BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

COMPORTAMIENTO DE TOBRFV DURANTE EL PROCESO DE INFECCIÓN EN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

KARINA HERRERA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. CARLOS ALBERTO CONTRERAS PAREDES

NOVIEMBRE 2024

Agradecimientos

A mi querida madre, la persona que siempre ha estado a mi lado y sin cuya presencia no sería la persona en la que me estoy convirtiendo. Admiro profundamente tu valentía, el amor incondicional que siempre me has brindado, la fe inquebrantable que tienes en mí, y tus ganas de superación, que han sido y seguirán siendo mis mayores fuentes de inspiración. No hay palabras que puedan hacerle justicia a la relación genuina y sólida que hemos construido a lo largo de los años. Gracias por ser no solo una madre, sino también mi gran amiga.

Al mejor hermano mayor, mi coach, mi asesor de imagen, mi compañero de lágrimas y risas. Gracias por ser siempre una fuente de apoyo incondicional, por tus consejos sabios, por tu buen humor que ilumina mis días y por enseñarme tanto a lo largo del camino. Agradezco especialmente que siempre me hayas dado la confianza para arriesgarme y perseguir mis sueños. No podría haber pedido un mejor hermano y amigo en esta aventura de la vida.

A la persona más ocurrente, mi padre, por sacarme una sonrisa en todo momento, a la persona que me enseñó a fraccionar con una manzana, fragmento que cortaba lo mencionaba y se lo comía, por las muchas noches de películas, nunca faltara algo ligth, gracias por estar siempre presente incluso a la distancia, tu apoyo, cariño y tu autentica forma de ser, por enseñarme a través de tu ejemplo, la importancia de ser uno mismo y principalmente a tomar con humor la vida, gracias o mio babbino caro.

Al Dr. Carlos por brindarme la oportunidad de participar en su laboratorio. Su guía y apoyo fueron fundamentales para mi crecimiento académico y profesional. Además, quiero agradecerle por la amistad que desarrollamos durante este tiempo, la cual me enseñó la importancia de encontrar un equilibrio entre la vida personal y laboral. Estoy profundamente agradecida por todo lo que aprendí bajo su dirección y por la confianza que siempre depositó en mí.

A mis amigos, por su valiosa amistad que hizo de esta experiencia algo increíble desde los primeros días de clase. A mis amigos sirenos, Asaf y Lizzy, por estar a mi lado desde el principio; a las amistades que se formaron durante la pandemia y que surgieron gracias a su excelente forma de trabajo, Xia, Fer y Oli; y a mi querida compañía en el laboratorio, Zoe y Diana. Gracias a todos por haber hecho este viaje tan especial y memorable.

A mis compañeros de desvelo, mis preciosas mascotas; snoopy por su arduo trabajo en la vigilancia, la señorita Tutsi por las buenas siestas y a Dimitri por su papel como supervisora.

Al Dr. Alejandro Marcelino Rodríguez Y Fuentes uno de mis mayores consejeros y ejemplo a seguir, quien vio en mi un gran potencial y alojó su confianza inquebrantable, jamás olvidaré sus palabras “estudia para aprender y aprender para aplicar”.

Finalmente, pero no menos importante, a ti, por aparecer en el momento más inesperado, gracias por brindarme de tu compañía y darme la oportunidad de experimentar un amor nuevo y hermoso, por elegir cada día, desde nuestra libertad, compartir nuestro paso con el mundo. Gracias por ser parte de esta etapa tan especial de mi vida, te amo.

Índice

Resumen **5**

Introducción **6**

Antecedentes **10**

Importancia del jitomate (*Solanum lycopersicum*) 10
Principales patologías en el cultivo de jitomate 11
Enfermedades fúngicas 11
Enfermedades bacterianas 12
Enfermedades causadas por fitoplasmas 13
Enfermedades causadas por viroides 14
Enfermedades virales 15
¿Qué son los virus? 15
Propagación de ToBRFV en el mundo 16
Composición del genoma de ToBRFV 17
Epidemiología de ToBRFV 19
Diseminación y métodos de desinfección 21
Síntomas causados por ToBRFV 22

Justificación **24**

Objetivos **25**

General 25
Específicos 25

Materiales y métodos **26**

Obtención de material biológico 26
Obtención de plantas de jitomate para experimentos de infección viral 26
Preparación del inóculo viral y establecimiento de los grupos experimentales 26
Extracción de RNA total a partir de material vegetal 27
Diseño de oligonucleótidos de genoma viral 27
Síntesis de cDNA a partir de RNA total 29

Amplificación por RT-PCR de fragmentos virales con oligonucleótidos específicos.....30
Amplificación de templados virales de sentido negativo mediante RT-PCR.....30
Preparación células competentes 31
Ligación y clonación de productos de RT-PCR 31
Extracción de DNA plasmídico 32
Secuenciación y análisis de la secuencia del fragmento 1 33
Resultados..... 34

Aislamiento de ToBRFV a partir de muestras vegetales colectadas.....34
Estandarización de la amplificación de fragmentos virales mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos 35
Análisis de la secuencia del fragmento viral 1 39
Dinámica de infección viral en plantas de jitomate 42
Discusión 45

Aislamiento e identificación de ToBRFV 45
Dinámica de la infección por ToBRFV en plantas de jitomate.....46
Conclusión 48

Referencias 49

Resumen

El virus del bronceado rugoso del fruto del tomate (ToBRFV por Tomato brown rugose fruit virus) es un virus emergente de RNA que ha tenido un impacto significativo en los cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annuum*) a nivel mundial. Este virus fue descubierto en 2015 por un grupo de investigadores en Jordania, siendo el primer brote registrado en invernaderos de Israel y Jordania en 2014. ToBRFV se distingue por su capacidad de superar la resistencia conferida por los genes Tm-1, Tm-2 y Tm-22, característica que lo diferencia de otros tobamovirus. Su alta tasa de diseminación ha ocasionado pérdidas devastadoras, especialmente en el cultivo de jitomate, que es de gran importancia global debido a su valor nutricional, cultural y económico. Los frutos infectados por ToBRFV muestran arrugamiento, necrosis, una disminución de tamaño y manchas irregulares de color amarillo, marrón y/o verde. En México, se reportó la presencia de ToBRFV en 2019 en el Estado de Michoacán.

Para llevar a cabo este estudio, se recolectaron muestras de frutos y tejido foliar de jitomate con síntomas de virosis en dos mercados de la capital poblana y en dos invernaderos en los municipios de Atlixco y Chignahuapan, ambos en el Estado de Puebla. La detección de ToBRFV se realizó mediante RT-PCR amplificando los segmentos ORF2 y ORF3 del genoma viral con oligonucleótidos específicos diseñados en el laboratorio, la identidad del virus se verificó mediante la secuenciación del fragmento amplificado. Tras el aislamiento y la identificación del virus, se estableció un experimento para evaluar el desarrollo de la infección viral a partir de los 5 días post-inoculación (dpi), y hasta los 20 y 40 dpi. Además, se evaluó la replicación del virus mediante la amplificación de cadenas negativas virales, observándose a partir de los 5 dpi.

Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos más importantes a nivel global debido a su valor nutricional y económico. Para México, representa el segundo cultivo más significativo, ya que en 2019 representó el 25.4% del total de productos mexicanos exportados, posicionando al país como el noveno productor a nivel mundial en mercados como Estados Unidos, países europeos, Japón y Canadá (García *et al.*, 2020). En 2023, el jitomate fue el segundo cultivo con mayor venta al extranjero, generando ganancias por 2.742 millones de dólares y siendo los principales estados productores Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán y Baja California (SIAP, 2024).

Las pérdidas en el cultivo de jitomate tiene un gran impacto económico y social; algunas de las causas de la disminución en su producción se deben a su susceptibilidad a enfermedades de origen viral (Chanda *et al*., 2020), siendo los principales virus que causan problemas severos en invernadero los que pertenecen al género *Tobamovirus*, dentro del cual encontramos al virus del mosaico del pepino dulce (PepMV por Pepino mosaic virus) (Zuñiga *et al.*, 2019), el virus de la marchitez del tomate (ToMarV por Tomato marchitez virus) (Barajas *et al*., 2013), el virus del marchitamiento manchado del tomate (TSWV por Tomato Spotted Wilt Virus) (Holguín y Rueda, 2007), el virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV por Tomato yellow leaf curl virus) (Ascencio-Ibáñez *et al*., 1999) y virus del bronceado rugoso del fruto del tomate (ToBRFV por Tomato brown rugose fruit virus) (García *et al*., 2020).

En 2015, se describió un nuevo patógeno viral conocido como el virus del bronceado rugoso del fruto del tomate, un tobamovirus emergente, que, a diferencia de otros, se ha convertido en una amenaza significativa debido a su rápida propagación, que compromete tanto la producción como

la calidad de los frutos y la robustez de la planta. ToBRFV puede infectar a más de 40 especies de plantas, incluyendo huéspedes experimentales como *Chenopodium quinoa, Nicotiana glutinosa y Nicotiana tabacum.* No obstante, las más relevantes son el jitomate (*Solanum lycopersicum*), el pimiento (*Capsicum annuum*) y especies de malezas asociadas a estos cultivos, actuando como reservorios virales. La prevalencia de la enfermedad en los cultivos afectados se calculó entre el 50% y el 100%, mientras que la disminución del rendimiento observada fue del 10% al 55% (Mehle, *et al*., 2023; Panno *et al*., 2020).

La infección por ToBRFV se manifiesta por la aparición de enchinamiento y necrosis en hojas jóvenes, presencia de amarillamiento y mosaico entre las venas de las hojas, decoloración, manchas irregulares, necrosis y arrugamiento en frutos (Wang *et al*., 2024). Parte del éxito, en la diseminación e infección por ToBRFV se atribuye a su capacidad para sobrepasar la resistencia conferida en jitomates por el gen *Tm 1*, así como por los genes *Tm-2* y *Tm-2*^{2}, que confieren resistencia de tipo reacción hipersensible (HR) contra el virus del mosaico del tabaco (TMV por Tobacco mosaic virus) y el virus del mosaico del tomate (ToMV por Tomato mosaic virus) (Carr, 2024; Bernabé *et al*., 2021). Este fenómeno demuestra la plasticidad genética de los virus y su interacción con los genes de resistencia (Zinger *et al*., 2021). Por su parte, Tm-1 tiene la función de un inhibidor viral ya que se adhiere a las proteínas de replicación de ToMV para evitar la formación del complejo de replicación en las membranas, prescindiendo la síntesis de RNA de cadena negativa (Zheng *et al*., 2024). La resistencia por *Tm-2*^{2} consiste en un mecanismo que interfiere con el movimiento viral de célula a célula en las plantas. En el caso del pimiento los genes L que controlan la resistencia a *Tobamovirus, L1* al ToMV, *L2* al virus del mosaico leve del pimiento (PaMMV por Paprika mild mottle virus), *L3* y *L4* al virus del mosaico leve del pimiento

(PMMoV por Pepper mild mottle virus). Sin embargo, estos genes no confieren resistencia al pimiento cuando hay una infección por ToBRFV (Fidan *et al*., 2021).

El virus puede transmitirse mecánicamente mediante el contacto directo entre una planta infectada y una planta sana. También puede propagarse a través de las semillas, donde permanece en los tegumentos, pero no en el embrión, y por la savia infectada que se puede adherirse a diversas superficies, como herramientas de trabajo, macetas, envases y ropa. Además, después de la cosecha, el inóculo de ToBRFV puede permanecer infeccioso en varias superficies y materiales del invernadero, como alambres, vidrio, concreto y suelo (Caruso *et al*.,2022; Davino *et al*., 2020; Zisi *et al*., 2024). Se ha sugerido la posible diseminación de ToBRFV por medio de polinizadores como los abejorros (*Bombus terrestris*) ya que convencionalmente son utilizados en la producción de jitomates por su contribución a la calidad y cantidad del fruto (Levitzky *et al*., 2019).

La rápida expansión de ToBRFV ha causado preocupación en las industrias del jitomate y del pimiento, de la misma manera a las empresas implicadas en la producción de semillas. Actualmente, el número de tratamientos disponibles para curar o controlar fitopatógenos virales en condiciones de campo es limitado ya que no existen opciones de control químico genérico, más que prácticas de medidas agrotecnológicas preventivas, que incluyen la desinfección de las áreas agrícolas y las herramientas, la rotación de cultivos, el manejo adecuado del uso y reemplazo de suelos, y la eliminación de plantas infectadas. Además, la detección temprana es crucial para evitar la propagación (Mehetre *et al*., 2021; Fox y Mumford 2017; Salem *et al*., 2022; Zinger *et al*., 2021). En la actualidad se cuenta con técnicas y herramientas que permiten la identificación de ToBRFV, por ejemplo el uso de microscopia electrónica para visualizar estructuras de las partículas virales con la limitante de no poseer especificidad, no obstante dentro de las tecnologías

que ofrecen especificidad en la identificación de especies virales se encuentran las pruebas serológicas, secuenciación de nueva generación (NGS) y ensamblaje del genoma, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT–PCR) y en tiempo real RT-qPCR, LAMP-PCR y ELISA (Gonzáles., 2020; Magaña *et al*., 2021).

En el presente estudio se estandarizó la detección de ToBRFV mediante RT-PCR partiendo de plantas con síntomas de virosis colectadas en invernaderos y mercados del Estado de Puebla, una vez aislado e identificado el comportamiento de ToBRFV fue observado analizando el tiempo de diseminación y replicación desde la hoja inoculada hacia hojas jóvenes en cinco, 20 y 40 dpi para poder comprender el comportamiento de ToBRFV.

Antecedentes

Importancia del jitomate (*Solanum lycopersicum*)

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) originario de Centro y Sudamérica pertenece a la familia Solanaceae, y es una de las hortalizas más importantes a nivel global, pues gracias a su comercialización ha generado altas ganancias económicas a causa de su popularidad como ingrediente en múltiples platillos de distintas regiones en diferentes países, debido a que tiene un importante valor nutricional y funcional, siendo una excelente fuente de antioxidantes, fibra, minerales y vitaminas, por ejemplo las vitaminas A y C, betacaroteno, xantinas y luteína a las cuales se ha asociado a la eliminación de radicales libres ayudando a proteger la visión y retardar el envejecimiento; además de, licopeno que permite proteger la piel de los rayos UV, y con un valor energético de 18 calorías por cada 100 g (Saffan *et al*., 2022; Liu W., *et al*. 2022).

De acuerdo con datos de la FAO la producción mundial de jitomate en 2022 fue de 186.1 millones de toneladas cultivados en 4.91 millones de hectáreas, siendo los principales países productores China, Estados Unidos, India y Turquía (Roque *et al*., 2021; FAO 2024), mientras que en 2021 México ocupó el noveno lugar en producción a nivel mundial con una producción de 3 millones 324 mil toneladas, representando el 33% de exportación mundial, siendo los Estados de Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco y Baja California los que aportaron la mayor producción a nivel nacional (SIAP, 2022).

Esta especie vegetal es denominada como una planta arbustiva, puede llegar a vivir un año en su estado silvestre, muestran una tolerancia amplia a diferentes climas, permitiendo así adaptarse tanto en regiones tropicales como templadas. Su introducción a Europa ocurrió tras la colonización

de América (Hanssen y Lapidot, 2012). La domesticación de las plantas comenzó con la selección de la especie silvestre cuyas características son deseables para después ser modificada genéticamente a través de la reproducción selectiva. Pero el centrarse únicamente en los procesos de domesticación pueden ocasionar limitaciones en la trayectoria de genes y rasgos que favorecen a las plantas en su estado nativo, de tal manera que su diversidad genética es considerada restringida, debido al bajo nivel de polimorfismo genético, los cultivares tienden a ser sensibles ante la presencia de patógenos, estrés abiótico y plagas (Razifard *et al*., 2020).

Principales patologías en el cultivo de jitomate

La diversidad genética, el estadio y el medio ambiente son factores que convergen de tal manera que pueden afectar a los cultivos generando enfermedades, en el caso del jitomate, se puede desarrollar alrededor de más de 200 enfermedades inducidas por patógenos como hongos, bacterias, virus, viroides y fitoplasmas (Panno *et al*., 2021).

