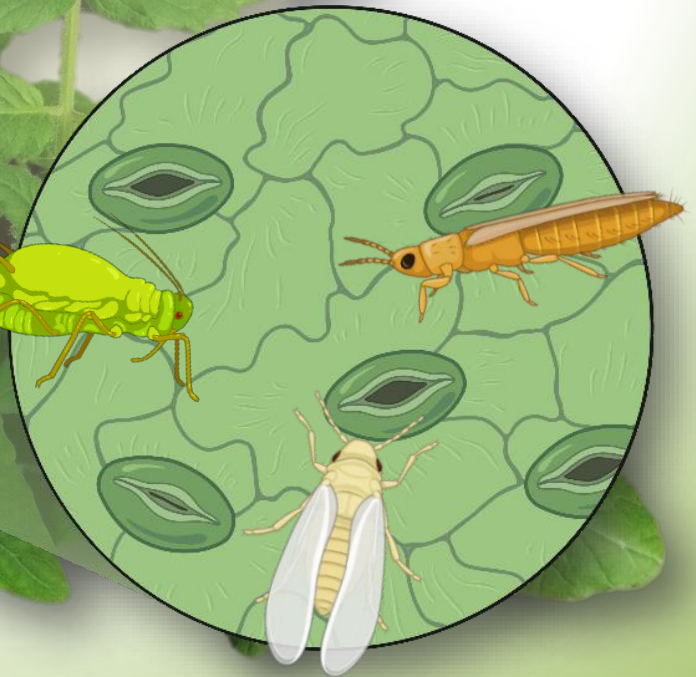


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY
Fully Bilingual

**Virus: Viroides, Diagnóstico,
Epidemiología y Aplicaciones
Ómicas**

Número Especial
Volumen 41 (4) 2023



Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

Composición Web y RMFito * Web and RMFito Composition

M.C. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

Editoras Adjuntas * Senior Editors

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Vicente Febres, UF, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA

Diseño portada: Planta de jitomate interaccionando con insectos vectores de diferentes géneros de virus: Fruto de jitomate con síntomas de anillos concéntricos asociados a *Impatiens necrotic spot virus* (Izquierda), síntomas de necrosis en fruto asociado a *Tomato apex necrosis virus* (Central), hoja de jitomate con mosaico y deformación severa asociado a *Tomato brown rugose fruit virus*.

Créditos de diseño: Ávila-Alistac N, Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G y Gonzalez Cruces A.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Genus *Orthotospovirus* in Costa Rica: a Central American case. 1
Montero-Astúa M, Dejuk-Protti N, Bermúdez-Gómez D, Vásquez Céspedes E, Sandoval-Carvajal I, Garita-Salazar L, Albertazzi F, Adkins S and Moreira-Carmona L.

Viroma del nopal verdura en la zona centro de México. 24
Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI, Nava-Díaz C y Valverde RA.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN * REVIEW ARTICLES

Arvenses y ruderales como potenciales fuentes de inóculo de enfermedades en hortalizas en el norte de Sinaloa. 49
Félix-Gastélum R, Herrera- Rodríguez G, Leyva-Madrigal KY y Mora-Romero GA.

Virus y viroides en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su manejo con PGPR. 66
Zamora-Macorra EJ, Ávila-Alistac N, Lagunes-Fortiz E y de los Santos-Villalobos S.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Fitopatología y comportamientos culturales: posible introducción reciente de la cepa de chaya del *Cassava common mosaic virus* en Costa Rica. 84
Montero-Astúa M, Sandoval-Carvajal I, Moreira L, Villalobos-Muller W, Garita L and Carvajal-Rojas.

Comparison of molecular protocols to detect *Tomato brown rugose fruit virus* in solanaceae hosts. 95
Zamora-Macorra EJ, Aviña-Padilla K, Rosemarie HW and Ochoa-Martínez DL.

Uso de microorganismos endófitos para el manejo del *Tomato brown rugose fruit virus* en cultivo de jitamate (*Solanum lycopersicum*). 109
Ramos-Villanueva CD, Carrillo-Benitez G, Zamora-Macorra EJ, Santiago-Elena E, Ramírez-Alarcón S, Jimenez-Vidals J y Ávila López R.



Genus *Orthospovirus* in Costa Rica: a Central American case

Mauricio Montero-Astúa*, **Natasha Dejuk-Protti**, **David Bermúdez-Gómez**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR), 11501-2060 San José, Costa Rica; Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica (UCR), 11501-2060 San José, Costa Rica; **Elena Vásquez Céspedes**, **Izayana Sandoval-Carvajal**, **Laura Garita-Salazar**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR); **Federico Albertazzi**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica (UCR); **Scott Adkins**, USDA-ARS, Fort Pierce, FL 34945, US; **Lisela Moreira-Carmona**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR), y Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica (UCR).

*Corresponding author: mauricio.monteroastua@ucr.ac.cr

***Corresponding Author:**

Mauricio Montero-Astúa
mauricio.monteroastua@ucr.
ac.cr

Section:
Special Number

Received:
23 August, 2023
Accepted:
24 November, 2023
Published:
30 November, 2023

Citation:
Montero-Astúa M, Dejuk-Protti N, Bermúdez-Gómez D, Vásquez Céspedes E, Sandoval-Carvajal I, Garita-Salazar L, Albertazzi F, Adkins S and Moreira-Carmona L. 2023. Genus *Orthospovirus* in Costa Rica: a Central American case. Mexican Journal of Phytopathology 41(4): 1-23. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-6>

Abstract. The genus *Orthospovirus* comprises economically important and emerging plant viruses infecting diverse crops worldwide. While these phytopathogenic viruses are widespread and well-studied in North and South America, there is limited information from Central America. We conducted a study of these viruses in Costa Rica as a case for the region, a geographic connection between North and South America. Two hundred ninety-five plant samples were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of INSV, IYSV, TSWV and the serogroup GRSV/TCSV. A subset (20 samples) was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with universal and species-specific primers. TSWV and serogroup GRSV/TCSV were not detected by ELISA. Occurrence of INSV in Costa Rica was confirmed by ELISA, RT-PCR and partial sequencing. INSV appears as a common virus in open fields and greenhouses. TSWV was not detected; despite records from diagnostic reports and previous publications indicating TSWV presence in Costa Rica. RT-PCR results with degenerate primers indicated no other orthospoviruses in our samples. A predominant INSV haplotype was detected plus three additional haplotypes; thus, we hypothesized at least two independent introductions. We highlight the need for further orthospoviruses surveys and research in Central America.

Keywords: viral symptoms, ELISA, RT-PCR, genetic diversity, INSV, IYSV



The plant virus genus *Orthotospovirus* (family *Tospoviridae*, order *Bunyavirales*) (Kuhn *et al.*, 2022) is an emerging group of viruses with a worldwide distribution, affecting diverse plant species (Pappu *et al.*, 2009). Members in this genus have increased their distribution or plant host range (Londoño *et al.*, 2012; Naidu *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2015). Several orthotospovirus species are recognized as economically important plant pathogens limiting crop production or yield quality. For example, different reports mention yield losses up to 100% and economic losses starting from several tens of thousands to millions of US dollars (Daughtrey *et al.*, 1997; Hasegawa and Del Pozo-Valdivia, 2023; Mandal *et al.*, 2012).

Twenty-six accepted species comprise the genus *Orthotospovirus* (Kuhn *et al.*, 2022). *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is the type species and causes high economic impact in several crops (Pappu *et al.*, 2009). Another species of importance within the genus is *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Daughtrey *et al.*, 1997). Historically, INSV was first recognized as a distinct serotype of TSWV, identified as TSWV-I (De Ávila *et al.*, 1992). *Iris yellow spot virus* (IYSV) is also noteworthy, an orthotospovirus of Eurasian origin that has become a limitation in onion bulb and seed production. It has spread rapidly throughout the world (Bag *et al.*, 2015; Gent *et al.*, 2006).

Despite considerable research on orthotospovirus biology, management, and interaction with thrips vectors (Montero-Astúa *et al.*, 2016), information on occurrence and sequence data is quite limited from all Central American countries. TSWV and INSV (at that time TSWV-I) were reported by serology from *impatiens* (*Impatiens* spp.) and *lisianthus* (*Eustoma* sp.) plants in Costa Rica in the early 1990s (Hsu and Lawson, 1991; Rivera *et al.*, 1990). IYSV was reported in Guatemala (Nischwitz *et al.*, 2007) and Costa Rica (Montero-Astúa *et al.*, 2017). In addition to these scientific publications, we only found information (local publications, dissertations or institutional project reports available on-line) for TSWV occurrence in Guatemala and Honduras (Cumes Mantanico, 2008; Dardón *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 2002; Espinoza Rivera, 2012; Palmieri, 2012). However, we did not find sequence data for TSWV isolates from Central America in public databases.

In contrast to the Central American situation, several reports have updated the orthotospovirus presence in the Caribbean islands. Outbreaks of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), a different species of orthotospovirus originally described from Brazil (De Ávila *et al.*, 1993), was reported throughout the Caribbean Basin: Cuba (Martinez-Zubiaur *et al.*, 2016), Dominican Republic (Almeida *et al.*, 2014; Batuman *et al.*, 2014), Haiti (Adegbola *et al.*, 2016), Puerto Rico (De Jensen and Adkins, 2014; Webster *et al.*, 2013); and additionally in Florida (USA) (Londoño *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 2015). Moreover, TSWV was confirmed by RT-PCR in the Dominican Republic in 2013 (Martínez *et al.*, 2014).

Orthotospovirus sequence data is needed from all geographic regions and from

diverse plant hosts to (i) analyze viral diversity on a global basis, (ii) recognize genetically distinct isolates, and (iii) contribute to epidemiological understanding. Moreover, the information is essential for crop breeding and disease resistance programs. For example, there are isolates of TSWV capable of overcoming (breaking) resistance conferred by the *Sw-5* and *Tsw* resistance genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annuum*) plants, respectively. Knowledge of the isolates present in an area and sequence comparisons to identify the mutations that allow resistance-breaking, are an important input for breeding programs (Batuman *et al.*, 2017; Sharman and Persley, 2006).

The objective of this work was to determine the prevalence of orthotospoviruses in Costa Rica and obtain partial genome sequences to analyze genetic variability. This information updates the occurrence and variability of these plant viruses in Central America. We conducted a study by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of virus-like symptomatic plants to increase the chances of detecting orthotospoviruses. A subset of ELISA-positive samples was further examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). No TSWV-positive plants were detected in our samples. Therefore, we also conducted an historical analysis of TSWV and INSV detection in Costa Rica based on diagnostic-clinic reports from Obligate Plant Pathogens and their Vectors Laboratory (LaFOV), Cellular and Molecular Biology Research Center (CIBCM), University of Costa Rica, available since the year 2000.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. A total of 295 plant samples from 20 different plant families (Table 1) and 47 independent sites (fields, greenhouses, parks, or gardens), from five of the seven provinces of Costa Rica, were analyzed by ELISA for *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and the serogroup *Groundnut ring spot virus* (GRSV) / *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). Plant samples were obtained (2013 to 2014) from grower submissions to the diagnostic clinic due to viral-like symptoms. Also, we visited and collected samples with virus-like symptoms from fields, greenhouses, gardens or parks with previous history of orthotospovirus occurrence or due to reports of symptoms in the plants. Symptoms included mosaic, chlorotic or necrotic concentric rings or line patterns, leaf deformation, irregular leaf or fruit surface (blistering, crinkling) and stunting. Plant species known to be hosts of these plant viruses including tomato, onion and pepper were relatively more represented in the sample set due to the importance of these horticultural crops and the likelihood of detecting viruses of interest. Additionally, ornamental and other horticultural plant species were included.

Table 1. Samples collected from five provinces of Costa Rica to analyze the presence of species of *Orthotospavirus*.

Plant Family	N° samples / province ^z	Total samples	N° Sites	Samples IDs	Tissue
Amaryllidaceae	2 A, 23 C, 17 SJ	42	13	T161-T163, T170-T175, T177-T180, T182, T183, T192, T195-T199, T283-T285, T288-T296, T298-T301, T305, T316, T317, T321	Leaf
Anacardiaceae	1 SJ	1	1	T335	Fruit
Apocynaceae	1 A, 5 C	6	3	T076, T159, T241, T346-T348	Leaf
Asparagaceae	1 A	1	1	T329	Leaf
Asteraceae	6 A	6	2	T051, T053, T325-T328	Leaf
Balsaminaceae	4 A, 3 C	7	2	T028-T031, T061, T261, T262	Leaf
Caricaceae	5 P	5	1	T330-T334	Fruit
Cucurbitaceae	7 A, 3 C, 1 G, 9 P	20	8	T035-T037, T046-, T047, T080, T090, T091, T160, T268, T270, T280, T135-T140, T265, T266	Leaf
Fabaceae	4 A, 2 C, 1 SJ	7	5	T034, T079, T118, T124, T148, T243, T258	Leaf
Gentianaceae	3 C	3	1	T322-T324	Leaf
Iridaceae	4 C	4	1	T184-T187	Leaf
Lamiaceae	3 C	3	1	T156-T158	Leaf
Liliaceae	2 C	2	1	T188-T189	Leaf
Malvaceae	3 A, 1 G, 1 SJ	5	3	T066-T068, T081, T350	Leaf
Orchidaceae	18 A, 27 C	45	2	T012-T027, T055, T056, T214-T240	Leaf
Oxalidaceae	2 A	2	1	T120, T121	Leaf
Plantaginaceae	2 C	2	1	T057, T058	Leaf
Rosaceae	2 A	2	1	T128, T131	Leaf
Solanaceae	71 A, 37 C, 11 P, 12 SJ	131		T001-T011, T032, T033, T038-T045, T048-T050, T054, T059-T060, T062-T065, T069-T075, T077, T078, T082-T089, T092-T104, T106-T112, T114-T116, T119, T122, T134, T165-T169, T176, T181, T194, T202-T205, T209-T213, T245-T251, T253, T263, T264, T267, T271-T279, T302-T304, T306-T313, T320, T336-T338, T341-T345	Leaf and/or Fruit
Zingiberaceae	1 A	1	1	T339	Leaf

^z Sampled provinces; A, Alajuela; C, Cartago; G, Guanacaste; P, Puntarenas; SJ, San José.

Sample preparation and screening by ELISA. ELISA for INSV, IYSV, TSWV, and for the serogroup GRSV/TCSV used commercial reagents (Agdia, Elkhart, IN) following the manufacturer's recommendations. Briefly, ~0.5 g plant tissue was ground in 1 mL general extraction buffer (136 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂SO₃, 2% [v/v] Tween-20, 2% [w/v] Polyvinylpyrrolidone MW 40,000, 0.2% [w/v] chicken egg albumin; pH 7.4). Three replicates were prepared per sample and stored at -35 °C until used in the ELISA

tests. Samples were tested by duplicate wells; certificated commercial positive (2 wells, Agdia) and negative controls (4 wells) were included per plate. Absorbance was read at 405 nm after 1 hour, but for 2 hours for IYSV, in microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, China). Samples with average absorbance values greater than twice the average of the corresponding negative wells were considered positive (Sutula *et al.*, 1986). Doubtful samples were retested using the same protocol, but enzyme-conjugate buffer (ECI buffer, Agdia's protocol) was used without and with the addition of 5% skim milk powder to avoid false positives (Smith *et al.*, 2006).

Historical analysis of INSV and TSWV detection in Costa Rica. Diagnostic-clinic reports for INSV and TSWV detection in Costa Rica done at the Obligate Plant Pathogens and their Vectors Laboratory (LaFOV), Cellular and Molecular Biology Research Center (CIBCM), University of Costa Rica, and available since the year 2000 constituted the only data obtainable (to our knowledge) and best approximation to determine INSV and TSWV detection frequency for a period of 23.5 (2000 to July 2023) years in the country. Samples submitted to the diagnostic-clinic correspond to (i) symptomless plant material intended for export (phytosanitary certification; thus, the plant tissue is likely virus-free); and (ii) symptomatic plant material that is very likely virus-infected (although not necessarily with orthospoviruses) submitted by growers and extension agents. Therefore, these 23.5 years of reports may be a good estimate (including healthy and diseased-looking samples from small and larger farms/greenhouses) of the relative frequency of virus occurrence in the country for a given year.

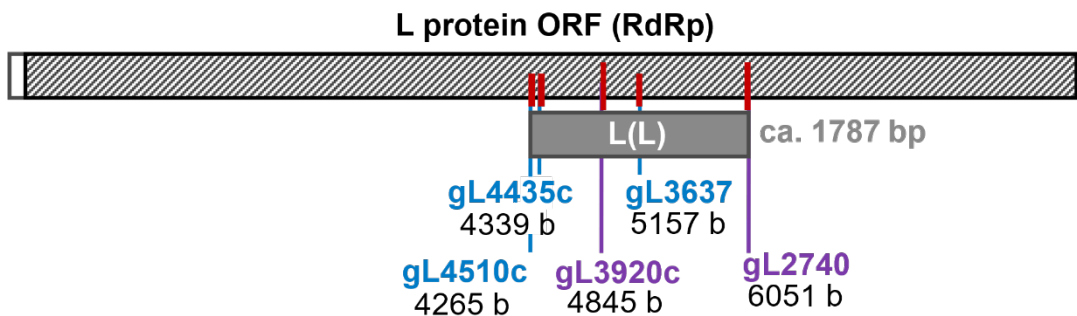
Confirmation of *Impatiens necrotic spot virus* by RT-PCR. A subset of 20 ELISA-positive samples for INSV (20 different plants) was analyzed by RT-PCR with both degenerate orthospovirus primers and INSV-specific primers (Table 2, Figure 1). RNA was extracted with RNeasy Plant Minikit (Qiagen, Germany), and total RNA was quantified with a UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop 2000C, ThermoScientific, USA). First strand cDNA was produced from 5 μ L of total RNA extraction per sample in a final reaction volume of 20 μ L by reverse transcription with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit or Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Lithuania) primed with random hexamers and stored at -35 °C. As a control to verify absence of amplification inhibitors or RNA degradation, each cDNA produced (retrotranscription reaction product) per each sample ($n = 20$) was tested with primers that amplified a 193 bp fragment of the 18S ribosomal RNA subunit of plants, designed as a reference gene for gene expression (quantitative RT-PCR) studies in plants (Zhu *et al.*, 2012). PCR reactions (25 μ L) contained 2 μ L cDNA, 12.5 μ L DreamTaq PCR Master Mix 2X

Table 2. Primer pairs and thermocycle profiles used for the detection of orthotospoviruses.

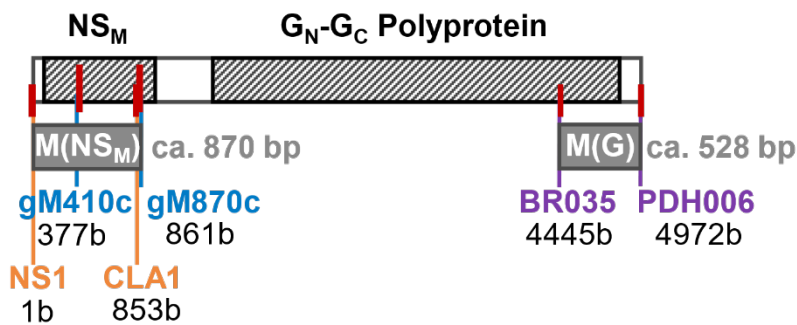
Primer pair	Primer sequence 5' to 3'	Amplicon size (bp)	Thermocycle profile	Reference
<i>Orthotospovirus detection (several species)</i>				
BR60	CCCGGATCCTGCAGAGCAAATGTGTCA	453	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 48 °C x 1 min, 72 °C); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
BR65	ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT			
BR035	GAATATATGACACCATTG	514	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 48 °C x 1 min, 72 °C); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
PDH006	CCCAGAGCAATCAGTGCA			
NS1	CCCTGCAGGATCCAGAGCAATCAGTGCA	865	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 48 °C x 1 min, 72 °C x 1 min); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
CLA1	GCAGGCTTCAATGAATGC			
gM410	AACTGGAAAAATGATTYNYTTGTTGG	500	95 °C x 1 min; 35 x (94 °C x 30 seg, 52 °C x 30 seg, 72 °C x 30 seg); 72 °C x 10 min	Chen <i>et al.</i> , 2012
gM870c	ATTAGYTTGCAKGCCTTCAATNAARGC			
gL2740	ATGGGDATNTTTGATTTCATGRTATGC	1200	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 50 °C x 30 seg, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chen <i>et al.</i> , 2012
gL3920c	TCATGCTCATSAGRATAAATYTCTCT			
gL3637	CCTTTAACAGTDGAAACAT	810	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 50 °C x 30 seg, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chu <i>et al.</i> , 2001
gL4435c	CATDGCRCGAAGARTGRTARACAGA			
gL3637	CCTTTAACAGTDGAAACAT	890	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 seg, 50 °C x 30 seg, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chu <i>et al.</i> , 2001
gL4510c	TCATCRGARTGBACMATCCATCT			
<i>INSV specific detection</i>				
INSV-589	CCCAAGACACAGGATTTCA	589	95 °C x 2 min; 35 x (94 °C x 30 seg, 54 °C x 30 seg, 72 °C x 1 min); 72 °C x 5 min	Uga & Tsuda, 2005
TOS-R15	GGGAGAGCAATYGWGKYR			
<i>Plants' 18S ribosomal RNA subunit</i>				
18S-F	TCTGCCCGTTGCTCTGATGAT	193	95 °C x 1 min; 40 x (94 °C x 30 seg, 55 °C x 30 seg, 72 °C x 35 seg); 72 °C x 5 min	Zhu <i>et al.</i> , 2012
18S-R	CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT			

(Thermo Scientific), and 200 nM each primer. Thermocycler conditions for each primer pair are indicated in Table 2 and were run on thermocyclers PTC-200 (MJ Research, Canada), MJ Mini (BioRad, Singapore) and/or Corbett Research CG1-96 (Corbett Life Science, Australia). PCR products were visualized on an ultraviolet light transilluminator (55W, BXT-26M, Uvitec, France) after agarose gel (1%) in TAE 1X (Tris Base 40mM, acetic acid 20mM, EDTA 1mM) electrophoresis and stained with GelRed 10000X (Biotinum Inc., USA) added to loading buffer (6X Thermo Scientific) for a final concentration of 1X GelRed in each loaded sample. Several primer pairs were used to obtain sequence information from the three orthotospovirus genome segments, small (S), medium (M) and large (L), for each sample ($n = 20$). In some cases, amplicons generated with different primer pairs

A) L segment, 8776 Kb (NC_003625.1)



B) M segment, 4972 Kb (NC_003616.1)



C) S segment, 2992 Kb (NC_003624.1)



Figure 1. Representation of primer pairs annealing positions in reference to the complete genome of *Impatiens necrotic spot virus*; accession numbers in parenthesis for each genome segment. Overlapping among primers and the final partial sequences (gray rectangles) obtained herein with corresponding expected size (bp). Base pair values under each primer represent the positions of the first and last nucleotide of the corresponding amplicon in the reference genome.

overlapped (Figure 1). In total, we obtained final sequences comprising four partial orthospovirus ORFs (Figure 1): (i) S(N), partial sequence of the nucleocapsid (N) open reading frame (ORF) and 3'-UTR region of the S genome segment; (ii) M(NS_M), partial sequence of the movement protein ORF (NS_M) at the 5'-terminus of the M genome segment; (iii) M(G), partial sequence of the glycoprotein precursor ORF at the 3'-terminus of the M genome segment; and (iv) L(L), internal partial sequence of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ORF in the L genome segment.

Sequencing and haplotype network analysis. All amplicons obtained for the subset of 20 samples were sequenced directly from the PCR reactions in forward and reverse sense employing the same primer pairs used for amplification. PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Korea). Contigs were generated and manually edited in BioEdit (version 7.2.5). Final sequences were deposited in GenBank (National Institute of Health genetic sequence database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Sequences representing different countries and host plants for INSV were retrieved from GenBank using the search phrase “Impatiens necrotic spot” in nucleotide and genome databases and were sorted by genome segment: S, M, and L. Several analyses were conducted. Initially, individual phylogenies were constructed for the regions of the genome amplified, S(N), M(NS_M), M(G) and L(L) (data not shown), including the available sequences downloaded from GenBank. Models for DNA substitution to use in the phylogenetic analyses were determined and phylogenies were constructed with MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), but no clear or robust clustering was obtained. Therefore, sequences corresponding to S(N) obtained in this study were aligned (MUSCLE algorithm) to N sequences downloaded from GenBank (81 total INSV sequences) with the objective to conduct a general worldwide analysis of INSV diversity. Final alignment, after cutting overhangs, due to different size of the sequences, comprised 261 bp of the N ORF of INSV. Haplotype determination and population analyses were conducted on DnaSP6 (Rozas *et al.*, 2017) using the previous S(N) alignment for 79 isolates; two sequences were eliminated because there was no information on geographical origin. Sequences were grouped as populations by country or region (Europe) to conduct the analysis. Network graph was done in PopART (Population Analysis with Reticulate Trees, <http://popart.otago.ac.nz>) using the TCS network inference method (Clement *et al.*, 2000).

In a second analysis, the different regions of the INSV genome that were successfully amplified and sequenced for the same sample were aligned and concatenated. Twelve of the Costa Rican samples were included (because we obtained sequence data for the four regions targeted) and five INSV samples from

abroad for which the complete genome was available. The alignment comprised a total of 2,945 positions and was analyzed by Maximum Likelihood method with a Tamura 3-parameter model and a gamma-distributed rate of variation in nucleotides (+G); 2,000 permutations in MEGA X software. Analyses for all segments were run with and without TSWV as outgroup (reference sequences S: NC_002051; M: NC_002050; and L: NC_002052).

RESULTS

ELISA analyses and observed symptoms. ELISA-positive samples were observed for INSV and IYSV (Table 3). Noteworthy, TSWV and the serogroup comprising GRSV and TCSV were not detected in any sample. In contrast, INSV seems relatively common in Costa Rica (58/295 samples were ELISA-positive), occurring on different plant species. In this study, INSV was detected in 12 plant species out

Table 3. Number of total and positive samples per plant species tested by ELISA to detect three orthotospoviruses in Costa Rica.

Plant host (common name)	Sample number	N° positive samples ^y			GRSV/ TCSV
		INSV	IYSV	TSWV	
Amaryllidaceae					
<i>Allium cepa</i> (onion)	38	6	10	0	0
<i>Allium sativum</i> (garlic)	2	0	0	0	0
<i>Hippeastrum</i> sp. (“amaryllis”)	1	1	0	0	0
<i>Tulbaghia violaceae</i> (society garlic)	1	0	0	0	0
Anacardiaceae					
<i>Spondias purpurea</i> (jocote)	1	0	0	0	0
Apocynaceae					
<i>Mandevilla</i> sp. (dipladenia)	1	0	0	0	0
<i>Trachelospermum jasminoides</i> (star jasmine)	1	0	0	0	0
<i>Cataranthus roseus</i> (periwinkle)	4	0	0	0	0
Asparagaceae					
<i>Ornithogalum</i> sp. (star of Bethlehem)	1	0	0	0	0
Asteraceae					
<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)	6	0	0	0	0
Balsaminaceae					
<i>Impatiens</i> sp. (impatiens)	7	3	0	0	0
Caricaceae					
<i>Carica papaya</i> (papaya)	5	0	0	0	0
Cucurbitaceae					
<i>Citrullus lanatus</i> (watermelon)	2	0	0	0	0
<i>Cucumis melo</i> (muskmelon)	13	0	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i> (cucumber)	1	0	0	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> (pumpkin, zucchini)	2	0	0	0	0

Table 3. Continue

Plant host (common name)	Sample number	N° positive samples ^y			GRSV/ TCSV
		INSV	IYSV	TSWV	
<i>Sechium edule</i> (chayote)	1	0	0	0	0
<i>Sechium tacaco</i> (tacaco)	1	0	0	0	0
Fabaceae					
<i>Arachis pinto</i> (pinto peanut)	3	0	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i> (black bean)	4	0	0	0	0
Gentianaceae					
<i>Eustoma</i> sp. (lisianthus)	3	3	0	0	0
Iridaceae					
<i>Iris</i> sp. (iris)	4	4	0	0	0
Lamiaceae					
<i>Ocimum basilicum</i> (basil)	1	1	0	0	0
<i>Plectranthus scutellarioides</i> (coleus)	2	2	0	0	0
Liliaceae					
<i>Lilium</i> sp. (lilies)	2	0	0	0	0
Malvaceae					
<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton)	1	0	0	0	0
<i>Hibiscus</i> sp. (hibiscus)	4	0	0	0	0
Orchidaceae					
Several species and hybrids ^z (orchids)	45	1	0	0	0
Oxalidaceae					
<i>Oxalis</i> sp.	2	0	0	0	0
Plantaginaceae					
<i>Antirrhinum majus</i> (snapdragon)	2	2	0	0	0
Rosaceae					
<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	2	0	0	0	0
Solanaceae					
<i>Browallia</i> sp. (bush violet)	2	1	0	0	0
<i>Calibrachoa</i> sp. (million bells)	4	0	0	0	0
<i>Capsicum annuum</i> (sweet pepper)	68	30	0	0	0
<i>Petunia</i> sp. (petunia)	14	0	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato)	37	4	0	0	0
<i>Solanum melongena</i> (eggplant)	1	0	0	0	0
<i>Solanum quitoense</i> (naranjilla, lulo)	1	0	0	0	0
<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	4	0	0	0	0
Zingiberaceae					
<i>Hedychium</i> sp.	1	0	0	0	0
Total	295	58	10	0	0

^y Samples were tested to detect: *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), iris yellow spot virus (IYSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) or the serogroup *Groundnut ring spot virus/Tomato chlorosis spot virus* (GRST/TCSV).

^z Orchid samples included several different genera and hybrids; therefore, those are listed together as family Orchidaceae. The positive sample corresponded to a plant of the hybrid genus *Bakerara*.

of 39 species and one family (Orchidaceae) tested. Peppers (*C. annuum*), onion (*Allium cepa*), tomato (*S. lycopersicum*) and iris (*Iris* sp.) were the species with more positive samples: 30, 6, 4 and 4, respectively. Chlorotic or necrotic rings and

spots, and chlorotic ring patterns were the most common symptoms associated with INSV-positive samples; mosaic or tissue deformation were also observed (Figure 2). IYSV was only detected in ten onion (*A. cepa*) leaf samples.

