



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DEL pepino mosaic virus  
(PepMV) EN ÁREAS PRODUCTORAS DE TOMATE (*Solanum  
lycopersicum* L.) EN MÉXICO**

---

Por:

**Biól. Omar Alejandro Miranda Campaña**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA PRODUCTOS AGRICOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de :

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Omar Alejandro Miranda Campaña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



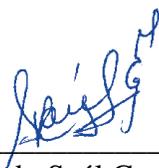
---

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza  
Director de Tesis



---

Dr. Alfredo Diaz Lara  
Co-Director de Tesis



---

Dr. Raymundo Saúl García Estrada  
Integrante del comité de tesis



---

M.C. Armando Carrillo Fasio  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Distribución de Genotipos del pepino mosaic virus (PepMV) en Áreas Productoras de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en México" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ornar Alejandro Miranda Campaña, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Graciela-Caire Juvera', is written over a horizontal line.

Dra. Graciela-Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.), por todas las facilidades brindadas para llevar a cabo este proyecto de investigación y obtener el grado de maestría.

A Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza por aceptarme como su alumno y discípulo, pero sobre todo por hacer posible la realización de este proyecto, por la motivación y compromiso que lo destaca como investigador.

A Dr. Alfredo Díaz Lara, por sus enseñanzas y disposición brindada para realizar mi estancia en su laboratorio.

A Dr. Saúl Raymundo García Estrada y M.C Armando Carrillo por sus invaluable aportaciones como miembros del comité.

A mis maestros, técnicos y compañeros que fueron parte de mi formación.

A mi compañera y amiga María Trinidad Valdez por ser parte de esta aventura, y sobre todo aligerarla con su compañía y confianza.

Al FITONEMA, por compartir y ser parte de mi camino por CIAD... Judith Salazar, Rubí Núñez, Belia Contreras, también a algunos del BIMOGEN...Lucia y Brandon por compartir sus conocimientos.

A mis colegas de Nunhems y Vilmorin Mexico, Víctor Javalera, Aurora Cruz , Juan Luis Patiño por apoyarme en mis muestreos y en algunas otras solicitudes extras...

## **DEDICATORIA**

A Dios, por brindarme sabiduría y fuerza en los momentos necesarios.

A mi mamá por nunca soltarme y estar siempre ahí, echándome porras y sintiéndose orgullosa.

A mis hermanas Dulce y Valeria, por apoyarme y respaldarme en cada uno de mis tropiezos y logros.

A esas personas que forman parte de mi vida, que son especiales y que estuvieron acompañándome pacientemente por esta travesía.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	14
2.1. Cultivo de Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	14
2.1.1. Generalidades del Cultivo de Tomate.....	14
2.2. Importancia Económica del Cultivo del Tomate.....	14
2.3. Factores Limitantes en el Cultivo de Tomate.....	15
2.3.1. Factores Abióticos .....	15
2.3.2. Factores Bióticos.....	15
2.4. Virus Fitopatógenos.....	16
2.4.1. Importancia de los Virus en los Cultivos.....	16
2.4.1.1. Virus que atacan el cultivo de tomate.....	16
2.5. Pepino mosaic virus (PepMV).....	17
2.5.1. Sintomatología.....	17
2.5.2. Rango de Hospedantes y Plantas Indicadoras.....	18
2.5.3. Propiedades Biológicas del Virus .....	19
2.5.3.1. Persistencia e inactivación de la partícula viral.....	19
2.5.3.2. Transmisión.....	19
2.6. Métodos de Control y Manejo.....	20
2.7. Taxonomía y Estructura del Genoma del PepMV.....	20
2.7.1. Taxonomía .....	20
2.7.2. Características de la Partícula Viral.....	21
2.7.3. Variabilidad Genética .....	23
2.8. Técnicas de Detección e Identificación .....	24
2.8.1. Técnicas Moleculares .....	24
2.8.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.....	24
2.8.1.2. PCR multiplex.....	25
2.8.1.3. RT-PCR.....	25
2.9. Estudios Enfocados en la Identificación, Distribución y Diversidad Genética de Aislados del PepMV Alrededor del Mundo .....	25

## CONTENIDO (continuación)

2.9.1. Primeros Reportes y Estado Actual de la Epidemiología del PepMV .....	25
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo General.....	32
4.2. Objetivos Específicos.....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Recolección de Muestras y Detección del PepMV en Campo .....	31
5.2. Detección Molecular del PepMV y ToBRFV en Muestras Recolectadas Mediante RT-PCR Múltiple de un Solo Paso .....	32
5.2.1. Selección de Iniciadores .....	32
5.2.2. Extracción de ARN y RT-PCR de un Solo Paso .....	33
5.3. Purificación y Secuenciación de Productos de RT-PCR.....	34
5.4. Alineamiento de Secuencias y Análisis Filogenético.....	35
5.5. Caracterización Biológica .....	35
5.5.1. Purificación de Aislados con Infección Mixta de PepMV y ToBRFV.....	35
5.5.2. Inoculación en Especies Indicadoras .....	36
<b>6. RESULTADOS</b> .....	37
6.1. Distribución del PepMV en Áreas Productoras de Tomate en México.....	37
6.2. Detección de Genotipos del PepMV e Infecciones Mixtas Mediante RT-PCR Múltiple ..	38
6.3. Análisis Filogenético de Región Parcial del Gen RdRp de Aislados CH2 .....	40
6.4. Análisis Filogenéticos de Región Parcial del Gen RdRp de Aislados LP y EU .....	41
6.5. Análisis Filogenéticos de la Región TGB2-3 y PC .....	42
6.6. Caracterización Biológica de Aislados Mexicanos del PepMV .....	44
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Síntomas inducidos por PepMV en el tomate.....	2
2	Organización genómica y estrategia de expresión del PepMV.....	5
3	Áreas productoras de tomate en México en las que se recolectaron muestras del PepMV.....	7
4	Validación de RT-PCR usando iniciadores genéricos del PepMV con productos analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.....	34
5	Validación de RT-PCR múltiple usando iniciadores específicos para genotipos del PepMV con productos analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.2 %.....	35
6	Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud inferido a partir de secuencias parciales del gen RdRp de aislados mexicanos del PepMV y aislados representativos de cada genotipo, publicadas en GenBank.....	37
7	Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud inferido a partir de secuencias parciales de la región TGB2-3 y CP de aislados mexicanos del PepMV y aislados representativos de cada genotipo publicadas en GenBank.....	39
8	Síntomas causados por aislados del PepMV en diferentes especies.....	42

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Conjunto de iniciadores utilizados para la detección simultánea de PepMV y ToBRFV, y la identificación de genotipos del PepMV mediante RT-PCR múltiple de un solo paso.....	27
2	Incidencia del PepMV y ToBRFV en los diferentes estados productores de tomate en México.....	32
3	Muestras positivas a ToBRFV, PepMV e identificación de genotipos del PepMV.....	33
4	Caracterización biológica de aislados del PepMV en especies indicadoras .....	41

## RESUMEN

El PepMV ha causado importantes epidemias en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a nivel mundial y a la fecha se han identificado cinco genotipos: Peruano (LP), Europeo (EU), Americano (US1), Chileno (CH2) y Peruano del Sur (PES). El objetivo del presente estudio fue conocer la distribución actual del PepMV en las principales zonas productoras de tomate en México, además de identificar los genotipos predominantes y su comportamiento biológico en hospedantes alternos y especies indicadoras. En diferentes predios agrícolas con cultivo de tomate distribuidos en 11 estados de México, del mes de marzo a octubre de 2022, se recolectaron 77 muestras de plantas de tomate con síntomas de moteado, mosaico y clorosis en hojas, así como frutos con marmoleado. Mediante RT-PCR multiplex de un solo paso, con el uso de iniciadores genéricos y específicos se obtuvieron productos de aprox. 980, 549 y 500 pb correspondientes a fragmentos parciales del gen *RdRp*, y de las regiones TGB2-3 y PC, los cuales se secuenciaron. Los análisis filogenéticos confirmaron que, 15 muestras fueron positivas para PepMV provenientes de seis estados. Se detectaron seis muestras con infecciones únicas con el genotipo CH2, dos con el genotipo LP, dos con el genotipo EU y cinco coinfecciones de los genotipos LP+CH2. Para la caracterización biológica, se seleccionaron tres aislados CH2 (MXM1, MXM18 y MXM31), un aislado LP+CH2 (MXM71) y un aislado EU (MXM64). Todos los aislados indujeron infección sistémica en *Solanum lycopersicum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana occidentalis*, y *Solanum melongena*. En plantas de tomate, los aislados CH2 indujeron mosaicos tenues y clorosis; mientras que, el aislado EU causó mosaicos cloróticos típicos del PepMV. En *D. stramonium* y *S. melongena* se observó clorosis, amarillamiento internerval y mosaicos; en ambos hospedantes, los síntomas más severos fueron causados por el aislado EU. En *N. occidentalis* se presentaron síntomas causados por todos los aislados, particularmente con el aislado CH2-MXM1, que provocó lesiones necróticas. En general, el PepMV está presente en al menos seis estados en México, prevaleciendo el genotipo CH2 y la infección mixta LP+CH2. No se detectaron los genotipos US1 y PES. Además, se caracterizó un aislado EU como variante agresiva.

**Palabras clave:** pepino mosaic virus, genotipo, variante, pruebas biológicas.

## ABSTRACT

Pepino mosaic virus (PepMV) has caused major epidemics worldwide affecting tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). Five PepMV genotypes have been identified: Peruvian (LP), European (EU), American (US1), Chilean (CH2), and southern Peruvian (PES). The aim of this study was to determine the current distribution of PepMV in the main tomato-producing areas of Mexico, in addition to identifying the predominant genotypes and their biological behavior in alternate hosts and indicator species. From March to October 2022, a total of 77 samples of tomato plants showing symptoms of mottled, mosaic, and chlorosis on leaves, as well as fruits with marbling were collected in 11 states in Mexico. By one-step multiplex RT-PCR with the use of generic and specific primers, products of approximately 980, 549, and 500 bp corresponding to the partial fragment of the *RdRp* gene, and the TGB2-3 and PC regions were obtained and sequenced. Phylogenetic analysis confirmed that 15 samples were positive for PepMV originating from six states. Six samples were single infections with the CH2 genotype, two with the LP genotype, two samples with the EU genotype, and five co-infections involving LP+CH2 were identified. For the biological characterization, five isolates previously characterized and identified as CH2 (MXM1, MXM18, MXM31) LP+CH2 (MXM71), and EU (MXM64) were used. Systemic infections in *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *N. occidentalis*, y *S. melongena* by all isolates were obtained. In tomatoes, among CH2 isolates symptoms since mild mosaics and chlorosis were observed, meanwhile, EU isolate caused a typical chlorotic patch of PepMV. In *D. stramonium* and *S. melongena*, chlorosis, interveinal yellowing, and mosaics were observed; in both hosts, the most severe symptoms were caused by the EU isolate. Furthermore, *N. occidentalis* showed symptoms with all isolates, particularly CH2-MXM1 isolate, causing necrotic lesions. In general, PepMV is present in at least six states in Mexico, with the CH2 genotype and mixed CH2+LP infection prevailing. US1 and PES genotypes were not detected. Interestingly, an EU isolate was also characterized as an aggressive variant.

**Key words:** *pepino mosaic virus*, genotype, variant, biological index.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) son una seria amenaza para la agricultura y la sostenibilidad alimentaria mundial (Vurro *et al.*, 2010). La aparición y expansión de enfermedades virales de plantas se ha atribuido a la intensificación de la agricultura, el comercio mundial de semillas y productos, así como a la introducción y expansión de insectos vectores (Hanssen *et al.*, 2010b). Un ejemplo destacado, es la dispersión del pepino mosaic virus (PepMV) que se describió por primera vez infectando plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum* L.) en Perú, alrededor de 1970 (Jones *et al.*, 1980) y emergió en cultivos de tomate en Europa a principios del 2000 (van der Vlugt *et al.*, 2002).

El PepMV ha causado importantes epidemias a nivel mundial, reduciendo la calidad y rendimiento del tomate, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas (Gómez *et al.*, 2012; Hanssen y Thomma, 2010). Debido a la infección en plantas de tomate, el PepMV causa la expresión de diferentes síntomas foliares, desde mosaico leve y severo hasta la necrosis; mientras que, en los frutos, los síntomas varían desde el marmoleado, hasta la malformación. La severidad de los síntomas puede depender del genotipo o aislado, el cultivo y las condiciones ambientales (Sempere *et al.*, 2016). Actualmente no existen cultivares comerciales resistentes a PepMV y, a pesar de la implementación de programas permanentes de vigilancia y prevención, el PepMV representa una enfermedad de alto impacto para los cultivos de tomate en muchas regiones de América, África, Asia y Europa (Gómez *et al.*, 2012).

Uno de los métodos de manejo y control del PepMV, es la implementación de estrategias de protección cruzada, basadas en la “pre-inmunización” del cultivo con cepas atenuadas del virus. Este método ha sido altamente efectivo en países donde se produce tomate en invernaderos con alta tecnología y donde se conoce la distribución y prevalencia de los genotipos presentes (Hull, 2014).

Alrededor del mundo, se han identificado cinco genotipos del PepMV: Peruano (LP), Europeo (EU), Americano (US1), Chileno-2 (CH2) y el Peruano del sur (PES) (Hanssen y Thomma, 2010; y Moreno-Pérez *et al.*, 2014). Aunque México es uno de los principales productores y exportadores de tomate a nivel mundial (SIAP, 2022) y a pesar de que se conoce la presencia del PepMV en algunas zonas productoras de tomate (Ling *et al.*, 2019; García-Estrada *et al.*, 2022), existen pocos

reportes oficiales acerca de la distribución y diversidad genética de este virus. Además, en México, más de 60% de la producción de tomate se lleva a cabo en invernaderos y malla sombra con variedades de crecimiento indeterminado (SIAP, 2022), implicando mayor manejo y manipulación durante la temporada del cultivo, e incrementando el riesgo de transmisión y dispersión de este virus (Gómez *et al.*, 2012b).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la distribución actual del PepMV en las principales zonas productoras de tomate en México, además de, identificar los genotipos predominantes y su comportamiento biológico en hospedantes alternos y especies indicadoras.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Cultivo de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

#### 2.1.1. Generalidades del Cultivo de Tomate

El tomate es una planta perenne, dicotiledónea, herbácea, de tallo semi leñoso, con un sistema radical compuesto de una raíz principal de corta extensión, ramificada en numerosas raíces secundarias. Las hojas del tomate son imparipinnadas, compuestas por folíolos alternos e impares; la flor del tomate es perfecta con órganos masculinos y femeninos, en cada inflorescencia o racimo se forman varias flores (Escobar, 2010).

El fruto del tomate es una baya bilocular o pluribilocular, constituido por 94–95% de agua, el porcentaje restante es una mezcla compleja en la que predominan constituyentes orgánicos, los cuales le dan al fruto la textura y sabor característico (López, 2016; Torres, 2017).

Esta hortaliza es una excelente fuente de nutrientes y metabolitos secundarios como minerales, vitaminas C y E,  $\beta$ -carotenos, licopenos, flavonoides, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, proteínas y fibras (Otunaiya y Shittu, 2014; Selçuk y Muruz, 2019). Debido a su gran adaptabilidad a diferentes ecosistemas, alto rendimiento y contenido de nutrientes, este cultivo desempeña un papel fundamental en la mejora de la calidad de vida de las personas y en el desarrollo económico de los países productores (Firdous *et al.*, 2020).

