiene que ser uno de los objetivos prioritarios a corto plazo, ya que es posible que en el futuro haya que emplear variedades de pimiento con este gen de resistencia.

Para garantizar la durabilidad de que las resistencias genéticas introducidas y prevenir su superación por cepas virales, es crucial combinar la utilización de variedades resistentes junto con otras medidas de control, como son aumentar las medidas de higiene para reducir la carga viral en las parcelas. Para ello, además de proporcionar semillas de variedades resistentes a virus es necesario transferir el conocimiento de cómo llevar los procesos en una explotación (manejo) para mantener dichas cargas virales bajas, evitando así o retrasando la superación de las resistencias introducidas (Lecoq et al., 2004).

La resistencia a virus en plantas puede ser superada por ciertas variantes virales o mecanismos como, (i) la interacción con otros virus en infecciones mixtas (García-Cano et al., 2006), (ii) la selección de mutaciones puntuales que favorecen al virus (Hébrard et al., 2006), o (iii) por eventos de recombinación genética (Miras et al., 2014). La superación de las resistencias de las plantas por cambios en la patogenicidad de las poblaciones virales representa un caso específico e importante de emergencia, con tremendas consecuencias económicas ya que pone en riesgo el éxito y la durabilidad de los factores de resistencia en los cultivos como estrategia de control antiviral (Elena et al., 2010). Aunque se sabe que las resistencias poligénicas son más duraderas, a menudo se utilizan resistencias monogénicas debido a que su introgresión en los cultivos suele ser más sencilla (Palloix et al., 2009). En este estudio se optó por esta estrategia de introducir genes mayores que dan resistencia a tobamovirus. Sin embargo, las resistencias a virus controladas por un único gen dominante generalmente no

son superadas fácilmente por variantes virales, proceso que suele ocurrir más recurrentemente en otros patógenos celulares. En los casos en que las cepas virales superan la resistencia, suelen causar síntomas más suaves en las variedades susceptibles y suelen ser menos eficaces que aquellas cepas que no superan la resistencia (García-Arenal y McDonald, 2003). Otro factor asociado a la superación de las resistencias monogénicas está relacionado con las altas temperaturas. Por ejemplo, se ha observado que el gen *tsw*, que proporciona resistencia a TSWV, no es eficaz en condiciones de elevada temperatura (Moury et al., 1998).

Uno de los aspectos a tener en cuenta para reducir los riesgos de epidemias es la producción de semillas certificadas libres de virus y desinfectadas, siendo especialmente relevante para aquellos virus que se transmiten por semilla, como los tobamovirus. El tratamiento de estas semillas se puede hacer con termoterapia o químicamente (Córdoba et al., 2007; Herrera et al., 2009). Una vez que los virus entren en las parcelas, es fundamental evitar la transmisión por contacto desinfectando herramientas y ejecutando protocolos para reducir la dispersión del virus (Aguilar et al., 2010; Alfaro et al., 2013; Mehle y Ravnkar, 2012).

En cuanto a los virus transmitidos por insectos vectores en los cultivos de pimiento de Euskadi, como CMV, PVY y TSWV, se pueden implementar varias estrategias para controlar estas virosis: i) controlar a los artrópodos transmisores mediante diferentes estrategias (Andorno et al., 2014; Téllez et al., 2017; Bouagga et al., 2018), ii) poner barreras físicas para impedir que penetren en el cultivo (Antignus, 2012; Fereres y Racah, 2015), iii) interferir en el proceso de transmisión aplicando aceites u otros productos que eviten la unión del virus al insecto (Lecoq y Desbiez, 2012; Blanc et al., 2014). Otra de las prácticas agronómicas que conviene llevar a cabo para evitar la dispersión de estos virus en el cultivo es eliminar plantas infectadas del cultivo o de la flora silvestre en las inmediaciones del mismo (Fereres y Racah, 2015), disponiendo para ello herramientas analíticas rápidas y específicas como la HM (Rubio et al., 2020). Además, como ya se ha comenzado a utilizar en cultivos de patata de siembra, la detección temprana a partir de imágenes hiper o multispectrales proporcionadas por vuelos de drones podría ser una buena opción para identificar y eliminar las plantas infectadas por virus al comienzo del cultivo, contribuyendo así a evitar la dispersión de los virus (Polder et al., 2019; Griffel et al., 2023). Esta práctica podría ser especialmente interesante en las parcelas de guindilla de Ibarra al aire libre donde hay grandes problemas con virosis de transmisión no persistente (CMV, PVY).

Aunque los programas de mejora genética para introducir resistencias a patógenos son muy beneficiosos, requieren una considerable cantidad de trabajo y tiempo para lograr los resultados deseados. En el caso del programa de mejora dirigido a la resistencia a los tobamovirus, el desarrollo de los primeros genotipos resistentes homocigóticos tomó seis años y requirió siete generaciones de mejora. Además, una vez obtenidos estos genotipos, se realizaron ensayos en campo para evaluar su comportamiento agronómico, lo que extendió el tiempo necesario antes de poder disponer de variedades comerciales. Este proceso ilustra la complejidad y la inversión de tiempo y recursos que implica el desarrollo de nuevas variedades de plantas resistentes a patógenos.

Una de las alternativas para disminuir el tiempo de estos programas de mejora podría ser la aplicación de sistemas de edición génica como la CRISPR/Cas (Mojica et al., 2005; Rasheed et

al., 2021). En los últimos años, los sistemas CRISPR/Cas han emergido como el principal método para la edición génica, permitiendo la introducción o corrección de mutaciones genéticas en diversos contextos biológicos, incluyendo líneas celulares, animales (humanos incluidos) y plantas (Hsu et al., 2014; Belhaj et al., 2015). Las ventajas de la técnica de edición del genoma CRISPR/Cas sobre otros sistemas de edición incluyen su rapidez, facilidad de uso y aplicabilidad a diversas especies. Además, es versátil, permitiendo la introducción o eliminación de varios genes simultáneamente sin requerir muchas herramientas de manipulación (Hadidi et al., 2016). Desde 2015, la tecnología CRISPR/Cas9 ha sido aplicada para editar el genoma y combatir infecciones por virus de DNA, logrando resistencia a los geminivirus (Ali et al., 2015; Baltes et al., 2015; Ji et al., 2015). Posteriormente, se extendió esta técnica para desarrollar genotipos de pepino y *Arabidopsis thaliana* resistentes a virus de RNA, como los potyvirus, a través de mutaciones en los genes eIF4E y eIF(iso)4E, donde el alelo recesivo confiere resistencia a varios virus de este género (Chandrasekaran et al., 2016; Pyott et al., 2016). Más adelante, se han desarrollado genotipos resistentes a virus en diversas especies agrónomicamente importantes utilizando esta misma técnica (Liu et al., 2018; Macovei et al., 2018; Tashkandi et al., 2018; Kis et al., 2019; Zhan et al., 2019; Pramanik et al., 2021). Una vez introducidas las resistencias mediante esta técnica se ha demostrado la estabilidad de estos genes editados con CRISPR/Cas en las generaciones posteriores (Chandrasekaran et al., 2016). La edición génica también puede ser aplicada para conseguir variedades más resilientes, adaptadas a las condiciones extremas que causa el cambio climático como el estrés hídrico, la salinidad y las altas temperaturas (Singh et al., 2022; Gajardo et al., 2023).

No obstante, la implementación de la técnica CRISPR/Cas en Europa enfrenta obstáculos legales, dado que el Tribunal de Justicia de la Unión Europea determinó en 2018 (ECLI:EU:C:2018:583) que todas las plantas editadas genéticamente deben acogerse a la normativa de organismos genéticamente modificados (OGM) de la Unión Europea, según la Directiva 2001/18/CE. Esta decisión equipara los riesgos potenciales de las plantas transgénicas, aquellas modificadas mediante la adición de nuevos genes o fragmentos de DNA de otras especies, con aquellos de las plantas editadas mediante CRISPR/Cas. Sin embargo, la edición con CRISPR/Cas generalmente no implica añadir transgenes, sino que consiste en desactivar o alterar genes existentes a través de pequeñas variaciones genéticas (inserciones, deleciones o sustituciones), que pueden ser similares o idénticas a las que ocurren naturalmente en otras variedades (Permyakova y Deineko, 2024). Dicha directiva requiere evaluaciones rigurosas de los riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente, lo cual dificulta la aprobación de nuevas variedades desarrolladas mediante estas técnicas. En este contexto, actualmente Europa y Nueva Zelanda se distinguen del resto del mundo en cuanto a la regulación de la edición génica, adoptando un enfoque más restrictivo respecto a estas técnicas. Recientemente la Unión Europea ha mostrado el interés de regular esta tecnología como “new genomic techniques” (NGT), entre los que se encuentra CRISPR/Cas, y ha lanzado una propuesta que las diferencia de los OGM (COM (2023) 411 final). La propuesta de la UE establecería dos categorías de plantas desarrolladas mediante Nuevas Técnicas Genómicas (NGT). La primera categoría incluiría plantas con modificaciones genéticas menores, similares a las que podrían obtenerse mediante técnicas convencionales, como cambios en uno a tres pares de bases de DNA para incrementar la resistencia a enfermedades.

Estas plantas no estarían sujetas a la regulación de transgénicos y se tratarían de manera similar a las obtenidas convencionalmente. La segunda categoría, en cambio, abarcaría plantas con modificaciones más extensas, de más de 20 pares de bases, como aquellas diseñadas para resistir múltiples patógenos, y seguirían reguladas bajo las mismas normas aplicadas a los transgénicos. Finalmente, las plantas NGT que se consideren equivalentes a las plantas convencionales no podrán ser usadas en agricultura ecológica. Las plantas NGT de la categoría 1 se clasificarán prácticamente como cultivos convencionales para las parcelas convencionales, pero se considerarán transgénicos en el contexto de las parcelas ecológicas. Esta distinción carece de fundamento científico, especialmente cuando la comisión admite que puede ser imposible diferenciar estas plantas de aquellas desarrolladas mediante métodos convencionales (COM (2023) 411 final; Mehta, 2023).

Las metodologías CRISPR/Cas presentan un nivel de seguridad comparable, si no superior, a las técnicas de modificación genética tradicionalmente aceptadas, como la mutagénesis. La mutagénesis, que involucra la modificación del DNA mediante radiación o agentes químicos, tiende a introducir una mayor cantidad de alteraciones no deseadas en el DNA en comparación con CRISPR/Cas (Lassoued et al., 2019). Esta diferencia puede ilustrarse mediante una analogía en la que CRISPR/Cas se compara con un bisturí, que permite cortes precisos, mientras que la mutagénesis sería comparable a una motosierra, por su menor precisión y mayor capacidad de causar daños colaterales en el genoma de las plantas.

En Europa, la regulación de los OGM ha sido históricamente más estricta que en otros lugares del mundo, lo que ha llevado a prohibir la producción de transgénicos en varios estados miembros. Estas restricciones han dado una ventaja competitiva a países fuera de la UE que han adoptado esta tecnología para aplicaciones agrícolas. A pesar de la prohibición de producir transgénicos, la Unión Europea permite la importación y el consumo de productos transgénicos procedentes de otros países (Directiva 2015/412). Por ejemplo, se importan una cantidad significativa de maíz, soja, colza, algodón, y clavel que son transgénicos desde países terceros para su uso en alimentación animal y otras aplicaciones (ISAAA Inc, 2024). Esta dicotomía entre la producción y el consumo muestra las complejidades y los desafíos de las políticas agrícolas en relación con la biotecnología a nivel global. Además, esta situación plantea preguntas sobre la coherencia de las políticas que restringen la producción local, pero permiten la importación de estos productos.

En este contexto es destacable el hecho de que la implementación de tecnologías como los transgénicos y la edición genética se observa predominantemente en el sector agrícola. En contraste, en campos como la medicina, estas tecnologías son generalmente bien recibidas y los posibles problemas de salud pública que puedan surgir rara vez son objeto de debate. Esto refleja una doble moral en la percepción y regulación de las biotecnologías, dependiendo del contexto de su aplicación, siendo los lobbies los que condicionan las decisiones y no las evidencias científicas.

Finalmente, es crucial reflexionar sobre los propósitos de estas tecnologías, ya que la pregunta más importante a la que hay que responder es ¿Para qué utilizamos estas tecnologías? Por un lado, tenemos el modelo que introduce resistencias a herbicidas en variedades de cultivos importantes a nivel global (Zanatta et al., 2020). Este enfoque consiste en aplicar tratamientos

de herbicidas que permiten producir sin competencia de “malas hierbas” y sin que afecte al cultivo, pero obliga a comprar las semillas y herbicidas vendidos por las mismas empresas, creando un ciclo de dependencia. En este modelo ya se están viendo cada vez más especies de flora silvestre resistentes a herbicidas (Baek et al., 2021). Por otro lado, tenemos el modelo de modificar genéticamente una variedad para que, por ejemplo, se adapte mejor a las condiciones de cambio climático o resista mejor a potenciales enfermedades que puedan afectar al cultivo. Este enfoque se centra más en reducir los insumos químicos y se centra más en el manejo que cada agricultor haga para que esas características de la variedad sean efectivas y duraderas en el tiempo. Cada uno de estos modelos tiene implicaciones significativas, no solo para la agricultura, sino también para la sostenibilidad ambiental, económica y social. Es fundamental que se evalúen cuidadosamente las ventajas y desventajas de cada enfoque para asegurar que los beneficios de estas tecnologías avanzadas se maximicen mientras se minimizan sus posibles riesgos y dependencias.

6. CONCLUSIONES Y TESIS

CONCLUSIONES

Basado en los resultados de esta investigación, se pueden resaltar las siguientes conclusiones:

1. En la prospección realizada en 2014 en parcelas de pimiento de Euskadi mediante la técnica analítica DAS-ELISA, se observó que los Tobamovirus y TSWV fueron predominantes en cultivos protegidos, mientras que PVY prevaleció en condiciones al aire libre. Dentro de los Tobamovirus, TMGMV fue el más importante. Los siete virus analizados (PVY, TSWV, TMV, ToMV, TMGMV, PaMMV y PMMoV) fueron detectados en todos los sistemas de cultivo evaluados. Sin embargo, cuando se analizó PaMMV por HM, las muestras resultaron negativas para este virus. No se excluye la posibilidad de que haya dado positivo cruzado con anticuerpos para otros Tobamovirus. Además, se identificaron diversas combinaciones de infecciones múltiples de hasta 5 virus, incluyendo casos de positividad cruzada entre los virus evaluados.
2. Todos los aislados de PMMoV de la prospección de 2014 estudiados en el bioensayo de inoculación con variedades diferenciales, pertenecieron al patotipo P1.2, indicando que se requiere de al menos el gen de resistencia L3 para controlar los Tobamovirus de la zona.
3. En la prospección a gran escala realizada en 2019 por HM, se detectaron 10 virus (CMV, TSWV, PVY, TMGMV, BPeMV, ToMV, PMMoV, AMV, PeVYV, y PVX) de los 21 evaluados, sin detectarse la presencia de viroides. El virus detectado con mayor frecuencia fue CMV, especialmente en cultivos al aire libre. También fueron relevantes las infecciones por PVY y TSWV. En cultivo protegido destacaron los Tobamovirus, siendo TMGMV el más relevante junto con TSWV. Se observó por primera vez muestras infectadas por BPeMV, aunque las señales de hibridación obtenidas fueron muy tenues, requiriéndose la confirmación mediante otras técnicas moleculares. No se detectaron plantas infectadas por PaMMV y TMV, lo que sugiere la posibilidad de resultados positivos cruzados obtenidos en la prospección de 2014. Además, se registraron diversas combinaciones de infecciones múltiples, con una disminución en las coinfecciones entre Tobamovirus, indicando la mayor especificidad de la técnica de HM en comparación con la técnica DAS-ELISA.
4. El inóculo primario de CMV fue localizado en la flora silvestre de las parcelas y en sus alrededores, tanto antes como al final del cultivo. Antes del periodo de cultivo, destacaron como hospedantes plantas del género *Cardamine* y *Cerastium glomeratum*. Al final del ciclo del cultivo destacaron como hospedantes *Stellaria media* y *Oenothera rosea*. Además, se identificaron *Cardamine flexuosa*, *O. rosea*, *Geranium molle* y *Lamium hybridum* como nuevas especies hospedantes del virus.
5. Se ve imprescindible controlar a los insectos vectores de virus como CMV, PVY o TSWV con el fin de mitigar las incidencias de estos virus en campo. Una estrategia efectiva podría ser eficaz la instalación de malla antiinsectos que permita reducir el riesgo de infección por virus tanto en sistemas al aire libre como en invernadero. Además, sería interesante ajustar la fecha de transplante a la dinámica de vuelos de los pulgones, lo que ayudaría a minimizar la exposición de estos cultivos a los insectos vectores. Asimismo, sería

- conveniente incorporar genes de resistencia a los virus más importantes que afectan a los cultivos de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra.
6. Ante las elevadas incidencias de Tobamovirus detectadas en la prospección de 2014, se inició un programa de mejora para introducir los genes de resistencia L3 y L4 en las variedades locales de pimiento de Gernika y guindilla de Ibarra. Además, como parte de las estrategias de control, se propone el uso de semillas desinfestadas, certificadas y libres de virus así como inactivar el inóculo presente en los residuos de los cultivos y desinfectar los materiales de los invernaderos.
 7. Las polisondas de HM se han revelado como herramientas eficaces para la detección polivalente de múltiples virus en un solo ensayo, destacando su utilidad en el diagnóstico rápido y eficiente de patógenos en cultivos agrícolas. Sin embargo, tanto la longitud de las polisondas como la posición de las sondas individuales dentro de ellas han demostrado ser factores críticos que afectaron a su sensibilidad. El límite de detección de las polisondas poli12 y poli21 fue entre 5 y 25/125 veces menor que el obtenido con las sondas individuales, respectivamente. Sin embargo, poli21 fue particularmente más efectiva que poli12 para la detección de ciertos virus, como CMV y ToMV, probablemente debido a la posición central óptima de estas sondas individuales dentro de poli21. La localización de las sondas individuales en los extremos de las polisondas redujo significativamente la sensibilidad de la técnica debido probablemente a las restricciones termodinámicas para una correcta hibridación molecular en esa zona.
 8. El nuevo Tobamovirus detectado en las parcelas de pimiento de Euskadi resultó ser CPMMoV-Sp (chili pepper mild mottle virus), mostrando un porcentaje de identidad del 99,5 % con la secuencia de referencia en GenBank. El análisis RACE reveló la presencia de 22 nucleótidos adicionales en el extremo 5', en comparación con la secuencia de referencia. La generación de clones infecciosos mediante transcritos *in vitro* y/o expresión transitoria mediante cultivos de *Agrobacterium tumefaciens*, puso de manifiesto que la secuencia extra 5' terminal caracterizada en el presente trabajo fue crítica para el inicio de la infección, mientras que el residuo de citosina 5' terminal no resultó esencial. Se desarrollaron dos ribosondas específicas que permitieron la detección específica mediante HM, tanto de CPMMoV-Sp como BPeMV, dos virus que presentan un alto porcentaje de identidad entre ellos. Sin embargo, esta técnica de detección fue 125 veces menos sensible que la técnica de RT-PCR. El estudio de la transmisión vertical a través de semillas mostró una tasa de transmisión del 0,9 % al 8,5 %. Se observó que las variedades de pimiento portadoras del gen L1 fueron parcialmente susceptibles a la infección por CPMMV-Sp, con una tasa de infección del 20-40 % en las plantas inoculadas. En contraste, las variedades con los genes L2, L3, y L4 mostraron resistencia al virus. Estos hallazgos son cruciales para el desarrollo de estrategias de manejo y la obtención de variedades resistentes a este virus.
 9. Los genotipos obtenidos en el programa de mejora, se mostraron resistentes tanto genotípicamente como fenotípicamente, lográndose fijar los genes de resistencia a Tobamovirus L3 y L4 en homocigosis. Los genotipos con el gen L3 se mostraron resistentes a PMMoV P1.2 y a CPMMoV, mientras que los genotipos con L4 exhibieron resistencia a PMMoV P1.2.3 y CPMMoV. El desarrollo de estos genotipos resistentes a Tobamovirus tiene el potencial de hacer que el cultivo de estas variedades locales sea viable y sostenible en un futuro cercano.

10. Se han seleccionado con éxito genotipos resistentes a Tobamovirus, manteniendo el mismo nivel de rendimiento y características organolépticas que las variedades sensibles originales. Sin embargo, se observó que los genotipos de pimiento de Gernika con el gen L4 mostraron una menor productividad y peores tasas de germinación que la variedad sensible "Derio". En cambio, en los genotipos de guindilla de Ibarra que poseían el gen L4 no se detectaron problemas de germinación, aunque se observó una disminución en la producción respecto a la variedad sensible original "Ibarroria".
11. Se han seleccionado genotipos que han mostrado resultados positivos al analizar con marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a PVY y TSWV, pvr4 y tsw, respectivamente. En el futuro, será necesario comprobar las resistencias de estos genotipos mediante ensayos de inoculación y evaluar su comportamiento productivo y organoléptico en cultivo.

TESIS

La presente investigación se centra en el análisis y control de virus en cultivos de variedades locales de pimiento en Euskadi, evaluando la incidencia y diversidad viral en diferentes sistemas de cultivo mediante varios métodos de detección. A través de un análisis exhaustivo, este trabajo proporciona una visión integral de los desafíos y estrategias para el control de enfermedades virales que afectan a los cultivos de pimiento de la zona de estudio, contribuyendo de manera significativa en aspectos clave como la detección de patógenos, la obtención de genotipos resistentes, y el desarrollo de métodos de manejo destinados a garantizar la sostenibilidad productiva del cultivo. Adicionalmente, este estudio ha permitido identificar un nuevo Tobamovirus, detectado por primera vez en Europa, aportando valiosa información epidemiológica crucial para la implementación de medidas de control específicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accotto GP, Navas-Castillo J, Noris E, Moriones E, Louro D. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Eur J Plant Pathol*. 2000;106:179-186. [doi: 10.1023/A:1008736023293](https://doi.org/10.1023/A:1008736023293)

Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol*. 2009;10:537–545. [doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x).

Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol*. 2005 Mar;150(3):459-79. [doi:10.1007/s00705-004-0440-6](https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6).

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol*. 2017 Aug;162(8):2505-2538. doi: 10.1007/s00705-017-3358-5.

Aguilar MI, Guirado ML, Melero-Vara JM, Gómez J. Efficacy of composting infected plant residues in reducing the viability of Pepper mild mottle virus, Melon necrotic spot virus and its vector, the soil-borne fungus *Olpidium bornovanus*. *Crop Prot*. 2010;29(4):342-348. [doi:10.1016/j.cropro.2009.12.021](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.021).

Aizpuru I, García-Mijangos I, Garín P, Hermsilla CE, Herrera M, Lizaur X, Patino S, Pérez Dacosta JM, Renobales G, Uribe-Echebarría PM, Urrutia P, Valencia J. Claves ilustradas de la flora del País Vasco y territorios limítrofes. Vitoria-Gasteiz (España): Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 1999.

Alberdi-Collantes JC. Calidad e identificación en el desarrollo de la horticultura del País Vasco. *Espacio Tiempo y Forma. Serie VI, Geogr*. 2002;15:29–50. [doi: 10.5944/etfvi.15.2002.2593](https://doi.org/10.5944/etfvi.15.2002.2593).

Alberdi-Collantes JC. De la formación a la instalación: un modelo de espacio test agrario para el País Vasco (España). *Rev Esp Estud Agrosoc Pesq*. 2023;260:267-297. [doi:10.24197/reap.260.2023.267-297](https://doi.org/10.24197/reap.260.2023.267-297).

Alberdi-Collantes JC. Nekazal ustiatgien abandonoa, gero eta larrigoa Gipuzkoako adibidea. *Lurralde: Investigación y espacio*. 2017;40:123-143.

Albert D, Dumonceaux T, Carisse O, Beaulieu C, Filion M. Combining Desirable Traits for a Good Biocontrol Strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microorganisms*. 2022 Jun;10(6):1189. [doi: 10.3390/microorganisms10061189](https://doi.org/10.3390/microorganisms10061189).

Alcaide C, Rabadán MP, Moreno-Pérez MG, Gómez P. Implications of mixed viral infections on plant disease ecology and evolution. *Adv Virus Res*. 2020;106:145-169. [doi: 10.1016/bs.aivir.2020.02.001](https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.02.001).

Alfaro A, Cordoba M, Font M, Jordá M. Virosis relevantes del Tomate. Detección, Diagnóstico y Control. *Phytoma, Spain*; 2013:264.

- Ali A, Kobayashi M. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *J Virol Methods*. 2010 Feb;163(2):234-7. doi: [10.1016/j.jviromet.2009.09.026](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.026).
- Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol*. 2015 Nov 11;16:238. doi: [10.1186/s13059-015-0799-6](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0799-6).
- Allard RW. *Principles of Plant Breeding*. New York: John Wiley and Sons; 1960.
- Allersma AP, Hofstede RJM, Vreugdenhil DK. Stable inheritance of the L4 allele for resistance to PMMoV pathotype 123 in pepper (*Capsicum annuum*). In: *Progress in research on capsicum and eggplant: Proceedings of the XIIIth EUCARPIA Meeting*. Warsaw, Poland; 2007. pp. 45–50.
- Al-Tamimi N, Kawas H, Mansour A. Seed transmission viruses in squash seeds (*Cucurbita pepo*) in Southern Syria and Jordan Valley. *Jordan J Agric Sci*. 2010;5(4):497-506. Available from: <https://journals.ju.edu.jo/JJAS/article/view/864>.
- Altieri MA, Nicholls CI. Agroecología y resiliencia al cambio climático: principios y consideraciones metodológicas. *Agroecología*. 2013;8:7-20. Disponible en: <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/182921>
- Altieri MA. Agroecology, Small Farms, and Food Sovereignty. *Monthly Review*. 2009;61(3):102–13. doi:[10.14452/MR-061-03-2009-07_8](https://doi.org/10.14452/MR-061-03-2009-07_8)
- Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth Biol*. 2020a;9:1226–1233. doi: [10.1021/acssynbio.9b00507](https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00507)
- Aman R, Mahas A, Marsic T, Hassan N, Mahfouz MM. Efficient, Rapid, and Sensitive Detection of Plant RNA Viruses With One-Pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a Assay. *Front Microbiol*. 2020b Dec 17;11:610872. doi: [10.3389/fmicb.2020.610872](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610872).
- Anaya-López JL, González-Chavira MM, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V, Torres-Pacheco I. Selection of chili pepper genotypes resistant to pathogenic wilt disease complex. *Rev Mex Cienc Agric*. 2011;2:373–383. ISSN 2007-0934.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol*. 2004;19:535–544. doi: [10.1016/j.tree.2004.07.021](https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021).
- Andorno AV, López SN. Biological control of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) through banker plant system in protected crops. *Biol Control*. 2014;78:9-14. doi: [10.1016/j.biocontrol.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.003).
- Andrés JL, Rivera A, Fernández J. *Phytophthora nicotianae* pathogenic to pepper in northwest Spain. *J Plant Pathol*. 2003;85(2):91-98. <https://www.jstor.org/stable/41998130>
- Andrews J. *Peppers: The Domesticated Capsicums*. University of Texas Press: Austin, TX, USA. 1984.
- Anikina I, Kamarova A, Issayeva K, Issakhanova S, Mustafayeva N, Insebayeva M, Mukhamedzhanova A, Khan SM, Ahmad Z, Lho LH, Han H, Raposo A. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Front Plant Sci*. 2023 Jun 12;14:1163270. doi: [10.3389/fpls.2023.1163270](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163270).

- Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M, Maslenin L, Rosner A. A new pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) overcomes the L4 resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Dis*. 2008;92(7):1033-1037. [doi:10.1094/PDIS-92-7-1033](https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1033).
- Antignus Y. Control methods of virus diseases in the Mediterranean basin. *Adv Virus Res*. 2012;84:533-553. [doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00015-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00015-4).
- Aparicio F, Soler S, Aramburu J, Galapienso L, Nuez F, Pallás V, López C. Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur J Plant Pathol*. 2009;123:117–123. [doi: 10.1007/s10658-008-9347-5](https://doi.org/10.1007/s10658-008-9347-5).
- Arguello A, Monar M, Arguello V, Alvarado E. El banco de germoplasma como instrumento clave para la soberanía alimentaria. *Revista de Investigación Talentos*, Volumen VIII (1), Enero - Junio 2021. [doi:10.33789/talentos.8.1.148](https://doi.org/10.33789/talentos.8.1.148)
- Arli-Sokmen M, Mennan H, Sevik MA, Ecevit O. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*. 2005;33:347–358. [doi:10.1007/BF02981301](https://doi.org/10.1007/BF02981301).
- Arogundade O, Balogun OS, Akinyemi SOS, Kumar PL. Surveys of virus diseases on pepper (*Capsicum* spp.) in South-west Nigeria. *African J Biotechnol*. 2019;14:3198–3205.
- Arora H, Sharma A, Sharma S, Haron FF, Gafur A, Sayyed RZ, Datta R. Pythium Damping-Off and Root Rot of *Capsicum annuum* L.: Impacts, Diagnosis, and Management. *Microorganisms*. 2021 Apr 13;9(4):823. [doi: 10.3390/microorganisms9040823](https://doi.org/10.3390/microorganisms9040823).
- Arteaga L, Ortega R. Biological characterization of PVY as isolated from pepper in Spain. In: *Proceedings of the VI Meeting on Capsicum and Eggplant*; 1986 Oct 21-24; Zaragoza, Spain. p. 183-88.
- Azeez MA, Adubi AO, Durodola FA. Landraces and Crop Genetic Improvement. In: *Rediscovery Landraces as a Resource for the Future*. 2018:1-20. [doi:10.5772/intechopen.75944](https://doi.org/10.5772/intechopen.75944).
- Bacon F. *Novum Organum; or, True Suggestions for the Interpretation of Nature*. Translated by James Spedding, Robert Leslie Ellis, and Douglas Denon Heath. London: Longman; 1858.
- Baek Y, Bobadilla LK, Giacomini DA, Montgomery JS, Murphy BP, Tranel PJ. Evolution of Glyphosate-Resistant Weeds. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2021;255:93-128. [doi: 10.1007/398_2020_55](https://doi.org/10.1007/398_2020_55).
- Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, Bisaro DM, Voytas DF. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nat Plants*. 2015 Oct;1(10):15145. [doi: 10.1038/nplants.2015.145](https://doi.org/10.1038/nplants.2015.145).
- Bananej K, Keshavarz T, da Silva JPH, et al. Isolation and whole-genome sequencing of tomato brown rugose fruit virus from pepper in Iran. *J Plant Dis Prot*. 2023;131:49-55. [doi:10.1007/s41348-023-00813-w](https://doi.org/10.1007/s41348-023-00813-w).
- Baranek J, Pluskota M, Rusin M, et al. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from tropical greenhouses towards *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua* larvae. *BioControl*. 2023;68:39–48. [doi: 10.1007/s10526-022-10173-3](https://doi.org/10.1007/s10526-022-10173-3).
- Baranwal VK, Kapoor R, Kumar S, Srivastava N. Recent advances of virus diagnostics in horticultural crops. In: *Applied Plant Virology*. Elsevier Inc.; 2020. pp 27–37. [doi: 10.1016/B978-0-12-818654-1.00002-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00002-5).

- Barba M, Hadidi A. An overview of plant pathology and Application of next-generation sequencing technologies. CAB Rev. 2015;10:1–21. doi:10.1079/PAVSNNR201510005.
- Barbary A, Djian-Caporalino C, Palloix A, Castagnone-Sereno P. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.; in Solanaceae: From genes to the field. Pest Manag Sci. 2015;71:1591–1598. doi: [10.1002/ps.4091](https://doi.org/10.1002/ps.4091)
- Barboza GE, Carrizo-García C, Leiva González S, Scaldaferrero M, Reyes X. Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. PLoS ONE. 2019;14:e0209792. doi: [10.1371/journal.pone.0209792](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792).
- Barchenger DW, Rodriguez K, Jiang L, Hanson SF, Bosland PW. Allele-specific CAPS marker in a Ve1 homolog of *Capsicum annuum* for improved selection of *Verticillium dahliae* resistance. Mol. Breed. 2017;37:134. doi: [10.1007/s11032-017-0735-4](https://doi.org/10.1007/s11032-017-0735-4).
- Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. Int J Mol Sci. 2011;12:7861–7884.
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. Nat Clim Change. 2013;3:985-988. doi: 10.1038/nclimate1990
- Beijerinck MW. Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. Ver. K. Akad. Wet. Amsterdam. 1898;65:3-21.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Curr Opin Biotechnol. 2015 Apr;32:76-84. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.
- Berlandier F, Thackray D, Jones R, Latham L, Cartwright L. Determining the relative roles of different aphid species as vectors of cucumber mosaic and bean yellow mosaic viruses in lupins. Ann Appl Biol. 1997;131:297–314. doi:[10.1111/j.1744-7348.1997.tb05158.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1997.tb05158.x).
- Berzal-Herranz A, de la Cruz A, Tenllado F, Díaz-Ruiz JR, Lopez L, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, Garcia-Luque I. The *Capsicum* L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology. 1995;209(2):498-505. doi: [10.1006/viro.1995.1282](https://doi.org/10.1006/viro.1995.1282)
- Bhat AI, Rao GP. Transmission through seeds. In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks. New York, NY: Humana; 2020. doi: [10.1007/978-1-0716-0334-5_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_10).
- Bielza P, Quinto V, Contreras J, Torné M, Martín A, Espinosa PJ. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. Pest Manag Sci. 2007; 63(7):682-7. doi: [10.1002/ps.1388](https://doi.org/10.1002/ps.1388).
- Bijman J, Muradian R, Schuurman J, editors. Cooperatives, Economic Democratization and Rural Development. Cheltenham: Edward Elgar Publishing; 2011.
- Black LL. Fusarium wilt. In: Perezny K, Roberts PD, Murphy JF, Goldberg NP, editors. Compendium of Pepper Diseases. St. Paul: APS Press; 2003. p. 14-15.
- Blanc S, Drucker M, Uzest M. Localizing viruses in their insect vectors. Annu Rev Phytopathol. 2014;52:403-425. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045920.
- Blanchard A, Rolland M, Jacquot E, Ouest A. Potato virus Y: A century of evolution. Curr Top Virol. 2008;7:21–32.

- Blawid R, Silva JMF, Nagata T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. *Ann Appl Biol*. 2017;170:301–314. doi: [10.1111/aab.12345](https://doi.org/10.1111/aab.12345).
- Blaya J, Lacasa C, Lacasa A, Martínez V, Santísima-Trinidad AB, Pascual JA, Ros M. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates in southeast Spain and their detection and quantification through a real-time TaqMan PCR. *J Sci Food Agric*. 2015;95(6):1243-51. doi: [10.1002/jsfa.6813](https://doi.org/10.1002/jsfa.6813).
- Boccard F, Baulcombe D. Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*. 1993 Apr;193(2):563-78. doi: [10.1006/viro.1993.1165](https://doi.org/10.1006/viro.1993.1165).
- Boiteux LS, De Avila AC. Inheritance of a resistance specific to Tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. *Euphytica*. 1994; 75:139–142. doi: [10.1007/BF00024541](https://doi.org/10.1007/BF00024541).
- Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, Mumford R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res*. 2014 Jun 24;186:20-31. doi: [10.1016/j.virusres.2013.12.007](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007).
- Boonham N, Tomlinson J, Mumford R. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol*. 2007;45:307-28. doi: [10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349).
- Boonham N, Walsh K, Smith P, Madagan K, Graham I, Barker I. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J Virol Methods*. 2003;108(2):181-7. doi: [10.1016/S0166-0934\(02\)00284-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00284-7).
- Bosland PW. An American in Spain. In: Prohens J, Rodríguez-Burruezo A, editors. *Advances in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant: Proceedings of the XIVth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant; 2010 Aug 30-Sep 1; Valencia*. p. 21-25.
- Bouagga S, Urbaneja A, Pérez-Hedo M. Combined use of predatory mirids with *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) to enhance pest management in sweet pepper. *J Econ Entomol*. 2018;111(3):1112–1120. doi: [10.1093/jee/toy072](https://doi.org/10.1093/jee/toy072).
- Boualem A, Dogimont C, Bendahmane A. The battle for survival between viruses and their host plants. *Curr Opin Virol*. 2016 Feb;17:32-38. doi: [10.1016/j.coviro.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.12.001).
- Boukema IW. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. *Euphytica*. 1980;29:433-439. doi: [10.1007/BF00025143](https://doi.org/10.1007/BF00025143).
- Boukema IW. Resistance to a new strain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. *Capsicum Newsl*. 1982;1:50–52.
- Boukema IW. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by allele of the L-locus. *Capsicum Newsl*. 1984;3:47–48.
- Bruenn JA. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1991 Jan 25;19(2):217-26. doi: [10.1093/nar/19.2.217](https://doi.org/10.1093/nar/19.2.217).
- Burgio G, Ravaglia F, Maini S, Bazzocchi GG, Masetti A, Lanzoni A. Mating disruption of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on processing tomato: First applications in Northern Italy. *Insects*. 2020 Mar 26;11(4):206. doi: [10.3390/insects11040206](https://doi.org/10.3390/insects11040206).

- Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 2011;16(5):265–272. doi: [10.1016/j.tplants.2011.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010).
- Byzova NA, Vinogradova SV, Porotikova EV, Terekhova UD, Zherdev AV, Dzantiev BB. Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. *Biosensors.* 2018; 8(4):111. doi:10.3390/bios8040111
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci Technol.* 2012;22(12):1398-1416. doi: [10.1080/09583157.2012.731494](https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494)
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE. Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Sci Technol.* 2012;22(12):1398-1416. doi: [10.1080/09583157.2012.731494](https://doi.org/10.1080/09583157.2012.731494)
- Cameron R, Lang EB, Alvarez JM. Use of honeydew production to determine reduction in feeding by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) adults when exposed to cyantraniliprole and imidacloprid treatments. *J Econ Entomol.* 2014;107(2):546–550. doi: [10.1603/EC13369](https://doi.org/10.1603/EC13369).
- Canto T, Aranda MA, Fereres A. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Glob Change Biol.* 2009;15(8):1884-1894. doi: [10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x).
- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V. Molecular characterization of an almond isolate of Hop Stunt Viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnosis in almond samples. *Eur J Plant Pathol.* 1999;105:553-558. doi: [10.1023/A:1008794531725](https://doi.org/10.1023/A:1008794531725).
- Cao SK, Du XX, Chen G, Zeng AP, Yu H. Relative activity of 15 bacterial strains against the larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, and *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* 2023 Oct 10;116(5):1505-1517. doi: [10.1093/jee/toad147](https://doi.org/10.1093/jee/toad147).
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, Daubèze AM. QTLs for a component of partial resistance to Cucumber mosaic virus in pepper: Restriction of virus installation in host-cells. *Theor Appl Genet.* 1997;94:431–438. doi: [10.1007/s001220050433](https://doi.org/10.1007/s001220050433)
- Caranta C, Pflieger S, Lefebvre V, Daubèze AM, Thabuis A, Palloix A. QTLs involved in the restriction of Cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper. *Theor Appl Genet.* 2002;104:586-91. doi: [10.1007/s001220100753](https://doi.org/10.1007/s001220100753).
- Caranta C, Thabuis A, Palloix A. Development of a CAPS marker for the Pvr4 locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome.* 1999;42:1111–1116. doi: [10.1139/g99-069](https://doi.org/10.1139/g99-069).
- Carbonell P, Alonso A, Grau A, Salinas J, García-Martínez S, Ruiz J. Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces - from the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity.* 2018;10(1):12. doi: [10.3390/d10010012](https://doi.org/10.3390/d10010012).
- Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis P. Signaling in induced resistance. *Adv Virus Res.* 2010;76:57–121. doi: [10.1016/S0065-3527\(10\)76003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76003-6)
- Carrizo-García C, Barfuss MHJ, Sehr EM, Barboza GE, Samuel R, Moscone EA, Ehrendorfer F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (Capsicum, Solanaceae). *Ann Bot.* 2016;118:35–51. doi: [10.1093/aob/mcw079](https://doi.org/10.1093/aob/mcw079).

- Cating RA, Funke CN, Kaur N, Hamm PB, Frost KE. A multiplex reverse transcription (RT) high-fidelity PCR protocol for the detection of six viruses that cause potato tuber necrosis. *Am J Pot Res.* 2015;92:536–540. doi: [10.1007/s12230-015-9457-5](https://doi.org/10.1007/s12230-015-9457-5).
- Cebolla-Cornejo J, Soler S, Nuez F. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *Int J Plant Prod.* 2007;1:113–128.
- Chaim A, Grube R, Lapidot M, et al. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theor Appl Genet.* 2001;102:1213–20. doi: [10.1007/s001220100581](https://doi.org/10.1007/s001220100581).
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol.* 2016 Sep;17(7):1140–53. doi: [10.1111/mpp.12375](https://doi.org/10.1111/mpp.12375).
- Chapman E, Carrington J. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet.* 2007;8(11):884–896. doi: [10.1038/nrg2179](https://doi.org/10.1038/nrg2179).
- Chare ER, Holmes EC. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol.* 2006;151:933–946. doi: [10.1007/s00705-005-0675-x](https://doi.org/10.1007/s00705-005-0675-x).
- Chellemi DO, Mitchell DJ, Kannwischer-Mitchell ME, Rayside PA, Roskopf EN. *Pythium* spp. Associated with Bell Pepper Production in Florida. *Plant Dis.* 2000 Dec;84(12):1271–1274. doi: [10.1094/PDIS.2000.84.12.1271](https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.12.1271).
- Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 2018;360:436–439. doi: [10.1126/science.aar6245](https://doi.org/10.1126/science.aar6245).
- Chertow DS. Next-generation diagnostics with CRISPR. *Science.* 2018;360:381–382. doi: [10.1126/science.aat4982](https://doi.org/10.1126/science.aat4982).
- Choi GS, Kim JH, Lee DH, Kim JS, Ryu KH. Occurrence and distribution of viruses infecting pepper in Korea. *Plant Pathol J.* 2005;21:258–261.
- Choi S, Lee JH, Kang WH, Kim J, Huy HN, Park SW, Son EH, Kwon JK, Kang BC. Identification of Cucumber mosaic resistance 2 (*cmr2*) That Confers Resistance to a New Cucumber mosaic virus Isolate P1 (CMV-P1) in Pepper (*Capsicum* spp.). *Front Plant Sci.* 2018 Aug 21;9:1106. doi: [10.3389/fpls.2018.01106](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01106).
- Choudhary N, Kumari P, Panda S. RNA plant viruses: biochemistry, replication and molecular genetics. In: *Applied Plant Virology*. Elsevier Inc. 2020;pp 183–195. doi: [10.1016/b978-0-12-818654-1.00014-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00014-1).
- Christiaensen L, Rutledge Z, Taylor JE. The future of work in agriculture: some reflections. Washington, DC: The World Bank; 2020 Mar. Policy Research Working Paper; No. 9193. Available from: <https://documents1.worldbank.org/curated/en/777731585054424384/pdf/The-Future-of-Work-in-Agriculture-Some-Reflections.pdf>
- Chung BY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 15;105(15):5897–902. doi: [10.1073/pnas.0800468105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800468105).

Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol.* 1977 Mar;34(3):475-83. doi: [10.1099/0022-1317-34-3-475](https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475).

Climent VC, Ávila RC. El papel de las cooperativas en la crisis agraria. Estudio empírico aplicado a la agricultura mediterránea española. *Cuad Desarro Rural.* 2013;9:175-194. doi:[10.11144/Javeriana.cdr9-69.pcae](https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr9-69.pcae)

Coelho FC, Coelho EM, Egerer M. Local food: Benefits and failings due to modern agriculture. *Sci Agric.* 2018;75:84-94. doi:[10.1590/1678-992x-2015-0439](https://doi.org/10.1590/1678-992x-2015-0439).

Collier SM, Moffett P. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci.* 2009;14(10):521–529. doi: [10.1016/j.tplants.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001).

Colomer I, Aguado P, Medina P, Heredia RM, Fereres A, Belda JE, Viñuela E. Field trial measuring the compatibility of methoxyfenozide and flonicamid with *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) and *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) in a commercial pepper greenhouse. *Pest Manag Sci.* 2011;67:1237–1244. doi: [10.1002/ps.2173](https://doi.org/10.1002/ps.2173).

Condés-Rodríguez LF. Pimiento. In: Cultivos hortícolas al aire libre. Maroto B. JV, Baixauli S.C, Eds. Serie Agricultura España. 2017;13:471-507. Disponible en: <http://www.publicacionescajamar.es/pdf/series-tematicas/agricultura/cultivos-hortícolas-al-aire-libre-2.pdf>.

Cooper I, Jones RAC. Wild plants and viruses: Under-investigated ecosystems. *Adv Virus Res.* 2006;67(6):1-47. doi: [10.1016/S0065-3527\(06\)67001-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)67001-2).

Córdoba MC, García A, Alfaro A, Jordá C. Seed Transmission of Pepino mosaic virus and Efficacy of Tomato Seed Disinfection Treatments. *Plant Dis.* 2007;91:1250–1254. doi:[10.1094/PDIS-91-10-1250](https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1250).

Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH, Sicard O, Caballero M, Roux F, et al. The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e39169. doi: [10.1016/S0065-3527\(09\)07502-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-2).

Csorba T, Pantaleo V, Burgyán J. RNA Silencing: An Antiviral Mechanism. In: Loebenstein G, Carr JP, editors. *Advances in Virus Research.* Vol 75. Academic Press; 2009. p. 35-230. doi: [10.1016/S0065-3527\(09\)07502-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-2).

Cubero JI. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Madrid: Mundiprensa; 2013. 602 p. Spanish. ISBN-13: 9788484766551

Cuevas-Reyes P. Importancia de la resiliencia biológica como posible indicador del estado de conservación de los ecosistemas: implicaciones en los planes de manejo y conservación de la biodiversidad. *Biológicas.* 2010;12:1-7.

Cui X, Wei T, Chowda-Reddy RV, Sun G, Wang A. The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology.* 2010 Feb 5;397(1):56-63. doi: [10.1016/j.virol.2009.11.015](https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.015).

Culver JN, Lindbeck AGC, Dawson WO. Virus-Host Interactions: Induction of Chlorotic and Necrotic Responses in Plants by Tobamoviruses. *Annu Rev Phytopathol.* 1991;29:193–217. doi:[10.1146/annurev.py.29.090191.001205](https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.001205).

- Dall DJ, Lovelock DA, Penrose LDJ, Constable FE. Prevalences of Tobamovirus contamination in seed lots of tomato and capsicum. *Viruses*. 2023;15(4):883. <https://doi.org/10.3390/v15040883>
- Darnhofer I. Resilience and why it matters for farm management. *Eur Rev Agric Econ*. 2014;41:461-484.
- Davino S, Caruso AG, Bertacca S, Barone S, Panno S. Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants (Basel)*. 2020;9(11):1615. doi:10.3390/plants9111615.
- Davino S, Miozzi L, Panno S, Rubio L, Davino M, Accotto GP. Recombination profiles between Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications. *J Gen Virol*. 2012;93:2712-2717. doi: [10.1099/vir.0.045773-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.045773-0).
- De Pascale S, Ruggiero C, Barbieri G, Maggio A. Physiological Responses of Pepper to Salinity and Drought. *J Am Soc Hortic Sci*. 2003;128:48–54. doi: [10.21273/JASHS.128.1.0048](https://doi.org/10.21273/JASHS.128.1.0048).
- De Ronde D, Butterbach P, Kormelink R. Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci*. 2014;5:307. doi: [10.3389/fpls.2014.00307](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00307). Jones JDG, Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: [10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286)
- De Schutter O. Report submitted by the Special Rapporteur on the right to food, Olivier De Schutter. United Nations General Assembly. 2010. A/HRC/16/49.
- De Souza VL, Café-Filho AC. Resistance to *Leveillula taurica* in the genus *Capsicum*. *Plant Pathol*. 2003;52:613–619. doi: [10.1046/j.1365-3059.2003.00920.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00920.x)
- Demski JW. Tobacco Mosaic Virus is seedborne in pimiento peppers. *Plant Dis*. 1981;65(9):723. doi:10.1094/PD-65-723.
- Deng P, Wu Z, Wang A. The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virol J*. 2015 Sep 15;12:141. doi: [10.1186/s12985-015-0369-2](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0369-2).
- Devran Z, Kahveci E, Özkaynak E, Studholme DJ, Tör M. Development of molecular markers tightly linked to *Pvr4* gene in pepper using next-generation sequencing. *Mol Breeding*. 2015;35(4):1-9. doi: [10.1007/s11032-015-0294-5](https://doi.org/10.1007/s11032-015-0294-5).
- Di Dato F, Parisi M, Cardi T, Tripodi P. Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in *Capsicum* germplasm. *Euphytica*. 2015;204:103–119. doi: [10.1007/s10681-014-1345-4](https://doi.org/10.1007/s10681-014-1345-4).
- Dik AJ, Wubben JP. Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Eds. Springer, Dordrecht. 2007. doi: [10.1007/978-1-4020-2626-3_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_17).
- Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:14789–14794. doi: [10.1073/pnas.97.26.14789](https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14789).
- Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*. 1994 Feb;198(2):593-601. doi: [10.1006/viro.1994.1071](https://doi.org/10.1006/viro.1994.1071).

- Ding SW, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 2007;130(3):413–426. [doi: 10.1016/j.cell.2007.07.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039).
- Djian-Caporalino C, Fazari A, Arguel MJ, Vernie T, Van de Castele C, Faure I, Brunoud G, Pijarowski L, Palloix A, Lefebvre V, et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor Appl Genet*. 2007;114:473–476. [doi: 10.1007/s00122-006-0447-3](https://doi.org/10.1007/s00122-006-0447-3).
- Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J*. 1994 Mar 15;13(6):1482-91. [doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06403.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06403.x)
- Dombrovsky A, Glanz E, Pearlsman M, et al. Characterization of Pepper yellow leaf curl virus, a tentative new Polerovirus species causing a yellowing disease of pepper. *Phytoparasitica*. 2010;38:477-486. <https://doi.org/10.1007/s12600-010-0120-x>.
- Dombrovsky A, Smith E. Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. In: *Advances in Seed Biology*. 2017. [doi: 10.5772/intechopen.70244](https://doi.org/10.5772/intechopen.70244).
- Dong X. NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7:547–552. [doi: 10.1016/j.pbi.2004.07.005](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.005).
- Eldan O, Ofir A, Luria N, Klap C, Lachman O, Bakelman E, Belausov E, Smith E, Dombrovsky A. Pepper Plants Harboring L Resistance Alleles Showed Tolerance toward Manifestations of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Disease. *Plants*. 2022; 11(18):2378. [doi:10.3390/plants11182378](https://doi.org/10.3390/plants11182378)
- Elena SF, Fraile A, García-Arenal F. Evolution and emergence of plant viruses. In: Maramorosch K, Murphy FA, editors. *Advances in Virus Research*. Vol 88. Academic Press; 2014. p. 161-191. [doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9).
- Elphinstone JG, Allen C, Prior P, Hayward AC. The current bacterial wilt situation: A global overview. In *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex*. American Phytopathological Society: St Paul, MN, USA, 2005;pp. 9–28.
- Espinosa PJ, Bielza P, Contreras J, Lacasa A. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manag Sci*. 2002; 58(9):920-7. [doi: 10.1002/ps.573](https://doi.org/10.1002/ps.573).
- Esquinas-Alcázar J. Protecting crop genetic diversity for food security: Political, ethical and technical challenges. *Nat Rev Genet*. 2005;6:946-953. [doi:10.1038/nrg1729](https://doi.org/10.1038/nrg1729).
- FAO. Producción vegetal Capítulo 6. In *El cultivo protegido en clima mediterráneo*. 2002;pp 204-217.
- Fazari A, Palloix A, Wang L, Yan Hua M, Palloix AM, Zhang BX, Djian-Caporalino C. The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding*. 2012;131(5):665-673. [doi: 10.1111/j.1439-0523.2012.01994.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01994.x).
- Feenstra GW. Local food systems and sustainable communities. *Am J Altern Agric*. 1997;12(1):28-36. [doi:10.1017/S0889189300007165](https://doi.org/10.1017/S0889189300007165)
- Fereres A, Raccah B. Plant Virus Transmission by Insects. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2015 Apr. [doi: 10.1002/9780470015902.a0000760.pub3](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000760.pub3).

- Ferriol I, Ferrer RM, Luis–Arteaga M, Guerri J, Moreno P, Rubio L. Genetic variability and evolution of broad bean wilt virus 1: role of recombination, selection and gene flow. *Arch Virol*. 2014;159:779-784. [doi:10.1007/s00705-013-1868-3](https://doi.org/10.1007/s00705-013-1868-3).
- Ferriol I, Rangel E, Panno S, Davino S, Han C, Olmos A, et al. Rapid detection and discrimination of fabaviruses by flow-through hybridisation with genus-and species-specific riboprobes. *Ann Appl Biol*. 2015;167(1):26-35. [doi:10.1111/aab.12204](https://doi.org/10.1111/aab.12204).
- Fiallo-Olivé E, Pan LL, Liu SS, Navas-Castillo J. Transmission of Begomoviruses and other whitefly-borne viruses: Dependence on the vector species. *Phytopathology*. 2020 Jan;110(1):10-17. [doi: 10.1094/PHYTO-07-19-0273-FI](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0273-FI).
- Ficiciyan A, Loos J, Sievers-Glotzbach S, Tschardt T. More than yield: ecosystem services of traditional versus modern crop varieties revisited. *Sustainability*. 2018;10(8):2834. [doi:10.3390/su10082834](https://doi.org/10.3390/su10082834).
- Fita AM, Rodríguez-Burruezo, Prohens J. *Genética y Mejora Vegetal*. Valencia: Universitat Politècnica de Valencia Serv. Publ.; 2008. 192 p. Spanish. Softcover. ISBN: 9788483633403.
- Font I, Alfaro-Fernández A. El virus de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV) amplía su gama de hospedantes en los cultivos españoles. *Phytoma*. 2015;272:25-30.
- Frison EA, Stace-Smith R. Cross-reacting and heterospecific monoclonal antibodies produced against arabis mosaic nepovirus. *J Gen Virol*. 1992;73(10):2525–253. [doi:10.1099/0022-1317-73-10-2525](https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-10-2525).
- Gajardo HA, Gómez-Espinoza O, Boscarriol Ferreira P, Carrer H, Bravo LA. The Potential of CRISPR/Cas Technology to Enhance Crop Performance on Adverse Soil Conditions. *Plants (Basel)*. 2023 May 5;12(9):1892. [doi: 10.3390/plants12091892](https://doi.org/10.3390/plants12091892).
- Gallois JL, Moury B, German-Retana S. Role of the genetic background in resistance to plant viruses. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):2856. [doi:10.3390/ijms19102856](https://doi.org/10.3390/ijms19102856).
- Gambino G. Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses. In: Uyeda I, Masuta C, editors. *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 1236. New York, NY: Humana Press; 2015. p. 39-47 [doi: 10.1007/978-1-4939-1743-3_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_4).
- Gandariasbeitia M, López-Pérez JA, Juaristi B, Abaunza L, Larregla S. Biodisinfestation with agricultural by-products developed long-term suppressive soils against *Meloidogyne incognita* in lettuce crop. *Front Sustain Food Syst*. 2021;5:663248. [doi: 10.3389/fsufs.2021.663248](https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.663248).
- Gandariasbeitia M, Ojinaga M, Orbegozo E, Ortíz-Barredo A, Núñez-Zofío M, Mendarte S, Larregla S. Winter biodisinfestation with Brassica green manure is a promising management strategy for *Phytophthora capsici* control of protected pepper crops in humid temperate climate regions of northern Spain. *Span J Agric Res*. 2019;17(1):e1005. [doi: 10.5424/sjar/2019171-13808](https://doi.org/10.5424/sjar/2019171-13808).
- García JA, Pallás V. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr Opin Virol*. 2015;11:21-30. [doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.001](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.001).
- García-Arenal F, McDonald BA. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*. 2003 Aug;93(8):941-52. [doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.8.941](https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.8.941).

García-Cano E, Resende RO, Fernández–Muñoz R, Moriones E. Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*. 2006;96:1263–9. [doi: 10.1094/PHYTO-96-1263](https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1263).

García-Martínez S, Giménez M, Alonso A, Grau A, Valero M, Parra J, Aguilar A, Gamayo JD, Ruiz J. Similar yield reductions under different growing conditions caused by the introgression of genetic resistance to TYLCV into traditional tomato cultivars. *Acta Hort.* 2012;935:149-152. [doi:10.17660/ActaHortic.2012.935.21](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.935.21).

Garger SJ, Turpen T, Carrington JC, et al. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant Mol Biol Rep*. 1983;1:21-25. [doi: 10.1007/BF02680258](https://doi.org/10.1007/BF02680258).

Genda Y, Kanda A, Hamada H, Sato K, Ohnishi J, Tsuda S. Two Amino Acid Substitutions in the Coat Protein of Pepper mild mottle virus Are Responsible for Overcoming the L(4) Gene-Mediated Resistance in *Capsicum* spp. *Phytopathology*. 2007 Jul;97(7):787-93. [doi: 10.1094/PHYTO-97-7-0787](https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-7-0787).

Genda Y, Sato K, Nunomura O, Hirabayashi T, Ohnishi J, Tsuda S. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in *Capsicum annuum* seeds. *J Gen Plant Pathol*. 2005;71(3):238-242. [doi:10.1007/S10327-005-0189-0](https://doi.org/10.1007/S10327-005-0189-0)

Genda Y, Sato K, Nunomura O, Hirabayashi T, Tsuda S. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in developing seeds and seedlings of *Capsicum annuum*. *J Gen Plant Pathol*. 2011;77(3):201-208. <http://doi.org/10.1007/s10327-011-0307-0>.

Gergerich RC, Dolja VV. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. 2006. [doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01](https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01).

Ghabrial SA, Castón JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*. 2015;479-480:356-68. [doi: 10.1016/j.virol.2015.02.034](https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034).

Ghazaryan MH. Chemical control of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* and its effects on the qualitative indicators of peppers. *SABRAO J Breed Genet*. 2023;55(5):1713-1718. <http://doi.org/10.54910/sabrao2023.55.5.23>.

Ghosh S, Ghanim M. Factors determining transmission of persistent viruses by *Bemisia tabaci* and emergence of new virus-vector relationships. *Viruses*. 2021 Sep 11;13(9):1808. [doi: 10.3390/v13091808](https://doi.org/10.3390/v13091808).

Gibbs AJ, Wood J, Garcia-Arenal F, Ohshima K, Armstrong JS. Tobamoviruses have probably co-diverged with their eudicotyledonous hosts for at least 110 million years. *Virus Evol*. 2015 16;1(1):vev019. [doi: 10.1093/ve/vev019](https://doi.org/10.1093/ve/vev019).

Gilardi P, Garcia-Luque I, Serra MT. The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in *Capsicum*. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 7):2077-2085. [doi: 10.1099/vir.0.80017-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80017-0)

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154:442–451. [doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044).

Gniffke PA, Shieh SC, Lin SW, Sheu ZM, Chen JR, Ho FI, et al. Pepper research and breeding at AVRDC - The World Vegetable Center. In: Breakthroughs in the genetics and breeding of

capsicum and eggplant; Proceedings of the XV EUCARPIA meeting, 15th, Torino, 2-4 September 2013, Italy. <https://worldveg.tind.io/record/50155>.

Gobierno Vasco. Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca de Gobierno Vasco. Cambio Climático: impacto y adaptación en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Vitoria-Gasteiz: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 2011. Disponible en: https://www.euskadi.eus/contenidos/documentacion/kegokitzen/es_def/adjuntos/cambio_climatico.pdf

González-Salán M, Bosland P. Sources of resistance to Verticillium wilt in *Capsicum*. Euphytica. 1991;59:49–53. [doi: 10.1007/BF00025360](https://doi.org/10.1007/BF00025360).

Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science. 2018;360:439–444. [doi: 10.1126/science.aag0179](https://doi.org/10.1126/science.aag0179).

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. FEBS Lett. 1988 Aug 1;235(1-2):16-24. [doi: 10.1016/0014-5793\(88\)81226-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81226-2).

Griffel LM, Delparte D, Whitworth J, Bodily P, Hartley D. Evaluation of artificial neural network performance for classification of potato plants infected with potato virus Y using spectral data on multiple varieties and genotypes. Smart Agric Technol. 2023;3:100101. [doi:10.1016/j.atech.2022.100101](https://doi.org/10.1016/j.atech.2022.100101).

Groth-Helms D, Juszczak S, Adkins S. First report of Chili pepper mild mottle virus in calabrochoa in the United States. New Dis Rep. 2022;46(1):e12120. [doi:10.1002/NDR2.12120](https://doi.org/10.1002/NDR2.12120).

Grube R, Blauth J, RNAedo Andrés MS, Caranta C, Jahn MK. Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. Theor Appl Genet. 2000;101:852–859. [doi: 10.1007/s001220051552](https://doi.org/10.1007/s001220051552).

Guo GJ, Wang SB, Liu JB, Pan BG, Diao WP, Ge W, Gao CZ, Snyder JC. Rapid identification of QTLs underlying resistance to Cucumber mosaic virus in pepper (*Capsicum frutescens*). Theor Appl Genet. 2017; 130:41–52. [doi: 10.1007/s00122-016-2790-3](https://doi.org/10.1007/s00122-016-2790-3).

Guo HS, Ding SW. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. EMBO J. 2002 Feb 1;21(3):398-407. [doi: 10.1093/emboj/21.3.398](https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.398).

Gurung S, Short DPG, Hu X, Sandoya GV, Hayes RJ, Subbarao KV. Screening of wild and cultivated *Capsicum* germplasm reveals new sources of Verticillium wilt resistance. Plant Dis. 2015;10:1404–1409. [doi: 10.1094/PDIS-01-15-0113-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0113-RE).

Ha C, Coombs S, Revill PA, Harding RM, Vu M, Dale JL. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch Virol. 2008;153(1):25-36. [doi: 10.1007/s00705-007-1053-7](https://doi.org/10.1007/s00705-007-1053-7).

Hadidi A, Czosnek H, Barba M. DNA microarrays and their potential applications for the detection of plant viruses, viroids, and phytoplasmas. J Plant Pathol. 2004 Jul;86(2):97-104. <http://www.jstor.org/stable/41998178>.

Hadidi A, Flores R, Candresse T, Barba M. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. Front Microbiol. 2016 Aug 26;7:1325. [doi: 10.3389/fmicb.2016.01325](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325).

Hajimorad MR, Eggenberger AL, Hill JH. Evolution of Soybean mosaic virus-G7 molecularly cloned genome in Rsv1-genotype soybean results in emergence of a mutant capable of evading Rsv1-mediated recognition. *Virology*. 2003;314:497–509. [doi:10.1016/S0042-6822\(03\)00456-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00456-2).

Hak H, Spiegelman Z. The Tomato Brown Rugose Fruit Virus Movement Protein Overcomes Tm-22 Resistance in Tomato While Attenuating Viral Transport. *Mol Plant Microbe Interact*. 2021;34(9):1024-1032. [doi:10.1094/MPMI-01-21-0023-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-01-21-0023-R).

Hall RD, Holden MA, Yeoman MM. The Accumulation of Phenylpropanoid and Capsaicinoid Compounds in Cell Cultures and Whole Fruit of the Chilli Pepper, *Capsicum frutescens* Mill. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1987;8:163–176. [doi: 10.1007/BF00043153](https://doi.org/10.1007/BF00043153).

Hansen EA, Funderburk JE, Reitz SR, Ramachandran S, Eger JE, McAuslane H. Within-plant distribution of *Frankliniella* species (*Thysanoptera: Thripidae*) and *Orius insidiosus* (*Heteroptera: Anthracoridae*) in field pepper. *Environ Entomol*. 2003 Oct 1;32(5):1035-44. [doi: 10.1603/0046-225X-32.5.1035](https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1035).

Hare WW. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper. *Phytopathology*. 1957;47(8):455-459.

Harlan JR. *Crops and Man*. 2nd ed. Madison (WI): American Society of Agronomy, Crop Science Society of America; 1992.

Hasan N, Choudhary S, Naaz N, Sharma N, Laskar RA. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021 Aug 27;19(1):128. [doi: 10.1186/s43141-021-00231-1](https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1).

Hashimoto M, Neriya Y, Yamaji Y, Namba S. Recessive Resistance to Plant Viruses: Potential Resistance Genes Beyond Translation Initiation Factors. *Front Microbiol*. 2016;7:1695. [doi: 10.3389/fmicb.2016.01695](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01695).

HAZI. Gernikako piperra: Análisis del sector (operadores y gran distribución). 2018. (Informe interno de Hazi).

Hébrard E, Pinel-Galzi A, Bersoult A, Siré C, Fargette D. Emergence of a resistance-breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J Gen Virol*. 2006;87:1369-73. [doi: 10.1099/vir.0.81659-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81659-0).

Herranz MC, Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Pallás V. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or ‘polyprobe’. *J Virol Methods*. 2005a;124:49-55. [doi: 10.1016/j.jviromet.2004.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.003).

Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Sauri A, Mingarro I, Pallas V. Mutational analysis of the RNA-binding domain of the Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology*. 2005b;339(1):31–41. [doi: 10.1016/j.virol.2005.05.020](https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.020).

Herrera JA, Córdoba MC, Cebrián MC, Alfaro A, Jordá C. Seed transmission of Melon necrotic spot virus and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathol*. 2009;58:436–442. [doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01985.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01985.x)

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat Biotechnol*. 1992 Apr;10(4):413-417. [doi: 10.1038/nbt0492-413](https://doi.org/10.1038/nbt0492-413).

- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotechnol.* 1993;11:1026-1030. doi: [10.1038/nbt0993-1026](https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026).
- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci.* 2013;4:154. doi: [10.3389/fpls.2013.00154](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154).
- Hiskias Y, Lesemann DE, Vetten HJ. Occurrence, distribution and relative importance of viruses infecting hot pepper and tomato in the major growing areas of Ethiopia. *J Phytopathol.* 1999;147:5–11. doi:[10.1046/j.1439-0434.1999.147001005.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.147001005.x).
- Hobbs HA, Eastburn DM, D’Arcy CJ, Kindhart JD, Masiunas JB, Voegtlin DJ, et al. Solanaceous Weeds as Possible Sources of Cucumber mosaic virus in Southern Illinois for Aphid Transmission to Pepper. *Plant Dis.* 2000;84:1221–1224. doi:[10.1094/PDIS.2000.84.11.1221](https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.11.1221).
- Hoffmeisterová H, Kratochvílová K, Čeřovská N, Slavíková L, Dušek J, Muller K, Fousek J, Plchová H, Navrátil O, Kundu JK, Moravec T. One-Enzyme RTX-PCR for the Detection of RNA Viruses from Multiple Virus Genera and Crop Plants. *Viruses.* 2022 Jan 31;14(2):298. doi: [10.3390/v14020298](https://doi.org/10.3390/v14020298).
- Hollander PW, Kieper SN, Borst JW, Van Lent JW. The role of plasmodesma-located proteins in tubule-guided virus transport is limited to the plasmodesmata. *Arch Virol.* 2016;161(9):2431-2440. doi: [10.1007/s00705-016-2936-2](https://doi.org/10.1007/s00705-016-2936-2).
- Holmes FO. Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in the pepper. *Phytopathology.* 1937;27:637–642.
- Holmes FO. Inheritance of resistance to viral diseases in plants. *Adv Virus Res.* 1954;2:1–30.
- Holmes FO. Interspecific transfer of a gene governing type of response to tobacco-mosaic infection. *Phytopathology.* 1936;26:1007–1014.
- Holmes FO. Local lesions in tobacco mosaic. *Bot Gaz.* 1929;87:39–55.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1262-1278. doi: [10.1016/j.cell.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010).
- Hu JS, Li HP, Barry K, Wang M, Jordan R. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis.* 1995 Sep;79(9):902-906.
- Hui JW, Bi XQ, Hong YC, Bin P, Jian HC, Qin SG. The rate of seed contamination and transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in watermelon and melon. *Scientia Agricultura Sinica.* 2011;44(7):1527-32. doi: [10.3864/j.issn.0578-1752.2011.07.028](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2011.07.028)
- Hull R, Al-Hakim A. Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. *Trends Biotechnol.* 1988;6:213–218. doi: [10.1016/0167-7799\(88\)90076-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90076-5).
- Hull R. *Comparative Plant Virology.* 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, USA. 2009.
- Hwang MS, Kim SH, Lee JH, Bae JM, Paek KH, Park YI. Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus. *J Gen Virol.* 2005 Nov;86(Pt 11):3171-3177. doi: [10.1099/vir.0.81139-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81139-0).
- Hyodo K, Kaido M, Okuno T. Host and viral RNA-binding proteins involved in membrane targeting, replication and intercellular movement of plant RNA virus genomes. *Front Plant Sci.* 2014;5:321. doi: [10.3389/fpls.2014.00321](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00321).

Hyodo K, Okuno T. Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Curr Opin Virol.* 2016;17:11-18. [doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.11.004).

Iftikhar Y, Mubeen M, Siddique F, Shakeel Q, Zeshan MA, Sajid A, Asim M. Host-virus interaction: movement of plant viruses through plasmodesmata and effect on chloroplast structure: a review. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol.* 2020;21:15-26. ISSN: 0972-2025.

Iliopoulos C, Hendrikse GWJ. Influence of Cooperative Structures on Transaction Costs, Risks and Innovations: The Case of Fruit and Vegetable Co-operatives in Greece and the Netherlands. *J Rural Stud.* 2009;25(1):75-84.

Incarbone M, Dunoyer P. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.* 2013 Jul;18(7):382-92. [doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.001](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.001)

International Seed Federation. Detection of Infectious Tobamoviruses in Tomato Seed. v. 6.2. Nyon, Switzerland: International Seed Federation; 2019. p. 1–8.

Ishibashi K, Ishikawa M. Replication of Tobamovirus RNA. *Annu Rev Phytopathol.* 2016;54:55-78. [doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100217](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100217)

Ishibashi K, Masuda K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M. An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(35):13833–13838. [doi: 10.1073/pnas.0703203104](https://doi.org/10.1073/pnas.0703203104).

Ishibashi K, Mawatari N, Miyashita S, Kishino H, Meshi T, Ishikawa M. Coevolution and hierarchical interactions of Tomato mosaic virus and the resistance gene *Tm-1*. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002975. [doi: 10.1371/journal.ppat.1002975](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002975).

Ivanovski D. Über die mosaikkrankheit der Tabakpflanze. *Bull Acad Imp Sci St Petersburg Nouv Sér III.* 1892;35:67-70.

Ivars P, Alonso M, Borja M, Hernandez C. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of Pelargonium flower break virus and Pelargonium line pattern virus. *Eur J Plant Pathol.* 2004;110:275-283. [doi: 10.1023/B:EJPP.0000019798.87567.22](https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019798.87567.22).

Jahn M, Paran I, Hoffmann K, Radwanski ER, Livingstone KD, Grube RC, Aftergoot E, Lapidot M, Moyer J. Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the Tospovirus tomato spotted wilt virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the Sw5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Mol Plant Micro Interact.* 2000; 13:673–682. [doi: 10.1094/MPMI.2000.13.6.673](https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.6.673).

James D, Varga A, Pallás V, Candresse T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Can J Plant Pathol.* 2006;28:16-29. [doi: 10.1080/07060660609507267](https://doi.org/10.1080/07060660609507267).

Janzac B, Fabre MF, Palloix A, Moury B. Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathol.* 2008;58:443–449. [doi: 10.1007/s00705-008-0132-8](https://doi.org/10.1007/s00705-008-0132-8).

Ji X, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, Gao C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat Plants* 2015; 1:15144; [doi: 10.1038/nplants.2015.144](https://doi.org/10.1038/nplants.2015.144)

- Jiao J, Kong K, Han J, Song S, Bai T, Song C, Wang M, Yan Z, Zhang H, Zhang R, Feng J, Zheng X. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnol J*. 2021 Feb;19(2):394-405. doi: [10.1111/pbi.13474](https://doi.org/10.1111/pbi.13474).
- Jo J, Kim GW, Back S, Jang S, Kim Y, Han K, Choi H, Lee S, Kwon JK, Lee YJ, Kang BC. Exploring horticultural traits and disease resistance in *Capsicum baccatum* through segmental introgression lines. *Theor Appl Genet*. 2023 Oct 25;136(11):233. doi: [10.1007/s00122-023-04422-x](https://doi.org/10.1007/s00122-023-04422-x).
- Jo J, Venkatesh J, Han K, Lee HY, Choi GJ, Lee HJ, Choi D, Kang BC. Molecular mapping of *PMR1*, a novel locus conferring resistance to powdery mildew in pepper (*Capsicum annuum*). *Front Plant Sci*. 2017;8:2090. doi: [10.3389/fpls.2017.02090](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02090).
- Jo Y, Choi H, Kim SM, Kim SL, Lee BC, Cho WK. The pepper virome: Natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics*. 2017;18:1–12. doi:[10.1186/s12864-017-3838-8](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3838-8).
- Jo Y, Lian S, Chu H, Cho JK, Yoo SH, Choi H, et al. Peach RNA viromes in six different peach cultivars. *Sci Rep*. 2018;8:1–14. doi:[10.1038/s41598-018-20256-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-20256-w).
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. Reclassification of the xanthomonas associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*. 2004;27:755–762. doi: [10.1078/0723202042369884](https://doi.org/10.1078/0723202042369884).
- Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):323-9. doi: [10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286).
- Jones S, Baizan-Edge A, MacFarlane S, Torrance L. Viral diagnostics in plants using next generation sequencing: Computational analysis in practice. *Front Plant Sci*. 2017;8:1770. doi: [10.3389/fpls.2017.01770](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01770).
- Juárez M, Tovar R, Fiallo-Olivé E, Aranda MA, Gosálvez B, Castillo P, Moriones E, Navas-Castillo J. First detection of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Spain. *Plant Dis*. 2014;98(6):857. doi: [10.1094/PDIS-10-13-1050-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1050-PDN)
- Kaliciak A, Syller J. New hosts of Potato virus Y (PVY) among common wild plants in Europe. *Eur J Plant Pathol*. 2009;124:707–713. doi:[10.1007/s10658-009-9452-0](https://doi.org/10.1007/s10658-009-9452-0).
- Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H. RNA-Seq reveals virus-virus and virus-plant interactions in nature. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016 Nov;92(11):fiw176. doi: [10.1093/femsec/fiw176](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw176).
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM. Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:581–621. doi: [10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140).
- Kang JH, Yang HB, Jeong HS, Choe P, Kwon JK, Kang BC. Single nucleotide polymorphism marker discovery from transcriptome sequencing for marker-assisted backcrossing in *Capsicum*. *Kor J Hort Sci Technol*. 2014;32(4):535-543. doi: [10.7235/hort.2014.14109](https://doi.org/10.7235/hort.2014.14109)
- Kang WH, Hoang NH, Yang HB, Kwon JK, Jo SH, Seo JK, et al. Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet*. 2010;120(8):1587-96. doi: [10.1007/s00122-010-1278-9](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1278-9).

Kang WH, Seo JK, Chung BN, Kim KH, Kang BC. Helicase domain encoded by Cucumber mosaic virus RNA1 determines systemic infection of *Cmr1* in pepper. PLoS ONE. 2012;7(8):e43136. doi: [10.1371/journal.pone.0043136](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043136).

Kazinczi G, Horváth J, Takács AP, Gáborjányi R, Béres I. Experimental and natural weed host-virus relations. Commun Agric Appl Biol Sci. 2004;69(3):53-60. PMID: 15759395.

Keane PJ. Horizontal or generalized resistance to pathogens in plants. Plant Pathology. INTECH Open Access Publisher. 2012. doi: [10.5772/30763](https://doi.org/10.5772/30763).

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012 Jun 15;28(12):1647-9. doi: [10.1093/bioinformatics/bts199](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199).

Kenyon L, Kumar S, Tsai WS, Hughes JA. Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. Adv Virus Res. 2014;90:297–354. doi: [10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8).

Kessler C. Overview on factors influencing nucleic acid hybridization. In: Kessler C, editor. Nonradioactive Analysis of Biomolecules. Springer Lab Manuals. Berlin, Heidelberg: Springer; 2000. doi:[10.1007/978-3-642-57206-7_37](https://doi.org/10.1007/978-3-642-57206-7_37)

Kim CH, Palukaitis P. The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. EMBO J. 1997;16:4060–4068. doi:[10.1093/emboj/16.13.4060](https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4060).

Kim HJ, Han JH, Yoo JH, Cho HJ, Kim BD. Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to Tobamoviruses in pepper plants. Mol Cells. 2008;25(2):205-210. doi: [10.1016/S1016-8478\(23\)17571-6](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)17571-6)

Kim S, Park M, Yeom S-I, Kim Y-M, Lee JM, Lee H-A, et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. Nat Genet. 2014;46:270–278. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.2877>.

Kim S, Park M, Yeom SI, Kim YM, Lee JM, Lee HA, Seo E, Choi J, Cheong K, Kim KT, Jung K, Lee GW, Oh SK, Bae C, Kim SB, Lee HY, Kim SY, Kim MS, Kang BC, Jo YD, Yang HB, Jeong HJ, Kang WH, Kwon JK, Shin C, Lim JY, Park J, Huh JH, Kim JS, Kim BD, Cohen O, Paran I, Suh MC, Lee SB, Kim YK, Shin Y, Noh SJ, Park J, Seo YS, Kwon SY, Kim HA, Park JM, Kim HJ, Choi SB, Bosland PW, Reeves G, Jo SH, Lee BW, Cho HT, Choi HS, Lee MS, Yu Y, Do Choi Y, Park BS, van Deynze A, Ashrafi H, Hill T, Kim WT, Pai HS, Ahn HK, Yeom I, Giovannoni JJ, Rose JK, Sørensen I, Lee SJ, Kim RW, Choi IY, Choi BS, Lim JS, Lee YH, Choi D. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. Nat Genet. 2014;46(3):270-8. doi: [10.1038/ng.2877](https://doi.org/10.1038/ng.2877).

Kim SB, Kang WH, Huy HN, Yeom SI, An JT, Kim S, Kang MY, Kim HJ, Jo YD, Ha Y, Choi D, Kang BC. Divergent evolution of multiple virus-resistance genes from a progenitor in *Capsicum* spp. New Phytol. 2016;213(2):886-899. doi:[10.1111/nph.14177](https://doi.org/10.1111/nph.14177).

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2011.

Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, Havelda Z. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnol J. 2019 Jun;17(6):1004-1006. doi: [10.1111/pbi.13077](https://doi.org/10.1111/pbi.13077).

Kopta T, Sekara A, Pokluda R, Ferby V, Caruso G. Screening of Chilli Pepper Genotypes as a Source of Capsaicinoids and Antioxidants under Conditions of Simulated Drought Stress. *Plants*. 2020;9(3):364. doi: [10.3390/plants9030364](https://doi.org/10.3390/plants9030364).

Kraft KH, Brown CH, Nabhan GP, Luedeling E, Luna Ruiz Jde J, Coppens d'Eeckenbrugge G, Hijmans RJ, Gepts P. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(17):6165-70. doi: [10.1073/pnas.1308933111](https://doi.org/10.1073/pnas.1308933111).

Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, Simon R. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*. 2009;388(1):1-7. doi: [10.1016/j.virol.2009.03.024](https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024).

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-1549. doi: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).

Kummert J, Colinet D, Lepoivre P. Detection of plant viruses by molecular hybridization using non-radioactive probes. *OEPP/EPPO* 1995;25(1-2):301-313. doi: [10.1111/j.1365-2338.1995.tb01471.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1995.tb01471.x).

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

Lacasa A, Torres J, Martínez MC. (1991). La implicación de *Frankliniella occidentalis* en la diseminación del virus del Bronceado del Tomate (TSWV) en los cultivos murcianos. *Agríc Vergel*. 1991;112:203-209.

Lacasa CM, Martínez V, Martínez MC, Lacasa A, Tello J. *Phytophthora* en los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia). *Agroecología*. 2013;12:18-19.

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, López-Moya JJ, Burguán J. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J*. 2006 Jun 21;25(12):2768-80. doi: [10.1038/sj.emboj.7601164](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601164)

Laprom A, Nilthong S, Chukeatirote E. Incidence of viruses infecting pepper in Thailand. *Biomol Concepts*. 2019;10:184–193. doi: [10.1515/bmc-2019-0016](https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0016).

Larregla S, Guerrero MM, Mendarte S, Lacasa A. Biodisinfestación with Organic Amendments for Soil Fatigue and Soil-Borne Pathogens Control in Protected Pepper Crops. In: *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Springer, Cham. 2015;pp. 413–433. doi: [10.1007/978-3-319-23075-7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23075-7).

Larregla S, Llodio I, Maraña A, Riga P, Elorrieta J, Juaristi B, Abaunza L. Leuna y Luzea, dos nuevas variedades de pimiento de asar registradas por NEIKER-Tecnalia. *Sustrai*. 2008;86:62-67.

Larregla S. Etiología y Epidemiología de la Tristeza del pimiento en Bizkaia: su control. Tesis Doctoral de la Universidad del País Vasco. 2003.

Lartey RT, Voss TC, Melcher U. Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol Biol Evol*. 1996 Dec;13(10):1327-38. doi: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a025579](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025579).

- Lasa R, Pagola I, Ibañez I, Belda J, Williams T, Caballero P. Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain. *Biocontrol Sci Technol*. 2007;17(3):221-232. doi: [10.1080/09583150701211335](https://doi.org/10.1080/09583150701211335).
- Lassoued R, Macall DM, Hessel H, Phillips PWB, Smyth SJ. Benefits of genome-edited crops: expert opinion. *Transgenic Res*. 2019 Apr;28(2):247-256. doi: [10.1007/s11248-019-00118-5](https://doi.org/10.1007/s11248-019-00118-5).
- Lecoq H, Desbiez C. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. *Adv Virus Res*. 2012;84:67-126. doi: [10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8).
- Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M. Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res*. 2004 Mar;100(1):31-9. doi: [10.1016/j.virusres.2003.12.012](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.012).
- Lee MY, Lee JH, Ahn HI, Yoon JY, Her NH, Choi JK, et al. Identification and sequence analysis of RNA3 of a resistance-breaking Cucumber mosaic virus isolate on *Capsicum annuum*. *Plant Pathol J*. 2006; 22(3):265–70.
- Lee OH, Hwang HS, Kim JY, Han JH, Yoo YS, Kim BS. A search for sources of resistance to powdery mildew (*Leveillula taurica* (Lev.) RNA.) in pepper (*Capsicum* spp.). *Korean J Hort Sci Tech*. 2001;19:7e11.
- Lefebvre V, Daubèze AM, Rouppe van der Voort J, Peleman J, Bardin M, Palloix A. QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theor Appl Genet*. 2003 Aug;107(4):661-6. doi: [10.1007/s00122-003-1307-z](https://doi.org/10.1007/s00122-003-1307-z).
- Letschert B, Adam G, Lesemann D, Willingmann P, Heinze C. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J Virol Methods*. 2002 Oct;106(1):1-10. doi: [10.1016/S0166-0934\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00135-0). PMID: [12367724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12367724/).
- Li N, Yin Y, Wang F, Yao M. Construction of a high-density genetic map and identification of QTLs for Cucumber mosaic virus resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) using specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Breed Sci*. 2018a; 68:233–241. doi: [10.1270/jsbbs.17063](https://doi.org/10.1270/jsbbs.17063).
- Li Q, Palukaitis P. Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology*. 1996 Feb 1;216(1):71-9. doi: [10.1006/viro.1996.0035](https://doi.org/10.1006/viro.1996.0035).
- Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (N1b): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (N1a). *J Virol*. 1997;71(2):1598-1607. doi: [10.1128/JVI.71.2.1598-1607.1997](https://doi.org/10.1128/JVI.71.2.1598-1607.1997).
- Li Y, Tan G, Lan P, Zhang A, Liu Y, Li R, Li F. Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *J Virol Methods*. 2018b Sep;259:122-128. doi: [10.1016/j.jviromet.2018.06.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012).
- Lian S, Lee J, Cho WK, Yu J, Kim M, Choi H, et al. Phylogenetic and recombination analysis of tomato spotted wilt virus. *PLoS One*. 2013;8:e63380. doi: [10.1371/journal.pone.0063380](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063380).
- Liu H, Soyars CL, Li J, Fei Q, He G, Peterson BA, Meyers BC, Nimchuk ZL, Wang X. CRISPR/Cas9-mediated resistance to cauliflower mosaic virus. *Plant Direct*. 2018 Mar 7;2(3):e00047. doi: [10.1002/pld3.47](https://doi.org/10.1002/pld3.47).