Enfermedades fúngicas

Los hongos son considerados como los principales agentes causales de enfermedades en las plantas, con un 80% de la disminución del rendimiento de cultivo de jitomate, son los hongos que pertenece al género de *Alternaria solani*, responsable del tizón temprano, genera lesiones necróticas en tallos y flores, se caracteriza por tener conidios separados, con esporas muriformes, alargadas de color oscuros, sus micelios son septados y ramificados (Paiva *et al*., 2022; Mugao 2023). *Botrytis cinerea* resulta ser el segundo hongo fitopatogeno más importante en el cultivo del jitomate, es el causante de la podredumbre gris, este hongo filamentoso pertenece al género Botryitnia de la familia Sclerotiniaceae de la división Ascomicetaa, llega a ocasionar podredumbre

(en flores, hojas y tallos) y cancro en el tallo (Liu *et al*., 2021; Martinez *et al*., 2019). Los niveles de pérdida del cultivo oscilan de 10%-30% del cultivo, *Botrytis cinerea* ha desarrollado resistencia contra fungicidas (Sarven *et al*., 2020; Tzortzakis., 2019), otros hongos fitopatógeno que afectan a jitomate son; *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) está conformada por un conjunto de cepas hemidrotrópicas causando la marchitez vascular, generando perdidas mayores al 50% (Hernandez *et al*., 2017), la infección comienza atacando el xilema y floema hasta alcanzar la muerte de la misma. Aproximadamente el 45% de las cepas de *Fol* son altamente virulentas, el 30% son moderadamente virulentas, y el resto no presentan patogenicidad (Vásquez., 2017; López *et al*., 2021; Nirmaladevi *et al*., 2016).

Enfermedades bacterianas

Existen diversas patologías en las cuales el agente causante son las bacterias, estas penetran en los espacios intercelulares de las hojas a través de aberturas naturales, como los estomas, y se multiplican de manera endofítica y asintomática antes de la aparición de los síntomas (Preston, 2000). Los principales daños causados por bacterias que afectan al jitomate son la podredumbre acuosa de tallos y frutos, moteado en frutos, necrosis en el centro del tallo, cáncer en la raíz, mota bacteriana en hojas y marchitez bacteriana (Kolomiets *et al*., 2017).

Por ejemplo, *Ralstonia solanacearum*, es una bacteria gram negativa, la cual es transmitida por el suelo y es causante de la marchitez bacteriana en jitomate; puede infectar a más de 200 especies vegetales pertenecientes a más de 50 familias botánicas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Bae *et al*., 2012; Peeters *et al*., 2013) esta proteobacteria es considerada como la segunda bacteria fitópatogena más devastadora después de *Phytophthora*, causante del tizón tardío (Paudel *et al*., 2020); *Ralstonia solanacearum* origina la obstrucción de los tejidos vasculares, afectando el

crecimiento de la planta, generando marchitez en los tallos, mientras que en hojas se llega a presentar clorosis intervenal y arrugamiento en hojas, cuando la enfermedad se desarrolla paulatinamente se manifiesta una epinastia foliar (SENASICA, 2014; SAGARPA, 2011). Otro agente bacteriano es Pseudomonas syringae pv. Tomato (PSDMTM), esta es una bacteria gram negativa, con forma de bastón; es el agente causal de la mota bacteriana del tomate y se ha caracterizado por causar defoliación, manchas irregulares necróticas en tallos, hojas y frutos que van de color café oscuro a negras. PSDMTM puede asociarse a su hospedero por medio de heridas o estomas (Preston, 2000; Skliros *et al*., 2023; Orfei *et al*., 2023). Otra bacteria importante es *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis (Cmm), esta es gram positiva, no móvil, con una morfología de bastones corineformes órficos, su tamaño es de 0.5–1.5 µm de largo y 0.3–0.6 µm de ancho, este organismo causa el cancro bacteriano también llamado cáncer bacteriano (SENASICA, 2005) la infección por Cmm se manifiesta con la marchitez unilateral de las hojas hasta ocasionar necrosis generando el marchitamiento de la planta completa (Maeso, 2012), infecta los vasos del xilema y causa síntomas de marchitez, clorosis marginal de hojas y grietas (cancro) (Rivera *et al*., 2022).

Enfermedades causadas por fitoplasmas

Los fitoplasmas son un grupo de bacterias no cultivables que pertenecen a la clase de los Mollicutes (Lee *et al*., 2021; Sugio *et al*., 2011), son caracterizados por su forma pleomórfica y la ausencia de pared celular. Estos parásitos infectan a las plantas donde desarrollan su ciclo de vida, pero son transmitidos por insectos vectores que se alimentan del floema. Un ejemplo de fitoplasma que afecta al jitomate es Candidatus Phytoplasma solani el cual induce hiperplasia del floema y la

formación de depósitos de calosa en las placas cribosas de las hojas de tomate (Buoso *et al*., 2022). La enfermedad más significativa en los jitomates causada por los fitoplasmas 16SrI, 16SrII, 16SrVI, 16SrIX y 16SrXII es el brote grande del tomate (TBB por Tomato big bud), que provoca filodia, virescencia, agrandamiento de cálices y proliferación de brotes axilares (Hemmati *et al*., 2021).

Enfermedades causadas por viroides

Los viroides son agentes infecciosos constituidos por una cadena de RNA circular monocatenario altamente estructuradas de aproximadamente 234 a 406 nucleótidos. Su replicación se realiza de manera autónoma, utilizando las enzimas de procesamiento ya presentes en las células del hospedador, como el RNA polimerasa. No tienen la capacidad de codificar proteínas (Hadidi *et al*., 2022). Los síntomas causados por viroides generan una floración temprana, epinastia foliar, aborto de las flores, reducción de frutos, rotura de yemas axilares, y deformación de las hojas, necrosis y clorosis de los tallos y las venas (Antignus *et al*., 2007; Adkar *et al*., 2018; Aviña- *et al*., 2018).

El viroide de la planta macho del tomate (TPMV por Tomato planta macho viroid) pertenece al género de *Pospiriviriod*, los síntomas asociados a una infección por TPMV en jitomates es el retraso del crecimiento, acortamiento de entrenudos apicales, clorosis, hojas de color canela o violeta, quebradizas y deformes, aborto de flores y reducción del tamaño del fruto (Constable *et al*., 2019; Parella *et al*., 2014). La tasa de transmisión por semillas es de 0–4,4% (Yanagisawa *et al*., 2017), cuenta con una incidencia de pérdidas del 5% del cultivo. Otra especie del género de *Pospiviriod* es el viroide enano clorótico del tomate (TCDVd por Tomato chlorotic dwarf viroid)

produce en las plantas de jitomate enanismo y clorosis en hojas jóvenes, ocasionando pérdida total del cultivo (Aviña *et al*., 2022; Constable *et al*., 2019; Zamora-Macorra *et al*., 2024).

Enfermedades virales

Los virus representan el grupo más grande y diverso de organismos definido a la fecha (Shukla, *et al*., 2019). Las enfermedades en plantas causadas por patógenos virales generan al rededor del 40% de las pérdidas totales del cultivo (Mehetre *et al*, 2021). En México, se han encontrado diversos virus asociados al cultivo de jitomate, dentro de los cuales encontramos al ToMV, TYLCV, TSWV, PepMV, ToMarV y recientemente algunos como el Virus del mosaico moteado del tomate (ToMMV) y ToBRFV (Turina, *et al*., 2016; Salem, *et al*., 2016; García *et al*., 2022).

¿Qué son los virus?

Los virus son organismos acelulares que se replican usando la maquinaria celular de los organismos que usan como hospedadores, lo que los constituye como parásitos intracelulares obligados. Las partículas virales, también llamadas viriones, están constituidas por ácidos nucleicos y proteínas virales estructurales, formando así nucleoproteínas (Edward *et al*., 2024), el ingreso del virus a la célula huésped comienza con la interacción específica entre las proteínas de la superficie viral y los receptores de la célula huésped, desencadenando los cambios conformacionales de las proteínas virales que permiten fusionarse con la membrana celular e ingresar el material genético (Jiang, S., y Lu, L., 2022) .

Aunque a lo largo de la historia se ha hecho referencia al término “virus”, fue en 1898 cuando el científico holandés Martinus Beijerinck reintrodujo dicho concepto al caracterizar el “*contagium*

vivum fluidum" y aislando al virus del mosaico del tabaco (Lefeuvre *et al*., 2019), con la capacidad de infectar a distintas especies vegetales ocasionando mosaicos, es decir cambios en el color y forma de los folíolos, dando así origen a la Virología la cual alcanzó notoriedad a inicios del siglo XX (Creager *et al*., 2022; Xavier *et al*., 2023). Estos parásitos submicroscopicos tienen la capacidad de infectar a cualquier organismo generando en la mayoría de los casos la muerte del individuo. Una característica de los virus es que pueden poseer una gran variabilidad genética que supera en cantidad a la de otros reinos y a su vez su presencia a lo largo de la historia indica que juegan un papel esencial en los ecosistemas (Lefeuvre *et al*., 2019).

En la agricultura, los virus tienen un impacto económico a nivel mundial ya que las infecciones virales pueden ocasionar la disminución abrupta del rendimiento de los cultivos y de la calidad de estos (Wang, A., y Zhou, X., 2016).

Propagación de ToBRFV en el mundo

El virus del bronceado rugoso del fruto del tomate es una especie del género *Tobamovirus* perteneciente a la familia Virgaviridae. Este virus ha sido responsable de pérdidas severas en los cultivos de jitomate a nivel mundial afectando significativamente la producción y la economía agrícola global (Alon *et al*., 2021; Smith, *et al*., 2022). Aunque el primer reporte que se tiene registrado indica que fue encontrado en jitomates de invernaderos en Jordania en 2016 por Salem *et al*., fue a finales de 2014 que se observaron los primeros síntomas en cultivos de jitomate en Ohad, Israel (van de Vossenberg *et al*., 2020; EPPO., 2021; Luria *et al*., 2017), posteriormente, ToBRFV fue detectado a través de distintas técnicas en diversas localidades (figura 1) (Salem *et al*., 2023) en México (Camacho-Beltrán *et al*., 2019; Cambrón-Crisantos *et al*., 2019), Italia (Panno *et al*., 2019), Alemania (Menzel *et al*., 2019), Palestina (Alkowni *et al*., 2019), China (Yan

et al., 2019; Guo *et al*., 2024), Estados Unidos (Ling *et al*.,2019), Canadá (Sarkes *et al*, 2020), Reino Unido (Skelton *et al*., 2019), Grecia (Beris *et al*., 2020), Egipto (Amer *et al*., 2020), Países Bajos (van de Vossenberg *et al*., 2020), España (Alfaro *et al*., 2021), Noruega (Hamborg *et al*., 2022), Arabia Saudita (Sabra *et al*., 2022) y Francia (Skelton *et al*., 2022).

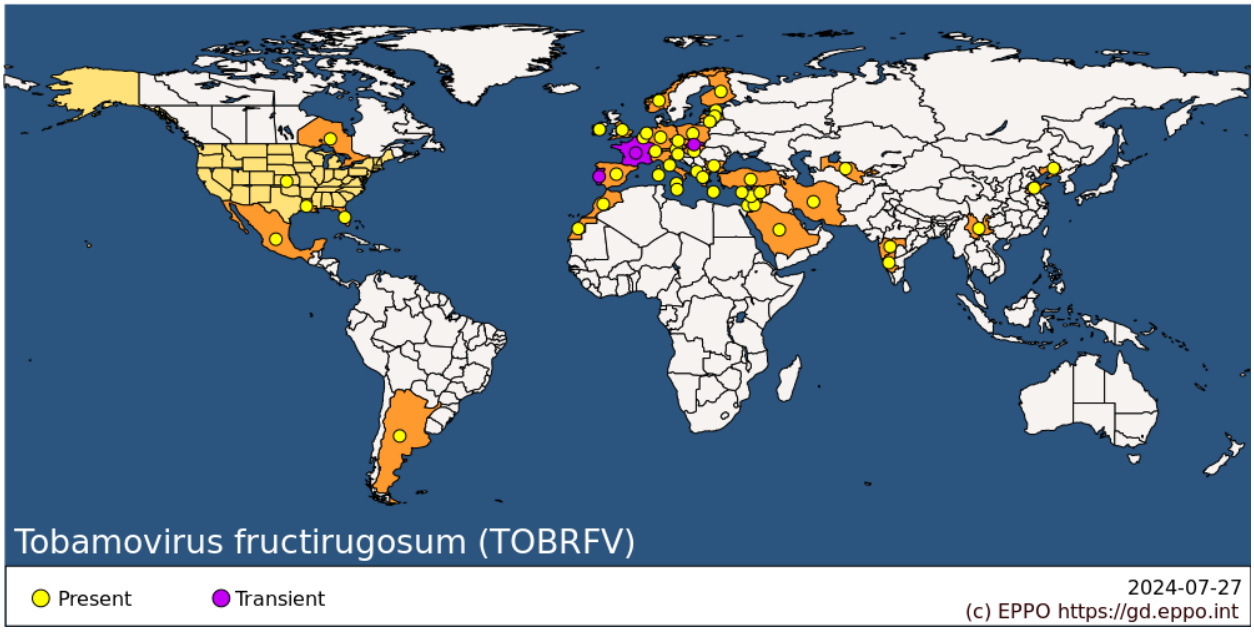

Figura 1. Distribución geográfica del ToBRFV, documentada en la base de datos global de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) global database (https://gd.eppo.int/taxon/ToBRFV/distribution, actualizado el 27 de julio de 2024).

Composición del genoma de ToBRFV

ToBRFV al pertenecer al género *Tobamovirus*, y al igual que otros virus de este género forma viriones en forma de bastones helicoidales rígidos sin envoltura y con simetría helicoidal formados por una molécula de RNA y proteínas de cápside de 19- 24 kDa (Lartey *et al*., 1996; Adam *et al*., 2009), su diámetro es de aproximadamente 18 nm y tiene una longitud de 300 a 310 nm (Figura 2) (Viralzone, 2024). Estos virus, que infectan a las plantas, poseen un linaje muy antiguo, posiblemente durante el período Cretácico, hace entre 145 y 66 millones de años, en la época de

los dinosaurios (Wylie, 2023). La composición genómica de ToBRFV también resulta ser como el resto de los Tobamovirus; su genoma está compuesto de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA+) sin cola de *Poly(A)*$^{-}$, con una longitud aproximada de 6,400 nucleótidos (nt) organizada en cuatro marcos de lectura abierto, los marcos ORF 1a (3348 nt) y ORF 1b (1419 nt) codifican dos subunidades de la RNA polimerasa dependiente de RNA viral (RdRp) de 126kDa (p126) y 183 (p183) kDa respectivamente, ambas encargadas de la replicación viral. Se ha observado que p126 se une al RNA genómico y forma el complejo de dirección de premembrana central (PMTC), si este no se une funciona como un supresor del silenciamiento del RNA, además contiene dominios de metiltransferasa y helicasa (Ishibashi y Ishikawa, 2016).El ORF 2 (798 nt) codifica una proteína de 30 kDa nombrada proteína de movimiento (MP) que facilita el movimiento viral de célula a célula; finalmente el ORF 3 (477 nt) codifica la proteína de cubierta o proteína de la cápside (CP) de 17.5 kDa, la cual forma la partícula viral (Figura 2) (Salem *et al*., 2016; Vaisman *et al*.,2022). Los extremos 5’ y 3’ del RNA genómico corresponden a dos regiones no traducibles (UTR), la región UTR 5´ con una longitud de aproximadamente 70 nt es rica en adenina y citosina, mientras que la región UTR 3´ con tamaño de aproximadamente 200 nt puede plegarse en pseudonudos consecutivos río arriba. Las proteínas de replicación del Tobamovirus se unen cotraduccionalmente al extremo 5' UTR del RNAgenómico para formar el PMTC, siendo el primer paso en la replicación del RNA del viral (Figura 2) (Salem *et al*., 2023).