### 2.2. Importancia Económica del Cultivo del Tomate

El tomate representa uno de los sistemas de producción de mayor importancia económica a nivel mundial. En 2019 se sembró un área de 4,762,457 ha con una producción de 182,256,458 ton y un rendimiento promedio de 38.2694 ton ha<sup>-1</sup> de tomates frescos en todo el mundo (FAOSTAT, 2020). Los cinco principales países productores de tomate son China, EE. UU., Turquía, India e Italia,

mientras que México ocupa el noveno lugar en producción con un total de 3,370,827 ton producidas en 2020. En exportación, México, España, EE. UU. y Bélgica son los países que liderean el mercado, y México exportó un total de 1,663,316 ton durante 2019-2020, siendo EE. UU. el principal cliente, con una derrama económica anual de 1,874 millones de dólares (SIAP, 2022).

El porcentaje de participación en la producción de México se distribuyó de la siguiente manera: región noroeste (34.9%), región centro-occidente (31.6%), región noreste (12.7%), región centro (14.2%) y la región sur-suroeste (6.6%). Los estados que presentaron mayor volumen de producción fueron Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Zacatecas, Jalisco, Baja California Sur, Morelos, Querétaro, Puebla y Sonora (SIAP, 2022). Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2021), en México, 40% del tomate se produce bajo invernadero, 33% en campo abierto, 26% en malla sombra y aproximadamente el 1% en macro túnel.

## 2.3. Factores Limitantes en el Cultivo de Tomate

### 2.3.1. Factores Abióticos

Se clasifican por la naturaleza que lo causa, y pueden dividirse en físicos y químicos. Entre los factores físicos se encuentra el estrés por déficit o exceso de agua, temperaturas extremas, salinidad y radiación ultravioleta. Entretanto, la contaminación atmosférica, metales pesados, las toxinas, la salinidad y la carencia de elementos minerales, representan parte de los factores químicos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

### 2.3.2. Factores Bióticos

Son causados por la acción de otros agentes que causan en la mayoría de las veces alguna enfermedad o daño en la planta, tales como hongos y oomicetes, virus y viroides, bacterias,

nematodos, fitoplasmas, plantas parásitas, insectos, ácaros y otros herbívoros (Agrios, 2005).

## 2.4. Virus Fitopatógenos

Los virus se definen como agentes parásitos intracelulares obligados que necesitan de un hospedante adecuado para completar su ciclo. Las partículas virales se componen de una o varias moléculas de ácidos nucleicos que se encuentran normalmente envueltas por una capa de naturaleza proteica denominada cápside. Estos agentes contienen la información genética necesaria para la replicación del virus; sin embargo, requieren de la maquinaria celular del hospedante para la síntesis de diferentes proteínas relacionadas con la virulencia del mismo (Sastry y Zitter, 2014).

### 2.4.1. Importancia de los Virus en los Cultivos

Las enfermedades causadas por virus representan uno de los grandes desafíos mundiales en la agricultura del siglo XXI (Jones y Naidu, 2019), con implicaciones que afectan de manera negativa en la producción y el desarrollo óptimo de la comercialización, que van desde daños menores en tejido foliar o el fruto, hasta la pérdida total del cultivo (Bos, 1982; Hull, 2014; Jones y Barbetti, 2012). De esta manera, las enfermedades ocasionadas por virus generan grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Loebenstein, 2009; Sastry y Zitter, 2014). Los virus de plantas son muy diversos y se pueden transmitir verticalmente a la descendencia del hospedante u horizontalmente entre hospedantes mediante vectores o por contacto mecánico. La persistencia, distribución y prevalencia de los virus dependen de los hospedantes y los vectores; así como, de las condiciones climáticas (Hull, 2014).

2.4.1.1. Virus que atacan el cultivo de tomate. En el cultivo de tomate, las enfermedades virales son difíciles de controlar, dado la aparición continua de nuevas cepas de virus existentes o virus

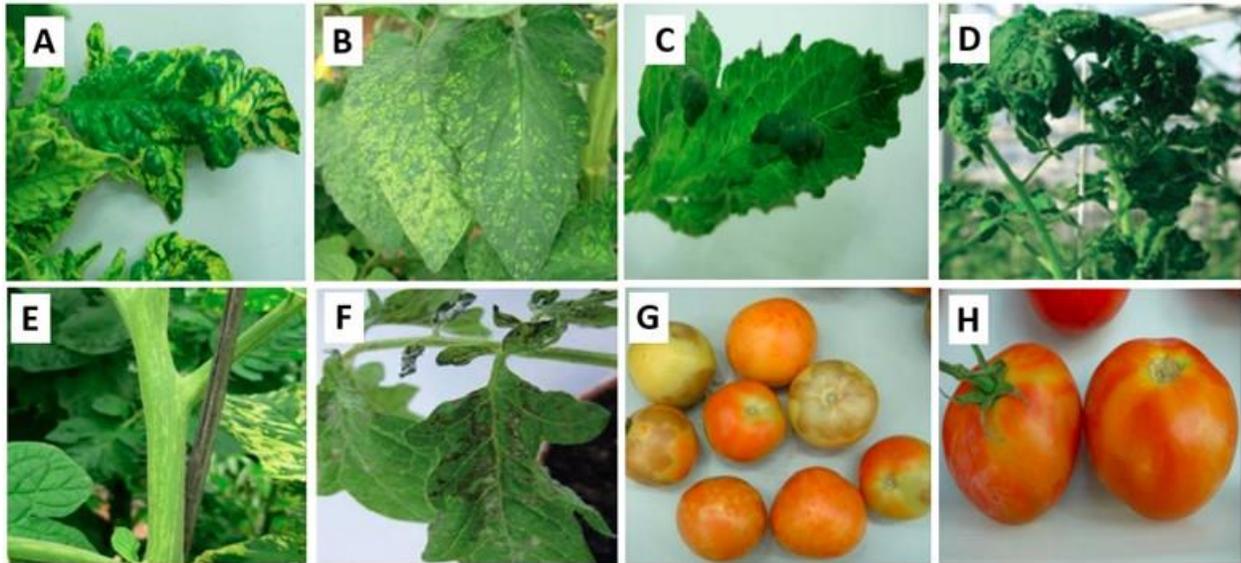
nuevos. Los virus tienen un gran potencial para evolucionar y adaptarse rápidamente bajo presión de selección natural, debido a su capacidad de mutación y plasticidad genética (Hanssen *et al.*, 2010a).

Las principales enfermedades causadas por virus que inducen daños de importancia económica a nivel mundial y nacional en el cultivo de tomate son: tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), pepino mosaic virus (PepMV), tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), tomato mottle mosaic virus (ToMMV), tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), *Orthospovirus tomatomaculae* (sin: tomato spotted wilt virus TSWV), tomato yellow ring virus (TYRV), *Orthospovirus capsiciflavi* (sin: capsicum chlorosis virus, CaCV), *Orthospovirus tomatozonae* (sin: tomato zonate spot virus, TZSV), tomato torrado virus (ToTV), tomato marchitez virus (ToMarV), tomato chlorosis virus (ToCV), pepper mottle virus (PepMoV), pepper veinal mottle virus (PVMV), potato virus Y (PVY), chili veinal mottle virus (ChiVMV), cucumber mosaic virus (CMV), tomato aspermy virus (TAV), *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (sin: impatiens necrotic spot virus, INSV), y southern tomato virus (STV) (Hanssen *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2017; García-Estrada *et al.*, 2022).

## 2.5. Pepino mosaic virus (PepMV)

### 2.5.1. Sintomatología

La sintomatología causada por el PepMV está condicionada por varios factores que determinan el desarrollo y la severidad de los síntomas, incluyendo las condiciones ambientales, el genotipo y el cultivar de tomate (Spence *et al.*, 2006; Hanssen *et al.*, 2010a; Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2013; Mehle *et al.*, 2020). Los síntomas comunes de la enfermedad (Figura 1) son abultamientos y mosaicos amarillentos en las hojas, estriado en el tallo, maduración irregular en frutos (Hanssen *et al.*, 2010a) y en algunos casos necrosis (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010; Sempere *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Síntomas inducidos por PepMV en tomate. (A) y (B) Mosaicos cloróticos en hojas; (C) Abolsamientos en hojas ; (D) Deformación en ápice; (E) Estrías cloróticas en el tallo; (F) Necrosis en hoja; (G) y (H) maduración irregular y mosaicos en fruto (Hanssen et al., 2010a).

### 2.5.2. Rango de Hospedantes y Plantas Indicadoras

El rango de hospedantes del PepMV se restringe principalmente a especies de la familia *Solanaceae*, muchas de las cuales son hospedantes en los que existen infecciones sistémicas. Sin embargo, diferentes aislados del PepMV pueden producir diferentes síntomas en cada una de las especies de hospedantes, haciéndose complejo establecer una correlación entre el fenotipo de la enfermedad y el genotipo del virus (Gómez *et al.*, 2012; Hásiow-Jaroszewka *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 1980).

Aunque de forma natural solo se han descrito infecciones por PepMV en pepino dulce, tomate o especies silvestres próximas a éste, experimentalmente se ha comprobado que es capaz de infectar a plantas de especies como la albahaca (*Ocimum basilicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*Solanum tuberosum*) o tabaco (*Nicotiana* spp.), entre otras (Gómez *et al.*, 2012a; Salomone y Roggero, 2002; Soler *et al.*, 2002; Blystad *et al.*, 2015). Asimismo, se ha descrito que el PepMV es capaz de infectar plantas silvestres circundantes a cultivos de tomate infectados, convirtiéndose éstas en especies reservorio del virus (Gómez *et al.*, 2012a).

Algunos autores han distinguido los aislados del PepMV con base en su rango de hospedantes y

síntomas en plantas indicadoras; sin embargo, todavía faltan datos comparables sobre hospedantes alternos dentro de la familia de las solanáceas y también sobre los síntomas inducidos por diferentes aislados del virus en plantas de prueba bajo diferentes condiciones climáticas (Jones *et al.*, 1980; Martin y Mousserion, 2002; Pagán *et al.*, 2006; Salomone y Roggero, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003).

### **2.5.3. Propiedades Biológicas del Virus**

2.5.3.1. Persistencia e inactivación de la partícula viral. Con base en las características de la partícula viral, se ha reportado que el PepMV es un virus muy estable. Los extractos vegetales provenientes de plantas con el virus, retienen la capacidad infectiva durante al menos tres meses cuando se almacenan a 20 °C; mientras que, hojas infectadas de *Nicotiana glutinosa* secadas sobre silica gel, son infecciosas después de seis meses (van der Vlugt *et al.*, 2011).

Los extractos vegetales con concentraciones virales de hasta  $10^5$  siguen siendo infectivos y para inactivar su capacidad infectiva deben ser sometidos a temperaturas de al menos 70 °C durante periodos de 10 min, valor que se corresponde con el punto de inactivación térmica del PepMV (Jones *et al.*, 1980). El PepMV infecta al tomate de forma sistémica; una vez en la planta se extiende rápidamente por todos los órganos, siendo a los órganos en formación a los que el virus llega más rápido (Yantén-Carreno y Sandoval-Briones 2005). La partícula viral del PepMV puede permanecer activa en las raíces húmedas, al menos tres semanas después del arranque de la planta, momento en que la pudrición de los tejidos impide su conservación; en cambio, si las raíces se dejan secar, el virus puede sobrevivir en los tejidos al menos por cuatro semanas (Yantén-Carreno y Sandoval-Briones, 2005).

2.5.3.2. Transmisión. La transmisión mecánica es la principal forma de transmisión y dispersión del PepMV bajo condiciones naturales, logrando que una planta infectada transmita el virus a otra planta sana con solamente rosarla. En los cultivos de tomate, la transmisión ocurre mayoritariamente por la manipulación de las plantas durante las labores de poda o deshoje, pudiendo diseminarse la enfermedad rápidamente en el invernadero (Lacasa *et al.*, 2003). Aunque

la manipulación de las plantas por el hombre se considera la principal vía de transmisión en cultivos de tomate, se ha descrito la implicación de insectos, como los abejorros (Lacasa *et al.*, 2003; Shipp *et al.*, 2008) y la mosca blanca de invernadero (Noël *et al.*, 2014), o de hongos, como *Olpidium virulentus* (Alfaro-Fernández *et al.*, 2010); sin embargo, no se ha podido comprobar la especificidad de la transmisión. Por otro lado, el PepMV es capaz de transmitirse por semilla y, aunque a una tasa muy baja ( 1.8 al 0.005% ) (Hanssen *et al.*,2010), se cree que ha tenido un papel fundamental en la transmisión del virus a larga distancia (Ling, 2010).

## 2.6. Métodos de Control y Manejo

Actualmente, no existen variedades comerciales de tomate resistentes a PepMV, lo que implica que todos los esfuerzos por controlar la enfermedad se dirigen a estrategias profilácticas en el manejo de los cultivos. Estas estrategias se enfocan en el mantenimiento de estrictas medidas higiénicas desde el semillero hasta la destrucción de plantas infectadas o desechos procedentes de la poda (Aranda y Freitas-Astua, 2017).

En países europeos, se han desarrollado estrategias de protección cruzada basadas en la inoculación de plantas de tomate en etapas tempranas con aislados atenuados del virus y que están resultando efectivas en el control de la enfermedad (Agüero *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de que la protección cruzada puede ser una eficiente medida de control de la enfermedad cuando no se encuentran disponibles otros métodos (Aranda y Freitas-Astua, 2017), ésta presenta desventajas, entre las que se incluye el posible sinergismo con virus no relacionados (Ziebell y Carr, 2010).

## 2.7. Taxonomía y Estructura del Genoma del PepMV

### 2.7.1. Taxonomía

La especie *Pepino mosaic virus* pertenece al género *Potexvirus*, incluido en la familia

*Alphaflexiviridae*. Comparado con otros géneros de esta familia, los *Potexvirus* forman viriones cortos (< 700 nm) y sus genomas tienen cinco marcos abiertos de lectura. Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (2023) este género cuenta con 48 especies.

### 2.7.2. Características de la Partícula Viral

Al igual que otros miembros del género *Potexvirus*, los viriones de PepMV son partículas filamentosas y flexibles, sin envoltura y con simetría helicoidal (Agirrezabala *et al.*, 2015). Su genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva (+ssARN) con una longitud aproximada de 6.4 kb, ordenado en 5 marcos abiertos de lectura (ORF) que se encuentran flanqueados por regiones 5' y 3' no codificantes (untranslated regions, UTRs). Además, consta de una estructura “cap” en su extremo 5' y una cola poliadenilada en el extremo 3' (3' poli-A) (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002; Mumford y Metcalfe, 2001).

Los ORFs codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN (RNA dependent RNA polymerase, RdRp), tres proteínas nombradas como TGB1, TGB2 y TGB3, codificadas por el bloque triple de genes (triple gene block, TGB), y la proteína de la cápside (capside protein, CP) (Park *et al.*, 2014). La RdRp sintetiza la secuencia de polaridad negativa del genoma viral y la de los tres ARNs subgenómicos (sgARNs) (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Las proteínas TGB1-3 y la CP se traducen a partir de estos sgARNs que, al igual que el ARN genómico, tienen estructura 5'-cap y cola 3' poli-A (Figura 2).