- Liu HW, Luo LX, Li JQ, Liu PF, Chen XY, Hao JJ. Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber. *Plant Pathol.* 2014;63:72–77. [doi:10.1111/ppa.12065](https://doi.org/10.1111/ppa.12065).
- Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A. Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España. 1996;263-274.
- Loeffler F, Frosch P. Bericht der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Centralbl Bakteriologie, Parasitologie und Infektionskrankheiten I Abt.* 1898;23:371-391.
- Lomas-Cano T, Palmero-Llamas D, de Cara M, García-Rodríguez C, Boix-Ruiz A, Camacho-Ferre F, Tello-Marquina JC. First Report of *Fusarium oxysporum* on Sweet Pepper Seedlings in Almería, Spain. *Am Phytopathol Soc.* 2014;98(10):1435. [doi: 10.1094/PDIS-04-14-0365-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0365-PDN).
- Luria N, Smith E, Sela N, et al. A local strain of Paprika mild mottle virus breaks L3 resistance in peppers and is accelerated in Tomato brown rugose fruit virus-infected *Tm-22*-resistant tomatoes. *Virus Genes.* 2018;54:280–289. [doi:10.1007/s11262-018-1539-2](https://doi.org/10.1007/s11262-018-1539-2)
- Lurie S, Shapiro B, Ben-Yehoshua S. Effects of water stress and degree of ripeness on rate of senescence of harvested bell pepper fruit. *J Amer Soc Hort Sci.* 1986;111:880–885.
- Mackenzie DJ, McLean MA, Mukerji S, Green M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 1997;81:222–226. [doi:10.1094/PDIS.1997.81.2.222](https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.222)
- Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Čermák T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol J.* 2018 Nov;16(11):1918-1927. [doi: 10.1111/pbi.12927](https://doi.org/10.1111/pbi.12927).
- Maes P, Alkhovsky SV, Bào Y, Beer M, Birkhead M, Briese T, Buchmeier MJ, Calisher CH, Charrel RN, Choi IR, Clegg CS, de la Torre JC, Delwart E, DeRisi JL, Di Bello PL, Di Serio F, Digiario M, Dolja VV, Drostén C, Druciarek TZ, Du J, Ebihara H, Elbeaino T, Gergerich RC, Gillis AN, Gonzalez JJ, Haenni AL, Hepojoki J, Hetzel U, Hồ T, Hóng N, Jain RK, Jansen van Vuren P, Jin Q, Jonson MG, Junglen S, Keller KE, Kemp A, Kipar A, Kondov NO, Koonin EV, Kormelink R, Korzyukov Y, Krupovic M, Lambert AJ, Laney AG, LeBreton M, Lukashevich IS, Marklewitz M, Markotter W, Martelli GP, Martin RR, Mielke-Ehret N, Mühlbach HP, Navarro B, Ng TFF, Nunes MRT, Palacios G, Pawęska JT, Peters CJ, Plyusnin A, Radoshitzky SR, Romanowski V, Salmenperä P, Salvato MS, Sanfaçon H, Sasaya T, Schmaljohn C, Schneider BS, Shirako Y, Siddell S, Sironen TA, Stenglein MD, Storm N, Sudini H, Tesh RB, Tzanetakis IE, Uppala M, Vapalahti O, Vasilakis N, Walker PJ, Wáng G, Wáng L, Wáng Y, Wèi T, Wiley MR, Wolf YI, Wolfe ND, Wú Z, Xú W, Yang L, Yāng Z, Yeh SD, Zhāng YZ, Zhèng Y, Zhou X, Zhū C, Zirkel F, Kuhn JH. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch Virol.* 2018;163(8):2295-2310. [doi: 10.1007/s00705-018-3843-5](https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5).
- Mahmood T, Rana RM, Ahmar S, Saeed S, Gulzar A, Khan MA, Wattoo FM, Wang X, Branca F, Mora-Poblete F, Mafra GS, Du X. Effect of Drought Stress on Capsaicin and Antioxidant Contents in Pepper Genotypes at Reproductive Stage. *Plants.* 2021;10(7):1286. [doi: 10.3390/plants10071286](https://doi.org/10.3390/plants10071286).
- Mahmoudabadi G, Phillips R. Research: A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *eLife.* 2018;7:e31955. [doi: 10.7554/eLife.31955](https://doi.org/10.7554/eLife.31955).

- Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJ, Charpentier E, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18:67–83. [doi: 10.1038/s41579-019-0299-x](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x)
- Makkouk KM, Kumari SG. Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa. *Virus Res.* 2009 May;141(2):209-18. [doi: 10.1016/j.virusres.2008.12.007](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.007).
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823–826. [doi: 10.1126/science.1232033](https://doi.org/10.1126/science.1232033).
- Maliogka VI, Orfanidou C, Lotos L, Katis NI. Diagnosis and Detection. In: *Cucumber Mosaic Virus.* Eds. Palukaitis P, García-Arenal F. APS Press; 2019:19–36. [doi:10.1094/9780890546109.005](https://doi.org/10.1094/9780890546109.005)
- Mancho M. Conservación y mejora de variedades autóctonas de hortalizas. *Sustrai.* 1988;10-11:38-40.
- Mandadi KK, Scholthof KB. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell.* 2013;25:1489-1505. [doi: 10.1105/tpc.113.111658](https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658).
- Mandal B, Jain RK, Krishnareddy M, Krishna Kumar NK, Ravi KS, Pappu HR. Emerging problems of tospoviruses (Bunyaviridae) and their management in the Indian subcontinent. *Plant Dis.* 2012;96(4):468-479. [doi: 10.1094/PDIS-06-11-0520](https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0520).
- Mannai S, Jabnoun-Khiareddine H, Nasraoui B, Daami-Remadi M. *Rhizoctonia* Root Rot of Pepper (*Capsicum annuum*): Comparative Pathogenicity of Causal Agent and Biocontrol Attempt using Fungal and Bacterial Agents. *J Plant Pathol Microbiol.* 2018;9:431. [doi: 10.4172/2157-7471.1000431](https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000431).
- Mantxo M, Agirre MP, Etxarri A, Izagirre JI, Izagirre FJ. Selección de Guindilla: Ibarra Piparra. *Sustrai.* 1998;50-51:42-45.
- Mao Z, Zhu P, Liu F, Huang Y, Ling J, Chen G, Xie B. Cloning and functional analyses of pepper CaRKNR involved in *Meloidogyne incognita* resistance. *Euphytica.* 2015;205(3):903-913. [doi: 10.1007/s10681-015-1438-8](https://doi.org/10.1007/s10681-015-1438-8).
- Maramorosch K, Loebenstein G. Plant Disease Resistance: Natural, Non-Host Innate or Inducible. In: *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Schaechter M, editor. Academic Press; 2009. pp. 589-596. [doi: 10.1016/B978-012373944-5.00341-2](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00341-2).
- Marqués MC, Sánchez-Vicente J, Ruiz R, Montagud-Martínez R, Márquez-Costa R, Gómez G, Carbonell A, Daròs JA, Rodrigo G. Diagnostics of Infections Produced by the Plant Viruses TMV, TEV, and PVX with CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13. *ACS Synth Biol.* 2022 Jul 15;11(7):2384-2393. [doi: 10.1021/acssynbio.2c00090](https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00090).
- Martin EM, Cho JD, Kim J, Goeke S, Kim K, Gergerich R. Novel cytopathological structures induced by mixed infection of unrelated plant viruses. *Phytopathology.* 2004;94:111–119. [doi:10.1094/PHTO.2004.94.1.111](https://doi.org/10.1094/PHTO.2004.94.1.111)
- Martin RR, Constable F, Tzanetakis IE. Quarantine Regulations and the Impact of Modern Detection Methods. *Annu Rev Phytopathol.* 2016 Aug 4;54:189-205. [doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100105](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100105).

Martínez F, Rodrigo G, Aragonés V, Ruiz M, Lodewijk I, Fernández U, Elena SF, Daròs JA. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. BMC Genomics. 2016 Feb 1;17:87. [doi: 10.1186/s12864-016-2394-y](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2394-y).

Martínez-Carrasco L, Brugarolas-Mollá M, Martínez-Poveda A, Ruiz-Martínez JJ, García-Martínez S. Aceptación de variedades tradicionales de tomate en mercados locales. Un estudio de valoración contingente. ITEA Inf Tec Econ Agrar. 2015;111:56-72. [doi:10.12706/itea.2015.005](https://doi.org/10.12706/itea.2015.005).

Más P, Sánchez-Navarro JA, Sánchez-Pina MA, Pallás V. Chemiluminescent and colorigenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. J Virol Methods. 1993;45:93-102. [doi: 10.1016/0166-0934\(93\)90143-F](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90143-F).

Massumi H, Shaabani M, Pour AH, Heydarnejad J, Rahimian H. Incidence of Viruses Infecting Tomato and Their Natural Hosts in the Southeast and Central Regions of Iran. Plant Dis. 2009;93:67–72. [doi:10.1094/PDIS-93-1-0067](https://doi.org/10.1094/PDIS-93-1-0067)

Matsumoto K, Sawada H, Matsumoto K, Hamada H, Yoshimoto E, Ito T, Takeuchi S, Tsuda S, Suzuki K, Kobayashi K, Kiba A, Okuno T, Hikichi Y. The coat protein gene of Tobamovirus PO pathotype is a determinant for activation of temperature-insensitive L1a gene-mediated resistance in *Capsicum* plants. Arch Virol. 2008;153:645-650. [doi:10.1007/s00705-008-0032-y](https://doi.org/10.1007/s00705-008-0032-y).

Matsushita Y, Takeyama S, Tomitaka Y, et al. Elucidating the nature of seed-borne transmission of tomato brown rugose fruit virus in tomato, bell pepper, and eggplant. J Gen Plant Pathol. 2024;90:23-34. [doi:10.1007/s10327-023-01159-9](https://doi.org/10.1007/s10327-023-01159-9).

Matta A, Garibaldi A. Su una necrosi basale del peperone dovuta a ristagni idrici. Informatore Fitopatologico. 1980;XI-XII:17-20.

Matthews REF. Serological methods in plant virology. In: Matthews REF, editor. Fundamentals of Plant Virology. Academic Press; 1992. p. 37-52. ISBN 9780124805583. Available from: [doi:10.1016/B978-0-12-480558-3.50006-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-480558-3.50006-6).

Matthews REF. Transmission, movement and host range. In: Matthews REF, editor. Fundamentals of Plant Virology. London, UK: Academic Press Inc.; 1992. p. 205–223. [doi: 10.1016/B978-0-12-480558-3.50013-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-480558-3.50013-3).

Maule AJ, Caranta C, Boulton MI. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. Mol Plant Pathol. 2007;8(2):223-231. [doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00386.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00386.x)

Maule AJ, Hull R, Donson J. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. J Virol Methods. 1983;6(4):215-224.

Mayer A. Over demozaïekziekte van de tabak:voorloopige mededeeling. Tijdschr. Lansbouwk. 1882;2:359-364.

Mayer A. Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. Landw.Vers. Stn. 1886;32:451-467.

McKinney HH. Two strains of Tobacco-mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent Pepper. Plant Dis Rep. 1952;36(5):184-187.

Mehle N, Ravnkar M. Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection. Water Res. 2012;46:4902–4917. [doi:10.1016/j.watres.2012.07.027](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.027).

- Mehta D. EU proposal on CRISPR-edited crops is welcome - but not enough. *Nature*. 2023 Jul;619(7970):437. doi: [10.1038/d41586-023-02328-8](https://doi.org/10.1038/d41586-023-02328-8).
- Mekuria G, Ramesh S, Alberts E, Bertozzi T, Wirthensohn M, Collins G, Sedgley M. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus* necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *J Virol Methods*. 2003;114:65–69. doi: [10.1016/j.jviromet.2003.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.014).
- Melcher U. The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *Microbiology*. 2000;81(1):257-266.
- Meshi T, Motoyoshi F, Maeda T, Yoshiwoka S, Watanabe H, Okada Y. Mutations in the Tobacco mosaic virus 30 kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. *Plant Cell*. 1989;1(5):515–522. doi: [10.1105/tpc.1.5.515](https://doi.org/10.1105/tpc.1.5.515).
- Messiaen CM, Blancard D, Rouxel F, Lafon R. Los métodos de lucha. In: *Enfermedades De Las Hortalizas*. Barcelona: Ediciones Mundi-Prensa; 1995. pp. 93–146.
- Michelena JM, Lacasa A, Hermoso de Mendoza A. Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Sci Technol*. 2010;21(2):171–188. doi: [10.1080/09583157.2010.530641](https://doi.org/10.1080/09583157.2010.530641).
- Miedaner T. Breeding strategies for improving plant resistance to diseases. In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D, editors. *Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits*. Cham: Springer; 2016. doi:[10.1007/978-3-319-22518-0_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22518-0_15)
- Milošević D, Ignjatov M, Stanković I, Nikolić Z, Gvozdanović-Varga J, Krstić B. Occurrence and diversity of viruses infecting pepper in Serbia. *Acta Agric Serbica*. 2018;23:141–155. doi:[10.5937/AASer1846141M](https://doi.org/10.5937/AASer1846141M).
- Minutillo SA, Mascia T, Gallitelli D. A DNA probe mix for the multiplex detection of ten artichoke viruses. *Eur J Plant Pathol*. 2012;134:459-465. doi: [10.1007/s10658-012-0032-3](https://doi.org/10.1007/s10658-012-0032-3).
- Miras M, Sempere RN, Kraft JJ, Miller WA, Aranda MA, Truniger V. Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking. *New Phytol*. 2014;202:233-46. doi: [10.1111/nph.12650](https://doi.org/10.1111/nph.12650).
- Missio JC, Rivera A, Figàs MR, Casanova C, Camí B, Soler S, Simó J. A comparison of landraces vs. modern varieties of lettuce in organic farming during the winter in the Mediterranean area: An approach considering the viewpoints of breeders, consumers, and farmers. *Front Plant Sci*. 2018;871. doi:[10.3389/fpls.2018.01491](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01491).
- Moffett P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv Virus Res*. 2009;75:1–33. doi: [10.1016/S0065-3527\(09\)07501-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07501-0).
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005 Feb;60(2):174-82. doi: [10.1007/s00239-004-0046-3](https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3).
- Monserrat A, Lacasa MC, Martínez V, Martínez MC, del Pino M, Guerrero MM, Alcázar S, Torres J, Soler D. El virus rugoso del tomate: bases para una estrategia integrada de manejo. Informe IMIDA.

- Montasser MS, Tousignant ME, Kaper JM. Viral Satellite RNAs for the Prevention of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Disease in Field-Grown Pepper and Melon Plants. *Plant Dis.* 1998;82:1298–1303. [doi:10.1094/PDIS.1998.82.12.1298](https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1298).
- Montes N, Pagán I. Light intensity modulates the efficiency of virus seed transmission through modifications of plant tolerance. *Plants (Basel).* 2019;8(9):304. [doi:10.3390/plants8090304](https://doi.org/10.3390/plants8090304).
- Montoliu L. Europa entreabre la puerta a la edición genética en plantas. 2023. <https://theconversation.com/europa-entreabre-la-puerta-a-la-edicion-genetica-en-plantas-210290>
- Moodley V, Naidoo R, Gubba A, Mafongoya PL. Development of Potato virus Y (PVY) resistant pepper (*Capsicum annuum* L.) lines using marker-assisted selection (MAS). *Physiol Mol Plant Pathol.* 2019;105:96-101. [doi: 10.1016/j.pmpp.2018.12.002](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.12.002).
- Moury B, Pflieger S, Blattes A, Lefebvre V, Palloix A. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome.* 2000 Feb;43(1):137-42. PMID: 10701122.
- Moury B, Selassie KG, Marchoux G, Daubèze AM, Palloix A. High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Eur J Plant Pathol.* 1998;104(5):489-98. [doi: 10.1023/A:1008618022144](https://doi.org/10.1023/A:1008618022144).
- Moury B, Verdin E. Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: a remarkable stasis. *Adv Virus Res.* 2012;84:127-162. [doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00004-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00004-X).
- Mrkvová M, Hančinský R, Grešíková S, Kaňuková Š, Barilla J, Glasa M, Hauptvogel P, Kraic J, Mihálik D. Evaluation of New Polyclonal Antibody Developed for Serological Diagnostics of Tomato Mosaic Virus. *Viruses.* 2022; 14(6):1331. [doi:10.3390/v14061331](https://doi.org/10.3390/v14061331)
- Mühlbach HP, Weber U, Gomez G, Pallás V, Duran-Vila N, Hadidi A. Molecular hybridization. In: Viroids. Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik J, editors. Collingwood: CSIRO; 2003. p. 103-114.
- Muhyi R, Bosland PW. Evaluation of *Capsicum* germplasm for sources of resistance to *Rhizoctonia solani*. *HortScience.* 1995;30:341–342. [doi: 10.21273/HORTSCI.30.2.341](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.2.341).
- Mullis KB, Erlich HA, RNAheim N, Horn GT, Saiki RK, Scharf SJ. U.S. Patent No. 4,683,195. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 1987.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335–350. [doi: 10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliam M. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat Biotechnol.* 2012;30:360-366.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot.* 2008;59:501–520. [doi: 10.1093/jxb/erm239](https://doi.org/10.1093/jxb/erm239).
- Murakami R, Nakashima N, Hinomoto N, et al. The genome sequence of pepper vein yellows virus (family Luteoviridae, genus Polerovirus). *Arch Virol.* 2011;156:921-923. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0956-5>.

Murphy JF, Bowen KL. Synergistic disease in pepper caused by the mixed infection of Cucumber mosaic virus and Pepper mottle virus. *Phytopathology*. 2006;96:240-247. doi: [10.1094/PHYTO-96-0240](https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0240).

Murua JR, Eguia B, Malagón E, Albiac J. Coste de la No Agricultura en el País Vasco. Eusko Jauriaritza (Servicio de publicaciones). Vitoria Gasteiz. 2006

Mushegian AR, Elena SF. Evolution of plant virus movement proteins from the '30K' superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. *Virology*. 2015;476:304-15. doi: [doi: 10.1016/j.virol.2014.12.012](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.012).

Nagai Y. Control of mosaic diseases of tomato and sweet pepper caused by Tobacco mosaic virus. *Spec Bull Chiba Prefect Agric Exp Stn*. 1981;9:1-109. Disponible en: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135650268603264>.

Nagano AJ, Honjo MN, Mihara M, Sato M, Kudoh H. Chapter 8 Detection of Plant Viruses in Natural Environments by Using RNA-Seq. In: *Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology*, p. 241–254. 2015. doi: [10.1007/978-1-4939-1743-3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3).

Nam M, Kim JS, Lim S, Park CY, Kim JG, Choi HS, Lim HS, Moon JS, Lee SH. Development of the large-scale oligonucleotide chip for the diagnosis of plant viruses and its practical use. *Plant Pathol J*. 2014 Mar;30(1):51-7. doi: [10.5423/PPJ.OA.08.2013.0084](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2013.0084).

Navarro JA, Sanchez-Navarro JA, Pallas V. Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. *Adv Virus Res*. 2019;104:1-64. doi: [10.1016/bs.aivir.2019.05.001](https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001).

Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol*. 2011;49:219-248.

Nicaise V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Front Plant Sci*. 2014 Nov 21;5:660. doi: [10.3389/fpls.2014.00660](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00660).

Nono-Womdim R, Gèbre-Selassie K, Palloix A, Pochard E, Marchoux G. Study of multiplication of Cucumber mosaic virus in susceptible and resistant *Capsicum annum* lines. *Ann Appl Biol*. 1993a;122:49-56. doi: [10.1111/j.1744-7348.1993.tb04013.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04013.x)

Nono-Womdim R, Palloix A, Gèbre-Selassie K, Marchoux G. Partial resistance of bell pepper to Cucumber mosaic virus movement within plants: field evaluation of its efficiency in southern France. *J Phytopathol*. 1993b;37:125-32. doi: [10.1111/j.1439-0434.1993.tb01332.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01332.x)

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:E63. doi: [10.1093/nar/28.12.e63](https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63).

Nuez-Viñals F, Costa-García J, Gil-Ortega R. Tipos varietales. In: *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*; Mundi-Prensa, Madrid, Spain. 1996;pp. 253-282.

OHL SA, Sijmons PC, Van Der Lee FM, Goddijn OJM, Klap JJC. Nematode-inducible plant gene promoter. United States Patent 6262344 B1. 2001.

Ojinaga M, Gandariasbeitia M, Orbegozo E, Ortíz A, Guerrero MM, Lacasa CM, Arizmendi J, Otaño A, Camino C, Enbeita G, Diez F, Larregla S. Biodisinfestation for Meloidogyne and Verticillium control in commercial protected crops in the Basque Country Atlantic area (northern Spain). *Acta Hort*. 2020;1270:327–335. doi: [10.17660/ActaHortic.2020.1270.40](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1270.40).

Ojinaga M, Ortiz A, Juaristi B, Aragonés A, Hernández M, Larregla S. Evaluación de marcadores moleculares para un programa de mejora de la resistencia a Tobamovirus en pimiento mediante retrocruzamiento. In: Actas de Horticultura nº 80, Proceedings of IX Congreso de Mejora Genética de Plantas, Murcia, Spain, 18th-20th September. Eds. García J, Pérez O, Cos JE, Ruiz L, Sánchez E. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas: Murcia, Spain; 2018:167–170.

Oldstone MBA. History of Virology. In: Encyclopedia of Microbiology. 2014;pp. 608–12. [doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00078-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00078-7).

Oliver JE, Whitfield AE. The Genus Tospovirus: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. *Annu. Rev. Virol.* 2016; 3:101–24. [doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055036](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055036).

Olmos A, Capote N, Bertolini E, Cambra M, Punja Z, Boer S, et al. Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Punja ZK, de Boer SH, Sanfaçon H, editors. *Biotechnology and plant disease management*. Oxfordshire, UK: CABI; 2007. p. 227–249. [doi: 10.1079/9781845932886.0227](https://doi.org/10.1079/9781845932886.0227).

Ontañón C, Ojinaga M, Larregla S, Zabala JA, Reva A, Losa A, Heribia R, Bertacca S, Sanahuja E, Alfaro-Fernández A, Font-San Ambrosio MI, Corachán L, Pallás V, Sánchez-Navarro JA. Molecular analysis of a Spanish isolate of chili pepper mild mottle virus and evaluation of seed transmission and resistance genes. *Eur J Plant Pathol.* 2024; 168:401-418. [doi:10.1007/s10658-023-02765-1](https://doi.org/10.1007/s10658-023-02765-1)

Ormeño J, Sepúlveda P, Rojas R, Araya JE. Datura genus weeds as an epidemiological factor of Alfalfa mosaic virus (AMV), Cucumber mosaic virus (CMV), and Potato virus Y (PVY) on Solanaceus crops. *Agric Téc.* 2006;66(4):333-341. [doi:10.4067/S0365-28072006000400001](https://doi.org/10.4067/S0365-28072006000400001).

Osei MK, Prempeh R, Adjebeng-Danquah J, Opoku AJ, Danquah A, Danquah E, Blay E, Adu-Dapaah H. Marker-assisted selection (MAS): a fast-track tool in tomato breeding. In: *Recent Advances in Tomato Breeding and Production*. InTechOpen; 2017. [doi:10.5772/intechopen.76007](https://doi.org/10.5772/intechopen.76007).

Owen J, Palukaitis P. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology.* 1988 Oct;166(2):495-502. [doi: 10.1016/0042-6822\(88\)90520-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90520-x).

Owens RA, Diener TO. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic Acid hybridization. *Science.* 1981 Aug 7;213(4508):670-2. [doi: 10.1126/science.213.4508.670](https://doi.org/10.1126/science.213.4508.670).

Özkaynak E, Devran Z, Kahveci E, Doganlar S, Basköylü B, Dogan F, Isleyen M, Yüksel A, Yüksel M. Pyramiding multiple genes for resistance to PVY, TSWV and PMMoV in pepper using molecular markers. *Europ J Hort Sci.* 2014;79(4):233-239.

Pacheco R, García-Marcos A, Manzano A, de Lacoba MG, Camañes G, García-Agustín P, Díaz-Ruiz JR, Tenllado F. Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 May;25(5):709-23. [doi: 10.1094/MPMI-11-11-0305](https://doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0305).

Pallás V, Faggioli F, Aparicio F, Sanchez-Navarro JA. Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Fruit Tree Viruses and Viroids. In: *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann W, editors. APS Press/American Phytopathological Society; 2011. Chapter 59, pp. 333-339. [doi: 10.1094/9780890545010.059](https://doi.org/10.1094/9780890545010.059).

- Pallás V, García JA. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol*. 2011;92:2691–2705. doi: [10.1099/vir.0.036665-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.036665-0).
- Pallás V, Más P, Sánchez-Navarro JA. Detection of Plant RNA Viruses by Nonisotopic Dot-Blot Hybridization. In: Foster GD, Taylor SC, editors. *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 1998;81:461-468. doi: [10.1385/0-89603-385-6:461](https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:461).
- Pallás V, Sánchez-Navarro JA, James D. Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. *Front Microbiol*. 2018;9:2087. doi: [10.3389/fmicb.2018.02087](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087).
- Pallás V, Sánchez-Navarro JA, Kinard GK, Di Serio F. Molecular hybridization techniques for detecting and studying viroids. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P, editors. *Viroids and Satellites*. London: Elsevier Inc.; 2017. p. 369-379. doi: [10.1016/B978-0-12-801498-1.00035-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00035-8).
- Palloix A, Ayme V, Moury B. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol*. 2009;183(1):190-199. doi: [10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x)
- Palukaitis P, Carr JP. Plant resistance responses to viruses. *J Plant Pathol*. 2008;90(2):153-171. <http://www.jstor.org/stable/41998492>.
- Palukaitis P, García-Arenal F, editors. *Cucumber Mosaic Virus*. 2019. ISBN: 978-0-89054-610-9. doi: [10.1094/9780890546109](https://doi.org/10.1094/9780890546109).
- Palukaitis P, García-Arenal F. Cucumoviruses. *Adv Virus Res*. 2003;62:241-323. doi: [10.1016/s0065-3527\(03\)62005-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)62005-1).
- Palukaitis P. Genome Structure and Expression. In: Palukaitis P, García-Arenal F, editors. *Cucumber Mosaic Virus*. St. Paul (MN): APS Press; 2019. p. 113-21.
- Pappu HR, Jones RAC, Jain RK. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res*. 2009;141:219–236. doi: [10.1016/j.virusres.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009).
- Pappu HR. Tomato Spotted Wilt Virus. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. Academic Press; 2008. p. 133-138. doi: [10.1016/B978-012374410-4.00648-8](https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00648-8).
- Pares RD, Gunn LV, Cresswell GC. Tomato Mosaic Virus Infection in a Recirculating Nutrient Solution. *J Phytopathol*. 1992;135:192–198.
- Parisi M, Alioto D, Tripodi P. Overview of Biotic Stresses in Pepper (*Capsicum* spp.): Sources of Genetic Resistance, Molecular Breeding and Genomics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2587. doi: [10.3390/ijms21072587](https://doi.org/10.3390/ijms21072587).
- Pasin F, Simón-Mateo C, García JA. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathog*. 2014 Mar 6;10(3):e1003985. doi: [10.1371/journal.ppat.1003985](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003985).
- Pategas KG. Management of Tomato Mosaic Virus in Hydroponically Grown Pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Dis*. 1989;73:570–573. doi: [10.1111/j.1439-0434.1992.tb01266.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb01266.x).

Peiró A, Martínez-Gil L, Tamborero S, Pallás V, Sánchez-Navarro JA, Mingarro I. The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *J Virol*. 2014 Mar;88(5):3016-26. doi: 10.1128/JVI.03648-13.

Peiró A, Pallás V, Sánchez-Navarro JA. Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *Eur J Plant Pathol*. 2012;132:469–475. doi:10.1007/s10658-011-9893-0

Pérez P, Duque M, Collar J, Avilla C, Fereres A. Activity of alatae aphids landing on open-field pepper crops in Spain. *Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz*. 2003;110.

Pérez-Caselles C, Brugarolas M, Martínez-Carrasco L. Traditional Varieties for Local Markets: A Sustainable Proposal for Agricultural SMEs. *Sustainability*. 2020;12(11):4517. doi:10.3390/su12114517.

Perfecto I, Vandermeer J. The agroecological matrix as alternative to the land-sparing/agriculture intensification model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(13):5786-91.

Permar T, Gransey S, Gumpf D, Lee R. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology*. 1990;80:224–228. doi: 10.1094/Phyto-80-224.

Permyakova NV, Deineko EV. Crop Improvement: Comparison of Transgenesis and Gene Editing. *Horticulturae*. 2024; 10(1):57. doi:10.3390/horticulturae10010057

Pernezny K, Roberts PD, Murphy JD, Goldberg NP, eds. *Compendium of Pepper Diseases*. APS Press; 2003:88.

Perry KL, Zhang L, Shintaku MH, Palukaitis P. Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology*. 1994 Dec;205(2):591-5. doi: 10.1006/viro.1994.1686.

Pfankuche VM, Hahn K, Bodewes R, Hansmann F, Habierski A, Haverkamp AK, Pfaender S, Walter S, Baechlein C, Postel A, Steinmann E, Becher P, Osterhaus A, Baumgärtner W, Puff C. Comparison of Different In Situ Hybridization Techniques for the Detection of Various RNA and DNA Viruses. *Viruses*. 2018 Jul 20;10(7):384. doi: 10.3390/v10070384.

Pietilä MK, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. *Trends Microbiol*. 2014;22(6):334-44. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.007.

Pires D, Vicente CS, Menéndez E, Faria JM, Rusinque L, Camacho MJ, Inácio ML. The fight against plant-parasitic nematodes: Current status of bacterial and fungal biocontrol agents. *Pathogens*. 2022;11(10):1178. doi: 10.3390/pathogens11101178.

Piron F, Nicolai M, Minoia S, Piednoir E, Moretti A, Salgues A, et al. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e11313. doi: 10.1371/journal.pone.0011313.

Pitrat M. Vegetable crops in the Mediterranean Basin with an overview of virus resistance. *Adv Virus Res*. 2012;84:1-29. doi:10.1016/B978-0-12-394314-9.00001-4.

Pochard E. Données experimentales sur la selection du piment *Capsicum annum* L. *Ann Am Plantes*. 1966;16(2):185-197.

Polder G, Blok PM, de Villiers HAC, van der Wolf JM, Kamp J. Potato Virus Y Detection in Seed Potatoes Using Deep Learning on Hyperspectral Images. *Front Plant Sci.* 2019;10:209. [doi: 10.3389/fpls.2019.00209](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00209).

Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell.* 1987 Sep 11;50(6):831-40. [doi: 10.1016/0092-8674\(87\)90587-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90587-0).

Pramanik D, Shelake RM, Park J, Kim MJ, Hwang I, Park Y, Kim JY. CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Pathogen-Resistant Tomato against Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Powdery Mildew. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 13;22(4):1878. [doi: 10.3390/ijms22041878](https://doi.org/10.3390/ijms22041878).

Pretty J. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1491):447-65.

Priyanka V, Kumar R, Dhaliwal I, Kaushik P. Germplasm Conservation: Instrumental in Agricultural Biodiversity—A Review. *Sustainability.* 2021; 13(12):6743. [doi:10.3390/su13126743](https://doi.org/10.3390/su13126743)

Pumrachat S, Hongprayoon R. Epitope-based peptide antigen of pepper yellow leaf curl Thailand virus for specific antibody production. *Int J Agric Technol.* 2021;17:661–672.

Pyott DE, Sheehan E, Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Mol Plant Pathol.* 2016 Oct;17(8):1276-88. [doi: 10.1111/mpp.12417](https://doi.org/10.1111/mpp.12417).

Qin C, Yu C, Shen Y, Fang X, Chen L, Min J, Cheng J, Zhao S, Xu M, Luo Y, Yang Y, Wu Z, Mao L, Wu H, Ling-Hu C, Zhou H, Lin H, González-Morales S, Trejo-Saavedra DL, Tian H, Tang X, Zhao M, Huang Z, Zhou A, Yao X, Cui J, Li W, Chen Z, Feng Y, Niu Y, Bi S, Yang X, Li W, Cai H, Luo X, Montes-Hernández MA, Xiong Z, He X, Bai L, Tan S, Tang X, Liu D, Liu J, Zhang S, Chen M, Zhang L, Zhang L, Zhang Y, Liao W, Zhang Y, Wang M, Lv X, Wen B, Liu H, Luan H, Zhang Y, Yang S, Wang X, Xu J, Li X, Li S, Wang J, Palloix A, Bosland PW, Li Y, Krogh A, Rivera-Bustamante RF, Herrera-Estrella L, Yin Y, Yu J, Hu K, Zhang Z. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(14):5135-40. [doi: 10.1073/pnas.1400975111](https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111).

Quenouille J, Paulhiac E, Moury B, Palloix A. Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity.* 2014;112:579-87. [doi: 10.1038/hdy.2013.138](https://doi.org/10.1038/hdy.2013.138).

Quenouille J, Saint-Felix L, Moury B, Palloix A. Diversity of genetic backgrounds modulating the durability of a major resistance gene. Analysis of a core collection of pepper landraces resistant to Potato virus Y. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(2):296-302. [doi:10.1111/mpp.12277](https://doi.org/10.1111/mpp.12277).

Quirin EA, Ogundiwin EA, Prince JP, Mazourek M, Briggs MO, Chlada TS, Kim KT, Falise M, Kang BC, Jahn MM. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon in pepper. *Theor Appl Genet.* 2005;110:605–612. [doi: 10.1007/s00122-004-1874-7](https://doi.org/10.1007/s00122-004-1874-7).

Racah B, Gal-On A, Eastop V. The role of flying aphid vectors in the transmission of Cucumber mosaic virus and Potato virus Y to peppers in Israel. *Ann Appl Biol.* 1985;106:451–460. [doi:10.1111/j.1744-7348.1985.tb03135.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1985.tb03135.x).

Racah B. Nonpersistent viruses: epidemiology and control. *Adv Virus Res.* 1986;31:387–429. [doi: 10.1016/S0065-3527\(08\)60270-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60270-5).

- Rasheed A, Gill RA, Hassan MU, Mahmood A, Qari S, Zaman QU, Ilyas M, Aamer M, Batool M, Li H, Wu Z. A Critical Review: Recent Advancements in the Use of CRISPR/Cas9 Technology to Enhance Crops and Alleviate Global Food Crises. *Curr Issues Mol Biol*. 2021 Nov 11;43(3):1950-1976. [doi: 10.3390/cimb43030135](https://doi.org/10.3390/cimb43030135).
- Raza A, Razzaq A, Mehmood SS, Zou X, Zhang X, Lv Y, Xu J. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants (Basel)*. 2019 Jan 30;8(2):34. [doi: 10.3390/plants8020034](https://doi.org/10.3390/plants8020034).
- Read AF. The evolution of virulence. *Trends Microbiol*. 1994;2:73-6. Sánchez JA, La-Spina M, Reche-Mármol J. Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Sevilla: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación. 2010;293pp.
- Remesal E, Lucena C, Azpilicueta A, Landa BB, Navas-Cortés JA. First report of Southern Blight of Pepper caused by *Sclerotium rolfsii* in Southern Spain. *Plant Dis*. 2010 Feb;94(2):280. [doi: 10.1094/PDIS-94-2-0280C](https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0280C).
- Riggs TJ. Breeding F1 hybrid varieties of vegetables. *J Hortic Sci*. 1988;63:369-382. [doi:10.1080/14620316.1988.11515871](https://doi.org/10.1080/14620316.1988.11515871).
- Riley DG, Joseph SV, Kelley WT, Olson S, Scott J. Host Plant Resistance to Tomato spotted wilt virus (Bunyaviridae: Tospovirus) in Tomato. *HortScience*. 2011;46(12):1626-1633. [doi: 10.21273/HORTSCI.46.12.1626](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.12.1626).
- Ro N, Lee GA, Ko HC, Oh H, Lee S, Haile M, Lee J. Exploring disease resistance in pepper (*Capsicum* spp.) germplasm collection using Fluidigm SNP genotyping. *Plants*. 2024;13:1344. [doi: 10.3390/plants13101344](https://doi.org/10.3390/plants13101344).
- Robertson L, Díez-Rojo MA, López-Pérez JA, Buena AP, Escuer M, Cepero JL, Martínez C, Bello A. New Host Races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from Horticultural Regions of Spain. *Plant Dis*. 2009 Feb;93(2):180-184. doi: 10.1094/PDIS-93-2-0180.
- Robertson L, López-Pérez JA, Bello A, Díez-Rojo MA, Escuer M, Piedra-Buena A, Ros C, Martínez C. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *Meloidogyne hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum*). *Crop Prot*. 2006;25:440-445. [doi: 10.1016/j.cropro.2005.07.008](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.07.008).
- Robles S. Virus del mosaico verde del tabaco (Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV) en pimiento de Gernika [Trabajo Fin de Carrera]. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia; 2009.
- Rodríguez Y, Manso TLD, Salatti RC. (2007). El virus del bronceado del tomate. (TSWV) y su incidencia en el cultivo de pimiento. *Temas Cienc Tecnol*. 2007; 32:33-39.
- Rodríguez-Alvarado G, Fernandez-Pavia S, Creamer R, Liddell C. Pepper mottle virus Causing Disease in Chile Peppers in Southern New Mexico. *Plant Dis*. 2002;86:603-605. [doi:10.1094/PDIS.2002.86.6.603](https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.603).
- Rodríguez-Molina MC, Morales-Rodríguez C, Osorio C, Núñez E, Alonso E, Maya M, Picón-Toro J. Short communication. *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of root and crown rot (Tristeza disease) of red pepper in La Vera region (Cáceres, Spain). *SJAR*. 2010;8:770. [doi: 10.5424/sjar/2010083-1277](https://doi.org/10.5424/sjar/2010083-1277).

- Roossinck MJ, Martin DP, Roumagnac P. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. *Phytopathology*. 2015;105:716–727. [doi:10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW).
- Roossinck MJ, Zhang L, Hellwald KH. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6752-8. [doi: 10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999](https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999).
- Roossinck MJ. Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses. *Virus Res*. 2017;239:82–86. [doi:10.1016/j.virusres.2016.11.019](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.019).
- Roossinck MJ. Lifestyles of plant viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 Jun 27;365(1548):1899-905. [doi: 10.1098/rstb.2010.0057](https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0057).
- Roossinck MJ. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet*. 2012;46:359–369.
- Ros C, Guerrero MM, Lacasa A, Guirao P, González A, Bello A, López JA, Martínez MA. El injerto en pimiento. Comportamiento de patrones frente a hongos y nematodos. En Lacasa A, Guerrero MM, Oncina M, Mora JA (eds.). *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia*. 2004;Pág: 279-312.
- Ros C, Guerrero MM, Lacasa CM, Martínez V, Díaz MA, Cano A, Bello A, Lacasa A. Combinación de biosolarización o solarización con injerto para el control de *Meloidogyne* en pimiento de invernadero. *Actas del VIII Congreso SEAE*. 2008;PII: 22.1-22.11.
- Rotenberg D, Jacobson AL, Schneeweis DJ, Whitfield AE. Thrips transmission of tospoviruses. *Curr Opin Virol*. 2015;15:80–89. [doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003).
- Rott M, Xiang Y, Boyes I, Belton M, Saeed H, Kesanakurti P, et al. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Dis*. 2017;101:1489–1499.
- Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*. 1992 Aug;73 (Pt 8):2129-34. [doi: 10.1099/0022-1317-73-8-2129](https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-8-2129).
- Rubio L, Galipienso L, Ferriol I. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front Plant Sci*. 2020;11:1092. [doi: 10.3389/fpls.2020.01092](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092).
- Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, Moury B, Bendahmane A, Robaglia C, et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J*. 2002;32(6):1067–1075. [doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01499.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01499.x).
- Ruffel S, Gallois JL, Lesage ML, Caranta C. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol Genet Genomics*. 2005 Nov;274(4):346-53. [doi: 10.1007/s00438-005-0003-x](https://doi.org/10.1007/s00438-005-0003-x).
- Ruffel S, Gallois JL, Moury B, Robaglia C, Palloix A, Caranta C. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol*. 2006 Jul;87(Pt 7):2089-2098. [doi: 10.1099/vir.0.81817-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81817-0).
- Ruiz ML, Simón A, Velasco L, García MC, Janssen D. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant Dis*. 2015;99:894.