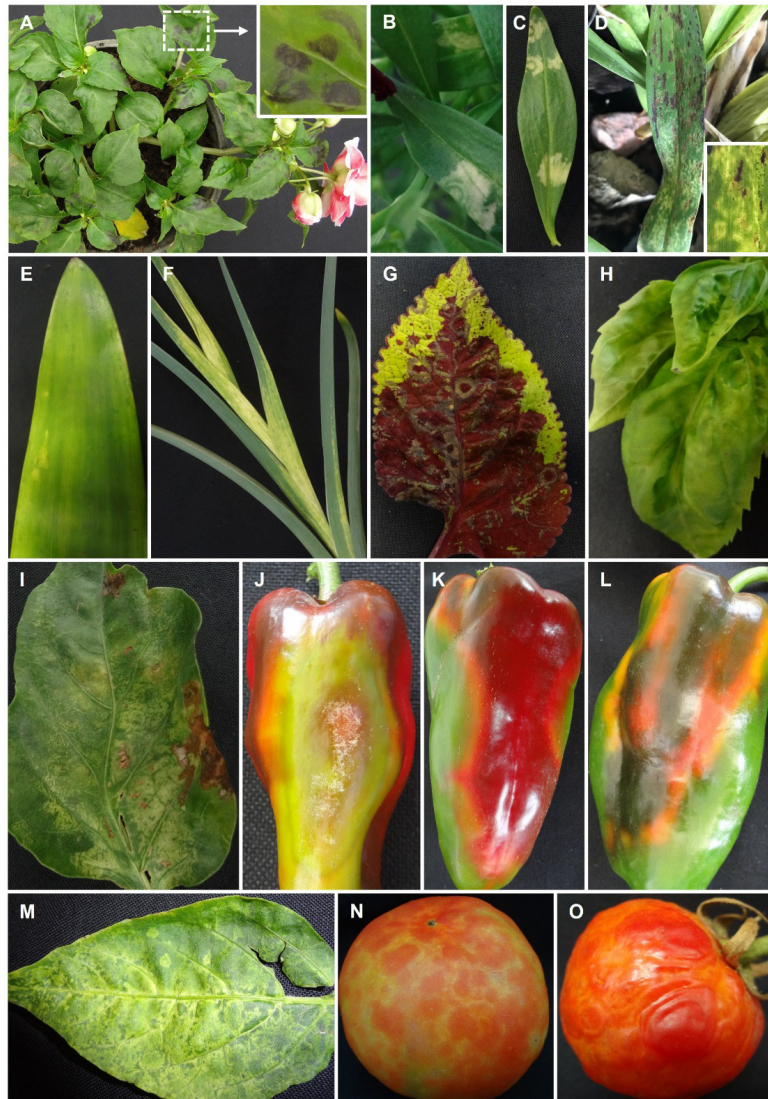


Figure 2. *Impatiens necrotic spot virus* symptoms observed in multiple hosts confirmed to be virus infected by ELISA and RT-PCR/sequencing. Necrotic concentric rings on impatiens (*Impatiens* sp.) T031 (A) and coleus (*Plectranthus scutellarioides*) T157 (G). Chlorotic rings and spots observed on snapdragons (*Antirrhinum majus*) T057 (B, C). Chlorotic and necrotic striate on orchid leaves T024 (D) and chlorotic mosaic on amaryllis (*Hippeastrum* sp.) T161 I; iris (*Iris* sp.) T184 (F); and basil (*Ocimum basilicum*) T156 (H). Chlorotic concentric ring patterns and single rings on sweet pepper (*Capsicum annuum*) leaves T250 (I) and T092 (M). Uneven ripening, ring patterns and deformation on sweet pepper fruits T092 (J), T107 (K), T094 (L). Chlorotic patterns, rings and uneven surface on tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) T263 (N) and T303 (O).

Historical analysis of TSWV and INSV occurrence. We were interested in the historical occurrence of TSWV and INSV in the country due to the lack of TSWV detection in our study samples, and because the only TSWV reports in the country were made in 1990 (Rivera *et al.*, 1990) and 1991 (Hsu and Lawson, 1991). For this purpose, we collected data from our records of diagnostic-clinic services available from the year 2000 to July 2023. Samples in these records correspond mostly to ornamental plants (for exportation/importation) but also include horticultural samples coming from small to large-size growers. In total, 1027 and 1889 samples were analyzed for TSWV and INSV, respectively. Positive samples for TSWV were 43 (4.2%) and for INSV were 290 (15.4%), detected by DAS-ELISA with commercial antibodies. Three years (2008-2010) presented values over 50 INSV-positive samples per year. Conversely, TSWV-positive samples per year were below ten samples. Since 2015, after the survey included herein, detection of these viruses was very low and not frequent. Also, TSWV-positive samples were detected only in 11 of 23.5 years analyzed; meanwhile, INSV was detected in 17 years (Figure 3)

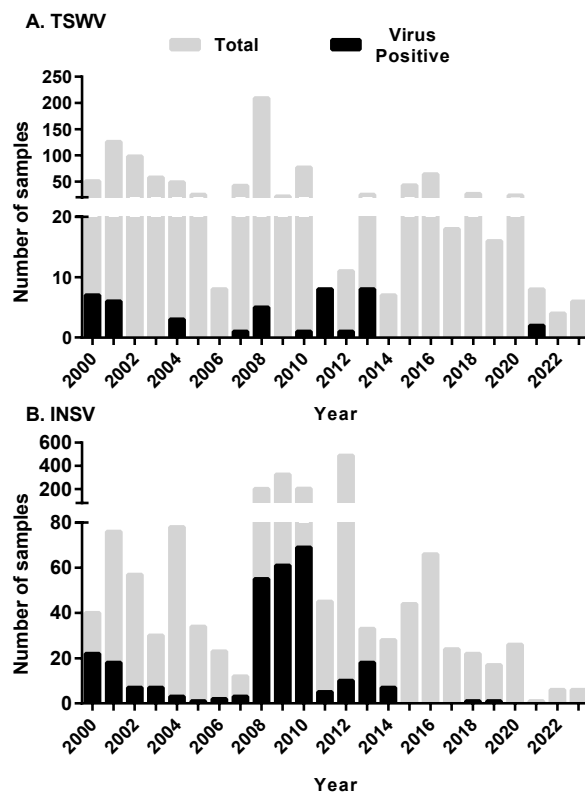


Figure 3. Detection of *Impatiens necrotic spot* and *tomato spotted wilt* viruses, by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) through a 23.5-year period (2000 to July 2023) in samples submitted to diagnostic services at Cellular and Molecular Biology Research Center, University of Costa Rica.

RT-PCR confirmed INSV occurrence. RT-PCR results confirmed the occurrence of INSV on nine plant taxa: *Antirrhinum majus*, *C. annuum*, *Hippeastrum*, *Impatiens*, *Iris*, *Oncimun basilicum*, *Plectranthus scutellarioides*, *S. lycopersicum*, and the man-made orchid hybrid *Bakerara*. All plant species that were ELISA-positive were also positive by RT-PCR with two or more primer pairs and sequencing (Figure 1, Table 4), except *Browallia* sp., *Eustoma* sp., and onion samples. These were not tested by RT-PCR because the *Browallia* and *Eustoma* potted plants suddenly wilted and died in our greenhouse before we collected tissue for RNA extraction. Onion samples were not tested, because IYSV was confirmed previously (Montero-Astúa *et al.*, 2017).

In total, we obtained 72 final, edited partial sequences or contigs; 18 sequences for nucleocapsid gene; 18 for movement protein gene; 20 for the glycoprotein precursor gene; and 16 for the viral RdRp gene. All sequences were submitted to GenBank (Table 4).

Haplotype network analysis. Initially, a lack of well-defined clusters was observed with phylogenetic trees for S(N), M(NS_M), M(G), and L(L) sequences including sequences available from other countries (data not shown). Therefore, we proceeded with a haplotype analysis of the S(N) sequence data set comprising 261bp from the nucleocapsid ORF of INSV isolates from around the world available in GenBank and the 18 sequences obtained herein (Figure 4). Four haplotypes of the partial nucleocapsid ORF sequence were detected in Costa Rica (Figure 4). There is one predominant haplotype of the virus in the country. This haplotype is also found in China, Japan, Europe and Korea. Two other haplotypes found in Costa Rica are distantly located in the network and seem more related to a second major haplotype occurring in Europe, Japan, New Zealand, and the USA.

The concatenated analysis of the four genome regions that we amplified and sequenced in this work, for 12 of the Costa Rican samples, and similar concatenated sequences from five INSV genomes available in GenBank (Figure 5) showed Costa Rican INSV samples clustering together and separated from the reference sequences. The structure of the sub-clusters of the Costa Rican samples generally corresponded with the geographic site of origin. In this case, greater diversity was suggested by the phylogeny in comparison to the haplotype network, where the branches and nodes indicated differences among the 12 isolates included from Costa Rica (Figure 5).

Table 4. Partial nucleotide sequences and virus identity determined for a subset of INSV ELISA-positive samples.

Plant host	ID	Site ^w , province	Sequence ^x identification ^y			
			S(N)	M(NS _M)	M(G)	L(L)
<i>Antirrhinum majus</i>	T057	D, Cartago	MH687991	MH673625	MH673643	MH487473
<i>Capsicum annuum</i>	T092	N, Alajuela	MH687992	MH673626	MH673644	MH487474
	T093	M, Alajuela	MH687993	MH673627	MH673645	MH487475
	T094	M, Alajuela	MH687994	MH673628	MH673646	MH487476
	T096	M, Alajuela	MH687995	MH673629	MH673647	MH487477
	T107	N, Alajuela	MH687996	MH673630	MH673648	MH487479
	T109	N, Alajuela	MH687997	MH673631	MH673649	MH487480
	T245	II, Cartago	MH688003	MH673638	MH673657	MH487487
	T250	II, Cartago	MH688004	MH673639	MH673658	MH487488
	T251	II, Cartago	MH688005	MH673640	MH673659	MH487489
	<i>Hippeastrum</i> sp.	T161	D, Cartago	MH688001	MH673635	MH673653
<i>Impatiens</i> sp.	T031	C, Alajuela	MH687990	MH673624	MH673642	MH487472
<i>Iris</i> sp.	T184	CC, Cartago	--- ^z	MH673636	MH673654	MH487484
	T186	CC, Cartago	--- ^z	MH673637	MH673655	MH487486
<i>Ocimum basilicum</i>	T156	D, Cartago	MH687998	MH673632	MH673650	--- ^z
Orchid	T024	B, Alajuela	MH687989	MH673623	MH673641	--- ^z
<i>Plectranthus</i>	T157	D, Cartago	MH687999	MH673633	MH673651	MH487481
<i>scutellarioides</i>	T158	D, Cartago	MH688000	MH673634	MH673652	MH487482
	T263	O, San José	MH688006	--- ^z	MH673660	--- ^z
<i>Solanum lycopersicum</i>	T303	O, San José	MH688007	--- ^z	MH673661	--- ^z
	Total (n)	20	8, 3	18	18	20

^w Different letter codes distinguish independent fields, greenhouses, parks, or gardens.

^x Sequences corresponding to partial fragments of the S, M and L genome segments of orthospoviruses obtained from one or several primer pairs (contig) as shown in Figure 1. **S(N)**, partial sequence of the nucleocapsid ORF and 3'-UTR regions of the S genome segment. **M(NS_M)**, partial sequence of the movement protein ORF (NS_M). **M(G)**, partial sequence of the glycoprotein precursor ORF. And **L(L)**, an internal region of the polymerase (RdRp) ORF in the L genome segment.

^y Plant virus species determined by the first hit BLAST result (GenBank, National Center for Biotechnology Information, U.S.A.) and percentage of identity >97%.

^z ---, no sequence available because: (i) there was no amplification in RT-PCR; alternatively, (ii) an amplicon was generated but the sequencing reaction failed (one or both primers), or yielded only plant host sequence (nonspecific amplification).

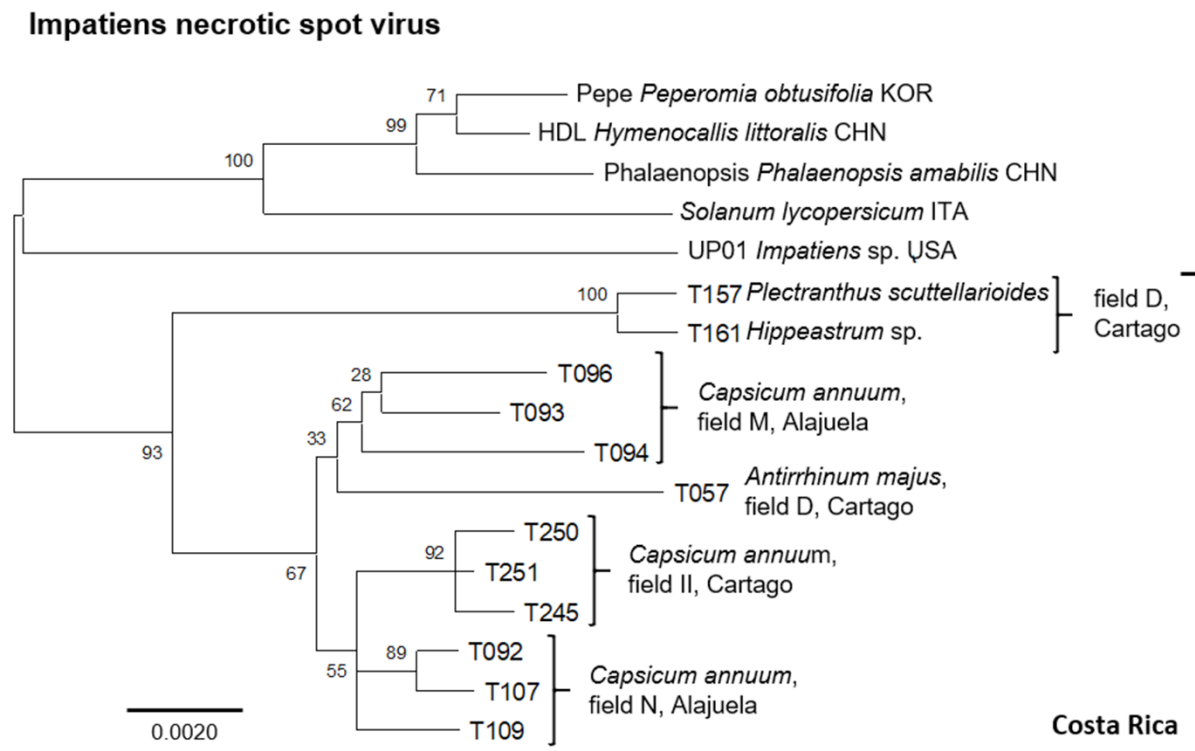


Figure 5. Phylogenetic analysis of an alignment of concatenated sequences (2945 positions) including a region of the nucleocapsid [S(N)], the glycoprotein precursor [M(G)], movement protein [M(NSM)] and viral polymerase [L(L)] ORFs of *Impatiens necrotic spot virus* isolates. Standard (ISO 3166-1) three letter codes indicate country of origin for reference sequences; CHN, China; ITA, Italy; KOR, South Korea; and USA, United States of America. Additional different letter codes (in parenthesis) for Costa Rican isolates, indicate independent geographic sites. Analysis was run in MEGA X using a Maximum Likelihood method with a Tamura-3-parameter model and a gamma-distributed rate of variation in nucleotides (+G); 2000 permutations. Scale bar represents number of substitutions per site.

DISCUSSION

TSWV, INSV (originally detected as TSWV-I) (Hsu and Lawson, 1991; Rivera *et al.*, 1990), and IYSV (Montero *et al.*, 2017) are the orthotospoviruses reported in Costa Rica. In our current study, we detected INSV and IYSV, and confirmed by RT-PCR and sequencing the occurrence of INSV. However, TSWV seems to occur in Costa Rica, by serology, from analysis of an historic record (Figure 3) and previous reports (Hsu and Lawson, 1991; Rivera *et al.*, 1990). The analysis of historic data from the diagnostic clinic service, showed low occurrence of the virus and alternating periods of years without TSWV detection in the period 2000-July 2023.

Tentchev and collaborators (2011) mentioned that TSWV occurrence decreased worldwide between the 1940s and 1980s, and after that period there were important outbreaks of the virus, indicating cycles in TSWV occurrence. Moreover, Kaye *et al.* (2011) discussed that TSWV population from peanut in North Carolina and Virginia was strongly limited by population bottlenecks; including the biology and feeding preference of the thrips vector. Also, we should consider that previously in Costa Rica, screening and control measures targeted TSWV, and thus the incidence of this virus was limited. Recently, vector biology and competition among whitefly species has been associated with changes in occurrence and displacement among begomoviruses in Costa Rica (Can-Vargas *et al.*, 2020; Valverde-Méndez *et al.*, 2023). Therefore, the lack of detection of TSWV during this survey may be due to one or several factors including: cycles in TSWV occurrence; changes in vector competence and population; competition with other viruses; and/or the effect of control measures.

The orthospovirus serogroup GRSV/TCSV was not detected during this survey, suggesting that this serogroup, spread throughout the Caribbean islands (Adegbola *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2014; Batuman *et al.*, 2014; De Jensen and Adkins, 2014; Londoño *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013; Martinez-Zubiaur *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2015), has not reached the continental Caribbean region of Central America. Use of degenerate orthospovirus primers (Chen *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2001; Eiras *et al.*, 2001) in 20 samples from several hosts without detection of other viruses but for INSV, likewise suggests there are not additional orthospovirus species in the country. The samples included herein corresponded to a survey from 2013 to 2014; therefore, updated periodical surveys and continued government surveillance are necessary to avoid the introduction of other orthospovirus species.

Our results indicate that INSV is an important and widely distributed orthospovirus in Costa Rica. In contrast, INSV has not been reported from other Central American countries. The limited information available reports only the occurrence of TSWV in Guatemala and Honduras (Cumes Mantanico, 2008; Dardón *et al.*, 1994; Espinoza Rivera, 2012; Palmieri, 2012; Doyle *et al.*, 2002). In the case of IYSV, there are reports only from Guatemala (Nischwitz *et al.*, 2007) and Costa Rica (Montero-Astúa *et al.*, 2017). We did not find information regarding studies that tested for orthospoviruses. The lack of reports is not necessarily indicative of the absence of orthospoviruses in these countries, but likely signals a gap in knowledge and research on this specific topic.

Two clades of INSV isolates: Western Hemisphere and Asia, were identified previously (Adegbola *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018). Observing the network haplotype analysis of a partial N(S) alignment it is possible to recognize the existence of two main haplotypes with all other isolates as variants or secondary

nodes of those principal ones (Figure 5). All isolates from China, and several Japanese, Korean, and European sequences belong to this group of haplotypes. Most of the Costa Rica sequences were included within this group, which may represent the putative Asian clade of INSV sequences. The second lineage of INSV, putative Western Hemisphere group, appears as the second group of haplotypes in the network, it includes the second more frequent haplotype worldwide; it is found in Europe, Japan, New Zealand, and the USA. Additionally, in this group are included a few other diverse haplotypes from the USA, Chile, Europe and two from Costa Rica (three samples). Therefore, it is likely that at least two introductions of INSV to Costa Rica have occurred, one from Asia and a second from the Western Hemisphere lineage (Adegbola *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018).

INSV appears to cluster related to geography or site (field/greenhouse) of origin. The 12 Costa Rican isolates are clustered independently from the isolates from abroad, and in three cases out of four, isolates from the same field or greenhouse clustered together (Figure 5). Our results agree with the conclusions from Adegbola *et al.* (2019), Nekoduka *et al.* (2015), Kuo *et al.* (2014) and Zhao *et al.* (2018). In summary, these four studies found that INSV (isolate sequences or haplotypes) show a tendency to cluster in relation to geographical origin, and two studies (Kuo *et al.*, 2014; Nekoduka *et al.*, 2015) also reported a low degree of genetic or haplotype diversity in local INSV populations. Four haplotypes for the partial S(N) sequence (Figure 4) may suggest low diversity; however, this analysis comprises only 261 nucleotide positions. Conversely, the phylogeny of concatenated sequences (Figure 5) suggested relative higher diversity with various subgroups and different branch lengths. Thus, further research is required for a robust estimation of the genetic variability of the Costa Rican INSV population.

CONCLUSIONS

INSV was detected in 58 samples out of 295 tested by ELISA. The virus was detected in diverse plant families and species, a total of 13 taxa: *Allium cepa*, *Antirrhinum majus*, *Browallia*, *Capsicum annuum*, *Eustoma*, *Hippeastrum*, *Impatiens*, *Iris*, *Oncimun basilicum*, *Plectranthus scuttellarioides*, *Solanum lycopersicum*, and the man-made hybrid *Bakerara*. IYSV was detected only in ten onion samples. Meanwhile, TSWV, GRSV or TCSV were not detected in the survey included herein. Conversely, historical data indicated the presence of TSWV in the country and showed a tendency to decrease regarding requests for analyses and detection of TSWV and INSV in the country.

Based on a fragment of the nucleocapsid sequence, there is low diversity of INSV in Costa Rica, with only 4 haplotypes among 20 samples. Concatenated

analysis including regions of S, M and L genome segments corresponding to the nucleocapsid, movement protein, glycoproteins precursor and RdRp for a total of 2945 positions, suggested relatively higher variability of this virus in Costa Rica. Further sampling and analysis are necessary to determine the genetic diversity of INSV in Costa Rica. Overall, the data lead us to hypothesize the presence of two lineages of INSV, the Asian and Western Hemisphere ones.

The results correspond to a survey conducted during 2013 and 2014, therefore it shows a specific time point, that may have changed due to current continuous international trade and movement of people. An updated survey and higher representation of the whole country is recommended to understand current situation of orthospoviruses and their epidemiological cycles.

Our results and information search efforts, lead us to conclude the need to conduct studies and research throughout Central America to definitively establish which orthospoviruses species occur in this region. Descriptions of symptoms, lists of susceptible hosts and identification of thrips' populations associated with transmission are necessary to understand the epidemiology of orthospoviruses in Central America. Sequence data will allow determination of the population structure and thus to recognize potential high-risk strains (e.g. resistant breaking strains) not currently found in the area. Such information will be instrumental to control the introduction of specific viral strains and species to the region (via customs inspections and quarantine) and to design management strategies, preferably at the regional level.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to growers who gave us symptomatic plant tissue or allowed us to collect samples from their fields or greenhouses. We also thank Experimental Station Lankester Botanical Garden Research Center (JBL) and Experimental Station Fabio Baudrit Moreno (EEFBM), both from Universidad de Costa Rica, for allowing us to sample their orchid collections. This research was funded by Universidad de Costa Rica (research project 801-B3-126 and research activity 801-A1-801).

LITERATURE CITED

- Adegbola RO, Fulmer AM, Williams B, Brenneman TB, Kemerait RC, Sheard W, Adkins S and Naidu RA. 2016. First report of the natural occurrence of Tomato chlorotic spot virus in peanuts in Haiti. *Plant Disease* 100:1797-1797. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0070-PDN>
- Adegbola RO, Marshall SH, Batuman O, Ullman DE, Gilbertson RL, Adkins Sb and Naidu RA. 2019. Sequence analysis of the medium and small RNAs of impatiens necrotic spot virus reveals segment reassortment but not recombination. *Archives of Virology* 164:2829-2836. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04389-5>

- Almeida MMS, Orilio AF, Melo FL, Rodriguez R, Feliz A, Cayetano X and Resende RO. 2014. The first report of Tomato chlorotic spot virus (TCSV) infecting long beans and chili peppers in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:1285-1285. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0348-PDN>
- Bag S, Schwartz HF, Cramer CS, Havey MJ and Pappu HR. 2015. Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): From obscurity to research priority. *Molecular Plant Pathology* 16:224-237. <https://doi.org/10.1111/mpp.12177>
- Batuman O, Rojas MR, Almanzar A and Gilbertson RL. 2014. First report of Tomato chlorotic spot virus in processing tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:286-286. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0685-PDN>
- Batuman O, Turini TA, Oliveira PV, Rojas MR, Macedo M, Mellinger HC, Gilbertson RL. 2017. First report of a resistance-breaking strain of Tomato spotted wilt virus infecting tomatoes with the Sw-5 tospovirus-resistance gene in California. *Plant Disease* 101:637-637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1371-PDN>
- Can-Vargas X, Barboza N, Fuchs EJ and Hernández EJ. 2020. Spatial distribution of whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) and identification of secondary bacterial endosymbionts in tomato fields in Costa Rica. *Journal of Economic Entomology* 113(6):2900-2910. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa215>
- Chen TC, Li JT, Lin YP, Yeh YC, Kang YC, Huang LH and Yeh SD. 2012. Genomic characterization of Calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. *Plant Pathology* 61:183-194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02484.x>
- Chu FH, Chao CH, Chung MH, Chen CC and Yeh SD. 2001. Completion of the genome sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91:361-368. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.4.361>
- Clement M, Posada D and Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cumes Mantanico SY. 2008. Etiología, incidencia, severidad y distribución del tizón de crisantemo, en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. P. 54. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2395.pdf (Accessed July 18, 2023).
- Dardón D, Calderón F, Salguero V, Lastra R and Brown J. 1994. Identificación de virus en el tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en cinco departamentos de Guatemala. *Agronomía Mesoamericana* 5:109-117. <https://doi.org/10.15517/AM.V5I0.25076>
- Daughtrey ML, Jones RK, Moyer JW, Daub ME and Baker JR. 1997. Tospoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease* 81:1220-1230. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1220>
- De Ávila AC, de Haan P, Kormelink R, Resende RdO, Goldbach RW and Peters D. 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74:153-159. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-2-153>
- De Ávila AC, Haan PD, Kitajima EW, Kormelink R, Resende RDO, Goldbach RW and Peters D. 1992. Characterization of a distinct isolate of Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134:133-151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb01222.x>
- De Jensen CE and Adkins S. 2014. First report of Tomato chlorotic spot virus in lettuce in Puerto Rico. *Plant Disease* 98:1015-1015. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1200-PDN>
- Doyle MM, Bermeo E, Aguilar E and Rueda A. 2002. Identificación de las infecciones virales en los principales cultivos hortícolas y malezas en 3 regiones de Honduras, 1998-2002. *Escuela Agrícola*

- Panamericana Zamorano. http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2935/1/211395_0226.pdf (Accessed July 18, 2023).
- Eiras M, Resende RO, Missiaggia AA and Ávila ACD. 2001. RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira* 26:170-175. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200009>
- Espinoza Rivera M. 2012. Producción de plantas de crisantemo libres de virus utilizando termo terapia y cultivo de meristemas. 74p. Informe Final, Proyecto FODECYT No. 086-2006 Universidad del Valle de Guatemala. <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/index.php/catalogo/15-codigo/305-86-2006-biotecnologia> (Accessed February 10th, 2022).
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90:1468-1480. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1468>
- Hasegawa DK and Del Pozo-Valdivia AI. 2023. Epidemiology and economic impact of *impatiens necrotic spot virus*: a resurging pathogen affecting lettuce in the Salinas Valley of California. *Plant Disease* 107:1192-1201. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1248-RE>
- Hsu HT and Lawson RH. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Disease* 75:292-295. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0292>
- Kaye AC, Moyer JW, Parks EJ, Carbone I and Cubeta MA. 2011. Population genetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101:147-153. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-10-0035>
- Kuhn JH, Adkins S, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Ayllón MA, Bahl J, Balkema-Buschmann A, Ballinger MJ, et al. 2022. 2022 taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of Virology* 167:2857-2906. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05546-z>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuo YW, Gilbertson RL, Turini T, Brennan EB, Smith RF and Koike ST. 2014. Characterization and epidemiology of outbreaks of *Impatiens necrotic spot virus* on lettuce in coastal California. *Plant Disease* 98:1050-1059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0681-RE>
- Londoño A, Capobianco H, Zhang S and Polston JE. 2012. First record of Tomato chlorotic spot virus in the USA. *Tropical Plant Pathology* 37:333-338. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012005000001>
- Mandal B, Jain RK, Krishnareddy M, Krishna Kumar NK, Ravi KS and Pappu HR. 2012. Emerging problems of tospoviruses (*Bunyaviridae*) and their management in the Indian subcontinent. *Plant Disease* 96:468-479. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0520>
- Martínez RT, Poojari S, Tolin SA, Cayetano X and Naidu RA. 2014. First report of Tomato spotted wilt virus in peppers and tomato in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:163-163. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0617-PDN>
- Martínez-Zubiaur Y, Chang Sidorchuk L, González Alvarez H, Barboza Vargas N and González Arias G. 2016. First molecular evidence of *Tomato chlorotic spot virus* infecting tomatoes in Cuba. *Plant Disease* 100(9): 1956. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0082-PDN>
- Montero-Astúa M, Dejuk-Protti N, Vásquez E, Garita L and Moreira L. 2017. First report of *Iris yellow spot virus* in Costa Rica. *Australasian Plant Disease Notes* 12:18. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0243-8>

- Montero-Astúa M, Stafford-Banks CA, Badillo-Vargas IE, Rotenberg D, Ullman DE and Whitfield AE. 2016. Tospovirus-thrips biology. Pp. 289-308. In Brown JK (Ed.) Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. APS press. 496p. <https://doi.org/10.1094/9780890545355>
- Naidu RA, Deom CM and Sherwood JL. 2005. Expansion of the host range of Impatiens necrotic spot virus to peppers. *Plant Health Progress* 6(1):28. <https://doi.org/10.1094/PHP-2005-0727-01-HN>
- Nekoduka S, Kobayashi K, Fuji S, Okuda M and Sano T. 2015. Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. *Journal of General Plant Pathology* 81:429-438. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0615-x>
- Nischwitz C, Pappu HR, Mullis SW, Sparks AN, Langston DR, Csinos AS and Gitaitis RD. 2007. Phylogenetic analysis of *Iris yellow spot virus isolates* from onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. *Journal of Phytopathology* 155:531-535. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01272.x>
- Palmieri M. 2012. Diagnóstico de la situación fitosanitaria del crisantemo y otras flores de corte y evaluación de planes emergentes de manejo integrado del cultivo en los municipios de San Pedro y San Juan Sacatepéquez, Guatemala. 114 p. Informe Final, Proyecto FODECYT 076-2006. Universidad del Valle de Guatemala y Universidad de San Carlos de Guatemala. <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/index.php/catalogo/15-codigo/297-76-2006-biotecnologia>. (Accessed July 28th, 2023)
- Pappu HR, Jones RAC and Jain RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141:219-236. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009>
- Rivera C, Pereira R and Ramírez P. 1990. Identificación del marchitamiento moteado del tomate (TSWV) en *Impatiens walerana* en Costa Rica. *Turrialba* 40:562-568. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0789e/A0789e04.html>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE and Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sharman M and Persley DM. 2006. Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in capsicum in Australia. *Australasian Plant Pathology* 35:123-128. <https://doi.org/10.1071/AP06014>
- Smith TN, Wylie SJ, Coutts BA and Jones RAC. 2006. Localized distribution of *Iris yellow spot virus* within leeks and its reliable large-scale detection. *Plant Disease* 90:729-733. <https://www.dopi.org/10.1094/PD-90-0729>
- Sutula CL, Gillet JM, Morrissey SM and Ramsdell DC. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70:722-726. <https://doi.org/10.1094/PD-70-722>
- Tentchev D, Verdin E, Marchal C, Jacquet M, Aguilar JM and Moury B. 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: Evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92:961-973. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029082-0>
- Uga H and Tsuda S. 2005. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology* 95:166-171. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0166>
- Valverde-Méndez K, Hernández EJ, Matamoros D and Barboza N. 2023. Begomovirus diversity in tomato crops in Costa Rica. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/aab.12850>

- Webster CG, Estévez de Jensen C, Rivera-Vargas LI, Rodrigues JCV, Mercado W, Frantz G, Mellinger HC and Adkins S. 2013. First report of Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in tomato, pepper, and Jimsonweed in Puerto Rico. *Plant Health Progress* 14(1):47 <https://doi.org/10.1094/PHP-2013-0812-01-BR>
- Webster CG, Frantz G, Reitz SR, Funderburk JE, Mellinger HC, McAvoy E, Turechek WW, Marshall SH, Tantiwanich, Y, McGrath MT, Daughtrey ML and Adkins S. 2015. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in vegetables in Florida and the southeastern United States. *Phytopathology* 105:388-398. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0172-R>
- Zhao K, Margaria P and Rosa C. 2018. Characterization of the first complete genome sequence of an *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* isolate from the United States and worldwide phylogenetic analyses of INSV isolates. *BMC Research Notes* 11:288 <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3395-5>
- Zhu X, Li X, Chen W, Chen J, Lu W, Chen L and Fu D. 2012. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. *PLoS ONE* 7(8): e44405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044405>



Artículo Científico

Viroma del nopal verdura en la zona centro de México

Candelario Ortega-Acosta, Daniel L. Ochoa-Martínez*, Reyna I. Rojas-Martínez, Cristian Nava-Díaz, Fitosanidad Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 56264. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México; Rodrigo A. Valverde, Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA, 70803, USA. *Autor de correspondencia: ldaniel@colpos.mx

RESUMEN

En este estudio se aprovechó la capacidad de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) para detectar virus conocidos y desconocidos en nopal verdura. Se analizaron muestras de los estados de México (EDMX), Hidalgo y Morelos, así como de la Ciudad de México (CDMX). En la muestra proveniente de EDMX, se detectaron y recuperaron los genomas de *Opuntia virus 2* (OV2, género *Tobamovirus*) y *Cactus carlavirus 1* (CCV-1, género *Carlavirus*). En la muestra proveniente de CDMX, además de OV2 y CCV-1, se detectó un nuevo viroide y un potexvirus. El primero tiene un genoma RNA circular con 412 nt de longitud para el cual se propone el nombre de “*Opuntia viroid I*” (OVd-I). La estructura primaria de este viroide mostró una identidad de secuencia de nucleótidos de menos del 80% con cualquiera de los viroides actualmente conocidos y una relación filogenética con el género *Apscaviroid*, (Familia *Pospiviroidae*) con el que comparte motivos estructurales conservados. El nuevo potexvirus se denominó *Opuntia potexvirus A* (OPV-A), cuya secuencia de la replicasa viral tiene un 77.7% de identidad de aminoácidos con *Schlumbergera virus X*. Finalmente, en 93 (72%) de 129 muestras de nopal verdura recolectadas en las cuatro entidades se detectó al CCV-1.