El ORF1 (nt 87- 4406) es la de mayor tamaño (1.439 aa) y codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Esta proteína de 164 kDa contiene tres dominios muy conservados que se localizan en otros *Potexvirus* y que están implicados en la replicación viral: el dominio metiltransferasa (aa 59 a 224) específico del supergrupo de virus “Sindbis-like” (Rozanov *et al.*, 1992), el dominio NTPasa/helicasa (aa 708-934) que presenta los motivos NTP-binding GCGGSGKS y VVIFDD, y el dominio de la RNA polimerasa dependiente (aa 1217-1374) caracterizado por el motivo SGEGPTFDANT-X22-GDD (Kamer y Argos, 1984).

Además de estas zonas fuertemente conservadas, existe una región hipervariable localizada antes del dominio NTPasa/helicasa (aa 407-593) (Cotillón *et al.*, 2002). El codón de parada del primer

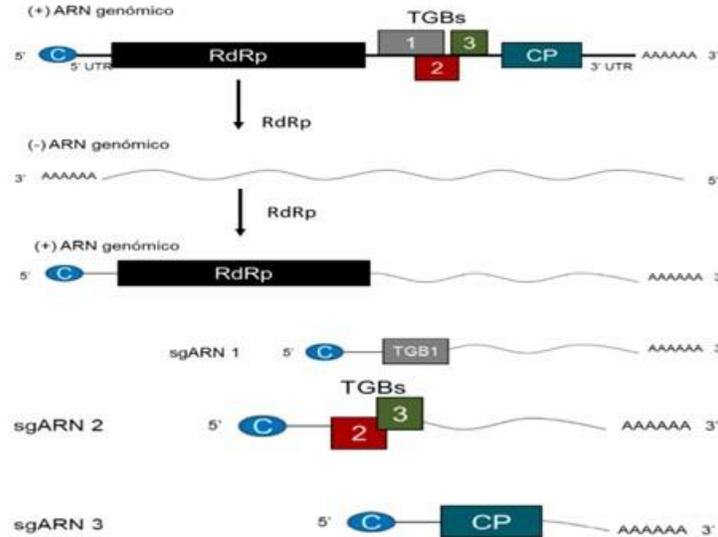
ORF va seguido por una corta región intergénica (IR1) de 25 nt tras la que se localizan, parcialmente solapadas, los ORF 2, 3 y 4 que constituyen el triple bloque génico (Triple Gene Block, TGB) que presenta una organización similar a la de otros *Potexvirus* (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002). Esta zona del genoma está implicada en el movimiento del virus célula a célula y los productos que codifica son necesarios para la infectividad del virus en la planta hospedante, en particular el ORF 2 (nt 4432 – 5136), que codifica la primera proteína del TGB (TGBp1) de 234 aa (26 kDa) en la que está presente el dominio NPTasa/helicasa (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002).

La TGBp1 pertenece a la superfamilia I de las RNA helicasas. El ORF3 (nt 5117–5488) se solapa en los 19 nt iniciales con el extremo 3' del ORF2 y se extiende 148 nt tras el codón de inicio del ORF4. Esta zona del genoma codifica la segunda proteína del TGB (TGBp2) de 14 kDa. El ORF4 (nt 5340–5594) codifica la tercera proteína del TGB (TGBp3) de 84 aa y 9 kDa (Cotillón *et al.*, 2002).

Tras una segunda región intergénica (IR2) de 38 nt de longitud (nt 5595– 5632) de alta variabilidad entre las distintas cepas, se localiza el quinto ORF (nt 5633–6346) que codifica la proteína de cubierta del virus (CP) de 238 aa (25 kDa) esencial para la infección de las plantas y que cuenta con un núcleo anfipático KFAAFDFFDGVT, que también se localiza en las CP de otros *Potexvirus* que podría ser el responsable de la unión de la CP al RNA viral mediante interacciones hidrofóbicas (Cotillón *et al.*, 2002). Los ORF1 y ORF5 son las zonas más conservadas del genoma del PepMV, mientras que los ORF2-3 y 4 se presentan como las zonas menos conservadas del mismo (Mumford y Metcalfe, 2001; Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002).

Las cinco zonas codificantes están flanqueadas por dos regiones que no se transcriben (UTR's). En el extremo 5' del genoma se sitúa la 5'UTR, zona rica en adenina y citosina (A+C) de 86 nt de longitud y que precede a los 5 ORFs. Como ocurre en otros *Potexvirus*, la 5'UTR se inicia con el pentámero 5'GAAAA, que podría ser importante en la replicación del RNA o en la transcripción a proteína y además contiene varios motivos CAAA que permitirían la unión de los ribosomas (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002).

En el extremo 3' del genoma se localiza la 3'UTR que consiste en 63 nt situados a continuación del quinto ORF y que separan a esta última zona codificante de la cola poliadenilada o Poly-(A) situada en el extremo 3'. En los extremos 5' de los ORF2 y ORF5 podrían localizarse las secuencias promotoras para la síntesis de los RNAs subgenómicos (sgRNA) del PepMV (Cotillón *et al.* 2002).



**Figura 2.** Organización genómica y estrategia de expresión de PepMV. Representación esquemática del ARN genómico de polaridad positiva (+ARN), de polaridad negativa (-ARN) y de los tres ARNs subgenómicos (sgARN 1-3). El genoma de PepMV se compone de un 5´-cap (5´C), una cola 3´-poliA (AAA), las regiones no traducidas 5´ UTR y 3´ UTR y de cinco marcos de lectura abiertos que codifican a la ARN polimerasa dependiente del ARN ( RdRp), las tres proteínas de movimiento (TGB1-3) codificadas por el bloque de genes triple y la proteína de la cápside (CP). Las flechas indican la estrategia de expresión del virus. Los sgARN se representan con el ORF que traduce a partir de ellos ( Aguilar et al., 2002).

### 2.7.3. Variabilidad Genética

Los aislados del pepino mosaic virus (PepMV) muestran una diversidad genómica considerable, que parece estar relacionada con los orígenes geográficos, los hospedantes específicos y/o las altas tasas de mutación de los virus de ARN. Estas diferencias parecen aumentar la adaptación del PepMV a nuevos entornos (Domingo *et al.*, 2012).

Mundialmente, se han descrito cinco genotipos del PepMV, Peruano (LP), Europeo (EU), Americano (US1), Chileno (CH2) y Peruano del Sur (PES) (Hanssen and Thomma 2010; Moreno-Pérez et al. 2014). Con base en la comparación de la diversidad de secuencias del genoma de las poblaciones de aislados infectando cultivos de tomate, el genotipo CH2 comparte aproximadamente el 78% de su identidad de nucleótidos con el resto de los genotipos, mientras que la secuencia de nucleótidos del genotipo EU es similar en un 90–96% al genotipo LP, y aproximadamente un 82–86% con el genotipo US1 (Moreno-Pérez *et al.*, 2014; Bibi *et al.*, 2017).

Sin embargo, los diferentes genotipos no pueden distinguirse en función de las características biológicas, ya que, se ha observado que aislados de un mismo genotipo pueden causar diversos síntomas o tipos de infección en hospedantes alternos y especies indicadoras (Hanssen *et al.*, 2009; Gómez *et al.* 2012b ; Bandte *et al.*, 2016).

Para varios países europeos y en Norteamérica, los estudios de genética de poblaciones han revelado un cambio en el genotipo PepMV dominante EU al genotipo CH2 (French *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2013).

## 2.8. Técnicas de Detección e Identificación

### 2.8.1. Técnicas Moleculares

Los procedimientos moleculares que se utilizan para la identificación del PepMV en muestras vegetales y en estudios de diversidad genética son numerosos, aunque los más utilizados están basados en la transcripción reversa y posterior amplificación de un fragmento del genoma utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Naidu y Huges, 2003).

2.8.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean cuatro pasos: a).- desnaturalización a alta temperatura (normalmente entre 94 o 95 °C) para separar las hebras del ADN; b).- alineamiento de los dos iniciadores a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN y cuya temperatura depende del tamaño y composición nucleotídica del iniciador; c).- la extensión del iniciador para formar la cadena complementaria por la ADN polimerasa, normalmente a 72 °C y d).- la extensión final durante 5 o 10 min con la misma temperatura (Naidu y Huges, 2003).

En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los nuevos ciclos por lo que repitiendo los primeros tres pasos 30 o 40 veces en un termociclador automático, la cantidad de nuevas hebras de ADN amplificadas suman millones y pueden ser analizadas en un gel con el uso

de un fotodocumentador (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

2.8.1.2. PCR multiplex. La PCR multiplex es otra variante de la PCR punto final, mediante la cual se pueden detectar dos o más virus en la misma reacción. La amplificación se realiza utilizando dos o más pares de iniciadores y aumentando proporcionalmente los reactivos de la reacción, ahorrando tiempo en la detección múltiple de patógenos (Naidu y Huges, 2003).

2.8.1.3. RT-PCR. En caso de que los virus a detectar sean de genoma de ARN, la PCR tiene un paso previo, se tiene que retrotranscribir la hebra de ARN, en ADN complementario, mediante la utilización de una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Una vez transcrito en ADN complementario, se realiza una PCR convencional para su amplificación y se conoce como RT-PCR (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009).

## 2.9. Estudios Enfocados en la Identificación, Distribución y Diversidad Genética de Aislados del PepMV Alrededor del Mundo

### 2.9.1. Primeros Reportes y Estado Actual de la Epidemiología del PepMV

El PepMV fue identificado por primera vez en el año 1974 en plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*) y se identificó como genotipo “Peruano” (LP) (Jones *et al.*, 1980).

En 1999, en Holanda, se detectaron por primera vez plantas de tomate infectadas con PepMV con un marcado filimorfismo en los folíolos de las hojas superiores, manchas amarillentas y un definido mosaico en las hojas (van der Vlugt *et al.*, 2002). En países como Inglaterra e Irlanda se describieron síntomas similares, pero más agresivos, que incluso obligaron a eliminar los cultivos (Wright y Mumford, 1999).

Desde la notificación de estos casos y en tan sólo cuatro años, el virus se extendió por las principales zonas productoras de tomate de Europa; estos genotipos fueron nombrados “Europeos”

(EU) (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002; Jordá *et al.*, 2001; Mumford y Metcalife, 2001; Pagán *et al.*, 2006; Roggero *et al.*, 2001). Poco después, se reportó su presencia en Norteamérica (French *et al.*, 2001).

Pagán *et al.*, (2006), identificaron que los aislados de la epidemia inicial en Europa fueron muy similares (99%) entre sí, constituyendo el genotipo de tomate europeo (EU). Los aislados EU están estrechamente relacionados (96% de similitud) con el genotipo denominado Peruano o LP (Hanssen y Thomma 2010; Pagán *et al.*, 2006).

Desde 2005 se han caracterizado nuevos aislados del PepMV que comparten sólo un 80% de similitud de secuencia con los genotipos EU o LP. Estos aislados se reportaron en EE. UU. como genotipos US1 y US2 (Maroon *et al.*, 2005). Por su parte, Ling (2007) reportó dos nuevos genotipos CH1 y CH2, procedentes de lotes de semillas de tomate producidas en Chile. Posteriormente, Hanssen *et al.* (2008), realizaron la caracterización completa de estos aislados y demostraron que el genotipo US2 era un recombinante entre los genotipos US1 y CH1, reconociendo en ese momento cuatro genotipos del PepMV: el genotipo Peruano original (LP), el genotipo de tomate Europeo (EU), el Americano (US1) y el genotipo Chileno (CH2). Alfaro-Fernández *et al.*, (2008), reportaron el genotipo US1 en Islas Canarias, España.

En Norteamérica, French *et al.*, (2008), reportaron el genotipo EU como predominante en Canadá y EE. UU., estos resultados concordaron con lo reportado por Ling *et al.*, (2008), quienes estudiaron la composición genética de las poblaciones del PepMV provenientes de invernaderos de Canadá y EE. UU.

Gómez *et al.*, (2012b), caracterizaron las epidemias ocasionadas por el PepMV en países de la cuenca mediterránea en Europa y encontraron que existía un reemplazo de genotipos en ciertas regiones, concluyendo que los aislados EU fueron reemplazados por aislados CH2, con una infección mixta entre ambos genotipos y la recombinación entre ellas, jugando un papel importante en la dinámica evolutiva del virus, y coincidiendo con lo previamente descrito por Hasiów-Jaroszewska *et al.*, (2010).

En 2011, se reportó por primera vez en Jocotitlán, México la presencia del PepMV, causando síntomas en más de 50% de las plantas. A través de análisis serológicos y la amplificación por RT-PCR del segmento de la RdRp y TGB1, se identificó el genotipo Chileno (CH2) (Ling y Zhang, 2011). En muestras procedentes del mismo sitio en Jocotitlán, México, Ling *et al.*, (2013) reportaron un cambio en la prevalencia del genotipo CH2 por el genotipo US1, así como también

desarrollaron una técnica RT-LAMP para identificar simultáneamente infecciones mixtas con los genotipos CH2 y US1. Estos datos se corroboraron por RT-PCR y secuenciación por método de Sanger. A partir del análisis filogenético, se obtuvo una identidad de secuencia >98% con los genotipos detectados en las muestras vegetales y los lotes de semilla que habían sido utilizados en esa misma temporada, concluyendo que el principal factor de cambio de los genotipos en periodos tan cortos pudo deberse a la introducción no intencional de semilla contaminada proveniente de otros lugares.

Debido a la necesidad de estudiar la situación del PepMV en la región de su centro de origen, Moreno *et al.*, (2014) estudiaron la incidencia del PepMV en poblaciones naturales de tomates silvestres del sur de Perú, y a través de secuenciación por método de Sanger y análisis filogenéticos, establecieron la variación y estructura genética de las poblaciones del virus en los diferentes hospedantes naturales encontrados, obteniendo como resultados una incidencia alta del virus y, a su vez, propusieron un nuevo genotipo, denominado “PES”(Peruano del Sur).

Gómez-Aix *et al.*, (2019) secuenciaron 85 aislados recolectados en ocho importantes áreas productoras de tomate en España y Marruecos durante el año 2017 y encontraron que el genotipo CH2 prevaleció sobre el genotipo EU, el cual se encontró principalmente en infecciones mixtas; mientras que, el genotipo US1 se restringió a unos pocos casos.

Si bien, la persistencia de infecciones únicas y mixtas con genotipos del PepMV está bien documentada, no está claro cómo la co-circulación de diferentes cepas virales podría afectar la variabilidad genética y la dinámica evolutiva de las poblaciones virales en las plantas. En este sentido, Alcaide *et al.*, (2020) estudiaron diferentes genotipos del PepMV recolectados entre 2014 y 2015, en regiones vecinas de Murcia, y observaron su interacción en infecciones únicas y mixtas, los resultados se compararon con los genotipos recolectados durante 2007 y 2008 de las mismas regiones, concluyendo que las interacciones competitivas entre los genotipos del PepMV podrían estar impulsando la variabilidad genética de las poblaciones en los genotipos Chilenos (CH2). Por su parte, Abrahamian *et al.*, (2020) secuenciaron el genoma completo de un aislado del PepMV proveniente de una región de EE. UU. y mediante análisis filogenético se denominó como aislado “US3”, además, se identificó que compartía mayor similitud con aislados pertenecientes al genotipo Europeo.

Cabe resaltar que, en los reportes donde han identificado infecciones mixtas naturales entre genotipos del PepMV, también se ha detectado una alta incidencia de infecciones mixtas con otros

virus como el tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), lo cual ha provocado síntomas más severos, tal es el caso de reportes en países como México (Ling *et al.*, 2019), Alemania (Menzel *et al.*, 2019), Reino Unido (Skelton *et al.*, 2019) e Israel (Klap *et al.*, 2020).

### **3. HIPOTESIS**

H1. El pepino mosaic virus (PepMV) está presente en al menos un estado productor de tomate en el centro de México.