- Runia WT. Disinfection of Recirculation Water From Closed Cultivation Systems With Ozone. *Acta Hortic.* 1994;361:388–396. [doi:10.17660/ActaHortic.1994.361.39](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.361.39).
- Saade M, Aparicio F, Sánchez-Navarro JA, Herranz MC, Myrta A, Di Terlizzi B, et al. Simultaneous detection of three ilarviruses affecting stone fruits by non-isotopic molecular hybridization and multiplex RT-PCR. *Phytopathology.* 2000;90(12):1330-1336. [doi: 10.1094/PHTO.2000.90.12.1330](https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.12.1330).
- Sacristán S, Díaz M, Fraile A, García-Arenal F. Contact transmission of Tobacco mosaic virus: a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. *J Virol.* 2011 May;85(10):4974-81. [doi: 10.1128/JVI.00057-11](https://doi.org/10.1128/JVI.00057-11).
- Safari M, Roossinck MJ. Coevolution of a Persistent Plant Virus and Its Pepper Hosts. *Mol Plant Microbe Interact.* 2018;31(7):766-776. [doi:10.1094/MPMI-12-17-0312-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0312-R)
- Saint-Pierre C, Peterson CW, Ross AS, Ohm JB, Verhoeven MC, Larson M, Hoefler B. White wheat grain quality changes with genotype, nitrogen fertilization, and water stress. *Agron J.* 2008;100:414-420.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-425. [doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454).
- Saldarelli P, Barbarossa L, Grieco F, Gallitelli D. Digoxigenin-labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Dis.* 1996;80:1343-1346. [doi: 10.1094/PD-80-1343](https://doi.org/10.1094/PD-80-1343).
- Salem NM, Abumuslem M, Turina M, Samarah N, Sulaiman A, Abu-Irmaileh B, Ata Y. New weed hosts for Tomato Brown Rugose Fruit Virus in wild Mediterranean vegetation. *Plants (Basel).* 2022;11(17):2287. doi:10.3390/plants11172287.
- Salgado-Ortíz H, De La Torre-Almaraz R, Sánchez-Navarro JÁ, Pallás V. Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Arch Virol.* 2020 Mar;165(3):781-784. doi: 10.1007/s00705-020-04528-3.
- Sánchez JA, Cánovas F, Lacasa A. Thresholds and management strategies for *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae) in greenhouse pepper. *J Econ Entomol.* 2007;100(1):123-130. [doi: 10.1093/jee/100.1.123](https://doi.org/10.1093/jee/100.1.123).
- Sánchez JA, García F, Lacasa A, Gutiérrez L, Oncina M, Contreras J, Gomez J. Response of the Antocorids *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* and the Phytoseiid *Amblyseius cucumeris* for the control of *Frankliniella occidentalis* in commercial crops of sweet peppers in plastic houses in Murcia (SPAIN). *IOBC wprs Bulletin.* 1997; 20-4, pp. 186 - 195.
- Sánchez JA, La-Spina M, Michelena JM, Lacasa A, Hermoso de Mendoza A. Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Sci Technol.* 2011;21:2, 171-188. [doi: 10.1080/09583157.2010.530641](https://doi.org/10.1080/09583157.2010.530641).
- Sánchez Monge E. *Fitogenética (Mejora de Plantas)*. Madrid: INIA; 1974.
- Sánchez-Balibrea JM, Sánchez JA, Barberá GG, Castillo V, Díaz S, Perera L, Pérez-Marcos M, de Pedro L, Reguilón M. Manejo de setos y otras estructuras vegetales lineales para una agricultura sostenible. Murcia: Asociación Paisaje y Agricultura Sostenible; 2020. 1ª ed. 72 p. ISBN: 978-84-09-23564-3. Depósito legal: MU-686-2020.

- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Herranz MC, Minafra A, Myrta A, Pallás V. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *Eur J Plant Pathol*. 2005;111:77–84. [doi: 10.1007/s10658-004-1422-y](https://doi.org/10.1007/s10658-004-1422-y).
- Sanchez-Navarro JA, Aparicio F, Rowhani A, Pallas V. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathol*. 1998;47(6):780-786. [doi:10.1046/j.1365-3059.1998.00301.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00301.x).
- Sanchez-Navarro JA, Cano EA, Pallas V. Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant Pathol*. 1996;45(2):375-382. [doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-1.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-1.x).
- Sánchez-Navarro JA, Cañizares MC, Cano EA, Pallás V. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J Virol Methods*. 1999;82(2):167–175. [doi:10.1016/S0166-0934\(99\)00097-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00097-X)
- Sánchez-Navarro JA, Cooper CN, Pallás V. Polyvalent detection of members of the genus Potyvirus by molecular hybridization using a genus-probe. *Phytopathology*. 2018a;108:1522–9. [doi: 10.1094/PHYTO-04-18-0146-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0146-R).
- Sánchez-Navarro JA, Corachán L, Font I, Alfaro-Fernández A, Pallás V. Polyvalent detection of twelve viruses and four viroids affecting tomato by using a unique polyprobe. *Eur J Plant Pathol*. 2019;155:361–8. [doi: 10.1007/s10658-019-01763-6](https://doi.org/10.1007/s10658-019-01763-6).
- Sánchez-Navarro JA, Fiore N, Fajardo TVM, Pallás V. Simultaneous detection of the 13 viruses and 5 viroids affecting grapevine by molecular hybridization using a unique probe or 'polyprobe.' In: *Proceedings of the 19th Conference of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, Santiago; 2018b.
- Sandra N, Tripathi A, Dikshit HK, Mandal B, Jain RK. Seed transmission of a distinct soybean yellow mottle mosaic virus strain identified from India in natural and experimental hosts. *Virus Res*. 2020;280:197903. [doi: 10.1016/j.virusres.2020.197903](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197903).
- Sanogo S. Predispositional Effect of Soil Water Saturation on Infection of Chile Pepper by *Phytophthora capsici*. *Hortscience*. 2006;41(1):172–175. [doi: 10.21273/HORTSCI.41.1.172](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.1.172).
- Sasaki N, Park JW, Maule AJ, Nelson RS. The cysteine-histidine-rich region of the movement protein of Cucumber mosaic virus contributes to plasmodesmal targeting, zinc binding and pathogenesis. *Virology*. 2006 Jun 5;349(2):396-408. [doi: 10.1016/j.virol.2006.02.035](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.035).
- Sastry KS. Mechanism of seed transmission. In: *Seed-Borne Plant Virus Diseases*. Springer, India; 2013. [doi: 10.1007/978-81-322-0813-6_5](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6_5).
- Schaad NW, Frederick RD. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can J Plant Pathol*. 2002;24(3):250-258. [doi:10.1080/07060660209507006](https://doi.org/10.1080/07060660209507006)
- Schmidhuber J, Qiao B. High input prices protract high food prices. *Food Outlook*. June 2022.
- Schoelz JE, Harries PA, Nelson RS. Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant*. 2011;4:813–831. [doi: 10.1093/mp/ssr070](https://doi.org/10.1093/mp/ssr070).
- Schoen R, de Koning P, Oplaat C, Roenhorst A, Westenberg M, van der Gaag DJ, Barnhoorn R, Koenraadt H, et al. Identification of Tomato mottle mosaic virus in historic seed accessions

originating from France, the Netherlands, and Spain, indicates a wider presence before its first description. *Eur J Plant Pathol.* 2023;166:485-489. [doi:10.1007/s10658-023-02677-0](https://doi.org/10.1007/s10658-023-02677-0).

Scholthof HB. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* 2005;10(8):376-82. [doi: 10.1016/j.tplants.2005.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.002).

Schönhals EM, Ortega F, Barandalla L, Aragones A, Ruiz de Galarreta JI, Liao JC, Sanetomo R, Walkemeier B, Tacke E, Ritter E, Gebhardt C. Identification and reproducibility of diagnostic DNA markers for tuber starch and yield optimization in a novel association mapping population of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet.* 2016 Apr;129(4):767-785. [doi: 10.1007/s00122-016-2665-7](https://doi.org/10.1007/s00122-016-2665-7).

Sharma HC. Climate change effects on insects: implications for crop protection and food security. *J Crop Improv.* 2014;28(2):229-259. [doi: 10.1080/15427528.2014.881205](https://doi.org/10.1080/15427528.2014.881205).

Sharma N, Sahu PP, Puranik S, Prasad M. Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). *Mol Biotechnol.* 2013;55(1):63-77. [doi: 10.1007/s12033-012-9615-7](https://doi.org/10.1007/s12033-012-9615-7).

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* 2001 Nov 16;107(4):465-76. [doi: 10.1016/S0092-8674\(01\)00576-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00576-1).

Simmonds NW. Genetics of horizontal resistance to diseases of crops. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1991;66(2):189-241.

Simmons HE, Munkvold GP. Seed transmission in the Potyviridae. In: *Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material*. Vol 6. Springer; 2014. p. 3-15. [doi:10.1007/978-94-017-9389-6_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9389-6_1).

Simón A, García C, Pascual F, Ruiz L, Janssen D. The influence of crop habitat and control strategies on pepper viruses in Andalusia (Spain). *Horticulturae.* 2016;2:15. [doi: 10.3390/horticulturae2040015](https://doi.org/10.3390/horticulturae2040015).

Singh D, Mathur SB. *Histopathology of Seed-Borne Infections*. CRC Press; 2004. [doi: 10.1201/9781420038170](https://doi.org/10.1201/9781420038170).

Singh J, Sharma D, Brar GS, Sandhu KS, Wani SH, Kashyap R, Kour A, Singh S. CRISPR/Cas tool designs for multiplex genome editing and its applications in developing biotic and abiotic stress-resistant crop plants. *Mol Biol Rep.* 2022 Dec;49(12):11443-11467. [doi: 10.1007/s11033-022-07741-2](https://doi.org/10.1007/s11033-022-07741-2).

Skendžić S, Zovko M, Živković IP, Lešić V, Lemić D. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests. *Insects.* 2021;12(5):440. [doi:10.3390/insects12050440](https://doi.org/10.3390/insects12050440)

Smith E, Dombrovsky A. *Aspects in Tobamovirus Management in Intensive Agriculture*. IntechOpen. 2020. doi: 10.5772/intechopen.87101.

Soler S, Prohens J, López C, Aramburu J, Galipienso L, Nuez F. Viruses Infecting Tomato in València, Spain: Occurrence, Distribution and Effect of Seed Origin. *J Phytopathol.* 2010;158:797-805. [doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01706.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01706.x).

Song X, Cao Y, Yan F. Isothermal Nucleic Acid Amplification-Based Lateral Flow Testing for the Detection of Plant Viruses. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25(8):4237. [doi:10.3390/ijms25084237](https://doi.org/10.3390/ijms25084237)

- Sonnino R. The power of place: embeddedness and local food systems in Italy and the UK. *Anthropology of Food*. 2007; doi:[10.4000/aof.454](https://doi.org/10.4000/aof.454).
- Souiri A, Zemzami M, Amzazi S, Ennaji MM. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *Eur J Sci Res*. 2014;123:281–295.
- Stobbe AH, Melcher U, Palmer MW, Roossinck MJ, Shen G. Co-divergence and host-switching in the evolution of tobamoviruses. *J Gen Virol*. 2012 Feb;93(Pt 2):408-418. doi:[10.1099/vir.0.034280-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.034280-0).
- Stobbe AH, Roossinck MJ. Plant virus metagenomics: What we know and why we need to know more. *Front Plant Sci*. 2014;5:1–4. doi: [10.3389/fpls.2014.00150](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00150).
- Sugita T, Yamaguchi K, Sugimura Y, Nagata R, Yuji K, Kinoshita T, Todoroki A. Development of SCAR markers linked to L3 gene in Capsicum. *Breed Sci*. 2004;54(2):111-115. doi:[10.1270/jsbbs.54.111](https://doi.org/10.1270/jsbbs.54.111).
- Sui X, Li R, Padmanabhan C, Ling KS. Molecular, serological, and biological characterization of the emerging Tomato mottle mosaic virus on tomato. *Acta Hortic*. 2018;1207:281–286.
- Sumalan RL, Ciulca SI, Sumalan RM, Popescu S. Vegetable Landraces: The “Gene Banks” for Traditional Farmers and Future Breeding Programs. *Landrac - Tradit Var Nat Breed*. 2021. doi:[10.5772/intechopen.96138](https://doi.org/10.5772/intechopen.96138).
- Sun M, Voorrips RE, Steenhuis-Broers G, et al. Reduced phloem uptake of *Myzus persicae* on an aphid resistant pepper accession. *BMC Plant Biol*. 2018;18:138. doi: [10.1186/s12870-018-1340-3](https://doi.org/10.1186/s12870-018-1340-3).
- Sun S, Wang B, Li C, Xu G, Yang J, Hufford MB, Ross-Ibarra J, Wang H, Wang L. Unraveling prevalence and effects of deleterious mutations in Maize elite lines across decades of modern breeding. *Mol Biol Evol*. 2023;40(8):msad170. doi:[10.1093/molbev/msad170](https://doi.org/10.1093/molbev/msad170).
- Sutherland LA. Who do we want our ‘new generation’ of farmers to be? The need for demographic reform in European agriculture. *Agric Econ*. 2023;11(3). doi:[10.1186/s40100-023-00244-z](https://doi.org/10.1186/s40100-023-00244-z)
- Suzuki K, Kuroda T, Miura Y, Murai J. Screening and Field Trials of Virus Resistant Sources in *Capsicum* spp. *Plant Dis*. 2003;87(7):779-783. doi:[10.1094/PDIS.2003.87.7.779](https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.7.779).
- Svoboda J, Svobodová-Leisová L. Occurrence of viruses on pepper plantations in the Czech Republic - Short communication. *Hortic Sci*. 2012;39:139-143. doi:[10.17221/69/2011-HORTSCI](https://doi.org/10.17221/69/2011-HORTSCI)
- Tao Y, Man J, Wu Y. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China. *Arch Virol*. 2012 Jul;157(7):1261-7. doi:[10.1007/s00705-012-1294-y](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1294-y).
- Tashkandi M, Ali Z, Aljedaani F, Shami A, Mahfouz MM. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signal Behav*. 2018;13(10):e1525996. doi: [10.1080/15592324.2018.1525996](https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1525996).
- Tatineni S, Hein GL. Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virus disease management strategies. *Phytopathology*. 2023 Feb;113(2):117-141. doi:[10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW).

- Taylor MD, Locascio SJ. Blossom-end rot: A calcium deficiency. *J Plant Nutr.* 2004;27(1):123–139. doi: [10.1081/PLN-120027551](https://doi.org/10.1081/PLN-120027551).
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50:S1–S5.
- Télliez MDM, Simon A, Rodriguez E, Janssen D. Control of Tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini using the predatory mite *Amblyseius swirskii*. *Biol Control.* 2017;114:106-113. doi: [10.1016/j.biocontrol.2017.08.008](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.008).
- Tello J, Lacasa A. Problemática fitosanitaria del suelo en el cultivo del pimiento en el campo de Cartagena. En: Posibilidad de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero. Federación de Cooperativas Agrarias de Murcia (FECOAM). Región de Murcia. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Serie: Jornadas y Congresos, Nº 11. 1997;130 pp.
- Thabuis A, Palloix A, Pflieger S, Daubeze AM, Caranta C, Lefebvre V. Comparative mapping of Phytophthora resistance loci in pepper germplasm: Evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theor Appl Genet.* 2003;106:1473–1485. doi: [10.1007/s00122-003-1206-3](https://doi.org/10.1007/s00122-003-1206-3).
- Thies JA, Fery RL. Heat Stability of Resistance to Meloidogyne incognita in Scotch Bonnet Peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of Nematology.* 2000;32(4):356-361.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-4680.
- Thomson D, Dietzgen RG. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J Virol Methods.* 1995 Aug;54(2-3):85-95. doi: [10.1016/0166-0934\(95\)00022-m](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)00022-m).
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature.* 2002;418(6898):671-7.
- Tkacz M, Arando S, Pacut A. Cooperative response to societal and market challenges: the motives and stages of development of Mondragon cooperative model. A Case Study. *Ekonomia Społeczna.* 2015;2:69-84. doi: [10.15678/ES.2015.2.05](https://doi.org/10.15678/ES.2015.2.05).
- Tomašechová J, Hančinský R, Predajňa L, Kraic J, Mihálik D, Šoltys K, et al. High-throughput sequencing reveals bell pepper endornavirus infection in pepper (*Capsicum annuum*) in Slovakia and enables its further molecular characterization. *Plants.* 2020;9(1):41. doi: [10.3390/plants9010041](https://doi.org/10.3390/plants9010041).
- Tomita R, Murai J, Miura Y, Ishihara H, Liu S, Kubotera Y, Honda A, Hatta R, Kuroda T, Hamada H, et al. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theor Appl Genet.* 2008;117(6):1107-18. doi: [10.1007/s00122-008-0848-6](https://doi.org/10.1007/s00122-008-0848-6).
- Tomita R, Sekine KT, Mizumoto H, Sakamoto M, Murai J, Kiba A, Hikichi Y, Suzuki K, Kobayashi K. Genetic basis for the hierarchical interaction between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(1):108-17. doi: [10.1094/MPMI-06-10-0127](https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0127).

- Torchetti EM, Navarro B, Di Serio F. A single polyprobe for detecting simultaneously eight pospiviroids infecting ornamentals and vegetables. *J Virol Methods*. 2012;186:141–146. doi: [10.1016/j.jviromet.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.005).
- Tosic M, Sutic D, Pesic Z. Transmission of tobacco mosaic-virus through pepper (*Capsicum-annuum* L.) seed. *Phytopathol Z*. 1980;97(1):10-13.
- Truniger V, Aranda MA. Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res*. 2009;75:119–159. doi: [10.1016/S0065-3527\(09\)07504-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07504-6).
- Tsuda S, Fujisawa I, Ohnishi J, Hosokawa D, Tomaru K. Localization of tomato spotted wilt tospovirus in larvae and pupae of the insect vector *Thrips setosus*. *Phytopathology*. 1996;86:1199-1203.
- Ueda H, Yamaguchi Y, Sano H. Direct interaction between the Tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol Biol*. 2006;61(1-2):31–45. doi: [10.1007/s11103-005-5817-8](https://doi.org/10.1007/s11103-005-5817-8).
- Untiveros M, Fuentes S, Salazar LF. Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Dis*. 2007;91(6):669-676. doi: [10.1094/PDIS-91-6-0669](https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0669).
- Valli AA, Gallo A, Rodamilans B, López-Moya JJ, García JA. The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Mol Plant Pathol*. 2018 Mar;19(3):744-763. doi: [10.1111/mpp.12553](https://doi.org/10.1111/mpp.12553).
- Van De Wouw M, Kik C, Van Hintum T, Van Treuren R, Visser B. Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genet Resour*. 2010;8:1-15. doi: [10.1017/S1479262109990062](https://doi.org/10.1017/S1479262109990062).
- Van Der Hoorn RAL, Kamoun S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*. 2008;20(8):2009–2017. doi: [10.1105/tpc.108.060194](https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194).
- van Duin PJW. Resistance to PMMV (123) in pepper breeding. In: Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant. Avignon, France; 1998. p. 175.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 2007;3(1):12. doi: [10.1186/1746-4811-3-12](https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12).
- Vaucheret H. Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci*. 2008;13(7):350–358. doi: [10.1016/j.tplants.2008.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007).
- Vélez-Olmedo JB, Fribourg CE, Melo FL, Nagata T, de Oliveira AS, Resende RO. Tobamoviruses of two new species trigger resistance in pepper plants harbouring functional L alleles. *J Gen Virol*. 2021;102(2):001524. doi: [10.1099/jgv.0.001524](https://doi.org/10.1099/jgv.0.001524).
- Venkatesh J, An J, Kang WH, Jahn M, Kang BC. Fine Mapping of the Dominant Potyvirus Resistance Gene Pvr7 Reveals a Relationship with Pvr4 in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*. 2018 Jan;108(1):142-148. doi: [10.1094/PHYTO-07-17-0231-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0231-R).
- Vigne E, Garcia S, Komar V, Lemaire O, Hily JM. Comparison of serological and molecular methods with high-throughput sequencing for the detection and quantification of grapevine

- fanleaf virus in vineyard samples. *Front Microbiol.* 2018;9:2726. doi: [10.3389/fmicb.2018.02726](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02726).
- Villa TCC, Maxted N, Scholten M, Ford-Lloyd B. Defining and identifying crop landraces. *Plant Genet Resour.* 2005;3:373-384. doi: [10.1079/pgr200591](https://doi.org/10.1079/pgr200591).
- Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR, Tzanetakis IE. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology.* 2019;109:716–725. doi: [10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW).
- Villanueva F, Castillo P, Font MI, Alfaro-Fernández A, Moriones E, Navas-Castillo J. First Report of Pepper vein yellows virus Infecting Sweet Pepper in Spain. *Plant Dis.* 2013 Sep;97(9):1261. doi: [10.1094/PDIS-04-13-0369-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0369-PDN).
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol.* 2009;47:177–206. doi: [10.1146/annurev.phyto.050908.135202](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202).
- Vlot AC, Klessig DF, Park S-W. Systemic acquired resistance: The elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol.* 2008;11:436–442. doi: [10.1016/j.pbi.2008.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.003).
- Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet.* 2005;6(3):206-220. doi: [10.1038/nrg1555](https://doi.org/10.1038/nrg1555).
- Vunsh R, Rosner A, Stein A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann Appl Biol.* 1990;117:561-569. doi: [10.1111/j.1744-7348.1990.tb04822.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1990.tb04822.x).
- Walker SJ, Bosland PW. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *J Am Soc Hortic Sci.* 1999;124:14–18. doi: [10.21273/JASHS.124.1.14](https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.14).
- Wang A, Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(7):795–803. doi: [10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x).
- Wang MB, Metzloff M. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Apr;8(2):216-22. doi: [10.1016/j.pbi.2005.01.006](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.006).
- Wang P, Liu X, Guo J, Liu C, Fu N, Shen H. Identification and Expression Analysis of Candidate Genes Associated with Defense Responses to *Phytophthora capsici* in Pepper Line "PI 201234". *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):11417-38. doi: [10.3390/ijms160511417](https://doi.org/10.3390/ijms160511417).
- Wang P, Wang L, Guo J, Yang W, Shen H. Molecular mapping of a gene conferring resistance to *Phytophthora capsici* Leonian race 2 in pepper line PI201234 (*Capsicum annum* L.). *Mol Breed.* 2016;36:66. doi: [10.1007/s11032-016-0464-0](https://doi.org/10.1007/s11032-016-0464-0).
- Wang Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology.* 2002;92(1):51-58. doi: [10.1094/PHYTO.2002.92.1.51](https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.51).
- Wei T, Wang A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol.* 2008 Dec;82(24):12252-64. doi: [10.1128/jvi.01329-08](https://doi.org/10.1128/jvi.01329-08).

- Weng Z, Barthelson R, Gowda S, Hilf ME, Dawson WO, Galbraith DW, et al. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS One*. 2007;2:e917. [doi: 10.1371/journal.pone.0000917](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000917).
- Whitfield AE, Ullman DE, German TL. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:459–89. [doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017).
- Wong KL, Liu J. Factors and methods to modulate DNA hybridization kinetics. *Biotechnol J*. 2021;16:e2000338. [doi:10.1002/biot.202000338](https://doi.org/10.1002/biot.202000338)
- Woolhouse M, Scott F, Hudson Z, Howey R, Chase-Topping M. Human viruses: Discovery and emergence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012;367(1604):2864-71. [doi: 10.1098/rstb.2011.0354](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0354).
- World Bank. World Development Report 2008: Agriculture for Development. Washington, DC: World Bank; 2007.
- Wu Q, Ding SW, Zhang Y, Zhu S. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annu Rev Phytopathol*. 2015;53:425–444.
- Wyatt SD, Brown JK. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 1996 Dec;86(12):1288-1293.
- Wylie SJ, Kueh J, Welsh B, Smith LJ, Jones MG, Jones RA. A non-aphid-transmissible isolate of bean yellow mosaic potyvirus has an altered NAG motif in its coat protein. *Arch Virol*. 2002 Sep;147(9):1813-20. [doi: 10.1007/s00705-002-0846-y](https://doi.org/10.1007/s00705-002-0846-y).
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*. 2004 May;2(5):e104. [doi: 10.1371/journal.pbio.0020104](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104).
- Xie Z, Si W, Gao R, Zhang X, Yang S. Evolutionary analysis of RB/Rpi-blb1 locus in the Solanaceae family. *Mol Genet Genomics*. 2015;290(6):2173-86. [doi: 10.1007/s00438-015-1068-9](https://doi.org/10.1007/s00438-015-1068-9).
- Xu X, Chao J, Cheng X, Wang R, Sun B, Wang H, Luo S, Xu X, Wu T, Li Y. Mapping of a Novel Race Specific Resistance Gene to Phytophthora Root Rot of Pepper (*Capsicum annuum*) Using Bulk Segregant Analysis Combined with Specific Length Amplified Fragment Sequencing Strategy. *PLoS ONE*. 2016;11:e0151401. [doi: 10.1371/journal.pone.0151401](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151401).
- Xu Y, Ghanim M, Liu Y. Editorial: Mixed Infections of Plant Viruses in Nature and the Impact on Agriculture. *Front Microbiol*. 2022 Jun 7;13:922607. [doi: 10.3389/fmicb.2022.922607](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922607).
- Yamafuji R, Watanabe Y, Meshi T, Okada Y. Replication of TMV-L and Lta1 RNAs and their recombinants in TMV-resistant *Tm-1* tomato protoplasts. *Virology*. 1991;183(1):99–105. [doi: 10.1016/0042-6822\(91\)90122-R](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90122-R).
- Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, Namba S. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell*. 2012 Feb;24(2):778-793. [doi: 10.1105/tpc.111.093658](https://doi.org/10.1105/tpc.111.093658).
- Yanar Y, Miller SA. Resistance of Pepper Cultivars and Accessions of *Capsicum* spp. to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis*. 2003 Mar;87(3):303-307. [doi: 10.1094/PDIS.2003.87.3.303](https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.303).

- Yanez C.E., A. Alvino, V. Magliulo, and P. Steduto. Pepper response to mild conditions of combined soil-water and salinity stress. *Adv Hort Sci.* 1992;6:3–10.
- Yang HB, Liu WY, Kang WH, Jahn M, Kang BC. Development of SNP markers linked to the L locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. *Mol Breed.* 2009;24(4):433-446. doi: [10.1007/s11032-009-9304-9](https://doi.org/10.1007/s11032-009-9304-9).
- Yang HB, Liu WY, Kang WH, Kim JH, Cho HJ, Yoo JH, Kang BC. Development and validation of L allele-specific markers in *Capsicum*. *Mol Breed.* 2012;30(2):819-829. doi: [10.1007/s11032-011-9666-7](https://doi.org/10.1007/s11032-011-9666-7).
- Yao M, Li N, Wang F, Ye Z. Genetic analysis and identification of QTLs for resistance to cucumber mosaic virus in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica.* 2013;193:135-45. doi: [10.1007/s10681-013-0953-8](https://doi.org/10.1007/s10681-013-0953-8).
- Yeom I, Kang BC, Lindeman W, Choi D, Jahn MM. Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the *pvr1* locus encoding *eIF4E* in *Capsicum*. *Theor Appl Genet.* 2005;112:178–186. doi: [10.1007/s00122-005-0120-2](https://doi.org/10.1007/s00122-005-0120-2).
- Yeku O, Frohman MA. Rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Methods Mol Biol.* 2011;703:107-22. doi: [10.1007/978-1-59745-248-9_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_8).
- Yoon JY, Palukaitis P, Choi SK (2019) Host Range In: Palukaitis P, García-Arenal F, editors. *Cucumber Mosaic Virus*. St Paul MN: APS Press. 2019; pp. 15–18. <https://doi.org/10.1094/9780890546109.004>
- Zamljen T., Zupanc V., Slatnar A. Influence of Irrigation on Yield and Primary and Secondary Metabolites in Two Chilies Species, *Capsicum Annuum* L. and *Capsicum Chinense* Jacq. *Agric. Water Manag.* 2020;234:106104. doi: [10.1016/j.agwat.2020.106104](https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106104).
- Zamora-Macorra E, Ochoa-Martínez DL, Valdovinos-Ponce G, Rojas-Martínez R, Ramírez-Rojas S, Sánchez-Navarro JA, Pallás V, Aparicio F. Simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp michiganensis, Pepino mosaic virus and Mexican papita viroid by non-radioactive molecular hybridization using a unique polyprobe. *Eur J Plant Pathol.* 2015;143:779–787. doi:[10.1007/s10658-015-0729-1](https://doi.org/10.1007/s10658-015-0729-1)
- Zanatta CB, Benevenuto RF, Nodari RO, et al. Stacked genetically modified soybean harboring herbicide resistance and insecticide rCry1Ac shows strong defense and redox homeostasis disturbance after glyphosate-based herbicide application. *Environ Sci Eur.* 2020;32:104. Doi:[10.1186/s12302-020-00379-6](https://doi.org/10.1186/s12302-020-00379-6)
- Zeven, A.C. Traditional maintenance breeding of landraces: 2. Practical and theoretical considerations on maintenance of variation of landraces by farmers and gardeners. *Euphytica* 2002, 123, 147–158, doi:[10.1023/A:1014940623838](https://doi.org/10.1023/A:1014940623838).
- Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock R, Nie B, Zhang J. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. *Plant Biotechnol J.* 2019 Sep;17(9):1814-1822. doi: [10.1111/pbi.13102](https://doi.org/10.1111/pbi.13102).
- Zhang X, Holt J, Colvin J. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. *Plant Pathol.* 2001;50:732–746. doi:[10.1046/j.1365-3059.2001.00613.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00613.x)

Páginas web

EPPO Global Database. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) [Host plants]. 2024. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCV0/hosts>. [Consultado: 09 mayo 2024].

Euskadi (2015a) Calidad alimentaria. Indicación Geográfica: Pimiento de Gernika. Disponible en: https://www.euskadi.eus/web01-a2elikal/es/contenidos/informacion/dop_pimiento/es_agripes/index.shtml. [Consultado: 11 agosto 2023].

Euskadi (2015b) Calidad alimentaria. Reglamento de la marca “Ibarrako piparrak - guindillas de ibarra”. Disponible en: https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/mg_guindilla/es_agripes/adjuntos/Reglamento%20Guindillas%20de%20Ibarra.pdf. [Consultado: 11 agosto 2023].

Euskadi. Departamento de Desarrollo Económico, sostenibilidad y Medio ambiente. Estadísticas resumidas de las Operaciones Estadísticas del Plan Vasco de Estadística que sirven para proporcionar una visión general del Sector agrario, pesquero, la industria de alimentación y bebidas y la madera. 2020. Disponible en: <https://www.euskadi.eus/estadistica-rapida-agricultura-pesca-e-industria-alimentaria/web01-a2estadi/es/> [Consultado: 10 abril 2020]

Euskadi. El relevo generacional pieza clave del futuro del sector primario de Euskadi. 2023. Disponible en: <https://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/-/noticia/2023/el-relevo-generacional-pieza-clave-del-futuro-del-sector-primario-euskadi/> [Consultado: 09 mayo 2024].

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: Food and Agriculture Data. Production of crops by Country. Rome: FAO; 2020. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. [Consultado: 4 abril 2020].

Gipuzkoa. La Diputación Foral apoya la competitividad y el relevo generacional del primer sector con 4,7 millones. 2023. Disponible en: <https://www.gipuzkoa.eus/eu/-/foru-aldundiak-lehen-sektorearen-lehiakortasuna-eta-belaunaldi-erreleboa-babestuko-ditu-4-7-milioirekin> [Consultado: 09 mayo 2024].

GURE PLATERA GURE AUKERA. Disponible en: <https://www.gureplateragureaukera.eus/es/>. [Consultado: 09 mayo 2024].

HAZI. Productos que llevan el sello Eusko Label. 2024. Disponible en: <https://euskolabel.hazi.eus/es/nuestros-productos/> [Consultado: 09 mayo 2024].

ISAAA Inc. Productos transgénicos importados por Europa. Disponible en: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/approvedeventsin/default.asp?CountryID=EU&Country=European%20Union>. [Consultado: 09 mayo 2024].

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España). Anuario de Estadística Agraria Española 2018. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; 2019. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2019/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=6>. [Consultado: 09 abril 2020]

National Human Genome Research Institute. Representación del funcionamiento de la técnica PCR. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa> [Consultado 04 junio 2024]

Legislación

Comisión Europea. Estrategia de la UE sobre la Biodiversidad para 2030. Bruselas: Comisión Europea; 2020b. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0380>

Comisión Europea. Proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council on plants obtained by certain new genomic techniques and their food and feed, and amending Regulation (EU) 2017/625. COM(2023) 411 final. Brussels: European Commission; 2023. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:52023PC0411>

Comisión Europea. Una estrategia de la granja a la mesa para un sistema alimentario justo, saludable y respetuoso con el medio ambiente. Bruselas: Comisión Europea; 2020a. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0381>

Consejo de la Unión Europea. Reglamento (CE) No 2100/94 del Consejo de 27 de julio de 1994 sobre el régimen comunitario de protección de los derechos de obtentor de variedades vegetales. Diario Oficial de la Unión Europea. 1994;L227:1-30. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A31994R2100>

Court of Justice of the European Union. Case ECLI:EU:C:2018:583. Judgement of the Court of Justice of the European Union. 2018.

España. Jefatura del Estado. "Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal". BOE núm. 279, de 21 de noviembre de 2002, págs. 40970-40988, sec. I. Disposiciones generales, ref. BOE-A-2002-22649. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/l/2002/11/20/43>.

España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. "Real Decreto 1054/2021, de 30 de noviembre, por el que se establecen y regulan el Registro de operadores profesionales de vegetales, las medidas a cumplir por los operadores profesionales autorizados a expedir pasaportes fitosanitarios y las obligaciones de los operadores profesionales de material vegetal de reproducción, y se modifican diversos reales decretos en materia de agricultura". BOE núm. 300, 16 de diciembre de 2021, págs. 154157-154193, sec. I, Disposiciones generales, ref. BOE-A-2021-20730. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2021/11/30/1054>

España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. "Real Decreto 739/2021, de 24 de agosto, por el que se dictan disposiciones para la aplicación en España de la normativa de la Unión Europea relativa a las medidas de protección contra las plagas de los vegetales y los controles y otras actividades oficiales en dicha materia". BOE núm. 223, 17 de septiembre de 2021, págs. 113530-113549, sec. I, Disposiciones generales, ref. BOE-A-2021-15095. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2021/08/24/739>.

Parlamento Europeo. INFORME sobre el relevo generacional en las futuras explotaciones agrícolas de la Unión. Bruselas: European Parliament; 2023. Report No.: A9-0283/2023. Disponible en: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2023-0283_ES.html.

Unión Europea. Directive (EU) 2015/412 of the European Parliament and of the Council of 11 March 2015 amending Directive 2001/18/EC as regards the possibility for the Member States to restrict or prohibit the cultivation of genetically modified organisms (GMOs) in their territory. Off J Eur Union. 2015;L 68/1. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015L0412>

Unión Europea. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Official Journal of the European Communities. 2001;L 106/1. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=SWD:2023:0411:FIN:EN:PDF>

ANEXOS

Anexo I

Número de diagnósticos positivos a diferentes virus en pimiento y guindilla en la provincia de Bizkaia y el porcentaje de cada virus respecto a las muestras positivas a virus. (Fuente: Laboratorio oficial de la Diputación Foral de Bizkaia).

Año	Muestras analizadas	Diagnóstico virus	TSWV- INSV	ToMV	PVY	CMV	TMGMV	BBWV	CPPMoV
1997	107	35	4	19	11	1			
1998	132	31	16	7	8				
1999	122	16	8	2	4	2			
2000	96	15	8	1	6				
2001 ^a	119	25	15	6	4	1			
2002 ^a	112	25	12	3	6		3	2	
2003	96	19	10		3	1	4	1	
2004 ^a	74	17	8	2	4		4		
2005	62	13	9		1		3		
2006	73	20	9		4		4	3	
2007 ^a	98	53	19	3	6	2	32		
2008	99	37	12	1	5	1	18		
2009 ^a	79	27	13		3	3	10		
2010 ^a	75	18	5			1	14		
2011 ^b	56	13	3		1	1	8		
2012	76	24	15	3	1	1	4		
2013	35	11	7	1			3		
2014	39	13	8			1	4		
2015	54	20	8	6	1	2	3		
2016	42	10	10						
2017	42	9	4	2	2		1		
2018	43	9	3	3		1	2		
2019	44	16	7	2	1	1	1		4
Total	1775	476	213	61	71	19	118	6	4
Porcentaje		26,8 % ^c	44,7 % ^d	12,8 % ^d	14,9 % ^d	4,0 % ^d	24,8 % ^d	1,3 % ^d	0,8 % ^d

^a En algunos años, la suma de los diagnósticos positivos a los diferentes virus es superior al número de muestras con diagnóstico positivo a virus porque en algunas muestras se detecta más de un virus.

^b En año 2011 periodo de enero hasta agosto.

^c Porcentaje respecto al número de muestras de pimiento analizadas.

^d Porcentaje respecto al número de muestras con diagnósticos positivo a virus.

Número de diagnósticos positivos a diferentes virus en pimiento y guindilla en la provincia de Gipuzkoa y el porcentaje de cada virus respecto a las muestras positivas a virus. (Fuente: Laboratorio oficial de la Diputación Foral de Gipuzkoa, Fraisoro)

Año	Muestras analizadas	TSWV	CMV	TMGMV	PVY	PMMoV	ToMV
2012	86	11	0	2	3	0	1
2013	41	2	0	0	1	0	3
2014	62	4	0	1	7	0	4
2015	97	2	0	0	1	12	2
2016	33	3	0	0	1	3	0
2017	69	2	8	0	6	16	8
2018	60	1	4	0	2	3	1
2019	179	11	15	0	0	1	2
Total	627	36	27	3	21	35	21
Porcentaje		25,2 %	18,9 %	2,1 %	14,7 %	24,5 %	14,7 %

Anexo III.

Cebadores utilizados RT-PCR, secuenciación y amplificación del genoma completo de CPMMoV-Sp.

Nombre cebador	S/As ¹	Secuencia primer 5'-3'	Posición CPMMoV (GenBank: OQ920979)
2721-A ² (Stem-loop)	As	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACAAAAAAAAAAAAAAAA	-
2721-T ³ (Stem-loop)	As	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTTTTTTTTTTTTTTTT	-
3337 ⁴	S	ACTGTGGCAATAAGATCTGC	6080-6099
3339	As	TGGGCCCTACCGGGGTTCCGG	6383-6405
3345 ⁵	As	TGTGTGTATGCCATTGTA	69-91
3346 ⁶	As	TTAACCTTGGGCTGCGGTC	199-218
3351	S	CGTATTTTTACTACAACAATTACC	1-25
3493	S	CAAGGTCTTTAAATACTACAC	3305-3326
3494	As	CTAACTTGCTCTAAATCACGC	3357-3377
3519 ⁷	AS	AGGTCTCCCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC	
3533 ⁸	S	AGGTCTCAAGCTTCGTTGTA AACGACGGCCAGTG	
3534 ⁹	AS	AGGTCTCGAATTCACAGGAAACAGCTATGACCATG	
3566	S	AATGCGTGTTCCTCAAGGG	814-832
3567	AS	AACTAACGTGCGGTTCTCC	2527-2545
3568	S	CGCTGGTCAGGTTAACGCC	3224-3243
3569	S	ATTCAGACAGAGTATCCGG	4018-4036
3570	As	CCCTTCTACCGGCTTTGG	5636-5654
3585 ¹⁰	S	CACAGAGCTCTAATACGACTACTATAGCGTATTTTTACTACAACAATTAC	1-24
3586 ¹¹	As	CACACTGCAGCTCGAGTGGGCCCTACCGGGGTTCCGG	6383-6405
3589 ¹²	S	ACGTCTCTTTAGTTAGCATAGTGCG	3342-3359
3590 ¹³	As	ACGTCTCACTAAAGGATCCATACTA	3329-3347
3594 ¹⁴	S	CACACTCGAGGATCTGGTGCTAGTTC	2623-2641
3595 ¹⁵	As	CACAGTCGACTATGAATAGCCTCTTGAAC	2769-2788
3596 ¹⁶	S	CACACTCGAGGTGACCGACAAAGGACC	5449-5466
3597 ¹⁷	As	CACAGTCGACTAAAAGGTCTGTGGGATC	5783-5800
3598 ¹⁸	S	GTAGTTATGGATCCTTTAG	3328-3346
3599 ¹⁹	As	CTAAAGGATCCATACTAC	3328-3346
3600	S	GAGCAAGAAGACCATTCCCG	534-553
3604 ²⁰	S	CACACTCGAGACGAAACCTTGACGCAG	1501-1518
3605 ²¹	As	CACAGTCGACTATAGATCTGGCACCGTT	1626-1643
3666 ²²	S	CTAATACGACTACTATACGTATTTTTACTAC	1-15
3667 ²³	S	CTAATACGACTACTATAGTATTTTTACTAC	2-15
3668 ²⁴	S	CTAATACGACTACTATAACCAACAACAAACAAAC	23-39
3669 ²⁵	S	CTAATACGACTACTATAGACCAACAACAAACAAAC	23-39
3670 ²⁶	S	AGGTCTCCCCTAGACTTGCCATCTTC	
3671 ²⁷	As	AGGTCTCTAGGGTGGGCCCTACCGGGGTTCC	6385-6405
3672 ²⁸	S	...AGGTCTCAGAGGCGTATTTTTACTACAACAATT	1-22
3673 ²⁹	S	...AGGTCTCAGAGGCGTATTTTTACTACAACAATT	2-22
3674 ³⁰	S	...AGGTCTCAGAGGACCAACAACAAACAAAC	23-42
3700 ³¹	S	...ACGTCTCAGAGGACCAACAACAAACAAAC	23-42
3701	As	ACGTCTCTAGGGTGGGCCCTACCGGGGTTCC	6385-6405

¹ S: sentido, As: Antisense; ² Cebador que se une al extremo de la cola poly(U); ³ Cebador que se une al extremo de la cola poly(A); ⁴ Cebador cerca del 3' terminal del RNA viral para determinar la secuencia exacta del extremo; ⁵ Amplificación del extremo 5' por RT-PCR; ⁶ Amplificación del extremo 5' por PCR; ⁷ Este primer es un antisense del promotor 35S para amplificar este promotor y ligarlo al extremo 5' del virus. ⁸ Cebador complementario a 3534. Amplificar casete de expresión en pSK+ y pUC18 y clonar en pMOG800. Lleva el sitio de restricción *BsaI* (*HindIII*); ⁹ Cebador complementario a 3533. Amplificar casete de expresión en pSK+ y pUC18 y clonar en pMOG800. Lleva el sitio de restricción *BsaI* (*EcoRI*). ¹⁰ Cebador correspondiente a la secuencia de nucleótidos virales del extremo 5' terminal precedido de la secuencia del promotor T7 y el sitio de restricción *SacI*; ¹¹ Cebador complementario al extremo 3' terminal del virus con los sitios de restricción *XhoI* y *PstI*; ¹² Cebador complementario al 3586 con el sitio de restricción *Esp3*; ¹³ Cebador complementario al 3585 con el sitio de restricción *Esp3*; ¹⁴ Cebador

complementario al 3595As, con sitio de restricción *XhoI*, para generar la sonda de 166 nt;¹⁵ Cebador complementario al 3594, con sitio de restricción *Sall*, para generar la sonda de 166 nt.¹⁶ Cebador complementario al 3597As, con sitio de restricción *XhoI*, para generar la sonda de 352 nt;¹⁷ Cebador complementario al 3596s, con sitio de restricción *Sacl*, para generar la sonda de 352 nt;¹⁸ Cebador complementario al 3586 para amplificar el virus, lleva el sitio de restricción *BamHI*;¹⁹ Cebador complementario al 3585 para amplificar el virus, lleva el sitio de restricción *BamHI*;²⁰ Cebador complementario al 3605, con sitio de restricción *XhoI*, para generar la sonda de 143 nt;²¹ Cebador complementario al 3604, con sitio de restricción *Sall*, para generar la sonda de 143 nt.²²⁻²⁵ Cebadores con diferentes extremos 5' terminales precedidos del promotor T7 para crear clones infectivos.²⁶ Cebador del inicio del terminador PopIt con sitio restricción *BsaI*.²⁷ Cebador complementario al extremo 3' terminal empleado para crear los clones infectivos con el promotor 35S y el terminador PopIt.²⁸⁻³¹ Cebadores con diferentes secuencias 5' terminales empleados generar clones infecciosos con el promotor 35S y el terminador PopIt .