Palabras claves: Cactáceas, HTS, Viroide, Potexvirus, Tobamovirus, Carlavirus

*Autor de
correspondencia:

Daniel L. Ochoa-Martínez
ldaniel@colpos.mx

Sección:

Número Especial

Recibido: 31 Julio, 2023

Aceptado:

18 Noviembre, 2023

Publicado:

30 Noviembre, 2023

Cita:

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI, Nava-Díaz C y Valverde RA. 2023. Viroma del nopal verdura en la zona centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 41(4): 24-48.
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-2>



Opuntia ficus-indica es la cactácea de mayor importancia económica en el mundo, se cultiva en América, África, Asia, Europa y Oceanía (Barbera *et al.*, 1992). Esta especie fue domesticada en México (Griffith, 2004), país donde se encuentra la mayor diversidad de cultivares (Bravo 1978), y de la cual se utilizan sus frutos y cladodios, dependiendo del cultivar. En México existen aproximadamente 12,618 ha dedicadas para la producción de nopal verdura para consumo humano (SIAP, 2022). Las principales entidades productoras de nopal verdura son el estado de

Morelos y la Ciudad de México, que en conjunto comprenden el 50% de la superficie total cultivada. De los cladodios se obtienen diversos productos y subproductos que se utilizan para elaborar preparaciones antidiabéticas, sus flores son empleadas para preparar bebidas diuréticas, los frutos son usados para preparar jugos, jaleas, miel, mermeladas y pastas, entre otros, y de sus semillas se extrae aceite; además, esta cactácea también se cultiva como hospedante de la “cochinilla” (*Dactylopius coccus*), insecto utilizado para la producción del tinte de ácido carmínico (Barbera *et al.*, 1992).

A nivel mundial se han identificado diferentes virus en cactáceas, la mayoría poseen genoma RNA monocatenario (Sastry *et al.*, 2019). Además, se han descrito dos caulimovirus que infectan *Epiphyllum* spp. (Lan *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020) y tres geminivirus en varias especies de cactus (Fontenele *et al.*, 2020; 2021).

En México, en los municipios de Axapusco, Otumba y San Martín de las Pirámides (estado de México), se reportó al tobamovirus Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV) en plantas de nopal que mostraban manchas pequeñas y anillos amarillos en los cladodios (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a). En esa misma zona, también se encontró al potexvirus Schlumbergera virus X (SchVX) en plantas de nopal que presentaban manchas irregulares y deformación de cladodios (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a). Además, en cladodios de nopal verdura que mostraban síntomas de halos cloróticos y manchas irregulares, se detectaron un tobamovirus y un potexvirus en las localidades de San Martín de las pirámides (Estado de México) y Cuauhtepic de Hinojosa (Hidalgo), respectivamente, de los cuales no se pudo determinar la especie (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007; Alonso-Barrera *et al.*, 2015). Por último, un tobamovirus, denominado *Opuntia virus 2* (OV2), se detectó con secuenciación de alto rendimiento (HTS, high-throughput sequencing) en especies del género *Opuntia* (Salgado-Ortíz *et al.*, 2020) en México.

Otros patógenos de plantas importantes son los viroides, pequeñas moléculas de RNA circular monocatenario de aproximadamente 400 nucleótidos (nt) de longitud que pueden replicarse de forma autónoma. A diferencia de los virus, no hay evidencia de que los viroides codifiquen alguna proteína y que sus genomas estén protegidos por una cápside proteica (Di Serio *et al.*, 2014). Taxonómicamente, los viroides se dividen en dos familias: a) *Pospiviroidae*, que incluye cinco géneros (*Apscaviroid*, *Cocadviroid*, *Coleviroid*, *Hostuviroid* y *Pospiviroid*) y b) *Avsunviroidae* que incluye tres géneros (*Avsunviroid*, *Pelamoviroid* y *Elaviroid*) (Di Serio *et al.*, 2018; 2021). Algunos viroides pueden afectar severamente la producción de diversos cultivos, mientras que otros se replican sin provocar síntomas en plantas susceptibles (Di Serio *et al.*, 2014).

Los avances en el campo de la secuenciación han hecho que las tecnologías basadas en HTS sean más asequibles a un mayor número de usuarios (Vučurović *et al.*, 2021). El empleo de HTS ha revolucionado la virología vegetal y acelerado el descubrimiento de nuevas especies de virus en los ecosistemas, ampliando nues-

tro conocimiento de la diversidad de estos fitopatógenos (Fontenele *et al.*, 2020; Vučurović *et al.*, 2021). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue conocer el viroma del nopal verdura y determinar la distribución de Cactus carlavirus 1 (CCV-1) en cuatro estados productores de nopal verdura en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuenciación de alto rendimiento (HTS). Dos muestras que mostraban síntomas putativos a virus, denominadas CDMX-1 y EM-1 se sometieron a HTS. CDMX-1 estuvo conformada con cladodios (n=4) que presentaban patrones amarillos irregulares, anillos amarillos y mosaico, procedentes de la alcaldía Milpa Alta de la Ciudad de México (Figura 1A-D); la muestra EM-1 (n=1) fue una planta proveniente



Figura 1. Síntomas asociados a virosis en cladodios de nopal verdura. (A-D) Muestras de nopal colectadas en la Ciudad de México, Alcaldía Milpa Alta, (E) Muestra de nopal colectado en el estado de México, Municipio de Otumba, (F) Muestra de nopal sana del estado de México.

de Oxtotipac, Municipio de Otumba, que mostraba un síntoma llamado localmente por los productores “pinto” consistente en manchas cloróticas alrededor de las espigas (Figura 1E). En ambos casos, se extrajo RNA con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra EM-1 se envió a MacroGen Inc. (Corea) en donde se preparó la librería usando TruSeq stranded total RNA con Ribo-Zero Plant. La secuenciación se realizó en un equipo Illumina NovaSeq6000, con 150-bp PE. La muestra CDMX-1 se envió a BGI Genomics (China), donde se construyó la librería Eukaryotic Strand-specific mRNA y la secuenciación se realizó en la plataforma DNBSEQ, con 150-bp PE.

Análisis bioinformático. Los adaptadores y las secuencias de baja calidad de los datos obtenidos de MacroGen fueron removidos usando Fastp (Chen *et al.*, 2018). Por su parte, las secuencias de BGI, se recibieron limpias y sin adaptadores, por lo cual se verificaron en FastQC (Andrews 2010). Las lecturas limpias fueron ensambladas *de novo* con el software SPAdes (Prjibelski *et al.*, 2020). Los contigs obtenidos fueron sometidos a una búsqueda BLASTx y BLASTn en una base de datos local de virus/viroides. Posteriormente, la lista reducida de hits virales se comparó con la base de datos completa no redundante (nr) del GenBank utilizando BLASTx y BLASTn (Vučurović *et al.*, 2021).

Para la reconstrucción de los genomas, se utilizó Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012), Samtools (Li *et al.*, 2009) e Integrative Genomic Viewer (IGV) versión 2.3 (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013). Las características del ensamble de los genomas obtenidos se obtuvieron en Qualimap (Okonechnikov *et al.*, 2016), donde se calculó la cobertura promedio por nucleótido de cada genoma. Finalmente, los genomas obtenidos se anotaron con ORFinder (NCBI) y se depositaron en el GenBank.

Análisis filogenético. Los genomas obtenidos se alinearon con especies representativas del género *Tobamovirus* obtenidas en la base de datos del NCBI. Se utilizó el modelo GTR+F+R5 de sustituciones de nucleótidos. Por otro lado, se elaboró un árbol filogenético alineando secuencias de genomas completos de miembros representativos del género *Carlavirus* (familia: *Betaflexiviridae*), obtenidos del NCBI, así como con un aislamiento del virus obtenido en este estudio. El modelo evolutivo estimado fue GTR+F+R5. Para el caso de nuevos virus, se construyeron dos árboles filogenéticos alineando secuencias de aminoácidos de la replicasa viral y de la cápside proteica pertenecientes a diferentes especies de la familia correspondiente obtenidas del ICTV (Kreuze *et al.*, 2020) y la secuencia obtenida en este estudio. El modelo evolutivo para la replicasa viral fue LG+F+R7 y para la cápside proteica LG+F+R5. Para el análisis filogenético del nuevo viroide, se utilizaron secuencias de especies representativas de ambas familias de estos patógenos obtenidas del NCBI y el modelo evolutivo utilizado fue HKY+F+G4.

En todos los casos, los árboles se generaron con el método de Máxima Verosimilitud utilizando IQTREE 2 (Minh *et al.*, 2020), el alineamiento múltiple de secuencias en MAFFT (Kato, *et al.*, 2019), y el modelo evolutivo según el Criterio de Información Bayesiano implementado en ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). El soporte nodal se estimó con el bootstrap ultrarrápido (UFBoot) ejecutando un total de 1000 réplicas. Finalmente, la visualización y edición de los árboles se realizó en iTOL (Letunic y Bork 2021).

Análisis de identidad por pares. Para reforzar la clasificación de las nuevas especies, se estimó la identidad por pares con SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014) comparando la replicasa y cápside proteica de los virus más cercanos, así como de diferentes genomas de la familia *Pospiviroidae* para el caso del viroide.

Predicción de estructura secundaria del nuevo viroide. Se obtuvo utilizando el servidor web UNAFold (www.mfold.org consultada el 18 de noviembre de 2022) (Zuker, 2003).

Validación de la detección de los nuevos virus y viroide. Parte del RNA extraído de los cladodios con síntomas que se envió a HTS, se sometió a RT-PCR para confirmar la presencia del viroide y virus encontrados. Se diseñaron diferentes iniciadores (Cuadro 1) a partir de las secuencias obtenidas. Adicionalmente, se realizaron análisis de RT-PCR para la detección de uno de los virus en cuatro muestras independientes recolectadas en la Ciudad de México (n=1, asintomática), estado de México (n=2), Hidalgo (n=2) y Morelos (n=2).

En todos los casos, la síntesis de cDNA se realizó con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200U/μL) (Promega, USA) a partir de 1 μL de RNA total y 1 μL (10 mM) del iniciador antisentido, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se utilizó como cadena molde para la PCR cuya mezcla consistió en 2 μL de amortiguador de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 μL de MgCl₂ (25 mM), 0.2 μL de dNTPs Mix (10 mM), 0.6 μL (10 μM) de cada iniciador, (sentido y antisentido) 4.9 μL de agua ultrapura, 0.1 μL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/μL) (Promega, USA) y 1 μL de cDNA en un volumen final de 10 μL. Las condiciones de PCR incluyeron una incubación inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 40 s y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se secuenciaron por el método Sanger en Macrogen Inc.

Detección de CCV-1. Se analizaron mediante RT-PCR 129 muestras provenientes de cladodios recolectados de los estados de México, Hidalgo, Morelos y Ciudad de México para la detección de CCV-1 con los oligonucleótidos CCV1-F/R con la finalidad de conocer su presencia o ausencia.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en los ensayos de RT-PCR para la validación de los virus/viroide detectados en los datos de HTS de las dos bibliotecas de nopal.

Nombre del iniciador	Virus/Viroide (Región)	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
OV2-F	Opuntia virus 2 (Proteína de movimiento)	CGG GTC CTT TTC CTT TTG TCT GTC	667	55
OV2-R		GAGAGCGAGTAGAAACTCCAACG		
CCV1-F	Cactus carlavirus 1 (Replicasa viral)	GAAGCGCATGGGCTGTATTG	459	55
CCV1-R		GTCTGCGCAGCTTTAGCATC		
Opuntia_Potex-F(RdRp)	Opuntia potexvirus A (Replicasa viral)	ACCCACTAGCCATTGAAGCC	580	55
Opuntia_Potex-R(RdRp)		AGGTGGTTGGCACCTTTTGA		
Caulimovirus_F	Caulimovirus (Retro transcriptasa)	TCCTCACACTAGTCTGCT	846	55
Caulimovirus_R		TTGAGGACGGCACTCCAATG		
Alphavirus-F(RdRp)	Alphavirus (Cápside)	CACTGGCGTGTTTTAGCCAC	579	55
Alphavirus-R(RdRp)		TCAGCCTCCAGCCACAAAAT		
Tymovirus-F	Tymovirus (Proteína del triple bloque de genes)	CTGGAGCGCCTTGGAATAA	745	55
Tymovirus-R		TTTGCCAACCTCACCATGA		
Vityvirus-F	Vityvirus (Proteína de movimiento)	GAACTGCTTGATATGCGCCG	229	55
Vityvirus-R		CCTGACGGACCACACTCATC		
Banmivirus_Opun-F	Banmivirus (Replicasa viral)	CAGAGCGCCAATTAACCTGC	707	55
Banmivirus_Opun-R		CGCTCTTGAAGGTTAGCCCA		
OPV-I-1F	Opuntia viroid I (Parte del genoma)	TTGACCTAGGTTGGCTCTCG	362	55
OPV-I-1R		GCAGGAGAAGGCCAGGAAG		
OPV-I-2F	Opuntia viroid I (Parte del genoma)	GGGATCAACCTTGTGGTTTCT	351	55
OPV-I-2R		GAAAGAAAAGCACCTGTGGGC		

Microscopía electrónica de transmisión. Con el propósito de conocer si se encontraban viriones de los virus determinados en los resultados de HTS, plantas de nopal sintomático fueron utilizadas para preparar rejillas de cobre de 300 mallas cubiertas con Formvar para su observación. Para esto, se realizó la técnica “leaf dip” y se utilizó ácido fosfotúngstico 2% como contrastante. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G² Spirit TWIN, de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

RESULTADOS

Detección de virus por HTS. Se obtuvieron 32,921,232 lecturas en la muestra EM-1 y 48,292,940 lecturas para la muestra CDMX-1. Las lecturas sin procesar se depositaron en el NCBI con el número de bio-proyecto PRJNA922236. El análisis de estas lecturas mostró la presencia de secuencias de diferentes virus y un viroide en nopal (Cuadro 2), los cuales se describen a continuación:

Cuadro 2. Comparación del genoma completo o parcial de los virus encontrados por HTS en las dos bibliotecas de nopal, con la secuencia de referencia más similar del GenBank.

Muestra	Aislamiento de Virus detectado/Viroide	Número de acceso GenBank	Parte del genoma	Número de acceso de la secuencia de referencia	Porcentaje de similitud de nucleótido
EM-1	CCV-1-Edo-MeX	OQ240442	Completo	KU854930.4	87.71
	OV2-Edo-Mex	OQ240440	Completo	NC_040685.2	97.67
CDMX-1	CCV-1-CD-MX	OQ240444	Parcial	KU854930.4	97.5
	OV2-CDMX	OQ240441	Completo	NC_040685.2	97.61
	Opuntia virus A	OQ240443	Completo	LC654699.2	74.42
	Opuntia viroid I	OQ240445	Completo	X95292.1	88.52*

*Cobertura de consulta 14%

Opuntia virus 2. Se detectó y confirmó su presencia en las dos muestras sometidas a HTS, obteniendo dos genomas completos denominados OV2-Edo-Mex y OV2-CDMX; la cobertura promedio por nucleótido fue de 634,104.1X y 500.5X, respectivamente (Figura 2A, 3A). El genoma OV2-Edo-Mex de 6453 nt tiene la

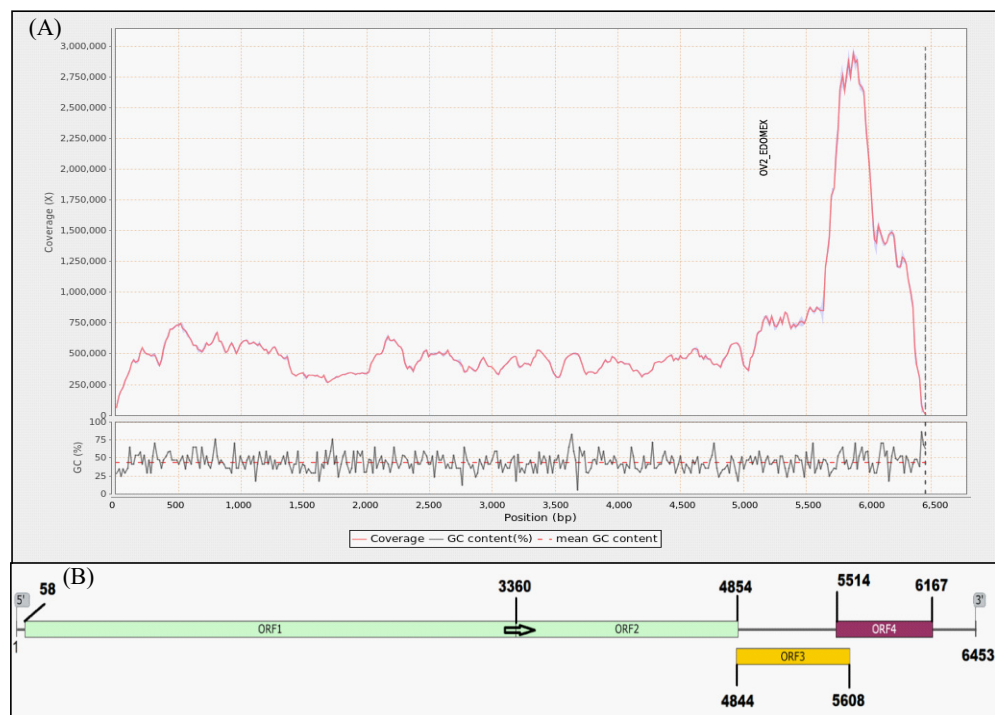


Figura 2. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento OV2-Edo-Mex y porcentaje del contenido de guanina citosina, (B) Mapa genómico del OV2-Edo-Mex. La flecha indica el sitio del codón de terminación de la proteína de 128 kDa completa, con fugas de lectura

organización típica de los tobamovirus (Figura 2B) con una región no traducible (UTR) 5' (nt 1-57), un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la replicasa viral (RdRp) de 183 kDa (nt 58 -4854), metiltransferasa/helicasa de 128 kDa (nt 67-3360), una proteína de movimiento (MP) (nt 4844-5608), cubierta proteica (CP) (nt 5514-6167) y la UTR 3' (nt 6168-6453). El genoma de OV2-Edo-Mex tiene una identidad de nucleótidos del 97.6% con el aislamiento NC_040685.2 de OV2 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultado del análisis Blastx de virus potencialmente presentes en la biblioteca CDMX-1 y confirmación por RT-PCR y secuenciación.

Virus	Longitud del contig	Número de acceso de la secuencia de referencia	Porcentaje de identidad (cobertura de consulta)	Parte del genoma	Confirmación por RT-PCR	Confirmación por secuenciación Sanger
Caulimovirus	3168	QYR69113.1	47.14 (51)	Putativa replicasa viral	+	+
Vityvirus	1242	AVL25840.1	52.21 (64)	Proteína de movimiento	+	+
Alphavirus	2932	QYD13417.1	75 (27)	Cápside proteica	-	-
Bammivirus	2110	UUL90866.1	39.75 (99)	Replicasa viral	-	-
Betaflexiviridae (Tymovirales)	1096	AZM69108.1	36.36 (52)	Proteína 1 del bloque de tres genes	-	-

+ = Positivo; - = Negativo

El genoma del aislamiento OV2-CDMX tuvo una longitud de 6453 nt, con una organización típica de tobamovirus (Figura 3B) consistente en una región 5' no traducible (nt 1-61), un ORF que codifica la RdRp de 183 kDa (nt 62-4858), metiltransferasa/helicasa de 128 kDa (nt 62-3364), MP (nt 4848-5612) y CP (nt 5632-6171) así como una UTR 3' (nt 6172-6453). La secuencia del genoma de este aislamiento compartió una identidad de nucleótidos del 97.61% con el aislamiento NC_040685.2 de OV2 (Cuadro 3). El análisis filogenético ubicó a ambos aislamientos de OV2 obtenidos en este estudio, en el subgrupo de tobamovirus que infectan cactáceas (Figura 4).

Cactus carlavirus 1 (CCV-1). Este virus se detectó en las dos muestras que se sometieron a HTS. Sin embargo, el genoma completo solo se recuperó en la muestra del Estado de México. El genoma obtenido estuvo soportado por una cobertura promedio por nucleótido de 15,516X (Figura 5A). La organización del genoma de CCV-1 es similar a la de otros carlavirus conocidos, con seis ORFs (Figura

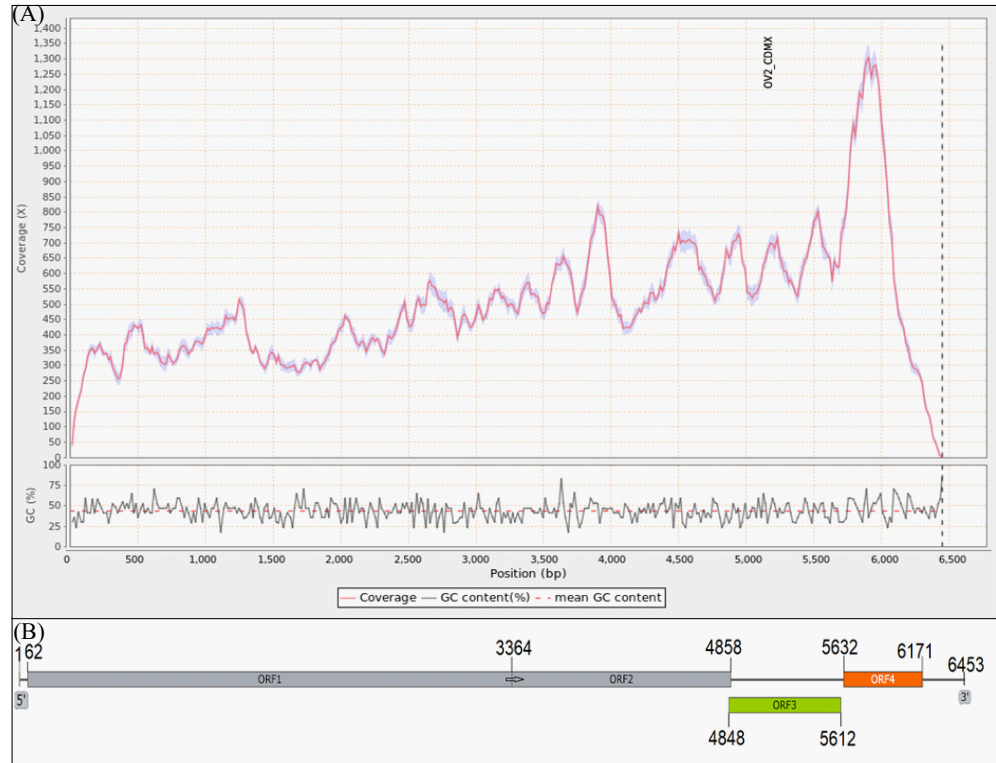


Figura 3. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento OV2-CDMX y porcentaje del contenido de guanina citosina (B) Mapa genómico de OV2-CDMX. La flecha indica el sitio del codón de terminación de la proteína de 128 kDa completa, con fugas de lectura.

Tree scale: 1

Hospedante natural	
■	Cactaceae
■	Malvaceae
■	Fabaceae
■	Passifloraceae
■	Apocynaceae
■	Cucurbitaceae
■	Solanaceae
■	Brassicaceae

bootstrap	
●	70
●	77.5
●	85
●	92.5
●	100

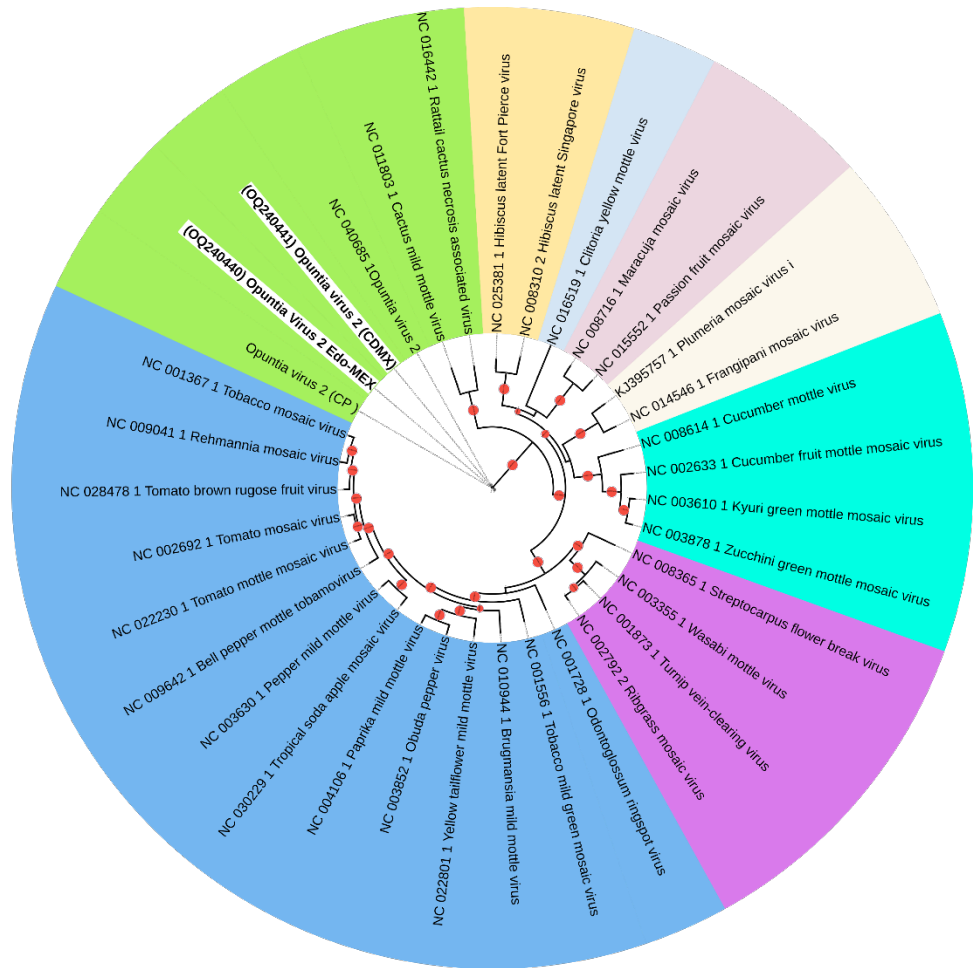


Figura 4. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud del género *Tobamovirus* que muestra las relaciones entre los genomas obtenidas en este estudio (en negrita) del OV2 y la de aislamientos previamente reportados. Los diferentes colores representan las familias botánicas como hospedantes naturales donde se ha reportado cada virus. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 70%.

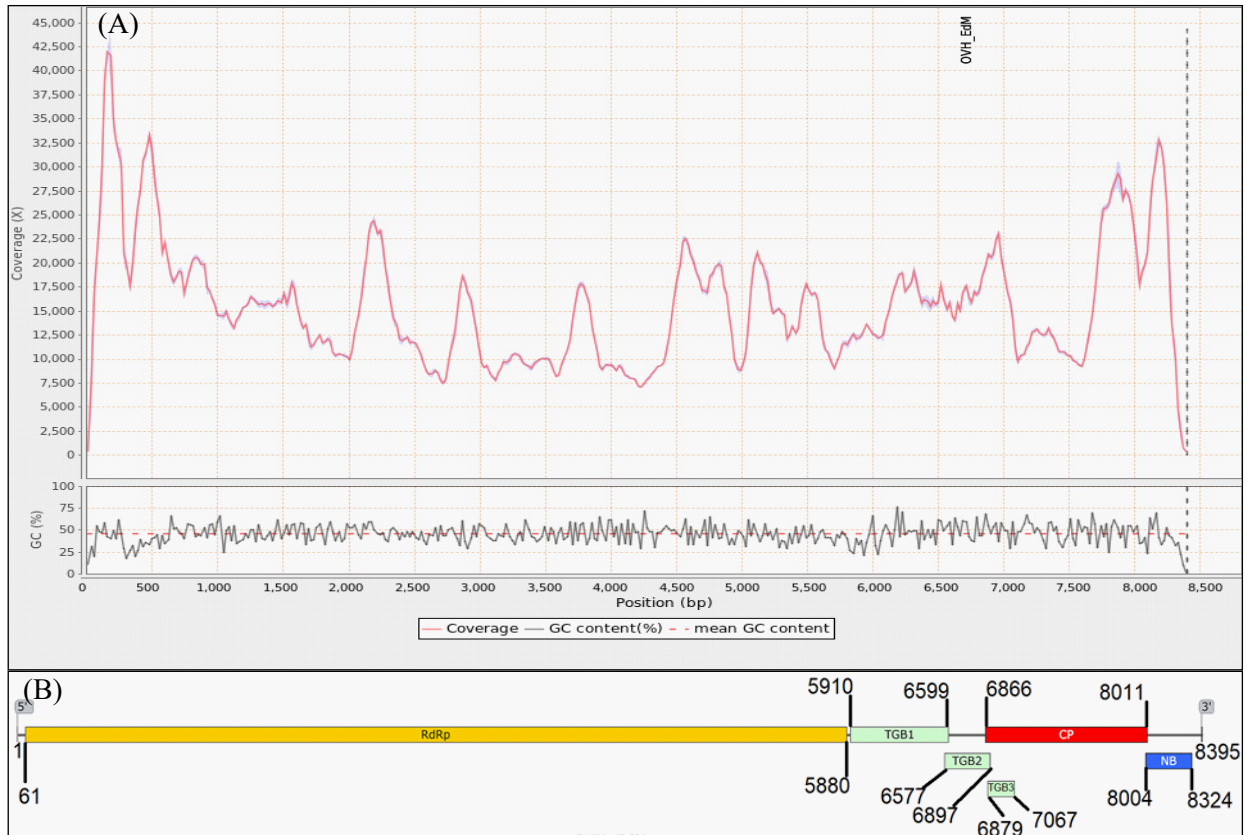


Figura 5. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento CCV-1-Edo-Mex y porcentaje del contenido de guanina citosina, (B) Organización del genoma de CCV1-Edo-Mex, que muestra seis marcos de lectura abiertos y sus productos correspondientes. RNA-dependiente RNA-polimerasa, (RdRp); cubierta proteica, (CP); proteína de unión al ácido nucleico, (NB); bloque de tres genes, (TGB).