H2: Al menos los genotipos US1 y CH2 del pepino mosaic virus (PepMV) están presentes en las áreas productoras de tomate en México.

H3: Existe una alta incidencia de co-infecciones entre genotipos del PepMV-CH2 y/o ToBRFV al menos en el centro de México.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1. Objetivo General

Determinar la distribución de genotipos del pepino mosaic virus (PepMV) en las principales áreas productoras de tomate en México.

### 4.2. Objetivos Específicos

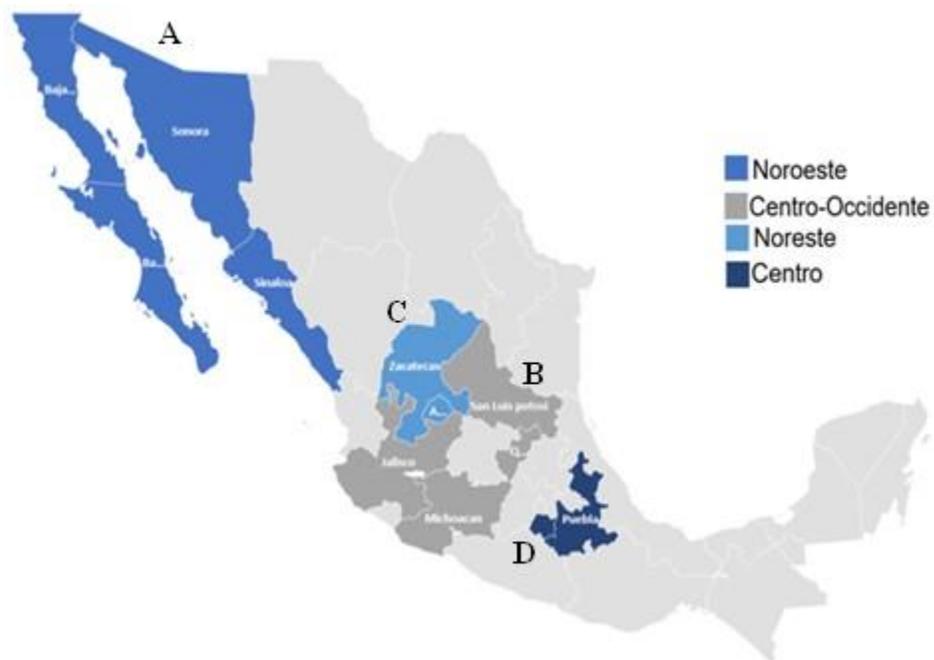
- Detectar mediante pruebas serológicas y moleculares (RT-PCR), la presencia del pepino mosaic virus (PepMV) en las áreas productoras de tomate en México.
- Identificar los genotipos del pepino mosaic virus (PepMV) presentes en las áreas productoras de tomate en México mediante análisis filogenéticos.
- Caracterizar biológicamente los aislados del pepino mosaic virus (PepMV) y determinar variantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Recolección de Muestras y Detección del PepMV en Campo

Durante el ciclo Otoño-Invierno 2021-2022 y ciclo Primavera-Verano 2022, se recolectaron muestras de hojas de tomate con síntomas de moteado, mosaico y clorosis, así como frutos con síntomas de maduración irregular procedentes de las principales áreas productoras de tomate en México, dividiéndolas principalmente en cinco regiones (Figura 3): A) Noroeste (Sinaloa, Baja California Sur, Sonora), B) Centro-Occidente (San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Querétaro), C) Noreste (Zacatecas) y D) Centro (Morelos, Puebla). La recolección de muestras (tejido foliar y fruto) se llevó a cabo de manera dirigida hacia plantas de tomate que presentaban sintomatología característica del PepMV.

Para la detección rápida del virus en campo se emplearon kits de prueba serológica ImmunoStrip® (Agdia) en algunos casos se recolectó tejido foliar de plantas que no presentaban síntomas, con la finalidad de descartar plantas asintomáticas o falsos positivos. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Fitopatología de CIAD-Culiacán o enviadas directamente al laboratorio de Virología Molecular del Tecnológico de Monterrey campus Querétaro y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso. En algunos casos, para mantener la fuente de inóculo, se hicieron inoculaciones artificiales en plantas de tomate y tabaco.



**Figura 3.** Áreas productoras de tomate en México en las que se recolectaron muestras del PepMV. A) Región Noroeste : Sonora, Sinaloa y Baja California Sur; B) Centro-Occidente : San Luis Potosí, Jalisco, Querétaro, Michoacán ; C) Noreste: Zacatecas y D) Centro: Morelos, Puebla.

## 5.2. Detección Molecular del PepMV y ToBRFV en Muestras Recolectadas Mediante RT-PCR Múltiple de un Solo Paso

### 5.2.1. Selección de Iniciadores

Se seleccionaron un conjunto de iniciadores tanto genéricos (PepMV y ToBRFV) como específicos para cada genotipo del PepMV (Cuadro 1). Para discriminar entre algunas de las muestras con síntomas con sintomatología tanto de PepMV como ToBRFV se realizó un primer cribado de todas las muestras para confirmar la presencia de cada uno de los virus. Una vez confirmadas las muestras infectadas con PepMV y PepMV +ToBRFV, se procedió al análisis de identificación de genotipos e infecciones mixtas. Para permitir una genotipificación eficiente, se utilizaron tres iniciadores específicos para el genotipo LP-EU, US1 y CH2 y un iniciador reverso común (Cuadro 1), los cuales amplifican regiones parciales del gen RdRp. Adicionalmente, para algunos casos se

emplearon los iniciadores genéricos KL05-13 y R5 los cuales amplificaban la región TGB2-3 y PC (Cuadro 1) para confirmar la identidad de los genotipos identificados.

**Cuadro 1.** Conjunto de iniciadores utilizados para la detección simultánea de PepMV y ToBRFV, y la identificación de genotipos del PepMV mediante RT-PCR múltiple de un solo paso

Objetivo	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Región/gen	Amplicón	Referencia
PepMV genérico	KL05-13-F KL05-14-R	GTCCTCACCAATAAATTTAG AGGAAAACTTAACCCGTTC	TGB2-3	202 pb	Ling <i>et al.</i> , 2008
PepMV genérico	F5-F R5-R	GACTTCTCAAATCCTAATACAGC CACATCAGCATAAGCACGAGC	PC	166 pb	Hasiów <i>et al.</i> , 2008
ToBRFV	ToBRFV-FMX ToBRFV-RMX	AACCAGAGTCTTCTATACTCGGAA CTCWCATCTCTTAATAATCTCCT	RdRp	475 pb	Rodríguez-Mendoza <i>et al.</i> , 2019
PepMV-LP-EU	PepMV-DEP	TCAATGTTTCATCTTCTAGCAGTC	RdRp	980 pb	Alfaro-Fernández <i>et al.</i> , 2009
PepMV-US1	PepMV-D1	ACAGCACAACCTACCATATCTCACAAT	RdRp	703 pb	
PepMV-CH2	PepMV-D2	ACTATCCGCTTCTCTGCCATGT	RdRp	549 pb	
PepMV-R2	PepMV-R2	GCTTCATTGT TGGACTCATGATA	RdRp		
PepMV-Genérico	KL05-13-F R5-R	GTCCTCACCAATAAATTTAG CACATCAGCATAAGCACGAGC	TGB2-3-PC	500 pb	Ling <i>et al.</i> , 2008 Hasiów <i>et al.</i> , 2008

### 5.2.2. Extracción de ARN y RT-PCR de un Solo Paso

Para la extracción de ARN total se empleó el protocolo de TRIzol® (Invitrogen, USA) con algunas modificaciones. A partir de 100 mg de tejido foliar o de fruto previamente almacenados a -80 °C se procedió al macerado de las muestras con un homogeneizador Tissue Lyser LT 85600 (QIAGEN® Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez que se obtuvo un polvo fino de cada muestra se adicionaron 1000 µL de TRIzol®, se mezclaron en vórtex por 3 minutos hasta homogenización y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente (20-25°C). Se adicionaron 200 µL de cloroformo y homogenizó durante 5 segundos. Se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente (20-25°C) y se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se extrajo la fase acuosa (superior) y se colocó en un nuevo tubo de 1.5 mL (este procedimiento se repitió 2 veces a partir de la adición de cloroformo).

Después de la obtención de los nuevos tubos con la fase acuosa se le agregaron 0.5 mL de isopropanol al 100%. Para la precipitación se incubaron a -20°C durante 30 min y se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante del tubo con micropipeta, dejando

solo la pastilla de ARN y se re suspendió con 1 mL de etanol-DEPC al 75%. Se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 7,500 x g durante 5 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante con una micropipeta. Posteriormente se secó la pastilla durante 10 min, manteniendo el tubo invertido con la tapa abierta sobre una toalla de papel absorbente.

Finalmente, la pastilla se re suspendió con 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso. La concentración y calidad del ARN se midió con un espectrofotómetro UV-Visible Nanodrop One® (Thermo Scientific®, EE. UU).El ARN de cada aislado se utilizó como templado para la amplificación por RT-PCR de un sólo paso de la región de interés con cada uno de los iniciadores descritos en el Cuadro 1.

Para la reacción de RT-PCR se siguió lo descrito por Alfaro-Fernández *et al.*, (2009) con algunas modificaciones, donde a un volumen final de 25 µL: 10 µL de agua de grado de biología molecular, 2 µL de ARN, 5 µL de Green GoTaq Flexi Buffer 5X, 1.25 µL de DTT (0,1 M), 1 µL del iniciador PepMV-DEP, 1 µL del iniciador PepMV-D2, 1 µL del iniciador PepMV-D1 y 1 µL del iniciador PepMV-R (10 µM), 1.1 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.1 µL de inhibidor de RNasa, 0.5 µL de mezcla dNTP (10 µM), 0.5 µL Superscript III Rtase (200U/ µM) (Invitrogen) y 0.5 µL de ADN polimerasa GoTaq (Invitrogen). La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.) con las siguientes condiciones:1 ciclo a 52 °C durante 30 min, 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, a 56 °C durante 45 s y a 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 7 min. Se utilizaron 4 µL del producto de PCR para la electroforesis en gel de agarosa/TBE al 1% teñida con SYBR® Green (Invitrogen®, EE.UU.), con una corrida de 45 min a 100 volts. Los productos se visualizaron en un fotodocumentador iBright® CL1000 ( Invitrogen®, EE.UU.).

### 5.3. Purificación y Secuenciación de Productos de RT-PCR

Finalmente, los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron por la empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea) en ambas direcciones con los mismos iniciadores que se usaron para las reacciones de PCR.

#### 5.4. Alineamiento de Secuencias y Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas de las regiones parciales del gen RdRP y TGB2-3 y PC, fueron analizadas con el software Geneious 2019.2.3, posterior al corte y ensamblado, fueron sometidas a BLASTn, y a partir de los BLAST-hit obtenidos, se seleccionaron las secuencias de aislados referencia para cada uno de los genotipos del PepMV y se realizaron alineamientos múltiples usando CLUSTAL W incluido en el mismo software. Los árboles filogenéticos se generaron con el software MEGA10 utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei con 1000 réplicas de arranque.

#### 5.5. Caracterización Biológica

##### **5.5.1. Purificación de Aislados con Infección Mixta de PepMV y ToBRFV**

A partir de los aislados almacenados en -20 °C, se llevó a cabo la reactivación en plantas de tomate cv Byelsa y 20 días después de inoculación, se siguió la metodología con algunas modificaciones descrita por Hanssen *et al.*, (2009), donde por cada aislado, se tomó 1 g de tejido infectado y se maceraron en 2 mL de tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,4) se agregó a la mezcla 0.1 g de CELITE® y con un hisopo se inoculó el primer par de hojas en el hospedante indicador *Datura stramonium*. Los síntomas se evaluaron por periodos de 24 h, la infección por ToBRFV se detectó con la aparición de lesiones locales necróticas (Luria, *et al.*, 2017) y para PepMV con la infección sistémica de la planta (Blystad *et al.*, 2015). Para la confirmación de la purificación de los virus, se utilizaron kits de prueba serológica ImmunoStrip® (Agdia).

### 5.5.2. Inoculación en Especies Indicadoras

Con el objetivo de investigar la posibilidad de diferenciar entre los genotipos del PepMV y las posibles variantes basadas en la expresión de síntomas, se seleccionaron cinco aislados procedentes de cinco zonas productoras de tomate, tres aislados del genotipo CH2 (MX1, MXM18 y MXM31) un aislado que presentaba infección mixta de genotipos CH2+LP (MXM71) y un aislado genotipo EU (MXM64), se utilizó como fuente de inóculo los aislados previamente purificados en el hospedante *D. stramonium*.

Se emplearon las especies indicadoras según Blystad *et al.*, (2015) y Luria *et al.*, (2017), *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* cv Vir, *N. occidentalis*, *N. tabacum* cv Xanthi, *Chenopodium ambrosioides* y como hospedantes *Solanum lycopersicum* cv. Río Grande y *S. melongena* cv. ESTELAL y se procedió nuevamente a inocular mecánicamente los aislados según lo descrito por Hanssen *et al.*, (2009), donde por cada aislado, se tomó 1 g de tejido infectado y se maceraron en 2 mL de tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,4) se agregó a la mezcla 0.1 g de CELITE ® y con un hisopo se inoculó el primer par de hojas. Para cada aislado se inocularon tres plantas por especie y, como control, una planta se inoculó solamente con agua o tampón.

Las plantas inoculadas se observaron regularmente para el desarrollo de síntomas locales y sistémicos en un período de cuatro a cinco semanas después de la inoculación. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones de invernadero (de 16 a 35 °C /12 h luz) con fertirriego cada que se requirió. La detección del PepMV en las plantas inoculadas se llevó a cabo a los 30 ddi usando kits comerciales de ImmunoStrip (Agdia®).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Distribución del PepMV en Áreas Productoras de Tomate en México

Se analizaron un total de 77 muestras procedentes de 11 estados con producción de tomate en México (Cuadro 2) y a través de RT-PCR usando iniciadores genéricos para detección del PepMV, se obtuvieron amplicones de 202 y 166 pb (Figura 4A), detectándose al virus en 15 muestras recolectadas en los estados de Baja California, Sonora, Guanajuato, Querétaro, Edo. de México y Puebla. Además, se detectó al ToBRFV en 37 muestras, de las cuales, ocho presentaron coinfección con el PepMV (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Incidencia del PepMV y ToBRFV en los diferentes estados productores de tomate en México

	Estado	No. muestras recolectadas	Detección <sup>a</sup>		PepMV + ToBRFV	Síntomas <sup>b</sup>
			PepMV	ToBRFV		
1	Baja California	3	2	1	0	MT,MC
2	Sinaloa	6	0	6	0	MT,MC,MF
3	Sonora	2	2	0	0	MS,CL,MF
4	Jalisco	3	0	0	0	ND
5	Michoacán	2	0	2	0	ND
6	Guanajuato	5	1	0	1	MT,MC
7	San Luis Potosí	4	0	4	0	ND
8	Morelos	8	0	4	0	MS, CL, MF
9	Edo. de Mex	17	0	4	5	MT, MC, CL
10	Querétaro	10	2	4	1	MC,CL,MF
11	Puebla	15	0	12	1	MS,CL, MF
	Total muestras	77	7	37	8	

<sup>a</sup>Indica el número de muestras infectadas confirmadas por RT-PCR usando iniciadores genéricos para PepMV y ToBRFV.