Anexo V

Muestreo aleatorio de flora silvestre en cuatro parcelas de guindillas de Ibarra al aire libre en marzo de 2021 (antes del cultivo) y análisis de CMV por HM.

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
1-Ibarra	207		47		254	
<i>Arum italicum</i> Miller			1		1	
<i>Arum maculatum</i> L.	1				1	
<i>Bellis perennis</i> L.	8				8	
<i>Brassica napus</i> L.	1				1	
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus			1		1	
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	1				1	
<i>Cardamine pratensis</i> L.			2		2	
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	5		2		7	
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.			1		1	
<i>Crepis vesicaria</i> L.	6		1		7	
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.			3		3	
<i>Geranium dissectum</i> L.	9		2		11	
<i>Geranium robertianum</i> L.	2				2	
<i>Glechoma hederacea</i> L.	5		4		9	
<i>Hedera helix</i> L.			3		3	
<i>Hypericum androsaemum</i> L.			1		1	
<i>Lathyrus pratensis</i> L.	1				1	
<i>Medicago polymorpha</i> L.	1				1	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	2				2	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton	1				1	
<i>Plantago lanceolata</i> L.	29				29	
<i>Plantago major</i> L.	8				8	
<i>Potentilla reptans</i> L.	6				6	
<i>Ranunculus acris</i> L.	3		1		4	
<i>Ranunculus repens</i> L.	5		5		10	
<i>Rubus</i> sp.	6				6	
<i>Rumex acetosa</i> L.	1		1		2	
<i>Rumex acetosella</i> L.	3				3	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	11		2		13	
<i>Sambucus ebulus</i> L.	1				1	
<i>Senecio vulgaris</i> L.			1		1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill			1		1	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	9		1		10	
<i>Stellaria holostea</i> L.	3				3	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	4		1		5	
<i>Taraxacum gr. officinale</i> Weber	37		4		41	
<i>Trifolium repens</i> L.	24				24	
<i>Urtica</i> sp.	2				2	
<i>Veronica agrestis</i> L.			1		1	
<i>Veronica persica</i> Poiret	12		3		15	
Sin identificar			5		5	

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
		13				
2-Ibarra	320	(4,1%)			320	13 (4,1%)
<i>Anthemis arvensis</i> L.	1				1	
<i>Arum italicum</i> Miller	1				1	
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	2				2	
<i>Capsicum annuum</i> L.	2				2	
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	8	5			8	5
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	6				6	
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	66	1			66	1
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	1				1	
<i>Crepis</i> sp.	2				2	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	11				11	
<i>Galium aparine</i> L.	11				11	
<i>Geranium dissectum</i> L.	12				12	
<i>Geranium molle</i> L.	2				2	
<i>Hedera helix</i> L.	1				1	
<i>Hypochoeris radicata</i> L.	1				1	
<i>Lamium purpureum</i> L.	9	1			9	1
<i>Lapsana communis</i> L.	1				1	
<i>Leontodon hispidus</i> L.	1				1	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	1				1	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton	44	2			44	2
<i>Parietaria diffusa</i> Mert. & Koch	1				1	
<i>Picris</i> sp.	5				5	
<i>Ranunculus ficaria</i> L.	2				2	
<i>Ranunculus repens</i> L.	1				1	
<i>Rosa</i> sp.	5				5	
<i>Rubus</i> sp.	1				1	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	5				5	
<i>Senecio vulgaris</i> L.	9				9	
<i>Sonchus arvensis</i> L.	2				2	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	3				3	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	15				15	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	6	3			6	3
<i>Taraxacum gr. officinale</i> Weber	5				5	
<i>Thlaspi arvense</i> L.	1				1	
<i>Trifolium pratense</i> L.	1				1	
<i>Trifolium repens</i> L.	4				4	
<i>Veronica arvensis</i> L.	5				5	
<i>Veronica persica</i> Poiret	57	1			57	1
Sin identificar	9				9	
<i>Capsicum annuum</i> L. (raíces)*	2				2	
3-Hernani	257	3 (1,2%)	58	10 (17,2%)	315	13 (4,1%)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	6		1		7	
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	4		5	5	9	5
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	58		12	3	70	3

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	1				1	
<i>Epilobium parviflorum</i> Schreber	1				1	
<i>Epilobium</i> sp.	10				10	
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	5				5	
<i>Erigeron canadensis</i> L.	2				2	
<i>Erigeron</i> sp.	16				16	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	1		1		2	
<i>Fumaria officinalis</i> L.			2	1	2	1
<i>Galium aparine</i> L.			1		1	
<i>Geranium dissectum</i> L.	12	1			12	1
<i>Lepidium</i> sp.	7				7	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	6				6	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton	6				6	
<i>Oxalis corniculata</i> L.			1		1	
<i>Pisum sativum</i> L.			11		11	
<i>Plantago major</i> L.			1		1	
<i>Ranunculus ficaria</i> L.	3				3	
<i>Ranunculus repens</i> L.	1				1	
<i>Rumex acetosella</i> L.	16				16	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	1		4		5	
<i>Solanum chenopodioides</i> Lam.			1		1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	5		2	1	7	1
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	9		4		13	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	8	1	9		17	1
<i>Trifolium repens</i> L.	1				1	
<i>Urtica</i> sp.	2				2	
<i>Valerianella locusta</i> (L.) Laterrade	25				25	
<i>Veronica arvensis</i> L.	27		1		28	
<i>Veronica persica</i> Poiret	21		2		23	
Sin identificar	3	1			3	1
4-Usurbil	208		43		251	
<i>Ajuga reptans</i> L.			1		1	
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus			2		2	
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	3				3	
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	4				4	
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	8				8	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	2		1		3	
<i>Galium aparine</i> L.	6		2		8	
<i>Geranium dissectum</i> L.	5		1		6	
<i>Geranium robertianum</i> L.			4		4	
<i>Lapsana communis</i> L.			2		2	
<i>Lathyrus pratensis</i> L.	4		2		6	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	7				7	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aitone	23		1		24	
<i>Pastinaca sativa</i> L.	6		2		8	
<i>Plantago lanceolata</i> L.	4				4	

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Plantago major</i> L.			3		3	
<i>Potentilla reptans</i> L.	21				21	
<i>Ranunculus bulbosus</i> L.			1		1	
<i>Ranunculus ficaria</i> L.	11		4		15	
<i>Rubus</i> sp.	3		1		4	
<i>Rumex acetosella</i> L.	5				5	
<i>Rumex</i> sp.			5		5	
<i>Scrophularia auriculata</i> L.			1		1	
<i>Silene</i> sp.	1				1	
<i>Sonchus arvensis</i> L.	1				1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill			4		4	
<i>Symphytum officinale</i> L.			2		2	
<i>Symphytum tuberosum</i> L.			1		1	
<i>Taraxacum gr. officinale</i> Weber	4				4	
<i>Trifolium pratense</i> L.	6		2		8	
<i>Urtica</i> sp.	36				36	
<i>Valerianella locusta</i> (L.) Laterrade	11				11	
<i>Veronica persica</i> Poiret	32				32	
<i>Vicia sativa</i> L.	4				4	
Sin identificar	1		1		2	
Total general	992	16 (1,6%)	148	10 (6,8%)	1140	26 (2,3%)

*Raíces de pimiento (*Capsicum annuum*) de la campaña anterior que quedaron en la parcela. Se analizaron tanto las raíces que fueron procesadas como las hojas.

Anexo VI

Muestreo aleatorio de flora silvestre en cuatro parcelas de guindillas de Ibarra al aire libre en septiembre de 2021 (final del cultivo) y análisis CMV por HM.

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
1-Ibarra	164		114	14 (12,2%)	278	14 (5%)
<i>Achillea</i> sp.	1				1	
<i>Amaranthus blitum</i> L.	11		28		39	
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.			5		5	
<i>Bellis silvestris</i> Cyr.			1		1	
<i>Calendula</i> sp.	1				1	
<i>Cardamine flexuosa</i> With.			5	2	5	2
<i>Cichorium intybus</i> L.			1		1	
<i>Crepis</i> sp.	1				1	
<i>Echinochloa crus-gali</i> (L.) Beauv.			1		1	
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	1				1	
<i>Geranium molle</i> L.	2		1	1	3	1
<i>Glechoma hederacea</i> L.	20		1		21	
<i>Hypochoeris radicata</i> L.	1				1	
<i>Lamium hybridum</i> Vill.			1	1	1	1
<i>Leontodon hispidus</i> L.	23		1		24	
<i>Lepidium</i> sp.	1				1	
<i>Lobularia maritima</i> (L.) Desv.	1				1	
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	1				1	
<i>Medicago polymorpha</i> L.	3				3	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	6				6	
<i>Oxalis</i> sp.	8		5		13	
<i>Picris hieracioides</i> L.	1				1	
<i>Plantago lanceolata</i> L.	13				13	
<i>Plantago major</i> L.	1				1	
<i>Polygonum aviculare</i> L.	1		1		2	
<i>Portulaca oleracea</i> L.	1		2		3	
<i>Ranunculus repens</i> L.	1		1		2	
<i>Rubus</i> sp.	1				1	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	10		4		14	
<i>Sambucus ebulus</i> L.	1				1	
<i>Senecio vulgaris</i> L.			3		3	
<i>Solanum nigrum</i> L.			7		7	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	8		6		14	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	6		13		19	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.			18	10	18	10
<i>Taraxacum gr. officinale</i> Weber	11		1		12	
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	1				1	
<i>Trifolium repens</i> L.	5				5	
<i>Urtica</i> sp.	6				6	
<i>Verbena officinalis</i> L.	5		1		6	
<i>Veronica arvensis</i> L.			1		1	

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Veronica montana</i> L.			4		4	
<i>Veronica persica</i> Poiret.	11		1		12	
Sin identificar			1		1	
2-Ibarra	159	8 (5%)	136	3 (2,2%)	295	11 (3,7%)
<i>Amaranthus blitum</i> L.	36	1	42		78	1
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	1		6		7	
<i>Atriplex patula</i> L.	2		1		3	
<i>Bellis silvestris</i> Cyr.			1		1	
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	3		7	1	10	1
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	4	1			4	1
<i>Datura stramonium</i> L.	1				1	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	27	1	17		44	1
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	7		21	2	28	2
<i>Galium aparine</i> L.	2				2	
<i>Geranium molle</i> L.	11				11	
<i>Lepidium</i> sp.	1				1	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér ex Aiton	31	4	5		36	4
<i>Persicaria maculosa</i> S.F. Gray	1		3		4	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.			1		1	
<i>Picris hieracioides</i> L.	1		1		2	
<i>Portulaca oleracea</i> L.	1		1		2	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	1				1	
<i>Senecio vulgaris</i> L.	7	1	2		9	1
<i>Solanum nigrum</i> L.			3		3	
<i>Sonchus arvensis</i> L.	1				1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill			2		2	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	9		9		18	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.			1		1	
<i>Taraxacum gr. officinale</i> Weber	1		1		2	
<i>Trifolium repens</i> L.	5		6		11	
<i>Valerianella</i> sp.	3				3	
<i>Veronica persica</i> Poiret.	2		3		5	
Sin identificar	1		3		4	
3-Hernani	190	6 (3,1%)	121	7 (5,8%)	311	13 (4,2%)
<i>Amaranthus blitum</i> L.	3	1	20		23	1
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	3		8		11	
<i>Arum italicum</i> Miller.	1				1	
<i>Atriplex patula</i> L.	1				1	
<i>Bellis silvestris</i> Cyr.	2				2	
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	1	1	4	1	5	2
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	1	1			1	1
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	14	1	2	1	16	2
<i>Chenopodium album</i> L.	1				1	
<i>Convolvulus sepium</i> L.	11		4		15	
<i>Cornus sanguinea</i> L.	1				1	

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.	7				7	
<i>Epilobium hirsutum</i> L.	3				3	
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	10				10	
<i>Equisetum</i> sp.	1				1	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	3				3	
<i>Fallopia dumetorum</i> (L.) J. Holub	2				2	
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	4				4	
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	19		48	1	67	1
<i>Galium aparine</i> L.	4				4	
<i>Geranium dissectum</i> L.	1				1	
<i>Hedera helix</i> L.	5				5	
<i>Hypochoeris radicata</i> L.	2				2	
<i>Lamium purpureum</i> L.			1		1	
<i>Ligustrum ovalifolium</i> Hassk.	3				3	
<i>Malus domestica</i> Borkh.	19				19	
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	1				1	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér ex Aiton	11				11	
<i>Oxalis corniculata</i> L.	1				1	
<i>Oxalis</i> sp.	1				1	
<i>Persicaria maculosa</i> S.F. Gray	2		1		3	
<i>Picris hieracioides</i> L.			1		1	
<i>Plantago lanceolata</i> L.	1				1	
<i>Platanus hispanica</i> Miller ex Münch	1				1	
<i>Portulaca oleracea</i> L.	4		3		7	
<i>Ranunculus repens</i> L.	2				2	
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	3				3	
<i>Rumex obtusifolius</i> L.			1		1	
<i>Senecio vulgaris</i> L.	2		1		3	
<i>Solanum nigrum</i> L.	4		2		6	
<i>Solidago virgaurea</i> L.	1				1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	4				4	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	1				1	
<i>Stachys arvensis</i> (L.) Benth	5				5	
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	4	2	25	4	29	6
<i>Trifolium repens</i> L.	1				1	
<i>Urtica</i> sp.	7				7	
<i>Veronica montana</i> L.	6				6	
Bambú (Sin identificar)	6				6	
4-Usurbil	147		152		299	
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	4		3		7	
<i>Bellis silvestris</i> Cyr.	1				1	
<i>Berula erecta</i> (Hudson) Coville	14				14	
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	2				2	
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	3		9		12	
<i>Convolvulus sepium</i> L.	1				1	

Especie de planta (por parcela)	Borde		Parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Convolvulus</i> sp.	1				1	
<i>Cyperus</i> sp.	4		4		8	
<i>Epilobium hirsutum</i> L.	1		2		3	
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	3		1		4	
<i>Equisetum</i> sp.	4		1		5	
<i>Euphorbia peplus</i> L.	3				3	
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	1		42		43	
<i>Hedera helix</i> L.	1				1	
<i>Lactuca serriola</i> L.			5		5	
<i>Lysimachia</i> sp.			1		1	
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér ex Aiton	31		54		85	
<i>Persicaria lapathifolia</i> (L.) S.F. Gray			2		2	
<i>Picris hieracioides</i> L.			1		1	
<i>Portulaca oleracea</i> L.	1		6		7	
<i>Potentilla reptans</i> L.	5		1		6	
<i>Raphanus sativus</i> L.	1				1	
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.	9				9	
<i>Rubus</i> sp.	16		1		17	
<i>Samolus valerandi</i> L.	12		1		13	
<i>Scrophularia auriculata</i> auct.			1		1	
<i>Solanum nigrum</i> L.	1		4		5	
<i>Solanum</i> sp.	2				2	
<i>Sonchus arvensis</i> L.			1		1	
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	1		1		2	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	5		5		10	
<i>Trifolium repens</i> L.	3		1		4	
<i>Urtica</i> sp.	2				2	
<i>Veronica agrestis</i> L.	11				11	
<i>Veronica arvensis</i> L.	4				4	
<i>Veronica persica</i> Poiret.			4		4	
Sin identificar			1		1	
Total general	660	14 (2,1%)	523	24 (4,6%)	1183	38 (3,2%)

Anexo VII

Muestreo aleatorio de flora silvestre en una parcela (Parcela 3- Hernani) de guindilla de Ibarra al aire libre en marzo de 2022 (antes del cultivo) y análisis CMV por HM.

Especie de planta	Borde		Área parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
3-Hernani	322	1 (0,3%)	76	2 (2,6%)	398	3 (0,75%)
<i>Arum italicum</i> Miller	5				5	0
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medicus	25	1	6		31	1
<i>Cardamine flexuosa</i> With.	10		5	1	15	1
<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	49		8		57	0
<i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.	2				2	0
<i>Crepis vesicaria</i> L.	2				2	0
<i>Daucus carotas</i> L.	1				1	0
<i>Epilobium parviflorum</i> Schreber			1		1	0
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	4				4	0
<i>Erigenon</i> sp.	6				6	0
<i>Euphorbia peplus</i> L.	9		3		12	0
<i>Ranunculus ficaria</i> L.	1				1	0
<i>Fragaria</i> sp.	1				1	0
<i>Fumaria officinalis</i> L.	1				1	0
<i>Galium aparine</i> L.	12		1		13	0
<i>Geranium dissectum</i> L.	7		9		16	0
<i>Hedera helix</i> L.	2				2	0
<i>Lamium</i> sp.			1		1	0
<i>Lamium galeobdolon</i> (L.) L.	1				1	0
<i>Lapsana communis</i> L.	11				11	0
<i>Lepidium</i> sp.	12				12	0
<i>Medicago lupulina</i> L.	6				6	0
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	2				2	0
<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton	15		21		36	0
<i>Plantago lanceolata</i> L.	5				5	0
<i>Plantago major</i> L.	1				1	0
<i>Potentilla reptans</i> L.	1				1	0
<i>Ranunculus repens</i> L.	26				26	0
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.			1		1	0
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	3		4		7	0
<i>Scandix pecten veneris</i> L.	1				1	0
<i>Senecio vulgaris</i> L.	3		3		6	0
<i>Simphytum tuberosum</i> L.	1				1	0
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	11				11	0
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	6				6	0
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	2		2	1	4	1
<i>Symphytum officinale</i> L.	2				2	0
<i>Symphytum tuberosum</i> L.			1		1	0
<i>Taraxacum</i> gr. <i>officinale</i> Weber.	9				9	0
<i>Trifolium repens</i> L.	3				3	0
<i>Urtica</i> sp.	13				13	0

Especie de planta	Borde		Área parcela		Total	
	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV	nº plantas	nº CMV
<i>Valerianella locusta</i> (L.) Laterrade	9		4		13	0
<i>Verbascum</i> sp.			1		1	0
<i>Veronica agrestis</i> L.	2				2	0
<i>Veronica arvensis</i> L.	8				8	0
<i>Veronica persica</i> Poiret	32		4		36	0
<i>Vicia sepium</i> L.			1		1	0

Anexo VIII.

Genoma completo secuenciado de Chili pepper mild mottle virus (CPMMV) Spanish strain/2019 (Genbank: OQ920979.1)

CGTATTTTTTACTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACATTACTTTTTAACAACCTA
CAATGGCATAACACAAAACCGCGTCTTCCGCCGCTTTGTTAGACACAGTCCGTGGTAACAATACCATGGT
CAACGATCTAGCAAAAGCGTTCGGTTGTACGACACAGCGGTAGAGGAATTCAATGCAAGGGACCGCAGGCC
AAGGTAAATTTTTCCAAAAGTTGTAAGCGAAGAACAGACGCTTATAGCAACTAAGGCTTACCCCGAATTCC
AAATCACGTTCTATAACACGCAGAACGCCGTCCATACTTTGGCCGGCGGTCTCCGATCTCTAGAGTTAGA
GTATCTCATGATGCAAATACCGTACGGTTCATTGACCTATGATATCGGCCGGGAATTTCCGCATCACATCTG
TTCAAGGGCAGGGACTATGTTTCATTGCTGCATGCCAATCTGGATGTCCGCGACATAATGCGGCACGAAA
GTCAGAAGGATAGTATCGAACTTTATCTGTCAAGACTAGATAGGAGCAAGAAGACCATTCCCGTTTTTCA
GAAGTCTGCTTTTGAAAAATATGCGGAGTGCAAGGAGGAAGTAGTCTGTCCAGTACTTTCCAAGCGTGT
AGGCATCGACAAGATGCATATACAGGAAGAGTGTATGCTATTGCTTTACATAGCATATACGACATTCCGG
CCGATGAGTTCGGCGCGGCGCTGCTTAGAAAAGATGTACATGTATGTTACGCCGCTTTCCACTTTTCAGA
GGATCTTCTCTTAGAAGATTCGCACGCAAACTGGATGAGATCAATGCGTGTTTTTCAAGGGACGGCGAC
AAACTGTCTTTTTCGTTTGTCTCTGAGAGCACTTAAATTATGTCCATAGTTATAGTAATGTATTAAGT
ATGTGTGCAAGACCTATTTTCCAGCTTCCAATAGGGAAGTGTATATGAAAGAATTTTTAGTTACTAGAGT
AAATACTTGGTTTTGCAAATTTTCTAGAATAGATACTTTCTTGTCTTATAAGGGTGTGGCGCACAGGTCC
ACGGACTGAGACGATCTATGCTGCAATGGAGGATGCATGGCACTATAAGAAGACTCTTGGCATGTGTA
ATAGCGAGAGAATCTTACTGGAAGATTCTTCATCAGTTAATTATTTGGTTTTCCAAAAATGAAGGATATGGT
CATTGTGCCGTTGTTCGACATTTCAATAGAGACTAATAAGAGAACACGCAAGGAAGTCTTAGTTTTCAAAG
GACTTTGTCTATACTGTTTTGAATCACATCAGGACATATCAAGCCAAGGCGCTTACGTACACCAATGTGC
TGTCTTTCGTCGAATCAATTCGTTTCGAGGGTCATAATCAACGGTGTACAGCCCGATCTGAATGGGATGT
GGACAAATCACTGCTGCAATCACTGTCGATGACTTTCTTCTTACACACAAAGCTTGGCGTCTTAAAGAT
GATCTTATAATAAGCAAGTTTACGTTAGGAACGAAACCCCTTGACGCAGTATGTATGGGACGAAGTGACCA
ATGCATTCGGTAATGCCTTTCCATCAATCAAAGAGAGATTAATAAACAGGCGTTTGATAACAGTCTCTGA
GCATGCTTTGAAATAACGGTGCCAGATCTATATGTGACTTTTTCACGATAGACTGGTAACCGAGTACAAG
CAGTCTGTTGAAATGCCCGTTTGGACATAAGGAAAAAGATGGAAGAACTGAGGTGATGTACAACGCAC
TGTCCGAGATTTCCGTTCTGAAAACTCCGACAAGTTTGACGTTGATGTTTTTTCCAGATGTGTAGCAC
ACTTAATGTTGACCAATGACGGCCGCTAAAGTTATGGTAGCGGTGATGAGTAATGAGAGTGGGTTAACT
CTTACTTTTTGAAAGTCCGACTGAAGCTAACGTTGCTATGGCTTTGCAAGATTCAGCAAGTGCCTCGGAAG
GTGCTATTGTGGTGACCTCAAGGGATGTGGAAGAACCATCTATGAAGGGTCTATGGCAAGAGGTGAGTT
GCAGCTGGCCGATTCACAGGTGATATAACTGAGGCTTCCCTTACAAGGAACGAGGAGATTGAGTCTTTG
GCGCAGTTCATATGGCAACAGCAAGTTCGTTGATCAAAAAGCAGATGTGTTTCGATAGTGTACACAGGGC
CTCTTAAAGTTCAGCAAAATGAAAACTTTATAGACTCCCTGGTAGCATCTCTCTCTGCTGCTGTCTCGAA
TCTTGTGAAGATCTTAAAGGACGTGGCGGCCATCGACCTGAAACCTGTCAAAGTTTTGGGCTCTTTGAT
GTGAACTTGAAGAAGTGGCTTATAAGACCATCCGCCAAGAACCATGCATGGGGTGTGTTAGAGACTCATG
AGAGGAAATACCATGTTCGCACTTCTAGAGTACAACCGTGGTGGATTTATCTGTGCTGAGAGTTGGAGAAG
AGTAGCGGTGAGCGCTGAGAGTGTGGTTTACTCTGATATGGCAAACTCAAACATTGAGGAGTATACTA
CGGGATGGAGAACCACGCTTAGTTCCGGCTAAGGTTGTGCTGGTGGACGGAGTACCTGGATGTGGAAGA
CTAAGGAGATCTTATCAAAGGTTCAACTTCGAAGAGGATCTGGTGTAGTTCCCGGCAGGCAGGCCGCTGA
GATGATCAGGAGGAGAGCAAACTCAACAGGAGTGATAGTCGCTACTAAGGACAACGTGAAGACCGTAGAT
TCATTTATAATGAATTACGGAAGAGCGGTAGGGTCCAGTTCAAGAGGCTATTCATAGATGAGGGTCTAA
TGCTGCACACTGGCTGTGTGAATTTTCTTGTGCTATGTCTTTGTGCGATATTGCATATGTCTATGGAGA
CACACAACAAATCCATACATCAACAGAGTTACTGGTTTTCCGTACCCGGAGCATTTTTTCCAAGTTGGAA
GTGGACGAGGTGAAACAAGGCGTATTACGCTGCGTGTGCTGCTGATGTTACTTTCTTCTTGAATCAGA
GGTACGACGGACATGTAATGTGCACGCTAGTGAGAAGCGTTCGGTAAGTCAAGAAATGGTTAAAGGTGC
TGGCGCCATTAATCCAGTTTTCGAAACCAATGGAGGGTAAGATTCTCAGTTTTTACTCAGTTTGACAAGGAT
GCTTTATTGTCAAGAGGTTACAAAAGATGTTCAACTGTGCACGAGGTGCAAGGAGAACTTACGCGGATG
TGTCGCTGGTTCAGGTTAACGCCCTACGCCGTTTCTATAATTTCCGCTGAGAGTCCGCATGTGCTTGTAGC
TTTGTCTAGACATACAAGGCTTTTTAAATACTACACAGTAGTTATGGATCCTTTAGTTAGCATAGTGCCT
GATTTAGAGCAAGTTAGTACTTTTCTGTTAGATATGTACAAAGTTAACGCTAGTACTCAATAGCAATTAC
AGGTAGATGCAGTTTTTTCTGGTACCAATCTGTTTGTGGCAGCACCGAAGACTGGTGCACATATCCGATTT
GCAGTTTTACTATGATAAGTGTCTCCAGGGAATAGTTTCAATGTTTAAACGACTTTTGACGCTGTTTACCATG
AGGTTGACTGACATTTCACTGAATGTCAAAGACTGACTTTTAGATATGTCTAAGTCTTGTATCATGCCAA
GAGGGGGGAAAAAAGTCACTTGATAACAGTGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCCTGCCAGACTGGACT
ATTTGAAAACTTAGTGCTATGATCAAGAGGAATTTTAATTTCCCTGAACTGTCTGGGATTTGTGGACATA
GAGAATACTGCATCACTTGTAGTTGACAAGTTTTTTAGTAGCTATATGTTAAAAGAAAAAGAAAAACAA
ATAAAAAATGTTTCTATGTTTTGTAGGGAGTCTCTCAATAGATGGTTAGCGAAACAAGAGCAGGTCCAGAT
CGGTCAATTGACTGATTTGACTTTGTGACCTACCTGCCGTTGATCAGTATAGGCACATGATTAAGGCA

CAGCCCAAGCAGAAGTTGGATTGTCTATTTCAGACAGAGTATCCGGCGCTGCAAACGATTGTGTATCACT
CAAAAAAGATCAACGCAATCTTCGGGCCCTTTGTTTCAGTGAGCTGACAAGACAATTTGTTAGAGAGTGTGGA
CTCAAGTAGATTTCTCTTCTTCACAAGAAAACTCCGGAGCAGATTGAAGAGTTCTTTTCAGACCTCGAC
AGTCATGTTCCAATGGATATACTGGAGTTAGATATTTCAAAGTATGATAAGTCTCAAAATGAGTTCCTACT
GTGCTGTAGAGTATGAAAATCTGGAGAAGGCTAGGTTTTGAAGATTTTCTGGCGGAAGTGTGGAAGCAGGG
TCACAGGAAGACCCTTTAAAAAGATTACACCGCAGGTATTTAAACTTGTCTGTGGTACCAAAGGAAAAGT
GGCGACGTGACTACATTTATTTGGAAACACTGTGATAATTGCCGCCCTGTTTGGCCTCAATGTTACCCATGG
ATAAGGCAATCAAAGGTGCGTTTTGCGGAGATGATAGCTTGTCTATATTTCCCGAAGGGTGTGAACCTCC
AGACGTGCAGCAATGTGCAATTTAATGTGGAACCTCGAAGCAAACTGTACAGGAAAACATATGGGTAC
TTCTGTGGAAGTACGTACATACATCATGATAGAGGCTGCATTGTGTATTATGATCCTCTGAAGTTGATAT
CTAAACTCGGTGCTAAACACATCAAGGATAGAGAGCCTTAGAGGAGTTCAGGAGATCTCTATGTGATGT
TGCTAGTTCATTGAACAACCTGTGCGTATTACGGGCAGTTGGACGATGCTGTAGGGGAGGTTCCATAAGACC
GCCCCCTCTGGTTTCGTTTTGTTTTATAAAAAGTTTGGTTAAATTTCTTGTCTGATAAAAGTGTGTTTAGTTCGC
TGTTTTCTAGATGGCATTAGTAATTAAGAGTAGGGTCAATGTCAATGATTTTCAATTAATTTGTCAAATTTCTG
AAAAGTTCTTACCGTCTGTGATGACACCGGTTAAAAGTGTTAGAATCTCCAAAGTCGATAAGGTTTTAGC
TCGCGAGAACGAGTCTTGTCTGAAGTCGACTTGTGTAAGGGTGTCAAGCTAATCGAAGGTGGTTATGTT
TGTTTTGGCCGGTTTTAGTTGTGACCGGTGAGTGAACCTTCCAGATAAATGCGTCCGGTGGCGTTAGTGTCT
GTTTTGGTCGATAAAAAGAAATGAAAAGAGCAAATGAAGCTACCCTCGGGTCATACTACACTGGGGCTGCAAA
AAAGCGTTTTTCAGTTTAAAGGTGATTTCCCAATTTATAGTGTAAACGACCGATGATGCGAAGAAGGGTATTTGG
CAAGTTCTTGTAAACATTAAGGGTGTAAAAATGAGTGTGGATTCTGTCTCTTTCTTTAGAGTTTTGTGT
CTGTGTGCATAGTTTTTAAAAATAATATAAAAATTAGGTTTTGAGGGAGAAGATTACAAGGGTGACCGACAA
AGGACCTATAGAACTTTCCGAAGAAGTTGTAGATGAGTTCATAGAGGATGTTCCAATGGCGGCCAGGCTT
AGTAGTTTTTCGAACCAGATCTTCAAAAAGAGGTCGAAAAAGTTCTATAATAATAATAGGAGTAGCGATG
GTAGAAATAGTAATAATGGTGGCAAAGGGTTATACCCAAAGCCGGTAGGAAGGGTTGTAAGTAATAAGAT
GGTAAATGACGAGACCGAGTCAGCTGACGCGGAATCCGATTTCGTACTTTTTAAAATATGTCTTACACTGTC
AACTCTCCGTCGCAATTAGTATATCTTTCTGTCTGTCTGGGCTGATCCACAGACCTTTTTAAATTTGTGTA
CCAACTCGCTGGAAATCAGTTTCAGACTCAACAAGCAGAACACTACTGTTCAACAGCAGTTTAGCGATGT
CTGGAAACCGGTGCCCTCAGGCTGGTGTAAAGTTTCCCGAATAACGGTTTTAAAGTTTTATAGGTATAATGCT
GTTTTAGATCCTCTAATTAAGTCTTTGTTAGGTACTTTTTGATACCCGCAATAGAATAATAAGATTGAAA
ATCAGCAGAATCCCACAACCCGAGAAACGTTGGATGCAACCCGTAGGGTTGATGACGCAACTGTGGCAAT
AAGATCTGCAATAAATAATTTAGCTAATGAATTAGTGCGTGGCACAGGCATGTACAACCAGGCTTCTTTT
GAGAGCACGGCTGGACTTACTTGGACTACGACTCCTGCTTAGTTTTATGTATTGTAAAATTAATAAGGATT
TGTATCCGTAAGATACACGTGGTGCACAGATAGTGCATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGT
TGTGTTTTGGTACGCGCGGGTCAAATATATGTGGTTCACATATATCCGTAGGCACATAAAATGGCGTGGG
ATTCGAATTCCTCCGGAACCCCGGTAGGGGCCCA

1	CGTATTTTTT	ACTACAACAA	TTACCAACAA	CAAACAAACA	ACAACAACAT	TACATTACTT
61	TTAACAACATA	CAATGGCATA	CACACAAACC	GCGTCTTCCG	CCGCTTTGTT	AGACACAGTC
121	CGTGGTAACA	ATACCATGGT	CAACGATCTA	GCAAAGCGTC	GGTTGTACGA	CACAGCGGTA
181	GAGGAATTC	ATGCAAGGGA	CCGCAGGCC	AAGGTAAATT	TTTCCAAAGT	TGTAAGCGAA
241	GAACAGACGC	TTATAGCAAC	TAAGGCTTAC	CCCGAATTCC	AAATCACGTT	CTATAACACG
301	CAGAACGCCG	TCCATACTTT	GGCCGGCGGT	CTCCGATCTC	TAGAGTTAGA	GTATCTCATG
361	ATGCAAAATAC	CGTACGGTTC	ATTGACCTAT	GATATCGGCG	GGAATTTGCG	ATCACATCTG
421	TTCAAGGGCA	GGGACTATGT	TCATTGCTGC	ATGCCCAATC	TGGATGTCCG	CGACATAATG
481	CGGCACGAAA	GTCAGAAGGA	TAGTATCGAA	CTTTATCTGT	CAAGACTAGA	TAGGAGCAAG
541	AAGACCATT	CCGTTTTTCA	GAAGTCTGCT	TTTGAAAAAT	ATGCGGAGTG	CAAGGAGGAA
601	GTAGTCTGTC	ACGATACTTT	CCAAGCGTGT	AGGCATCGAC	AAGATGCATA	TACAGGAAGA
661	TGTATGCTA	TTGCTTTACA	TAGCATATAC	GACATTCCGG	CCGATGAGTT	CGGCGCGGCG
721	CTGCTTAGAA	AGAATGTACA	TGTATGTTAC	GCCGCTTTCC	ACTTTTCAGA	GGATCTTCTC
781	TTAGAAGATT	CGCACGCAA	TCTGGATGAG	ATCAATGCGT	GTTTTTCAAG	GGACGCGCAC
841	AAACTGTCTT	TTTCGTTTGC	TTCTGAGAGC	ACTTTAAATT	ATGTCCATAG	TTATAGTAAT
901	GTATTAAGT	ATGTGTGCAA	GACCTATTTT	CCAGCTTCCA	ATAGGGAAGT	GTATATGAAA
961	GAATTTTTAG	TTACTAGAGT	AAATACTTGG	TTTTGCAAAT	TTTCTAGAAT	AGATACTTTC
1021	TTGCTTTATA	AGGGTGTGGC	GCACAGGTCC	ACGGACTCAG	AGCAGTTCTA	TGCTGCAATG
1081	GGGGATGCAT	GGCACTATA	GAAGACTCTT	GCGATGTGTA	ATAGCGAGAG	AATCTTACTG
1141	GAAGATTCTT	CATCAGTTAA	TTATTGGTTT	CCAAAAATGA	AGGATATGGT	CATTGTGCCG
1201	TTGTTTCGACA	TTTCAATAGA	GACTAATAAG	AGAACACGCA	AGGAAGTCTT	AGTTTCAAAG
1261	GACTTTGTCT	ATACTGTTTT	GAATCACATC	AGGACATATC	AAGCCAAGGC	GCTTACGTAC
1321	ACCAATGTGC	TGTCTTTCGT	CGAATCAATT	CGTTCGAGGG	TCATAATCAA	CGGTGTTACA
1381	GCCCGATCTG	AATGGGATGT	GGACAAATCA	CTGCTGCAAT	CACTGTGCGAT	GACTTTCTTC