5B): el ORF1 (nt 61-5,880) codifica una poliproteína (220 kDa) involucrada en la replicación viral; ORF2 (TGB1) (nt 5,910-6,599), ORF3 (TGB2) (nt 6,577-6,897) y ORF4 (TGB3) (nt 6,879-7,067) codifican tres proteínas de 26 kDa, 11 kDa y 7 kDa, respectivamente, que son las proteínas del triple bloque de genes (TGB) asociadas al movimiento de célula a célula ‘tipo potex’ (Morozov y Solovyev, 2003); ORF5 (nt 6,866-8,011) codifica una proteína con un dominio de cubierta proteica (CP) típica de carlavirus y un dominio Flexi_CP; ORF6 (nt 8004-8324) codifica una proteína de unión a ácidos nucleicos (NB) de 12 kDa; y por último las regiones UTR 5’ (nt 1-60) y 3’ (8325-8395). El análisis filogenético agrupó al CCV-1-Edo-Mex, junto a los dos únicos genomas que se tienen disponibles en el GenBank de este virus (Figura 6) con un porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos del 87.86 y 90.41%.

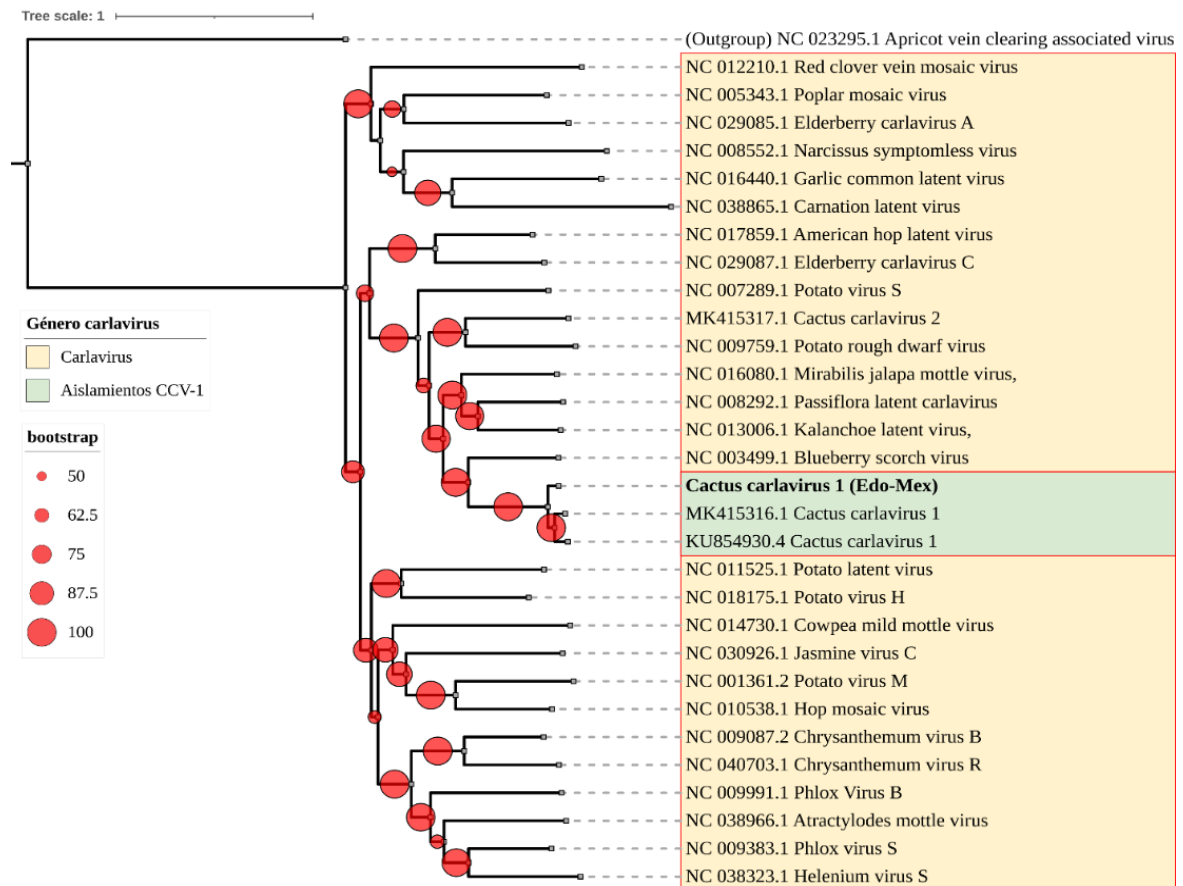


Figura 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de genomas completos de secuencias de nucleótidos de CCV-1 de este estudio (en negrita), así como otros aislamientos, y diferentes especies del género *Carlavirus*. Como grupo externo se utilizó al Apricot vein clearing associated virus, género *Prunivirus*. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 50%.

Opuntia potexvirus A (OPV-A). En la muestra compuesta de la Ciudad de México se detectó un contig de 6,671 nt, que en la búsqueda BLASTx tuvo 77.5% de identidad con Schlumbergera virus X (SchVX). La inspección adicional de la transcripción del genoma viral y la curación mediante el mapeo iterativo de las lecturas filtradas dio como resultado una secuencia viral consolidada de 6,644 nt respaldada por 10,536,601 lecturas con una cobertura promedio por nucleótido de 238,206.9X (Figura 7A). El genoma se encuentra organizado en cinco ORFs (Figura 7B). Al igual que otros potexvirus, el ORF1 (nt 85–4737) codifica la replicasa viral que consta de 1550 aminoácidos (aa). Asimismo, posee un conjunto de tres ORFs parcialmente superpuestos: ORF2 (4737–5426 nt), ORF3 (5389–5721 nt) y ORF4 (5651–5842 nt), que muestran la configuración típica del bloque de tres genes (TGB) de los potexvirus. El ORF5 (5854–6531 nt) codifica la proteína de la cápside (CP). Finalmente, se detectaron las regiones UTR de 84 y 113 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente.

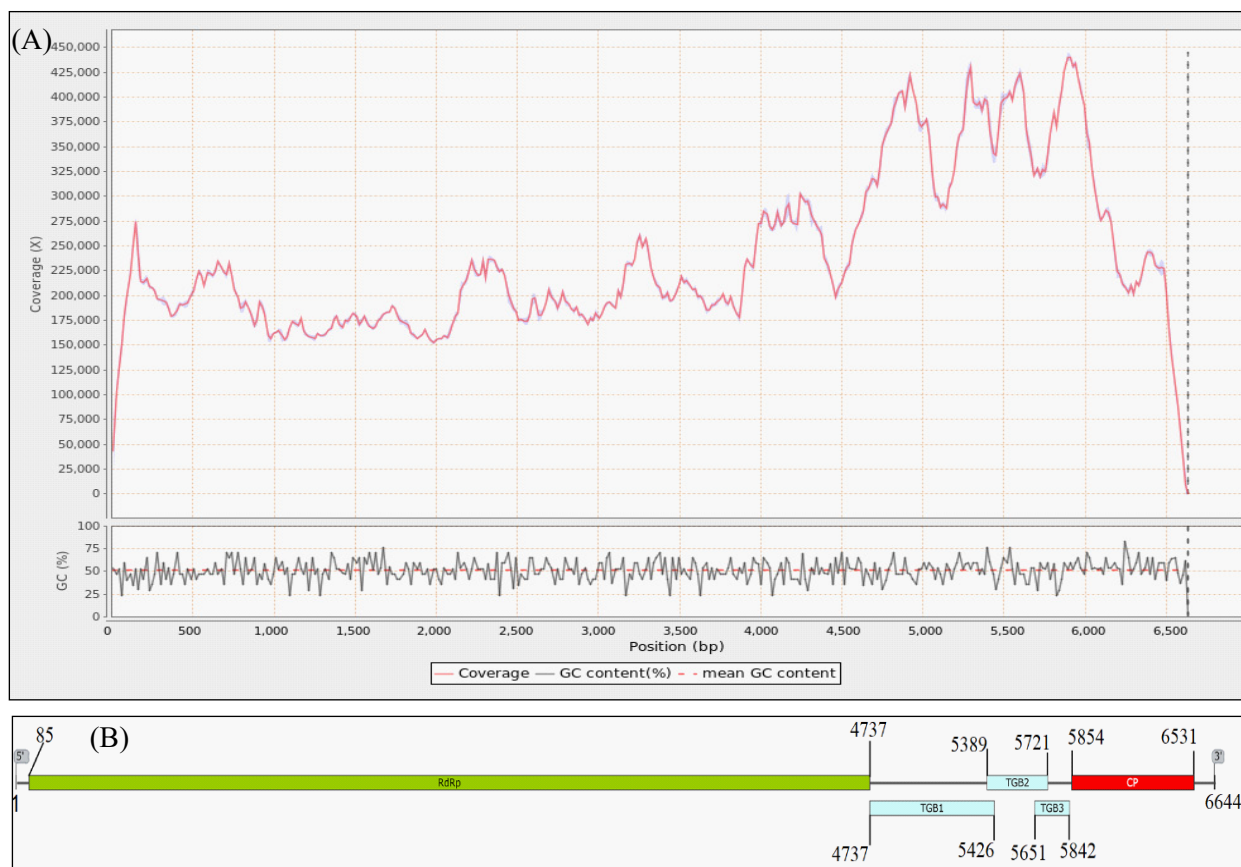


Figura 7. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma de Opuntia potexvirus A (OPV-A) y porcentaje de guanina/citosina, (B) Organización del genoma de OPV-A, que muestra cinco marcos de lectura abiertos y sus productos correspondientes: RdRp, replicasa viral; TGB, bloque de tres genes. CP, cubierta proteica.

Los motivos conservados de aa QDGAML, HQQAKDE y TFDANTE se identificaron en la región C-terminal de la replicasa viral (Van der Vlugt y Berendsen 2002). Por otra parte, un dominio replicasa catalítico, que contiene el motivo central de consenso característico TGX3TX3NTX22GDD encontrado en potexvirus (Martelli *et al.*, 2007), estaba presente cerca del extremo C de la replicasa. También, se encontró el motivo hexanucleótido 5'-GGAAA-3', en el extremo 5'-UTR, el cual se tiene presente en algunos potexvirus (Chen *et al.*, 2005), al igual que una putativa señal de poliadenilación en el extremo 3'-UTR.

La comparación por pares reveló identidades a nivel de aminoácidos que oscilaron del 59.8 al 82.2% para la CP, y del 53.6 al 77.7% para la replicasa viral (Figura 8a, b). El criterio de demarcación de especies para potexvirus, establece que especies distintas tienen <72% nt o <80% aa de identidad para los genes de la replicasa o cubierta proteica, respectivamente (Adams *et al.*, 2004). Por lo anterior, el virus

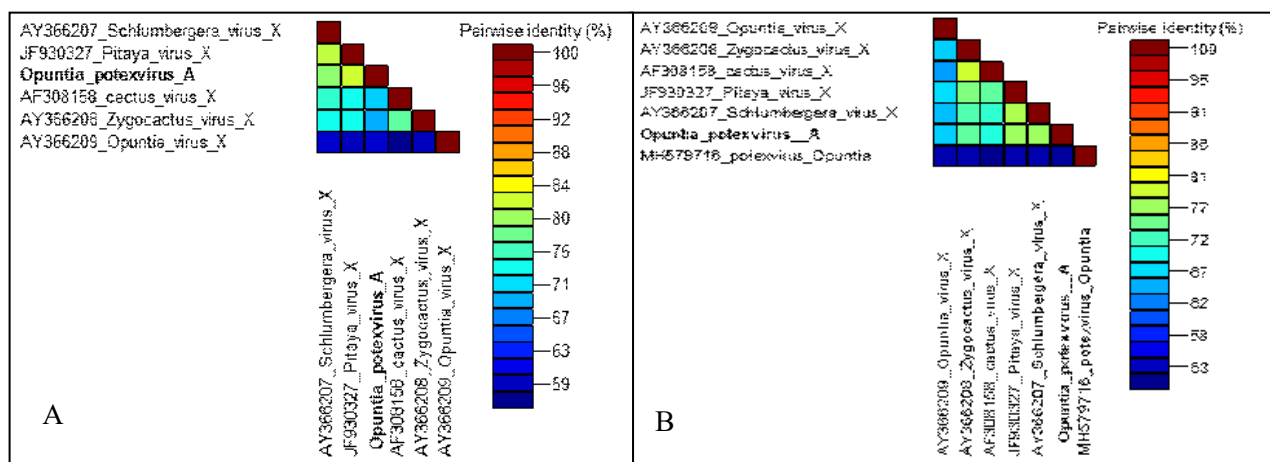


Figura 8. Matriz de identidad del porcentaje de aminoácidos de la cápside proteica (A) y la replicasa viral, (B) de las especies del género *Potexvirus* más cercanas al *Opuntia potexvirus A* (en negrita).

detectado en nopal se considera una nueva especie del género *Potexvirus* para el cual se propone el nombre de “*Opuntia potexvirus A*” (OPV-A). La secuencia del genoma de OPV-A se depositó en el GenBank con el número de acceso OQ240443.

Los árboles filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos de la replicasa viral y cubierta proteica de los virus pertenecientes a la familia *Alfavirusidae* muestran que OPV-A se agrupa con los potexvirus: Pitaya virus X (PiVX), Zygocactus virus X (ZyVX), Cactus virus X (CVX), SchVX y Opuntia virus X (OpVX), en un clado altamente respaldado (Figura 9 y 10).

Opuntia viroid I. En la muestra CDMX-1 se encontró un contig similar al de los viroides de la familia *Pospiviroidae*, al cual se denominó “Opuntia viroid I” (OVd-I). Los resultados del análisis BLASTn mostraron una similitud con Columnnea latent viroid-B, con 14% de cobertura de consulta y un E value = 4e-08. Para determinar el género al que pertenece el OVd-I, se realizó la inspección manual y curado de la secuencia. Se obtuvo un contig final de 412 pb con el cual se realizó un mapeo en los datos de HTS corroborando su presencia, con una cobertura promedio por nucleótido de 1,492X. La confirmación de OVd-I se realizó por RT-PCR y secuenciación Sanger.

La predicción de la estructura secundaria del OVd-I, mostró una molécula en forma de bastón con una región central conservada (CCR) (Figura 11), criterio principal para clasificar a un viroide como nuevo miembro de la familia *Pospiviroidae*. La presencia de la CCR y de una región conservada terminal (TCR) se tomaron en cuenta para ubicar al OVd-I dentro del género *Apscaviroid* (Di Serio *et al.*, 2014). En la TCR no se detectaron cambios, sin embargo, en la CCR superior se detectaron cinco cambios (T/G,T/C,T/G,A/G,G/C) y en la CCR inferior se detectaron seis cambios (G/T,T/C,G/C,C/A,G/C,A/C) debidos probablemente a la divergencia del OVd-I con el género *Apscaviroid*.

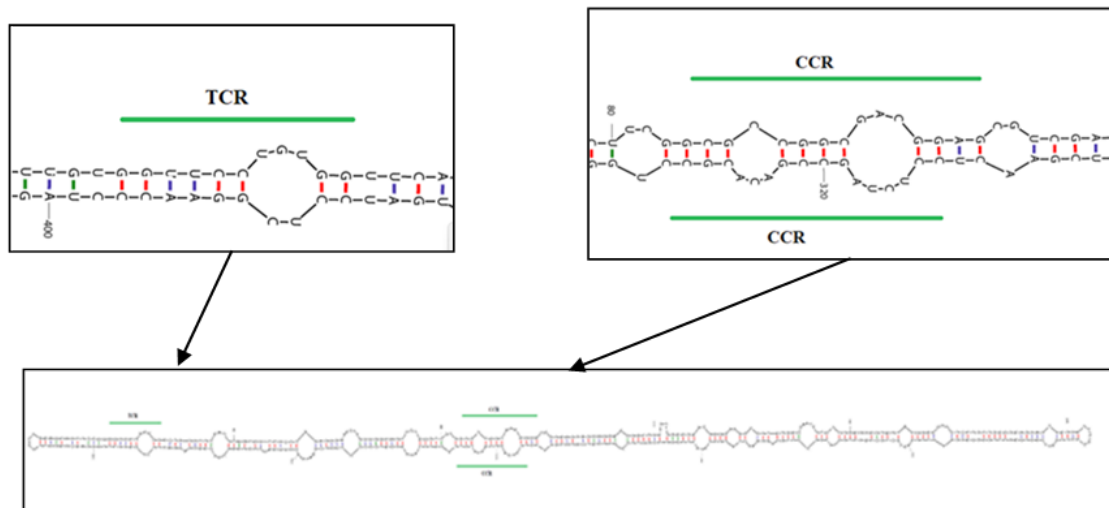


Figura 11. Estructura secundaria predicha utilizando el servidor web UNAFold (Herramienta UNAFold disponible online: www.mfold.org) para OVd-I. Se resaltan los sitios que forman la región conservada terminal (TCR) en las posiciones 16 a 26 y la región conservada central (CCR) en las posiciones 84 a 100 y 313 a 329.

Los resultados del análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (Figura 12) ubicaron al OVd-I en el clado del género *Apscaviroid* de la familia *Pospiviroidae*. El análisis SDT, basado en comparaciones por pares, muestra que ninguna de las secuencias de viroides analizadas presenta más del 80% de similitud con el genoma de OVd-I (Figura 13). Finalmente, OVd-I se detectó en las cuatro muestras independientes de la Ciudad de México y en una muestra del estado de Morelos.

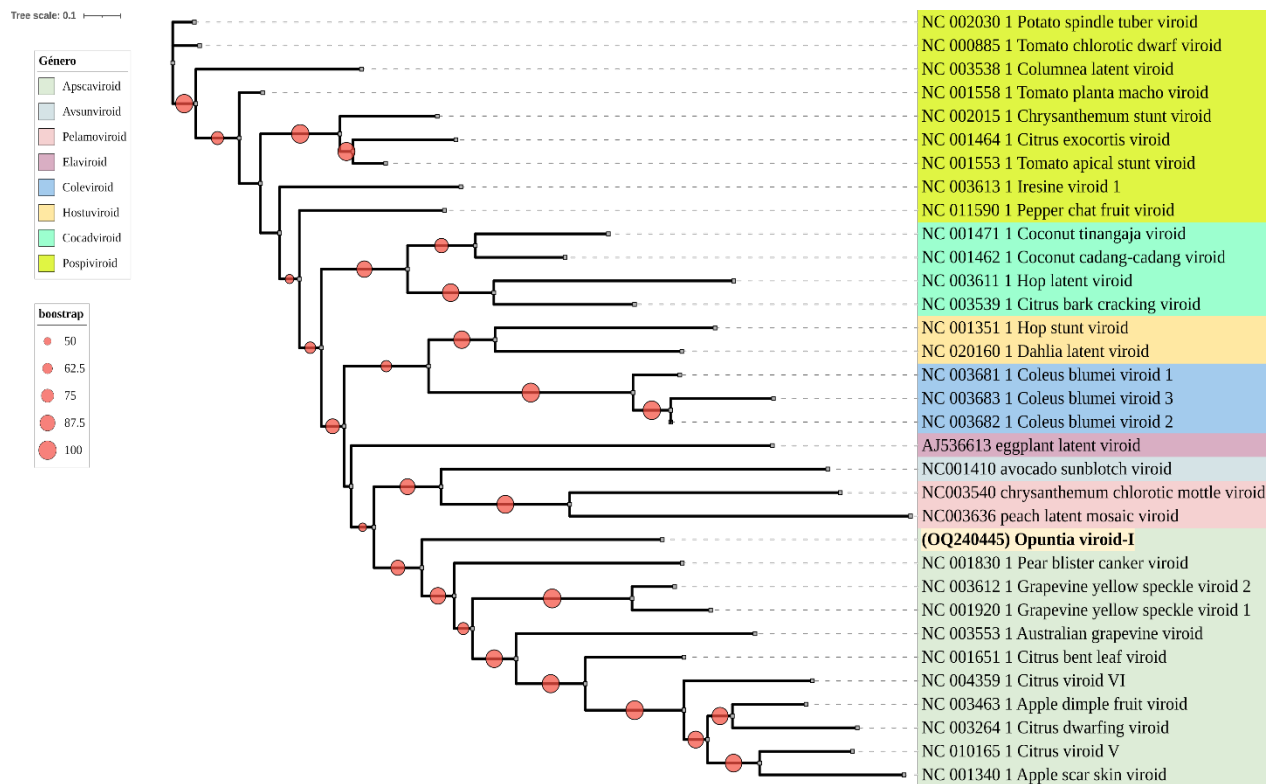


Figura 12. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae* basado en secuencias de nucleótidos de genomas completos de las especies representativas de los diferentes géneros. La secuencia obtenida del OVd-I se encuentra en negrita. Los diferentes colores representan los géneros de viroides. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 50%.

Otros virus detectados. Adicionalmente, en la muestra CDMX-1 se detectaron contigs virales adicionales (Cuadro 4). Sin embargo, solo se confirmó un caulimovirus y un vityvirus por RT-PCR. Por lo tanto, es necesario continuar con trabajos adicionales que permitan recuperar los genomas completos de estas potenciales nuevas especies de virus.

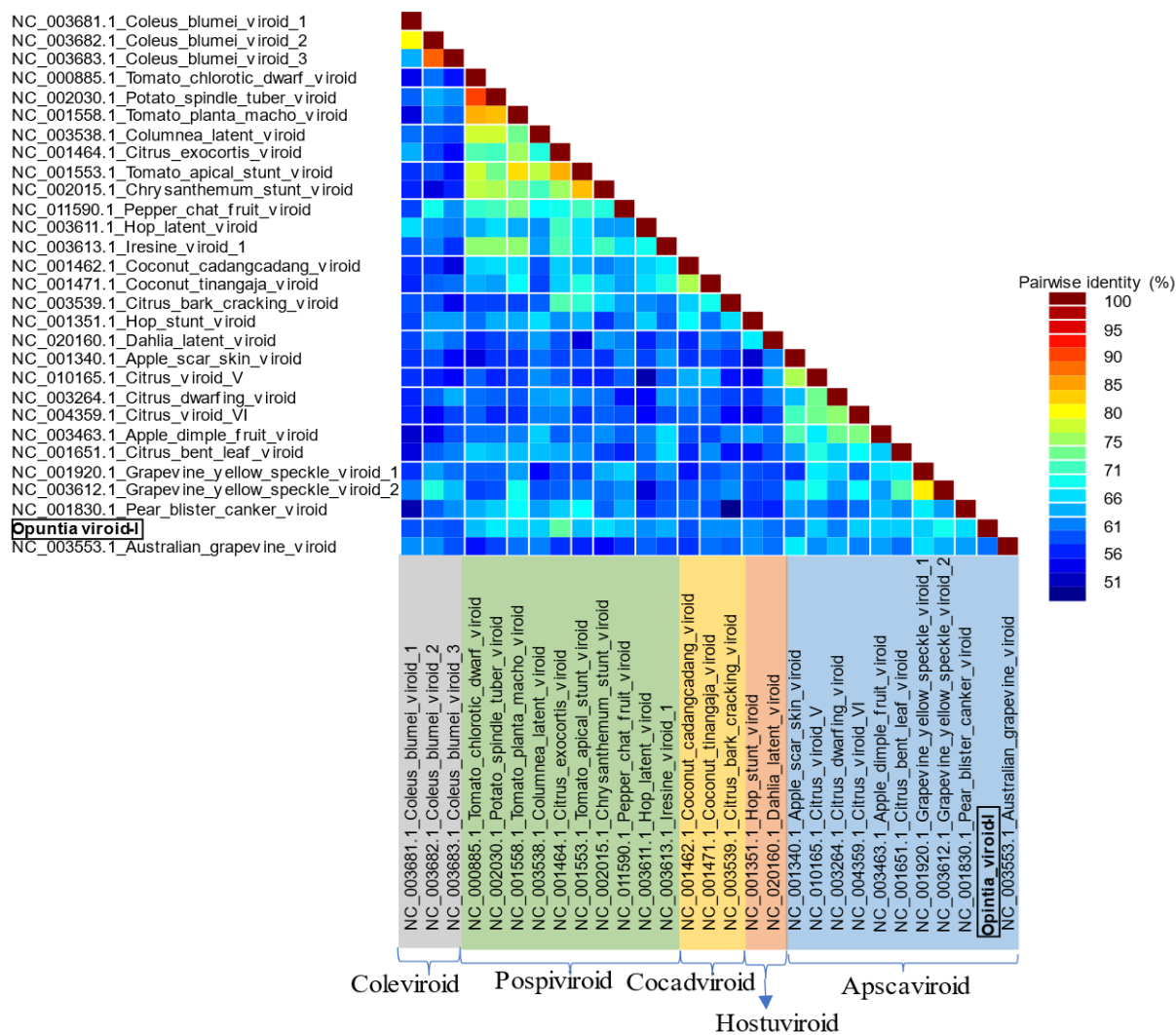


Figura 13. Distribución de frecuencia de identidades por pares obtenida con la herramienta de demarcación de secuencias SDT (Muhire *et al.*, 2014) a partir de secuencias de genomas completos de especies de la familia *Pospiviroidae* para respaldar la demarcación del *Opuntia viroid I*, como una nueva especie.

Cuadro 4. Detección de CCV-1 en cuatro estados productores de nopal verdura en México.

Estado	Muestras analizadas	Muestras positivas a CCV-1 (%)
Estado de México	24	22 (91)
Morelos	26	16 (64)
Hidalgo	24	10 (41)
CDMX	55	45 (81)
Total	129	93 (72)

Detección de CCV-1. Se detectó en las cuatro entidades en estudio en el 72% de muestras analizadas (Cuadro 4); se trata del primer reporte de la presencia de CCV-1 en plantaciones comerciales de nopal verdura en México.

Microscopía electrónica. En las muestras analizadas se observaron viriones de diferentes tamaños y formas (Figura 14). Se observaron partículas en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, típicas de tobamovirus. Asimismo, se encontraron viriones en forma de varilla flexible, con una longitud promedio de 700 nm y 15 nm de diámetro, las cuales podrían pertenecer al CCV-1. También se observaron partículas virales flexibles de aproximadamente 500 nm de longitud.

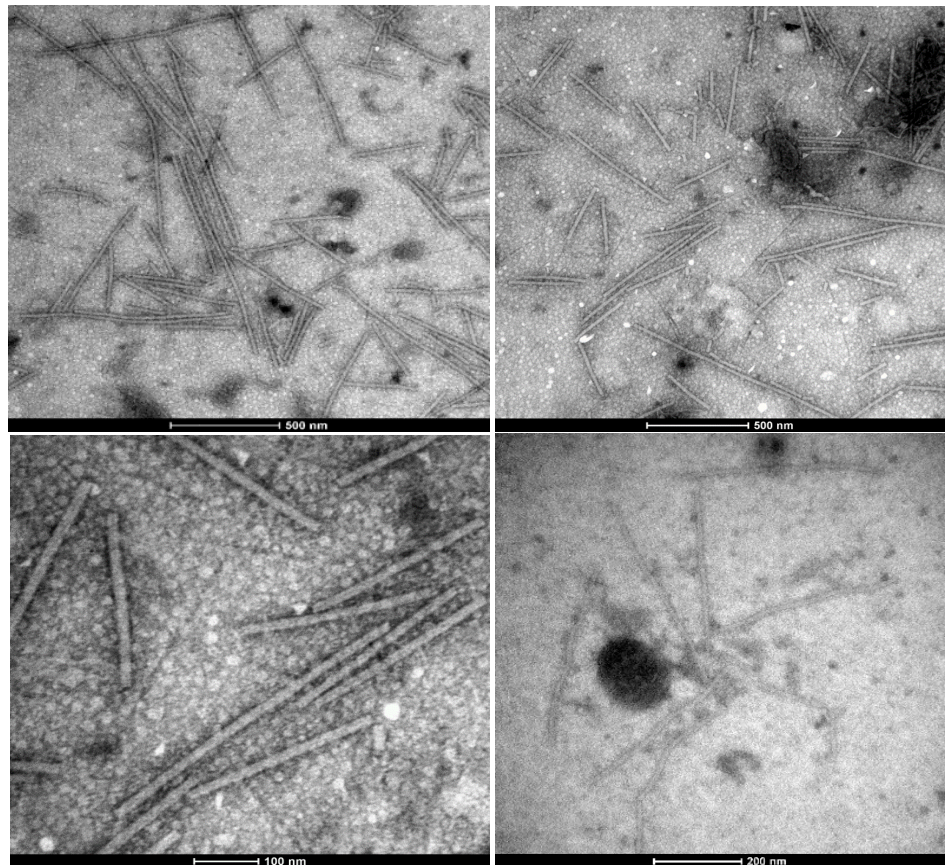


Figura 14. Partículas virales de diferentes formas y tamaños observadas por microscopía electrónica de transmisión en plantas de nopal sintomático utilizando la técnica “leaf dip”.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) ha permitido el descubrimiento de nuevas especies virales (Maliogka *et al.*, 2018; Villamor *et al.*, 2019), y con ello también se ha evidenciado la complejidad de los viomas (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Vučurović *et al.*, 2021).

En México se han realizado investigaciones para conocer los virus asociados al nopal con síntomas putativos a virosis. Sin embargo, con el uso de técnicas convencionales como RT-PCR, ELISA, microscopía electrónica de transmisión e indexado biológico, en varias investigaciones no fue posible determinar al (los) virus asociado(s), debido a las características y limitaciones que presentan estas técnicas (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007; De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a; De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016b; Alonso-Barrera *et al.*, 2015). Con el uso de HTS es posible determinar la presencia de todos los virus (conocidos o desconocidos) en una muestra, característica que otras técnicas no poseen. Así, por ejemplo, con esta técnica se logró la detección de un nuevo tobamovirus (OV2) en una muestra compuesta de RNA extraído de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* recolectadas en el estado de México (Salgado-Ortiz *et al.*, 2020).

En este estudio se conoce por primera vez el viroma del nopal verdura cultivado en la zona centro de México, constituido por tres virus (dos nuevos, del género *Potexvirus* y *Carlavirus*) y un viroide (género *Apscaviroid*).

Opuntia potexvirus A (OPV-A) se propone como un nuevo miembro de la familia *Alphaflexiviridae*, género *Potexvirus*, con base en los criterios de demarcación de especies para este género (Jan *et al.*, 2020). Los potexvirus tienen partículas elongadas de aproximadamente 700 nm de longitud, infectan hospedantes herbáceos, no tienen vectores conocidos y se transmiten principalmente de manera mecánica (Jan *et al.*, 2020). Filogenéticamente el OPV-A se encuentra estrechamente relacionado con PiVX y SchVX que infectan naturalmente cactáceas (Figura 17 y 18).