<sup>b</sup>Síntomas observados en las muestras recolectadas. MT = mosaico tenue; MC= mosaico clorótico ; MS= mosaico severo; CL= clorosis ; MF= marmoleado en frutos ; ND= no disponible.

**Cuadro 3.** Muestras positivas a ToBRFV, PepMV e identificación de genotipos del PepMV

No.	Aislado	Estado	Síntomas <sup>a</sup>	RT-PCR <sup>b</sup>		Genotipo PepMV identificado <sup>c</sup>				Infección mixta
				ToBRFV	PepMV	LP	CH2	EU	US1	
1	MXM1	Baja California	MM, CL	-	+		+			
2	MXM30	Baja California	MM, CL	-	+					+
3	MXM64	Sonora	SV, YM, CL	-	+			+		
4	MXM65	Sonora	SV, YM, CL	-	+			+		
5	MXM71	Guanajuato	NS	-	+					+
6	MXM72	Guanajuato	NS	+	+	+				
7	MXM31	Querétaro	MM, CL, FM	+	+		+			
8	MXM32	Querétaro	MM, CL, FM	-	+		+			
9	MXM33	Querétaro	MM, CL, FM	-	+		+			
10	MXM18	Edo. de Mexico	MM, CL, FM	+	+		+			
11	MXM19	Edo. de Mexico	MM, CL	+	+	+				
12	MXM20	Edo. de Mexico	MM, CL	+	+					+
13	MXM21	Edo. de Mexico	MM, CL	+	+					+
14	MXM22	Edo. de Mexico	MM, CL, FM	+	+					+
15	MXM70	Puebla	SM, YM, CL	+	+		+			
<b>Total</b>				<b>8</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

<sup>a</sup> Síntomas observados en las muestras recolectadas. MT = mosaico tenue; MC= mosaico clorótico ; MS= mosaico severo; CL= clorosis ; MF= marmoleado en frutos ; NS= Sin síntomas.

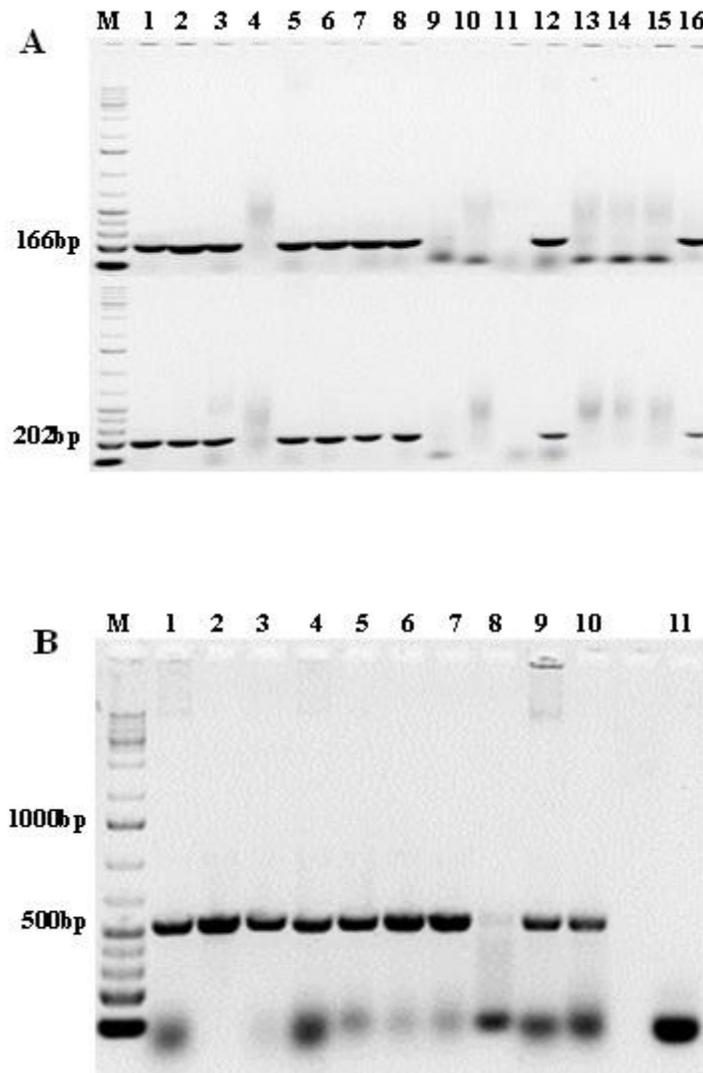
<sup>b</sup> Indica la presencia del virus en las muestras, confirmadas por RT-PCR usando iniciadores genéricos para PepMV y ToBRFV. - = resultado negativo ; + = resultado positivo.

<sup>c</sup> Indica la identificación del genotipo del PepMV a través de RT-PCR múltiple (Alfaro-Fernández et al. 2009). + = resultado positivo.

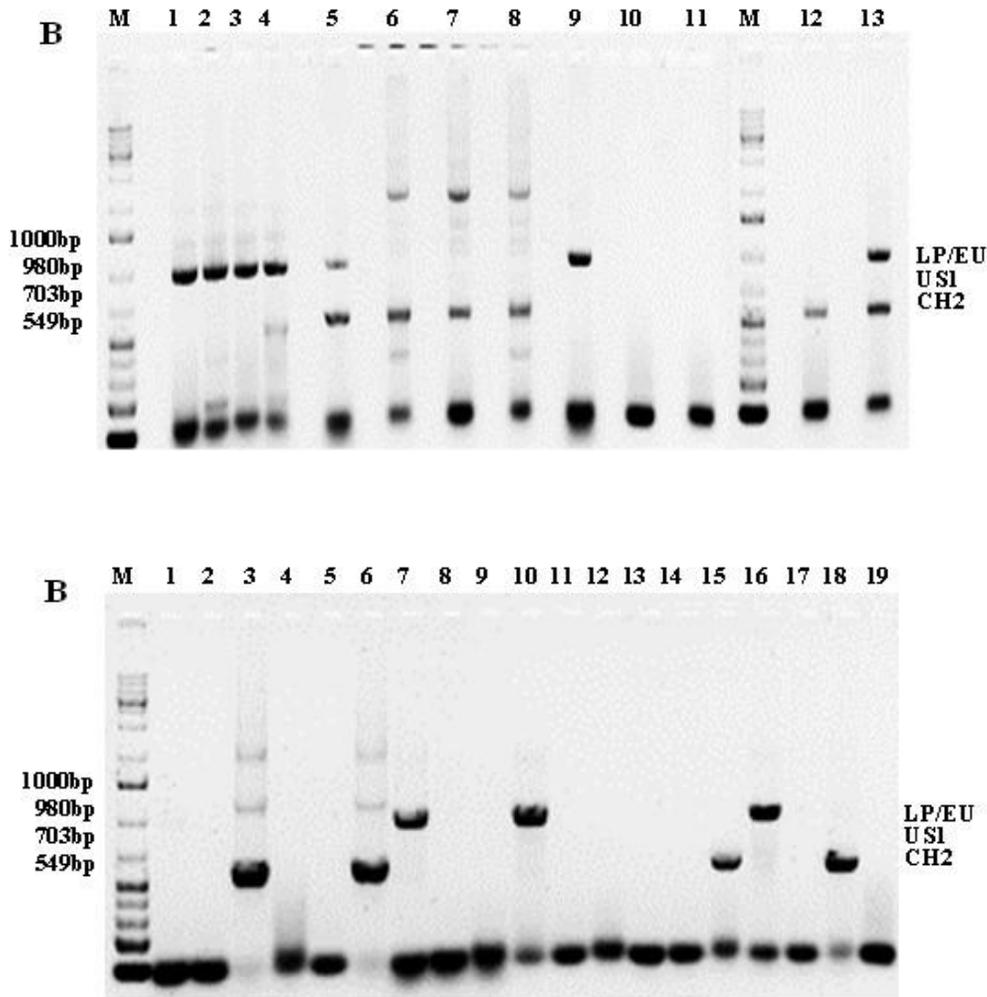
## 6.2. Detección de Genotipos del PepMV e Infecciones Mixtas Mediante RT-PCR Múltiple

A través de RT-PCR múltiple utilizando iniciadores específicos de la región parcial de la RdRp de los genotipos PepMV LP–EU, US1 y CH2 (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009), se obtuvieron productos de aproximadamente 980 y 549 pb correspondientes a los genotipos LP, EU, y CH2, en infecciones simples y mixtas (Figura 5A). Sin embargo, para discriminar entre los genotipos LP y EU de las muestras analizadas, se secuenció cada uno de estos amplicones. En este sentido, se identificaron cinco muestras en co-infección entre los genotipos LP y CH2, dos muestras con infección simple del genotipo LP, seis muestras con infección simple del genotipo CH2 y dos muestras con infección

simple del genotipo EU (Cuadro 3). Para el caso de las muestras analizadas con la combinación de iniciadores KL05-13 (Ling *et al.*, 2008) y R5 (Hasiów *et al.*, 2008) se obtuvieron productos de aproximadamente 500 pb, correspondiente a la región TGB2-3 y PC (Figura 4B).



**Figura 4.** Validación de RT-PCR usando iniciadores genéricos del PepMV con productos analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. **A.** Detección con iniciadores genéricos, productos de 166 pb (Hasiów *et al.* 2008) y 202 pb (Ling *et al.* 2008). M: Marcador 100 pb ; carril 1-3 : muestras positivas; carril 4: control negativo ; carril 5-8, muestras positivas ; carril 9-11 : muestras negativas; carril 12 y 16 : control positivo; carril 13-15 : muestras negativas. **B.** Detección con iniciadores genéricos KL05-13 / R5 productos de 500 pb. M: Marcador 100 pb ; carril 1-7 muestras positivas; carril 8: muestra negativa; carril 9: muestra positiva; carril 10 control positivo; carril 11: control negativo.



**Figura 5.** Validación de RT-PCR múltiple usando iniciadores específicos para genotipos del PepMV con productos analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.A, Detección de coinfecciones de genotipos del PepMV en RT-PCR múltiple (Alfaro-Fernández et al. 2009). M: marcador 100 pb ; Carril 1-3 : muestras con infección simple del genotipo LP; carril 4: muestra con infección mixta LP+CH2; carril 5: muestra con infección mixta LP+CH2; carril 6-8 : muestras con infección simple del genotipo CH2, mostrando bandas inespecíficas ; carril 9: muestra con infección simple con genotipo EU; carril 10 : muestra negativa; carril 11: control negativo; carril 12: muestra con infección simple con genotipo CH2 ; carril 13: muestra con infección mixta con genotipo LP+CH2. B, Confirmación de genotipos del PepMV con iniciadores específicos (Alfaro-Fernández et al. 2009) en RT-PCR simple. M: marcador 100 pb; carril 1 y 2 : muestras negativas ; carril 3, 6, 15 : muestras positivas genotipo CH2; carril 7: muestra positiva genotipo LP; carril 10 y 16 : muestra positiva genotipo EU; carril 18: control positivo; carril 19: control negativo.

### 6.3. Análisis Filogenético de Región Parcial del Gen *RdRp* de aislados CH2

Un total de 34 accesiones reportadas previamente en GenBank para los genotipos LP, EU, US1, CH2 y PES se compararon con las 11 secuencias de los aislados con infección del genotipo CH2

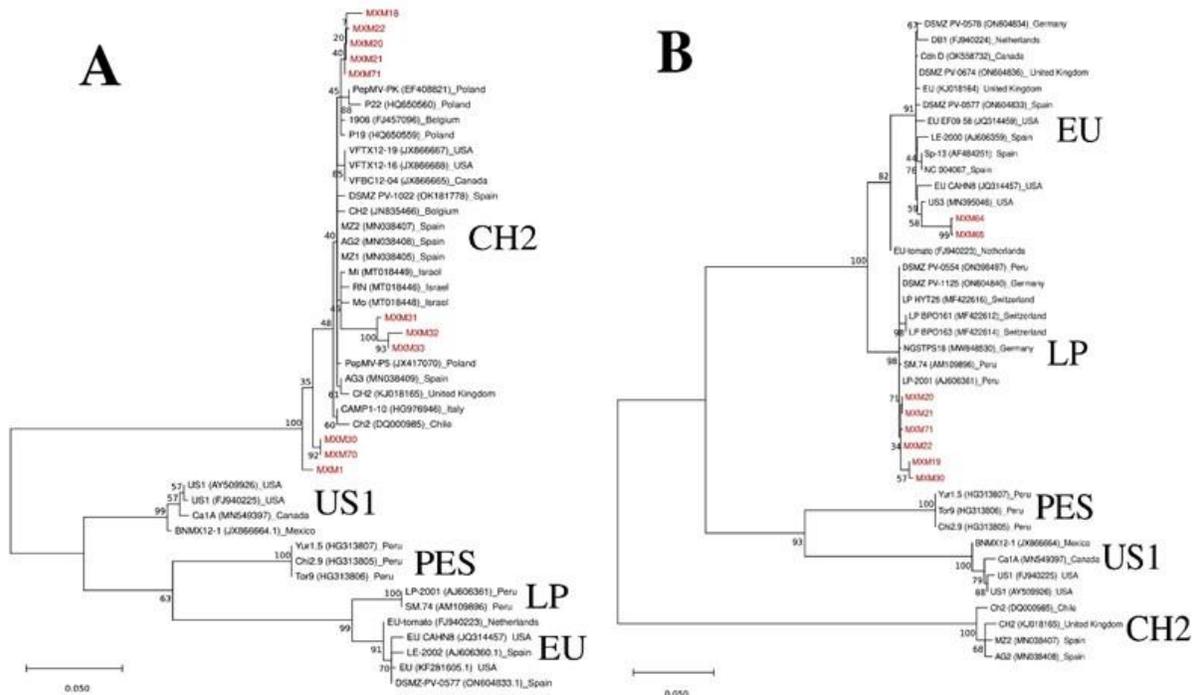
obtenidas en este estudio (Cuadro 3), y a partir de alineamientos múltiples de secuencias parciales del gen RdRp, se generaron los árboles filogenéticos (Figura 6A). Los 11 aislados mexicanos, se agruparon dentro del clado correspondiente al genotipo CH2. Además, se formaron tres subgrupos asociados principalmente a la región geográfica de recolección de la muestra. En el subgrupo 1: aislados MXM18, MXM20, MXM21, MXM22 y MXM71, los cuales compartieron entre ellos una homología de 97.9 a 100%, mientras que con accesiones del GenBank del genotipo CH2, la mayor homología fue de 98.4 a 99.6% con los aislados AG3 (MN0338409), MZ1 (MN038405), AG2 (MN038408), y MZ2 (MN038407) de España, así como con los aislados P19 (HQ650559) de Polonia y CH2 (JN835466) y 1906 (FJ457096) de Bélgica. En el subgrupo 2: los aislados MXM31, MXM32 y MXM33 presentaron entre ellos una homología de 97.6 a 98.3%, y con accesiones del GenBank del genotipo CH2, la mayor homología fue de 96.3 a 97.1 % con los aislados MZ1 (MN038405), AG2 (MN038408), MZ2 (MN038407) de España, así como con los aislados Mi (MT018449) y RN (MT018446) de Israel. En el subgrupo 3: los aislados MXM-30, MXM70 y MXM1 mostraron una homología de 98.4 a 99.6%, y de 97.9 a 98.4 % con los aislados PepMV-P5 (JX417070) y los aislados MZ1 (MN038405) , AG2 (MN038408), MZ2 (MN038407) de España.