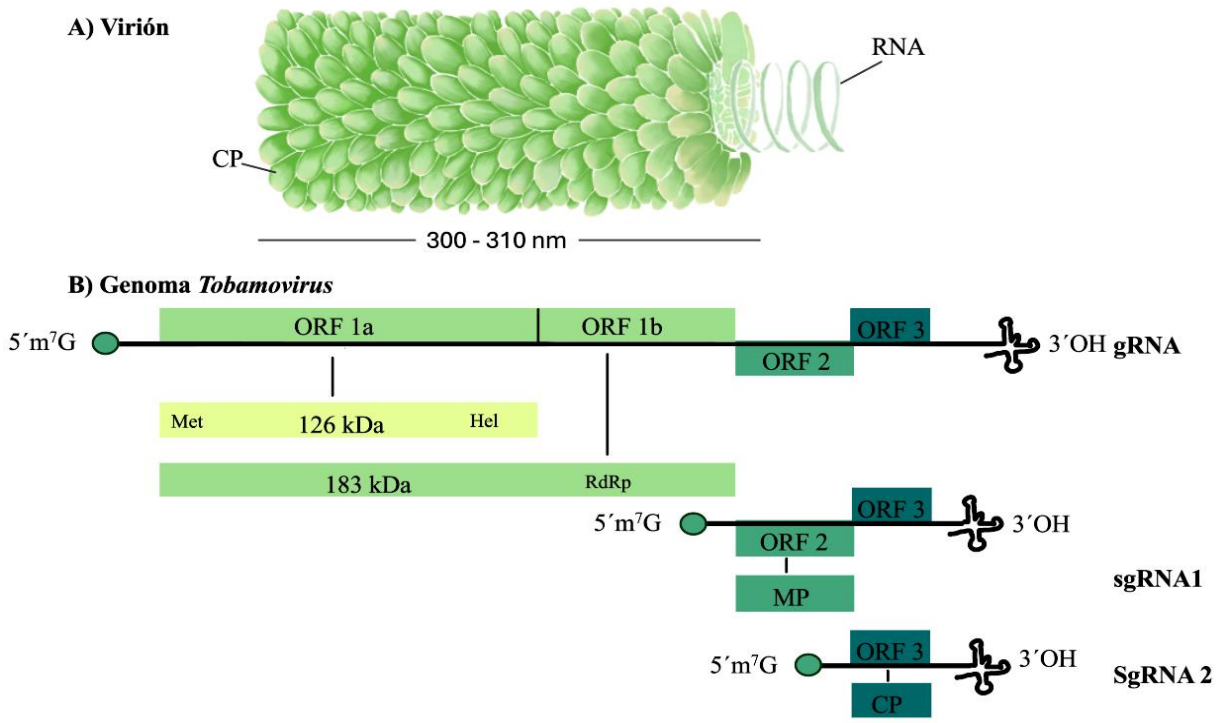

Figura 2. A) Esquema del virión de *Tobamovirus*, consiste en una varilla helicoidal sin envoltura. B) Esquema de la composición del genoma de *Tobamovirus*, el RNA genómico (gRNA codifica las proteínas de replicación de 126 kDa y 183 kDa con dominios de helicasa de RNA (Hel), metilasa (Met) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). El RNAsubgenómico 1 (sgRNA 1) actúa como mensajero para la traducción de la proteína de movimiento (MP) y el RNA subgenómico 2 (sgRNA 2) codifica para la proteína de cápside (CP). Los RNA cuentan con una estructura *Cap* en el extremo 5´ (5´m7G) y con un grupo OH en el extremo 3´.

Epidemiología de ToBRFV

La prevalencia del ToBRFV es de 56.6% en jitomate y 21.7% en pimiento, a partir de la detección de ToBRFV se ha encontrado en distintas regiones del país (SENASICA 2020; Sánchez *et al*., 2023); Baja California (Camacho-Beltrán, *et al*., 201921), Michoacán (Cambrón-Crisantos *et al*., 2019), Yucatán (Magaña *et al*., 2021), Guanajuato (Nolasco *et al*., 2022) y Coahuila (Vazques *et al*., 2024), no obstante, aunque el Estado de Puebla se situó en el 19º lugar como productor de

jitomate durante el ciclo primavera-verano 2024 (SIAP 2024; SENASICA 2020), no se han realizado estudios sobre el aislamiento e identificación de ToBRFV.

Se ha reportado que ToBRFV puede infectar diversas especies vegetales además del jitomate, tales como el pimiento (*Capsicum annuum*) algunas malezas como *Chenopodium murale*, *Solanum nigrum, Amaranthus retroflexus, Beta vulgaris subsp. maritima, Corchorus olitorius, Erigeron canadensis, Malva parviflora, Portulaca oleracea, Taraxacum officinale, Veronica syriaca* (Salem *et al*., 2022; Luria *et al*., 2017), *Convolvulus arvensis, Solanum elaeagnifolium* y *Polycarpon tetraphyllum* (Cultrona *et al*., 2024), aunque estudios en condiciones controladas también han permitido conocer la susceptibilidad de especies vegetales que han sido empleadas como hospedantes experimentales, dentro de estas se incluye a especies pertenecientes a las familias Amaranthaceae, Apocynaceae, Asteraceae y Solanaceae (Zhang *et al*., 2022), tales como C*henopodium giganteum*, *Chenopodium quinoa* (Luria *et al*.,2017), *Catharanthus roseus*, *Chenopodium album* (Chanda *et al*., 2021), *Solanum pimpinellifolium, S. sitiens, S. pimpinellifolium, S. peruvianum, S. pennellii, S. ochranthum, S. neorickii* (Jewehan *et al*., 2021), *Solanum rostratum* (Matzrafi *et al*., 2023), *Datura metel* (Bananej *et al*., 2023), *Amaranthus virids, Clematis drummondii, S. tuberosum, Bidens pilosa, Datura innoxia, Vitis vinifera, Bouvardia ternifolia, Sonchus oleraceus* y *Verbesina encelioides* (Vasquez *et al*., 2024).

Parte del éxito que tiene este virus para infectar un amplio número de especies de plantas, y principalmente diversas variedades de jitomate, se atribuye a la variación en los residuos H^{67}, N^{125}, K^{129}, A^{134}, I^{147} y I^{168} en la región central de la MP permitiendo escapar del reconocimiento de Tm-2^2, la cual confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco (Yang *et al*., 2021).

Diseminación y métodos de desinfección

ToBRFV es un virus que puede llegar a permanecer viable hasta por varios meses (Skelton *et al*., 2023), se transmite principalmente de manera mecánica, a través de plantas infectadas, o savia contaminada adherida en las herramientas de trabajo; se puede diseminar en largas distancias por medio de semillas ya que infecta rápidamente la testa de las semillas (sin infectar el embrión) o frutos contaminados (Davino *et al*., 2020). Los ambientes acuosos como ríos, aguas residuales y aguas utilizadas para riego, favorecen la diseminación de ToBRFV pues puede persistir en este medio durante un periodo de hasta cuatro semanas (Mehle *et al*., 2023).

Para minimizar el riesgo generado por este virus se recomienda adquirir semillas certificadas libres de ToBRFV, descartar plantas con síntomas y realizar medidas de saneamiento además de la desinfección de herramientas (Batuman *et al*., 2022; Klap *et al*., 2020). Aunque son pocas las estrategias que se han establecido como tratamientos de las infecciones virales, la mayoría consisten en la prevención y el control de la diseminación a partir de semillas o por insectos vectores. Por ejemplo, con respecto al manejo de semillas, estas se han sometido a tratamientos químicos como el glutaraldehído, sales cuaternarias de amonio y sales de potasio con la intención de inactivar el virus, para el caso de utensilios y sustratos se ha recomendado someterlos por al menos 30 minutos a temperaturas de 92°C (Vargas *et al*., 2022). El hipoclorito de sodio ha resultado ser parcialmente efectivo para la desnaturalización de ToBRFV, sin embargo, productos como Virkon resulta ser eficaz para desactivar a ToBRFV después de 20 minutos en contacto con superficies como aluminio, plástico, polietileno y vidrio (Skelton *et al.,* 2023).

Síntomas causados por ToBRFV

La infección por ToBRFV produce síntomas que suelen ser similares a los observados en plantas infectadas por otros tobamovirus, aunque la severidad de los síntomas varía entre distintos cultivares, plantas, fases de crecimiento y condiciones de cultivo (Zhang *et al*., 2022). En las hojas de plantas de jitomate, los principales síntomas asociados con ToBRFV incluyen clorosis, patrones de mosaico severo, moteado en brotes laterales, en hojas jóvenes se desarrollan ampollas, enchinamiento, marchitez, y estrechamiento de las hojas. En los pedúnculos, cáliz y pecíolos se desarrolla necrosis marrón, y deformación en los sépalos de las flores; en los frutos maduros, no se alcanza la coloración roja (maduración irregular) jaspeado, en frutos verdes se observan manchas cloróticas, rugosas, necróticas y deformaciones; además de que existe disminución del número de frutos por rama (Panno *et al*., 2021; Batuman *et al*., 2020; Mehle *et al*., 2023). La infección por ToBRFV en plantas jóvenes de pimiento suelen ser parecidas a la del jitomate, observándose manchas necróticas de color amarillo y deformación en los frutos (Salem *et al*., 2020) Figura 3.

Figura 3. (A - C) Mosaico en hojas de plantas de jitomate. (C) Estrechamiento de hojas de jitomate. (D) Pedúnculos y cálices secos que conducen a la abscisión del fruto. (E) Necrosis en pedículo, cálices y pecíolos. (F) Manchas amarillas en fruto (GI) Síntomas variables de frutos de tomate cv. Odelia. (G) Manchas irregulares amarillas, marrones y/o verdes. (H) Infecciones mixtas por TSWV y ToBRFV. (I) Arrugamiento de frutos causado por ToBRFV (Luria *et al*., 2017).

Justificación

El virus del bronceado rugoso del fruto del tomate es un patógeno emergente que afecta principalmente al jitomate y pimiento, se ha diseminado rápidamente por el mundo en poco tiempo, transmitiéndose por contacto mecánico con plantas infectadas, por frutos, semillas y a través de insectos vectores, además de que puede sobrepasar la resistencia a otros Tobamovirus, pudiendo causar grandes pérdidas en cultivos como el jitomate u otras especies susceptibles, por lo que es importante identificar y caracterizar aislamientos que afecten diferentes cultivos en distintas partes del mundo y conocer detalladamente el desarrollo del proceso de infección desde las primeras etapas de la infección, la diseminación en la planta y el movimiento sistémico en la misma.

Desde la detección de ToBRFV en 2018 en Michoacán, se ha confirmado su presencia en 79 municipios de 23 estados del país. Este trabajo se propuso aislar a ToBRFV a partir de muestras colectadas en mercados e invernaderos del Estado de Puebla e implementar un método de detección usando oligonucleótidos específicos para la identificación del ToBRFV, además de evaluar la velocidad de diseminación viral en plantas de jitomate.

Objetivos

General

Analizar el comportamiento de ToBRFV durante la infección en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Específicos

Aislar ToBRFV a partir de muestras colectadas en invernaderos mercados del Estado de Puebla

Establecer la detección de ToBRFV mediante la amplificación por RT-PCR de fragmentos virales utilizando oligonucleótidos específicos.

Dilucidar la identidad del virus a partir de la clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados

Determinar la diseminación y acumulación del ToBRFV a 5, 20 y 40 días postinoculación en plantas de jitomate.

Determinar la acumulación de cadenas negativas de RNA de ToBRFV a 5, 20 y 40 días postinoculación en plantas de jitomate.

Materiales y métodos

Obtención de material biológico

Para obtener una fuente de inóculo del ToBRFV se realizó la colecta de frutos y tejido foliar de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) con síntomas de virosis de puestos de mercados de Puebla capital y en invernaderos de los municipios de Atlixco y Chignahuapan en el Estado de Puebla, las cuales fueron trasladadas al laboratorio para después ser procesados y almacenadas a -80°C para su posterior uso.

Obtención de plantas de jitomate para experimentos de infección viral

Para establecer en laboratorio el modelo planta-virus, se utilizaron plantas de jitomate bola (VÍTA, Rancho Los Molinos S.A. de C.V. México), se sembraron a una profundidad de 2 a 3 mm en vermiculita a temperatura ambiente y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, después de 14 días las plántulas se trasplantaron en macetas con sustrato compuesto por vermiculita y compost en una proporción 2 : 1, con 50% de humedad relativa, y se mantuvieron por 20 días en condiciones de invernadero en el Jardín Botánico Universitario de la BUAP.

Después de que las plantas habían alcanzado 15 cm de altura se trasladaron al laboratorio donde se mantuvieron a 23°C, humedad relativa del 50% durante 7 días.

Preparación del inóculo viral y establecimiento de los grupos experimentales

Para el mantenimiento de inóculo fresco viral, se preparó un macerado del tejido criopreservado con síntomas de virosis moliendo en un mortero estéril y frío con 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 8.5, luego se realizó la inoculación de plantas de jitomate frotando con unas pinzas

cubiertas con algodón una hoja de las plantas de jitomate hasta generar heridas en la epidermis de la hoja.

Después de dos semanas post inoculación y tras la aparición de síntomas en las plantas, se colectaron hojas y se maceraron como se mencionó anteriormente, el macerado fue frotado hasta generar lesiones en la epidermis de las primeras hojas verdaderas de un grupo de cinco plantas, como un control de la inoculación viral, las hojas de tres plantas fueron frotadas solo con la solución de fosfatos. Pasando cinco dpi las hojas locales y la primera sistémica fueron colectadas, también se colectaron las hojas sistémicas a 20 y 40 dpi. Cada muestra colectada fue almacenada a - 80°C para ser procesada posteriormente.

Extracción de RNA total a partir de material vegetal

El RNA total de las muestras vegetales se extrajo con el kit TRIZOL Reagent (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) con las modificaciones sugeridas por Wang, G., y cols. (2012), partiendo de 0.15 gramos. El RNA total fue resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas y conservado a -20°C hasta su uso, para poder evaluar la calidad e integridad del RNA total, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se consideraron las absorbancias a 230, 260 y 280 nm usando un nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Munich Alemania).

Diseño de oligonucleótidos de genoma viral

Con el objetivo de determinar la presencia de ToBRFV en las muestras vegetales, se diseñaron cuatro pares de oligonucleótidos específicos (Tabla 1, Figura 4), con base en regiones conservadas observadas en un alineamiento múltiple realizado con el software Geneious ver. 4.8.5 (New Zeland) con 77 secuencias de los genomas completos de ToBRFV aislados en distintas partes del

mundo disponibles en GenBank con los siguientes códigos de acceso: MN882064.1, MN882063.1, MN882062.1, MN882061.1, MN882060.1, MN882059.1, MN882058.1, MN882057.1, MN882056.1, MN882055.1, MN882054.1, MN882053.1, MN882052.1, MN882051.1, MN882050.1, MN882049.1, MN882048.1, MN882047.1, MN882046.1, MN882045.1, MN882044.1, MN882043.1, MN882042.1, MN882041.1, MN882040.1, MN882039.1, MN882038.1, MN882037.1, MN882036.1, MN882035.1, MN882034.1, MN882029.1, MN882028.1, MN882027.1, MN882026.1, MN882025.1, MN882024.1, MN882023.1, MN882022.1, MN882021.1, MN882020.1, MN882019.1, MN882018.1, MN882017.1, MN882016.1, MN882015.1, MN882014.1, MN882013.1, MN882012.1, MN882011.1, MN549396.1, MN549395.1, MN549394.1, MT118666.1, MT107885.1, MN882033.1, MN882032.1, MN882031.1, MN882030.1, MN815773.1, MN182533.2, MK648157.1, MN167466.1, MK319944.1, MT002973.1, MN013188.1, MN013187.1, MK133095.1, MK133093.1, NC_028478.1, KT383474.1, MP875817.1, MP875816.1, MP872415.1, MP872414.1, MK165457.1, KX619418.1. La identidad y especificidad de la secuencia de cada par de oligonucleótidos fue evaluada *in silico* mediante el software Blastn del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Stephen F. A. *et al*. 1997).