Recientemente, en cactáceas ornamentales se reportaron los potexvirus CVX, OpVX, PiVX, SchVX y ZyVX, en infección única o mixta, de hasta cuatro de ellos (CVX, PiVX, SchVX y ZyVX) en una planta (Park *et al.*, 2021). Adicionalmente se informó que la cactácea *Notocactus leninghausii f. cristatus*, puede estar coinfectada hasta con seis virus, cuatro potexvirus (CVX, PiVX, SchVX y ZyVX) y dos tobamovirus (CMMoV y RCNaV) (Park *et al.*, 2018). Estos reportes muestran que las cactáceas son hospedantes naturales de los potexvirus y tobamovirus. Sin embargo, los síntomas que causan de manera individual aún no se han descrito claramente ni se conoce su gama de hospedantes. Por lo anterior, en estudios posteriores tendrá que abordarse la caracterización biológica del potexvirus detectado en este estudio, para determinar, entre otras cosas, si representa un riesgo para la producción de nopal en México.

En el análisis de HTS, el CCV-1 se detectó en las muestras de la Ciudad de México y del Estado de México. Sin embargo, el genoma completo solo se recuperó en los cladodios recolectados en este último. La detección del genoma parcial en la muestra de la Ciudad de México, probablemente se deba a que el OPV-A y el OV2 suprimieron la replicación del CCV-1, por lo tanto, el número de secuencias obtenidas para este virus no cubrió la totalidad del genoma. El CCV-1 aislado del Estado de México, se agrupó en el mismo clado del aislamiento MK415316.1 reportado en Estados Unidos y una secuencia de México (KU854930.4) pero en una rama distinta. Este virus se detectó en las cuatro entidades muestreadas (Cuadro 5) tanto en plantas con síntomas de virosis como en plantas asintomáticas, en este último caso solamente en los estados de Hidalgo, Morelos y Ciudad de México. Se sabe que los carlavirus se transmiten por pulgones de forma no persistente, o por moscas blancas, infectan predominantemente plantas herbáceas y muchos de ellos causan infecciones latentes o asintomáticas, lo cual explicaría su detección en plantas de nopal que no presentaban alteraciones visibles (Kreuze *et al.*, 2012). Los virus CCV-1 y cactus carlavirus 2 (CC-2), se detectaron por primera vez en una planta asintomática del híbrido ‘Professor Ebert’ de *Epiphyllum* spp. (Peng *et al.*, 2019). Por lo tanto, en posteriores estudios, será necesario investigar el comportamiento biológico de ambos virus para determinar si bajo ciertas condiciones ambientales inducen algún síntoma en nopal y otras plantas de importancia económica. Asimismo, tendría que determinarse si constituyen un riesgo para la producción de nopal o algún otro cultivo.

El OV2 se reportó por primera vez en México en diferentes especies de cactáceas cultivadas (*O. ficus-indica* y *O. albicarpa*) y no cultivadas (*O. pilifera*, *O. depressa*, *O. tomentosa*, *O. robusta* y *O. streptacantha*) del Estado de México, Puebla y Ciudad de México (Salgado-Ortíz *et al.*, 2020). El género tobamovirus se divide en siete grupos, de acuerdo con su hospedante natural, que incluye a las familias *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Cactaceae*, *Passifloraceae*, *Apocynaceae* y *Leguminosae* (Li *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2006). El análisis filogenético fue consistente con esta división, agrupando al OV2 en el clado de tobamovirus que infectan cactáceas (Figura 12). Otro tobamovirus reportado en México que infecta nopal es el Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV). Este virus se reportó en la zona de Axapusco, Otumba, y San Martín de las Pirámides, Estado de México en plantas de nopal que mostraban anillos amarillos pequeños, (De La Torre-Almaráz *et al.*, 2016a). Sin embargo, en este estudio no se detectó al RCNaV en ninguna de las muestras analizadas por HTS.

En la presente investigación se informa por primera vez a nivel mundial, la presencia de un viroide en nopal (OVd-I). Sin embargo, debido a que éste se encontró en muestras infectadas con OV2, CC-1 y OPV-A, se desconocen los síntomas y el efecto que pudiera causar de manera individual.

Hasta ahora en México no existe una normatividad que regule el movimiento de material propagativo de nopal, por lo que existe el riesgo de la introducción de los virus y viroide encontrados en esta investigación a nuevas zonas productoras de esta especie.

CONCLUSIONES

El viroma del nopal verdura en cuatro zonas productoras del centro de México estuvo conformado por *Opuntia virus 2* (género *Tobamovirus*), *Cactus carlavirus 1* (Género *Carlavirus*), un nuevo virus denominado *Opuntia potexvirus A* (Género *Potexvirus*) y un nuevo viroide, *Opuntia viroid-I* (Género *Apscaviroid*). *Cactus carlavirus 1* se encontró en los cuatro estados productores de nopal muestreados.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor para realizar sus estudios de doctorado. A los productores de nopal de los diferentes estados que dieron acceso a sus parcelas para la toma de muestras.

LITERATURA CITADA

- Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster G, Martelli GP, Milne RG and Fauquet CM. 2004. Virology Division News: The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149:1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
- Al Rwahnih M, Daubert S, Úrbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives of Virology* 156:397-403. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0869-8>
- Alonso-Barrera B, Mora-Aguilera G, Valdovinos-Ponce G, Ochoa-Martínez DL, Rodríguez-Leyva E, Tlapal-Bolaños B and De La Torre-Almaraz R. 2015. Asociación de un *Potexvirus* como agente causal de manchas cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Mexican Journal of Phytopathology* 33(1):75-86 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092015000100075&lng=es&tlng=es.
- Andrews S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Barbera, GF, Carimi P, Inglese and M Panno. 1992. Physical, morphological and chemical changes during fruit development and ripening in three cultivars of prickly-pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). *Journal of Horticultural Science* 67:307-312. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516253>
- Bravo H. 1978. Las Cactáceas de México. 2nd. ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 743 p.
- Chen J, Shi YH, Adams MJ and Chen JP. 2005. The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of Lily virus X (genus *Potexvirus*). *Archives of Virology* 150:825–832. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0441-5>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y and Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics* 34 (17):i884-i890 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

- De La Torre-Almaraz R, Salazar-Segura M and Ruiz-Medrano R. 2007. Ocurrencia de un tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41:763-773. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v41n7/1405-3195-agro-41-07-763.pdf>
- De la Torre-Almaraz R, Salgado-Ortiz H, Salazar-Segura M, Pallas V, Sanchez-Navarro JA and Valverde RA. 2016a. First report of Schlumbergera virus X in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). *Plant Disease* 100:1799. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-15-1326-pdn>
- De La Torre-Almaraz R, Salgado-Ortiz H, Salazar-Segura M, Pallás V, Sánchez-Navarro JA and Valverde RA. 2016b. First Report of Rattail cactus necrosis-associated virus in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa Scheinvar*) in Mexico. *Plant Disease* 100:11. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-16-0554-pdn>
- Di Serio F, Flores R, Verhoeven JTJ, Li SF, Pallás V, Randles JW, Sano T, Vidalakis G and Owens RA. 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology* 159:3467–3478 <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Fontenele RS, Salywon AM, Majure LC, Cobb IN, Bhaskara A, Avalos-Calleros JA, Argüello-Astorga GR, Schmidlin K, Khalifeh A, Smith K, Schreck J, Lund MC, Köhler M, Wojciechowski MF, Hodgson WC, Puente-Martinez R, Van Doorslaer K, Kumari S, Vernière C, Filloux D, Roumagnac P, Lefeuvre P, Ribeiro SG, Kraberger S, Martin DP and Varsani A. 2020. A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. *Viruses* 12:398. <https://doi.org/10.3390/v12040398>
- Fontenele RS, Salywon AM, Majure LC, Cobb IN, Bhaskara A, Avalos-Calleros JA, Argüello-Astorga GR, Schmidlin K, Khalifeh A, Smith K, Schreck J, Lund MC, Köhler M, Wojciechowski MF, Hodgson WC, Puente-Martinez R, Van Doorslaer K, Kumari S, Oyeniran KA, Vernière C, Filloux D, Roumagnac P, Lefeuvre P, Ribeiro SG, Kraberger SP, Martin DP and Varsani A. 2021. New World Cactaceae Plants Harbor Diverse Geminiviruses. *Viruses* 13(4):694. <https://doi.org/10.3390/v13040694>
- Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1915-1921. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1915>
- Jan FK, Vaira AM, Menzel W, Candresse T, Zavriev SK, Hammond J, Ryu KH and ICTV Report Consortium. 2020. ICTV Virus Taxonomy Profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology* 101:699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Haeseler AV and Jermini LS. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14:587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, Rozewicki J and Yamada KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief in Bioinformatics* 20:1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kreuze JF, Vaira AM, Menzel W, Candresse T, Zavriev SK, Hammond J, Ryu KH and ICTV Report Consortium. 2020. ICTV virus taxonomy profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology* 101:699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Lan P, Tian T, Pu L, Rao W, Li F and Li R. 2019. Characterization, and detection of a new badnavirus infecting *Epiphyllum* spp. *Archives of Virology* 164:1837–1841. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04237-6>
- Langmead B and Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4): 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Letunic I and Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Research* 49: W293–W296 <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G and Durbin R. 2009. “The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.” *En: Bioinformatics (Oxford, England)* 25:16 2078-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li Y, Wang Y, Hu J, Xiao L, Tan G, Lan P, Liu Y and Li F. 2017. The complete genome sequence, occurrence and host range of tomato mottle mosaic virus Chinese isolate. *Virology Journal* 14:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0676-2>
- Maliogka V, Minafra A, Saldarelli P, Ruiz-García A, Glasa M, Katis N and Olmos A. 2018. Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses* 10:436. <https://doi.org/10.3390/v10080436>
- Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF and Dolja VV. 2007. Family Flexiviridae: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45:73–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401>

- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Haeseler AVR and Lanfear. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol* 37:1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Muhire BM, Varsani A and Martin DP. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS one* 9(9):e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Okonechnikov K, Conesa A and García-Alcalde F. 2016. Qualimap 2: advanced multisample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(2):292–294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566>
- Park CH, Song EG and Ryu KH. 2018. Detection of co-infection of *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* with six virus species in South Korea. *The Plant Pathology Journal* 34:65-70. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.08.2017.0187>
- Park CH, Song EG and Ryu KH. 2021. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of five potexviruses infecting cactus plants using dual-priming oligonucleotides (DPOs) primers. *Journal of Virological Methods* 298:114280. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114280>
- Peng L, Wu L, Grinstead SC, Kinard GR and Li R. 2019. Molecular characterization and detection of two novel carlaviruses infecting cactus. *Archives of Virology* 164:1873–1876. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04279-w>
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A and Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* 70(1):e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Salgado-Ortíz H, De La Torre-Almaraz R, Sánchez-Navarro J and Pallás V. 2020 Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Archives of Virology* 165:781–784 <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04528-3>
- Sastry KS, Mandal B, Hammond J, Scott SW and Briddon RW. 2019. *Narcissus* spp. (Daffodil). In: *Encyclopedia of plant viruses and viroids*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3912-3_608
- SIAP. 2022. Avance agrícola. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/. (Consultado el 1 de noviembre del 20220).
- Song YS, Min BE, Hong JS, Rhie MJ, Kim MJ and Ryu KH. 2006. Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus *Tobamovirus* and production of an infectious cDNA transcript. *Archives of Virology* 151:2337–2348. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0823-y>
- Thorvaldsdóttir He, Robinson JT and Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14:2,78–192 <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Van der Vlugt RA and Berendsen M. 2002. Development of a General Potexvirus Detection Method. *European Journal of Plant Pathology* 108:367–371. <https://doi.org/10.1023/A:1015644409484>
- Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR and Tzanetakis IE. 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology* 109:716–725. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW>
- Vučurović A, Kutnjak D, Mehle N, Stanković I, Pecman A, Bulajić A, Krstić B and Ravnikar M. 2021. Detection of four new tomato viruses in Serbia using post hoc high-throughput sequencing analysis of samples from a large-scale field survey. *Plant Disease* 105:2325–2332. [https://doi.org/10.1007/s00705-020-04688-2](https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1915Zheng L, Cao M, Wu L, Liu H, Chen M and Li R. 2020. First identification and molecular characterization of a novel cavemovirus infecting <i>Epiphyllum</i> spp. <i>Archives of Virology</i> 165:2083–2086. <a href=)
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>



Artículo de Revisión

Arvenses y ruderales como potenciales fuentes de inóculo de enfermedades en hortalizas en el norte de Sinaloa

Rubén Félix-Gastélum^{1*}, Gabriel Herrera- Rodríguez², Karla Yeriana Leyva-Madrigal¹, Guadalupe Arlene Mora-Romero¹, ¹Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, CP 81223. Los Mochis, Sinaloa. ²Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. Lázaro Cárdenas, PTE. 315, Colonia Centro, Los Mochis Sinaloa, CP. 81200, México. *Autor de correspondencia: ruben.felix@uadeo.mx

*Autor de
correspondencia:

Rubén Félix-Gastélum
ruben.felix@uadeo.mx

Sección:
Número Especial

Recibido: 31 Julio, 2023

Aceptado:

25 Noviembre, 2023

Publicado:

30 Noviembre, 2023

Cita:

Félix-Gastélum R,
Herrera- Rodríguez G,
Leyva-Madrigal KY y
Mora-Romero GA. 2023.
Arvenses y ruderales como
potenciales fuentes de
inóculo de enfermedades
en hortalizas en el norte de
Sinaloa. Revista Mexicana
de Fitopatología
41(4): 49-65.
DOI: [https://doi.
org/10.18781/R.MEX.
FIT.2023-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-4)



RESUMEN

Se abordan especies de arvenses y ruderales de las familias *Cucurbitaceae* y *Solanaceae* como potenciales fuentes de inóculo para el desarrollo de enfermedades virales y fungosas en cultivos agrícolas en el norte de Sinaloa. Se proponen líneas futuras de investigación multidisciplinarias enfocadas a la determinación de la patogenicidad en plantas cultivadas de virus y hongos asociados a plantas silvestres y viceversa. También se deberá estudiar la distribución espacio- temporal de plantas silvestres que pueden fungir como fuentes de inóculo, así como la de potenciales insectos vectores de enfermedades virales. La implementación de herramientas moleculares modernas, como la Secuenciación de Alto Rendimiento, para la detección de fitopatógenos es importante. Todo esto contribuirá a la aplicación de estrategias amigables con el ambiente para el control de las enfermedades en cultivos agrícolas en Sinaloa, en beneficio de los productores de hortalizas.

Palabras clave: fuentes de inoculo, insectos vectores, enfermedades virales, enfermedades fungosas, manejo de enfermedades.

En Sinaloa se siembra una amplia gama de hortalizas donde sobresalen las solanáceas y las cucurbitáceas. En el primer grupo se ubican la papa, tomate, chile, y tomatillo, los cuales en el ciclo otoño invierno 2022 cubrieron una superficie de 11,975.1, 11,541.2, 15,172.4 y 7,317.9, y ha, respectivamente; mientras que las cucurbitáceas están representadas por diversos tipos de calabazas y pepino que ocupan una superficie de 2686.2 y 3,874.9 ha, respectivamente, durante el mismo el mismo año. El valor anual de la producción de las solanáceas alcanzó 13,618,770,410 de pesos en tanto que las cucurbitáceas alcanzan los 2,511,114,370 pesos (SIAP, 2022).

Desde un punto de vista agronómico, las arvenses se consideran como una amenaza significativa en la producción agrícola, pues compiten por nutrimentos, espacio, agua y luz con las plantas cultivadas (Zimdahl 1980; Dille *et al.*, 2016). En cambio, aun cuando las ruderales no compiten con el desarrollo de los cultivos, éstas en ocasiones se convierten en indeseables pues crecen a la vera de los caminos y lotes baldíos en poblados y ciudades; también crecen al costado de vías férreas, así como en los taludes de drenes y canales limitando el flujo del agua cuando ocurren lluvias torrenciales provocando azolves que conducen a inundaciones. Adicionalmente, ambos tipos de plantas pueden constituir fuentes de inóculo para el desarrollo de enfermedades en cultivos de importancia económica. Estos tipos de plantas pueden fungir como hospedantes para fitopatógenos e insectos vectores que transmiten enfermedades de éstas a cultivos económicamente importantes. Los síntomas causados por diversas enfermedades son más evidentes en las plantas cultivadas que en las silvestres, lo cual se debe a varios factores: a) La mayor diversidad genética en las plantas silvestres que en las plantas cultivadas, b) heterogeneidad de las poblaciones de silvestres y limitado contacto entre plantas de la misma especie, c) a la selección natural a través del tiempo, lo que conduce a la obtención de resistencia o tolerancia de una especie a un determinado patógeno y d) a la eliminación natural de las plantas silvestres susceptibles a patógenos altamente virulentos (Wisler y Norris, 2000). Son numerosos los registros de casos en los que las plantas silvestres se involucran como fuentes de inóculo de enfermedades causadas por virus (Duffus, 1971; Yazdkhastia *et al.*, 2021; Korbecka-Glinka, 2021) y hongos (SAGARPA-SENASICA, 2016; Gerling *et al.*, 2022). En la presente revisión se abordan enfermedades de origen viral y fungoso que se han detectado en arvenses y ruderales y que presentan potencial para transmitirse a cultivos hortícolas en el norte de Sinaloa.

Enfermedades virales. En la complejidad de la epidemiología de las enfermedades virales, las plantas silvestres y las plantas cultivadas como fuentes de inóculo, así como las poblaciones de insectos y su motilidad, son elementos importantes para la incidencia de este tipo de enfermedades. Las arvenses y ruderales pueden ser infectadas por virus introducidos a un área de plantas cultivadas y después funcionan como fuente de inóculo permanente para otras plantas cultivadas (Broadbent, 1964). Aun cuando este aspecto permanece inexplorado en Sinaloa, no se descarta la posibilidad de que muchos de los virus que actualmente causan enfermedades en hortalizas hayan ingresado a través de semilla u otras formas de diseminación y que a partir de las plantas cultivadas los virus se transmitieron a las plantas silvestres, donde los insectos vectores ejercen un papel fundamental en el desarrollo de epidemias.

Fuentes potenciales de enfermedades virales en tomate para industria.

Las enfermedades virales del tomate para industria limitaron la producción en una forma significativa en el norte de Sinaloa en los años 90s. Estudios donde se aplicaron herramientas de geoestadística indicaron una alta correlación entre la presencia de arvenses y ruderales de las familias Malvaceae, Sterculiaceae, Euphorbiaceae, Nyctaginaceae, y Leguminaceae, con síntomas inducidos por geminivirus. En cambio, especies de la familia Solanaceae presentaron incidencia del *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). La presencia de plantas sintomáticas y las poblaciones de mosca blanca, áfidos y trips estuvo altamente correlacionado con la incidencia de dichos virus en tomate para industria. Además, estudios de Sistemas de Información Geográfica permitieron detectar sectores del norte de Sinaloa con incidencia de 0 al 2% y otros con incidencia de 25 al 100% de enfermedades virales del tomate. Con base en esta información se diseñó y validó un sistema de manejo de enfermedades virales en el cultivo, el cual consistió en la selección de los distritos de riego con un menor riesgo de incidencia de este tipo de enfermedades, donde se consideraron además la etapa de siembra, eliminación de arvenses y ruderales en un área de doscientos metros contiguos a los límites de los lotes de siembra, en aquellos distritos que presentaban un alto grado de riesgo de incidencia de estas enfermedades (Nelson *et al.*, 1994). En la época de este estudio se sembraban 7,000 ha de caña de azúcar en el norte de Sinaloa, mismas que presentaban altas poblaciones de arvenses infectadas con diferentes virus, a la vez eran colonizadas por insectos vectores que los transmitían a plantaciones de tomate para industrial. Actualmente no se siembra caña de azúcar en la región y sin duda el nivel de riego de incidencia de enfermedades virales ha disminuido; sin embargo, en años recientes han surgido el virus necrosis apical del tomate (Barajas-Ortiz, 2013), *Zucchini yellow mosaic virus* (Félix-Gastelum *et al.*, 2007), por lo que se justifican estudios a nivel regional como el realizado en los 90s y la subsecuente implementación de este sistema para el manejo de las enfermedades virales en hortalizas.

El *Tomato apex necrosis virus* en tomate y tomatillo. En los 10 años recientes se han realizado estudios sobre detección de *Tomato apex necrosis virus* (ToANV). La enfermedad causó pérdidas de 100% en jitomate y tomatillo en el Valle del Fuerte y del Carrizo en trasplantes de septiembre en superficies de 400 y 300 ha de ambos cultivos en los ciclos 2011-2012 y 2012-2013 respectivamente, sobre todo en trasplantes de híbridos de tomate y variedades tomatillo susceptibles establecidos en septiembre. Aun cuando las poblaciones de mosca blanca fueron bajas, las poblaciones de plantas silvestres con síntomas virales eran altas, debido a las lluvias del verano; esto indica una alta eficiencia de la mosca blanca como

vector. En tomate la enfermedad consiste en necrosis de los brotes jóvenes de las plantas (Figura 1A) y los frutos (Figura 1B). En tomatillo inicialmente se presenta mosaico en las hojas y en estados avanzados de la enfermedad ocurre un amarillamiento total de las mismas (Figura 1C) y de la planta en general (Figura 2), lo cual afecta su vigor y limita la producción y calidad de esta hortaliza al grado de que los productores destruyen el cultivo para proceder a la siembra de maíz o sorgo (Espinoza-Castillo, 2013).

El ToANV se ha detectado en arvenses y ruderales de la familia Solanaceae mediante pruebas serológicas y PCR; resaltan el tomatillo silvestre (Figura 2A) (*Physalis* sp.), chichiquelite (*Solanum nigrum*) (Figura 2B), toloache (*Datura* sp.), tabacón (*Nicotiana glauca*) (Figura 2C y D) y mala mujer (*Solanum asureum*) (Figura 2E). Pruebas adicionales indicaron que la mosca blanca transmite el virus a tomatillo y tomate a partir de plantas silvestres arriba señaladas (Espinoza-Castillo, 2013). Estos hallazgos coinciden con resultados previos que indican que el virus se trasmite por mosca blanca (Barajas-Ortiz, 2013). Estas fuentes potenciales de inóculo están ampliamente distribuidas en el norte de Sinaloa y con frecuencia presentan síntomas de origen viral, lo cual coincide con altas poblaciones del vector y el ciclo de siembra de tomatillo y tomate. El manejo de la enfermedad se ha direccionado hacia la utilización de variedades de tomate tolerantes al virus y manejo de mosca blanca mediante el uso de insecticidas sistémicos en riegos presurizados y eliminación de plantas silvestres como potenciales fuentes de

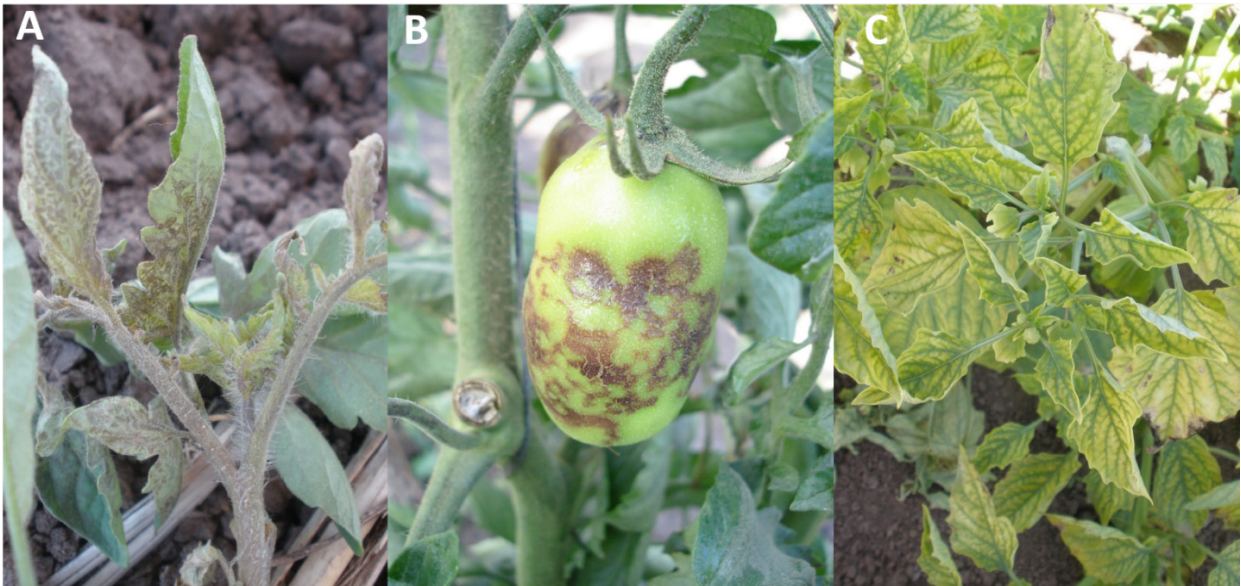


Figura 1. Síntomas inducidos por el *Tomato apex necrosis virus* (ToANV). Necrosis de rama joven en tomate (A), Necrosis en frutos de tomate (B) y clorosis intervenal en planta de tomatillo (C).

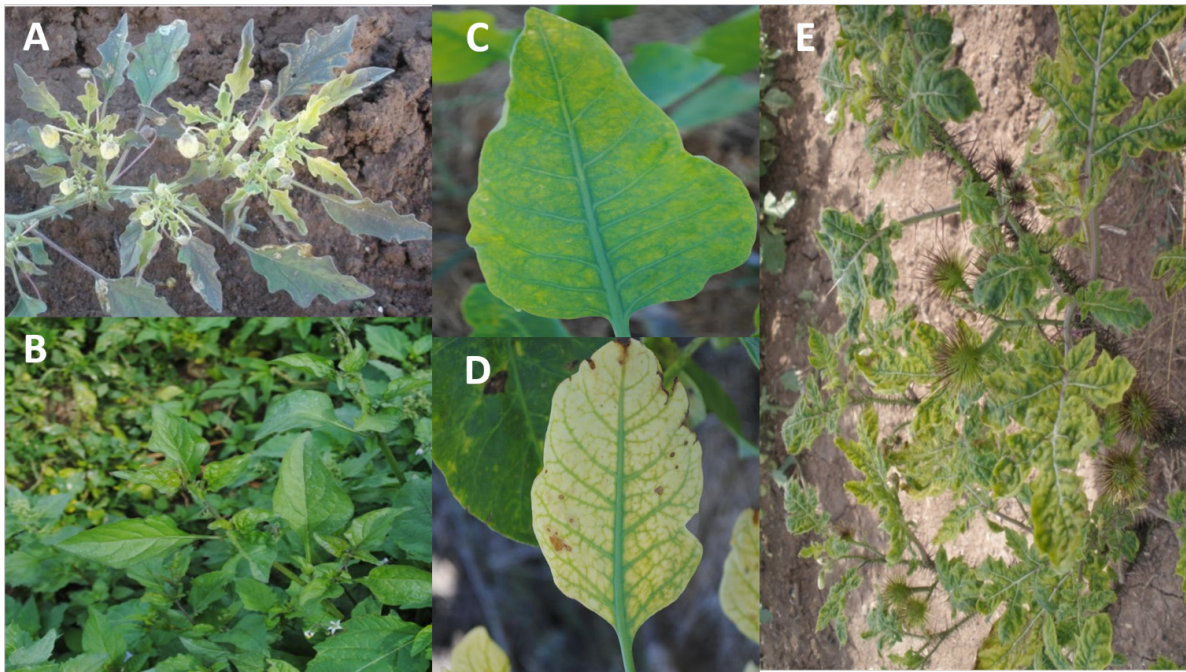


Figura 2. Síntomas inducidos por el *Tomato apex necrosis virus* (ToANV) en plantas silvestres. Amarillamiento en brotes jóvenes de tomatillo silvestre (*Physallis sp.*) (A). Amarillamiento leve y deformación de síntomas iniciales en chichiquelite (*Solanum nigrum*) (B). Síntomas iniciales de clorosis intervenal (C). Clorosis intensa y enverdecimiento de nervaduras en hojas de tabacón (*Nicotiana glauca*) (D). Amarillamiento general en mala mujer (*Solanum asureum*) (E).

inóculo, a lo cual da seguimiento puntual la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte.

Cucurbitáceas silvestres como fuentes de inóculo para enfermedades virales en calabaza zucchini. Estudios preliminares en el Valle del Fuerte indican que en calabaza zucchini ocurren infecciones por el *Zucchini yellows mosaic virus* (ZYMV) (Figura 3A y B), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV-W) y *Cucumber mosaic virus* (CMV), en forma individual y en coinfecciones en lotes comerciales de este cultivo; a su vez, las plantas silvestres de tabaco (*Nicotiana glauca*), melón silvestre (*Cucumis melo* var. *Dudaim*), pepino amargo (*Momordica charantia*) y pepino espinoso (*Cucumis dipsaseus*) presentaron los mismos virus (Félix-Gastelum *et al.*, 2007). La detección de estos virus en las arvenses y las ruderales indican que éstas pueden actuar como fuentes de inóculo para el desarrollo de virosis en otras cucurbitáceas cultivadas en la región, lo que debe demostrarse a través de pruebas de inoculación en condiciones de invernadero mediante especies de insectos consignados como vectores de este tipo de virus.

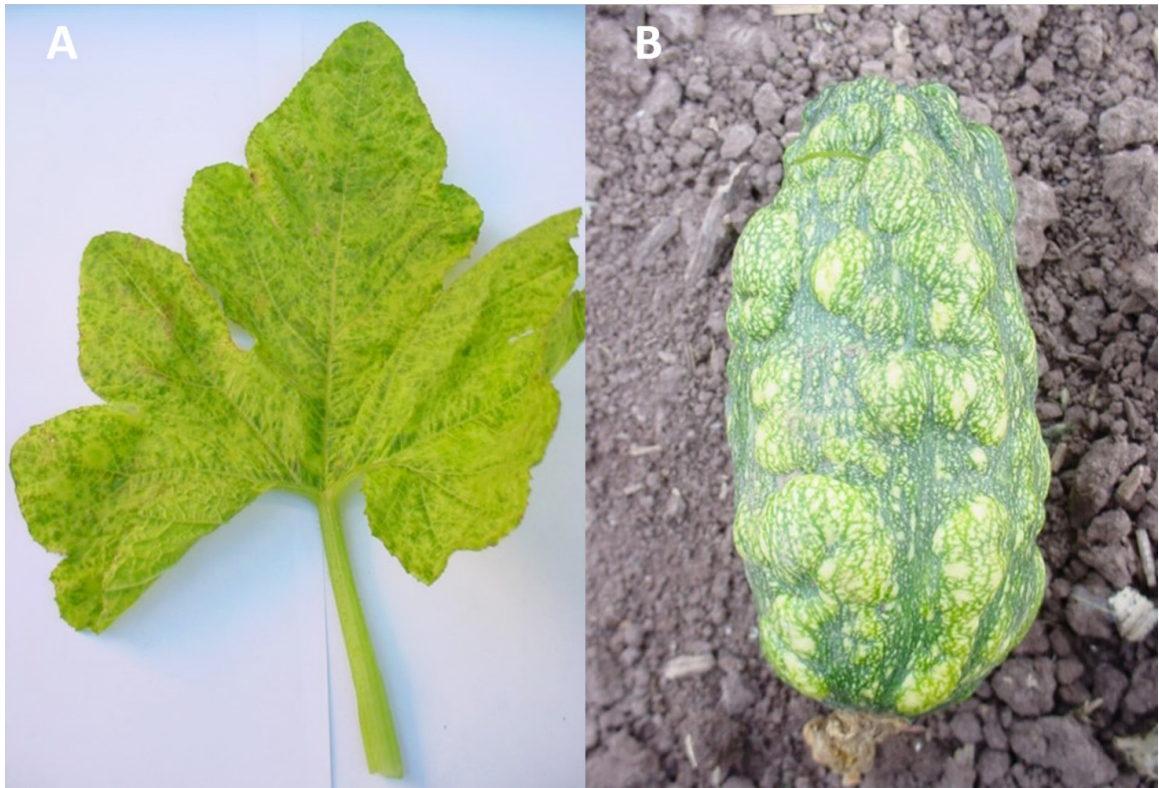


Figura 3. Síntomas inducidos por el virus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Amarillamiento en hoja de calabaza Zucchini grey (A). Síntomas de deformación de fruto del mismo hospedante causado por el mismo virus (B).