#### 6.4. Análisis Filogenéticos de Región Parcial del Gen *RdRp* de Aislados LP y EU

A partir de los productos de 980 pb obtenidos por la RT-PCR, se seleccionaron 32 accesiones reportadas previamente en GenBank para los genotipos LP, EU, US1, CH2 y PES, y se compararon con las nueve secuencias de los aislados LP-EU obtenidas en este estudio (Cuadro 3). El análisis filogenético de la región parcial del gen RdRp permitió distinguir los clados correspondientes al genotipo EU y LP. Dos aislados (MXM64 y MXM65) se agruparon en el clado del genotipo EU (Figura 6B), compartiendo entre ellos una homología a de 99.5%. Mientras que, con accesiones del genotipo EU reportadas en GenBank, la mayor homología fue de 97.6% con los aislados US3 (MN395046) de EUA y DSMZ PV-0674 (ON604836) de Reino Unido, a diferencia con las accesiones del genotipo LP, con las que sólo compartieron del 92.9 a 93.8%.

Por otra parte, los seis aislados (MXM19, MXM20, MXM21, MXM22 , MXM30 y MXM71) correspondieron al clado del genotipo LP (Figura 6B), compartiendo entre ellos una homología de

99.2 a 99.9%, al igual que con los aislados DSM PV-1125 (ON604840), NGSTPS18 (MW848530) de Alemania, LP\_BPO163 (MF422614) , LP HYT25 (MF422616) de Suiza y los aislados LP-2000 (AJ606361), SM.74 (AM109896) y DSMZ PV-0554 (ON398497) de Perú, previamente reportados en GenBank, compartiendo solamente, del 93 al 95% con los genotipos EU.

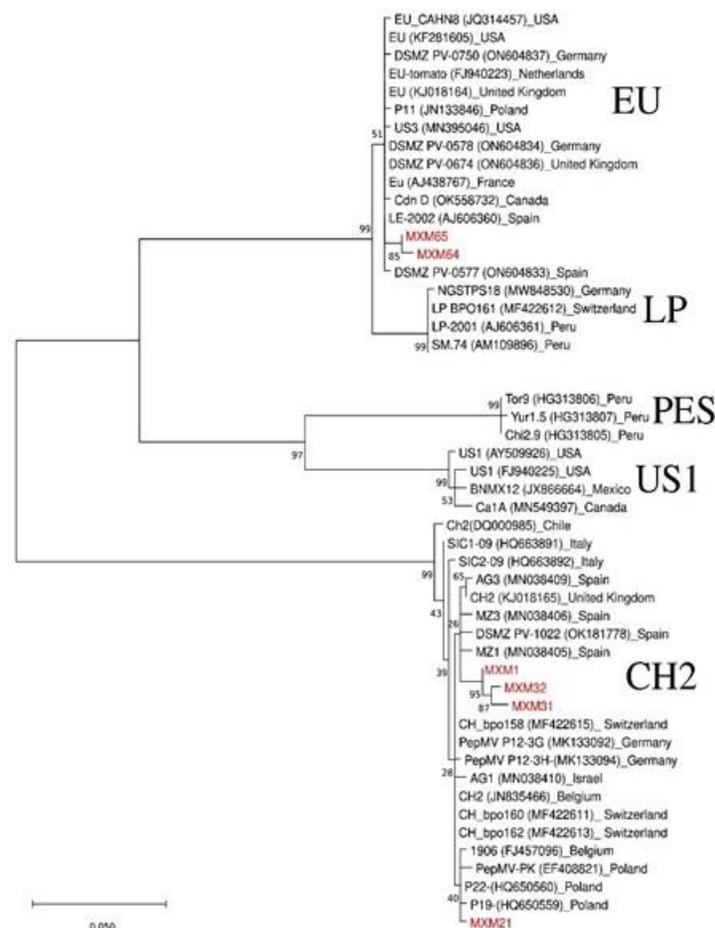


**Figura 6.** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud inferido a partir de secuencias parciales del gen RdRp de aislados mexicanos del PepMV y aislados representativos de cada genotipo, publicadas en GenBank. Las secuencias de los aislados de este estudio se muestran en rojo. Las secuencias del PepMV previamente publicadas en GenBank, se indican con el nombre del aislado, número de accesoión y país de origen. Los valores bootstrap se muestran en las ramas. La barra representa las sustituciones por sitio.

### 6.5. Análisis Filogenéticos de la Región TGB2-3 y PC

Los análisis filogenéticos con las secuencias de la región TGB2-3 y PC de seis aislados con 43 accesiones reportadas previamente en GenBank para los genotipos LP, EU, US1, CH2 y PES, confirmaron la identidad de los aislados MXM1, MXM31 y MXM32 como genotipos CH2 (Figura 7) compartiendo de 97.3 a 99.6% de similitud con accesiones del genotipo CH2. Para esta región

el genoma, el aislado MXM21 nuevamente compartió una alta homología (99.6 %) con el aislado 1906 (FJ457096) de Bélgica. Los dos aislados EU de este estudio (Figura 7), compartieron una similitud de 98.1 a 99.2% con los aislados DSMZ PV-0578 (ON604834) de Alemania, Eu (AJ438767) de Francia, EU (KJ018164) de Reino Unido y EU (KF281605) de EUA. Finalmente, la matriz de distancias entre las 43 secuencias analizadas (datos no mostrados), reveló que los aislados CH2 de este estudio, compartieron solamente similitud de 73.7 a 75.7% con el resto de genotipos, a diferencia de los aislados EU, que compartieron de 93-96% de similitud con el genotipo LP y de 80-82.6% con los genotipos US1 y PES (Hanssen *et al.*, 2010a ; Moreno-Pérez *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud inferido a partir de secuencias parciales de la región TGB2-3 y CP de aislados mexicanos del PepMV y aislados representativos de cada genotipo publicadas en GenBank. Las secuencias de los aislados obtenidos en este estudio se muestran en rojo. Las secuencias del PepMV previamente publicadas en GenBank, se indican con el nombre del aislado, número de acceso y país de origen. Los valores Bootstrap se muestran en las ramas. La barra representa las sustituciones por sitio.

## 6.6. Caracterización Biológica de Aislados Mexicanos del PepMV

Para la caracterización biológica, se seleccionaron cinco aislados del PepMV (MXM1, MXM18, MXM31, MXM64 y MXM71) (Cuadro 3). Previo a la inoculación en las especies de plantas indicadoras, los aislados MXM18 y MXM31, que originalmente provenían de campo en co-infección con el ToBRFV, se purificaron mediante la inoculación en el hospedante *Datura stramonium* (Luria *et al.*, 2017), esto para garantizar que los síntomas correspondieran solamente al PepMV. En total, se inocularon nueve especies de hospedantes, comprendidas principalmente por solanáceas (Cuadro 4).

El 100% de los aislados del PepMV causó infección sistémica en *S. lycopersicum* cv. Rio Grande. El aislado MXM1 (Figura 8B) causó síntomas de mosaicos tenues; mientras que, el aislado MXM71 (Figura 8F) no indujo síntomas. Los aislados MXM18 (Figura 8C) y MXM19 (Figura 8D) provocaron mosaicos, aclaramiento internerval y abolsamientos. Entretanto, los síntomas típicos causados por el PepMV, tal como mosaicos y clorosis severa, se observaron en las plantas inoculadas con el aislado MXM64 (Figura 8E).

En *D. stramonium*, los aislados MXM1 (Figura 8H), MXM31 (Figura 8J), y MXM71 (Figura 8L) indujeron aclaramiento internerval, clorosis y mosaicos. El aislado MXM64 (Figura 8K), causó abolsamientos, mosaicos severos, clorosis y deformación en los folíolos. Contrario a esto, el aislado MXM18 no causó síntomas (Figura 8I).

Particularmente, *N. occidentalis* fue la única especie del género *Nicotiana* que fue hospedante para el 100% de los aislados del PepMV, mostrando síntomas variables, inducidos por cada uno de los aislados. El aislado MXM1 causó síntomas de necrosis (Figura 8N); entretanto, los aislados MXM18 (Figura 8O) y MXM71 (Figura 8R) indujeron típicos mosaicos con ligeros abolsamientos. Por otra parte, los aislados MXM31 (Figura 8P) y MXM64 (Figura 8Q) causaron clorosis y aclaramiento internerval, respectivamente. La especie *S. melongena* cv. Estelal fue hospedante del 100% de los aislados, resaltando que, los aislados MXM18 (Figura 8U) MXM31 (Figura 8V) y MXM71 (Figura 8Y) causaron infección sistémica asintomática. El aislado MXM1 provocó ligeros mosaicos (Figura 8T) y nuevamente los síntomas más severos de mosaicos, abolsamientos, aclaramiento internerval y deformación de la hoja fueron ocasionados por el aislado MXM64 (Figura 8W). Por otra parte, el 100% de los aislados no causó síntomas, ni se detectó la presencia

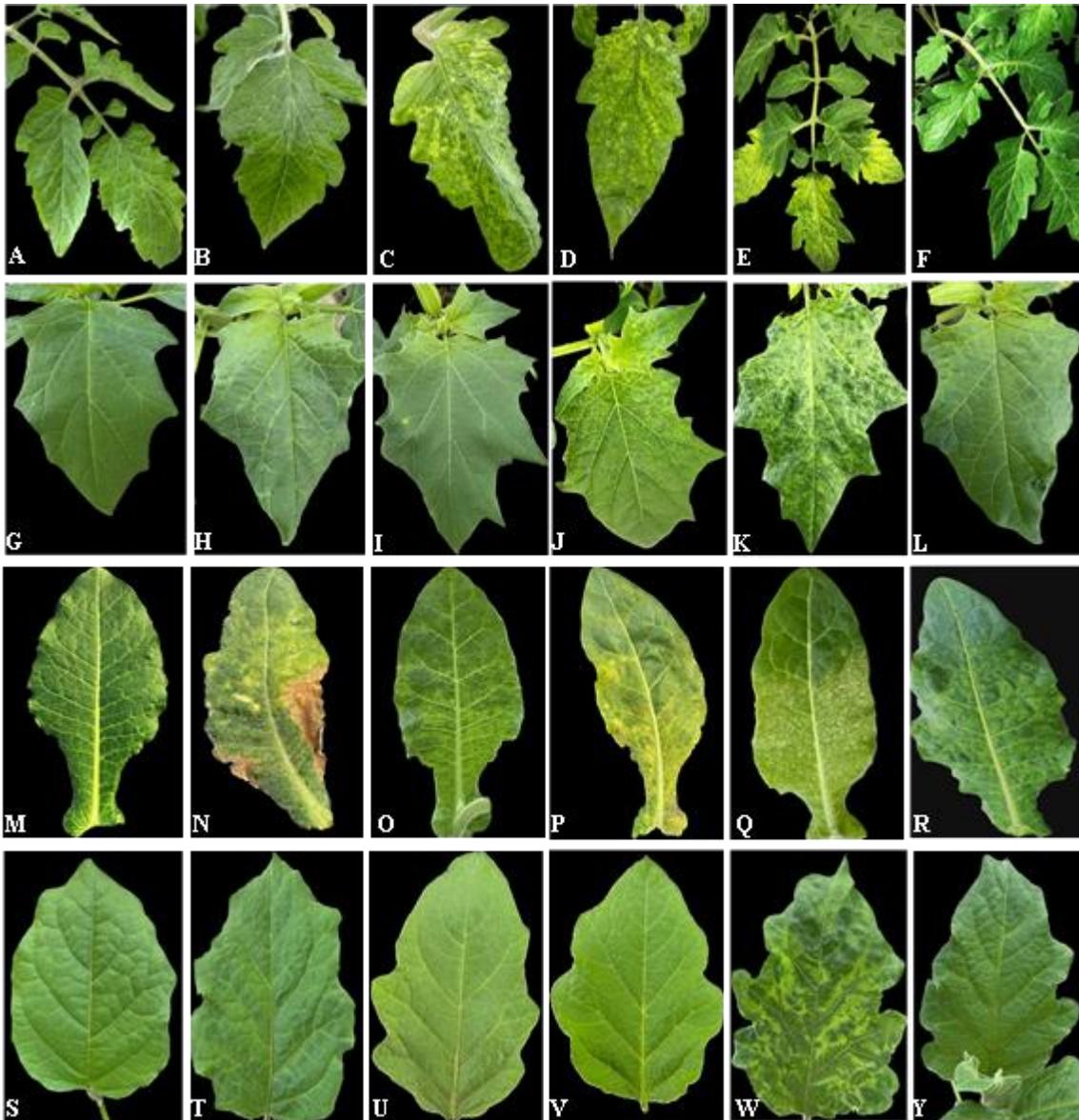
del virus en las especies *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* cv. Vir, *N. tabacum* cv. Xanthi y *Chenopodium ambrosioides* (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Caracterización biológica de aislados del PepMV en especies indicadoras

Especie indicadora	Síntomas causados por aislados del PepMV <sup>a</sup>					PepMV <sup>b</sup>
	MXM1 (CH2)	MXM18 (CH2)	MXM31 (CH2)	MXM64 (EU)	MXM71 (LP+CH2)	
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	(-)
<i>Solanum lycopersicum</i> cv Rio Grande	-/MT	-/MS,AV,AB	-/MS,AV,AB	-/MS,AV,AB,DH	-/-	(+)
<i>Datura stramonium</i>	-/MT,AV	-/-	-/MT,AV	-/MS,AV,AB,DH	-/MT,AV	(+)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	(-)
<i>N. occidentalis</i>	CL/LN,DH	CL/MT,AB	CL/,MT,AV	CL/MT,AV	-/MT,AV	(+)
<i>N. rustica</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	(-)
<i>N. tabacum</i> Xanthi	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	(-)
<i>N. tabacum</i> Vir	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	(-)
<i>Solanum melongena</i> cv Estelal	-/MT,AV	-/-	-/-	-/MS,AV,AB,DH	-/-	(+)

<sup>a</sup>Síntomas observados en hojas inoculadas y no inoculadas se indican a la izquierda y derecha de la barra, respectivamente. - = sin síntomas, MT= mosaico tenue, AV= aclaramiento internerval, CL= clorosis, LN= lesión necrótica, DH= deformación de la hoja, MS= mosaico severo, AB= abolsamiento.

<sup>b</sup> Indica la presencia del virus en la parte superior, hojas no inoculadas. Todas las infecciones sistémicas fueron confirmadas con kit comercial de ImmunoStrips para PepMV. - = resultado negativo; += resultado positivo.



**Figura 8.** Síntomas causados por aislados del PepMV en diferentes especies. *Solanum lycopersicum* cv. Rio Grande (A-F), *Datura stramonium* (G-L), *Nicotiana occidentalis* (M-R), *Solanum melongena* (S-Y). Testigo sin inocular (A,G,M,S). Aislados CH2, MXM1 (B,N,H,T), MXM18 (C,I,O,U) y MXM31 (D,J,P,V), aislado EU MXM64 (E,K,Q,W), LP+CH2 MXM71 (F,L,R,Y). Testigo sin inocular (A,G,M,S).