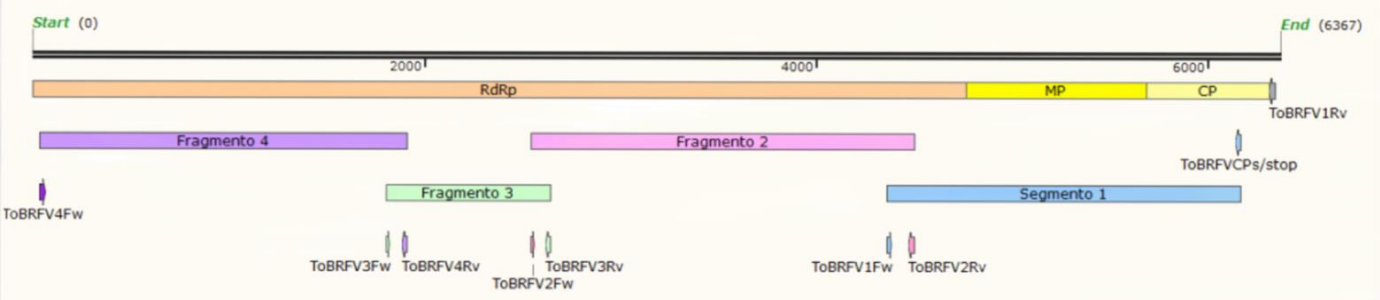

Figura 4. Esquema del genoma de ToBRFV. Se señalan los sitios de unión de los oligonucleótidos y se representan los fragmentos que se amplifican por RT-PCR.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de fragmentos virales. Se muestra la secuencia, el tamaño del oligonucleótido, la Tm teórico, el tamaño esperado del fragmento a amplificar de acuerdo con la combinación de oligonucleótidos y el locus.

Fragmento	Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)	Tm teórica (°C)	Producto (pb)	Locus
1	TOBRFV 1Fw	cgtgtttatggtaccagagaaagagtggg	29	59	1,774	ORF3 (CP), ORF2 (MP),
	TOBRFV CP/Rv	caatggtcctctgcacctgcatct	24	59		
2	TOBRFV 2Fw	tgacggtgtcccgggttgtgg	21	60.98	1960	ORF1b, ORF1a
	TOBRFV 2Rv	ggtgcattttgcggagatgacagttactata	32	59.37		
3	TOBRFV 3Fw	ggtagacccaatgactgcagcaaagg	26	59.79	838	ORF 1a (RdRP)
	TOBRFV 3Rv	ccgggtaagcaggctgctgaaatg	24	60.35		
4	TOBRFV 4Fw	ctatttacaactacaatggcatacacacagacagc	35		1876	ORF 1a (RdRP)
	TOBRFV 4Rv	ctgaagcaaatgtcgcattggcac	24			

Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante partiendo de un 1

µg de RNA total y usando oligo dT u oligonucleótido específico reverso, las mezclas de reacción se incubaron en un termoblock (Myblock mini digital dry bath series, Benchmark scientific, Sayreville NJ USA).

Amplificación por RT-PCR de fragmentos virales con oligonucleótidos específicos

La amplificación de fragmentos virales por PCR fue llevada a cabo con el de kit Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, California USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando los volúmenes de reacción a 10 µl, las reacciones fueron hechas en un termociclador T100 (BIORAD, USA). Para estandarizar las condiciones de reacción, se hicieron ensayos usando gradientes de temperatura para cada par de oligonucleótidos dependiendo el fragmento a amplificar. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% para posteriormente ser visualizados en transiluminador a 254 nm. En el caso de los fragmentos sometidos a clonación, fueron escindidos del gel de agarosa para ser purificados usando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, California USA). Una vez obtenido el fragmento purificado se corroboró la eficiencia del proceso mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Amplificación de templados virales de sentido negativo mediante RT-PCR

Para amplificar templados virales con sentido negativo derivados del proceso de replicación del ToBRFV, se sintetizó el cDNA usando 1 µg del RNA total extraído y 10mM del oligonucleótido ToBRFV 1Fw con el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA). La PCR se llevó a cabo como se mencionó anteriormente, llevando a cabo la estandarización de la reacción mediante gradientes de temperatura para amplificar un fragmento de 147 pb usando el par de oligonucleótidos ToBRFV 1Fw y ToBRFV 2Rv (Tabla 2).

Preparación células competentes

Para la preparación de células competentes se tomó una asada de bacterias a partir de una colonia de *E. coli DH5α,* crecidas en medio LB sólido, con la que se inocularon 2 mL medio LB líquido y se incubaron a 37 °C en agitación toda una noche, con una alícuota del cultivo se inoculó 200 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación hasta conseguir un crecimiento bacteriano con una densidad óptica entre 0.35 – 0.4 a 600 nm, posteriormente el cultivo de células se transfirió a 4 tubos estériles de centrífuga de 50 mL, se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Cada pastilla se resuspendió cuidadosamente en 20 mL de una solución a 100 mM de MgCl frío y se juntaron las soluciones bacterianas en dos tubos para ser centrifugadas a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 40 mL de solución a 100 mM de CaCl2 y se incubaron en hielo por 20 minutos, paralelamente se colocaron tubos de 1.5 mL a enfriar. Pasado el tiempo de incubación las células fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C, al cabo, los precipitados bacterianos se resuspendieron en una solución con 10 mL de 85 mM CaCl2, glicerol 15% y fueron centrifugados a 2,100 rpm por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante de ambos tubos se desechó y se añadieron 400 µL de 85 mM CaCl2, glicerol 15% v/v para resuspender los precipitados bacterianos, finalmente se formaron alícuotas de 50 µL en tubos estériles de 1.5 mL los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

Ligación y clonación de productos de RT-PCR

Una vez que se purificó el fragmento viral obtenido por RT-PCR, se llevó a cabo un tratamiento para eliminar la cola de adeninas que deja la enzima Dream Taq Polimerasa usando el kit Anza

DNA Blunt End (Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente el fragmento fue ligado al plásmido 49330 digerido previamente con la enzima de restricción *SmaI* (FastDigest Value Pack Unit, Thermo Scientific, California USA); la reacción de ligación se llevó a cabo usando el kit T4 DNA ligase (Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez concluida la reacción de ligación, se transformaron células competentes (*E. coli DH5α*) con 10µL de producto de dicha reacción, el vial con las células se sometió a un choque de calor a 42°C por 1 minuto para después ser colocado en hielo durante 5 minutos, al cabo de ese tiempo se agregó 1 mL de medio LB líquido al vial consecuentemente las células se incubaron en agitación por 1 hora en a 37°C en agitación a 150 rpm, después dicha incubación, las células fueron precipitadas centrifugando por 1 minuto a 8,000 rpm; en campana de flujo laminar se desechó aproximadamente 1 mL del medio y la pastilla se resuspendió con el medio sobrante. Finalmente, la suspensión bacteriana se sembró sobre una placa con LB con 50 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37 °C durante 18 horas para permitir el crecimiento de colonias transformantes.

Extracción de DNA plasmídico

Para extraer el plásmido a partir de colonias bacterianas candidatas transformantes, se seleccionaron al azar colonias aisladas, las cuales se sembraron en 5 mL de medio LB líquido con 50 µg/mL de ampicilina e incubaron en agitación a 180 rpm a 37°C por 16 horas, pasando ese tiempo las bacterias fueron cosechadas mediante centrifugación a 8,000 rpm durante un minuto, la pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µL solución amortiguadora TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA•Na_2), luego se agregaron 100 µL de solución de lisis (0.2 N NaOH, 1% (p/v) SDS),

y se incubó por cuatro minutos a temperatura ambiente (24°C), después se agregaron 120 µL de solución de neutralización (5M acetato de potasio pH 6, ácido acético glacial) y se incubó en hielo por 5 minutos, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 7 minutos, se recolectó en un tubo nuevo 250 µL de sobrenadante, se agregó un volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante 20 minutos, la mezcla se centrifugó 8 minutos a 12,000 rpm, el precipitado se lavó con 400 µL de etanol al 75% centrifugando un minuto a 12,000 rpm. Posteriormente el precipitado resultante se secó a temperatura ambiente y se diluyo en 20 µL de agua libre de nucleasas. Para verificar la presencia del inserto en el plásmido se realizó la amplificación por PCR del fragmento viral de 142 pb haciendo uso del par de oligonucleótidos TOBRFV 1Fw y TOBRFV 2Rv, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las colonias portadoras del plásmido que resultaron positivas a portar el fragmento viral 1 fueron sembradas nuevamente en 5 mL de medio LB con 50 µg/mL de ampicilina para extraer el plásmido con el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep (Zymo Research, California USA) o para ser almacenadas a -80 °C en medio LB con 50 µg/mL de ampicilina y 15 % glicerol.

Secuenciación y análisis de la secuencia del fragmento 1

Una vez que se purificó el plásmido portador del fragmento 1, se envió secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato; la secuenciación en capilar por Sanger se realizó con los oligonucleótidos TOBRFV 1Fw y TOBRFV CP/Rv, una vez conocida la lectura de nucleótidos, se analizó mediante el software BLAS disponible en la plataforma NCBI, la búsqueda de ORFs fue llevada a cabo con el software Geneious ver. 4.8.5 (New Zeland).

Resultados

Aislamiento de ToBRFV a partir de muestras vegetales colectadas

Para poder obtener un aislamiento del ToBRFV se tomaron muestras de hojas con síntomas de virosis como arrugamiento, disminución del área foliar, moteado y clorosis, así como de frutos que presentaban arrugas y manchas amarillentas e irregulares (figura 5).

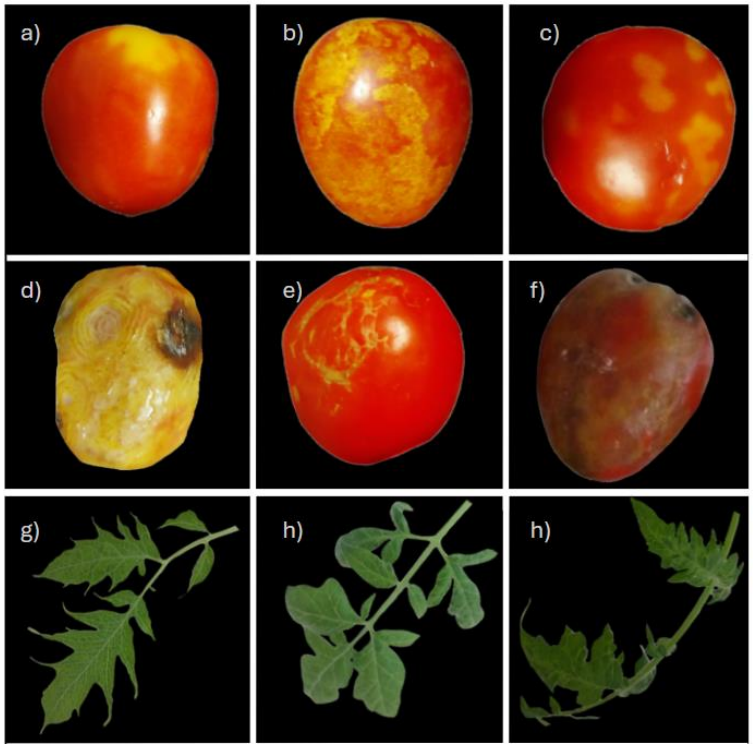

Figura 5. Muestras de frutos de jitomate con síntomas (a-c) amarillamiento y moteados, (d-f) rugosidad, (d y f) necrosis y (g-h) hojas con síntomas de enchinamiento y clorosis intervenal candidatas para estar infectadas con ToBRFV.

Una porción de las muestras fue almacenada en ultracongelación a -80°C, mientras que el resto fue usado para extraer el RNA total, el cual fue sometido a electroforesis en gel de agarosa para verificar su integridad, además de cuantificarse mediante espectrofotometría (figura 6).

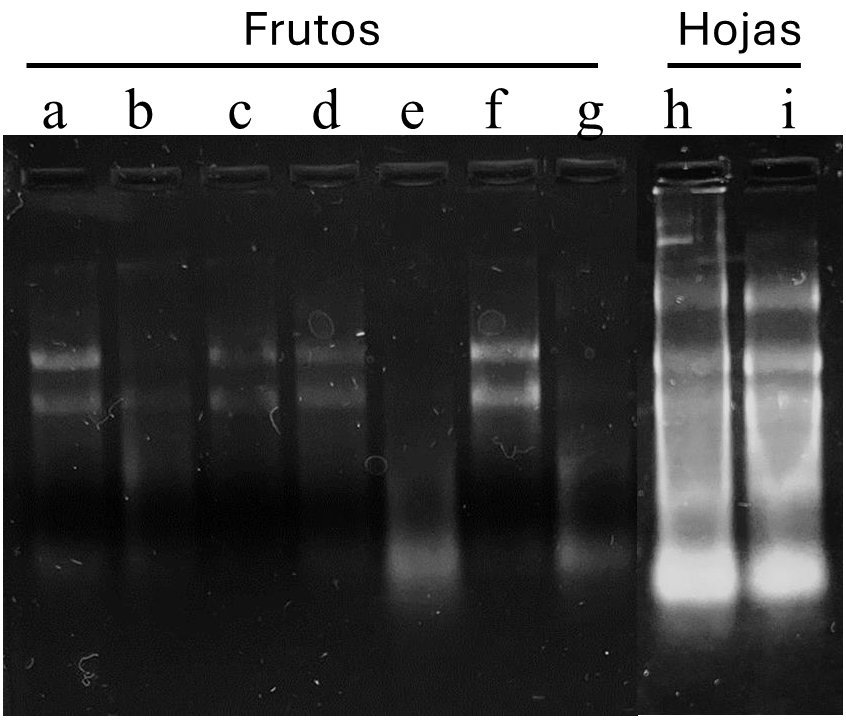

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total de frutos y hojas de plantas de jitomate con síntomas de virosis y candidatas a infección por ToBRFV.

Estandarización de la amplificación de fragmentos virales mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos

Una vez que se verificó la integridad del RNA total, se realizaron dos mezclas del RNA, una proveniente de frutos y la otra de hojas, estas se usaron como templado para realizar reacciones de reversotranscripción con oligonucleótidos específicos para fragmentos de ToBRFV y con oligo dT; los cDNAs obtenidos se usaron para ensayar la amplificación de fragmentos virales usando

cuatro pares de oligonucleótidos específicos (Tabla 2, Fragmentos 1 a 4) y gradientes de temperatura.

Los resultados observados después de la electroforesis de los productos de RT-PCR hecha con el par de oligonucleótidos ToBRFV 1Fw y ToBRFV CP/Rv mostraron la amplificación de un único fragmento entre los 1650 y 2000 pares de bases únicamente a partir del cDNA sintetizado con la mezcla de RNA total proveniente de hojas (Figura 7, lado izquierdo), aunque el fragmento se puede observar en los carriles correspondientes a las reacciones realizadas con las tres temperaturas de alineamiento diferentes, en los carriles b y c (58.8°C y 61.1°C) en notorio una mayor cantidad del fragmento esperado (Tabla 1), no obstante, a partir del cDNA hecho con RNA total obtenido de frutos, no se visualizó algún producto de amplificación (Figura 7, lado derecho).

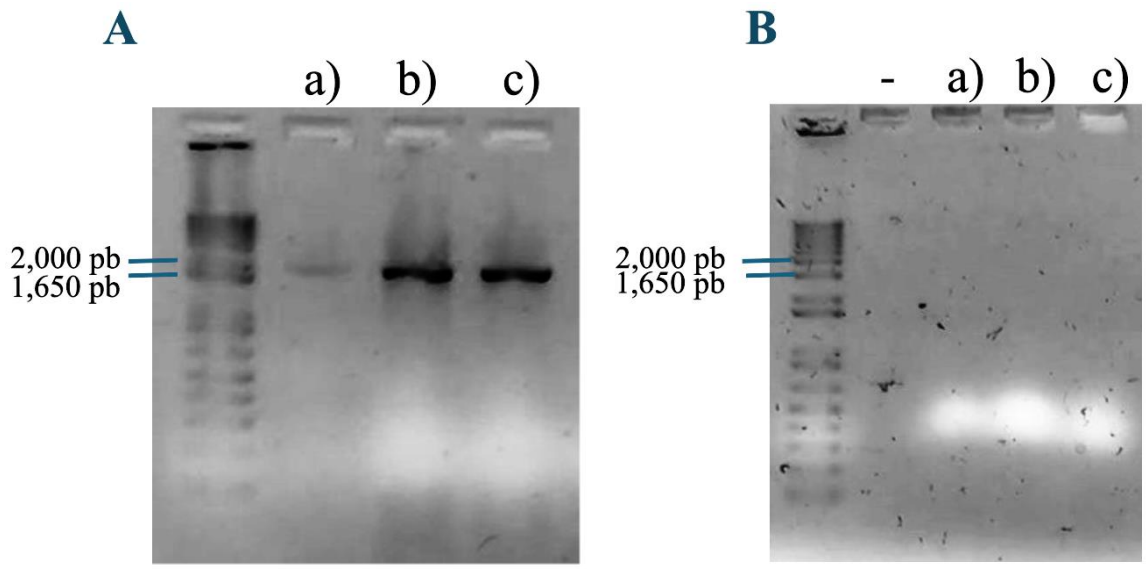

Figura 7. Detección de ToBRFV a partir de cDNA sintetizado con una mezcla de RNA total de hojas (A) y frutos (B). La PCR fue realizada con gradiente de temperatura para la fase de alineamiento a) 56.9°C, b) 58.8°C y c) 61.1°C, se incluyó un control negativo puesto con temperatura de alineamiento a 56.6°C. El fragmento esperado es de 1774 pares de bases.