Estudios en México indican que *N. glauca* es reservorio del CMV, lo cual coincide con estudios en Grecia donde la misma ruderal es fuente de inóculo para el mismo virus (Volvas y Di Franco, 2004).

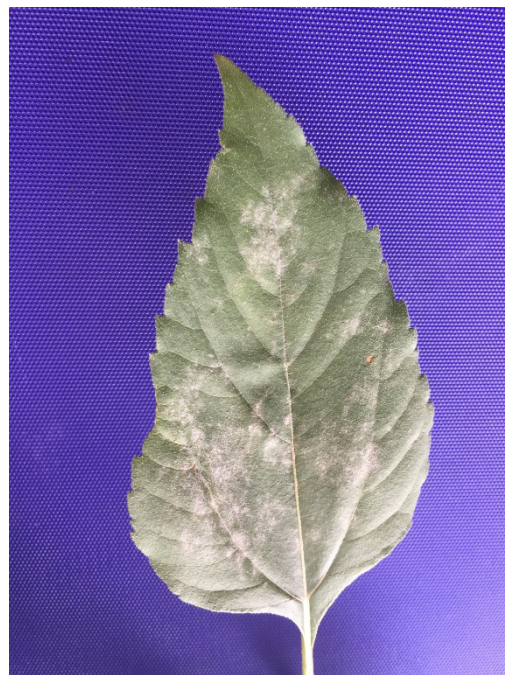
Enfermedades foliares de origen fungoso. Las enfermedades fúngicas en arvenses y ruderales, han recibido menor atención que en las plantas cultivadas, pues en éstas causan pérdidas económicas, mientras que en las plantas silvestres con frecuencia pasan desapercibidas en ambientes naturales. Algunas plantas fungen como hospedantes alternantes, lo cual es esencial en el ciclo de vida de las enfermedades. En este sentido resalta la roya de trigo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* donde al hospedante alterno (*Berberis vulgaris*) lo infectan las basidiosporas y ocurre intercambio genético, para formar posteriormente las aecias y aeciósporas que infectan nuevamente al trigo. Esto permite que el ciclo biológico se repita (Leonard y Szabo, 2005). También se sabe que en Alemania, en los márgenes de los hundimientos del suelo (“kettle holes” en inglés) crecen diferentes

especies de Poaceas y plantas herbáceas que son infectadas hasta por doce especies de *Fusarium* durante el otoño-invierno, los cuales presentan potencial para causar enfermedades en cultivos agrícolas (Gerling *et al.*, 2022); así mismo, *Phomopsis* sp., *Phomopsis longicolla* y *Diaporthe phaseolorum*, aislados de las arvenses *Eclipta prostrata*, *Ipomea lacunosa*, y *Desmenthus illinoensis* causaron enfermedad en hipocótilos, vainas y semillas de soya (Mengistu *et al.* 2007). A continuación, se describen arvenses y ruderales como potenciales fuentes de inóculo para el desarrollo de enfermedades de foliares fungosas en Sinaloa.

La cenicilla (*Golovinomyces spadiceus*) del girasol silvestre (*Helianthus annuus*). Estudios sobre la cenicilla del girasol silvestre (Figura 4) indicaron que el hongo *Golovinomyces spadiceus* es agente causal de la enfermedad en Sinaloa y que éste causó la enfermedad en girasol comercial en inoculaciones artificiales (Félix-Gastélum *et al.*, 2019). Este estudio reviste importancia, el girasol silvestre puede fungir como fuente de inóculo para el desarrollo de la enfermedad en girasol cultivado. Es importante recalcar que el girasol silvestre crece como arvense compitiendo con el maíz, frijol y otros cultivos, además de crecer como ruderal en los linderos de caminos, así como en bordos y taludes de drenes y canales durante el invierno e inicios de primavera, lo cual coincide con las siembras de girasol comercial en la región.

El tizón foliar (*Alternaria* spp.) del tabaco silvestre (*Nicotiana glauca*). El tabaco silvestre es una solanácea perene que crece al costado de los caminos, los

Figura 4. Síntomas de cenicilla causados por *Golovinomyces spadiceus* en hoja de girasol silvestre (*Helianthus annuus*).



bordos y taludes de canales de riego y drenes, así como en lotes agrícolas ociosos. Esta ruderal muestra lesiones irregulares de color café claro a oscuro en forma irregular en las hojas (Figura 5A), durante el ciclo otoño-invierno. La severidad de la enfermedad se acentúa cuando los periodos diarios de follaje mojado varían de 15 a 18 h y la temperatura oscilan entre 14 y 28 °C; bajo estas condiciones ocurre defoliación del tercio basal de las plantas. Estudios preliminares demostraron que una especie no identificada de *Alternaria* (Simmons, 2007) es el agente causal de la enfermedad (Apodaca-Orduño, 2016). En inoculaciones artificiales el hongo resultó patogénico en tomate, en el que causó lesiones café claro a oscuro con anillos concéntricos (Figura 5B) similares a los del tizón temprano causado por *A. solani* (Sánchez-Castro, 1998) y *A. tomatophila* (Jones *et al.*, 2017). Estos resultados demuestran que el tabaco silvestre es una potencial fuente de inóculo para el desarrollo del tizón temprano en tomate por una nueva especie de *Alternaria* en México y en otras partes del mundo.

El tizón foliar del tabaquillo (*Nicotiana trigonophylla*) y chichiquelite (*Solanum nigrum*). El tabaquillo y el chichiquelite son plantas anuales que crece durante el

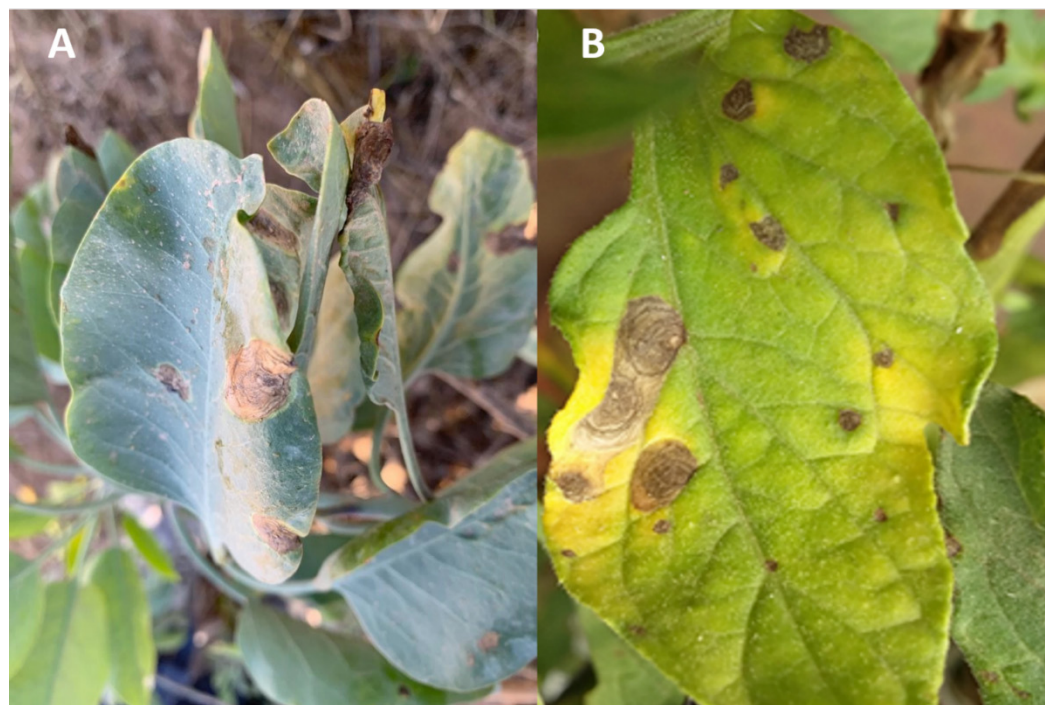


Figura 5. Manchas foliares causadas por *Alternaria* sp. Lesiones color café claro con círculos concéntricos en tabacón (*Nicotiana glauca*) (A). Síntomas de manchas foliares color café oscuro con anillos concéntricos causados por *Alternaria* sp. aislada de tabaco silvestre (B).

otoño y el invierno y ocurren principalmente como arvenses y raras veces como ruderales. En años recientes, en estas plantas han observado lesiones irregulares color café claro a oscuro de 3.0 a 5.0 mm. Con el progreso de la enfermedad, las lesiones adquieren una forma irregular y pueden cubrir hasta el 50% de la lámina foliar infectadas. Cuando las lesiones coalescen y cubren hasta una tercera parte de la lámina foliar, se origina defoliación, principalmente en las hojas basales de las plantas. De las hojas sintomáticas se aislaron en forma consistente a dos especies de *Alternaria* pertenecientes a la sección *Alternata* y *Curvularia muehlenbeckiae* se han encontrado asociadas a los síntomas (Guerra-Meza, 2021), pero aún no se ha demostrado su patogenicidad en ellas ni en solanáceas cultivadas.

Tizón foliar (*Alternaria* sp.) del zacate johnson (*Sorghum halepense*). El zacate johnson es una Poacea anual que se encuentra como arvense y ruderal durante todos los meses del año en Sinaloa. Durante el otoño, invierno y primavera, las plantas muestran lesiones intervenales café claro a oscuro de 1.0 a 2.0 cm (Figura 6). Las lesiones incrementan su tamaño hasta cubrir el 50% del área foliar. Estudios



Figura 6. Lesiones café claro a oscuro y atizonamiento de la vaina de la hoja en plantas de zacate Johnson (*Sorghum halepense*), causadas por *Curvularia muehlenbeckiae*.

en Sinaloa indican que la enfermedad es causada por *Curvularia muehlenbeckiae* (Olivas-Peraza *et al.*, 2021). El hongo también ha sido consignado causando manchas foliares en guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) en Sinaloa (Tovar *et al.*, 2022); La soya es el único hospedante económicamente importante en el que el hongo *C. muehlenbeckiae* causa manchas foliares en Sinaloa; también se ha registrado causando lesiones foliares en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) en China (Lv *et al.*, 2023) y abeto (*Cunninghamia lanceolata*) (Cui, 2020) en el mismo país. En Sinaloa el hongo se ha encontrado asociado a la mancha foliar del tabaquillo (*Nicotiana trigonophylla*) (Guerra-Meza, 2021). Aun cuando la mancha foliar de la soya es causada por *C. muehlenbeckiae* en Sinaloa, se desconoce si el zacate johnson, guar y tabaquillo pueden fungir como potenciales fuentes de inóculo para el desarrollo de la enfermedad; de ahí la importancia de realizar inoculaciones cruzadas con aislados del hongo provenientes de las diferentes especies de plantas, lo cual contribuirá al conocimiento de la ecología, epidemiología y manejo de la enfermedad en los cultivos económicamente importante

Tizón foliar (*Alternaria ricini*) de la higuerrilla silvestre (*Ricinus comunis*). La higuerrilla silvestre se considera una especie exótica invasora la cual se comporta como perene cuando crece como ruderal en Sinaloa.

Las hojas muestran manchas irregulares de café claro a oscuro de 0.5 a 1.0 cm (Figura 7); cuando las manchas coleasen cubren hasta el 25% de la lámina foliar,



Figura 7. Manchas irregulares y circulares café claro y márgenes de las hojas con atizonamiento causado por *Alternaria ricini* en hoja de higuerrilla silvestre (*Ricinus comunis*).

lo que provoca defoliación, principalmente en las hojas del tercio inferior de las plantas. Estudios preliminares han demostrado que la mancha foliar de la higuera silvestre es causada por *Alternaria ricini* y que en inoculaciones artificiales también causó la enfermedad en higuera comercial (Olivas-Peraza, 2018), lo cual coincide con reportes previos de la enfermedad donde se ha implicado a *A. ricini* como agente causal de la enfermedad en higuera comercial en México (López-Guillén *et al.*, 2015) y otras partes del mundo (Masirevic *et al.*, 1993; Nagaraja y Krishnappa, 2016a; Nagaraja y Krishnappa, 2016b). En Sinaloa, los síntomas del tizón foliar en higuera silvestre ocurren durante el otoño invierno cuando los periodos de humedad relativa $\geq 90\%$ de 12 a 16 h diarias y la temperatura oscila entre 8 y 28 °C, lo cual coincide con el ciclo de higuera comercial. Las pruebas de patogenicidad indican que la higuera silvestre es una fuente potencial de inóculo para el desarrollo del tizón foliar causado por *A. ricini* en higuera cultivada.

El mildiú (*Pseudoperonospora cubensis*) del meloncillo silvestre (*Cucumis melo* var. *Dudaim*). El meloncillo crece como arvense, pero también como ruderal en el norte de Sinaloa. Se presenta en altas poblaciones en lotes agrícolas ociosos durante el verano y principios del otoño en Sinaloa. En años recientes esta planta ha mostrado síntomas y signos de mildiú. La enfermedad es policíclica y las plantas presentan manchas de verde pálido a amarillo sin delimitación por las nervaduras en el haz (Figura 8) y en el envés, los signos consisten en esporangióforos y



Figura 8. Síntomas de mildiú causados por *Pseudoperonospora cubensis* en meloncillo silvestre (*Cucumis melo* var. *Dudaim*).

esporangios con un crecimiento veloso color café o púrpura. La incidencia de mildiú en meloncillo es del 100% y destruye hasta el 50% del follaje de las plantas. Los primeros síntomas de la enfermedad en meloncillo silvestre se observan durante la última semana de septiembre y la primera semana de octubre, cuando aún no se trasplantan cucurbitáceas comerciales en la región. Aun cuando no se ha demostrado la patogenicidad de *P. cubensis* proveniente de meloncillo silvestre en cucurbitáceas cultivadas en Sinaloa, estudios en Los Estados Unidos de Norteamérica indican que *P. cubensis* sobrevive el invierno en cucurbitáceas silvestres o cultivadas como biotrofo obligado en Florida; mientras que el patógeno no sobrevive el invierno en los Estados del Noreste del mismo país debido al frío invierno. De ahí que, a través del viento y la presencia de hospedantes susceptibles en la ruta de diseminación, el oomiceto se disemine desde Florida hasta los estados del noreste de Los Estados Unidos de Norteamérica cuando ocurre la enfermedad durante la primavera y el verano (Ojiambo y Holmes, 2011). En Sinaloa, las siembras en invernadero para producción de plántulas de cucurbitáceas inician la primera semana de octubre, cuando la esporulación de *P. cubensis* en meloncillo silvestre es abundante y los niveles de humedad y temperatura favorecen el desarrollo de la enfermedad tanto en el meloncillo silvestre como cucurbitáceas cultivadas; sin embargo, se desconoce la forma de supervivencia del patógeno durante el verano, donde las temperaturas alcanzan hasta 40 °C.

Arvenses y ruderales como potenciales fuentes de inóculo de enfermedades en hortalizas Sinaloa. En la presente revisión se abordan enfermedades de origen viral y fungoso que se han detectado en arvenses y ruderales y que tienen el potencial para presentarse en cultivos hortícolas. La importancia de las arvenses y ruderales, así como la abundancia y motilidad de insectos vectores de enfermedades virales en tomate para industria se demostró en Sinaloa, donde mediante de estudios de presencia de potenciales fuentes de inóculo, poblaciones de potenciales especies insectiles vectores de virus se diseñó un sistema de manejo de enfermedades virales en tomate para industria (Nelson *et al.*, 1994).

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los estudios sobre el papel que juegan las arvenses y ruderales como potenciales fuentes de inóculo para el desarrollo de enfermedades en plantas cultivadas es insipiente en México (Nelson *et al.*, 1994). En la presente revisión se muestra la situación actual sobre el tema en Sinaloa. Derivado del presente trabajo se proponen nuevas líneas de investigación relativas a estudios sobre la distribución espacio temporal de las plantas silvestres anuales y perenes con potencial de fuente de inóculo para el desarrollo de enfermedades de origen viral y enfermedades foliares de origen fungoso en plantas cultivadas.

Para la detección e identificación de hongos asociados a enfermedades foliares de plantas silvestres en el presente estudio, se recurrió a estudios morfométricos, utilización de la PCR y estudios filogenéticos multigen, así como estudios de patogenicidad, en algunos casos. En el caso de virus, se recurrió principalmente a pruebas serológicas. Sin duda, aun cuando requiere estudios de validación, el advenimiento de herramientas moleculares como la Secuenciación de Alto Rendimiento (SAR) (“High-Throughput Sequencing” en inglés) permite diagnósticos preliminares en la etapa inicial de diagnóstico para la identificación presuntiva de secuencias de virus donde se puede usar la PCR o ELISA para la confirmación de su identificación (Massart *et al.*, 2017). La SAR permite detectar todos los virus incluyendo variantes nuevas, así como viroides (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Rott *et al.*, 2017). La presente revisión sólo marca el inicio de estudios futuros sobre potenciales fuentes de inóculo para el desarrollo de enfermedades en cultivos agrícolas, donde la SAR sería una herramienta de utilidad pues permitiría la detección de virus en plantas cultivadas y silvestres, inclusive en plantas asintomáticas (Jacques-Davy and Gubba, 2020). Sin embargo, la integración de las herramientas como el SAR y la bioinformática en el estudio de virus fitopatógenos en Sinaloa y en el resto del país, requerirá el desarrollo de proyectos que implican altas inversiones; pero este es el camino en la implementación de estrategias sostenibles en el manejo de enfermedades de cultivos agrícolas. Además, a estas herramientas innovadoras de detección deben de integrarse botánicos para que estudien la ecología de las ruderales y arvenses, así como virólogos, entomólogos y epidemiólogos. Además de la identificación de los virus y hongos asociados a enfermedades de arvenses también es importante demostrar la patogenicidad de éstos en las plantas cultivadas y viceversa. En los virus deberá procederse de manera similar; sin embargo, las transmisiones de los virus a partir de las plantas silvestres deberán realizarse mediante los potenciales insectos transmisores de estos.

En el manejo de las enfermedades virales en el norte de Sinaloa, resalta la implementación de niveles de riesgo para la incidencia de este tipo de enfermedades en tomate para industria en los municipios de El Fuerte, Ahome y Guasave en los 1990s. Este modelo permitió evadir las zonas del alto riesgo para la plantación de tomate para industria. También se aplicaron medidas de saneamiento y evasión de las altas poblaciones de insectos vectores en el manejo de las enfermedades causadas por diferentes tipos de virus (Nelson *et al.* 1994). Este es un caso de éxito en el manejo de este tipo de enfermedades; sin embargo, es recomendable el diseño, evaluación e implementación de niveles de riesgo, no sólo en tomate para industria sino al grupo de hortalizas que se siembran en Sinaloa. También se deben de considerar las diferentes zonas productoras de hortalizas en el estado, pues existe variación en vegetación silvestre y sus poblaciones, así como los niveles de incidencia de enfermedades virales en este tipo de plantas pues se asume

que, a mayor incidencia, las probabilidades de transmisión se incrementan. Los tipos de hortalizas y las fechas de siembra también pueden variar en Sinaloa. Al igual que las poblaciones de plantas arvenses y ruderales presentes en la región. Además, nuevas enfermedades virales han surgido en los años recientes como el *Tomato apex necrosis virus* (Turina *et al.* 2007), *Tomato marchitez virus* (Camacho-Beltrán 2015) y el *Tomato brown rugose fruit virus* (García-Estrada *et al.*, 2022), de los cuales se requiere un mayor conocimiento sobre sus respectivos rangos de hospedantes. Otro aspecto de importancia en la interacción patógeno-planta silvestre es el rango de hospedantes del patógeno; en este sentido, la atención sobre el rango de hospedantes del patógeno siempre se ha direccionado hacia el rango de hospedantes en las plantas cultivadas, pero no en las plantas silvestres donde se pueden incluir patógenos con un amplio rango de hospedantes entre especies, géneros, y hasta familias (Dinoor y Eshed, 1984), lo cual impacta de manera directa en la ecología, epidemiología y el manejo de enfermedades virales.

Actualmente se desconoce el origen de los virus en plantas silvestres y cultivadas en Sinaloa. La mayoría de ellos quizás sean exóticos y se introdujeron al país a través de semilla u otros medios. Una vez que éstos se establecieron en los cultivos agrícolas, se diseminaron a arvenses y ruderales mediante insectos vectores. De ahí la importancia de establecer eficientes medidas para detección de virus en semilla y material propagativo que se introduce al país; de esta manera se reducirá el riesgo de surgimiento de enfermedades emergentes en el país. Como medio de detección resalta el SAR, pues es direccionado hacia una amplia gama de virus (Rubio *et al.*, 2020). Quizás esta técnica también se pueda aplicar a la detección de virus en insectos vectores potenciales en el futuro.

En enfermedades virales ya establecidas tanto plantas silvestres como cultivadas en Sinaloa, se debe recurrir a: a) artrópodos depredadores y parasitoides (Dáder *et al.* 2012), así como hongos entomopatógenos, nemátodos y bacterias (Kalha *et al.*, 2014); b) inhibidores de proteasas, neurotoxinas o silenciamiento de genes mediante RNA dirigidos a metabolismo primario del insecto vector (Feres y Raccach, 2015; Nandety *et al.*, 2015; Vogel *et al.*, 2019); c) prácticas agronómicas como fechas de siembra direccionadas a evadir altas poblaciones de insectos vectores y d) se puede interferir en el proceso de transmisión mediante la aplicación de aceite mineral péptidos sintéticos o proteínas modificadas que compiten con proteínas codificadas por los virus, las cuales pueden interactuar con receptores del insecto vector (Lecoq y Desbiez 2012; Blanc *et al.*, 2014).

En enfermedades en arvenses y ruderales existe un amplio espacio para la identificación de hongos asociados a éstas; también se debe de determinar su patogenicidad en plantas de importancia agrícola y viceversa, principalmente cuando en ambos coinciden especies del mismo género y/o especies. Se requieren también estudios sobre la ecología de los hongos asociados a las plantas silvestres,

pues es frecuente observar que están presentes en arvenses y ruderales durante el otoño - invierno y los síntomas no ocurren durante el verano cuando las temperaturas alcanzan los 39-40 °C en el norte de Sinaloa.

CONCLUSIONES

En Sinaloa se cultivan una amplia gama de hortalizas. La incidencia de enfermedades virales y fungosas es frecuente en solanáceas y cucurbitáceas cultivadas durante la temporada otoño-invierno en la región. Paralelamente diversas especies de arvenses ruderales pertenecientes a éstas y otras familias botánicas muestran síntomas de enfermedades virales y fungosas en el entorno donde se cultivan las hortalizas. La asociación de estos patógenos a las plantas silvestres implica riesgo de transmisión hacia las plantas cultivadas. A la fecha no existen estudios sobre la distribución espacio-temporal de las arvenses y ruderales en los valles de Sinaloa, así como las fluctuaciones poblacionales de los potenciales insectos vectores de las enfermedades virales de este tipo de plantas a las plantas cultivadas y viceversa. Tampoco existen sistemas modernos para detección de fitopatógenos tanto en plantas como en los potenciales vectores. Líneas futuras de investigación deberán abordar estos tópicos donde participen Botánicos, Entomólogos, Fitopatólogos, Epidemiólogos y Bioinformáticos; esto permitirá un manejo sostenible de las enfermedades de las hortalizas y otros cultivos de importancia en Sinaloa.

LITERATURA CITADA

- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Islas C and Rowhani A. 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology* 105: 758–763. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0165-R>.
- Apodaca-Orduño O. 2016. Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislados de *Alternaria* asociados al tizón foliar de tabaco silvestre (*Nicotina glauca* G.) en Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente. Universidad de Occidente. Los Mochis, Sinaloa. 55p.
- Barajas-Ortiz MC, Leon-Sicaíros CR, Lopez-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A, Velarde-Félix S, Peraza-Garay F and Garzón-Tiznado JA. 2013. Transmission efficiency of *Tomato apex necrosis virus* by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype B in tomato. *Journal of Economic Entomology*. 106:1559-1565. <http://dx.doi.org/10.1603/EC12223>.
- Blanc S, Drucker M and Uzest M. 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annual Review of Phytopathology* 52:403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto102313-04592>.
- Broadbent L. 1964. Control of plant virus diseases. In *Plant Virology*. ed. M. K. Corbett and H. D. Sisler. 16:330-64. Gainesville: Univ. Florida Press. 527p.
- Camacho-Beltrán E, Armenta-Chávez R, Romero-Romero JL, Magallanes-Tapia MA, Leyva-López NE, Apodaca-Sánchez MA and Méndez-Lozano J. 2015. First report of pepper as a natural new host for tomato marchitez virus in Sinaloa, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 37:384–389. <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1078412>

- Cui WL, Lu XQ, Bian JY, Qi XL, Li DW and Huang L. 2020. *Curvularia spicifera* and *C. muehlenbeckiae* causing leaf blight on *Cunninghamia lanceolata*. *Plant Pathology* 69:ppa-13198. <https://doi.org/10.1111/ppa.13198>.
- Dáder B, Moreno A, Viñuela E, Fereres A. 2012. Spatio-temporal dynamics of viruses are differentially affected by parasitoids depending on the mode of transmission. *Viruses* 4: 3069–3089. <https://doi.org/10.3390/v4113069>
- Dille JA, Sikkema PH, Everman WJ, Davis VM and Burke IC. 2016. Perspectives on corn yield losses due to weeds in North America. Weed Science Society of America. <http://wssa.net/wp-content/uploads/WSSA-2015-Corn-Yield-Loss-poster-updated-calc.pdf> (Consultada 15 febrero de 2022).
- Dinoor A, Eshed N. 1984. The role and importance of pathogens in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 22:443–466. doi:10.1146/annurev.py.22.090184.002303.
- Dinoor A. 1974. Role of wild and cultivated plants in the epidemiology of plant diseases in Israel. *Annual Review Phytopathology* 12:413-436. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002213>
- Duffus JE. 1971. Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annual Review Phytopathology* 9:319-340. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001535>
- Espinoza-Castillo DF. 2013. Estrategias de manejo del virus de la necrosis apical de tomate (ToANV) en los cultivos de tomate y tomatillo en el norte de Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Los Mochis. Los Mochis, Sinaloa. 48p.
- Fereres A and Raccach B. 2015. Plant virus transmission by insects. Chichester: eLS. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000760.pub3>.
- Félix-Gastélum R, Olivás-Peraza DD, Quiroz-Figueroa FR, Leyva-Madrigal KY, Peñuelas-Rubio O, Espinosa-Matías S and Maldonado-Mendoza IE. 2019. Powdery mildew caused by *Golovinomyces spadicus* on wild sunflower in Sinaloa, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41:301-309. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1577916>
- Félix-Gastélum R, Magallanes-Tapia MA, Méndez-Lozano J, Huet H, Trigueros-Salmerón JA y Longoria-Espinoza RM. 2007. Detección del virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV) y su coinfección con otros virus en Cucurbitáceas cultivadas y plantas silvestres en el Valle del Fuerte Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:95-101.
- García-Estrada RS, Díaz-Lara A, Aguilar-Molina VH, Tovar-Pedraza JM. 2022. Viruses of economic impact on tomato crops in Mexico: From Diagnosis to Management-A Review. *Viruses* 14:1251. <https://doi.org/10.3390/v14061251>.
- Gerling M, Pätzig M, Hempel L, Büttner C and Müller MEH. 2022. Arable weeds at the edges of kettle holes as overwintering habitat for phytopathogenic fungi. *Agronomy* 12: 823. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040823>
- Guerra-Meza O. 2021. Especies de *Alternaria* y *Curvularia* asociadas a manchas foliares en solanáceas silvestres. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Occidente. Los Mochis, Sinaloa 81p.
- Jacques-Davy I and Gubba A. 2020. High-throughput sequencing application in the diagnosis and discovery of plant-infecting viruses in Africa, a decade later. *Plants* 9:1376. <https://doi.org/10.3390/plants9101376>.
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM and Miller SA. (eds.) 2017. Compendium of tomato diseases and pests. Second Edition. APS Press. Saint Paul, MN, USA, 168p.
- Kalha C, Singh P, Kang S, Hunjan M, Gupta V and Sharma R. 2014. Entomopathogenic viruses and bacteria for insect-pest control, in integrated pest management: Current concepts and ecological perspective. Ed. D. P. Abrol San Diego, CA: Academic Press, 225–244p.
- Korbecka-Glinka G, Przybyś M and Feledyn-Szewczyk B. 2021. A Survey of five plant viruses in weeds and tobacco in Poland. *Agronomy* 11:1667. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081667>.
- Lecoq H and Desbiez C. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. *Advances in virus Research* 84:67–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8>.
- Leonard KJ and Szabo LJ. 2005. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology* 6:99-111. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00273.x>.
- López-Guillén GJ, Gómez-Ruiz JF, Barrera-Gaytán M, Martínez-Bolaños E, Herrera-Parra M y Hernández-Arenas M. 2015. Plagas y enfermedades asociadas a higuierilla (*Ricinus communis* L.) en el trópico mexicano. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Centro de Investigación Regional Pacífico Sur (CIRPAS). Folleto Técnico Núm. 36. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 48p.