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio, a partir de los muestreos realizados en 11 de los estados productores de tomate en México, se logró reportar la presencia del PepMV al menos en seis de ellos. Además, se llevó a cabo la inferencia de las relaciones filogenéticas de aislados del PepMV detectados en México analizando secuencias generadas a partir de la amplificación de productos de regiones parciales del genoma del PepMV y se compararon con secuencias de aislados representativos de cada genotipo del PepMV (LP, EU, CH2, US1 y PES) reportados a nivel mundial. Estos análisis, revelaron la presencia en México de los genotipos LP, EU y CH2. Además, el uso de iniciadores específicos y la detección simultánea por RT-PCR múltiple propuesta por Alfaro-Fernández *et al.*, (2009), permitió detectar infecciones mixtas, así como también identificar los genotipos del PepMV; sin embargo, la discriminación entre genotipos LP y EU fue posible únicamente después de la secuenciación de los productos. Otros estudios han reportado pruebas para la detección específica de genotipos, mas no, para la detección simultánea en coinfección (Hanssen *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2008; Hasiów *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2013). Por otra parte, el análisis de las secuencias parciales de la región TGB2-3 y PC (aprox. 500 pb) que resultó de la combinación de los iniciadores KL05-13 (Ling *et al.*, 2008) y el R5 (Hasiów *et al.*, 2008), confirmó la identidad de los genotipos previamente detectados con los iniciadores específicos.

De acuerdo a nuestros datos, en México prevalece el genotipo CH2, lo cual se ha reportado previamente desde 2006 en países de Europa (Hanssen *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2012b; Gómez-Aix *et al.*, 2019), donde epidemiológicamente, se ha concluido que los aislados CH2 tienen un mayor “viral fitness” en comparación de los aislados EU (Alcaide *et al.*, 2020b), y, al parecer con los genotipos US1 y PES, lo cual también podría explicar del porqué no se detectaron en este estudio. Previamente, Ling y Zhang (2011) detectaron el genotipo CH2 del PepMV en el Estado de México (México), durante 2010 y 2011 y dos años después, Ling *et al.*, (2013) indicaron una mayor prevalencia del genotipo US1 en el mismo sitio. Lo anterior, contrasta con lo obtenido en este estudio ya que, aunque se detectó la presencia del genotipo CH2 en el Estado de México, no se detectó la presencia del genotipo US1. En este aspecto, Blystad *et al.*, (2015) mencionaron que el genotipo US1 rara vez se encuentra en tomate, posiblemente, debido a su origen a partir de alguna otra solanácea silvestre diferente al tomate.

Algunos de nuestros aislados del genotipo CH2, compartieron más de 99.1% de identidad con el aislado 1906 (FJ457096) reportado por Hanssen *et al.*, (2009), como un aislado CH2 eficiente para protección cruzada. Por otro lado, Gómez-Aix *et al.*, (2019) indicaron que los cambios a nivel de homología de secuencias entre aislados del mismo genotipo, son evidencia de la micro evolución a lo largo del tiempo, lo cual podría explicar que algunos de nuestros aislados CH2 solamente compartieron una homología de 97.4 al 98.6% con el aislado original CH2 (DQ000985) (Ling 2007) y más de 99.6% con otros reportados recientemente (Alcaide *et al.*, 2020a).

En relación al genotipo EU, se detectó en el estado de Sonora en plantas de tomate exhibiendo síntomas de mosaico y clorosis severa. Los análisis de las regiones parciales del gen RdRp y la región TGB2-3 y PC confirmaron la identificación de infecciones únicas del genotipo EU, coincidiendo con lo reportado durante las primeras epidemias con el PepMV en las zonas productoras de tomate en Europa (van der Vlugt *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2002; Cotillón *et al.*, 2002; Pagán *et al.*, 2006) y Norteamérica (Ling *et al.*, 2013); aunque tiempo después, se encontró solamente en infecciones mixtas con el genotipo CH2 (Gómez *et al.*, 2009; Gómez- Aix *et al.*, 2019). Es importante indicar que, con el análisis de la región TGB2-3 y PC de nuestro estudio, la homología fue hasta del 99.2% con los primeros genotipos EU, los cuales provocaron epidemias con síntomas severos en los cultivos de tomate en Francia (Cotillón *et al.*, 2002).

La identificación del genotipo EU variante “agresiva” en México, podría estar estrechamente relacionada con los fenómenos de adaptación del virus y a la aparición de cuasi especies a lo largo del tiempo (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010b; Turco *et al.*, 2018; Alcaide *et al.*, 2020b) así como también de la expresión de síntomas por parte del hospedante en respuesta del ambiente (Blystad *et al.*, 2015 ; Sempere *et al.*, 2015). En este sentido, Hasiów-Jaroszewska *et al.*, (2013), encontraron que variaciones de un solo nucleótido se asociaron de manera directa a la virulencia y agresividad de un aislado del genotipo CH2. Sin embargo, la confirmación de los factores que causan este fenotipo, podría elucidarse posterior a la identificación de fenómenos como recombinación (Pagán *et al.*, 2006) o mutaciones (Alcaide *et al.*, 2020b) en el genoma completo de estos aislados, caracterizados por causar síntomas severos en tomate y otros hospedantes.

Respecto al genotipo LP, en esta investigación se detectó por primera vez su presencia en al menos tres estados con producción de tomate en México (Cuadro 3) y cabe resaltar que particularmente para este genotipo, las muestras recolectadas de hojas de tomate mostraban síntomas casi imperceptibles (Fig. 4F). Desde su primera aparición en tomate, el genotipo LP se ha caracterizado

por no causar síntomas (Jones *et al.*, 1980; López *et al.*, 2005), a diferencia de los genotipos EU, CH2 y US1 (Blystad *et al.*, 2015; Gómez-Aix *et al.*, 2019).

Recientemente, a través del uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, se han publicado los genomas virales completos procedentes de muestras de tomate infectadas con PepMV (Turco *et al.*, 2018; Gaafar *et al.*, 2021), compartiendo, al igual que en nuestro estudio, una homología a nivel de secuencia nucleotídica arriba de 99.7 % con los aislados LP obtenidos de plantas asintomáticas de *Solanum peruvianum* (López *et al.*, 2005) y de pepino dulce *S. muricatum* (Pagán *et al.*, 2006) en Perú. De acuerdo a nuestros resultados, hipotetizamos que la presencia del genotipo LP en México, al igual que el genotipo CH2, pudo ser resultado de un efecto antropocéntrico a través de la llegada de diversas fuentes de inóculo, y no necesariamente de su centro de origen, si no de otros países de Europa, donde se han usado estos aislados LP tenues para protección cruzada (Hanssen *et al.*, 2010; Schenk *et al.*, 2010) y donde, recientemente, se han detectado mutaciones en los genomas de genotipos LP procedentes de infecciones mixtas, lo cual les han permitido establecerse de manera exitosa en los cultivos de tomate en Suiza y Alemania (Turco *et al.*, 2018; Gafar *et al.*, 2021).

El hecho de que únicamente se detectó la presencia de infecciones mixtas entre los genotipos LP y CH2, y casualmente, la mayoría de ellas causaron síntomas tenues puede estar relacionado a que, en algunos casos en infecciones mixtas, el “viral fitness” de los aislados, se ve modificado, afectando la tasa de transmisión viral, virulencia, rango de hospedantes e inclusive la sintomatología (Alcaide *et al.*, 2020b; Moreno y López-Moya 2020).

Nuestros datos, además revelaron que, en casi el 50% de las muestras analizadas, se detectó al virus ToBRFV, ya sea en infecciones simples o mixtas, a pesar de que el objetivo de esta investigación se centra en el PepMV, la información generada relacionada con la alta incidencia y presión del ToBRFV debe ser considerada en futuras investigaciones, así como también, la hipótesis generada en este estudio de un posible desplazamiento del PepMV por el ToBRFV en algunas zonas productoras de tomate en México. La alta incidencia del ToBRFV y las infecciones mixtas con el PepMV, han sido previamente reportadas, en países como México (Ling *et al.*, 2019), Alemania (Menzel *et al.*, 2019), Reino Unido (Skelton *et al.*, 2019) e Israel (Klap *et al.*, 2020). Recientemente, en Israel, Klap *et al.*, 2020 reportaron que las infecciones mixtas de estos dos virus en plantas de tomate provocan síntomas más severos, posiblemente debido a efectos de sinergismo. Naturalmente, las plantas presentan infecciones virales mixtas, estas co-infecciones pueden

conducir a diferentes interacciones virales, las cuales producen cambios en la adaptabilidad y diversidad genética del o los virus involucrados (Syller 2012; Alcaide *et al.*, 2020b). Ampliar nuestra comprensión de este fenómeno es muy importante, ya que el mantenimiento de infecciones mixtas puede tener consecuencias críticas en el resultado evolutivo del PepMV (Alcaide y Aranda 2021).

En relación a la caracterización biológica, todos los aislados causaron infecciones sistémicas en tomate y se observaron diferentes síntomas en al menos cuatro de las nueve especies vegetales inoculadas con los cinco aislados del PepMV procedentes de este estudio. En la mayoría de los aislados, los síntomas observados en campo fueron replicados en las plantas de tomate inoculadas artificialmente. Particularmente, el aislado MXM71 resultado de una infección mixta LP+CH2, se caracterizó por no mostrar síntomas en tomate y berenjena, lo cual podría estar siendo un efecto propio de la infección de ambos genotipos, resultando en reacciones de antagonismo y disminuyendo en algunos casos, la expresión de síntomas (Syller y Grupa 2016).

Previamente, se ha reportado el uso de especies de plantas indicadoras en la caracterización de diferentes aislados del PepMV (Gómez *et al.*, 2009; Hanssen *et al.*, 2009; Blystad *et al.*, 2015; Vabishchevich *et al.*, 2020). Asimismo, aunque algunos estudios han señalado a *N. rustica* (van der Vlugt *et al.*, 2002; Fakhro *et al.*, 2011; Blystad *et al.*, 2015) y *N. tabacum* cv. Xanthi (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010a; Blystad *et al.*, 2015) como especies indicadoras, ninguno de los aislados del PepMV inoculados en nuestro estudio indujo síntomas ni se detectó infección sistémica en estos hospedantes, confirmando lo descrito en otros estudios similares (Martin y Mousserion 2002; Verhoeven *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2009). Por el contrario, los resultados de nuestro estudio confirmaron que *N. occidentalis* es una especie indicadora capaz de diferenciar entre aislados del PepMV (Verhoeven *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2009), ya que los síntomas fueron variados, particularmente, con el aislado MXM1 del genotipo CH2 que indujo lesiones necróticas, similar a los resultados obtenidos por Blystad *et al.*, 2015.

Como se mencionó anteriormente, uno de los hallazgos más interesantes en este estudio, fue la identificación del aislado MXM64 (genotipo EU) como variante agresiva, ya que se caracterizó por inducir síntomas de mosaico y clorosis severa (Cotillón *et al.*, 2002) en campo y posteriormente en las inoculaciones artificiales en tomate, *D. stramonium*, berenjena y tabaco. Particularmente en berenjena, bajo inoculaciones artificiales con aislados del genotipo EU (van der Vlugt *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2009; Blystad *et al.*, 2015), se han inducido síntomas de mosaicos, clorosis y

distorsión, pero hasta la fecha, no existen reportes de infecciones naturales en este hospedante. No obstante, está claro que es un hospedante alterno potencial y dada la amplia dispersión del PepMV a nivel mundial, su establecimiento en cultivos de solanáceas de importancia para la agricultura podría representar un alto riesgo (Blystad *et al.*, 2015).

Con respecto a la introducción de los diferentes genotipos del PepMV a México, hay información que indica que la transmisión del PepMV a través de la semilla y la comercialización de frutos infectados, juega un papel importante en su diseminación a larga distancia (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010a; Gómez *et al.*, 2012b; Ling *et al.*, 2013; Gómez-Aix *et al.*, 2019). Aunque el uso de semilla libre del PepMV, es requisito obligatorio en diferentes países, principalmente de Europa (European and Mediterranean Plant Protection Organization 2023), actualmente en México no existen requerimientos que regulen la entrada de semilla libre de este virus al país, incrementando el riesgo de diseminación y el establecimiento de nuevos aislados que representan un riesgo importante en la producción de tomate. En esa misma línea, el uso de aislados atenuados comerciales como alternativas para el control del PepMV en algunas zonas productoras de tomate en México, puede estar influyendo en la dispersión de aislados que podrían convertirse en importantes epidemias si no son manejadas de manera adecuada. Además, dicho desplazamiento de genotipos también podría verse favorecido por diferentes factores ambientales y ecológicos asociados con las actividades o prácticas de manejo en los invernaderos donde se produce tomate, atribuyendo de manera importante en la transmisión del PepMV una vez introducido a los invernaderos (Ling *et al.*, 2013).

## 8. CONCLUSIONES

Nuestro estudio reveló la presencia del PepMV en invernaderos de alta y mediana tecnología distribuidos en seis estados con producción de tomate en México (Estado de México, Baja California, Sonora, Guanajuato, Querétaro y Puebla), siendo los primeros reportes para los estados de Sonora, Guanajuato, Querétaro y Puebla. En total, se detectaron seis muestras con infecciones con el genotipo CH2, dos con el genotipo LP, dos con el genotipo EU y cinco coinfecciones de los genotipos LP+CH2. Además, se caracterizó un aislado del genotipo EU como variante agresiva.

## 9. REFERENCIAS

- Abrahamian, P., Hammond, J., and Hammond, R. W. (2020). Complete genome sequence of an American isolate of *Pepino mosaic virus*. *Microbiology Resource Announcements*, 9(2), e01124-19.
- Agirrezabala, X., Méndez-López, E., Lasso, G., Sánchez-Pina, M. A., Aranda, M., and Valle, M. (2015). The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *Elife*, 4, e11795.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology 5th edition: Elsevier academic press*. Burlington, Ma. USA, 79-103.
- Agüero, J., Gómez-Aix, C., Sempere, R. N., García-Villalba, J., García-Núñez, J., Hernando, Y., and Aranda, M. A. (2018). Stable and broad spectrum cross-protection against *Pepino mosaic virus* attained by mixed infection. *Frontiers in plant science*, 1810.
- Aguilar, J. M., Hernandez-Gallardo, M. D., Cenis, J. L., Lacasa, A., and Aranda, M. A. (2002). Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Archives of virology*, 147(10), 2009-2015.
- Alcaide, C., and Aranda, M. A. (2021). Determinants of persistent patterns of *Pepino mosaic virus* mixed infections. *Front. Microbiol.*12: 694492.
- Alcaide, C., Rabadán, M. P., Juárez, M., and Gómez, P. (2020a). Long-term cocirculation of two strains of *Pepino mosaic virus* in tomato crops and its effect on population genetic variability. *Phytopathology*, 110(1), 49-57.
- Alcaide, C., Rabadán, M. P., Moreno-Pérez, M. G., and Gómez, P. (2020b). Implications of mixed viral infections on plant disease ecology and evolution. *Adv. Virus Res.* 106:145-169.
- Alfaro-Fernández, A., Cebrián, M. C., Córdoba-Sellés, C., Herrera-Vásquez, J. A., and Jordá, C. (2008). First report of the US1 strain of *Pepino mosaic virus* in tomato in the Canary Islands, Spain. *Plant Disease*, 92(11), 1590-1590.
- Alfaro-Fernández, A., Del Carmen Córdoba-Sellés, M., Herrera-Vásquez, J. Á., Cebrián, M. D. C., and Jordá, C. (2010). Transmission of *Pepino mosaic virus* by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of phytopathology*, 158(4), 217-226.
- Alfaro-Fernández, A., Sánchez-Navarro, J. Á., Cebrián, M. D. C., Córdoba-Sellés, M. D. C., Pallás, V., and Jordá, C. (2009). Simultaneous detection and identification of *Pepino mosaic virus* (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *European journal of plant pathology*, 125, 143-158.
- Aranda, M. A., and Freitas-Astúa, J. (2017). Ecology and diversity of plant viruses, and epidemiology of plant virus-induced diseases. *Annals of Applied Biology*, 171(1), 1-4.
- Azcón-Bieto, J., and Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal* (No. 581.1). McGraw-Hill Interamericana.
- Bandte, M., Rodriguez, M. H., Schuch, I., Schmidt, U., and Buettner, C. (2016). *Plant viruses in*

irrigation water: reduced dispersal of viruses using sensor-based disinfection. *Irrigation Science*, 34, 221-229.