Una vez que se logró amplificar el fragmento viral 1 con un tamaño esperado, se ensayaron reacciones con 56.9°C, 58.8°C y 61.1°C para la fase de alineamiento y con los pares de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos 2, 3 y 4 del genoma de ToBRFV (Tabla 2).

El patrón electroforético de los productos de las reacciones realizadas mostró la presencia de una banda entre los 1650 y 2000 pares de bases para el fragmento 2, una banda entre los 650 y 850 pares de bases para el fragmento 3 y una banda cercana a los 1650 pares de bases para el fragmento 4 (figura 8), con tamaños muy cercanos a los esperados (Tabla 1).

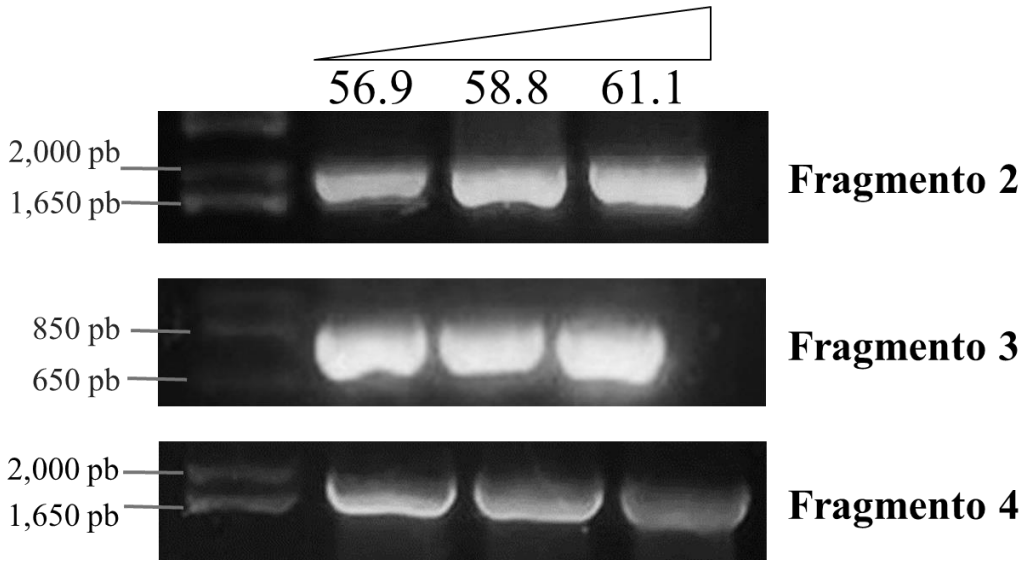

Figura 8. Productos de RT-PCR de ToBRFV fragmento 2 de 1960 pb, usando los oligonucleótidos TOBRFV2Fw y ToBRFV2R, fragmento 3 de 1960 pb, generado con los oligonucleótidos TOBRFV3Fw y ToBRFV3R y fragmento 4 de 1876 pb, generado con los oligonucleótidos ToBRFV4Fw y ToBRFV4R. Se muestran las temperaturas del gradiente establecido.

Adicionalmente se amplificó un fragmento de 6367 pb, que representa la región codificante del genoma de ToBRFV, para esta reacción se usó la combinación de oligonucleótidos ToBRFV4Fw y ToBRFV1Rv y un gradiente de temperatura para la fase de alineamiento; la electroforesis de los

productos de la PCR mostró bandas con el tamaño esperado (Figura 9, Tabla 2), otro fragmento que se logró amplificar fue el resultante de reacciones hechas con la combinación de oligonucleótidos ToBRFV 1Fw y ToBRFV 2RV observándose una banda de aproximadamente 147 pb, esta reacción se estableció para poder detectar en menor tiempo la presencia de ToBRFV (Figura 9, Tabla 2).

Tabla 2, Combinaciones de oligonucleótidos para la amplificación del genoma viral o para llevar a cabo la detección rápida de ToBRFV.

Fragmento	**oligonucleótidos**	**Tamaño del producto (pb)**
TOBRFV genómico	TOBRFV 4Fw TOBRFV 1Rv	6,367
Fragmento 1-2	TOBRFV 1Fw TOBRFV 2Rv	147
Fragmento 3-4	TOBRFV 3Fw TOBRFV 4Rv	1607

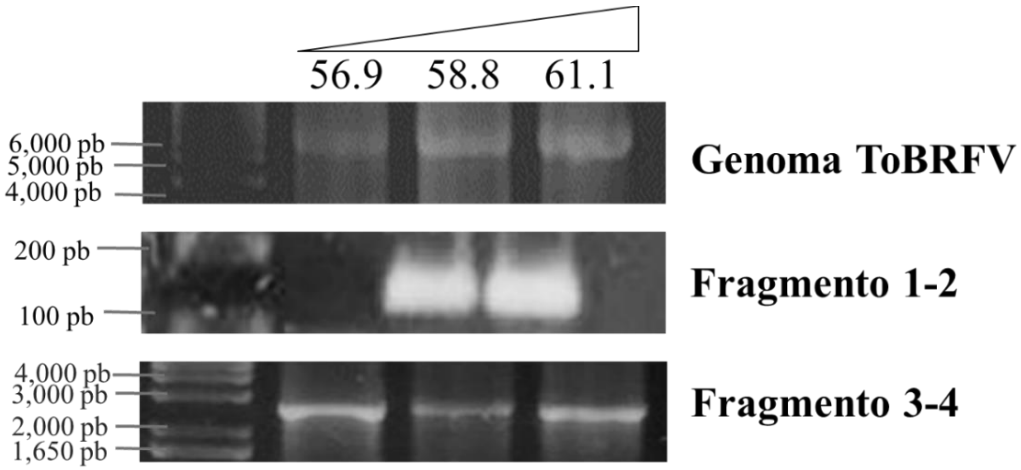

Figura 9. Amplificación por RT-PCR del fragmento de la secuencia codificante del genoma completo de ToBRFV, con una longitud de 6,367 pb, también un fragmento de 147 pb para realizar la detección rápida de ToBRFV (Fragmento 1-2) y un fragmento de 1,607 pb con el par de oligonucleótidos ToBRFV4Fw y ToBRFV3R, se empleó un gradiente de temperatura (56.9°C, 58.8°C y 61.1°C) en el alineamiento de los oligonucleótidos.

Análisis de la secuencia del fragmento viral 1

Para conocer la identidad del fragmento viral 1, se llevó a cabo su clonación y secuenciación. Una vez que se analizó la secuencia de 1774 nucleótidos mediante el software Geneious, se identificaron tres marcos de lectura abiertos, el primero correspondiente a los últimos 526 nucleótidos del gen de la subunidad b de la RdRp, el cual se encuentra sobrelapado en la secuencia de la MP, el segundo a los 801 nucleótidos que codifican para la MP y el tercero a los 453 nucleótidos dos que codifican a la CP (Figura 10).

El análisis de la secuencia obtenida con el software BLASTn disponible en la plataforma de NCBI, mostró valores de cobertura e identidad del 100%, además de un valor de E 0.00004 al compararse con secuencias de distintos aislamientos del ToBRFV, lo que prueba la identidad del aislamiento obtenido, teniendo mayor identidad con el aislamiento IR-Pep (Tabla 3).

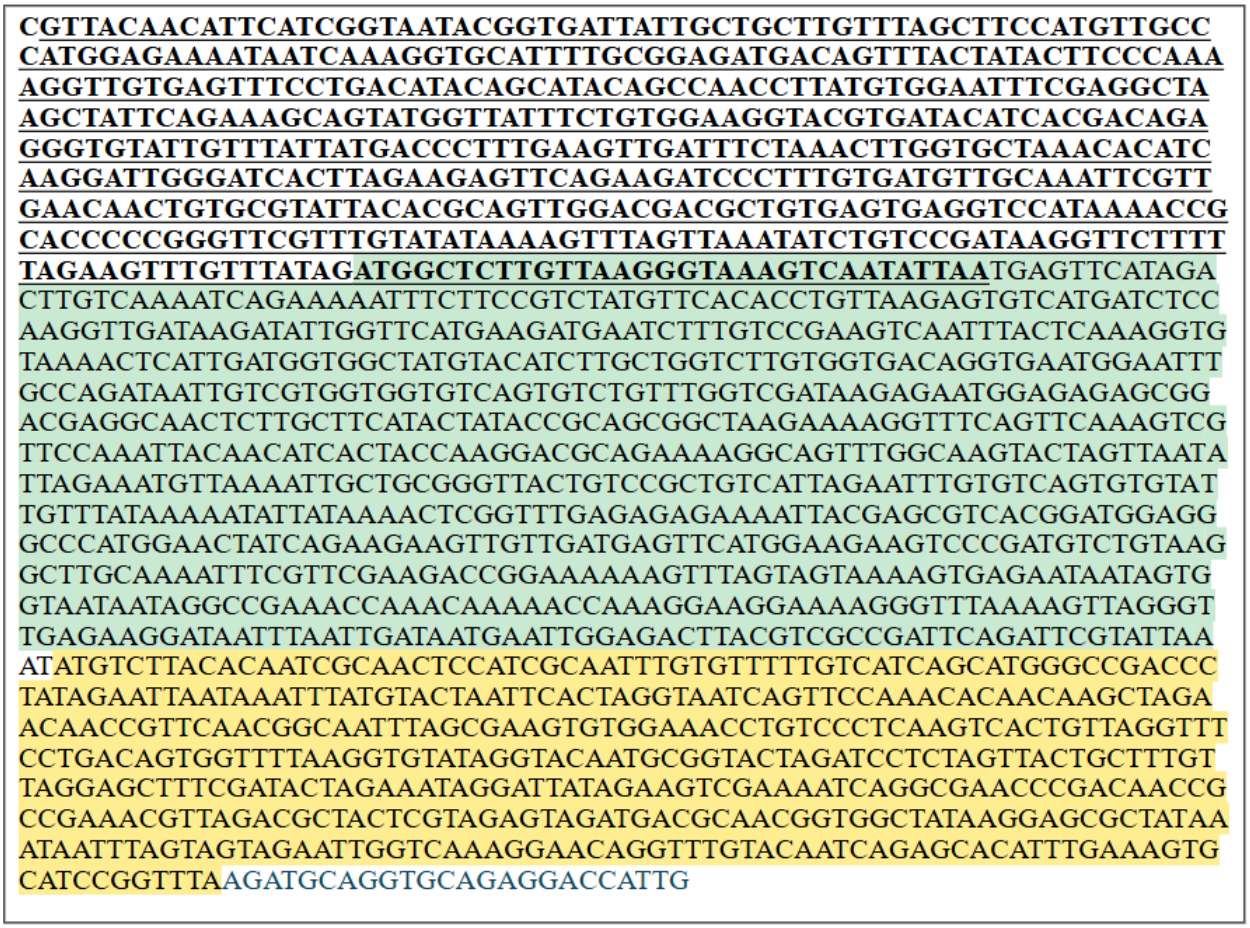

Figura 10. Secuencia de fragmento viral 1 (1774 pb). Subrayado y en negritas se representa una porción del ORF 1b, en verde el ORF de la MP y en amarillo el ORF de la CP.

Tabla 3. Resultados de la comparación de la secuencia del fragmento 1 hecha con BLASTn en NCBI.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per Ident	Acc Len	Accession
Tomate brown rugose fruit virus isolate IR-Pep_complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6392	ON528712.1
Tomate brown rugose fruit virus isolate ToBRFV-HB complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6429	PP796738.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate ToBRFV_G78_RB, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6363	OR760199.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate ToBRFV_G78_NRB, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6363	OR760198.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate A134T, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6392	PP681638.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 422265_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6385	OQ633222.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 422187_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6374	OQ633221.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402275_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6373	OQ633220.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402185_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6368	OQ633219.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402175_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6375	OQ633218.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402174_2, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6382	OQ633217.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402172_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6375	OQ633216.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402171_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6350	OQ633215.1
Tomato brown rugose fruit virus isolate 402169_1, complete genome	58.0	58.0	100%	4e-05	1000.00%	6382	OQ633214.1

Dinámica de infección viral en plantas de jitomate

En este estudio, se monitoreó el desarrollo de la infección por ToBRFV en plantas de jitomate a través de dos replicas experimentales independientes. Aunque los síntomas observados en las plantas variaron en la primera réplica realizada en primavera se observó la aparición de clorosis intervenal a los cinco dpi, a los 21 dpi se observó enchinamiento de las hojas y clorosis intervenal y a los 40 dpi los síntomas fueron más severos, incluyendo hojas con clorosis y necrosis, además deformaciones foliares como enchinamiento y una notable disminución en la turgencia. En la segunda replica realizada durante el invierno se observó un mayor número de hojas con clorosis en los primeros cinco dpi, para el día 21, las hojas mostraban caída y enchinamiento, sin embargo, al día 40 las plantas mostraron una disminución de los síntomas (Figura 11).

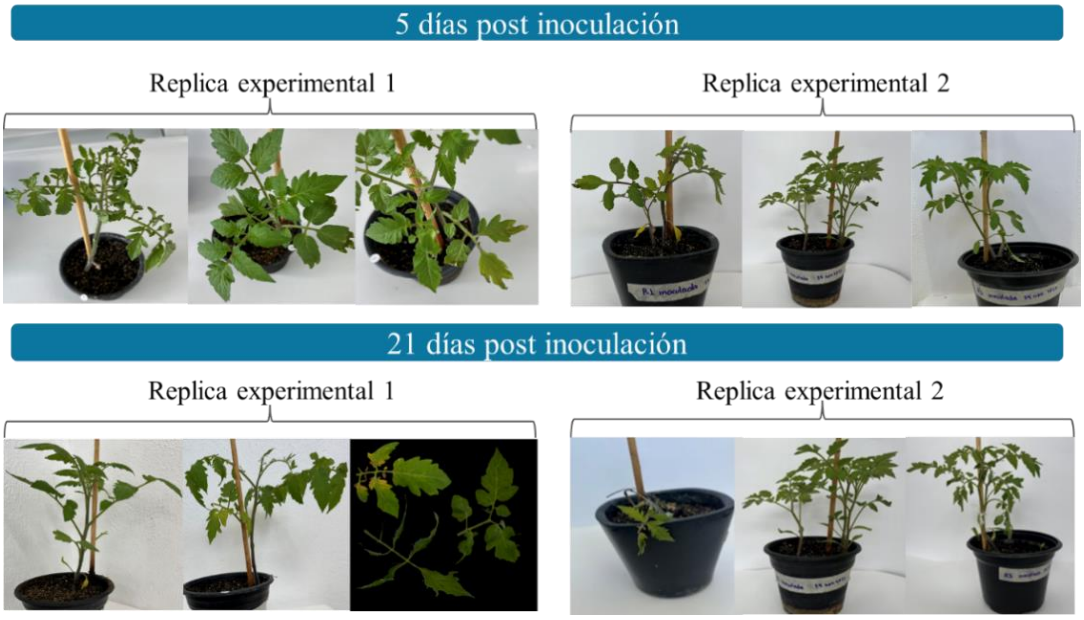

Figura 11. Desarrollo de síntomas en plantas de jitomate.