- Lv S, Zhang Y, Zhang C and Xiao L. 2023. First report of *Curvularia muehlenbeckiae*, the causal agent of *Curvularia* leaf spot, on pecan (*Carya illinoensis*) in China. *Plant Disease* 107: 1232. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-22-15>
- Masirevic S, Petrov M and Ceranic P. 1993. *Alternaria ricini*, a new castor bean parasite in Yugoslavia. *Zastita Bilja* 44:183-188.
- Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M. *et al.* 2017. A Framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory, and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology* 8:45. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00045>.
- Mengistu A, Castlebury LA, Rossman AY, Smith JR and Reddy KN. 2007. Isolates of *Diaporthe-Phomopsis* from weeds and their effect on soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29: 283–289. <https://doi.org/10.1080/07060660709507471>.
- Nagaraja O and Krishnappa M. 2016a. Leaf blight of castor caused by *Alternaria ricini*: Detection and pathogenicity in castor (*Ricinus communis* L) seed. *SSRG International Journal of Agriculture and Environmental Science* 3:6-10. www.internationaljournalsssrg.org
- Nagaraja O and Krishnappa M. 2016b. Location and transmission of *Alternaria ricini* in castor (*Ricinus communis* L.) *Asian Journal of Multidisciplinary Studies* 4: 4-8.
- Nandety RS, Kuoy YW, Nouriy S and Falk BW. 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered* 6:8–19. <https://doi.org/10.4161/21655979.2014.979701>.
- Nelson MR, Felix-Gastelum R, Orum TV, Stowel LJ and Myers DE. 1994. Geographic information systems and geostatistics in the design and validation of regional plant virus management programs. *Phytopathology* 84: 898-905.
- Ojiambo PS and Holmes GJ. 2011. Spatiotemporal spread of cucurbit downy mildew in the eastern United States. *Phytopathology* 101:451-461. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0240>
- Olivas-Peraza DD, Leyva-Madrigal KY, Maldonado-Mendoza IE and Félix-Gastélum R. 2021. *Curvularia muehlenbeckiae* causing leaf spot on johnson grass in Mexico. *Mycological Progress* 21: 50. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01805-0>
- Olivas-Peraza NG. 2018. Patogenicidad, caracterización morfológica y molecular de aislados de *Alternaria* spp. asociados al tizón foliar en higuera silvestre (*Ricinus communis* L.) en Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente. Universidad Autónoma de Occidente. Los Mochis, Sinaloa. 66p.
- Rott M, Xiang Y, Boyes I, Belton M, Saeed H, Kesanakurti P, *et al.* 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Disease* 101:1489–1499. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0306-RE>.
- Rubio L, Galipienso L and Ferriol I. 2020. Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Frontier in Plant Science*. 11:1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>.
- SAGARPA-SENASICA. 2016. Roya del tallo del trigo, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Ug99 Eriksson and Henning. *Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria*. Código EPPO: PuccGT. Ficha Técnica No. 25. 14p.
- Sánchez CM. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. Pp. 17-28. En: Cruz- Ortega J, García-Estrada R y Carrillo-Facio A. (eds.). *Enfermedades de las hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. 255p.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria* an identification manual. CBS. Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 775p.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Tovar-Pedraza JM, Márquez-Licona G, Bárcenas-Santana D, Leyva-Madrigal KY, Mora-Romero GA, Llaven-Valencia G and García-León E. 2022. Occurrence of *Curvularia pisi* and *C. muehlenbeckiae* causing leaf spot on guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) in Mexico. *Plant Disease* 107:565. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0858-PDN>.
- Turina M, Ricker MD, Lenzi R, Masenga V, Ciuffo M. 2007. A Severe Disease of Tomato in the Culiacan Area (Sinaloa, Mexico) Is Caused by a New Picorna-Like Viral Species. *Plant Disease* 91:932–941. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-8-0932>.
- Vogel E, Santos D, Mingels L, Verdonck TW and Broeck JV. 2019. RNA interference in insects: protecting beneficials and controlling pests. *Frontier Physiology* 10:1912. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>.
- Volvas C, and Di-Franco A. 2004. Cucumber Mosaic virus in *Nicotiana glauca*. *Journal of Plant Pathology* 86:91-92.
- Wisler GC and Norris RF. 2005. Interaction between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Science* 53: 914-917. <https://doi.org/10.1614/WS-04-051R.1>
- Yazdkhastia E, Hopkins RJ and Kvarnheden A. 2021. Reservoirs of plant virus disease: Occurrence of wheat dwarf virus and barley/cereal yellow dwarf viruses in Sweden. *Plant Pathology* 70: 1552-1561. <https://doi.org/10.1111/ppa.13414>
- Zimdahl RL. 1980. Weed-crop competition: A review. *Int. Plant Prot. Center, Oregon. State University Carvallis, Oregon*. 195 p.



Artículo de Revisión

Virus y viroides en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su manejo con PGPR

Erika Janet Zamora-Macorra¹, *Norma Ávila-Alistac², Erika Lagunes-Fortiz², ¹Departamento de Preparatoria Agrícola, ²Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5, carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230; Sergio de los Santos-Villalobos, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000.Ciudad Obregón, Sonora. *Autor de correspondencia: alixtac@gmail.com

*Autor de
correspondencia:
Norma Ávila-Alistac
alixtac@gmail.com

Sección:
Número Especial

Recibido: 23 Agosto, 2023
Aceptado:
26 Noviembre, 2023
Publicado:
30 Noviembre, 2023

Cita:
Zamora-Macorra EJ,
Ávila-Alistac N, Lagunes-
Fortiz E y de los Santos-
Villalobos S. 2023. Virus
y viroides en el cultivo de
tomate (*Solanum lycopersicum*) y su manejo con
PGPR. Revista Mexicana
de Fitopatología
41(4): 66-83.
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-7>



RESUMEN

Los virus y viroides causan diversas enfermedades en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en el mundo, generando pérdidas económicas importantes. Se han reportado 60 virus y siete viroides en el cultivo, de los cuales 23 están presentes en México. Es necesaria la búsqueda de alternativas de manejo de estos patógenos con el fin de mitigar su impacto, pues una vez que éstos se han establecido en el cultivo, se recomienda la erradicación de las plantas sintomáticas generando pérdidas de producción, aunado a la dificultad para evitar su diseminación. Por ello, el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria- PGPR), puede ser una alternativa efectiva para el manejo de estos patógenos. Los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Anabena* y *Stenotrophomonas*, se han implementado contra siete virus reportados en el cultivo de jitomate, pero en México solo se ha utilizado *Bacillus*. Se vislumbra que el uso de PGPR es una actividad que podría mitigar el impacto de enfermedades virales y que podría ser útil también para el manejo de viroides.

Palabras clave: Viroids, viruses, *Solanum lycopersicum*, PGPR, *Pseudomonas*, *Bacillus*.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*), originario del sur de América y actualmente distribuido en el mundo, está adaptado a condiciones tropicales y templadas (Hanssen y Lapidot, 2012). Es una de las hortalizas más cultivadas bajo condiciones de invernadero (Sánchez-del Castillo *et al.*, 2009) y uno de los cultivos más rentables y consumido mundialmente. En el 2021, se cosecharon 256 770 677 toneladas (FAO, 2023) en el mundo. En México la producción de este cultivo es una actividad de vital importancia en el ámbito social y económico por la captación de divisas y la generación de empleos (Hernández-Martínez *et al.*, 2004). No obstante,

los patógenos y plagas insectiles pueden reducir su rendimiento y calidad (Savary *et al.*, 2019). Por ejemplo, las enfermedades causadas por virus y viroides provocan pérdidas económicas en el cultivo a nivel mundial (Ling y Zhang, 2009; Antignus *et al.*, 2002) y aunque en México no existe información precisa del impacto económico de estos patógenos, las detecciones constantes (Figura 1) son un riesgo latente para la producción nacional. Se ha estimado un impacto económico global mayor a \$30 billones de dólares anuales causado por enfermedades causadas por virus en cultivos de importancia económica (Sastry, 2013).

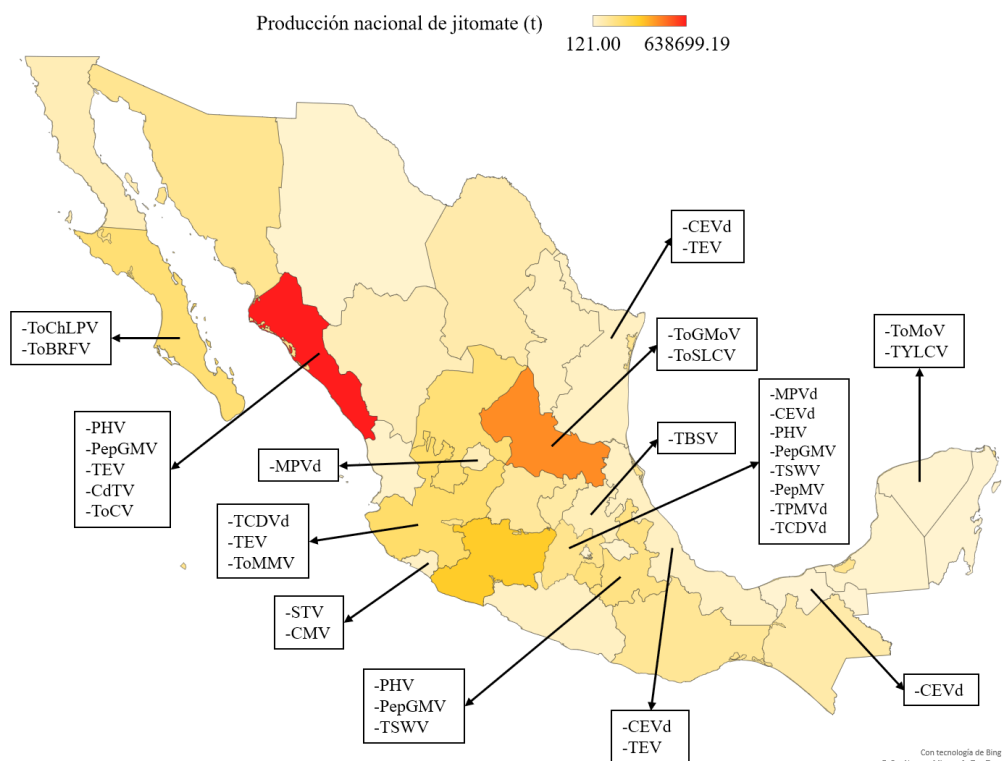


Figura 1. Estados de la República Mexicana donde se detectaron por primera vez virus y viroides en el cultivo de jitomate.

Virus en jitomate

Los virus son agentes infecciosos (parásitos obligados), constituidos de ácido nucleico (ARN y ADN) y envueltos de proteínas, que son capaces de replicarse dentro de las células vivas (Hancinský *et al.*, 2020), por lo que dependen exclusivamente de la maquinaria celular de su hospedante (Subramanya, 2013). Estos pueden tener diversas formas, tales como varilla rígida y flexible, bastones rígidos, bacilos, poliédricas, geminadas, entre otros (ICTV, 2021).

En el 2011, se publicó los 10 principales virus de importancia internacional de acuerdo con la comunidad internacional en virología. Éstos fueron *Tobacco mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Cauliflower mosaic virus*, *African cassava mosaic virus*, *Plum pox virus*, *Brome mosaic virus* y *Potato virus X*; de los cuales, seis afectan al jitomate (Scholthof *et al.*, 2011). A nivel mundial, los principales virus que han causado pérdidas en el cultivo de jitomate, incluyen *Tomato leaf curl virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Beet curly top virus*, *Tomato bushy stunt virus* y *Tomato spotted wilt virus* (Sastry, 2013); y desde el 2019, el *Tomato brown rugose fruit virus* es una amenaza latente ya que aún no existen variedades tolerantes y en México se encuentra afectando las principales zonas productoras.

El Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) clasificó a los todos los virus dentro de 189 familias, 2,224 géneros y 9,110 especies (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) (ICTV, 2021). En el cultivo de jitomate se han reportado alrededor de 60 virus, de estos 23 están presentes en México (Cuadro 1, Figura X). Del total de virus que infectan al cultivo, 27 pertenecen al género *Begomovirus* (ssDNA)

Cuadro 1. Virus reportados en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*), a nivel mundial y en México.

Familia	Genero	Especie	Tipo de genoma	Referencia
Geminiviridae	<i>Begomovirus</i>	* <i>Pepper golden mosaic virus</i> , * <i>Tomato chino La Paz virus</i> , * <i>Tomato golden mottle virus</i> , * <i>Tomato leaf curl Bangladesh virus</i> ,* <i>Tomato mottle virus</i> , * <i>Tomato severe leaf curl virus</i> , * <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , * <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , <i>Tobacco leaf curl virus</i> , <i>Tomato bright yellow mottle virus</i> , <i>Tomato chlorotic leaf curl virus</i> , <i>Tomato enation leaf curl virus</i> , <i>Tomato common mosaic virus</i> , <i>Tomato curly stunt virus</i> , <i>Tomato chlorotic leaf distortion virus</i> , <i>Tomato chlorotic mottle Guyane virus</i> , <i>Tomato dwarf leaf virus</i> , <i>Tomato golden mosaic virus</i> , <i>Tomato golden vein virus</i> , <i>Tomato interveinal chlorosis virus</i> , <i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> , <i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> , <i>Tomato leaf curl purple vein virus</i> , <i>Tomato mosaic Havana virus</i> , <i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ; <i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i> , <i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> , <i>Tomato yellow mosaic virus</i> ; <i>Tomato leaf curl virus Arusha virus</i> , <i>Tomato leaf curl Ghana virus</i>	DNA	Holguin-Peña <i>et al.</i> , 2004; Honguin-Peña <i>et al.</i> , 2007; Mauricio-Castillo <i>et al.</i> , 2007; CABI, 2020; Mauricio-Castillo <i>et al.</i> , 2006; Cardenas-Conejo <i>et al.</i> , 2010; Avedi <i>et al.</i> , 2021

Cuadro 1. Continúa

Familia	Genero	Especie	Tipo de genoma	Referencia
Potviridae	<i>Potyvirus</i>	* <i>Tobacco etch virus</i> , <i>Potato virus Y</i> , <i>Pepper vein mottle virus</i> , <i>Peru tomato mosaic virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020 Fernandez-Northcote and Fulton, 1980
Totiviridae	<i>Amalgavirus</i>	* <i>Southern tomato virus</i>	dsRNA	Sabanadzovic et al., 2009
Virgoviridae	<i>Tobamovirus</i>	* <i>Tobacco mosaic virus</i> , * <i>Tomato brown rugose fruit virus</i> , * <i>Tomato mottle mosaic virus</i> , <i>Tomato mosaic virus-ToMV</i>	ssRNA +	CABI, 2020; Cambrón-Crisantos et al., 2019
Secoviridae	<i>Nepovirus</i>	* <i>Tobacco ringspot virus</i> , <i>Tomato black ring virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
Secoviridae	<i>Torradorvirus</i>	<i>Tomato torrado virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
Tombusviridae	<i>Tombusvirus</i>	* <i>Tomato bushy stunt virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
Closteroviridae	<i>Crinivirus</i>	* <i>Tomato chlorosis virus</i> , <i>Tomato infectious chlorosis virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
Bunyaviridae	<i>Orthospovirus</i>	* <i>Tomato spotted wilt virus</i> , <i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> , <i>Pepper necrotic spot virus</i> , <i>Tomato chlorotic spot virus</i> , <i>Tomato necrotic ring virus</i>	ssRNA + ssRNA +	CABI, 2020; Nagata, 2000
Betaflexiviridae	<i>Carlavirus</i>	* <i>Cowpea mild mottle virus</i>	ssRNA +	EPPO, 2020
Alphaflexiviridae	<i>Potexvirus</i>	* <i>Pepino mosaic virus</i> , <i>Potato virus X</i>	ssRNA +	EPPO, 2020
Comoviridae	<i>Tymovirus</i>	<i>Eggplant mosaic virus</i>	ssRNA +	EPPO, 2020
	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
Bromoviridae	<i>Alfavirus</i>	* <i>Alfalfa mosaic virus</i>	ssRNA	De la Torre-Almaráz et al., 2003
	<i>Cucumovirus</i>	* <i>Cucumber mosaic virus</i> , <i>Peanut stunt virus</i> , <i>Tomato aspermy virus</i>	ssRNA +	Lecoq and Desbiez, 2012
	<i>Ilarvirus</i>	* <i>Tobacco streak virus</i> , <i>Parietaria mottle virus</i>	ssRNA +	CABI, 2020
	<i>Curtovirus</i>	* <i>Beet curly top virus</i>	ssDNA	Chen and Gilbertson, 2016 Front Matter (apsnet.org)

*Viruses presentes en México.

(Hogenhout *et al.*, 2008), y el resto se distribuyen en 18 géneros, donde *Orthospovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* y *Cucumovirus* tienen mayor número de especies después del género *Begomovirus*. En algunos casos, los virus son transmitidos por vectores, como los *Potyvirus* que son transmitidos por áfidos; los *Orthospovirus* por thrips (Aphidinae) (Gibbs *et al.*, 2008; Subramanya, 2013), y los *Begomovirus* son transmitidos principalmente por mosquitas blancas (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*) (Hogenhout *et al.*, 2008), haciendo más completo el manejo de estos fitopatógenos.

Por lo general, los síntomas causados por virus son difíciles de identificar porque usualmente son mezclas de infecciones o virus que están o no relacionados entre sí (Sastry *et al.*, 2019). Es claro que los síntomas reducen el vigor, calidad y rendimiento de los cultivos (Figura 2) (Subramanya, 2013). Las enfermedades causadas por estos fitopatógenos representan un gran desafío para la agricultura, además el cambio climático y las prácticas agrícolas del cultivo han favorecido brotes de enfermedades y su dispersión (Jones and Naidu, 2019).



Figura 2. Síntomas relacionados a los virus y viroides in solanáceas. A) Síntomas de deformación and mosaico inducido por *Tomato brown rugose fruit virus*; B and C) Síntomas relacionados al *Mexican papita viroid*; D and E) Síntomas relacionados al *Tomato spotted wilt virus* in bell pepper and tomato; F) Síntomas relacionados al *Tobacco mosaic virus*.

Viroides en el cultivo de tomate

Los viroides son agentes infecciosos de menor complejidad estructural y genética, constituidos de una cadena circular de RNA desnudo, cerrada covalentemente y de bajo peso molecular (246 a 401 nucleótidos de longitud) (CITA). Algunos son patogénicos y otros se replican sin causar síntomas en su hospedante (Flores *et al.*, 1998). La mayoría de los viroides conocidos fueron descubiertos por los daños causados en diversos cultivos de importancia económica (Flores y Randles, 2003).

Actualmente, se han descrito 33 viroides clasificados por el ICTV, agrupados en dos familias, dependiendo de la parte de la célula en la que se replican: Pospiviroidae (28 species) y Avsunviroidae (five species) (Di Serio y Flores, 2008). Cada familia está constituida por géneros y éstos por especies que pueden tener numerosas variantes de su secuencia, conocidas como cepas (Flores *et al.*, 1998; 2000). Una vez que ingresan a la célula del hospedante, los Pospiviroidae se mueven hacia el núcleo antes de iniciar su replicación, mientras que los Avsunsoviroidae se replican en los cloroplastos (Subramanya, 2013).

Desde 1988, en diversos países se han detectado enfermedades en plantas de jitomate infectadas naturalmente por viroides; todos de la familia Pospiviroidae como *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (Galindo *et al.*, 1982), *Mexican papita viroid* (MPVd) que podría considerarse variante del TPMVd (Verhoeven *et al.*, 2011), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Puchta *et al.*, 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) (Walter *et al.*, 1980; Walter, 1987), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Mishra *et al.*, 1991; Fagoaga y Duran-Vila, 1996; Verhoeven *et al.*, 2004), *Indian tomato bunchy top viroid* (Mishra *et al.*, 1991) que se considera una cepa del CEVd (Singh *et al.*, 2003), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) (Singh *et al.*, 1999) y *Columnnea latent viroid* (CLVd) (Verhoeven *et al.*, 2004). En infecciones artificiales se ha logrado infectar al jitomate con el *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (Matsushita y Kumar, 2009) y *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) (Cuadro 2) (Verhoeven *et al.*, 2009).

Todos los viroides son transmitidos fácilmente por inoculación mecánica (Subramanya, 2013) y por contacto; por ejemplo, con herramientas utilizadas en la poda, mediante la ropa, por la manipulación del cultivo y el contacto directo entre plantas cercanas (Hammond, 2017). En otros casos, también se transmiten por semillas, propagación vegetativa, injertos, polen e insectos (Verhoeven *et al.*, 2004). La eficiencia en que los viroides pueden o no ser transmitidos por semilla varía entre especies vegetales y viroidales (Flores *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2003; Chung y Choi, 2008). Las infecciones de viroides en cultivos comerciales de jitomate han sido ligadas a la importación de semillas y de plantas ornamentales (Batuman y Gilbertson, 2013; Van Brunshot *et al.*, 2014; Verhoeven *et al.*, 2012). Por la diversidad de especies de viroides, incluyendo algunas endémicas y la presencia de infecciones mixtas en el cultivo de tomate, México representa un centro de origen de viroides (Aviña-Padilla *et al.*, 2022).

Cuadro 2. Viroides que afectan el cultivo de tomate a nivel mundial.

Especies	Localización	Sintomas *	Tipo de transmisión	Pérdidas e incidencias	Referencias
<i>Tomato planta macho viroid</i> = <i>Mexican papita viroid</i> (TPMVd= MPVd)	Mexico (1982, 2008 and 2020) Canada (2008)	Stunting; chlorosis in the apex, tan or purple leaves, epinasty and severe deformation, reduction in the size and number of fruits and abortion of flowers.	Probable vector <i>Myzus persicae</i> Seed by contaminated pollen	Causes significant losses in yield. Incidences of 5% on the crop.	Galindo <i>et al.</i> , 1982, 1986; Ling and Zhang, 2009; Mejorada-Cuellar, 2020; Ling and Bledsoe, 2009; Yanagisawa and Matsushita, 2017; Yanagisawa and Matsushita, 2018; Aviña-Padilla <i>et al.</i> , 2018; Matthews-Berry, 2010; Li and Ling, 2012
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd)	Discovered in 1922 distributed worldwide but eradicated in most countries. Australia (2011)	Epinasty, chlorosis, violet color with bright yellow central nervation, deformation and reduction in size, brittle, and necrotic central nervation, short internodes, with stunted shoots and necrosis, abortion of flowers, small and hard fruits with dark green spots and irregular maturing	Seed Vector <i>M. persicae</i> (Transcapsidación with <i>Potato leaf roll virus</i>)	Reduction of crop biomass and yield by up to 89%. incidence of 3% in cherry tomato (<i>S. lycopersicum</i> cv. Perino).	Owens, 2007; Matthews-Berry, 2010; van Brunshot <i>et al.</i> , 2014; Yanagisawa and Matsushita, 2017; Matsushita <i>et al.</i> , 2011; Diener, 1987; Singh <i>et al.</i> , 2003 NSW Government, 2012; Mackie <i>et al.</i> , 2019
<i>Tomato apical stunt viroid</i> (TASVd)	Israel (1999 and 2000) Some countries in Asia and Africa, several European countries.	Short internodes; deformed, brittle leaves with yellowing; reduction and colorlessness in fruits (pale reddish)		Incidence of almost 100%	Antignus <i>et al.</i> , 2002, 2007; CABI, 2018; Matsuura <i>et al.</i> , 2010; Nielsen <i>et al.</i> , 2012
<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	Distributed worldwide, mainly in citrus fruits	Chlorosis, tanning and distortion, reduction in growth.	Found in commercial seed lots	No reports	Mishra <i>et al.</i> , 1991; Matthews-Berry, 2010; Verhoeven <i>et al.</i> , 2004 Constable <i>et al.</i> , 2019 Matsushita <i>et al.</i> , 2008; Singh <i>et al.</i> , 1999; Ling and Zhang, 2009; Verhoeven <i>et al.</i> , 2004 and 2007; Singh and Teixeira, 2006; Olmedo-Velarde <i>et al.</i> , 2018; Nie, 2012; Matthews-Berry, 2010; Antignus <i>et al.</i> , 2007; Matsuura <i>et al.</i> , 2010; Singh and Dilworth, 2009
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> (TCDVd)	Canada, U.S.A., Mexico, Japan, Hawaii (2017)	Reduction in growth and yellowing (chlorosis) of shoots, deformation of fruits, chlorosis turns bronze-colored, reddish and /or purple, epinasty Death of plants.	By active pollination by bumblebees (<i>Bombus terrestris</i> and <i>B. ignites</i>)	100% incidence in greenhouses	Nixon <i>et al.</i> , 2010; Batuman and Gilbertson, 2013; Matthews-Berry, 2010; Steyer <i>et al.</i> , 2010; Constable <i>et al.</i> , 2019.
<i>Columnnea latent viroid</i> (CLVd)	Netherlands and Belgium In 2007 in Great Britain and France and in 2011 in Mali.	Severe deformation, tanning and burning of leaves, epinasty, chlorosis and necrosis in nervation, reduction in size or delay in development.	Found in commercial seed lots	Decline in production in Great Britain. Incidence on field of approximately 1.5%.	Nixon <i>et al.</i> , 2010; Batuman and Gilbertson, 2013; Matthews-Berry, 2010; Steyer <i>et al.</i> , 2010; Constable <i>et al.</i> , 2019.
<i>Pepper chat fruit viroid</i> (PCFVd)	In 2009 in bell pepper plants and in 2013 in tomato seed shipments	Necrosis in young leaves and necrosis in nervation and petioles, stunting, reduction in fruit size.	Found in commercial seed lots	No reports	Verhoeven <i>et al.</i> , 2009; Chambers <i>et al.</i> , 2013; Constable <i>et al.</i> , 2019

*The symptoms described which each viroid may cause can be expressed as a group or separately in an infected plant.

Los síntomas inducidos por los viroides en jitomate, depende de la especie del viroide, el cultivar, la temperatura y la luz. La respuesta de las plantas está influenciada además por el silenciamiento del RNA, el cual puede jugar un papel importante en el desarrollo de los síntomas, combinado con elementos estructurales de los viroides (Di Serio *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2015). La variabilidad de los síntomas es provocada por las diferentes formas de expresión génica. Además, la infección por viroides puede o no inducir síntomas, pero por lo general inducen clorosis, bronceado, distorsión de hojas, achaparramiento, aclaramiento y decoloración de venas, malformación de flores, frutos, reducción del rendimiento y fruta no comercial (Figura 1 B y C) (Singh *et al.*, 2003; Kovalskaya y Hammond, 2014).

Manejo de enfermedades causadas por virus y viroides

Tanto los virus como los viroides provocan pérdidas en la producción y calidad de cultivos, por ello, es primordial buscar alternativas de manejo, para que el control sea directo, efectivo y ecológicamente seguro (Rojas *et al.*, 2018). Desde hace décadas se ha utilizado pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades en la agricultura mundial, con aplicaciones excesivas tanto al cultivo como el suelo (Karthika *et al.*, 2020) generando problemas de resistencia. En el caso particular del control de enfermedades causadas por virus y viroides, el uso de agroquímicos se ha limitado solo al control de vectores; pero en los últimos años, las tácticas de manejo se han encausado en buscar alternativas amigables con el medio ambiente, la flora y fauna.

Existe una tendencia mundial hacia el consumo de productos libres de plaguicidas. Independientemente del sistema agrícola y fitopatológico, es idóneo tener un enfoque de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que incluya medidas antes, durante y después del crecimiento del cultivo. Como primera instancia se recomienda el uso de cultivares resistentes a virus (Rojas *et al.*, 2018) y el saneamiento cultural, como prácticas de manejo de enfermedades (Karthika *et al.*, 2020).

El control efectivo de los virus y viroides incluye la detección temprana (diagnóstico), erradicación y métodos de control cultural (Kovalskaya and Hammond, 2014). La realización de medidas de control adecuadas permitirá evitar o aminorar la severidad de virus en plantas. Por lo que, el diagnóstico para la identificación del virus será importante para implementar estrategias de manejo. Las técnicas de diagnóstico pueden ser ELISA, inmunocromatografía o tira reactiva, hibridación de ácidos nucleicos, reacción en cadena polimerasa (PCR) y secuenciadores de siguiente generación (González-Garza, 2017).

Dada la importancia que tienen las enfermedades de índole viral y viroidal, se han buscado otras alternativas, como el uso de microorganismos benéficos para proteger el cultivo y mejorar el crecimiento y productividad vegetal (Sofy *et al.*, 2019).

Los métodos de control de virus y viroides fitopatógenos se han enfocado principalmente al uso de variedades resistentes; sin embargo, el manejo de estos patógenos en las plantas también se ha enfocado en la inducción de las defensas naturales en las mismas (Ryals *et al.*, 1994; Kloepper *et al.*, 2004). La demanda de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades, así como el uso de las moléculas inductoras (elicitores) que son capaces de desencadenar respuestas de defensa en las plantas, van en aumento (Nasir *et al.*, 2014). Para ello, se debe tomar en cuenta que la magnitud y la efectividad de la respuesta inducida dependerá del tipo de molécula, de la señal o su capacidad para inducir una señalización secundaria dentro del tejido (Eder y Cosio, 1994).

Por naturaleza, las plantas poseen la capacidad de defenderse de los fitopatógenos a través de la producción de sustancias que impiden o disminuyen el daño causado por los microorganismos. Esta respuesta se desencadena por el reconocimiento planta-patógeno, después de una infección local, donde las plantas activan sus respuestas de defensa de manera sistémica para incrementar la magnitud y la velocidad de respuesta contra el patógeno (Delgado-Oramas, 2020). La resistencia inducida es un estado en donde las plantas incrementan sus defensas contra el ataque fitopatógenos y puede desencadenarse mediante el estímulo de inductores químicos y/o biológicos (Choudhary *et al.*, 2007). De manera general, la resistencia inducida puede funcionar para el control de un amplio espectro de fitopatógenos (Kloepper, 1993). Se conocen dos tipos de resistencia inducida por patógenos en plantas: Resistencia Sistémica Inducida y la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz, 2007).

Resistencia Sistémica Inducida (RSI). La activación de la RSI requiere la señalización del ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET) (Beneduzi *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014), cuyos productos transducen coordinadamente los estímulos extracelulares que son reconocidos por receptores de la célula del hospedante a un gran número de moléculas blanco que integran las respuestas intracelulares específicas al estímulo externo (Walters, 2009; Delgado-Oramas, 2020; Jankiewicz y Koltonowicz, 2012; Choi *et al.*, 2014). La RSI se ha observado en diversas especies vegetales en reacciones de defensa contra hongos, bacterias y virus (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

Vías de señalización mediadas por ET, AJ, AS y su interacción. Las vías de señalización mediadas por AS, AJ y ET no funcionan de manera independiente (Maldonado-Cruz *et al.*, 2008; Derksen *et al.*, 2013). A través de una cascada de señales de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase-MAPKs) ocurre la activación de los genes insensitivos a etileno 1, 2 y 3 (*EIN1*, *EIN2* y *EIN3*) que regulan la expresión génica en respuesta a patógenos y

a heridas (Zhu *et al.*, 2011). En un estudio en mostaza se demostró que el etileno, en interacción con la ruta de la oxidasa alternativa mitocondrial (AOX), induce resistencia sistémica al *Turnip mosaic virus* (TuMV), debido a la posible limitación de la infección sistémica del virus y su acumulación en la planta (Zhu *et al.*, 2011). La señalización por jasmonatos, resulta esencial para la expresión de genes de defensa en plantas contra las plagas (Garnica *et al.*, 2012). El gen de la proteína insensible a la coronatina (*COII*) actúa como regulador central de la vía de señalización del AJ, ya que al unirse con el Jasmonil-Isoleucina (JA-Ile) promueve la liberación del factor de transcripción MYC2 y la transcripción de genes de respuesta a jasmonatos (Garnica *et al.*, 2012). Se tiene evidencia de que la expresión del gen *COII* y del gen *N* en la interacción tabaco-TMV confiere resistencia al TMV (Liu *et al.*, 2004).

El ácido salicílico (SA) es una molécula de señalización clave en la transducción de señales intracelulares que además de contribuir a la liberación de H₂O₂ y oxígeno activo derivado de éste, puede inducir la expresión de genes relacionados con la defensa (Shirasu *et al.*, 1997).