1441 TTACACACAA AGCTTGCGGT CTTAAAAGAT GATCTTATAA TAAGCAAGTT TACGTTAGGA
1501 ACGAAACCCCT TGACGCAGTA TGTATGGGAC GAAGTGACCA ATGCATTCCG TAATGCCTTT
1561 CCATCAATCA AAGAGAGATT AATAAACAGG CGTTTGATAA CAGTCTCTGA GCATGCTTTG
1621 GAAATAACGG TGCCAGATCT ATATGTGACT TTTCACGATA GACTGGTAAC CGAGTACAAG
1681 CAGTCTGTTG AAATGCCCGG TTTGGACATA AGGAAAAAGA TGGAAGAAAC TGAGGTGATG
1741 TACAACGCAC TGTCCGAGAT TTCCGTTCTG AAGAACTCCG ACAAGTTTGA CGTTGATGTT
1801 TTTTCCCAGA TGTGTAGCAC ACTTAATGTT GACCCAATGA CGGCCGCTAA AGTTATGGTA
1861 GCGGTGATGA GTAATGAGAG TGGGTTAACT CTTACTTTTG AAAGTCCGAC TGAAGCTAAC
1921 GTTGCTATGG CTTTGCAAGA TTCAGCAAGT GCTTCGGAAG GTGCTATTGT GGTGACCTCA
1981 AGGGATGTGG AAGAACCATC TATGAAGGGT TCTATGGCAA GAGGTGAGTT GCAGCTGGCC
2041 GGATTCACAG GTGATATAAC TGAGGCTTCC TTTACAAGGA ACGAGGAGAT TGAGTCTTTG
2101 GCGCAGTTCC ATATGGCAAC AGCAAGTTCG TTGATCAAAA AGCAGATGTG TTCGATAGTG
2161 TACACAGGGC CTCTTAAAGT TCAGCAAATG AAAAACTTTA TAGACTCCCT GGTAGCATCT
2221 CTCTCTGCTG CTGTCTCGAA TCTTGTGAAG ATCCTAAAGG ACGTGGCGGC CATCGACCTT
2281 GAAACCTGTC AAAAGTTTGG GGTCTTTGAT GTGAACTTGA AGAAGTGGCT TATAAGACCA
2341 TCCGCCAAGA ACCATGCATG GGGTGTGTGA GAGACTCATG AGAGGAAATA CCATGTGCGA
2401 CTTCTAGAGT ACAACGGTGG TGAGATTATC TGTGCTGAGA GTTGGAGAAG AGTAGCGGTG
2461 AGCGCTGAGA GTGTGGTTTA CTCTGATATG GCAAACTCA AACATTGAG GAGTATACTA
2521 CGGGATGGAG AACCGCACGT TAGTTCGGCT AAGGTTGTGC TGGTGGACGG AGTACCTGGA
2581 TGTGGAAAGA CTAAGGAGAT CTTATCAAAG GTCAACTTCG AAGAGGATCT GGTGCTAGTT
2641 CCCGGCAGGC AGGCCGCTGA GATGATCAGG AGGAGAGCAA ACTCAACAGG AGTGATAGTC
2701 GCTACTAAGG ACAACGTGAA GACCGTAGAT TCATTTATAA TGAATTACGG AAAGAGCGGT
2761 AGGGTCCAGT TCAAGAGGCT ATTCATAGAT GAGGGTCTAA TGCTGCACAC TGGCTGTGTG
2821 AATTTTCTTG TGTCTATGTC TTTGTGCGAT ATTGCATATG TCTATGGAGA CACACAACAA
2881 ATTCATACA TCAACAGAGT TACTGGTTTT CCGTACCCGG AGCATTTTTC CAAGTTGGAA
2941 GTGGACGAGG TGGAAACAAG GCGTATTACG CTGCGTTGTC CTGCTGATGT TACTTTCTTC
3001 TTGAATCAGA GGTACGACGG ACATGTAATG TGCACGTCTA GTGAGAAGCG TTCGGTAAGT
3061 CAAGAAATGG TTAAAGGTGC TGGGCCATT AATCCAGTTT CGAAACCAAT GGAGGGTAAG
3121 ATTCTCACTT TTACTCAGTT TGACAAGGAT GCTTTATTGT CAAGAGGTTA CAAAGATGTT
3181 CATACTGTGC ACGAGGTGCA AGGAGAAACT TACGCGGATG TGTCGCTGGT CAGGTTAACG
3241 CCTACGCCGG TTTCTATAAT TTCGCGTGAG AGTCCGCATG TGCTTGTAGC TTTGTCTAGA
3301 CATACAAGGT CTTTTAAATA CTACACAGTA GTTATGGATC CTTTAGTTAG CATAGTGCCT
3361 GATTTAGAGC AAGTTAGTAC TTTTCTGTTA GATATGTACA AAGTTAACGC TAGTACTCAA
3421 TAGCAATTAC AGGTAGATGC AGTTTTTTCT GGTACCAATC TGTTTGTGGC AGCACCGAAG
3481 ACTGGTGACA TATCCGATTT GCAGTTTTTAC TATGATAAGT GTCTCCCAGG GAATAGTTCA
3541 TTGTTTAAACG ACTTTGACGC TGTTACCATG AGGTTGACTG ACATTTCACT GAATGTCAAA
3601 GACTGCACTT TAGATATGTC TAAGTCTTGT ATCATGCCAA GAGGGGGGGA AAAAAGTCAC
3661 TTGATAACCAG TGGTACGAAC GGCGGCAGAA ATGCCTCGCC AGACTGGACT ATTGGAANAAC
3721 TTAGTGGCTA TGATCAAGAG GAATTTTAAAT TCCCCTGAAC TGCTGCGGAT TGTGGACATA
3781 GAGAATACTG CATCACTTGT AGTTGACAAG TTTTTTAGTA GCTATATGTT AAAAGAAAAA
3841 AGAAAACCAA ATAAAAATGT TTCTATGTTT TGTAGGGAGT CTCTCAATAG ATGGTTAGCG
3901 AAACAAGAGC AGGTCACGAT CGGTCAATTG ACTGATTTCC ACTTTGTCTGA CCTACCTGCC
3961 GTTGATCAGT ATAGGCACAT GATTAAGGCA CAGCCCAAGC AGAAGTTGGA TTTGTCTATT
4021 CAGACAGAT ATCCGGCGCT GCAAACGATT GTGTATCACT CAAAAAAGAT CAACGCAATC
4081 TTCGGGCCCTT TGTTCAGTGA GCTGACAAGA CAATTGTTAG AGAGTGTGGA CTCAAGTAGA
4141 TTTCTCTTCT TCACAAGAAA AACTCCGGAG CAGATTGAAG AGTTCTTTTT AGACCTCGAC
4201 AGTCATGTTT CAATGGATAT ACTGGAGTTA GATATTTCAA AGTATGATAA GTCTCAAAAT
4261 GAGTTCCACT GTGCTGTAGA GTATGAAATC TGGAGAAGGC TAGGTTTTGA AGATTTTCTG
4321 GCGGAAGTGT GGAAGCAGGG TCACAGGAAG ACCACTTTAA AAGATTACAC CGCAGGTATT
4381 AAAACTTGCT TGTGGTACCA AAGGAAAAGT GGCGACGTGA CTACATTTAT TGGAAACACT
4441 GTGATAAATG CCGCCTGTTT GGCCTCAATG TTACCCATGG ATAAGGCAAT CAAAGGTGCG
4501 TTTTGC GGAG ATGATAGCTT GCTATATTTT CCGAAGGGTT GTGAACTTCC AGACGTGCAG
4561 CAATGTGCGA ATTTAATGTG GAACTTCGAA GCAAACTGT ACAGGAAAAC ATATGGGTAC
4621 TTCTGTGGAA GGTACGTCAAT ACATCATGAT AGAGGCTGCA TTGTGTATTA TGATCCTCTG
4681 AAGTTGATAT CTAAACTCCG TGCTAAACAC ATCAAGGATA GAGAGCACTT AGAGGAGTTC
4741 AGGAGATCTC TATGTGATGT TGCTAGTTCA TTGAACAACCT GTGCGTATTA CGGGCAGTTG
4801 GACGATGCTG TAGGGGAGGT TCATAAGACC GCCCTCCTG GTTCGTTTGT TTATAAAAGT
4861 TTGGTTAAAT TCTTGTCTGA TAAAGTGTG TTTAGTTCCG TGTTCCTAGA TGGCATTAGT
4921 AATTAAGAGT AGGGTCAATG TCAATGATTT CATTAATTTG TCAAATCTG AAAAGTTCTT
4981 ACCGTCGTTG ATGACACCGG TTA AAAAGTGT TAGAATCTCC AAAGTGCATA AGGTTT TAGC
5041 TCGCGAGAAC GAGTCCTTGT CTGAAGTCGA CTTGCTGAAG GGTGTCAAGC TAATCGAAGG

5101 TGGTTATGTT TGT TTGGCCG GTTTAGTTGT GACCGGTGAG TGGAACCTTC CAGATAATTG
5161 CGTCGGTGGC GTTAGTGCT GTTGGTTCGA TAAAAGAATG GAAAGAGCAA ATGAAGCTAC
5221 CCTCGGGTCA TACTACACTG GGGCTGCAAA AAAGCGGTTT CAGTTTAAGG TGATTCCCAA
5281 TTATAGTGTA ACGACCGATG ATGCGAAGAA GGGTATTTGG CAAGTTCCTTG TTAACATTAA
5341 GGGTGTA AAA ATGAGTGCTG GATTCTGTCC TCTTCTTTA GAGTTTGTGT CTGTGTGCAT
5401 AGTTTTTAAA AATAATATAA AATTAGGTTT GAGGGAGAAG ATTACAAGG TGACCGACAA
5461 AGGACCTATA GAACTTCCG AAGAAGTTGT AGATGAGTTC ATAGAGGATG TTCCAATGGC
5521 GGCCAGGCTT AGTAGTTTTC GAACCAGATC TTCAAAAAGA GGTCCGAAAA AGTTCATAA
5581 TAATAATAGG AGTAGCGATG GTAGAAATAG TAATAATGGT GGCAAAGGGT TATACCCAAA
5641 GCCGGTAGGA AGGTTGTAA GTAATAAGAT GGTTAATGAC GAGACCGAGT CAGCTGACGC
5701 GGAATCCGAT TCGTACTTTT **AA**AAT**ATG**TTC TTACACTGTC AACTCTCCGT CGCAATTAGT
5761 ATATCTTTTCG TCTGCTTGGG CTGATCCCAC AGACCTTTTA AATTTGTGTA CCAACTCGCT
5821 TGGAAATCAG TTTCAGACTC AACAAAGCCAG AACTACTGTT CAACAGCAGT TTAGCGATGT
5881 CTGGAAACCG GTGCCTCAGG CTGGTGTAAG GTTCCCGAAT AACGGGTTTA AAGTTTATAG
5941 GTATAATGCT GTTTTAGATC CTCTAATTAC TGCTTTGTTA GGTACTTTTG ATACCCGCAA
6001 TAGAATAATA GAAGTTGAAA ATCAGCAGAA TCCCACAACC GCAGAAACGT TGGATGCAAC
6061 CCGTAGGGTT GATGACGCAA CTGTGGCAAT AAGATCTGCA ATAAATAATT TAGCTAATGA
6121 ATTAGTGCGT GGCACAGGCA TGTACAACCA GGCTTCTTTT GAGAGCACGG CTGGACTTAC
6181 TTGGACTACG ACTCCTGCTT **AG**TTTATGTA TTGTAAAATT AATAAGGATT TGTATCCGTA
6241 AGATACACGT GGTGCACACG ATAGTGCATA GTGTTTTTCC CTCCACTTAA ATCGAAGGGT
6301 TGTGTTTTGG TACGCGCGGG TCAAAATATAT GTGGTTCACA TATATCCGTA GGCACATAAA
6361 ATGGCGTGGG ATTCGAATTC CCCC GGAACC CCCGGTAGGG GCCCA

RdRp: 73-3424 nt

Rdrp full: 73-4926 nt

Stop débil: 3421-3423 nt

MP: 4910-5722 nt

CP: 5726-6202 nt

Secuencias de las proteínas expresadas por tres pautas de lectura abiertas del CPMoV-Sp
(Genbank: OQ920979.1)

1. RNA POLIMERASA RNA DEPENDIENTE

1	MAYTQTASSA	ALLDTRVRGNN	TMVNDLAKRR	LYDTAVEEFN	ARDRRPKVN	SKVVSEEQTL
61	IATKAYPEFQ	ITFYNTQNAV	HTLAGGLRSL	ELEYLMMQIP	YGSLTYDIGG	NFASHLTKGR
121	DYVHCCMPNL	DVRDIMRHES	QKDSIELYLS	RLDRSKKTIP	VFQKSAFEKY	AECKEEVVCH
181	DTFQACRHRQ	DAYTGRVYAI	ALHSIYDIPA	DEFGAALLRK	NVHVCYAAFH	FSEDLLEDS
241	HANLDEINAC	FSRDGDKLSF	SFASESTLNY	VHSYSNVLKY	VCKTYFPASN	REVYMKEFLV
301	TRVNTWFCKF	SRIDTFLLYK	GVAHRSTDSE	QFYAAMEDAW	HYKKTLMACN	SERILLEDSS
361	SVNYWFPKMK	DMVIVPLFDI	SIETNKRTRK	EVLVSKDFVY	TVLNHIRTYQ	AKALTYTNVL
421	SFVESIRSRV	IINGVTARSE	WDVDKSLQSS	LSMTFFLHTK	LAVLKDDLLI	SKFTLTKPL
481	TQYVWDEVNT	AFGNAFPSIK	ERLINRRLIT	VSEHALEITV	PDLYVTFHDR	LVTEYKQSV
541	MPGLDIRKKM	EETEVMYNAL	SEISVLKNSD	KFDVDVFSQM	CSTLNVDPM	AAKVMVAVMS
601	NESGLTLTFE	SPTEANVAMA	LQDSASASEG	AIVVTSRDVE	EPSMKGSMAR	GELQLAGFTG
661	DITEASFTRN	EEIESLAQFH	MATASSLIKK	QMCSIVYTG	LKVQQMKNFI	DSLVASLSAA
721	VSNLVKILKD	VAAIDLETCQ	KFGVFDVNLK	KWLIRPSAKN	HAWGVVETHE	RKYHVALLEY
781	NGGEIICAES	WRRVAVSAES	VVYSDMAKLK	TLRSILRDGE	PHVSSAKVVL	VDGVPCCGKT
841	KEILSKVNFE	EDLVLVPGRQ	AAEMIRRRAN	STGVIVATKD	NVKTVDSEFIM	NYGKSGRVQF
901	KRLFIDEGLM	LHTGCNVFLV	SMSLCDIAYV	YGDTQQIPYI	NRVTGFPYPE	HFSKLEVDEV
961	ETRRTILRCP	ADVTFFLNQR	YDGHVMCTSS	EKRVSQEMV	KGAGAINPVS	KPMEGKILTF
1021	TQFDKDALLS	RGYKDVHTVH	EVQGETYADV	SLVRLTPTPV	SIISRESPHV	LVALSRHTRS
1081	FKYYTVVMDP	LVSIVRDLEQ	VSTFLLDMYK	VNASTQXQLQ	VDAVFSGTNL	FVAAPKTGDI
1141	SDLQFYDYDK	LPGNSSLFND	FDAVTMLRLD	ISLNVKDCITL	DMSKSCIMPR	GGEKSHLIPV
1201	VRTAAEMPRQ	TGLENLVAM	IKRNFNSPEL	SGIVDIENTA	SLVVDKFFSS	YMLKEKRKPN
1261	KNVSMFCRES	LNRWLAKQE	VTIGQLTDFD	FVDLPAVDQY	RHMIIKAPKQ	KLDLSIQTEY
1321	PALQTIYVHS	KKINAIIFGPL	FSELTRQLE	SVDSSRFLFF	TRKTPEQIEE	FFSDLDHVP
1381	MDILELDISK	YDKSQNEFHC	AVEYEIWRRL	GFEDFLAEVW	KQGHRKTTLK	DYTAGIKTCL
1441	WYQRKSGDVT	TFIGNTVIIA	ACLASMLPMD	KAIKGAFCGD	DSLIFYPKGC	ELPDVQQCAN
1501	LMWNFEAKLY	RKTYGYFCGR	YVIHHRGCI	VYYDPLKLIS	KLGAHKIKDR	EHLEEFRRSL
1561	CDVASSLNNC	AYYQLDDAV	GEVHKTAPP	SFVYKSLVKF	LSDKVLFSSL	FLDGISN

2. PROTEÍNA DE MOVIMIENTO

1	MALVIKSRVN	VNDFINLSNS	EKFLPSLMT	VKSVRISKVD	KVLARENESL	SEVDLLKGVK
61	LIEGGYVCLA	GLVVTGEWNL	PDNCVGGVSV	CLVDKRMERA	NEATLGSYYT	GAAKKRFQFK
121	VIPNYSVTTD	DAKKGIWQVL	VNIKGVKMSA	GFCPLSLEFV	SVCIVFKNNI	KLGLREKTR
181	VTDKGPIELS	EEVVDEFIED	VPMAARLSSF	RTRSSKRGPK	KFYNNNRSSD	GRNSNNGGKG
241	LYPKPVGRVV	SNKMNDETE	SADAESDSYF			

3. PROTEÍNA DE CUBIERTA

1	MSYTVNSPSQ	LVYLSSAWAD	PTDLLNLCTN	SLGNQFQTQQ	ARTTVQQQFS	DVWKPVPQAG
61	VRFPNNGFKV	YRYNAVLDPL	ITALLGTFDT	RNRIIEVENQ	QNPTTAETLD	ATTRVDDATV
121	AIRSAINLNA	NELVRGTGM	NQASFESTAG	LTWTTTPA		

Anexo IX.

Alineamiento de secuencias completas de nucleótidos entre CPMMoV-Sp (ncbi reference sequence: OQ920979.1) y CPMMoV (ncbi reference sequence: MN164455.1).