Dado que se estandarizó la detección de ToBRFV por RT-PCR, fue posible detectarlo a partir de cDNA generado con 1 µg de RNA total de hojas locales y la primera sistémica de tres plantas de jitomate en cada replica experimental a los 5 dpi (Figura 12); la electroforesis de los productos de RT-PCR mostró la presencia del fragmento de 1774 pb en estas hojas, siendo mayor la acumulación viral en las hojas sistémicas de las plantas de la réplica 1, y todavía mayor en las hojas de las plantas de la réplica experimental 2. Adicionalmente, se realizó la detección de templados virales con sentido negativo que funcionan como intermediarios en la replicación de ToBRFV; los fragmentos correspondientes a estos templados fueron detectados en hojas locales y una sistémica de plantas de la réplica experimental 2, en conjunto estos resultados sugieren que ToBRFV puede replicarse y diseminarse a los cinco dpi. Como un control de la eficiencia de las reacciones se amplificó un fragmento de 159 pb del cDNA correspondiente a 18S.

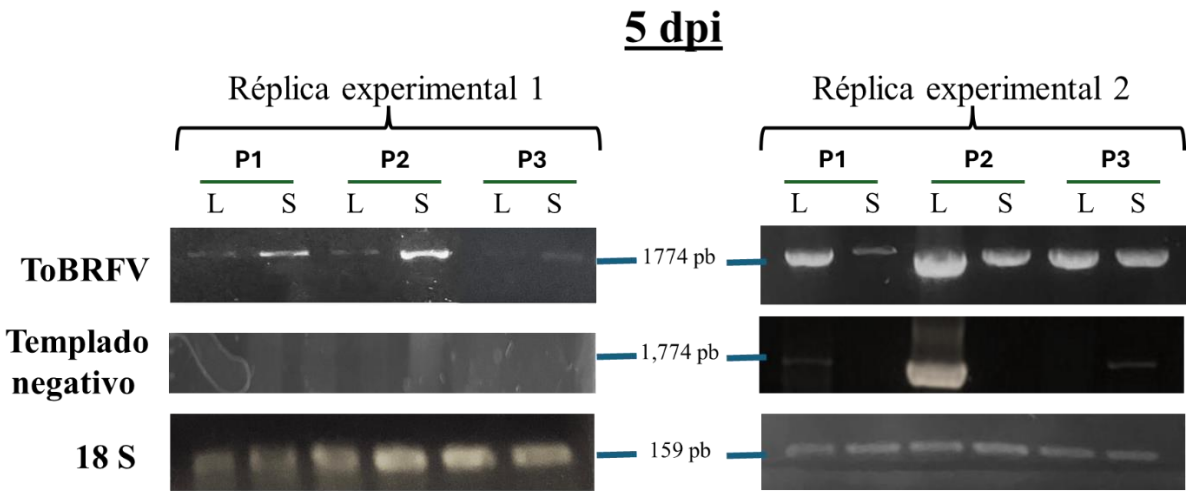

Figura 12. Detección de ToBRFV en jitomate a 5 dpi. Amplificación del segmento 1 con longitud de 1774 pb. Se amplificó 18S como un control de la eficiencia de la reacción 159 pb. P1, P2 y P3 indican la detección viral en tres plantas independientes.

ToBRFV también fue detectado a los 20 dpi en hojas sistémicas en plantas de las dos replicas experimentales, no obstante, en plantas de la réplica 2 llevada a cabo durante el invierno, la acumulación de ToBRFV fue menor que en las plantas de la réplica 1 llevada a cabo durante la primavera, también se llevó a cabo la detección de RNA de cadena negativa el cual solo fue detectado en las plantas de la réplica 1 donde la cantidad de templados virales positivos fue mayor. Finalmente, ToBRFV fue detectado en hojas sistémicas a 40 dpi en plantas de las dos réplicas experimentales, siendo su acumulación mayor en plantas de la primera réplica experimental y que al igual que en el ensayo montado a 20 dpi, la detección de templados con sentido negativo solo se logró en plantas de la primera réplica experimental donde la acumulación de ToBRFV fue mayor (Figura 13). Como un control de la eficiencia de las reacciones se llevó a cabo la amplificación del cDNA correspondiente al RNA ribosomal 18 S.

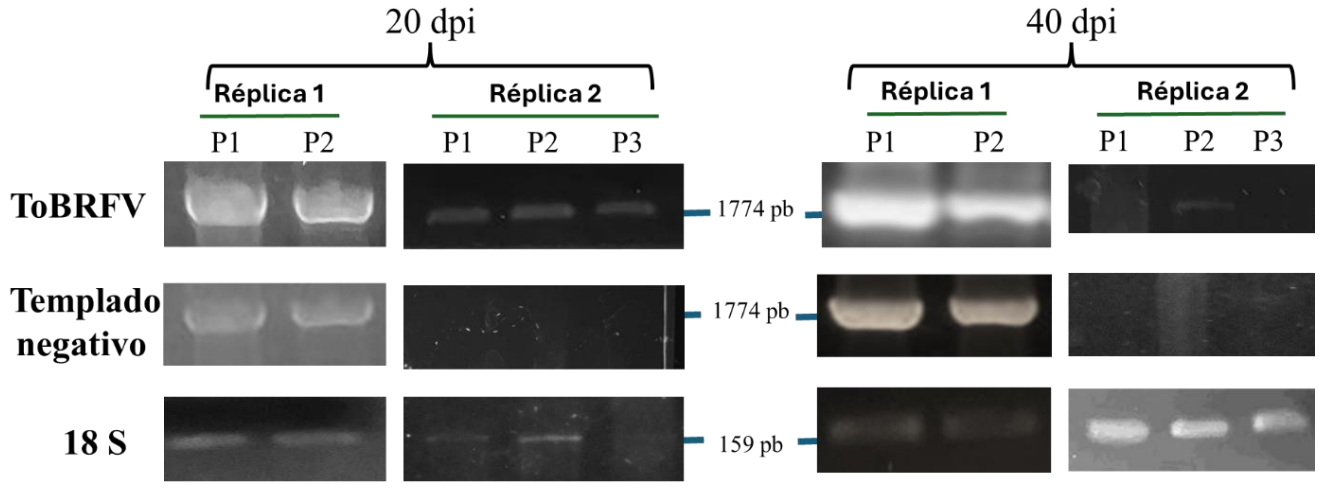

Figura 13. Amplificación del segmento 1 de ToBRFV e intermediaros replicativos de sentido negativo en hojas sistémicas de plantas de jitomate a 20 y 40 dpi. También se amplificó el cDNA del RNA ribosomal 18 S como control de la eficiencia de la reacción.

Discusión

Aislamiento e identificación de ToBRFV

ToBRFV fue detectado inicialmente en plantas de jitomate en invernaderos de Israel (Luria *et al*., 2017), en poco tiempo se ha reportado la propagación de este virus en diversas partes del mundo (Salem *et al*., 2023), en México la detección de ToBRFV fue hecha en Baja California Sur en el mes de julio de 2018 (Camacho-Beltrán *et al*., 2019) y después en Michoacán en el mes de septiembre del mismo año (Cambrón-Crisantos, 2019), aunque de acuerdo con datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), ToBRFV ha sido detectado en 23 Estados de la República Mexicana, incluido el Estado de Puebla (SENASICA, 2024; EPPO, 2024); como resultado de este trabajo se obtuvo un aislamiento viral a partir de muestras de plantas de invernadero establecido en el Estado de Puebla, que mostraban los síntomas que se han descrito para ToBRFV (Salem, 2023), dicho aislamiento permitió amplificar por RT-PCR con oligonucleótidos para ToBRFV, un fragmento de 1774 pb, siendo este método y algunas de sus variantes el sistema de detección más utilizado debido a su sensibilidad y especificidad (Panno, *et al*., 2019; Rodríguez, *et al*., 2019; Nolasco, *et al*., 2020; Rizzo, *et al*., 2021; Tiberini, *et al*., 2022), aunque la RT-PCR fue positiva, la secuenciación de dicho fragmento reveló la identidad del virus aislado (Figura 10 y tabla 3), esta secuencia codifica una porción del ORF 1b, el ORF de la MP y el ORF de la CP, y se ha probado a través de análisis filogenéticos o comparación de secuencias, que estas son suficientes para demostrar la identidad de ToBRFV (Maayan *et al*., 2018), además, la traducción *in silico* del ORF de la MP (Figura 14) mostró la presencia de los residuos H^{67}, N^{125},

K^{129}, A^{134}, I^{147} y I^{168} en su región central, los cuales son relevantes para el escape de ToBRFV del reconocimiento del gen de resistencia *Tm- 2^2* en jitomate (Yang *et al.*, 2021).

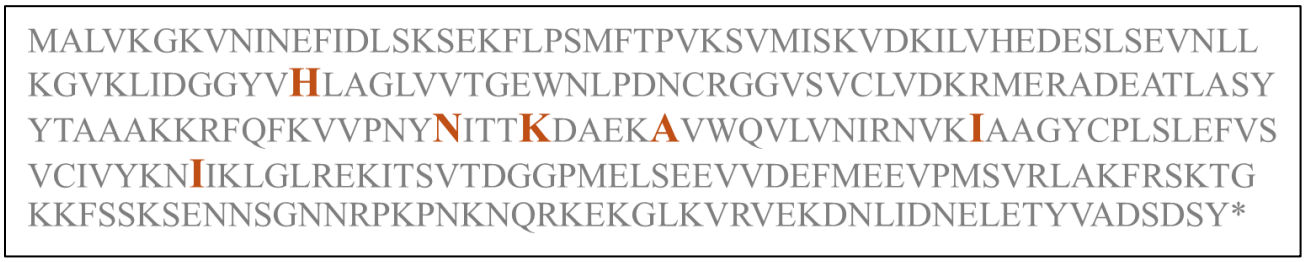

Figura 14. Traducción *in silico* del ORF de MP de ToBRFV, en café se señalan los residuos H^{67}, N^{125}, K^{129}, A^{134}, I^{147} y I^{168} que permiten sobrepasar la resistencia a *Tobamovirus* en jitomate.

Esto indica que se logró obtener un aislamiento del ToBRFV aunque se debe de corroborar por secuenciación del genoma completo la identidad de este aislamiento.

Dinámica de la infección por ToBRFV en plantas de jitomate

La diseminación y replicación de virus de RNA ha sido observada en distintos modelos vegetales, por ejemplo, los virus X y Y de la papa en tabaco (Vance, 1991), el virus del jaspeado del tabaco en *Arabidopsis thaliana* (Contreras-Paredes, *et al*., 2013), los virus del mosaico y de la mancha necrótica anular de la papaya, en papaya (Chávez-Calvillo, et al., 2016; Vargas *et al.*, 2020), en este trabajo se dilucidó el tiempo que tarda el ToBRFV en moverse de la hoja local a hojas sistémicas; aunque los síntomas de virosis fueron apreciados a los 21 dpi en las plantas infectadas, la detección molecular de ToBRFV se probó a partir de los 4 dpi, sin ser esta positiva (datos no mostrados), sin embargo el virus se pudo detectar a partir de los 5 dpi tanto en hojas locales como en la primera hoja sistémica de plantas de las dos replicas experimentales, habiendo mayor acumulación de templado viral y evidencia de la replicación viral en las plantas de la segunda réplica experimental, desarrollada durante el invierno. Es importante considerar que existen

factores que influyen en el tiempo que tardan los virus en invadir sistémicamente al hospedero tales como la temperatura del ambiente, la variación en la cantidad de inóculo depositado en las plantas, además de la especie y el aislamiento viral, y la especie vegetal hospedadora, la cual puede desarrollar diversas respuestas ante la infección por ejemplo, susceptibilidad o tolerancia, silenciamiento del RNA, la diferencia de velocidad de movimiento del virus dentro de las células epidérmicas y mesofílicas hacia células del floema, siendo mayor en el tejido floemático (Salem *et al*., 2022; Wang *et al*., 2024; Favara *et al*., 2019). Interesantemente aunque la detección de ToBRFV se llevó a 20 y 40 dpi, solo en las plantas de la réplica 1 se pudo detectar una mayor acumulación de templado viral y del intermediario replicativo de sentido negativo, pero no en las plantas de la segunda réplica experimental, a pesar de que en estas se observó una mayor acumulación de templado viral a 5 dpi, es posible que debido al clima de la temporada del año en el que se desarrollaron cada réplica experimental o la misma fenología de la planta, algún mecanismo de resistencia haya sido elicitado y regulado la replicación y acumulación de los templados virales (Carr *et al*., 2010; Ishibashi y Ishikawa, 2016; Chujo *et al*., 2015). Estos datos sugieren que el ToBRFV es capaz de llevar a cabo su movimiento sistémico y su replicación en jitomate a partir de los 5 dpi, evidenciando síntomas de virosis hasta los 21 dpi, aunque al parecer es importante la condición climática para que se lleven a cabo estos procesos.

Conclusión

A partir de las observaciones realizadas en este trabajo se puede concluir que se logró obtener un aislamiento del ToBRFV a partir de muestras de invernadero en el Estado de Puebla, se estableció un método de detección mediante RT-PCR, y se validó la identidad del virus mediante la secuenciación del fragmento amplificado, lo que además presenta la generación de una herramienta que puede ser usada para favorecer a la población, particularmente a los productores de cultivos susceptibles al virus, permitiendo la detección del patógeno. Finalmente se logró determinar el tiempo que ToBRFV tarda en diseminarse desde la inoculación de la planta, sugiriendo que además de las condiciones bióticas el clima en el que se desarrollen las plantas infectadas puede ser determinante para permitir la acumulación, replicación y movimiento del virus. No obstante, la perspectiva que se genera es obtener la secuencia completa del genoma del virus y poder inferir sobre su origen a través de análisis filogenéticos, de igual forma realizar nuevas réplicas experimentales que validen lo observado con respecto a la diseminación y replicación viral dependiente de la condición del clima.

Referencias

Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Kreuze, J. (2009). Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. Archives of virology, 154(12), 1967–1972. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0506-6

Adkar-Purushothama, C. R., Sano, T., & Perreault, J. P. (2018). Viroid-derived small RNA induces early flowering in tomato plants by RNA silencing. Molecular plant pathology, 19(11), 2446–2458. https://doi.org/10.1111/mpp.12721

Alfaro-Fernández, A., Castillo, P., Sanahuja, E., Rodríguez-Salido, M. C., & Font, M. I. (2021). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato in Spain. Plant Disease, 105(2), 515. https://doi.org/10.1094/pdis-06-20-1251-pdn

Alkowni, R., Alabdallah, O. & Fadda, Z. (2019) Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. Journal of Plant Pathology, 101, 719–723. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7

Alon, D. M., Hak, H., Bornstein, M., Pines, G., & Spiegelman, Z. (2021). Differential detection of the tobamoviruses tomato mosaic virus (Tomv) and tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) using crispr-cas12a. Plants, 10(6). https://doi.org/10.3390/plants10061256

Amer, M., & Mahmoud, S. (2020). First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Egypt. New Disease Reports, 41(1), 24. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.024

Antignus, Y., Lachman, O., & Pearlsman, M. (2007). Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in Greenhouse Tomato Crops Is Associated with Seed Transmission and Bumble Bee Activity. Plant disease, 91(1), 47–50. https://doi.org/10.1094/PD-91-0047

Ascencio-Ibáñez, J. T., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. Plant disease, 83(12), 1178. https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1178A

Aviña, K., Rivera, R., Kovalskaya, N. Y., & Hammond, R. W. (2018). Pospiviroid Infection of Tomato Regulates the Expression of Genes Involved in Flower and Fruit Development. Viruses, 10(10), 516. https://doi.org/10.3390/v10100516

Aviña, K., Zamora, E. J., Ochoa, D. L., Alcántar, F. C., Hernández, M., Calderón, L., & Hammond, R. W. (2022). Mexico: A Landscape of Viroid Origin and Epidemiological Relevance of Endemic Species. Cells, 11(21), 3487. https://doi.org/10.3390/cells11213487

Avni, B., Gelbart, D., Sufrin-Ringwald, T., Zemach, H., Belausov, E., Kamenetsky-Goldstein, R., & Lapidot, M. (2022). ToBRFV Infects the Reproductive Tissues of Tomato Plants but Is Not Transmitted to the Progenies by Pollination. *Cells*, *11*(18), 2864. https://doi.org/10.3390/cells11182864

Bae, J. Y., Wu, J., Lee, H. J., Jo, E. J., Murugaiyan, S., Chung, E., & Lee, S. W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. Journal of microbiology and biotechnology, 22(12), 1613–1620. https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08072

Bananej K, Keshavarz T, da Silva JP, Zerbini FM (2023) Isolation and whole-genome sequencing of tomato brown rugose fruit virus from pepper in Iran. Journal of Plant Diseases and Protection 131, 49–55

Barajas-Ortiz, M., León-Sicairos, C. R., López-Valenzuela, J. A., Reyes-Moreno, C., Valdez-Ortiz, A., Velarde-Félix, S., Peraza-Garay, F., & Garzón-Tiznado, J. A. (2013). Transmission efficiency of tomato apex necrosis virus by Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype B in tomato. Journal of economic entomology, 106(4), 1559–1565. https://doi.org/10.1603/ec12223

Batuman, O., Yilmaz, S., Roberts, P., McAvoy, E., Hutton, S., Det, K., Adkins, S. (2020) Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV): A Potential Threat for Tomato Production in Florida. PP360, e Plant Pathology Department, UF/IFAS.