- Bibi, I., Djelouah, K., Remah, A., and Afechtal, M. (2017). *Pepino mosaic virus*: a serious threat to tomato crops worldwide. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét*, 5, 231-237.
- Blystad, D. R., van der Vlugt, R., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba, M., Bese, G., Hristova, D., Pospieszny, H., Mehle, N., Ravnikar, M., Tommassoli, L., Varveri, C., and Nielsen, S. L. (2015). Host range and symptomatology of *Pepino mosaic virus* strains occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 143, 43-56.
- Bos, L. (1982). Crop losses caused by viruses. *Crop Protection*, 1(3), 263-282.
- Cotillón, A. C., Girard, M., and Ducouret, S. (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archives of virology*, 147(11), 2231-2238.
- Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159-216.
- Escobar, H. (2010). Manual de producción de tomate bajo invernadero. Editorial Tadeo Lozano.
- Fakhro, A., von Bargen, S., Bandte, M., Büttner, C., Franken, P., and Schwarz, D. (2011). Susceptibility of different plant species and tomato cultivars to two isolates of *Pepino mosaic virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 129:579-590.
- Firdous, N., Khan, M. R., Butt, M. S., and Shahid, M. (2020). Application of aloe vera gel based edible coating to maintain postharvest quality of tomatoes. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(1).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAOSFAT). (2020). Recuperado de : <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- French, C. J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, M., Johnson, R. C., Masters, C., Godkin, S., and Mumford, R. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease*, 85(10), 1121-1121.
- French, C. J., Dubeau, C., Bunckle, A., Ferguson, G., Haesevoets, R., Bouthillier, M., and Bernardy, M. G. (2008). Overview of *Pepino mosaic virus* research. In *CANADIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY-REVUE* Vol. 30, No. 2, pp. 373-374.
- Gaafar, Y. Z., Westenberg, M., Botermans, M., László, K., De Jonghe, K., Foucart, Y., ... and Ziebell, H. (2021). Interlaboratory comparison study on ribodepleted total RNA high-throughput sequencing for plant virus diagnostics and bioinformatic competence. *Pathogens*, 10(9), 1174.
- García-Estrada, R. S., Diaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H., and Tovar-Pedraza, J. M. (2022). Viruses of economic impact on tomato crops in Mexico: From diagnosis to management—A review. *Viruses*, 14(6), 1251.
- Gómez, P., Sempere, R. N., Aranda, M. A., and Elena, S. F. (2012b). Phylodynamics of *Pepino mosaic virus* in Spain. *European journal of plant pathology*, 134, 445-449.
- Gómez, P., Sempere, R. N., Elena, S. F., and Aranda, M. A. (2009). Mixed infections of *Pepino mosaic virus* strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *Journal of*

Virology, 83(23), 12378-12387.

- Gómez, P., Sempere, R., and Aranda, M. A. (2012a). *Pepino mosaic virus* and *Tomato torrado virus*: Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean basin. In *Advances in virus research* (Vol. 84, pp. 505-532). Academic Press.
- Gómez-Aix, C., Alcaide, C., Agüero, J., Faize, M., Juárez, M., Díaz-Marrero, C. J., and Gómez, P. (2019). Genetic diversity and population structure of *Pepino mosaic virus* in tomato crops of Spain and Morocco. *Annals of Applied Biology*, 174(3), 284-292.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delić, D., Gruden, K., Mumford, R., and Ravnikar, M. (2009). Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of *Pepino mosaic virus*. *Journal of virological methods*, 162(1-2), 46-55.
- Hanssen, I. M., and Thomma, B. P. (2010). *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular plant pathology*, 11(2), 179-189.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., and Thomma, B. P. (2010a). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(5), 539-548.
- Hanssen, I. M., Mumford, R., Blystad, D. R., Cortez, I., Hasiów-Jaroszewska, B., Hristova, D., Pagán, I., Pereira, A.M., Peters, J., Pospieszny, H., Ravnikar, M., Stijger, I., Tomassoli, L., Varveri, C., van der Vlugt, R., and Nielsen, S. L. (2010b). Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 145-152.
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., Vanachter, A.C.R.C., and Thomma, B. P. H. J. (2009). *Pepino mosaic virus* isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology*, 58(3), 450-460
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., and Vanachter A.C.R.C., and Thomma, B. P. H. J. (2008). Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology*, 121(2), 131-146
- Hasiów, B., Borodynko, N., and Pospieszny, H. (2008). Development of a real time RT-PCR assay for detecting genetically different *Pepino mosaic virus* isolates. *Journal of Plant Protection Research*, 50:470–476
- Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Jackowiak, P., Figlerowicz, M., and Pospieszny, H. (2010a). *Pepino mosaic virus* – a pathogen of tomato crops in Poland: biology, evolution and diagnostics. *Journal of Plant Protection Res.* 50:470–476
- Hasiów-Jaroszewska, B., Jackowiak, P., Borodynko, N., Figlerowicz, M., and Pospieszny, H. (2010b). Quasispecies nature of *Pepino mosaic virus* and its evolutionary dynamics. *Virus Genes* 41: 260-267.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Paeleman, A., Ortega-Parra, N., Borodynko, N., Minicka, J., Czerwoniec, A., Thoma, B., and Hanssen, I. M. (2013). Ratio of mutated versus wild-type coat protein sequences in *Pepino mosaic virus* determines the nature and severity of yellowing symptoms on tomato plants. *Molecular plant pathology*, 14(9), 923-933.
- Hull, R. (2014). *Plant Virology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press. California, USA. 1104 p
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2020). Recuperado de

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>

- Jones, R. A., and Barbetti, M. J. (2012). Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *Plant Sciences Reviews*, 22, 1-31.
- Jones, R. A., and Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual review of virology*, 6, 387-409.
- Jones, R. C., KOENIG, R., and Lesemann, D. E. (1980). *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94(1), 61-68.
- Jordá, C., Pérez, A. L., Martínez-Culebras, P., Abad, P., Lacasa, A., and Guerrero, M. M. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease*, 85(12), 1292-1292.
- Kamer, G., and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic acids research*, 12(18), 7269-7282.
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Bakelman, E., Belausov, E., Laskar, O., Lachman, O., Gal-On, A., and Dombrovsky, A. (2020). The potential risk of plant-virus disease initiation by infected tomatoes. *Plants*, 9(5), 623.
- Lacasa, A., Guerrero, M. M., Hita, I., Martínéz, M. A., Jordá, C., Bielza, P., Contreras, A., and Cano, A. (2003). Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en cultivos de tomate. *Bol. Sanid. Veg., Plagas*, 29, 393-402.
- Ling, K. S. (2007). Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus genes*, 34, 1-8.
- Ling, K. S. (2010). Effectiveness of chemo-and thermo-therapeutic treatments on *Pepino mosaic virus* in tomato seed. *Plant disease*, 94(3), 325-328.
- Ling, K. S., and Zhang, W. (2011). First report of *Pepino mosaic virus* infecting tomato in Mexico. *Plant Disease*, 95(8), 1035-1035.
- Ling, K. S., Li, R., and Bledsoe, M. (2013). *Pepino mosaic virus* genotype shift in North America and development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid genotype identification. *Virology Journal*, 10(1), 1-13.
- Ling, K. S., Tian, T., Gurung, S., Salati, R., and Gilliard, A. (2019). First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease*, 103(6), 1439.
- Ling, K. S., Wintermantel, W. M., and Bledsoe, M. (2008). Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Disease*, 92(12), 1683-1688.
- Loebenstein, G. (2009). Plant virus diseases: economic aspects. En Brian W. J. y Marc H.V.V.R (Eds.) *Encyclopedia of Virology* (pp. 197-201). (3<sup>a</sup> ed). Academic Press.
- López, C., Soler, S., and Nuez, F. (2005). Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Arch. Virol.* 150: 619-627.
- López, M. L. M. (2016). Manual técnico del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*). San José, Costa Rica: INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología)

Agropecuaria). Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>

- 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., and Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring *Tm-2<sup>2</sup>* resistance genes. *PloS One* 12: e0170429.
- Maroon-Lango, C. J., Guaragna, M. A., Jordan, R. L., Hammond, J., Bandla, M., and Marquardt, S. K. (2005). Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of virology*, 150(6), 1187-1201.
- Martin, J., and Mousserion, C. (2002). Potato varieties which are sensitive to the tomato strain of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Phytoma. La Défense des Végétaux* (France).
- Mehle, N., Gregur, L., Bogožalec Košir, A., and Dobnik, D. (2020). One-step reverse-transcription digital PCR for reliable quantification of different *Pepino mosaic virus* genotypes. *Plants*, 9(3), 326.
- Menzel, W., Knierim, D., Winter, S., Hamacher, J., and Heupel, M. (2019). First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in Germany. *New Dis. Rep.*, 39(1), 2044-0588.
- Moreno, A. B., and López-Moya, J. J. 2020. When viruses play team sports: Mixed infections in plants. *Phytopathology*. 110: 29-48.
- Moreno-Pérez, M. G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., and García-Arenal, F. (2014). Ecological and genetic determinants of *Pepino mosaic virus* emergence. *Journal of virology*, 88(6), 3359-3368.
- Mumford, R. A., and Metcalfe, E. J. (2001). The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of virology*, 146(12), 2455-2460.
- Naidu, R. A., and Hughes, J. D. A. (2003). Methods for the detection of plant virus diseases. In *Plant Virology in Sub-Saharan Africa: Proceedings of a Conference Organized by IITA: 4-8 June 2001*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria (p. 233). IITA
- Noël, P., Hance, T., and Bragard, C. (2014). Transmission of the *Pepino mosaic virus* by whitefly. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 23-27.
- Otunaiya, A. O., and Shittu, A. M. (2014). Complete household demand system of vegetables in Ogun State, Nigeria. *Agricultural Economics*, 60(11), 509-516.
- Pagán, I., del Carmen Córdoba-Sellés, M., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C., and García-Arenal, F. (2006). Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, 96(3), 274-279.
- Park, M. R., Jeong, R. D., and Kim, K. H. (2014). Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. *Frontiers in plant science*, 5, 60.
- Rodríguez-Mendoza, J., De Jesús García-Ávila, C., López-Buenfil, J. A., Araujo-Ruiz, K., Quezada-Salinas, A., Cambrón-Crisantos, J. M., and Ochoa-Martínez, D. L. (2019). Identificación de *Tomato brown rugose fruit virus* por RT-PCR de una región codificante de la replicasa (RdRP) *Rev. Mex. Fitopatol.* 2019; 37: 345–356.

- Rodríguez-Sánchez, I. P., and Barrera-Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).
- Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, F., Ena, S., and Winter, S. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology*, 50(6).
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V., and Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73(8), 2129-2134.
- Salomone, A., and Roggero, P. (2002). Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology*, 65-68.
- Sastry, K. S., and Zitter, T. A. (2014). Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. In *Plant virus and viroid diseases in the tropics* (pp. 149-480). Springer, Dordrecht.
- Schenk, M. F., Hamelink, R., van der Vlugt, R. A., Vermunt, A. M., Kaarsenmaker, R. C., and Stijger, I. C. (2010). The use of attenuated isolates of *Pepino mosaic virus* for cross-protection. *Eur. J. Plant Pathol.* 127: 249-261.
- Selçuk, Z., Salman, M., and Muruz, H. (2019). Determination of in vitro digestion values of alfalfa hay, dried tomato pomace and their combinations. *Van Veterinary Journal*, 30(1), 63-66.
- Sempere, R. N., Gómez-Aix, C., Ruíz-Ramón, F., Gómez, P., Hasiów-Jaroszewska, B., Sánchez-Pina, M. A., and Aranda, M. A. (2016). *Pepino mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase pol domain is a hypersensitive response-like elicitor shared by necrotic and mild isolates. *Phytopathology*, 106(4), 395-406.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (SIAP).2022.Panorama Agroalimentario 2022. México. Recuperado de: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021)
- Shipp, J. L., Buitenhuis, R., Stobbs, L., Wang, K., Kim, W. S., and Ferguson, G. (2008). Vectoring of *Pepino mosaic virus* by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology*, 153(2), 149-155.
- Skelton, A., Buxton-Kirk, A., Ward, R., Harju, V., Frew, L., Fowkes, A., Lonf, M., Negus, A., Forde, S., Adams, I. P., Pufal, H., McGreig, S., Weekes, R., and Fox, A. (2019). First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in the United Kingdom. *New Dis. Rep.*, 40(12), 2044-0588.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol.* 13:204-216.
- Syller, J., and Grupa, A. (2016). Antagonistic within-host interactions between plant viruses: Molecular basis and impact on viral and host fitness. *Mol. Plant Pathol.* 17: 769-782.
- Soler, S., Prohens, J., Diez, M. J., and Nuez, F. (2002). Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of phytopathology*, 150(2), 49-53.
- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R., and Jones, D. R. (2006). Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55(5), 595-606.

- Torres, P. A. (Ed.). (2017). Manual del cultivo de tomate al aire libre. Boletín No. 11. Santiago, Chile: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). Recuperado de <https://www.inia.cl/wpcontent/uploads/ManualesdeProduccion/11%20Manual%20Tomate%20Aire%20Libre.pdf>
- Turco, S., Golyaev, V., Seguin, J., Gilli, C., Farinelli, L., Boller, T., ... and Pooggin, M. M. (2018). Small RNA-omics for virome reconstruction and antiviral defense characterization in mixed infections of cultivated *Solanum* plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(7), 707-723.
- U.S. Department of Agriculture. (USDA).(2021).Mexico : Tomato Annual. Recuperado de : <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-tomato-annual-4>
- Vabishchevich, V. V., Vauchkevich, I. G., and Kanapatskaya, M. V. (2020). Identification and assessment of vector transmission of the *Pepino mosaic virus* in the culture of tomato protected ground. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*. 65:432-440.
- van der Vlugt, R. A. A., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I. C. M. M., Lesemann, D. E., Verhoeven, J. T. J., and Roenhorst, J. W. (2002). Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *EPPO Bulletin*, 32(3), 503-508.
- van der Vlugt, R., Stijger, C. C. M. M., Verhoeven, J. T. J., and Lesemann, D. E. (2011). First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Archives of Virology*.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M., and Rozanov Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88(6), 1643-1655.
- Verhoeven, J. T. J., van der Vlugt, R. A. A., and Roenhorst, J. W. (2003). High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 419-425.
- Vurro, M., Bonciani, B., and Vannacci, G. (2010). Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food security*, 2, 113-132.
- Wright, D., and Mumford, R. (1999). *Pepino mosaic Potexvirus* (PepMV): first records in tomato in the United Kingdom. *Plant disease notice*, 89, 400.
- Xu, C., Sun, X., Taylor, A., Jiao, C., Xu, Y., Cai, X., ... and Wang, Q. (2017). Diversity, distribution, and evolution of tomato viruses in China uncovered by small RNA sequencing. *Journal of virology*, 91(11), e00173-17.
- Yantén-Carreno, Y., and Sandoval-Briones, C. (2005). Determinación de la presencia de *pepino mosaic potexvirus*-PepMV en tomate en la zona Central de Chile. (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía).
- Ziebell, H., and Carr, J. P. (2010). Cross-protection: a century of mystery. In *Advances in virus research* (Vol. 76, pp. 211-264). Academic Press.