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001 = CPMMoV (Genbank: MN164455.1)
# 2: EMBOSS_002 = CPMMoV (Genbank: OQ920979.1)
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
# Length: 6405
# Identity:      6356/6405 (99.2%)
# Similarity:   6356/6405 (99.2%)
# Gaps:         22/6405 (0.3%)
# Score: 31672.0
#=====
EMBOSS_001      1  -----accacaacaacaacaacaacaacat      28
                               |||
EMBOSS_002      1  cgtatTTTTtactacaacaattaccaacaacaacaacaacaacat      50
EMBOSS_001     29  tacattactTTTtaacaactacaatggcatacacacaaaccgcgtcttccg      78
                               |||
EMBOSS_002     51  tacattactTTTtaacaactacaatggcatacacacaaaccgcgtcttccg      100
EMBOSS_001     79  ccgctttgTtagacacagtcctggtaacaataccatggTcaacgatcta      128
                               |||
EMBOSS_002    101  ccgctttgTtagacacagtcctggtaacaataccatggTcaacgatcta      150
EMBOSS_001    129  gcaaagcgtcggTtTgtacgacacagcggtagaggaattcaatgcaagggga      178
                               |||
EMBOSS_002    151  gcaaagcgtcggTtTgtacgacacagcggtagaggaattcaatgcaagggga      200
EMBOSS_001    179  ccgcaggcccaaggTaaatTTTtccaaagTtGtaagcgaagaacagacgc      228
                               |||
EMBOSS_002    201  ccgcaggcccaaggTaaatTTTtccaaagTtGtaagcgaagaacagacgc      250
EMBOSS_001    229  ttatagcaactaaggcttaccCGaattccaaatcacgTtctataacacg      278
                               |||
EMBOSS_002    251  ttatagcaactaaggcttaccCGaattccaaatcacgTtctataacacg      300
EMBOSS_001    279  cagaacgcctccatactTTggccggcgtctccgatctctagagTtaga      328
                               |||
EMBOSS_002    301  cagaacgcctccatactTTggccggcgtctccgatctctagagTtaga      350
EMBOSS_001    329  gtatctcatgatgcaaataccgtacggTtcattgacctatgatatcggcg      378
                               |||
EMBOSS_002    351  gtatctcatgatgcaaataccgtacggTtcattgacctatgatatcggcg      400
EMBOSS_001    379  ggaatTtcGcatcacatctgtTcaaggGcagggactatgtTcattgctgc      428
                               |||
EMBOSS_002    401  ggaatTtcGcatcacatctgtTcaaggGcagggactatgtTcattgctgc      450
EMBOSS_001    429  atgcccaatctggatgtccgcgacataatgcggcaggaagTcagaagga      478
                               |||
EMBOSS_002    451  atgcccaatctggatgtccgcgacataatgcggcaggaagTcagaagga      500
EMBOSS_001    479  tagtatcgaactTTtatctgtcaagactagataggagcaagaagaccattc      528
                               |||
EMBOSS_002    501  tagtatcgaactTTtatctgtcaagactagataggagcaagaagaccattc      550
EMBOSS_001    529  ccgTTTTtcagaagTctgctTTTgaaaaatatgCGgagTgcaaggagaa      578
                               |||
EMBOSS_002    551  ccgTTTTtcagaagTctgctTTTgaaaaatatgCGgagTgcaaggagaa      600
```

EMBOSS_001	579	gtagtctgtcacgatactttccaaacgtgtaggcacgacaagatgcata	628
EMBOSS_002	601	gtagtctgtcacgatactttccaagcgtgtaggcacgacaagatgcata	650
EMBOSS_001	629	tacaggaagagtgtatgctattgctttacatagcatatacgacattccgg	678
EMBOSS_002	651	tacaggaagagtgtatgctattgctttacatagcatatacgacattccgg	700
EMBOSS_001	679	ccgatgagttcggcgggcgctgcttagaaagaatatacatgtatgttac	728
EMBOSS_002	701	ccgatgagttcggcgggcgctgcttagaaagaatgtacatgtatgttac	750
EMBOSS_001	729	gccgctttccacttttcagaggatcttctcttagaagattcgcacgcaaa	778
EMBOSS_002	751	gccgctttccacttttcagaggatcttctcttagaagattcgcacgcaaa	800
EMBOSS_001	779	tctggatgagatcaatgcgtgtttttcaagggacggcgacaaaactgtctt	828
EMBOSS_002	801	tctggatgagatcaatgcgtgtttttcaagggacggcgacaaaactgtctt	850
EMBOSS_001	829	tttcgtttgccttctgagagcactttaaattatgtccatagttatagtaat	878
EMBOSS_002	851	tttcgtttgccttctgagagcactttaaattatgtccatagttatagtaat	900
EMBOSS_001	879	gtattaaagtatgtgtgcaagacctattttccagcttccaataggggaagt	928
EMBOSS_002	901	gtattaaagtatgtgtgcaagacctattttccagcttccaataggggaagt	950
EMBOSS_001	929	gtatatgaaagaattttttagttactagagtaaatacttggttttgcaaat	978
EMBOSS_002	951	gtatatgaaagaattttttagttactagagtaaatacttggttttgcaaat	1000
EMBOSS_001	979	tttctagaatagatactttcttgctttataaggggtgtggcgacaggtcc	1028
EMBOSS_002	1001	tttctagaatagatactttcttgctttataaggggtgtggcgacaggtcc	1050
EMBOSS_001	1029	acggactcagagcagttctatgctgcaatggaggatgcatggcactataa	1078
EMBOSS_002	1051	acggactcagagcagttctatgctgcaatggaggatgcatggcactataa	1100
EMBOSS_001	1079	gaagactcttgcatgtgtaatagcgagagaatcttactggaagattcctt	1128
EMBOSS_002	1101	gaagactcttgcatgtgtaatagcgagagaatcttactggaagattcctt	1150
EMBOSS_001	1129	catcagttaattattggtttccaaaaatgaaggatattggtcattgtgccg	1178
EMBOSS_002	1151	catcagttaattattggtttccaaaaatgaaggatattggtcattgtgccg	1200
EMBOSS_001	1179	ttgttcgacatttcaatagagactaataagagaacacgcaaggaagtctt	1228
EMBOSS_002	1201	ttgttcgacatttcaatagagactaataagagaacacgcaaggaagtctt	1250
EMBOSS_001	1229	agtttcaaaggactttgtctatactgttttgaatcacatcaggacataatc	1278
EMBOSS_002	1251	agtttcaaaggactttgtctatactgttttgaatcacatcaggacataatc	1300
EMBOSS_001	1279	aagccaaggcgttacgtacaccaatgtgctgtccttcggtgaatcaatt	1328
EMBOSS_002	1301	aagccaaggcgttacgtacaccaatgtgctgtccttcggtgaatcaatt	1350
EMBOSS_001	1329	cgttcgagggtcataatcaacgggtgttacagcccgatctgaatgggatgt	1378
EMBOSS_002	1351	cgttcgagggtcataatcaacgggtgttacagcccgatctgaatgggatgt	1400
EMBOSS_001	1379	ggacaaatcactgctgcaatcactgtcgatgacttttcttcttacacaaa	1428
EMBOSS_002	1401	ggacaaatcactgctgcaatcactgtcgatgacttttcttcttacacaaa	1450

EMBOSS_001	1429	agcttgcggtctttaaagatgatcttataataagcaagtttacgtagga	1478
EMBOSS_002	1451	agcttgcggtctttaaagatgatcttataataagcaagtttacgtagga	1500
EMBOSS_001	1479	acgaaacccttgacgcagtatgtatgggacgaagtgaccaatgcattcgg	1528
EMBOSS_002	1501	acgaaacccttgacgcagtatgtatgggacgaagtgaccaatgcattcgg	1550
EMBOSS_001	1529	taatgcctttccatcaatcaaagagagattaataaacaggcgtttgataa	1578
EMBOSS_002	1551	taatgcctttccatcaatcaaagagagattaataaacaggcgtttgataa	1600
EMBOSS_001	1579	cagtctctgagcatgctttggaaataacggtgccagatctatatgtgact	1628
EMBOSS_002	1601	cagtctctgagcatgctttggaaataacggtgccagatctatatgtgact	1650
EMBOSS_001	1629	tttcacgataggctggtaaccgagtacaagcagtctggtgaaatgcccg	1678
		.	
EMBOSS_002	1651	tttcacgatagactggtaaccgagtacaagcagtctggtgaaatgcccg	1700
EMBOSS_001	1679	tttggacataaggaaaaagatggaagaaactgaggtgatgtacaacgcac	1728
EMBOSS_002	1701	tttggacataaggaaaaagatggaagaaactgaggtgatgtacaacgcac	1750
EMBOSS_001	1729	tgtccgagatctctgttctgaagaactccgacaagtttgacgttgatgtt	1778
		. .	
EMBOSS_002	1751	tgtccgagatctctgttctgaagaactccgacaagtttgacgttgatgtt	1800
EMBOSS_001	1779	ttttcccagatgtgtagcacacttaatggtgaccaatgatggccgctaa	1828
		. .	
EMBOSS_002	1801	ttttcccagatgtgtagcacacttaatggtgaccaatgatggccgctaa	1850
EMBOSS_001	1829	agttatggtagcgggtgatgagtaatgagagtgggttaactcttacttttg	1878
EMBOSS_002	1851	agttatggtagcgggtgatgagtaatgagagtgggttaactcttacttttg	1900
EMBOSS_001	1879	aaagtccgactgaagctaactgttgcctatggctttgcaagattcagcaagt	1928
EMBOSS_002	1901	aaagtccgactgaagctaactgttgcctatggctttgcaagattcagcaagt	1950
EMBOSS_001	1929	gcttcggaaggtgctattgtggtgacctcaagggatgtggaagaaccatc	1978
EMBOSS_002	1951	gcttcggaaggtgctattgtggtgacctcaagggatgtggaagaaccatc	2000
EMBOSS_001	1979	tatgaagggttctatggcaagaggtgagttgcagctggccgattcacag	2028
EMBOSS_002	2001	tatgaagggttctatggcaagaggtgagttgcagctggccgattcacag	2050
EMBOSS_001	2029	gtgatataactgaggcttcctttacaaggaacgaggagattgagtctttg	2078
EMBOSS_002	2051	gtgatataactgaggcttcctttacaaggaacgaggagattgagtctttg	2100
EMBOSS_001	2079	gcgcagttccatatggcaacagcaagttcgttgatcaaaaagcagatgtg	2128
EMBOSS_002	2101	gcgcagttccatatggcaacagcaagttcgttgatcaaaaagcagatgtg	2150
EMBOSS_001	2129	ttcgatagtgtacacagggcctcttaaagttcagcaaatgaaaaacttta	2178
EMBOSS_002	2151	ttcgatagtgtacacagggcctcttaaagttcagcaaatgaaaaacttta	2200
EMBOSS_001	2179	tagactccctggtagcatctctctctgctgctgtctcgaatcttgtgaag	2228
EMBOSS_002	2201	tagactccctggtagcatctctctctgctgctgtctcgaatcttgtgaag	2250
EMBOSS_001	2229	atcctaaaggacgtggcgccatcgaccttgaacctgtcaaaagtttgg	2278
EMBOSS_002	2251	atcctaaaggacgtggcgccatcgaccttgaacctgtcaaaagtttgg	2300

EMBOSS_001	2279	ggctctttgatgtgaacttgaagaagtggttataagaccatccgccaaga	2328
EMBOSS_002	2301	ggctctttgatgtgaacttgaagaagtggttataagaccatccgccaaga	2350
EMBOSS_001	2329	accatgcatgggggtgttagagactcatgagaggaaataccatggttgca	2378
EMBOSS_002	2351	accatgcatgggggtgttagagactcatgagaggaaataccatgtcgca	2400
EMBOSS_001	2379	cttctagagtacaacgggtggtgagatcatctgtgctgagagttggagaag	2428
EMBOSS_002	2401	cttctagagtacaacgggtggtgagattatctgtgctgagagttggagaag	2450
EMBOSS_001	2429	agtagcggtagcgctgagagtggttactctgatatggcaaaactca	2478
EMBOSS_002	2451	agtagcggtagcgctgagagtggttactctgatatggcaaaactca	2500
EMBOSS_001	2479	aaacattgagaagtatactacgggatggagaaccacacgtagttcggct	2528
EMBOSS_002	2501	aaacattgaggagtatactacgggatggagaaccgcacgtagttcggct	2550
EMBOSS_001	2529	aaggttgtgctggtggacggagtacctggatgtggaagactaaggagat	2578
EMBOSS_002	2551	aaggttgtgctggtggacggagtacctggatgtggaagactaaggagat	2600
EMBOSS_001	2579	cttatcaaaggtcaacttcgaagaggatctggtgctagttcccggcaggc	2628
EMBOSS_002	2601	cttatcaaaggtcaacttcgaagaggatctggtgctagttcccggcaggc	2650
EMBOSS_001	2629	aggccgctgagatgatcaggaggagagcaaaactcaacaggagtgatagtc	2678
EMBOSS_002	2651	aggccgctgagatgatcaggaggagagcaaaactcaacaggagtgatagtc	2700
EMBOSS_001	2679	gctactaaggacaacgtgaagaccgtagattcatttataatgaattacgg	2728
EMBOSS_002	2701	gctactaaggacaacgtgaagaccgtagattcatttataatgaattacgg	2750
EMBOSS_001	2729	aaagagcggtagggtccagttcaagaggctattcatagatgagggctcaa	2778
EMBOSS_002	2751	aaagagcggtagggtccagttcaagaggctattcatagatgagggctcaa	2800
EMBOSS_001	2779	tgctgcacactggctgtgtgaatcttctgtgctatgtctttgtgcat	2828
EMBOSS_002	2801	tgctgcacactggctgtgtgaatcttctgtgctatgtctttgtgcat	2850
EMBOSS_001	2829	attgcatatgtctatggagacacacaacaaattccatacatcaacagagt	2878
EMBOSS_002	2851	attgcatatgtctatggagacacacaacaaattccatacatcaacagagt	2900
EMBOSS_001	2879	tactggtttccgtaccggagcatttttccaagttggaagtggacgagg	2928
EMBOSS_002	2901	tactggtttccgtaccggagcatttttccaagttggaagtggacgagg	2950
EMBOSS_001	2929	tggaaacaaggcgtattacgctgcgttgcctgctgatgttactttcttc	2978
EMBOSS_002	2951	tggaaacaaggcgtattacgctgcgttgcctgctgatgttactttcttc	3000
EMBOSS_001	2979	ttgaatcagaggtagcagggacatgtaatgtgcacgtctagtgagaagcg	3028
EMBOSS_002	3001	ttgaatcagaggtagcagggacatgtaatgtgcacgtctagtgagaagcg	3050
EMBOSS_001	3029	ttcggtaagtcaagaaatggttaaagggtgctggcgccattaatccagtct	3078
EMBOSS_002	3051	ttcggtaagtcaagaaatggttaaagggtgctggcgccattaatccagtct	3100
EMBOSS_001	3079	cgaaaccaatgaagggttaagattctcacttttactcagtttgacaaggat	3128
EMBOSS_002	3101	cgaaaccaatgaagggttaagattctcacttttactcagtttgacaaggat	3150

EMBOSS_001	3129	gctttattgtcaagagggttacaagatgttcatactgtgcacgaggtgca	3178
EMBOSS_002	3151	gctttattgtcaagagggttacaagatgttcatactgtgcacgaggtgca	3200
EMBOSS_001	3179	aggagaaacttacgcggatgtgtcgctggtcaggttgacgcctacgccgg	3228
		.	
EMBOSS_002	3201	aggagaaacttacgcggatgtgtcgctggtcaggttaacgcctacgccgg	3250
EMBOSS_001	3229	tttctataatctcgctgagagtcgcgatgtgctttagctttgtctaga	3278
EMBOSS_002	3251	tttctataatctcgctgagagtcgcgatgtgctttagctttgtctaga	3300
EMBOSS_001	3279	catacaaggtccttttaatactacacagtagttatggatcctttagttag	3328
EMBOSS_002	3301	catacaaggtccttttaatactacacagtagttatggatcctttagttag	3350
EMBOSS_001	3329	catagtgcgtgatttagagcaagttagtagtctttctgtagatatgtaca	3378
EMBOSS_002	3351	catagtgcgtgatttagagcaagttagtagtctttctgtagatatgtaca	3400
EMBOSS_001	3379	aagttaacgctagtagtactcaatagcaattacaggtagatgcagtttttct	3428
EMBOSS_002	3401	aagttaacgctagtagtactcaatagcaattacaggtagatgcagtttttct	3450
EMBOSS_001	3429	ggtaccaatctgtttggcagcaccgaagactggtgacatatccgattt	3478
EMBOSS_002	3451	ggtaccaatctgtttggcagcaccgaagactggtgacatatccgattt	3500
EMBOSS_001	3479	gcagttttactatgataagtgtctcccaggaatagttcattgtttaacg	3528
EMBOSS_002	3501	gcagttttactatgataagtgtctcccaggaatagttcattgtttaacg	3550
EMBOSS_001	3529	actttgacgctgttaccatgaggttgactgacatttcactgaatgtcaaa	3578
EMBOSS_002	3551	actttgacgctgttaccatgaggttgactgacatttcactgaatgtcaaa	3600
EMBOSS_001	3579	gactgcacttttagatatgtctaagtcttgtatcatgccaaagagggggga	3628
EMBOSS_002	3601	gactgcacttttagatatgtctaagtcttgtatcatgccaaagagggggga	3650
EMBOSS_001	3629	aaaaagtcacttgataaccagtggtagcgaacggcggcagaaatgcctcgcc	3678
EMBOSS_002	3651	aaaaagtcacttgataaccagtggtagcgaacggcggcagaaatgcctcgcc	3700
EMBOSS_001	3679	agactggactattggaaaacttagtggctatgatcaagaggaattttaat	3728
EMBOSS_002	3701	agactggactattggaaaacttagtggctatgatcaagaggaattttaat	3750
EMBOSS_001	3729	tcccctgaactgtctgggattgtggacatagagaatactgcatcacttgt	3778
EMBOSS_002	3751	tcccctgaactgtctgggattgtggacatagagaatactgcatcacttgt	3800
EMBOSS_001	3779	agttgacaagtttttagtagctatatgttaaagaaaaagaaaaccaa	3828
EMBOSS_002	3801	agttgacaagtttttagtagctatatgttaaagaaaaagaaaaccaa	3850
EMBOSS_001	3829	ataaaaatgtttctatgtttttagggagtctctcaatagatgggttagcg	3878
EMBOSS_002	3851	ataaaaatgtttctatgtttttagggagtctctcaatagatgggttagcg	3900
EMBOSS_001	3879	aaacaagagcaggtcacgatcgggtcaattgactgattttgactttgtcga	3928
		.	
EMBOSS_002	3901	aaacaagagcaggtcacgatcgggtcaattgactgattttgactttgtcga	3950
EMBOSS_001	3929	cctacctgccgttgatcagtataggcacatgattaaggcacagccaagc	3978
EMBOSS_002	3951	cctacctgccgttgatcagtataggcacatgattaaggcacagccaagc	4000

EMBOSS_001	3979	agaagttggatttgtctattcagacagagtatccggcgctgcaaacgatt	4028
EMBOSS_002	4001	agaagttggatttgtctattcagacagagtatccggcgctgcaaacgatt	4050
EMBOSS_001	4029	gtgtatcactcaaaaaagatcaacgcaatcttcgggcctttgttcagtga	4078
EMBOSS_002	4051	gtgtatcactcaaaaaagatcaacgcaatcttcgggcctttgttcagtga	4100
EMBOSS_001	4079	gctgacaagacaattggttagagagtgtggactcaagtagatttctcttct	4128
EMBOSS_002	4101	gctgacaagacaattggttagagagtgtggactcaagtagatttctcttct	4150
EMBOSS_001	4129	tcacaagaaaaactccggagcagattgaagagttcttttcagacctcgac	4178
EMBOSS_002	4151	tcacaagaaaaactccggagcagattgaagagttcttttcagacctcgac	4200
EMBOSS_001	4179	agtcatgttccaatggatatactggagttagatatttcaaagtatgataa	4228
EMBOSS_002	4201	agtcatgttccaatggatatactggagttagatatttcaaagtatgataa	4250
EMBOSS_001	4229	gtctcaaaatgagttccactgtgctgtagagtatgaaatctggagaaggc	4278
EMBOSS_002	4251	gtctcaaaatgagttccactgtgctgtagagtatgaaatctggagaaggc	4300
EMBOSS_001	4279	taggttttgaagattttctggcggaagtgtggaagcaaggtcacaggaag	4328
EMBOSS_002	4301	taggttttgaagattttctggcggaagtgtggaagcaggggtcacaggaag	4350
EMBOSS_001	4329	accactttaaaagattacaccgcaggtattaaaacttgcttgtggtacca	4378
EMBOSS_002	4351	accactttaaaagattacaccgcaggtattaaaacttgcttgtggtacca	4400
EMBOSS_001	4379	aaggaaaagtggcgacgtgactacatttattggaacactgtgataattg	4428
EMBOSS_002	4401	aaggaaaagtggcgacgtgactacatttattggaacactgtgataattg	4450
EMBOSS_001	4429	ccgcctgtttggcctcaatgttacccatggataaggcaatcaaaggtgcg	4478
EMBOSS_002	4451	ccgcctgtttggcctcaatgttacccatggataaggcaatcaaaggtgcg	4500
EMBOSS_001	4479	ttttgcgagatgatagcttgcataatcccgaaggggttgaacttcc	4528
EMBOSS_002	4501	ttttgcgagatgatagcttgcataatcccgaaggggttgaacttcc	4550
EMBOSS_001	4529	agacgtgcagcaatgtgcaaatattgatgtggaacttcgaagcaaaactgt	4578
EMBOSS_002	4551	agacgtgcagcaatgtgcaaatattgatgtggaacttcgaagcaaaactgt	4600
EMBOSS_001	4579	acagaaaaacatatgggtacttctgtggaaggtacgtcatacatcatgat	4628
EMBOSS_002	4601	acagaaaaacatatgggtacttctgtggaaggtacgtcatacatcatgat	4650
EMBOSS_001	4629	agaggctgcattgtgtattatgatcctctgaagttgatatctaaactcgg	4678
EMBOSS_002	4651	agaggctgcattgtgtattatgatcctctgaagttgatatctaaactcgg	4700
EMBOSS_001	4679	tgctaaacacatcaaggatagagagcacttagaggagttcaggagatctc	4728
EMBOSS_002	4701	tgctaaacacatcaaggatagagagcacttagaggagttcaggagatctc	4750
EMBOSS_001	4729	tatgtgatgttgctagttcattgaacaactgtgcgatttacgggcagttg	4778
EMBOSS_002	4751	tatgtgatgttgctagttcattgaacaactgtgcgatttacgggcagttg	4800
EMBOSS_001	4779	gacgatgctgtaggggaggttcataagaccgccctcctggttcgtttgt	4828
EMBOSS_002	4801	gacgatgctgtaggggaggttcataagaccgccctcctggttcgtttgt	4850

EMBOSS_001	4829	ttataaaagtttggttaaattccttgtctgataaagtgtttagttcgt	4878
EMBOSS_002	4851	ttataaaagtttggttaaattccttgtctgataaagtgtttagttcgc	4900
EMBOSS_001	4879	tgtttctagatggcattagtagttaagagtagggccaatgtcaatgatt	4928
EMBOSS_002	4901	tgtttctagatggcattagtaattaagagtagggccaatgtcaatgatt	4950
EMBOSS_001	4929	cattaatttgtcaaattctgaaaagttcttaccgctggtgatgacaccgg	4978
EMBOSS_002	4951	cattaatttgtcaaattctgaaaagttcttaccgctggtgatgacaccgg	5000
EMBOSS_001	4979	ttaaaagtgttagaatctccaaagtcgataaaggttttagctcgcgagaac	5028
EMBOSS_002	5001	ttaaaagtgttagaatctccaaagtcgataaaggttttagctcgcgagaac	5050
EMBOSS_001	5029	gagtccttgtctgaagtcgacttactgaaggggtgcaagctaatacgaagg	5078
EMBOSS_002	5051	gagtccttgtctgaagtcgacttactgaaggggtgcaagctaatacgaagg	5100
EMBOSS_001	5079	tggttatgtttgtttggccggttagttgtgaccggtgagtggaaaccttc	5128
EMBOSS_002	5101	tggttatgtttgtttggccggttagttgtgaccggtgagtggaaaccttc	5150
EMBOSS_001	5129	cagataattgctgctggcggttagtgctgtttggctcgataaaagaatg	5178
EMBOSS_002	5151	cagataattgctgctggcggttagtgctgtttggctcgataaaagaatg	5200
EMBOSS_001	5179	gaaagagcaaatgaagctaccctcgggtcatactacactggggctgcaaa	5228
EMBOSS_002	5201	gaaagagcaaatgaagctaccctcgggtcatactacactggggctgcaaa	5250
EMBOSS_001	5229	aaagcggtttcagtttaaggtgattcccaattatagtgtaacgaccgatg	5278
EMBOSS_002	5251	aaagcggtttcagtttaaggtgattcccaattatagtgtaacgaccgatg	5300
EMBOSS_001	5279	atgcaagaagggtatttggcaagttcttgttaacattaaggggtgtaaaa	5328
EMBOSS_002	5301	atgcaagaagggtatttggcaagttcttgttaacattaaggggtgtaaaa	5350
EMBOSS_001	5329	atgagtgtctggattctgtcctcttctttagagtttgtgtctgtgtgat	5378
EMBOSS_002	5351	atgagtgtctggattctgtcctcttctttagagtttgtgtctgtgtgat	5400
EMBOSS_001	5379	agtttttaaaaataataaaaattaggtttgagggagaagattacaaggg	5428
EMBOSS_002	5401	agtttttaaaaataataaaaattaggtttgagggagaagattacaaggg	5450
EMBOSS_001	5429	tgaccgacaaaggacctatagaactttccgaagaagttgtagatgagttc	5478
EMBOSS_002	5451	tgaccgacaaaggacctatagaactttccgaagaagttgtagatgagttc	5500
EMBOSS_001	5479	atagaggatgttccaatggcgccagacttagtagttttcgaaccagatc	5528
EMBOSS_002	5501	atagaggatgttccaatggcgccagacttagtagttttcgaaccagatc	5550
EMBOSS_001	5529	ttcaaaaagaggtccgaaaaagttctataataataataggagtagcgatg	5578
EMBOSS_002	5551	ttcaaaaagaggtccgaaaaagttctataataataataggagtagcgatg	5600
EMBOSS_001	5579	gtagaaatagtaataatggtggcaaagggttatacccaaagccggtagga	5628
EMBOSS_002	5601	gtagaaatagtaataatggtggcaaagggttatacccaaagccggtagga	5650
EMBOSS_001	5629	agggttgtaagtaataagatgggttaatgacgagaccgagtcagctgacgc	5678
EMBOSS_002	5651	agggttgtaagtaataagatgggttaatgacgagaccgagtcagctgacgc	5700

EMBOSS_001	5679	ggaatccgattcgtacttttaaataatgtcttatactgtcaactctccgt	5728
EMBOSS_002	5701	ggaatccgattcgtacttttaaataatgtcttatactgtcaactctccgt	5750
EMBOSS_001	5729	cgcaattagtataatctttcgtctgcttgggctgatcccacagacctttta	5778
EMBOSS_002	5751	cgcaattagtataatctttcgtctgcttgggctgatcccacagacctttta	5800
EMBOSS_001	5779	aatttgtgtaccaactcgcttggaaatcagtttcagactcaacaagccag	5828
EMBOSS_002	5801	aatttgtgtaccaactcgcttggaaatcagtttcagactcaacaagccag	5850
EMBOSS_001	5829	aactactgttcaacagcagtttagcgatgtctggaaaccggtgcctcagg	5878
EMBOSS_002	5851	aactactgttcaacagcagtttagcgatgtctggaaaccggtgcctcagg	5900
EMBOSS_001	5879	ctgggtgtaaggttcccgaataacgggtttaagtttataggtataatgct	5928
EMBOSS_002	5901	ctgggtgtaaggttcccgaataacgggtttaagtttataggtataatgct	5950
EMBOSS_001	5929	gttttagatcctctaataactgctttgtaggtacttttgatacccgcaa	5978
EMBOSS_002	5951	gttttagatcctctaataactgctttgtaggtacttttgatacccgcaa	6000
EMBOSS_001	5979	tagaataatagaagttgaaaatcagcagaatcccacaaccgcagaaacgt	6028
EMBOSS_002	6001	tagaataatagaagttgaaaatcagcagaatcccacaaccgcagaaacgt	6050
EMBOSS_001	6029	tggatgcaaccgtagggttgatgacgcaactgtggcaataagatctgca	6078
EMBOSS_002	6051	tggatgcaaccgtagggttgatgacgcaactgtggcaataagatctgca	6100
EMBOSS_001	6079	ataaataattagctaatgaattagtgctggcagggcatgtacaacca	6128
EMBOSS_002	6101	ataaataattagctaatgaattagtgctggcagggcatgtacaacca	6150
EMBOSS_001	6129	ggcttcttttgagagcacggctggacttacttgactacgactcctgctt	6178
EMBOSS_002	6151	ggcttcttttgagagcacggctggacttacttgactacgactcctgctt	6200
EMBOSS_001	6179	agtttatgtattgtaaaattaataaggatttgtatccgtaagatacacgt	6228
EMBOSS_002	6201	agtttatgtattgtaaaattaataaggatttgtatccgtaagatacacgt	6250
EMBOSS_001	6229	ggtgcacacgatagtgcatagtgttttccctccacttaaatcgaaggggt	6278
EMBOSS_002	6251	ggtgcacacgatagtgcatagtgttttccctccacttaaatcgaaggggt	6300
EMBOSS_001	6279	tgtgttttggtacgcgcggtcaaatatatgtggttcacatatatccgta	6328
EMBOSS_002	6301	tgtgttttggtacgcgcggtcaaatatatgtggttcacatatatccgta	6350
EMBOSS_001	6329	ggcacataaaatggcgtgggattcgaattccccggaacccccggtaggg	6378
EMBOSS_002	6351	ggcacataaaatggcgtgggattcgaattccccggaacccccggtaggg	6400
EMBOSS_001	6379	gcca 6383	
EMBOSS_002	6401	gcca 6405	

BPEMV	599	agtagtctgccacgatactttccaacggtgtaagcatcgtcaggatgctt	648
		. .	
CPMMOV	600	agtagtctgtcacgatactttccaagcgtgtaggcatcgacaagatgcat	649
BPEMV	649	ataccggaagagtgtatgccattgctttgcatagcatatacgacattcca	698
		
CPMMOV	650	atacaggaagagtgtatgctattgctttacatagcatatacgacattccg	699
BPEMV	699	gcagacgagttcggcggcggcact-tttaaggaaag-atgtacatgtttgt	746
		
CPMMOV	700	gccgatgagttcggcggcggcgtgctta--gaaagaatgtacatgtatgt	747
BPEMV	747	tatgccgctttccacttttcagaagatccttctcctagaagactcacacgc	796
		
CPMMOV	748	tacgccgctttccacttttcagaggatccttctcctagaagattcgcacgc	797
BPEMV	797	gaatctcgatgaaatcaacgcggttttctcaagggatggcgataaattgt	846
		
CPMMOV	798	aaatctggatgagatcaatgcggtttttcaaggacggcgacaaactgt	847
BPEMV	847	cttttctttcgcacatctgagagtacccttaattatgtgcatagtttagt	896
		
CPMMOV	848	cttttctggttgcctctgagagcactttaaattatgtccatagttatagt	897
BPEMV	897	aatgtcttaagatggttgtaaaacttatttcccagcatctaatagaga	946
		
CPMMOV	898	aatgtatataagatggtgtgcaagacctatttccagcttccaatagggga	947
BPEMV	947	agtatatatgaaggagttttagttaccagggtcaatacctggttctgca	996
		
CPMMOV	948	agtgtatatgaaagaatttttagttactagagtaataacttggttttgc	997
BPEMV	997	agtttcttagaatagatactttctgtgtgtataagggtgtggcgcataga	1046
		
CPMMOV	998	aatttcttagaatagatactttctgtgtgtataagggtgtggcgcacagg	1047
BPEMV	1047	gccacggattctgagcagttttatgctgcaatggaggatgcatggcacta	1096
		
CPMMOV	1048	tccacggactcagagcagttctatgctgcaatggaggatgcatggcacta	1097
BPEMV	1097	caagaagacacttgcgatgtgcaatagtgagagaattctattggaggatt	1146
		
CPMMOV	1098	taagaagactcctgcatgtgtaatagcgagagaatccttactggaagatt	1147
BPEMV	1147	cttcgctgggttaactattggtttccgaagatgagagataggtcattgtg	1196
		
CPMMOV	1148	cttcatcagtttaattattggtttccaaaatgaaggataggtcattgtg	1197
BPEMV	1197	cctctctttgatatactttggagactaacaagagaaccgcaaggaggt	1246
		
CPMMOV	1198	ccgttgttcgacatttcaatagagactaataagagaacacgcaaggaagt	1247
BPEMV	1247	cttagtttcaaaggacttctgctacacgggtgctcaatcacataaggacat	1296
		
CPMMOV	1248	cttagtttcaaaggacttctgctatactgttttgaatcacatcaggacat	1297
BPEMV	1297	accaagcaaaggctttgacgtataccaatgttttgtctttcgtcgaatca	1346
		
CPMMOV	1298	atcaagccaaggccttacgtacaccaatgtgctgtccttcgtcgaatca	1347
BPEMV	1347	attcgttcgagagtcattataaacgggtgtaacggctcggctctgaatggga	1396
		
CPMMOV	1348	attcgttcgaggtcataataaacgggtgttacagcccgatctgaatggga	1397
BPEMV	1397	tgtagataagtcgctcctacaatcgttgtccatgactttttcttacaca	1446
		
CPMMOV	1398	tgtggacaaatcactgctgcaatcactgctcgtgacttttcttcttacaca	1447

BPEMV	1447	cgaaacttgcaactgaaggacgatcttatgatcagcaagtttacgcta	1496
		
CPMMOV	1448	caaagcttgccggtcttaaaagatgatcttataataagcaagtttacgcta	1497
BPEMV	1497	ggcactaaatcagtgctgcagatgtgtgggatgaagtcacaattgcatt	1546
		
CPMMOV	1498	ggaacgaaacccttgacgcagatgtatgggacgaagtgaccaatgcatt	1547
BPEMV	1547	tggcaacgcattcccatcaatcaaggaaagattgataaacaggcgtctca	1596
		
CPMMOV	1548	cggtaatgcctttccatcaatcaaagagagattaataaacaggcgtttga	1597
BPEMV	1597	taacagtttctgagcaggctttagaataacggttcccgacttatatgtg	1646
		
CPMMOV	1598	taacagtctctgagcatgctttggaaataacggtgccagatctatatgtg	1647
BPEMV	1647	acttttcacgataggttagtactgagtacaagcaatctggtgagatgcc	1696
		
CPMMOV	1648	acttttcacgatagactggtaaccgagtagacaagcagctctggtgaaatgcc	1697
BPEMV	1697	cggctctggatatacaggaagaagatggaagaaactgagcagatgtacaacg	1746
		
CPMMOV	1698	cggtttgacataaggaagaaagatggaagaaactgaggtgatgtacaacg	1747
BPEMV	1747	cattgtctgagatttctgttcttaagaattcggacaagttcgacgttgat	1796
		
CPMMOV	1748	cactgtccgagatttccggtctgaaaaactccgacaagtttgacgttgat	1797
BPEMV	1797	gttttttcccagatgtgtgacgctcaatggtgaccgatggtagcagc	1846
		
CPMMOV	1798	gttttttcccagatgtgtagcacacttaatggtgacccaatgacggccgc	1847
BPEMV	1847	taaggttatggtagctggtgtgagtaatgagagtggtcttactctgactt	1896
		
CPMMOV	1848	taaagttatggtagcgggtgatgagtaatgagagtggttaactcttactt	1897
BPEMV	1897	ttgagaaaccaactgaggctaattgtggctatggcactacaagattctgtc	1946
		
CPMMOV	1898	ttgaaagtccgactgaagctaactgtgctatggctttgcaagattcagca	1947
BPEMV	1947	agtgtctcgatggtgcaatggtttgacttcgagagatattgaagaacc	1996
		
CPMMOV	1948	agtgtctcggaaggtgctattgtggtgacctcaagggtatgtggaagaacc	1997
BPEMV	1997	ttctatgaagggttcaatggcaagaggtgagttgcaattcgctggtttga	2046
		
CPMMOV	1998	atctatgaagggttctatggcaagaggtgagttgcagctggccgattca	2047
BPEMV	2047	ctggtgatataacagaaacatcctttacaagaacgaggagattgagtcc	2096
		
CPMMOV	2048	caggtgatataactgaggcttctttacaaggaacgaggagattgagtct	2097
BPEMV	2097	ttggcgcagtttcacatggcaacagcaggttcggtgatcaaaaagcagat	2146
		
CPMMOV	2098	ttggcgcagttccatattggcaacagcaagttcgttgatcaaaaagcagat	2147
BPEMV	2147	gtgttcgatcgtgtacaca-ggcccttgaaagttcaacagatgaagaac	2195
		
CPMMOV	2148	gtgttcgatagtgtagacagggcctctt-aaagttcagcaaatgaaaaac	2196
BPEMV	2196	tatatagatagcctggtagcctcgctctctgctgctgtctcgaatctcgt	2245
		
CPMMOV	2197	ttatagactcctggtagcatctctctgctgctgtctcgaatcttgt	2246
BPEMV	2246	gaagatcctgaaggatactgcagctattgaccttgaaactagtcaagaagt	2295
		
CPMMOV	2247	gaagatcctaaaggacgtggcgccatcgaccttgaaacctgtcaaaagt	2296

BPEMV	2296	ttgggggtttttgatgtggccatgaagaagtggttaattaaccatctgcc	2345
		
CPMMOV	2297	ttgggggtctttgatgtgaactgaagaagtggttataagaccatccgcc	2346
BPEMV	2346	aagaatcatgcatggggagtcgctcgagactcaagagaggtcgtatcatgt	2395
		
CPMMOV	2347	aagaacctgcatgggggtgttagagactcatgagaggaaataccatgt	2396
BPEMV	2396	tgcacttctggagtacaatgggtcagagattgtgatgtgc-gagaattgg	2444
		
CPMMOV	2397	cgcaacttctagagtacaacgggtggtgagattat-ctgtgctgagagttgg	2445
BPEMV	2445	agaagaatcgcatgagcgtgaatcggtggtatactctgatatggcgaa	2494
		
CPMMOV	2446	agaagagtagcggtagcgtgagagtggtttactctgatatggcaaa	2495
BPEMV	2495	acttaagacactgagaggcttactgcgcaatggagaaccacatgtcagca	2544
		
CPMMOV	2496	actcaaacattgaggagtatactacgggatggagaaccgcacgttagtt	2545
BPEMV	2545	cagccaaggtagtgtctgtggacggagtagcaggtgtggttaagacgaag	2594
		
CPMMOV	2546	cgctaaggtgtgctggtggacggagtagcctggatgtggaagactaag	2595
BPEMV	2595	gagattctt-tctaaggtcaacttcgatgaggatttgatactcgtcccag	2643
		
CPMMOV	2596	gaga-tcttatcaaaggtcaacttcgaagaggatctggtgctagtcccg	2644
BPEMV	2644	gtaggcaagctgccaaatgatcagaagaagagcaaacgctactggaata	2693
		
CPMMOV	2645	gcaggcagggcgtgagatgatcaggaggagagcaaaccaacaggagtg	2694
BPEMV	2694	ctcgtggcaacaaaagataacgttcgcactgtagattcgttcataatgaa	2743
		
CPMMOV	2695	atagtcgctactaaggacaacgtgaagaccgtagattcatttataatgaa	2744
BPEMV	2744	ttacggtaagaacgcgagatgt-caattcaaaaggctgttcggttgatgag	2792
		
CPMMOV	2745	ttacggaaagagcggtag-ggtccagttcaagaggctattcatagatgag	2793
BPEMV	2793	ggtcttatgctgcacactgggtgtgtgaa-tttcttagtttcgatgtcac	2841
		
CPMMOV	2794	ggtctaattgctgcacactggctgtgtgaattttctt-gtgtctatgtctt	2842
BPEMV	2842	tgtgagcgttgcatatataatggtgacacgcaacagattccatacatc	2891
		
CPMMOV	2843	tgtgcatattgcatatgtctatggagacacacaacaaattccatacatc	2892
BPEMV	2892	aacagagttactggatttccgtaccgggaacacttttcgaagttggaagt	2941
		
CPMMOV	2893	aacagagttactggatttccgtaccgggagcattttccaagttggaagt	2942
BPEMV	2942	tgacgaagtgagacaagacgtacaacggtgctgtcggctgatgtca	2991
		
CPMMOV	2943	ggacgaggtggaacaaggcgtattacgctgctgtcctgctgatgtta	2992
BPEMV	2992	ctttcttcttgaatcagaagtacgaagggaagtgatgtgcacttcaagt	3041
		
CPMMOV	2993	ctttcttcttgaatcagaggtacgacggacatgtaagtgtgcacgtctagt	3042
BPEMV	3042	gagaagaggtctgttagtcaagagatggttaagggcgtgctgctattaa	3091
		
CPMMOV	3043	gagaagcgttcgtaagtcaagaatggttaaggtgctggcgccattaa	3092
BPEMV	3092	tcctgtctctaaaccaatgaaaggaaaaattctcacttttactcagtttg	3141
		
CPMMOV	3093	tccagtttcgaaaccaatggagggtaagattctcacttttactcagtttg	3142

BPEMV	3142	acaagatgcttctgtccagaggatgctgatgttcatacagtgcatt	3191
		
CPMMOV	3143	acaagatgcttctgtccagaggatgctgatgttcatacagtgcatt	3192
BPEMV	3192	gaagttcaaggagagacataccctgatgtttcgtcggttaggtagcgcc	3241
		
CPMMOV	3193	gaggtgcaaggagaaacttacgcgcatgtgtcgcctggtcaggttaacgcc	3242
BPEMV	3242	gacaccagtgtcgcatttgcaagggaaagtccgcagtggttagcgc	3291
		
CPMMOV	3243	taccggtttctataatttcgcgcatgtgtcgcctggttagcgc	3292
BPEMV	3292	tgtccaggcatacaaagtctttaaagtactacacagttagttatggatcct	3341
		
CPMMOV	3293	tgtctagacatacaaggctctttaaataactacacagttagttatggatcct	3342
BPEMV	3342	ttagttagttataattcgtgatttagagcagtaagtacttttcttttaga	3391
		
CPMMOV	3343	ttagttagttataattcgtgatttagagcaagttagtacttttcttttaga	3392
BPEMV	3392	tatgtacaaagtagatgctggtgtgcaatagcaattacaggtcgactcgg	3441
		
CPMMOV	3393	tatgtacaaagttaacgctagtactcaatagcaattacaggttagatgcag	3442
BPEMV	3442	tattttcaggacaaaatctcttcgtagc-----tgcca--	3474
		
CPMMOV	3443	tttttctggtaccaatctgtagcgcagcaccgaagactggtgacata	3492
BPEMV	3475	-----tgagttttactatgacaagtgtctccctggtaacagttcatt	3517
		
CPMMOV	3493	tccgatttgagttttactatgataagtgtctccagggaaatagttcatt	3542
BPEMV	3518	gtttaacgactttgacgctggtaccatgaagctgactgacatttctttaa	3567
		
CPMMOV	3543	gtttaacgactttgacgctggtaccatgaggtgactgacatttctttaa	3592
BPEMV	3568	atgtcaaagactgcacggtggtatgtcctaagtc-tgtggcacagcctag	3616
		
CPMMOV	3593	atgtcaaagactgcactttagatgtcctaagtcctgtatca-tgccaag	3641
BPEMV	3617	ag-----agaaggttgagcaccggtgattcccgtggtagaacggca	3659
		
CPMMOV	3642	agggggggaaaaagt-----cac--ttgatacagtggtacgaaagcgcg	3684
BPEMV	3660	gcagaaatgcctcgcagactggactattggaaaatttggttagctatgat	3709
		
CPMMOV	3685	gcagaaatgcctcgcagactggactattggaaaacttagtggttagctatgat	3734
BPEMV	3710	aaaaagaactttaactctccggagttatcaggattggtgacatagaga	3759
		
CPMMOV	3735	caagaggaattttaattcccctgaactgtctgggattggtgacatagaga	3784
BPEMV	3760	ataccgcgtcactttagttgataggtttttttagatgttatcatgcttaa	3809
		
CPMMOV	3785	atactgcatcactttagttgacaagtttttttagttagctatagttaaaa	3834
BPEMV	3810	gaaaaaagaaaacaaataaaaaatggttcaatgctcagggagtctctc	3859
		
CPMMOV	3835	gaaaaaagaaaacaaataaaaaatggttctatggtttagggagtctctc	3884
BPEMV	3860	taacagatggttagcgaagaacaggtcacgacgggtaattgactg	3909
		
CPMMOV	3885	caatagatggttagcgaagaacaggtcacgacgggtaattgactg	3934
BPEMV	3910	atctgactttggtttagttgacagcgggtgatcaatagacatagttat	3959
		
CPMMOV	3935	atctgactttggtttagttgacagcgggtgatcaatagacatagttat	3984

BPEMV	3960	aaggcacagccgaaacagagattggacttgtcaattcagactgagtacc	4009
CPMMOV	3985	aaggcacagcccaagcagaagttggatttgtctatcagacagagtacc	4034
BPEMV	4010	ggctctgcaaacgattgtgtatcattcgaagaagatcaacgcaatctttg	4059
		.	
CPMMOV	4035	ggcgtgcaaacgattgtgtatcactcaaaaaagatcaacgcaatcttcg	4084
BPEMV	4060	gtcctttgttcagtgagcttacaaggcagttactcgatagtagactct	4109
		.	
CPMMOV	4085	ggcctttgttcagtgagctgacaagacaattgtagagagtgtggactca	4134
BPEMV	4110	agcaggttcttcttcttactagaaaaactccggaacagattgaagaatt	4159
		. . .	
CPMMOV	4135	agtagatttcttcttctcacaagaaaaactccggagcagattgaagatt	4184
BPEMV	4160	cttttcagatctcgacagtcacgttccaatggatatcttgagtagatg	4209
CPMMOV	4185	cttttcagacctcgacagtcacgttccaatggatatacttgagtagata	4234
BPEMV	4210	tgtcaaagtatgacaagtcctcagaacgagtttactgtgctgttgagtac	4259
		.	
CPMMOV	4235	tttcaaagtatgataagtcctcaaatgagttccactgtgctgtagagtat	4284
BPEMV	4260	gaaatttggagaaggttaggatttgaagattttttggctgaagtttgaa	4309
		.	
CPMMOV	4285	gaaatctggagaaggttaggttttgaagattttctggcggaagtgtgaa	4334
BPEMV	4310	gcaagggcataggaaaaccaccttaaggattatacggcaggaataaaaa	4359
		. . .	
CPMMOV	4335	gcagggtcacaggaagaccactttaaagattacaccgcaggtattaaaa	4384
BPEMV	4360	cttgcttgtggtatcaaaggaagagtggtgacgtgactaccttatagga	4409
CPMMOV	4385	cttgcttgtggtaccaaaggaagtggtgacgtgactacatttattgga	4434
BPEMV	4410	aatacagtgataatcgccgcttctgctgcttcgatgttacctatggagaa	4459
		. .	
CPMMOV	4435	aacactgtgataattgccgcctgtttggcctcaatgttacctatggataa	4484
BPEMV	4460	ggtgatcaaaggtgctgttttgcgggatgacagtttactgtacttcccaa	4509
		.	
CPMMOV	4485	ggcaatcaaaggtgctgttttgcgggatgacagtttactgtacttcccaa	4534
BPEMV	4510	agggtgctgattttctgatgtgcaacaaagtgcaatttgatgtggaat	4559
		. . .	
CPMMOV	4535	agggttgtgaacttccagacgtgacgaatgtgcaatttaattgtggaac	4584
BPEMV	4560	ttcgaagcaaaaactgtaccgaaaacttatgggtacttctgtggaaggta	4609
CPMMOV	4585	ttcgaagcaaaaactgtacaggaaaacatattgggtacttctgtggaaggta	4634
BPEMV	4610	cgttatacatcatgatagaggctgtattgtatattacgatcccttaaagt	4659
		.	
CPMMOV	4635	cgtcatacatcatgatagaggctgcattgtgtattatgatcctctgaagt	4684
BPEMV	4660	tgatatcgaaaacttggtgctaaacacatcaaggatcgagagcacttagag	4709
		.	
CPMMOV	4685	tgatatctaaaactcggtgctaaacacatcaaggatagagagcacttagag	4734
BPEMV	4710	gagttcagaagatctctatgtgatgttgctagttcattgaacaactgtgc	4759
CPMMOV	4735	gagttcaggagatctctatgtgatgttgctagttcattgaacaactgtgc	4784
BPEMV	4760	gtattacggacagttggacgatgctgtaggggaggttcataagaccgcc	4809
CPMMOV	4785	gtattacggcagttggacgatgctgtaggggaggttcataagaccgcc	4834

BPEMV	4810	ctcctggttcgtttgtttataaaagtttagtcaagtttttgtctga----	4855
CPMMOV	4835	ctcctggttcgtttgtttataaaagtttggttaaattcttgtctgataaa	4884
BPEMV	4856	-----atggcaattgtagtaaaggataagg	4880
		
CPMMOV	4885	gtgttgtttagttcgctgtttctagatggcattagtaattaagagtaggg	4934
BPEMV	4881	tcaatgtcaatgatttcatcaacctgtcaaactcagaaaagtatcttccg	4930
CPMMOV	4935	tcaatgtcaatgatttcatcaatttgtcaaattctgaaaagt-----	4976
BPEMV	4931	tcaaactcagaaaagtatctt--ccgtcgttgatgacaccggttaagagtg	4979
CPMMOV	4977	-----tcttaccgtcgttgatgacaccggttaaaagtg	5009
BPEMV	4980	tgaggatttcaaaagtcgataaggttttagctcgcgagaacgagactttg	5029
		. . .	
CPMMOV	5010	ttagaatctccaaagtcgataaggttttagctcgcgagaacgagtccttg	5059
BPEMV	5030	tccgaagtcgacttgttgaaaggtgtaaattgattgagggtggttacat	5079
		.	
CPMMOV	5060	tctgaagtcgacttgtcgaaggggtgcaagctaatacgaaggtggtatgt	5109
BPEMV	5080	ttgcttagctggctcttgggtgaccggagaatggaaccttccagacaact	5129
		
CPMMOV	5110	ttgtttggccggttttagttgtgaccggtagtggaaccttccagataatt	5159
BPEMV	5130	gcaccgggtgtgagcgtctgtttggttgataaaaggatggaaagagca	5179
		.	
CPMMOV	5160	gcgtcggtggttagtctgtttggtcgtgataaaagaatggaaagagca	5209
BPEMV	5180	agtgaagcaactctcgggtcatattacactggtgctgcaaaaaagcggtt	5229
		. . .	
CPMMOV	5210	aatgaagctaccctcgggtcactacactggggctgcaaaaaagcggtt	5259
BPEMV	5230	tcagtttaaggtgaccccgaattacagtgtcacaaccgatgatgctaaga	5279
CPMMOV	5260	tcagtttaaggtgattccaattatagtgtaacgaccgatgatgcaaga	5309
BPEMV	5280	aaaatatatggcaggttcttgttaacattaaggtgttagaatgagtgcg	5329
		
CPMMOV	5310	agggtatttggcaagttcttgttaacattaaggggtgaaaaatgagtgt	5359
BPEMV	5330	ggtttctgtccgctttcttggaaatttgtgtctgtgtatagtttttaa	5379
		.	
CPMMOV	5360	ggattctgtcctcttctttagagtttgtgtctgtgtcatagtttttaa	5409
BPEMV	5380	aaataatataaaattgggtttgagggagaagattacaagagtaaccgacg	5429
CPMMOV	5410	aaataatataaaattaggtttgagggagaagattacaaggggtgaccgaca	5459
BPEMV	5430	ccgggcctatggaacttactgaagaagttggttgatgagttcatagagaat	5479
		
CPMMOV	5460	aaggacctatagaacttccgaagaagttgtagatgagttcatagaggat	5509
BPEMV	5480	gtcccgatggcggcaaggcttgaagatttcaaccaaactcctcaaaaac	5529
		. .	
CPMMOV	5510	gtccaatggcggccaggcttagtagtttcaaccagatcttcaaaaag	5559
BPEMV	5530	aggccgaaaaagttcgttaggaacagtagaga-tagtaaggtaga---	5575
CPMMOV	5560	aggccgaaaaagttctataataataatag-gagtagcgtggttagaata	5608
BPEMV	5576	agtaataat--ttgaacagaggggtccgtccaaagtttgaagaagagggg	5623
		. . .	

CPMMOV	5609	agtaataatggtgg--caaagggttatacccaaagccggttagga-aggg-	5654
BPEMV	5624	attgtgagtgataagttaattaatgacgagtcgagtc-gatagacgcg	5672
CPMMOV	5655	-ttgtaagtaataagatggttaatgacgagaccgagtcagct-gacgcg	5702
BPEMV	5673	attccgattcgtacttat-aattatgtcttatactgtcaactcacgctct	5721
CPMMOV	5703	aatccgattcgtacttttaaaatatgtcttacactgtcaactctccgtcg	5752
BPEMV	5722	cagcttgtgtatctctcgtccgcttgggctgaccaacggacttacttaa	5771
CPMMOV	5753	caattagtataatcttctcgtctgcttgggctgatcccacagaccttttaa	5802
BPEMV	5772	tttgtgtactaactcgcttggaaatcagtttcaaacacaacaggctagaa	5821
CPMMOV	5803	tttgtgtaccaactcgcttggaaatcagtttcagactcaacaagccagaa	5852
BPEMV	5822	caactgttcaacagcaattcagtgatgtgtggaagccgacgcctcaggcg	5871
CPMMOV	5853	ctactgttcaacagcagtttagcgatgtctggaacccggtgcctcaggct	5902
BPEMV	5872	ggtgtaagggtcccgctagcgggtttaaagtttataggtataatgctgt	5921
CPMMOV	5903	ggtgtaagggtccgaataacgggtttaaagtttataggtataatgctgt	5952
BPEMV	5922	cttagatcctcttattactgctttactaggtacttttgataaccgtaata	5971
CPMMOV	5953	tttagatcctctaattactgctttgtaggtacttttgataaccgcaata	6002
BPEMV	5972	gaataatagaagtcgaaaatcagcagaatccgacaaccgcagaaactc	6021
BPEMV	6003	gaataatagaagttgaaaatcagcagaatcccacaaccgcagaaacttg	6052
BPEMV	6022	gatgcaactcgtagagttgacgatgacgactgtggcaataagatctgcaat	6071
CPMMOV	6053	gatgcaaccgcgtagggtgatgacgcaactgtggcaataagatctgcaat	6102
BPEMV	6072	aaataattagctaataagagtttagtgcgtggaacagggatgtacaacaaa	6121
CPMMOV	6103	aaataattagctaatagaatttagtgcgtggcacagggcatgtacaaccagg	6152
BPEMV	6122	cctctttcgagagtatggccgacttacctggactactacacctccatca	6171
CPMMOV	6153	cttcttttgagagcagggctggacttacttggactacgactcctgc-tta	6201
BPEMV	6172	ggtta-gaattgtagaataataaatgatttgtatccataagatacacgt	6220
CPMMOV	6202	gtttatgtattgtaaaattaat-aaggatttgtatccgtaagatacacgt	6250
BPEMV	6221	ggtacacacgatagtgtatagtggttttccctccacttaaatacgaagggt	6270
CPMMOV	6251	ggtgcacacgatagtgcataagtggttttccctccacttaaatacgaagggt	6300
BPEMV	6271	agtgtcttggaaacgcgcggggtcaaatataagtggttcaacttatatccgta	6320
CPMMOV	6301	tgtgttttggtagcgcggggtcaaatataagtggttcacatatatccgta	6350
BPEMV	6321	ggcacgaaaaattgctggtggttcgaattcccccggaacccccggtaggg	6370
CPMMOV	6351	ggcacataaaattgctggtggttcgaattcccccggaacccccggtaggg	6400
BPEMV	6371	gcca 6375	
CPMMOV	6401	gcca 6405	
#	-----		
#	-----		

ANEXO XII.

Segregación de genotipos observada en la generación RC4-F3 (primera autofecundación del retrocruce 4) del programa de mejora genética a Tobamovirus por retrocruzamiento con selección asistida mediante marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia L3 (genotipos DP, IP) ó L4 (genotipos DG, IG). Se muestran descendencias de los distintos cruces efectuados para introducir el gen L3 (DxP, IxP) ó el gen L4 (DxG, IxG).

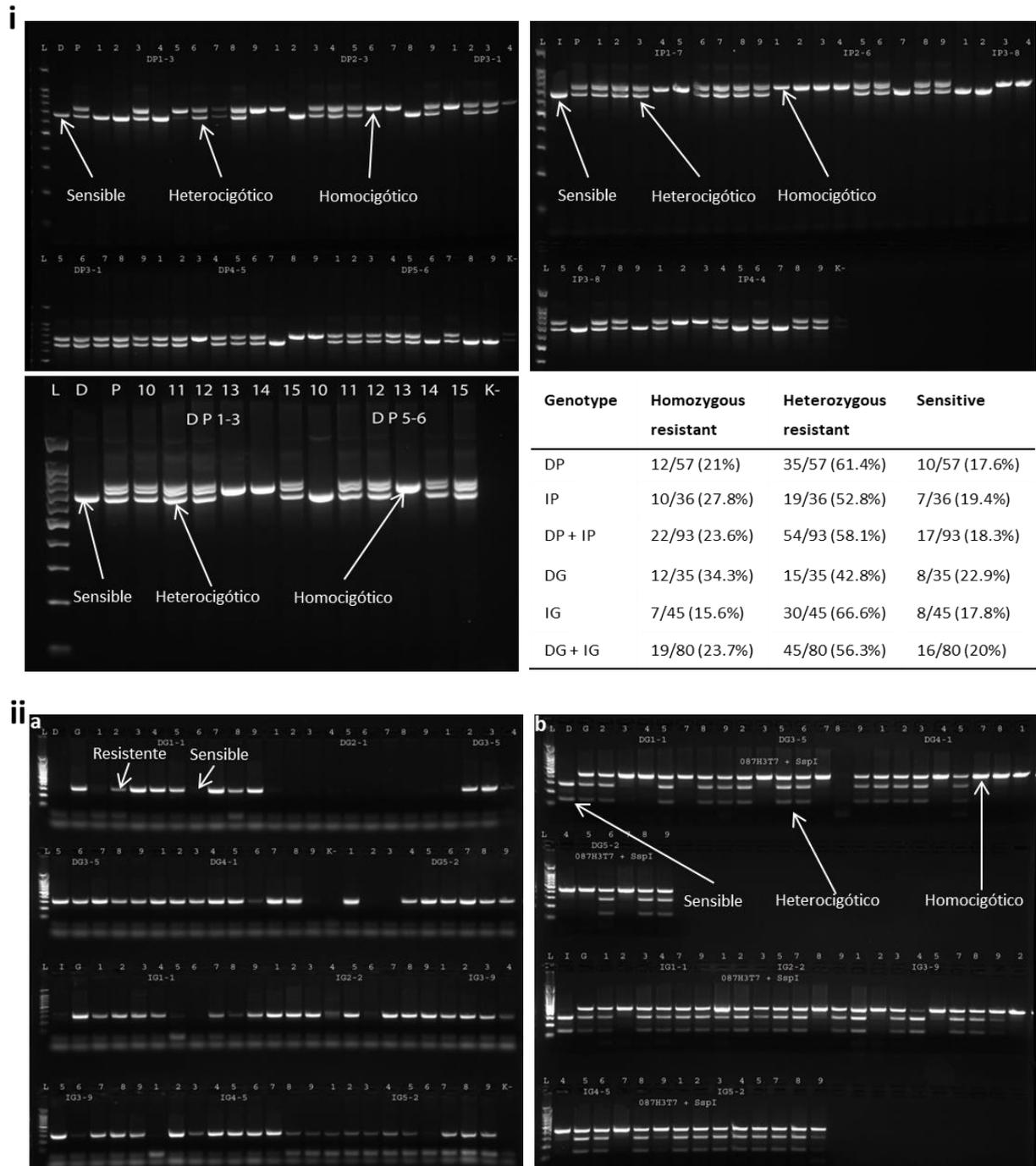
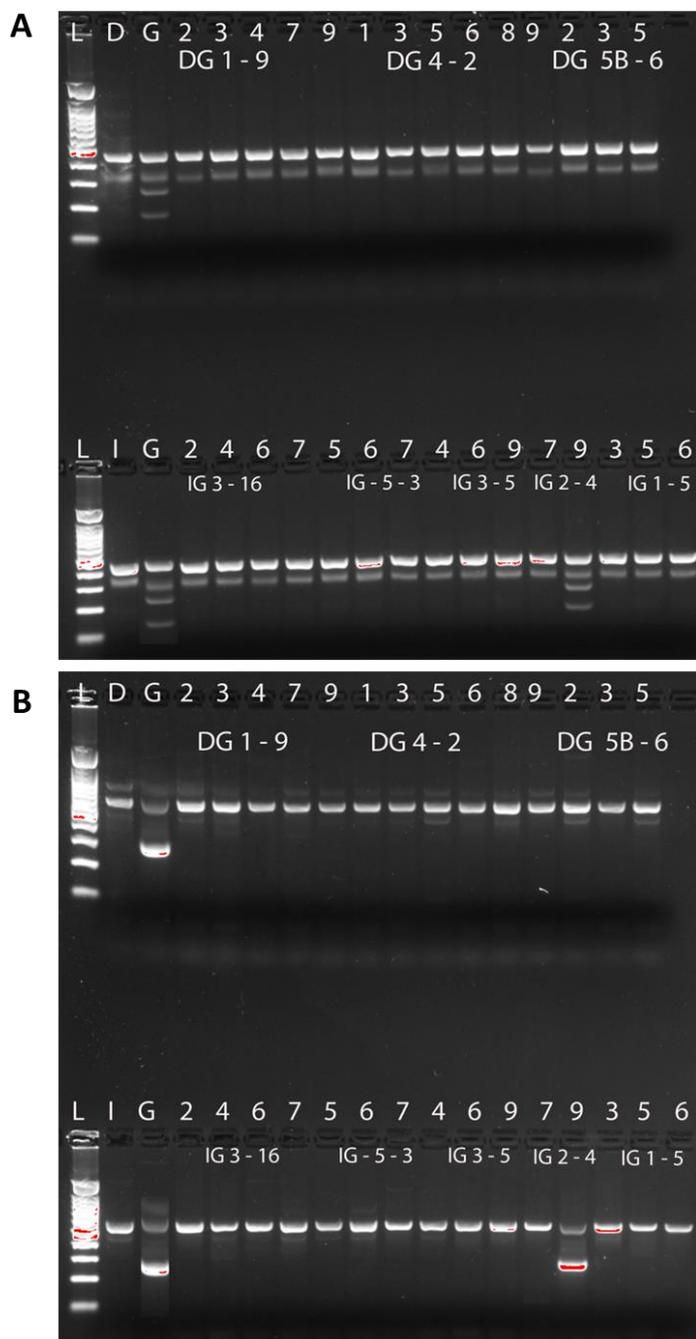


Figura de los resultados obtenidos mediante pruebas PCR en la generación RC4-F3 dentro del programa de mejora genética donde se detectan individuos resistentes tanto heterocigóticos como homocigóticos. Las evaluaciones se centraron en dos grupos de genotipos: i) Genotipos DP e IP: se analizaron cinco genotipos DP (DP1-3, DP2-3, DP3-1, DP4-5, DP5-6) y cuatro IP (IP1-7, IP2-6, IP3-8, IP4-4) usando el marcador codominante YB2A19, asociado al gen L3. En este caso, las plantas sensibles mostraron una banda de 660 pares de bases (pb), las resistentes heterocigóticas presentaron dos bandas de 750 y 660 pb, y las homocigóticas resistentes

una sola banda de más de 750 pb. ii) Genotipos DG e IG: se testaron cinco genotipos DG (DG1-1, DG2-1, DG3-5, DG4-1, DG5-2) y cinco IG (IG1-1, IG2-2, IG3-9, IG4-5, IG5-2) mediante: a) el marcador dominante L4SC340, asociado al gen L4, revelando en plantas resistentes una banda de 340 pb, mientras que las sensibles no mostraron amplificación. b) el marcador 087H3T7 (asociado al gen L4) + la enzima de restricción *SspI*, donde las plantas sensibles mostraron dos bandas (350 y 90 pb), las heterocigóticas resistentes tres bandas (440, 350, 90 pb) y las homocigotas resistentes una única banda de 440 pb. Adviértase que el genotipo DG2-1 no mostró amplificación en ninguna planta. Los términos 'D' e 'I' indican los cultivares sensibles "Derio" e "Ibarroria", respectivamente; 'P' se refiere a "Palermo", un cultivar heterocigoto para el gen L3 de resistencia; y 'G' a "Giulio", cultivar heterocigoto para el gen L4 de resistencia. La figura resalta los genotipos resistentes homocigotos, heterocigotos resistentes y sensibles en cada gel, con una mención especial en la sección iia sobre las plantas resistentes y sensibles para facilitar su identificación. En la tabla se muestran los porcentajes de cada genotipo en la generación segregante RC4-F3 resultante de distintos cruces efectuados en el programa de mejora genética para introducir el gen L3 (DxP, IxP) ó el gen L4 (DxG, IxG).

ANEXO XIII.

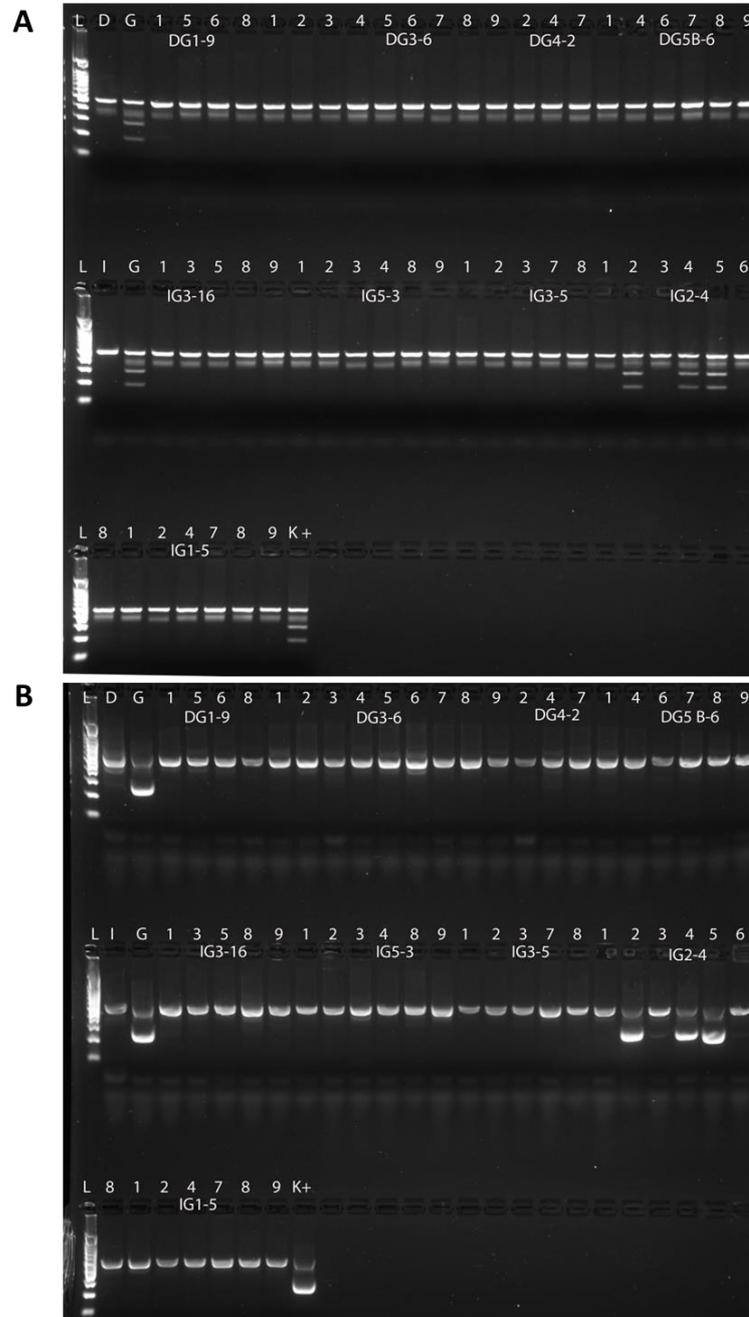
Segregación de genotipos observada en la generación RC3-F2 (retrocruce 3) del programa de mejora genética por retrocruzamiento con selección asistida mediante marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia L4, pvr4, tsw que confieren resistencia a Tobamovirus, PVY y TSWV, respectivamente. Se muestran descendencias de distintos cruces (DxG, IxG) efectuados para introducir el gen L4 (genotipos DG, IG).



Resultados obtenidos en plantas de la generación RC3-F2, que previamente habían mostrado marcador molecular asociado al gen de resistencia L4. A estas muestras se les aplicaron los marcadores moleculares: A) E41/M49 (CSO)(Caranta et al., 1999) asociado al gen de resistencia pvr4 que confiere resistencia al virus PVY una vez aplicado el enzima de restricción *HindIII*; B) SCAC568 (Moury et al., 2000) asociado al gen de resistencia tsw que confiere resistencia al virus TSWV una vez aplicado el enzima de restricción *XbaI*. Se observa que ambos genes de resistencia podrían estar ligados. Solamente se detectó una planta resistente a ambos virus en uno de los genotipos IG evaluados (IG2-4, planta 9). No se observó ninguna planta resistente en los demás genotipos evaluados.

ANEXO XIV.

Segregación de genotipos observada en la generación RC3-F2 (retrocruce 3) del programa de mejora genética por retrocruzamiento con selección asistida mediante marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia L4, pvr4, tsw que confieren resistencia a Tobamovirus, PVY y TSWV, respectivamente. Se muestran descendencias de distintos cruces (DxG, IxG) efectuados para introducir el gen L4 (genotipos DG, IG).