Beris, D., Malandraki, I., Kektsidou, O., Theologidis, I., Vassilakos, N., & Varveri, C. (2020). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Tomato in Greece. Plant Disease, 104(7), 2035. https://doi.org/10.1094/pdis-01-20-0212-pdn

Bernabé, J. M., Torre, C., Méndez, E., Hernando, Y., & Aranda, M. A. (2021). New Resources for the Specific and Sensitive Detection of the Emerging Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Viruses, 13(9), 1680. https://doi.org/10.3390/v13091680

Borniego, M. B., Karlin, D., Peña, E. J., Robles Luna, G., & García, M. L. (2016). Bioinformatic and mutational analysis of ophiovirus movement proteins, belonging to the 30K superfamily. Virology, 498, 172–180. https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.027

Buoso, S., Musetti, R., Marroni, F., Calderan, A., Schmidt, W., & Santi, S. (2022). Infection by phloem-limited phytoplasma affects mineral nutrient homeostasis in tomato leaf tissues. Journal of plant physiology, 271, 153659. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153659

Camacho-Beltrán, E., Pérez-Villarreal, A., Leyva-López, N. E., Rodríguez-Negrete, E. A., Ceniceros-Ojeda, E. A., & Méndez-Lozano, J. (2019). Occurrence of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato Crops in Mexico. Plant Disease, 103(6), 1440-1440.

Cambrón-Crisantos, José Manuel, Rodríguez-Mendoza, Johan, Valencia-Luna, Jessica Berenice, Alcasio Rangel, Salomé, García-Ávila, Clemente de Jesús, López-Buenfil, José Abel, & Ochoa-Martínez, Daniel Leobardo. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan,

Mexico. Revista mexicana de fitopatología, 37(1), 185-192. Epub 21 de agosto de 2020.https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-5

Carr, J. P., Lewsey, M. G., & Palukaitis, P. (2010). Signaling in induced resistance. Advances in virus research, 76, 57–121. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76003-6

Chanda, B., Gilliard, A., Jaiswal, N., & Ling, K. S. (2021). Comparative Analysis of Host Range, Ability to Infect Tomato Cultivars with Tm-22 Gene, and Real-Time Reverse Transcription PCR Detection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Plant disease, 105(11), 3643–3652. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1070-RE

Chanda, B., Rivera, Y., Nunziata, S. O., Galvez, M. E., Gilliard, A., & Ling, K. S. (2020). Complete Genome Sequence of a Tomato Brown Rugose Fruit Virus Isolated in the United States. Microbiology resource announcements, 9(29), e00630-20. https://doi.org/10.1128/MRA.00630-20

Chávez-Calvillo, G., Contreras-Paredes, C. A., Mora-Macias, J., Noa-Carrazana, J. C., Serrano-Rubio, A. A., Dinkova, T. D., Carrillo-Tripp, M., & Silva-Rosales, L. (2016). Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in Carica papaya is determined by their order of infection. Virology, 489, 179–191. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.026

Chujo, T., Ishibashi, K., Miyashita, S., & Ishikawa, M. (2015). Functions of the 5'- and 3'-untranslated regions of tobamovirus RNA. Virus research, 206, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.028

Citovsky, V., & Zambryski, P. (1991). How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections?. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 13(8), 373–379. https://doi.org/10.1002/bies.950130802

Constable, F., Chambers, G., Penrose, L., Daly, A., Mackie, J., Davis, K., Rodoni, B., & Gibbs, M. (2019). Viroid-infected Tomato and Capsicum Seed Shipments to Australia. Viruses, 11(2), 98. https://doi.org/10.3390/v11020098

Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L., & Asurmendi, S. (2017). Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins. Annals of botany, 119(5), 737–747. https://doi.org/10.1093/aob/mcw216

Contreras-Paredes, C. A., Silva, L., Daròs, J., Alejandri, N. D., y Dinkova, T. D. (2013). The Absence of Eukaryotic Initiation Factor eIF(iso)4E Affects the Systemic Spread of a Tobacco etch virus Isolate in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant-Microbe Interactions, 26(4), 461-470. https://doi.org/10.1094/mpmi-09-12-0225-r

Creager A. N. H. (2022). Tobacco Mosaic Virus and the History of Molecular Biology. Annual review of virology, 9(1), 39–55. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100520-014520

Cultrona M, Bonini N, Pacifico D, Tessitori M (2024) First report of Convolvulus arvensis and Polycarpon tetraphyllum as natural hosts of tomato brown rugose fruit virus. Plant Disease 108(3), 827. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-23-2413-PDN

Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., & Panno, S. (2020). Tomato brown rugose fruit virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. Plants, 9(11), 1615. https://doi.org/10.3390/plants9111615

Dorokhov, Y.L., Sheshukova, E.V., Byalik, T.E., Komarova, T.V. (2020) Diversity of Plant Virus Movement Proteins: What Do They Have in Common? Processes 8, 1547. https://doi.org/10.3390/pr8121547

EPPO. Global Database. 2024. Update of the situation of Tomato brown rugose fruit virus in Mexico. En línea: https://gd.eppo.int/reporting/article-6622 Fecha de consulta: agosto 2024.

Favara, G. M., Bampi, D., Molina, J. P. E., & Rezende, J. A. M. (2019) Kinetics of Systemic Invasion and Latent and Incubation Periods of Tomato severe rugose virus and Tomato chlorosis virus in Single and Co-Infections in Tomato Plants. Phytopathology, 109(3), 480–487. https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0203-R

Fidan, H., Sarikaya, P., Yildiz, K., Topkaya, B., Erkis, G., & Calis, O. (2021b). Robust molecular detection of the new Tomato brown rugose fruit virus in infected tomato and pepper plants from Turkey. Journal Of Integrative Agriculture, 20(8), 2170-2179. https://doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63335-4

Fox, A., & Mumford, R. A. (2017). Plant viruses and viroids in the United Kingdom: An analysis of first detections and novel discoveries from 1980 to 2014. Virus research, 241, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.029

García R. S., Diaz, A., Aguilar, V. H., & Tovar, J. M. (2022). Viruses of Economic Impact on Tomato Crops in Mexico: From Diagnosis to Management-A Review. Viruses, 14(6), 1251. https://doi.org/10.3390/v14061251

García-Estrada, R. S., Diaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H., & Tovar-Pedraza, J. M. (2022). Viruses of Economic Impact on Tomato Crops in Mexico: From Diagnosis to Management-A Review. Viruses, 14(6), 1251. https://doi.org/10.3390/v14061251

Gonzáles, L. F. (2020),DETECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN ESPACIO–TEMPORAL DEL Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) EN INVERNADEROS COMERCIALES DE TOMATE (Solanum lycopersicum) [tesis para optar el grado de maestría, Universidad Autónoma de Occidente] https://uadeo.mx/wp-content/uploads/2021/06/TESIS-LUIS-FELIPE-GONZALEZ-CONCHA.pdf

Hadidi, A., Sun, L., & Randles, J. W. (2022). Modes of Viroid Transmission. Cells, 11(4), 719. https://doi.org/10.3390/cells11040719

Hamborg, Z., & Blystad, D. (2022). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato in Norway. Plant Disease, 106(7), 2004. https://doi.org/10.1094/pdis-10-21-2208-pdn

Hanssen, I. M., & Lapidot, M. (2012). Major tomato viruses in the Mediterranean basin. Advances in virus research, 84, 31–66. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00002-6

Hemmati, C., Nikooei, M., Al-Subhi, A. M., & Al-Sadi, A. M. (2021). History and Current Status of Phytoplasma Diseases in the Middle East. Biology, 10(3), 226. https://doi.org/10.3390/biology10030226

Hernández, R., López, A., Borrego, F., Espinoza, J., Sánchez, D., Maldonado, I. E., & López, L. A. (2014). Razas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici en predios tomateros en San Luis Potosí. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 5(7), 1169-1178. Recuperado en 12 de septiembre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000700003&lng=es&tlng=es.

Hofmann, C., Sambade, A., & Heinlein, M. (2007). Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA. Biochemical Society transactions, 35(Pt 1), 142–145. https://doi.org/10.1042/BST0350142

Holguín, R. J., & Rueda, E. O. (2007). Detection of Tomato spotted wilt virus in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. Plant disease, 91(12), 1682. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1682B

Ishibashi, K., & Ishikawa, M. (2016). Replication of Tobamovirus RNA. Annual review of phytopathology, 54, 55–78. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100217

Jewehan A, Salem N, Tóth Z, Salamon P, Szabó Z (2021) Screening of Solanum (sections Lycopersicon and Juglandifolia) germplasm for reactions to the tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). Journal of Plant Diseases and Protection. https://doi.org/10.1007/s41348-021-00535-x

Jiang, S., & Lu, L. (2022). Virus entry inhibitors. Advances in experimental medicine and biology. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8702-0

Klap, C., Luria, N., Smith, E., Bakelman, E., Belausov, E., Laskar, O., Lachman, O., Gal-On, A., & Dombrovsky, A. (2020). The Potential Risk of Plant-Virus Disease Initiation by Infected Tomatoes. Plants (Basel, Switzerland), 9(5), 623. https://doi.org/10.3390/plants9050623

Kolomiets, J., Grygoryuk, I., & Butsenko, L. (2017). Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine. Annals Of Agrarian Science, 15(2), 213-216. https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.05.010

Lartey, R. T., Voss, T. C., & Melcher, U. (1996). Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. Molecular biology and evolution, 13(10), 1327–1338. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025579

Lee, S., Chu, C. Y., & Chu, C. C. (2021). Variability of Phytoplasma Infection Density in Poinsettia and Evaluation of its Association with the Level of Branching in Host Plants. Plant disease, 105(5), 1539–1545. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2304-RE

Lefeuvre, P., Martin, D. P., Elena, S. F., Shepherd, D. N., Roumagnac, P., & Varsani, A. (2019). Evolution and ecology of plant viruses. Nature reviews. Microbiology, 17(10), 632–644. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3

Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, et al. (2019) El abejorro Bombus terrestris porta un inóculo primario del virus rugoso marrón del tomate que contribuye a la propagación de la enfermedad en los tomates. PLoS ONE 14(1): e0210871. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871.

Ling, K., Tian, T., Gurung, S., Salati, R., & Gilliard, A. (2019). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Greenhouse Tomato in the United States. Plant Disease, 103(6), 1439. https://doi.org/10.1094/pdis-11-18-1959-pdn

Liu, S., Fu, L., Tan, H., Jiang, J., Che, Z., Tian, Y., & Chen, G. (2021). Resistance to Boscalid in Botrytis cinerea From Greenhouse-Grown Tomato. Plant disease, 105(3), 628–635. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1191-RE

Liu, W., Liu, K., Chen, D., Zhang, Z., Li, B., El-Mogy, M. M., Tian, S., & Chen, T. (2022). Solanum lycopersicum, a Model Plant for the Studies in Developmental Biology, Stress Biology and Food Science. Foods (Basel, Switzerland), 11(16), 2402. https://doi.org/10.3390/foods11162402

López, W. R., Garcia-Jaramillo, D. J., Ceballos-Aguirre, N., Castaño-Zapata, J., Acuña-Zornosa, R., & Jovel, J. (2021). Transcriptional responses to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen infection in three Colombian tomato cultivars. BMC plant biology, 21(1), 412. https://doi.org/10.1186/s12870-021-03187-z

Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, et al. (2017) A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. PLoS ONE 12(1): e0170429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., & Dombrovsky, A. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. PloS one, 12(1), e0170429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429

Maayan, Y., Pandaranayaka, E. P. J., Srivastava, D. A., Lapidot, M., Levin, I., Dombrovsky, A., & Harel, A. (2018). Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their

underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. Archives of virology, 163(7), 1863–1875. https://doi.org/10.1007/s00705-018-3819-5

Maeso, D. & Walasek, W. (2012). Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis). Agrociencia (Uruguay), 16(1), 134-142. Recuperado en 10 de septiembre de 2024, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100016&lng=es&tlng=es.

Magaña, A.A., Pérez, D., Vargas, B.Y. et al. Detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in solanaceous plants in Mexico. J Plant Dis Prot 128, 1627–1635 (2021). https://doi.org/10.1007/s41348-021-00496-1

Magaña, A.A., Pérez, D., Vargas-, B.Y., Ramírez, J.A., Núñez-, L.A., Salgado, H., de la Torre, R., Ruiz, R., Xoconostle-, B., (2021). Detection of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in solanaceous plants in Mexico. Journal of Plant Diseases and Protection, 128, pp. 1627–1635. https://doi.org/10.1007/s41348-021-00496-1

Martínez, F. E., Andrade, G.,Aispuro, E., Hernández, L. G., Holguín, R. J., & Rueda, E. O. (2019). Antisuero vs hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate en Sonora, México. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 10(4), 873-884. Epub 22 de mayo de 2020.https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1706

Mehetre, G. T., Leo, V. V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, M. K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A. N., Dawoud, T. M., Almaary, K. S., & Singh, B. P. (2021). Current Developments and Challenges in Plant Viral Diagnostics: A Systematic Review. Viruses, 13(3), 412. https://doi.org/10.3390/v13030412

Mehle, N., Bačnik, K., Bajde, I., Brodarič, J., Fox, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Kitek, M., Kutnjak, D., Loh, Y. L., Maksimović Carvalho Ferreira, O., Ravnikar, M., Vogel, E., Vos, C., & Vučurović, A. (2023). Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments - survival and significance of water-mediated transmission. Frontiers in plant science, 14, 1187920. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187920

Mehle, N., Bačnik, K., Bajde, I., Brodarič, J., Fox, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Kitek, M., Kutnjak, D., Loh, Y. L., Maksimović Carvalho Ferreira, O., Ravnikar, M., Vogel, E., Vos, C., & Vučurović, A. (2023). Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments - survival and significance of water-mediated transmission. Frontiers in plant science, 14, 1187920. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187920

Menzel, W., Knierim, D., Winter, S., Hamacher, J., & Heupel, M. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. New Dis. Rep, 39(1), 2044-0588.

Mugao L. (2023). Morphological and Molecular Variability of Alternaria solani and Phytophthora infestans Causing Tomato Blights. International journal of microbiology, 2023, 8951351. https://doi.org/10.1155/2023/8951351

Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K. M., Srinivas, C., Niranjana, S. R., & Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Scientific reports, 6, 21367. https://doi.org/10.1038/srep21367

Nolasco, L. I., Marín, J. L., Mireles, A. I., Ruiz-, J. E., & Hernández,, J. (2022). Geographic areas susceptible to Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Guanajuato, Mexico. Bioagro, 35(1), 13-20. https://doi.org/10.51372/bioagro351.2

Nolasco, L. I., Marín, J.L., Ruiz, J. E., & Hernández, J. (2020). Métodos de identificación del virus de la fruta rugosa marrón del tomate (ToBRFV) en México. Agronomía Mesoamericana, 31(3), 820-829. https://dx.doi.org/10.15517/am.v31i3.40655

Orfei, B., Pothier, J. F., Fenske, L., Blom, J., Moretti, C., Buonaurio, R., & Smits, T. H. M. (2023). Race-specific genotypes of Pseudomonas syringae pv. tomato are defined by the presence of mobile DNA elements within the genome. Frontiers in plant science, 14, 1197706. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1197706

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2024. [(Consultado el 23 de agosto de 2024)]. Disponible online: http://www.fao.org/home/en/

Paiva, M. H., & Badiale, E. (2022) Fungal diseases and natural defense mechanisms of tomatoes (Solanum lycopersicum): A review, Physiological and Molecular Plant Pathology,122, https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101906.

Panno, S., Caruso, A. G., & Davino, S. (2019). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. Plant Disease, 103(6), 1443. https://doi.org/10.1094/pdis-12-18-2254-pdn

Panno, S., Caruso, A.G., Barone, S., Lo Bosco, G., Rangel, E.A., Davino, S. (2020) Spread of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Sicily and Evaluation of the Spatiotemporal Dispersion in Experimental Conditions. Agronomy 2020, 10, 834. https://doi.org/10.3390/agronomy10060834

Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris E., Matić, S.(2021) A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. Agronomy. 11(11):2188. https://doi.org/10.3390/agronomy11112188

Panno, S., Ruiz-Ruiz, S., Caruso, A. G., Alfaro-Fernandez, A., Font San Ambrosio, M. I., & Davino, S. (2019). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato

brown rugose fruit virus and comparison with other techniques. PeerJ, 7, e7928. https://doi.org/10.7717/peerj.7928

Parrella, G., & Numitone, G. (2014). First Report of Tomato apical stunt viroid in Tomato in Italy. Plant disease, 98(8), 1164. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0206-PDN

Paudel, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2020). Taxonomy and Phylogenetic Research on Ralstonia solanacearum Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. Pathogens (Basel, Switzerland), 9(11), 886. https://doi.org/10.3390/pathogens9110886

Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., & Valls, M. (2013). Ralstonia solanacearum, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Molecular plant pathology, 14(7), 651–662. https://doi.org/10.1111/mpp.12038

PM 7/146 (1) Tomato brown rugose fruit virus. (2021). Bulletin OEPP, 51(1), 178-197. https://doi.org/10.1111/epp.12723

Preston G. M. (2000). Pseudomonas syringae pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular plant pathology, 1(5), 263–275. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x

Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., van der Knaap, E., & Caicedo, A. L. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. Molecular biology and evolution, 37(4), 1118–1132. https://doi.org/10.1093/molbev/msz297

Rivera, L. M., Ramírez, G., Martínez, B., Judith, A., & Aranda, S. (2022). Respuesta de variedades de jitomate (Solanum lycopersicum) a la infección con Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Revista mexicana de fitopatología, 40(1), 18-39. Epub 03 de octubre de 2022.https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-8

Rizzo, D., Da Lio, D., Panattoni, A., Salemi, C., Cappellini, G., Bartolini, L., & Parrella, G. (2021). Rapid and Sensitive Detection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato and Pepper Seeds by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays (Real Time and Visual) and Comparison With RT-PCR End-Point and RT-qPCR Methods. Frontiers in microbiology, 12, 640932. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640932

Rodríguez, J., García, C., López, J. A., Araujo, K., Quezada, A., Cambrón, J. M., & Ochoa, D. L. (2019). Identification of Tomato brown rugose fruit virus by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). Revista mexicana de fitopatología, 37(2), 345-356. Epub 30 de septiembre de 2020.https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1902-6

Roque, A., Delgado, J.C., Beltrán, M., Ochoa, Y. M., & Cerna, E. (2021). Parámetros agronómicos del tomate (Solanum lycopersicum L.) inoculado con "Candidatus Liberibacter solanacearum" y tratados con

fosfitos. Ecosistemas y recursos agropecuarios, 8(1), e2552. Epub 10 de octubre de 2022.https://doi.org/10.19136/era.a8n1.2552 Rybicki, E. P., & Foster, G. D. (2024). Plant diseases caused by viruses. En Elsevier eBooks (pp. 547-606). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822429-8.00017-0

Saffan, M. M., Koriem, M. A., El-Henawy, A., El-Mahdy, S., El-Ramady, H., Elbehiry, F., Omara, A. E.-D., et al. (2022). Sustainable Production of Tomato Plants (Solanum lycopersicum L.) under Low-Quality Irrigation Water as Affected by Bio-Nanofertilizers of Selenium and Copper. Sustainability, 14(6), 3236. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/su14063236

SAGARPA (2011) Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. En línea: https://compucampo.com/tecnicos/enfermedadesfungosasbacterianas-tomate-nay.pdf Fecha de consulta: agosto 2024

Salem, N. M., Abumuslem, M., Turina, M., Samarah, N., Sulaiman, A., Abu-Irmaileh, B., & Ata, Y. (2022). New Weed Hosts for Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Wild Mediterranean Vegetation. Plants, 11(17), 2287. https://doi.org/10.3390/plants11172287

Salem, N. M., Cao, M. J., Odeh, S., Turina, M., & Tahzima, R. (2020). First Report of Tobacco Mild Green Mosaic Virus and Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Capsicum annuum in Jordan. Plant Disease, 104(2), 601. https://doi.org/10.1094/pdis-06-19-1189-pdn

Salem, N. M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. (2023). Tomato Brown Rugose Fruit Virus Pandemic. Annual review of phytopathology, 61, 137–164. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-120703

Salem, N. M., Sulaiman, A., Samarah, N., Turina, M., & Vallino, M. (2022). Localization and Mechanical Transmission of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato Seeds. Plant disease, 106(1), 275–281. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2413-RE

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Archives of virology, 161(2), 503–506. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7

Sánchez, M., Aispuro, E., Quintana, E. A., Martinez, M.A., (2023) THE TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS IS RESTRICTED TO SPECIFIC AREAS IN SONORA, MEXICO - A STUDY OF 2021-2022 SEASON. Tropical and Subtropical Agroecosystems. doi:http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4674.

Santamaría, S., López, Á., Galvez, C., Munar, M., Monteagudos, E., Rodríguez, J. J., Krell, T., & López, E. (2022). Pseudomonas syringae pv. tomato infection of tomato plants is mediated by GABA and l-Pro chemoperception. Molecular plant pathology, 23(10), 1433–1445. https://doi.org/10.1111/mpp.13238

Sarkes, A., Fu, H., Feindel, D., Harding, M., & Feng, J. (2020). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). PLoS One, 15(6), e0230403.

Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020). Biological Control of Tomato Gray Mold Caused by Botrytis Cinerea with the Entomopathogenic Fungus Metarhizium Anisopliae. Pathogens (Basel, Switzerland), 9(3), 213. https://doi.org/10.3390/pathogens9030213

SENASICA. 2005 Protocolo de Diagnóstico Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus. En línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728749/1._PD._Clavibacter_michiganensis_subsp._sepedonicus_0.0_2014.pdf. Fecha de consulta: agosto 2024 Fecha de consulta: agosto 2024

SENASICA. 2014 Protocolo de Diagnóstico Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al 1995 (Identificación morfológica, ELISA y PCR). En línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728748/2._PD._Ralstonia_solanacearum_papa_fresca_0.0_2014.pdf Fecha de consulta: agosto 2024

SENASICA. 2020. Panorama nacional del virus del fruto rugoso del tomate ToBRFV. En línea: https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2020/abril/PANToBRFV_bc6c0958-dc49-4fb5-ac21-355322898f15.pdf Fecha de consulta: agosto 2024

Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), Panorama agroalimentario 2022

Shi, Y. J., Yang, X., Yang, L. L., Li, Q. L., Liu, X. M., Han, X. Y., Gu, Q. S., Li, H. L., Chen, L. L., Liu, Y., & Shi, Y. (2023). Interaction between cucumber green mottle mosaic virus MP and CP promotes virus systemic infection. Molecular plant pathology, 24(3), 208–220. https://doi.org/10.1111/mpp.13287

Shukla, A., López-González, S., Hoffmann, G., & Hafrén, A. (2019). Diverse plant viruses: a toolbox for dissection of cellular pathways. Journal of experimental botany, 70(12), 3029–3034. https://doi.org/10.1093/jxb/erz122 Skelton, A., Buxton-Kirk, A., Ward, R., Harju, V., Frew, L., Fowkes, A., ... & Fox, A. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in the United Kingdom. New Dis. Rep, 40(12), 2044-0588.

SIAP, consultado 2 de agosto de 2024, https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ ; SENASICA., 2020

Skelton, A., Frew, L., Ward, R., Hodgson, R., Forde, S., McDonough, S., Webster, G., Chisnall, K., Mynett, M., Buxton-Kirk, A., Fowkes, A. R., Weekes, R., & Fox, A. (2023). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Survival and Disinfection Efficacy on Common Glasshouse Surfaces. Viruses, 15(10), 2076. https://doi.org/10.3390/v15102076

Skelton, A., Gentit, P., Porcher, L., Visage, M., Fowkes, A., Adams, I., Harju, V., Webster, G., Pufal, H., McGreig, S., Ward, R., & Fox, A. (2022). First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in France. New Disease Reports, 45(1). https://doi.org/10.1002/ndr2.12061

Skliros, D., Papazoglou, P., Gkizi, D., Paraskevopoulou, E., Katharios, P., Goumas, D. E., Tjamos, S., & Flemetakis, E. (2023). In planta interactions of a novel bacteriophage against Pseudomonas syringae pv. tomato. Applied microbiology and biotechnology, 107(11), 3801–3815. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12493-5

Smith, E., & Dombrovsky, A. (2022). Pepper Plants Harboring L Resistance Alleles Showed Virus Disease. Plants.

Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(48), E1254–E1263. https://doi.org/10.1073/pnas.1105664108

Tiberini, A., Manglli, A., Taglienti, A., Vučurović, A., Brodarič, J., Ferretti, L., Luigi, M., Gentili, A., & Mehle, N. (2022). Development and Validation of a One-Step Reverse Transcription Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification of Tomato Mottle Mosaic Virus and Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Plants (Basel, Switzerland), 11(4), 489. https://doi.org/10.3390/plants11040489

Turina, M., Geraats, B.P.J. and Ciuffo, M. (2016), First report of Tomato mottle mosaic virus in tomato crops in Israel. New Disease Reports, 33: 1-1. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.001

Tzortzakis N. (2019). Physiological and Proteomic Approaches to Address the Active Role of Botrytis cinerea Inoculation in Tomato Postharvest Ripening. Microorganisms, 7(12), 681. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120681

Vaisman, M., Hak, H., Arazi, T., Spiegelman, Z. (2022) The Impact of Tobamovirus Infection on Root Development Involves Induction of Auxin Response Factor 10a in Tomato, Plant and Cell Physiology, Volume 63, Issue 12, December 2022, Pages 1980–1993, https://doi.org/10.1093/pcp/pcab179

van de Vossenberg B.T.L.H, Visser M, Bruinsma M, Koenraadt HMS, Westenberg M, Botermans M (2020) Real-time tracking of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain. PLoS ONE 15(10): e0234671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234671

van de Vossenberg, B. T. L. H., Visser, M., Bruinsma, M., Koenraadt, H. M. S., Westenberg, M., & Botermans, M. (2020). Real-time tracking of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain. PloS one, 15(10), e0234671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234671

Vance V. B. (1991). Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. Virology, 182(2), 486–494. https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90589-4

Vargas, P., Rodríguez, G., Salas, D. A., García, I. J., Pérez, R. S., de Dios, E. Á., Santoyo, J. N., Briseño, R. I. A., Silva, L. (2023). Identification and management of tomato brown rugose fruit virus in greenhouses in Mexico. Archives of virology, 168(5), 135. https://doi.org/10.1007/s00705-023-05757-y

Vargas, P., Salas, D. A., García, I. J .(2022) A ToBRFV similar to a European isolate in a Mexican greenhouse, its presence in seeds and its inactivation for virus integrated management., 08 June PREPRINT (Version 1) available at Research Square https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1697399/v1

Vargas, P., Vega-, J., Chávez, G., Ibarra-Laclette, E., & Silva-Rosales, L. (2020). Differential Accumulation of Innate- and Adaptive-Immune-Response-Derived Transcripts during Antagonism between Papaya Ringspot Virus and Papaya Mosaic Virus. Viruses, 12(2), 230. https://doi.org/10.3390/v12020230

Vásquez U., Frías, G.A., López, H., Delgado, J.C., Aguirre, L.A., Flores, A. (2024). Evaluation of the Pathogenicity of Three Isolates of Tomato brown rugose fruit virus in tomato plants (Solanum lycopersicum L.) from Coahuila, Mexico.Revista Bio Ciencias, 11, e1576. https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1576Article Info/Información del

Vásquez, L. M. & Castaño, J. (2017). MANEJO INTEGRADO DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL TOMATE [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (SACC.) W.C. SNYDER & H.N. HANSEN]:: UNA REVISIÓN. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 20(2), 363-374. Retrieved September 11, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014&lng=en&tlng=es.

Vásquez, U. López H, Frías , G. A., Delgado Ortiz JC, Flores Olivas A, Aguirre Uribe LA, Hernández Juarez A (2024) Biological exploration and physicochemical characteristics of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in several host crops. Agronomy 14(2), 388. https://doi.org/10.3390/agronomy14020388

Wang, A., & Zhou, X. (2016). Current Research Topics in Plant Virology. En Springer eBooks. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2

Wang, D., Chen, M., Peng, J., Zheng, H., Lu, Y., Wu, G., Wu, J., Li, J., Chen, J., Yan, F., & Rao, S. (2024). Transcriptome Analysis of Tomato Leaves Reveals Candidate Genes Responsive to Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infection. International journal of molecular sciences, 25(7), 4012. https://doi.org/10.3390/ijms25074012

Wylie S. (2023). Tobamoviruses: Special Issue Editorial. Viruses, 15(11), 2174. https://doi.org/10.3390/v15112174

Xavier, C. A. D., & Whitfield, A. E. (2023). Plant virology. Current biology : CB, 33(11), R478–R484. https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.03.038

Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Wang, L., Tettey, C., Zhao, M. S., Geng, C., Tian, Y. P., & Li, X. D. (2021). Identification of genetic determinants of tomato brown rugose fruit virus that enable infection of plants harbouring the Tm-22 resistance gene. Molecular plant pathology, 22(11), 1347–1357. https://doi.org/10.1111/mpp.13115

Yan, Z., Ma, H., Han, S., Geng, C., Tian, Y., & Li, X. (2019). First Report of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato in China. Plant Disease, 103(11), 2973. https://doi.org/10.1094/pdis-05-19-1045-pdn

Yanagisawa, H., Matsushita, Y. Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid . Eur J Plant Pathol 149, 211–217 (2017). https://doi.org/10.1007/s10658-017-1160-6

Zamora-Macorra, E.J, Ávila-Alistac N., Lagunes-Fortiz E. y de los Santos-Villalobos S. (2024) Virus y viroides en el cultivo de tomate (Solanum lycopersicum) y su manejo con PGPR. REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Vol. 41 (4), 66-77. DOI: https://doi. org/10.18781/R.MEX. FIT.2023-6

Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., & Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. Molecular Plant Pathology, 23(9), 1262-1277. https://doi.org/10.1111/mpp.13229

Zhang, Z., Liu, L., Wu, H., Liu, L., Kang, B., Peng, B., & Gu, Q. (2017). The 96th Amino Acid of the Coat Protein of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Affects Virus Infectivity. Viruses, 10(1), https://doi.org/10.3390/v10010006

Zheng X, Li Y, Liu Y. (2024) Plant Immunity against Tobamoviruses. Viruses. 16(4):530. https://doi.org/10.3390/v16040530

Zinger, A., Lapidot, M., Harel, A., Doron-Faigenboim, A., Gelbart, D., & Levin, I. (2021). Identification and Mapping of Tomato Genome Loci Controlling Tolerance and Resistance to Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Plants (Basel, Switzerland), 10(1), 179. https://doi.org/10.3390/plants10010179

Zinger, A., Lapidot, M., Harel, A., Doron-Faigenboim, A., Gelbart, D., & Levin, I. (2021). Identification and Mapping of Tomato Genome Loci Controlling Tolerance and Resistance to Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Plants (Basel, Switzerland), 10(1), 179. https://doi.org/10.3390/plants10010179

Zisi, Z., Ghijselings, L., Vogel, E., Vos, C., & Matthijnssens, J. (2024). Single amino acid change in tomato brown rugose fruit virus breaks virus-specific resistance in new resistant tomato cultivar. Frontiers in plant science, 15, 1382862. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1382862