Resultados obtenidos en plantas de la generación RC3-F2 que previamente habían dado resultados negativos para el gen de resistencia L4 a Tobamovirus. A estas muestras se les aplicaron los marcadores moleculares: A) E41/M49 (CSO)(Caranta et al., 1999) asociado al gen de resistencia pvr4 que confiere resistencia al virus PVY una vez aplicado el enzima de restricción HindIII; B) SCAC568 (Moury et al., 2000) asociado al gen de resistencia tsw que confiere resistencia al virus tsw una vez aplicado el enzima de restricción XbaI. Se observa que ambos genes de resistencia podrían estar ligados. Solamente se detectaron plantas resistentes en uno de los genotipos IG evaluados (IG2-4). No se observó ninguna planta resistente en los demás genotipos evaluados.

ANEXO XV.

Protocolo de buenas prácticas culturales para reducir la incidencia de virus en hortícolas

Elaboración y difusión de protocolo de buenas prácticas culturales para reducir la incidencia de virus en hortícolas

Proyecto GOVARPIM

INNOVACIÓN EN PROCESOS PRODUCTIVOS DE PIMIENTO Y GUINDILLA MEDIANTE VARIETADES RESISTENTES Y NUEVOS PROTOCOLOS DE MANEJO EN CAMPO

NÚMERO DE EXPEDIENTE:
00004-COO2022-30

PROYECTO FINANCIADO POR PROGRAMA DE DESARROLLO RURAL DE EUSKADI. AYUDAS A LA COOPERACIÓN - PDR (M16) SEGÚN DECRETO 43/2017 (Presupuestos Generales de la C.A. de Euskadi. Convocatoria 2022)



Benkartakako, Landa Garapenean eta Turismoak Departamentua
Departamento de Innovación, Desarrollo Rural y Turismo



ÁREA VEGETAL
Gipuzkoako Foru Aldundia
Diputación Foral de Gipuzkoa

NEIKER

MEMBER OF
BASQUE RESEARCH
& TECHNOLOGY ALLIANCE



Gorbea E



Enbeita G



Arizmendi J, Otaño A, Argote L, Perez de Urabayen A



Arrizabalaga I, Etxeberria J



Zabala A, Feijoo A



Díez F, Urkola A



Ojinaga M, Ortíz-Barredo A, Larregla S

Jornada técnica de Horticultura
Difusión Resultados Proyecto GOVARPIM
Hotel Seminario Derio (BIZKAIA). 22-02-2024

Índice

- 1** Virus más importantes y forma de transmisión
- 2** Virus de contacto
 - Tobamovirus más importantes
 - Síntomas
 - Transmisión .
 - PepMV
- 3** Medidas preventivas para virus de contacto
 - Medidas previas al cultivo
 - Medidas preventivas durante el cultivo
- 4** Virus transmitidos por pulgón
 - PVY
 - CMV
- 5** Virus transmitidos por trips: Virus del bronceado (TSWV)
- 6** Virus transmitidos por mosca blanca: Virus de la cuchara del tomate (TYLCV)
- 7** Bibliografía

1. Virus más importantes y forma de transmisión

Son parásitos obligados que solo pueden multiplicarse en el interior de la célula vegetal hospedante utilizando sus mecanismos de reproducción y desarrollo (replicación, transcripción y traducción a proteínas):

- No existen métodos de lucha química
- No se dispone de agentes que permitan bloquear la adsorción y penetración del virus



Modos de transmisión:

- Por contacto
- Por semilla
- Organismos vectores
 - pulgones
 - trips
 - hongos de suelo
 - nemátodos

Otras características

- Gran número de plantas huéspedes
- Capacidad de mutar

Proceso epidemiológico complejo y que dificulta el control

Virus	Género	Transmisión	Huéspedes/Reservorios
Tobacco mosaic virus (TMV)	Tobamovirus	Contacto Semilla	Solanaceas (cultivos y malas hierbas) y restos de cosecha
Tomato mosaic virus (ToMV)	Tobamovirus		Solanaceas (cultivos y malas hierbas) y restos de cosecha
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	Tobamovirus		Solanaceas (cultivos) y restos de cosecha
Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)	Tobamovirus		Solanaceas (cultivos) y restos de cosecha
Chili pepper mild mottle virus (CPMMoV)	Tobamovirus		Solanaceas (cultivos, ornamentales como la calibrachoa) y restos de cosecha
Tomato brown rugous fruit virus (ToBRFV)	Tobamovirus		Solanaceas (cultivos) y restos de cosecha
Mosaico del pepino dulce (PepMV)	Potexvirus		Pepino, Solanaceas (sobre todo tomate)
Potato virus Y (PVY)	Potyvirus	Áfidos (pulgón)	Solanaceas, Physalis y Nicotiana spp. Malas hierbas: Solanum nigrum, Solanum sarrachoides, Erodium cicutarium, Geranium pusillum, Lactuca serriola, Lamium purpureum
Cucumber mosaic virus (CMV)	Cucumovirus		Plantago mayor, Taraxacum spp., Sonchus spp., Fallopia spp., Chenopodium álbum.
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Tospovirus	Trips	Amplio espectro/Solanaceas (cultivos, ornamentales y malas hierbas)
Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	Begomovirus	Mosca blanca	Solanaceas, Phaseolus vulgaris, Datura malva y Stramonium nicaeensis

1. Virus más importantes y forma de transmisión



2. Virus de contacto

Principales características

Sus principales formas de transmisión son por **semilla y por contacto**. Por el **roce** entre las plantas y por la **manipulación** que se ejerce sobre ellas durante las diferentes operaciones que se realizan a lo largo del cultivo (**entutorado, destallado, deshojado, recolección, eliminación de plantas**, o simplemente cuando se pasa entre las plantas rozándolas).

Géneros

Tobamovirus:

- **TMV**: Virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus).
- **ToMV**: Virus del mosaico del tomate (Tomato mosaic virus).
- **PMMoV**: Virus del mosaico suave del pimiento (Pepper Mild Mottle Virus).
- **TMGMV**: Virus del mosaico verde suave del tabaco (Tobacco Mild Green Mosaic Virus).

Potexvirus:

- **PepMV**: Virus del mosaico del pepino.

Síntomas



Fuentes primarias de infección:

- **Semillas procedentes de cultivos infectados y no tratadas** convenientemente. Estos virus infectan normalmente el tegumento de la semilla y por tanto son sensibles a los tratamientos.
- **El suelo** cuando ha sido infectado en cultivos anteriores.
- **Estructuras, herramientas, personal**, etc. procedentes de fincas contaminadas.
- **Restos de cosecha infectados**. Mantienen el virus desde varios meses hasta años, dependiendo de las condiciones ambientales. Estos restos de cosecha pueden infectar el nuevo cultivo.
- **Flora silvestre** que puedan actuar como reservorio de alguno de estos virus.

Otros transmisores

- *Bombus*.

5

2. Virus de contacto > Tobamovirus más importantes

Síntomas



ToMV: Mosaico en hojas y frutos



ToMV + TMGMV: Mosaico tipo aucuba y necrosis en hojas



ToMV: Guindilla cv. Ibarroria. Frutos coloraciones irregulares y desecaciones. Necrosis pedúnculo fruto.

6

2. **Virus de contacto**>Tobamovirus más importantes

Sintomas



ToMV + TMGMV: Guindilla cv. Ibarrioria. Necrosis en tallos



TMGMV: Pimiento cv. Derio. Mosaico suave en hoja



TMGMV: Pimiento. Necrosis y mosaico en hoja



PMMoV: Pimiento cv. Derio. Mosaico suave en hojas



PMMoV: Pimiento cv. Derio. Necrosis en hoja

7

2. **Virus de contacto**>Tobamovirus más importantes

Sintomas: Chili pepper mild mottle virus (CPMMoV)



CPMMoV: Pimiento de Gernika cv. Derio. Frutos engrosados y necrosis en hojas



CPMMoV: Pimiento de Gernika cv. Derio. Mosaicos en plantas de vivero



CPMMoV: Calibrachoa. Mosaicos en flores y hojas. Photo by Heidi Lindberg, MSU Extension
<https://www.canr.msu.edu/news/reduce-the-spread-of-chili-pepper-mild-mottle-virus>

8

2. *Virus de contacto*>CPMMoV

Recomendaciones realizadas por técnicos de la universidad de Michigan State para reducir incidencias de CPMMoV en viveros



Los productores deben adoptar un protocolo riguroso que incluye inspección, análisis en plantas, eliminación de material vegetal con síntomas y desinfección para prevenir la propagación de enfermedades y minimizar las pérdidas. A continuación, se presenta una guía detallada que pueden seguir:

- 1. Inspección:** Planifiquen con anticipación y tracen una ruta para moverse por el invernadero sin tocar plantas, macetas o superficies adicionales.
- 2. Toma de muestras:** Utilicen la cantidad de tejido vegetal especificada en cada kit de análisis.
- 3. Muestras compuestas:** Es posible agrupar muestras de varias plantas triturando pequeñas porciones de tejido foliar para una única prueba, lo cual permite evaluar más material por tira reactiva. Este método es útil para examinar plantas cercanas a otras ya infectadas, pero en caso de resultado positivo, será necesario hacer pruebas individuales para identificar las plantas afectadas. Recuerden marcar las plantas muestreadas.
- 4. Evitar la contaminación cruzada:** Usen guantes al manejar material vegetal y cámbienlos entre muestras para prevenir la contaminación cruzada. Si no es posible usar guantes, lávense las manos entre muestras.

5. Realización de pruebas: Sigán las instrucciones del kit analítico, especialmente en lo referente al tiempo de incubación de las tiras reactivas para interpretar correctamente los resultados.

6. Eliminación de plantas positivas: Desháganse de inmediato de las plantas que den positivo, incluyendo la planta, maceta, material vegetal, y demás, en bolsas de basura. La persona encargada de esta tarea debe cambiarse de ropa antes de volver a entrar a las áreas de producción.

7. Ser exhaustivos: Aunque no es posible analizar cada planta sintomática, es crucial eliminar todas las sospechosas una vez detectado el virus.

8. Gestión del riesgo: Eviten colocar plantas en observación con posibles hospedantes para prevenir la transmisión del virus.

9. Saneamiento: Los tobamovirus pueden persistir en superficies como macetas y herramientas, siendo fundamental la desinfección tras eliminar el material infectado. Utilicen desinfectantes efectivos y seguros.

10. Preparación para nuevos cultivos: No introduzcan nuevas plantas hasta completar todas las medidas de saneamiento. Mantengan prácticas de higiene estrictas al trasladarse entre diferentes áreas del vivero o explotación.

11. Vigilancia continua: Es importante mantener una vigilancia constante en los invernaderos con plantas infectadas, repitiendo el proceso de análisis y eliminación según sea necesario.

12. Limpieza final de temporada: Al finalizar la temporada, realicen una limpieza profunda de las áreas afectadas para empezar limpios el nuevo ciclo.

Este protocolo es esencial para mantener la salud de las plantas y la productividad del invernadero.

2. *Virus de contacto*>ToBRFV (Tomato brown rugous fruit virus)

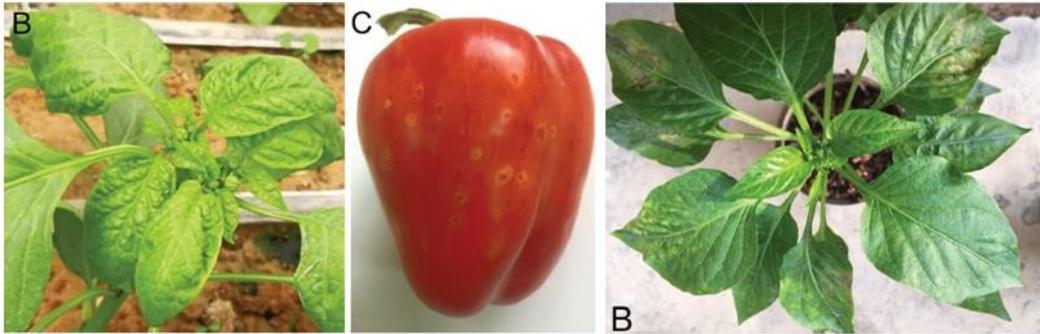
Síntomas en tomate



ToBRFV: Tomate. Síntomas de mosaicos, amarillos, necrosis y enrollado en hojas, necrosis en el tallo, mosaicos en frutos. (Fuente: Koppert)

2. *Virus de contacto*> ToBRFV (Tomato brown rugous fruit virus)

Sintomas en pimiento



ToBRFV: Pimiento. Rugosidad y necrosis en hojas. Manchas en frutos. (Fuente: Bananej et al., 2023)

Las variedades con genes de resistencia a Tobamovirus en pimiento (genes L) se muestran tolerantes a ToBRFV (Eldan et al., 2022)

11

2. *Virus de contacto*> ToBRFV (Tomato brown rugous fruit virus)

Recomendaciones

Debido a la importancia de la prevención en un virus tan peligroso como el rugoso del tomate, os añadimos un vídeo explicativo sobre síntomas y medidas preventivas (<https://www.youtube.com/watch?v=0Vyeley64tE>). Además, aquí os enumeramos las imprescindibles:

1. Prohibido introducir tomate ni otras plantas del exterior sin previos controles sanitarios.
2. No meter en la explotación cajas utilizadas con tomates que no sean nuestros. Si es posible, desinfectar las cajas antes de que entren en la explotación.
3. Prohibir la entrada al personal ajeno y en caso de que sea necesario imprescindible ir con bata, guantes, patucos y calzado desinfectado.
4. No visitar otras explotaciones y reducir el contacto entre explotaciones.
5. Desinfección de manos y pies a la entrada y salida del invernadero. Utilizar vados o alfombras de desinfección para los pies y alcohol/gel hidroalcohólico para manos.
6. Desinfectar ropa antes y después de su uso. Ropa exclusiva para el trabajo de invernadero.

12

2. **Virus de contacto**>PepMV (Virus del Mosaico del pepino dulce)

Síntomas



PepMV: Tomate. Amarilleo en hojas. Irregularidades en la maduración del fruto. Estrías amarillas en tallo y sépalos.

3. **Medidas preventivas para virus de contacto**

Medidas previas al cultivo

Medidas preventivas durante el cultivo

- Utilizar **semilla libre de virus**. Semilla desinfectada con **fosfato trisódico** (pimiento) o aplicando **termoterapia** (24 horas a 80°C en tomate; **Muy importante: Semillas bien secas previamente** (4 días-35°C para que no se “cuezan” durante la termoterapia a 80°C).
- Empleo de **plántulas sanas** procedentes de viveros autorizados y con garantía sanitaria.
- Evitar manosear las plantas.
- Restos de cosecha someter a procesos de **biofumigación-biosolarización** (Aportar mat. orgánica fresca y acolchar suelo durante 6 semanas).
- Si no se hace biofumigación-biosolarización, **arrancar las plantas** (incluyendo sistema radicular) y llevarlos a un punto limpio y/o vertedero.
- **Retirar restos vegetales** (hojas, tallos frutos) y **los plásticos** empleados durante el cultivo.
- **Reemplazar o desinfectar los plásticos, acolchado del suelo, tutores, anillas, tirantes e hilos,**...
- Rotaciones culturales.
- **Eliminar malas hierbas** dentro y fuera del invernadero.
- En cultivo hidropónico **reemplazar sacos infectados**. Limpiar los sacos de material vegetal y dejar secar el sustrato durante 6 semanas.
- **Desinfectar sistema de riego** con ácido nítrico pH 1-2 durante 24 horas.
- **Goterros** liberados de la materia orgánica que tengan y **desinfectados** a continuación.
- **Lavar la ropa** de trabajo en agua caliente.
- **Desinfectar herramientas:** 200°C durante 2 horas., Fosfato trisódico 10%, Hipoclorito sódico (lejía) 10% durante 30 minutos (mínimo).
- **Desinfectar todas las estructuras del invernadero** (3 semanas antes de la plantación). Primero con agua y después **con lejía** 5-10%, **fosfato trisódico** al 10% o con **ácidos orgánicos**. Enjuagar tras media hora con agua.
- **Desinfección con productos viricidas.**

3. Medidas preventivas para virus de contacto

Medidas previas al cultivo

Medidas preventivas durante el cultivo

- **Inspecciones periódicas.**
- **Marcar las zonas afectadas** por virosis y dejarlas para trabajar al final de la jornada (tanto recolección como otras labores).
- Si se confirma la infección de una **planta infectada, eliminarla rápidamente** junto con las plantas vecinas. Introducir las plantas en una bolsa de plástico y sacarlas del terreno sin sacar ninguna otra planta. Seguidamente los operarios deben cambiarse de ropa y guantes antes de continuar con otras labores. Designar un solo operario que trabaje la zona infectada. Si hay muchas plantas infectadas se eliminará la fila entera.
- **Evitar** que el **personal** venga de otras **fincas** que estén **contaminadas** de virosis. Usar ropa, guantes y zapatos de uso exclusivo para cada invernadero.
- Trabajar **avanzando por líneas** y manteniendo **siempre el mismo sentido de trabajo**.
- Aplicando **insecticidas no se controlan** los Tobamovirus.

Una vez se ha producido la entrada de un virus de contacto en el invernadero:

- **Limpiar** bien los invernaderos **entre cultivos, eliminando** todos los **restos vegetales y las malas hierbas**.
- Utilizar **variedades resistentes** si es que existen.
- Si no existen variedades resistentes **rotar con cultivos no susceptibles**.

15

4. Virus transmitidos por pulgón



Myzus Persicae

Aphis gossypii

Macrosiphum euphorbiae

Los virus transmitidos por pulgón son aquellos en los que su **forma de transmisión** principal en las plantas se produce a partir de **áfidos o pulgones** de forma **no persistente**. Destacan el virus **PVY** (Potyvirus) y el **CMV** (Begomovirus) por la importancia de los daños originados en diferentes cultivos hortícolas tanto en la producción como en calidad.

Síntomas (PVY y CMV)



PVY + CMV: Híbrido de guindilla. Defoliación, necrosis, y mosaico en hojas. Necrosis de nervios foliares y brotes.



TMGMV + CMV: Guindilla cv. Ibarrorria. Mosaico. Amarillos intensos sin necrosis.

Aspectos clave en el control de los virus

- Cultivares resistentes
- Monitoreo con trampas cromáticas
- Aceites minerales, Aceite de colza, soja,... → Repelencia/Toxicidad
- Cultivos de borde más altos (maíz, caña azúcar,...)
- Acolchados reflectantes
- Acolchados de paja
- Asociación cultivos o **intercropping**
- Mallas antiáfidos
- Banker con **parasitoides** en pulgones de cereal inocuos para hortícolas
- Productos repelentes de áfidos.

16

4. Virus transmitidos por pulgón

Acolchado paja



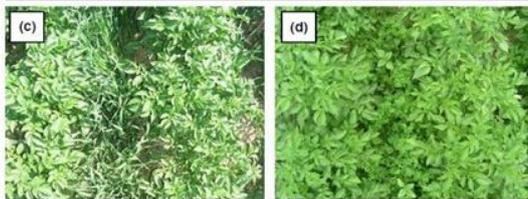
Cultivos borde más altos



Microtuneles malla antipulgón o agril



Intercroping



Aceites minerales y vegetales/ Substancias repelentes

17

5. Virus transmitidos por trips: Virus del bronceado (TSWV)



Frankliniella occidentalis.

Es un **virus polífago** que afecta a muchas especies, entre las que destacan el **pimiento, tomate, lechuga y ornamentales** (Impatiens, ciclamen, geranio,...).

Además, también afecta a muchas **plantas silvestres**.

El vector de esta enfermedad es *Frankliniella occidentalis*.

La transmisión es de tipo “**persistente circulativa propagativa**”

Síntomas

- **Pimiento:** **Necrosis** apical sobre todo en hojas más jóvenes. **Anillos cloróticos** después necróticos en hojas viejas, dibujos geométricos en arabesco. En fruto **manchas circulares** en forma de anillos y/o deformaciones.
- **Tomate:** El síntoma más característico es el **bronceado**. Pueden observarse también puntos o manchas necróticas que a veces afectan a los peciolos y tallos. Provoca reducción de crecimiento. En fruto se producen manchas irregulares.
- **Lechuga:** Pequeñas **manchas necróticas redondeadas** internerviales que se van extendiendo hasta afectar a gran parte de la hoja. Otras veces la necrosis se localiza principalmente en el cogollo central.
- **Ornamentales:** Síntomas muy variables de una especie a otra.



Control

El control ligado al de su agente transmisor.

Varietades resistentes

Medidas preventivas:

- **Mallas como barreras**

Para controlar el TSWV se recomiendan las siguientes medidas:

- En **semilleros** colocación de **trampas cromáticas** para detectar la presencia del vector y proteger los semilleros para evitar contaminaciones precoces.
- Si el **plantel** proviene de fuera de la explotación, **garantía de que esté libre de virus**.
- Durante el cultivo hay que **eliminar las malas hierbas** para evitar que los trips pasen desde ellas al cultivo.
- **Evitar cultivos asociados** que puedan presentar distinta sensibilidad a la plaga.
- Antes de la plantación de un nuevo cultivo eliminar vegetales que puedan constituir reservorio de la plaga.
- Colocación de trampas cromáticas para detectar precozmente presencia del vector.
- En cuanto se detecte **planta enferma arrancarla y quemar** el material vegetal para evitar la dispersión del virus.
- Otra forma de controlar las poblaciones de *Frankliniella occidentalis* es aplicar el **control biológico** aplicando ácaros del grupo de los fitoseidos (*Amblyseius*) e insectos del género **Orius**.
- **Plantas reservorio** fauna auxiliar autóctona.



18

5. *Virus transmitidos por trips: Virus del bronceado (TSWV)*



TSWV en pimiento cv. Derio. Anillos cloróticos y arabescos en hojas. Coloración irregular en frutos en forma de manchas circulares y anillos.



TSWV en lechuga. Manchas necróticas redondeadas internerviales que se van extendiendo ó necrosis en el cogollo central



TSWV en guindilla cv. Ibarroria. Anillos cloróticos y arabescos en hojas. Coloración irregular en frutos

5. *Virus transmitidos por trips: Virus del bronceado (TSWV)*



TSWV en frutos de tomate. Coloración irregular y anillos cloróticos.

6. Virus transmitidos por mosca blanca: Virus de la cuchara del tomate (TYLCV)

- Es uno de los virus más importantes en tomate
- Transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de una forma circulativa y persistente y por semilla.



Bemisia tabaci

Síntomas

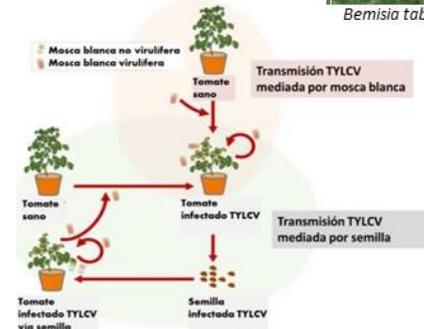
- Clorosis en los márgenes de las hojas
- parada del desarrollo
- enrollado de las hojas a lo largo del nervio principal,
- reducción de la lámina foliar,
- atrofia de la planta entera,
- abscisión de las flores
- desarrollo anormal de frutos



Encarsia formosa



Nesiodocoris tenuis



Ciclo de enfermedad del virus TYLCV (cultivos sensibles tomate y pimiento) en el que se muestra la transmisión mediada por mosca blanca (*Bemisia*) y mediada por semilla (demostrada muy recientemente) (Fuente: Kil et al., 2016)

Control

- **Varietades resistentes**
- **Control del vector**
 - Medidas **culturales**: Acolchados plásticos, barreras físicas, plantas libres de virus, manejo malas hierbas (hospedantes virus y mosca blanca),...
 - Medidas **químicas**
 - Medidas **biológicas**

21

7. Bibliografía

- Kil, E.J., Kim, S., Lee, Y.J. et al. *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. Sci Rep* 6, 19013 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep19013>
- Bananej, K., Keshavarz, T., da Silva, J.P.H. et al. Isolation and whole-genome sequencing of tomato brown rugose fruit virus from pepper in Iran. *J Plant Dis Prot* 131, 49–55 (2024). <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00813-w>
- Luria, N.; Klap, C.; Lachman, O.; Bakelman, E.; Belausov, E.; Smith, E.; Dombrovsky, A. Pepper Plants Harboring L Resistance Alleles Showed Tolerance toward Manifestations of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Disease. *Plants* 2022, 11, 2378. <https://doi.org/10.3390/plants11182378>
- Pappu HR, Jones RAC, Jain RK. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 2009; 141:219–236. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009>
- Rotenberg D, Jacobson AL, Schneweis DJ, Whitfield AE. Thrips transmission of tospoviruses. *Curr Opin Virol.* 2015; 15: 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003>.
- Blanchard A, Rolland M, Jacquot E, Ouest A. Potato virus Y: A century of evolution. *Curr. Top. Virol.* 2008; 7:21–32.
- Janzac B, Fabre MF, Palloix A, Moury B. Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathol.* 2008; 58:443–449. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0132-8>
- Kenyon L, Kumar S, Tsai WS, Hughes, JA. Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Adv Virus Res.* 2014; 90, 297–354. doi:10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8
- Catlin N, Daughtrey M. Chili Pepper Mild Mottle Virus (CPMMoV). (2022). e-GRO Alert

Links:

<https://www.canr.msu.edu/news/reduce-the-spread-of-chili-pepper-mild-mottle-virus>

<https://www.youtube.com/watch?v=0Vyeley64tE>

22

ANEXO XVI.

Inscripción de variedades resistentes a Tobamovirus en el registro de variedades comerciales y protegidas



MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OEVV)

O F I C I O

S/REF.:
N/REF.:
FECHA: 29 de octubre de 2021
ASUNTO: Solicitud inscripción RVC

NEIKER A.B. INSTITUTO VASCO DE
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGRARIO
CL BERREAGA 1
48160 DERIO (BIZKAIA)

Se adjunta/n el/los duplicado/s de las solicitud/es de inscripción que Vds. han presentado en el Registro de Variedades Comerciales, correspondiente/s a la/s variedad/es que a continuación se relaciona/n:

<u>NRVC</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>VARIEDAD</u>	<u>REFERENCIA OBTENTOR</u>
20210348	PIMIENTO	GUDARI	DP4-9

El material a entregar, condiciones del mismo y lugar de envío puede consultarlo en el siguiente vínculo:

https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/rvc-especiesfechascantidadescondicionesycentrosdeensayoactualizado-julio2021_tcm30-565966.pdf

La falta de entrega del mismo sin justificar conllevará la caducidad del expediente a los 90 días.

El plazo máximo para resolver los expedientes es el fijado con carácter general en los artículos 21.2 y 22 de la Ley 39/2015 PAC, y el fijado en el artículo 21 de la Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos (BOE 27.07.2006). No obstante este plazo se interrumpirá hasta la finalización de los ensayos de identificación y de valor agronómico cuando así se establezca en el correspondiente Reglamento de Inscripción, volviendo a contar a partir del trámite de audiencia

NOTAS: Se informa que, de acuerdo con el artículo 14.2 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, están obligados a presentar las solicitudes de inscripción en el Registro de Variedades Comerciales, a través de la Sede Electrónica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), los solicitantes que tengan su Sede Social fuera del territorio nacional. En la siguiente dirección: https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/procedimientos-intermedio?theme_id=2

Pago de tasas:

El devengo se producirá en el momento de la entrega del material vegetal objeto de examen, según lo indicado en los artículos 54 y 55 de la Ley 30/2006. El formulario del pago de tasas se descargará de la Sede Electrónica, en la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/navProcedimientoPagoTasas>. El pago de las mismas se podrá realizar bien de forma presencial (cumplimentando Modelo 790 código 84 y realizando el pago en Banco o Caja) o de forma telemática.

El/los duplicado/s de la/s solicitud/es de inscripción a que hace referencia este documento se envía/n por correo electrónico si dichas solicitudes han pasado por la CCAA o a través de la Sede Electrónica del Mº si éste ha sido el medio de solicitud.

LA JEFA DE ÁREA DEL REGISTRO DE VARIEDADES

Fdo.: Nuria Urquía Fernández

CORREO ELECTRÓNICO:
MPAyOEVV@mapa.es

OEVV
Oficina Española
de Variedades Vegetales

C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.88.59
FAX: 91 347.67.03

Código seguro de Verificación : GEN-fd53-620c-dd1d-2742-a0e2-e056-aeab-116c | Puede verificar la integridad de este documento en la siguiente dirección : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consulta...>

CSV : GEN-fd53-620c-dd1d-2742-a0e2-e056-aeab-116c

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 29/10/2021 10:02 | Sin acción específica





MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OE/V)

O F I C I O

S/REF.:
N/REF.: JASM
FECHA: 29 de octubre de 2021
ASUNTO: Solicitud TOV PIMIENTO

NEIKER A.B. INSTITUTO VASCO DE
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO
CL BERREAGA 1
48160 DERIO (BIZKAIA)

Se adjuntan los duplicados de las solicitudes de inscripción que Vds. han presentado en el Registro de Variedades Protegidas, correspondientes a las variedades que a continuación se relacionan:

<u>NRVP</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>VARIEDAD</u>	<u>REFERENCIA OBTENTOR</u>
20215653	PIMIENTO	GUDARI	DP4-9

El material requerido para los ensayos de identificación, la fecha límite de presentación de dicho material y la dirección donde debe entregarse puede consultarse en el siguiente enlace:

https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/rvp-especiesfechascantidadescondicionesycentrosdeensayoactualizado-julio2021_tcm30-565968.pdf

La entrega de material sólo se realizará una vez.

Antes del envío es conveniente ponerse en contacto con D. Francisco Edo, responsable de la especie, para que tenga constancia del material que va a llegar.

Teléfono: 96 307 96 04/03
Correo electrónico: cevalencia@inia.es

La falta de entrega no justificada de dicho material dará lugar a la caducidad del expediente a los tres meses.

El plazo máximo para resolver los expedientes es el fijado en el artículo 45 de la Ley 3/2000, de 7 de enero, de Régimen Jurídico de la Protección de las Obtenciones Vegetales.

Se le recuerda la necesidad del envío de un informe emitido por la Oficina Española de Patentes y Marcas, relativo a la identidad y parecido de las denominaciones con marcas solicitadas o registradas (Art. 48 Ley 3/2000 – BOE 10-1-2000) que les será entregado previo pago de la tasa correspondiente e indicación del motivo por el que se precisa dicho informe.

Dicho informe se podrá solicitar una vez que la denominación asignada a la variedad sea aprobada provisionalmente por este Registro, la cual tendrá carácter definitivo cuando se le conceda el Título de Obtención Vegetal y éste sea publicado en el BOE.

CORREO ELECTRÓNICO:

MPAyOE/V@mapa.es

OE/V
Oficina Española
de Variedades Vegetales

C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.68.69
FAX: 91 347.67.03

CSV : GEN-8969-7788-9adf-dcee-0130-3f96-d7f3-dc1d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 29/10/2021 10:02 | Sin acción específica





MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OE/V)

NOTAS: Se informa que, de acuerdo con el artículo 14.2 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, están obligados a presentar las solicitudes de inscripción en el Registro de Variedades Comerciales, a través de la Sede Electrónica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), los solicitantes que tengan su Sede Social fuera del territorio nacional. En la siguiente dirección:
<https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/procedimientos>

Pago de tasas:

El devengo se producirá en el momento de la entrega del material vegetal objeto de examen, según lo indicado en el punto 2 artículo 54 de la Ley 3/2000. El formulario del pago de tasas se descargará de la Sede Electrónica, en la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/navProcedimientoPagoTasas>
El pago de las mismas se podrá realizar bien de forma presencial (cumplimentando Modelo 790 código 046 y realizando el pago en Banco o Caja) o de forma telemática.

El/los duplicado/s de la/s solicitud/es de inscripción a que hace referencia este documento se envía/n por correo electrónico si dichas solicitudes han pasado por la CCAA o a través de la Sede Electrónica del Mº si éste ha sido el medio de solicitud.

LA JEFA DE ÁREA DEL REGISTRO DE VARIEDADES

Fdo.: Nuria Urquía Fernández

CORREO ELECTRÓNICO:

MPAyOEV@mapa.es



C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.66.69
FAX: 91 347.67.03

CSV : GEN-8969-7788-9adf-dcee-0130-3f96-d7f3-dc1d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 29/10/2021 10:02 | Sin acción específica





MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OEVV)

REF: F I C I O

NREF:

FECHA: 21 de octubre de 2022

ASUNTO: Solicitud inscripción RVC

NEIKER A.B. INSTITUTO VASCO DE
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGRARIO
CL BERREAGA 1
48160 DERIO (BIZKAIA)

Se adjunta/n el/los duplicado/s de la solicitud/es de inscripción que Vds. han presentado en el Registro de Variedades Comerciales, correspondiente/s a la/s variedad/es que a continuación se relaciona/n:

<u>NRVC</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>VARIEDAD</u>	<u>REFERENCIA OBTENTOR</u>
20220512	PIMIENTO	IRRIBARRA	IP2-4

El material a entregar, condiciones del mismo y lugar de envío, puede consultarlo en la sección [Descarga de documentos](#) de la siguiente página:

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/semillas-y-plantas-de-vivero/registro-de-variedades/req-de-variedades-comerciales/>

La falta de entrega del mismo sin justificar conllevará la caducidad del expediente a los 90 días.

El plazo máximo para resolver los expedientes es el fijado con carácter general en los artículos 21.2 y 22 de la Ley 39/2015 PAC, y el fijado en el artículo 21 de la Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos (BOE 27.07.2006). No obstante este plazo se interrumpirá hasta la finalización de los ensayos de identificación y de valor agronómico cuando así se establezca en el correspondiente Reglamento de Inscripción, volviendo a contar a partir del trámite de audiencia

NOTAS: Se informa que, de acuerdo con el artículo 14.2 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, están obligados a presentar las solicitudes de inscripción en el Registro de Variedades Comerciales, a través de la Sede Electrónica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), los solicitantes que tengan su Sede Social fuera del territorio nacional. En la siguiente dirección: https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/procedimientos-intermedio?theme_id=2

Pago de tasas:

El devengo se producirá en el momento de la entrega del material vegetal objeto de examen, según lo indicado en los artículos 54 y 55 de la Ley 30/2006. El formulario del pago de tasas se descargará de la Sede Electrónica, en la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/navProcedimientoPagoTasas> El pago de las mismas se podrá realizar bien de forma presencial (cumplimentando Modelo 790 código 84 y realizando el pago en Banco o Caja) o de forma telemática.

El/los duplicado/s de la/s solicitud/es de inscripción a que hace referencia este documento se envía/n por correo electrónico si dichas solicitudes han pasado por la CCAA o a través de la Sede Electrónica del MP si éste ha sido el medio de solicitud.

LA JEFA DE ÁREA DEL REGISTRO DE VARIEDADES

Fdo.: Nuria Urquía Fernández

CORREO ELECTRÓNICO:
MPAyOEVV@mapa.es

OEVV
Oficina Española
de Variedades Vegetales

C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.68.59
FAX: 91 347.67.03

CSV : GEN-46d7-65aa-a929-e679-38cf-690c-dce7-a00f

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 21/10/2022 13:33 | Sin acción específica





MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OEVV)

REF: F I C I O
NREF: JASM
FECHA: 21 de octubre de 2022
ASUNTO: Solicitud TOV PIMIENTO

NEKER A.B. INSTITUTO VASCO DE
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO
CL BERREAGA 1
48160 DERIO (BIZKAIA)

Se adjuntan los duplicados de las solicitudes de inscripción que Vds. han presentado en el Registro de Variedades Protegidas, correspondientes a las variedades que a continuación se relacionan:

<u>NRVP</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>VARIEDAD</u>	<u>REFERENCIA OBTENTOR</u>
20225707	PIMIENTO	IRRIBARRA	IP2-4

El material a entregar, condiciones del mismo y lugar de envío, puede consultarlo en la sección **Descarga de documentos** de la siguiente página:

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/semillas-y-plantas-de-vivero/registro-de-variedades/reg-de-variedades-protegidas/>

La entrega de material sólo se realizará una vez.

Antes del envío es conveniente ponerse en contacto con D. Francisco Edo, responsable de la especie, para que tenga constancia del material que va a llegar.

Teléfono: 96 307 96 04/03
Correo electrónico: cevvalencia@inia.csic.es

La falta de entrega no justificada de dicho material dará lugar a la caducidad del expediente a los tres meses.

El plazo máximo para resolver los expedientes es el fijado en el artículo 45 de la Ley 3/2000, de 7 de enero, de Régimen Jurídico de la Protección de las Obtenciones Vegetales.

Se le recuerda la necesidad del envío de un informe emitido por la Oficina Española de Patentes y Marcas, relativo a la identidad y parecido de las denominaciones con marcas solicitadas o registradas (Art. 48 Ley 3/2000 – BOE 10-1-2000) que les será entregado previo pago de la tasa correspondiente e indicación del motivo por el que se precisa dicho informe.

Dicho informe se podrá solicitar una vez que la denominación asignada a la variedad sea aprobada provisionalmente por este Registro, la cual tendrá carácter definitivo cuando se le conceda el Título de Obtención Vegetal y éste sea publicado en el BOE.

CORREO ELECTRÓNICO:

MPAyOEVV@mapa.es



C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.68.59
FAX: 91 347.67.03

CSV : GEN-281f-2634-39e2-a942-26f1-85c0-1395-83a3

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 21/10/2022 13:33 | Sin acción específica





MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS (MPA)
Y OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES (OEVV)

NOTAS: Se informa que, de acuerdo con el artículo 14.2 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, están obligados a presentar las solicitudes de inscripción en el Registro de Variedades Comerciales, a través de la Sede Electrónica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), los solicitantes que tengan su Sede Social fuera del territorio nacional. En la siguiente dirección:

<https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/procedimientos>

Pago de tasas:

El devengo se producirá en el momento de la entrega del material vegetal objeto de examen, según lo indicado en el punto 2 artículo 54 de la Ley 3/2000. El formulario de pago de tasas se descargará de la Sede Electrónica, en la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://sede.mapa.gob.es/portal/site/seMAPA/nav/ProcedimientoPagoTasas>

El pago de las mismas se podrá realizar bien de forma presencial (cumplimentando Modelo 790 código 046 y realizando el pago en Banco o Caja) o de forma telemática.

El/los duplicado/s de la/s solicitud/es de inscripción a que hace referencia este documento se envía/n por correo electrónico si dichas solicitudes han pasado por la CCAA o a través de la Sede Electrónica del M^e si éste ha sido el medio de solicitud.

LA JEFA DE ÁREA DEL REGISTRO DE VARIEDADES

Fdo.: Nuria Urquía Fernández

Código seguro de Verificación: GEN-281f-2634-39e2-a942-26f1-85c0-1395-83a3 | Puede verificar la integridad de este documento en la siguiente dirección: <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

CORREO ELECTRÓNICO:

MPAyOEw@mapa.es



C/ ALMAGRO, 33-7ª planta
28010 - MADRID
TEL: 91 347.66.69
FAX: 91 347.67.03

CSV : GEN-281f-2634-39e2-a942-26f1-85c0-1395-83a3

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://sede.administracion.gob.es/pagSedeFront/servicios/consultaCSV.htm>

FIRMANTE(1) : NURIA MARIA URQUIA FERNANDEZ | FECHA : 21/10/2022 13:33 | Sin acción específica



ANEXO XVII.

Citas bibliográficas de publicaciones relacionadas con esta Tesis

Ojinaga M, Mendarte S, Arizmendi J, Larregla S. CMV and CPMMoV impact in open field Ibarra chili pepper and its prevalence in wild flora around the crop in the Basque Country (Northern Spain). Paper presented at: European Horticulture Congress; 2024 May 12-16; Bucharest, Romania. *Acta Hort.* In press.

Ojinaga M, Aragonés A, Hernández M, Larregla S. Phenotypical and molecular characterization of new pepper genotypes resistant to Chili pepper mild mottle virus firstly detected in Europe and other tobamoviruses. *Scientia Horticulturae*. 2024;330:113074. doi: 10.1016/j.scienta.2024.113074.

Ojinaga M, Larregla S, Alfaro-Fernández A, Font-San Ambrosio MI, Pallás V, Sánchez-Navarro JA. The length of the polyprobes and the position of the individual probes in them determine the sensitivity in the detection of viruses affecting pepper crops. *Eur J Plant Pathol*. 2024. doi: 10.1007/s10658-024-02837-w.

Ojinaga M, Larregla S. La situación del cultivo del pimiento y sus principales problemas fitosanitarios en Euskadi. *Lurralde: Invest Espac*. 2023;46:267-308. ISSN 0211-5891. eISSN 1697-3070.

Ontañón C, Ojinaga M, Larregla S, Zabala JA, Reva A, Losa A, Herebia R, Bertacca S, Sanahuja E, Alfaro-Fernández A, Font-San Ambrosio MA, Corachán L, Pallás V, Sánchez-Navarro JA. Molecular analysis of a Spanish isolate of chili pepper mild mottle virus and evaluation of seed transmission and resistance genes. *Eur J Plant Pathol*. 2024;168:401-418. doi: 10.1007/s10658-023-02765-1.

Ojinaga M, Aragonés A, Hernandez M, Juaristi B, Larregla S. Evaluation of molecular markers associated with tobamoviruses resistance genes in pepper landraces of the Basque Country (northern Spain). *Acta Hort.* 2022;1362. doi: 10.17660/ActaHortic.2023.1362.36.

Ojinaga M, Guirao P, Larregla S. A survey of main pepper crop viruses in different cultivation systems for the selection of the most appropriate resistance genes in sensitive local cultivars in Northern Spain. *Plants*. 2022;11(6):719. doi: 10.3390/plants11060719.