Respuesta Sistémica Inducida en jitomate contra virus fitopatógenos mediada por PGPR. La necesidad de garantizar calidad y altos rendimientos de los cultivos (con bajo impacto ambiental) ha permitido el surgimiento de diferentes insumos formulados con microorganismos, dentro de ellos se puede encontrar el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) (González *et al.*, 2018; Cancchignia *et al.*, 2015). La RSI es potenciada por estos microorganismos, las cuales son bacterias saprofitas que viven libremente en la rizósfera; al colonizar el sistema radicular de las plantas aportan, mediante secreciones, vitaminas, hormonas y otros factores de crecimiento que contribuyen a mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas (Walters, 2009).

La mayoría de las bacterias que se han reportado como PGPR pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, pero también se han reportado otras bacterias pertenecientes a los géneros: *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pizobielonas Serratia*, *Variovorax*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Vessey, 2003).

Existen estudios sobre el uso de PGPR empleados como inoculantes microbianos para proteger las plantas de jitomate contra infecciones virales en donde, adicionalmente, se registró un incremento el rendimiento de los cultivos (Tabla 3); como ejemplo, en México Samaniego (2017) reportó que la aplicación de *Bacillus* en plantas de tomate infectadas, además de observar un incremento en la altura y peso de las plantas tratadas, se generó resistencia sistémica inducida. En los últimos años la investigación sobre la ISR mediante los PGPR contra virus de relevancia

Cuadro 3. Especies de rizobacterias promotoras de crecimiento usados como control biológico para virus en el cultivo de jitomate.

Virus	PGPR	Resultados obtenidos	Referencia
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Serratia marcescens</i>		Raupach <i>et al.</i> , 1996
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (IN937a), <i>Bacillus subtilis</i> (IN937b), <i>Bacillus pumilus</i> (SE34)	Reduction in the area under the disease progress curve in diseased plants treated.	
		Induced systemic resistance	Zehnder <i>et al.</i> , 2000, 2001
Cucumber mosaic virus	<i>B. amyloliquefaciens</i> (IN937a)+ <i>B. subtilis</i> (GB03)	Favored plant growth and protected them against the virus.	Murphy <i>et al.</i> , 2003
		Induced systemic resistance	
	<i>Azospirillum lipoferum</i> (MRB16)+ <i>A. brasilienses</i> (SP7)+ <i>A. brasilienses</i> (N040)+ <i>Anabena oryzae</i>	Infected and treated plants increased their yield up to 48% in comparison with untreated plants.	Dashti <i>et al.</i> , 2007
		Promoted vegetative growth and yield. Prevented infection in 91% of plants.	Dashti <i>et al.</i> , 2012
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Stenotrophomonas rhizophilia</i> <i>Pseudomonas</i> spp. (B-25)	Promoted plant growth and yield. Reduced the incidence of the virus in plants.	Kirankumar <i>et al.</i> , 2008
Tobacco mosaic virus		Favored the development of roots in infected tobacco plants.	Wang <i>et al.</i> , 2009; Choi <i>et al.</i> , 2014
	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (IN937a) <i>Bacillus pumilus</i> (SE34)+ <i>B. amyloliquefaciens</i> (IN937a)		
Tomato chlorotic spot virus	<i>Bacillus pumilus</i> (SE34)+ <i>Bacillus sphaericus</i> (SE56)+ <i>B. amyloliquefaciens</i> (IN937a)	Reduced severity on the field and was the treatment that best controlled the disease.	Abdalla <i>et al.</i> , 2017
		Reduced the incidence of the virus in plants by 30%.	Murphy <i>et al.</i> , 2000; Zehnder <i>et al.</i> , 2001
Tomato mottle virus	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (IN 937a) <i>Bacillus subtilis</i> (IN 937b) <i>Bacillus pumilus</i> (SE34)	Reduced the development of symptoms and incidence.	
	<i>P. fluorescens</i> (CHA0) <i>P. fluorescens</i> (CHA0+CoT-1)	Increased yield and growth of infected and treated plants. Reduced the viral load.	Kandan <i>et al.</i> 2005; 2002
Tomato spotted wilt virus	<i>P. fluorescens</i> (CHA0+CoT-1+CoP-1)		
	<i>B. amyloliquefaciens</i> (MBI600)	Reduced the incidence of the virus by 80%.	Beris <i>et al.</i> , 2018
Tomato yellow leaf curl virus	<i>Enterobacter asburiae</i> (BQ9)	Reduced the severity in treated and infected plants by 52%.	Li <i>et al.</i> , 2016
Potato virus Y	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (strain MBI600)	Reduced the systemic accumulation of viruses.	Beris <i>et al.</i> , 2018
Groundnut bud necrosis virus	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (VB7)	Reduced symptoms by around 84%	Vanthana <i>et al.</i> , 2019

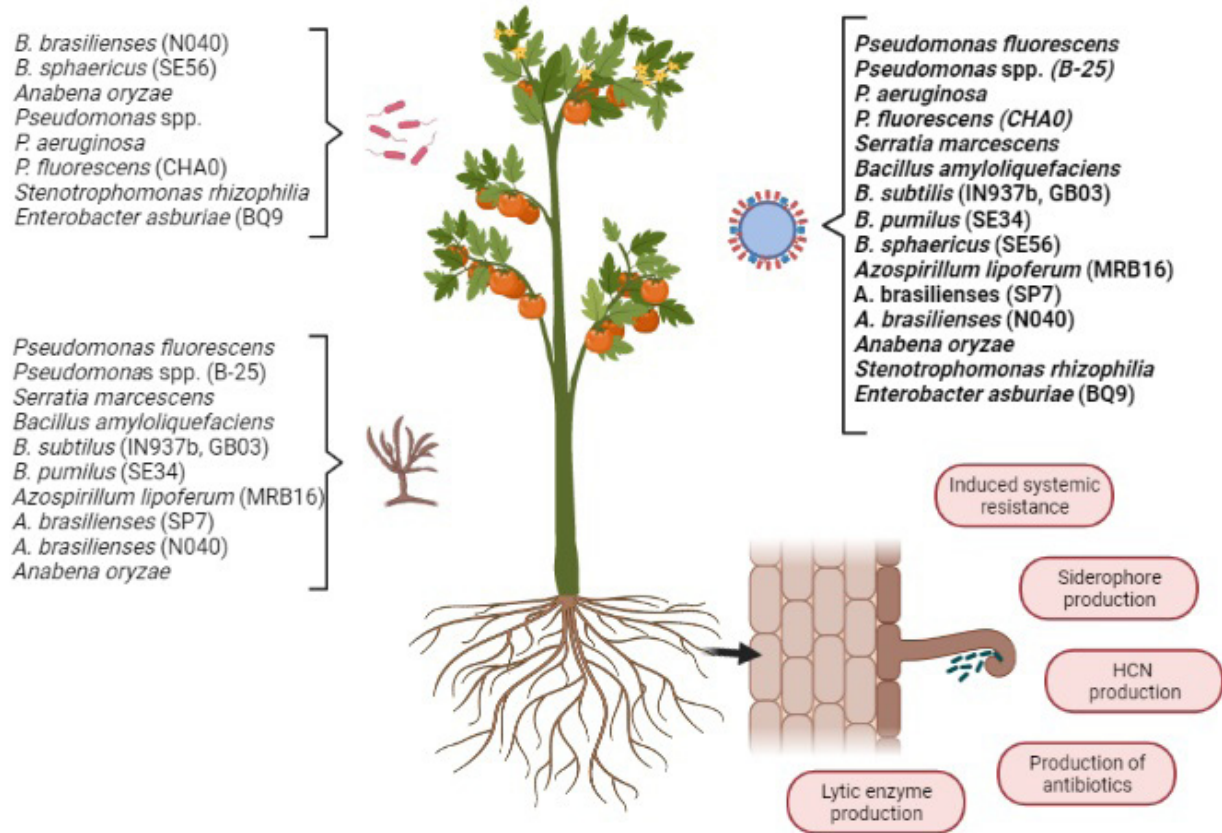


Figura 2. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) usados para controlar hongos fitopatógenos, bacterias y virus en los cultivos de jitomate y mecanismos de las PGPR para proteger al jitomate de enfermedades virales. Creado en: Bio-render.com

económica (20 virus) en diversos cultivos ha tomado una mayor importancia (Sofy *et al.*, 2019); sin embargo, a pesar de las investigaciones para contrarrestar los virus, aún se tiene limitadas investigaciones, principalmente para el caso de los viroides. Los trabajos se han encausado en cultivos de *Musa* spp., *Vigna unguiculata*, *V. mungo*, *Vicia faba*, *Momordica charantia*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *N. tabacum* cv. *Xanthi-nc*, *Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Phaseolus vulgaris*, *Datura metel* y *Cucurbita maxima* (Sofy *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Las enfermedades inducidas por virus y viroides afectan el rendimiento y calidad del cultivo de jitomate, y otros cultivos de importancia económica en el mundo. En

México, son limitadas las investigaciones sobre el impacto de bacterias promotoras del crecimiento en plantas de jitomate como inductores de resistencia contra estos patógenos o incluso para mejorar la sanidad del cultivo. Solo se ha reportado el uso de *B. subtilis* para el control del *Tobacco mosaic virus* en jitomate (Hernández-Santiago *et al.*, 2020). Por ello, el uso de PGPR es una alternativa promisoriosa para integrar en el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades, por ser amigable con el medio ambiente, seguro y efectivo para el control de una diversidad de fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Abdalla OA, Bibi S, Zhang S. 2017. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to control *Papaya ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 50: 584–597. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1352248>
- Antignus Y, Lachman O and Pearlsman M. 2007. The spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. Plant Dis. 91:47-50.
- Antignus Y, Lachman O, Pearlsmand M, Gofman R and Bar-Joseph M. 2002. A new disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain to *Tomato apical stunt viroid* (TASVd). Phytoparasitica, 30: 502 - 510.
- Aviña-Padilla K, Rivera-Bustamante R, Kovalskaya NY and Hammond WR. 2018. Pospiviroid Infection of Tomato Regulates the Expression of Genes Involved in Flower and Fruit Development. Viruses 10: 516. <https://doi.org/10.3390/v10100516>.
- Batuman O and Gilbertson RL. 2013. First Report of *Columnea latent viroid* (CLVd) in tomato in Mali. Disease Note 97 (5). <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0920-PDN>
- Benaissa A. 2019. Plant growth promoting Rhizobacteria a review. Algerian Journal of Environmental Science and Technology 5(1): 873-880.
- Beneduzi A, Ambrosini A and Passaglia LMP. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology. 35(4 Suppl):1044-1051.
- Beris D, Theologidis I, Skandalis N and Vassilakos N. 2018. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against *Tomato spotted wilt virus* and *Potato virus Y*. Scientific Reports 8:10320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3>
- CABI. Tomato apical stunt viroid. Datasheet. 20/04/18 Original text by: Rosemarie W Hammond, Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-ARS, Beltsville, Maryland, USA. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/52804#todistribution>
- Camarena-Gutiérrez, G., de la Torre-Almaráz, R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 13(2): 157-162.
- Choi HK, Song GC, Yi HS and Ryu CM. 2014. Field Evaluation of the Bacterial volatile derivative 3-Pentanol in priming for induced resistance in Pepper. Journal of Chemical Ecology 40(8):882-92.
- Chambers GA, Seyb AM, Mackie J, Constable FE, Rodoni BC, Letham D, Davis K and Gibbs MG. 2013. First Report of Pepper chat fruit viroid in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity. Disease notes. 97 (10)<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0293-PDN>
- Choudhary DK, Prakash A and Johri BN. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. Indian Journal of Microbiology 47(4): 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Chung BN and Choi GS. 2008. Incidence of *Coleus blumei* viroid 1 in Seeds of Commercial Coleus in Korea. The Plant Pathology Journal 24(3): 305–308. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.3.305>

- da Cruz CL, Pinto VF and Patriarca A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166(1):1-14.
- Dashti NH, Ali NY, Cherian VM and Montasser MS. 2012. Application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in combination with a mild strain of *Cucumber mosaic virus* (CMV) associated with viral satellite RNAs to enhance growth and protection against a virulent strain of CMV in tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34:177–186. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.685495>
- Dashti NH, Montasser MS, Ali NY, Bhardwaj RG and Smith DL. 2007. Nitrogen biofixing bacteria compensate for the yield loss caused by viral satellite RNA associated with *Cucumber mosaic virus* in tomato. *The Plant Pathology Journal* 23:90–96. <https://doi.org/10.5423/ppj.2007.23.2.090>
- Derksen H, Rampitschb C and Daayf F. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science*, 207:79-87.
- Di Serio F and Flores F. 2008. Viroids: Molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biology*, 5: 128 – 131.
- Di Serio F, De Stradis A, Delgado S, Flores R and Navarro B. 2013. Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. *Front. Plant Sci.* 3:288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00288>
- Diener TO. 1987. Biological Properties. In: Diener T.O. (eds) *The Viroids. The Viruses*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2_2
- Eder J and Cosio EG. 1994. Elicitors of plant defense responses. *International review of cytology*. 148:1-36.
- Fagoaga C and Duran-Vila N. 1996. Naturally occurring variants of *citrus exocortis viroid* in vegetable crops. *Plant Pathology* 45: 45–53.
- FAO (Food and agriculture organization statistics). 2020. Consulted 16-December-2020. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Canchignia H., Cruz N., Barrera A., Morante-Carriel J., Canchignia M., Peñafiel M. 2015. Applying Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) of the Genus *Pseudomonas* ssp as Biological Controllers of Insects and Plague Nematodes. *Revista Ciencia y Tecnología*, ISSN-e 1390-4043, ISSN 1390-4051, Vol. 8, N° 1, 2015, págs. 25-30. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5319281>
- Constable F, Chambers G, Penrose L, Daly A, Mackie J, Davis K, Rodoni B and Gibbs M. 2019. Viroid-infected Tomato and Capsicum Seed Shipments to Australia *Viruses* 11: 98. <https://doi.org/10.3390/v11020098>.
- Flores R and Randles J. 2003. *Viroids: Properties, Detection, Diseases and Their Control* Ahmed Hadidi, Science publishers, Inc. United States of America. 392 p.
- Flores R, Minoia S, Carbonell A, Gisel A, Delgado S, López-Carrasco A, Navarro B and Di Serio F. 2015. Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research*. Volume 209:136-145.
- Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M and Diener TO. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143: 623-629.
- Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M. and Diener T.O. 2000 *Viroids*. In: *Virus Taxonomy, 7th Report International of the Committee Taxonomy Viruses*. Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B. (eds.), San Diego, Academic Press, 1009-1024 pp.
- Flores R, Di Serio F, Navarro B, Duran-Vila NURIA and Owens RA. 2011. Viroids and viroid diseases of plants. *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems* 1: 311-346.
- Galindo J, López M and Aguilar T. 1986. Significance of *Myzus persicae* in the spread of *tomato planta macho viroid*. *Fitopatol. Bras.* 2: 400-410.
- Galindo J, Smith DR and Diener TO. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopatology* 72: 49–54.
- Garnica VA, Raya GJ, López BJ y Beltrán PE. 2012. Señalización del ácido jasmónico y el óxido nítrico durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* 55:28-41.
- González-Garza R. 2017. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de fitopatología* 35(3):591-610. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-1>.
- Hancinský R, Mihálik D, Mrkvová M, Candresse T and Glasa M. 2020. *Plants* 9 (667): 17 p. <https://doi.org/10.3390/plants9050667>

- Hammond WR. 2017. Viroids and Satellites. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00001-2>. Economic Significance of Viroids in Vegetable and Field Crops. Chapter 1. 5-13 pp.
- Hernández-Martínez J, García-Mata R, Valdivia-Alcalá y Omaña-Silvestre JM. 2004. Evolución de la competitividad y rentabilidad del cultivo del tomate rojo (*Lycopersicon esculentum* L.) en Sinaloa, México. *Agrociencia* 38: 431-436.
- Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE and Redinbaugh MG. 2008. Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46: 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Jankiewicz U and Koltonowicz M. 2012. The involvement of *Pseudomonas* bacteria in Induced Systemic Resistance in Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 48(39):244-249.
- Jones RAC and Naidu RA. 2019. Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Annual Review of Virology* 6:387-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>
- Kandan A, Commare RR, Nandakumar R, Ramiah M, Raguchander T and Samiyappan R. 2002. Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against tomato spotted wilt virus in tomato. *Folia Microbiologica* 47:121–129. <https://doi.org/10.1007/bf02817669>
- Kandan A, Ramiah M, Vasanthi VJ, Radjacommaré R, Nandakumar R, Ramanathan A, Samiyappan R. 2005. Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and enhanced yield in tomato. *Biocontrol Science and Technology* 15:553–569. <https://doi.org/10.1080/09583150500088546>
- Kirankumar R, Jagadeesh KS, Krishnaraj PU and Patil MS. 2008. Enhanced growth promotion of tomato and nutrient uptake by plant growth-promoting rhizobacterial isolates in presence of *Tobacco mosaic virus* pathogen. *Karnataka Journal Agriculture Sciences* 21:309–311.
- Karthika S, Varghese S and Jisha MS. 2020. Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against plant diseases. *3 Biotech* 10:320. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02306-1>
- Karthika S, Midhun SJ and Jisha MS. 2020. A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial Pathogenesis* 8: 142: 104049. [10.1016/j.micpath.2020.104049](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104049)
- Kloepper JW. 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as *biological* control agents. In: Metting, F. B (ed) *Soil microbial ecology— applications in agricultural and environmental management*. Dekker, New York, pp 255–274.
- Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94:1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Kloepper, J. W., Tuzun, S., Kuć, JA. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*. 2:349-351. <https://doi.org/10.1080/09583159209355251>
- Li, H., Ding, X., Wang, Ch., Ke, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H. Guo, J. 2016. Control of *Tomato yellow leaf curl virus* disease by *Enterobacter asburiae* BQ9 as a result of priming plant resistance in tomatoes. *Turkish Journal Biology*. 40:150–159. <https://doi.org/10.3906/biy-1502-12>
- Li, R. and Ling K. 2012. Molecular and biological characterization of *Mexican papita viroid*. *Tomato Disease Workshop*, 28 p.
- Ling, K. and M. Bledsoe. 2009. First Report of *Mexican Papita Viroid* Infecting Greenhouse Tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.
- Ling, K.S. and W. Zhang. 2009. First Report of a Natural Infection by *Mexican Papita Viroid* and *Tomato Chlorotic Dwarf Viroid* on Greenhouse Tomatoes in Mexico. *Plant Disease*, 93: 1126.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh, K. S. P. 2004. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*.38(5):800-809.
- Mackie E.A, Barbetti J. M., Rodoni B., McKirdy S.J., and Jones A.C. R. 2019. Effects of a *Potato Spindle Tuber Viroid* Tomato Strain on the Symptoms, Biomass, and Yields of Classical Indicator and Currently Grown Potato and Tomato Cultivars. *Plant disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0312-RE>
- Maldonado-Cruz, E., Ochoa-Martínez, D. L., Tlapal-Bolaños, B. 2008. Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo Serie horticultura*. 14(1):55-59.
- Matthews-Berry, S. 2010. Emerging viroid threats to UK tomato production. The Food and Environment Research Agency (Fera). *Plant disease Factsheet*, 5 p.

- Matsuura, S., Matsushita, Y., Kozuka, Shimizu, S., Tsuda, S. 2010. Transmission of *Tomato chlorotic dwarf viroid* by bumblebees (*Bombus ignitus*) in tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 126, 111. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9515-2>
- Matsushita, Y., Usugi, T., Tsuda, S. 2011. Distribution of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in floral organs of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 441–447.
- Matsushita, Y., A. Kanda, T. Usugi, and S. Tsuda. 2008. First report of a *Tomato chlorotic dwarf viroid* disease on tomato plants in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 74: 182-184.
- Matsushita Y. & Kumar P. K. R. 2009. *In vitro* transcribed *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) RNA is infectious to Chrysanthemum and other plants. *Phytopathol.*, 99, 58–66.
- Mejorada-Cuellar B.Y., Zamora-Macorra E.J., Vilchis-Zimuta R., Zamora-Macorra M. 2020. Systemic acquired resistance to manage the *Mexican papita viroid* in tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.). *Agroproductividad*, 13(7): 75-80. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1686>
- Mishra, M.D., R.W. Hammond, R.A. Owens, D.R. Smith and T.O. Diener. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- Murphy, J. F., Reddy, M. S., Ryu, C. M., Kloepper, J. W., Li, R. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* 93:1301–1307. <https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.10.1301>
- Murphy, J. F., Zehnder, G. W., Schuster, D. J., Sikora, E. J., Polston, J. E., Kloepper, J. W. 2000. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. *Plant Disease*. 84:779–784. <https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.7.779>
- Nasir, M. N., Polo, L. D., Luzuriaga, L. W., Deleu, M., Lins, L., Ongena, M., Fauconnier, M. L. 2014. New alternatives to chemical pesticides: deciphering the action mechanisms of lipid based plant elicitors via complementary biophysical and biological approaches. In: 19th National Symposium on Applied Biological Sciences. Gembloux, Bélgica. (<https://orbi.uliege.be/handle/2268/165417>).
- Nie, X. 2012. Analysis of Sequence Polymorphism and Population Structure of Tomato chlorotic dwarf viroid and Potato spindle tuber viroid in Viroid-Infected Tomato Plants. *Viruses* 4(6):940-53. DOI: 10.3390/v4060940.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, Per Kryger, Mojca Viršček Marn, Irena Mavrič Pleško, Andreas Kahrer & Richard A. Gottsberger. 2012. No transmission of *Potato spindle tuber viroid* shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Eur J Plant Pathol* 133, 505–509 <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9937-0>
- Nixon T., R. Glover, Mathews-Berry S., M. Daly E. Hobden C. Lambourne V. Harju A. Skelton. 2010. *Columnnea latent viroid* (CLVd) in tomato: the first report in the United Kingdom. *Plant pathology*, 59 (2): 392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02127.x>
- NSW (New South Wales) Government. 2012. Plant Biosecurity Orange. Exotic Pest Alert: *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd) in tomatoes. Department of primary Industries. Plant Biosecurity Primefact, 1151: 4.
- Ö. Cem Çiftçi, Michael K. Osei, Sally A. Miller, Maria R. Rojas, Robert L. Gilbertson. 2019. Rasta disease of tomato in Ghanda is caused by the Pospiviroids *Potato spindle tuber Viroid* and *Tomato apical stunt Viroid*. *Plant disease*. 103 (7): 1525-1535. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1751-RE>.
- Olmedo-Velarde, A., Roy, Avijit., Belanger, C.A., Watanabe, S. Hamasaki, R.T., Mavrodieva, V. A., Nakhla, M.K., Melzer, M.J. 2018. First report of Tomato chlorotic dwarf viroid infecting greenhouse tomato in Hawaii. *Plant Disease* “First Look” paper. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1401-PDN>
- Owens, R.A. 2007. *Potato spindle tuber viroid*: The simplicity paradox resolved? *Molecular Plant Pathology*, 8:549-560.
- Delgado-Oramas, P.B. 2020. La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*. 35(1). e07. Epub 01 de abril de 2020. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522020000100001&lng=es&tlng=es.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., Bakker, P. A. H. M. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 52:347–75.
- Puchta, H., T. Herold, K. Verhoeven, A. Roenhorst, K. Ramm, W. Schmidt-Puchta, Sanger, H.L. 1990. A new strain of *potato spindle tuber viroid* (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15: 509–511.

- Samaniego, G. B., Reyes, R. A., Moreno, V. O. A., Tun, S. J. M. 2017. Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *La Revista de Protección Vegetal*. 32(1):10-22.
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S., Kloepper, J.W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against *Cucumber mosaic cucumovirus* using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*. 80:891–894. <https://doi.org/10.1094/pd-80-0891>
- Rojas MR, acedo M. A., Maliano M. R., Soto-Aguilar M, Souza J. O., Briddon R. W., Kenyon L., Rivera-Bustamante R. F., Murilo, Z. F., Adkins S., Legg J. P., Kvarnheden A., Wintermantel W. M., Sudarshana M. R., Peterschmitt M., Lapidot M., Martin D. P., Moriones E., Inoue-Nagata A. K. and Gilbertson R. L. 2018. World management of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 65:637-677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto080615-100327>
- Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*. 104:1109–1112.
- Sánchez-del Castillo, F.E., Moreno-Pérez C., Cruz-Arellanes, E.L. 2009. Producción de jitomate hidropónico bajo invernadero en un sistema de dosel en forma de escalera. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15:67-73.
- Singh, R.P., Teixeira da Silva, J. A. 2006. Ornamental plants: Silent carrier of evolving viroids. *In*: J. A. Teixeira da Silva (ed.), *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, 3: 531–539.
- Singh, R.P., Xianzhou, N. Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Singh RP, Ready KFM, Nie X. 2003. Part II. Biology. *In* ‘Viroids’. (Eds A Hadidi, R Flores, JW Randies, JS Semancik) pp. 30–48. (CSIRO Publishing: Australia).
- Singh, R. P., Dilworth, D. A. 2009. *Tomato chlorotic dwarf viroid* in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1), 111–116.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A., Lamb, C. 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*. 9:261-270. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.261>
- Scholthof, KB. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Honh T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12(9): 938-954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Skoric, D. 2017. Viroids and Satellites. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00005..> Chapter 5. Viroid Biology. 53-61.
- Subramanya, S. K. 2013. *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*. Springer Science+Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6524-5>
- Steyer S., Olivier T., Skelton A., Nixon T., Hobden E. 2010. *Columnnea latent viroid* (CLVd): first report in tomato in France. *Plant pathology*, 59 (4): 794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02261.x>
- Van Bogaert N., K. De Jonghe, E.J.M. Van Damme, M. Maes, G. Smagghe. 2015. Quantitation and localization of pospiviroids in aphids. *Journal of Virological Methods*. Volume 211, Pages 51-54.
- van Brunschot S. L., Verhoeven, J. Th. J., Persley, D. M., Geering, A. D. W., Drenth, A., Thomas, J. E. 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed *Eur J Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0379-8>
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. *In*: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, pp. 39–66. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_2
- Vanthana, M., Nakkeeran, S., Malathi, V. G., Renukadevi, P., Vinodkumar, S. 2019. Induction of in planta resistance by flagellin (Flg) and elongation factor-TU (EF-Tu) of *Bacillus amyloliquefaciens* (VB7) against groundnut bud necrosis virus in tomato. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103757
- Verhoeven J. T. J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T. M., Kox L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831,
- Verhoeven J. T. J., C. C. C. Jansen, J.W. Roenhorst, R. Flores, M. de la Peña. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*, Volume 144, Issues 1–2, Pages 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.002>

- Verhoeven, J.T.J., Botermans, M., Meeke, E. T. M. Meeke, J. W. Roenhorst. 2012. *Tomato apical stunt viroid* in the Netherlands: most prevalent pospiviroid in ornamentals and first outbreak in tomatoes. *Eur J Plant Pathol* 133, 803–810 <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0005-6>
- Verhoeven J Th J, J W Roenhorst, Owens, R. A. 2011. Mexican papita viroid and tomato planta macho viroid belong to a single species in the genus Pospiviroid. *Archives of Virology* 156(8):1433-7. [10.1007/s00705-011-0975-2](https://doi.org/10.1007/s00705-011-0975-2)
- Verhoeven, J. T., Jansen, J. C.C., Willemen, T.M, Kox, L.F.F, Owens R. A., Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 823-831
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255:571–586. <https://doi.org/10.1023/a:1026037216893>
- Walter, B. 1987. Tomato apical stunt. pp. 321-327. *In*: Diener, T.O. (ed.). *The Viroids*. Plenum Press, New York, USA.
- Walter, B., Thouvenal, J.C., Fauquet, C. 1980. Les virus de la tomate en Cote d’Ivoire. *Annales de Phytopathologie*, 12: 259– 275.
- Walters, D. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Protection*. 28: 459-465.
- Wang, S., Wu, H., Qiao, J., Ma, L., Liu, J., Xia, Y., Gao, X. 2009. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to *Tobacco mosaic virus* by *Bacillus* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19:1250–1258. <https://doi.org/10.4014/jmb.0901.008>
- Yanagisawa, H., Matsushita, Y. 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. *Eur J Plant Pathol*, 149:211–217 DOI [10.1007/s10658-017-1160-6](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1160-6).
- Yanagisawa, H., Matsushita, Y. 2018. Differences in dynamics of horizontal transmission of Tomato planta macho viroid and Potato spindle tuber viroid after pollination with viroid-infected pollen. *Virology Volume 516*, Pages 258-264.
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J., Kloepper, J. W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*. 107:39–50. <https://doi.org/10.1023/a:1008732400383>
- Zehnder, G. W., Yao, C., Murphy, J. F., Sikora, E. R., Kloepper, J. W. 2000. Induction of resistance in tomato against *Cucumber mosaic cucumovirus* by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol* 45:127–137. <https://doi.org/10.1023/a:1009923702103>
- Zhu, L., Li, Y., Li, L., Yang, J., Zhang, M. 2011. Ethylene is involved in leafy mustard systemic resistance to Turnip mosaic virus infection through the mitochondrial alternative oxidase pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76(3-4):166-172
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S., Esker, J., McRoberts, P., Nelson, A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & evolution* 3(3): 430-439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Fernandez-Northcote, E. N. and Fulton, R. W. 1980. Detection and characterization of Peru tomato virus strains infecting pepper and tomato in Peru. *Phytopathology* 70:315-320. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n04_315.PDF
- Avedi, E. K., Adediji, A. O., Kilalo, D. C., Olubayo, F. M., Macharia, I., Ateka, E. M., Machuka, E. M., & Mutuku, J. M. (2021). Metagenomic analyses and genetic diversity of Tomato leaf curl Arusha virus affecting tomato plants in Kenya. *Virology journal*, 18(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01466-z>
- Sofy, A. R., Sofy, M. R., Hmed, A. A. and El-Dougdoug K. 2019. Potential Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Enhancing Protection Against Viral Diseases. *In*: Maheshwari, D. K. and Dheeman, S. (eds). *Field Crops: Sustainable Management by PGPR*. Springer. pp 411-445.
- ICTV. 2021. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org>



Phytopathological Note

Phytopathology and cultural behaviors: putative recent introduction of Chaya-strain of *Cassava common mosaic virus* to Costa Rica

Mauricio Montero-Astúa*, Izayana Sandoval-Carvajal, Lisela Moreira, Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 11500-2060 San José, Costa Rica; **William Villalobos-Muller, Laura Garita, Sofía Carvajal-Rojas**, Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, 11500-2060 San José, Costa Rica.

*Corresponding author: mauricio.monteroastua@ucr.ac.cr

***Corresponding Author:**

Mauricio Montero-Astúa
mauricio.monteroastua@ucr.ac.cr

Section:
Special Number

Received:
23 August, 2023

Accepted:
22 November, 2023

Published:
30 November, 2023

Citation:
Montero-Astúa M, Sandoval-Carvajal I, Moreira L, Villalobos-Muller W, Garita L and Carvajal-Rojas. 2023. Phytopathology and cultural behaviors: putative recent introduction of Chaya-strain of *Cassava common mosaic virus* to Costa Rica. Mexican Journal of Phytopathology 41(4): 84-94. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-3>



ABSTRACT

Leaves of the shrub chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), spinach tree or ‘chicasquil’ (in Costa Rica), are consumed in the Mesoamerican culinary tradition, having its origin in South Mexico and Guatemala. Its infection by *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) was previously reported from Florida (USA) and Mexico. We report CsCMV detection in a chaya plant in Costa Rica with mosaic symptoms. Pathogenicity and association of virus and symptoms were demonstrated by mechanical inoculation in *Nicotiana benthamiana* and chaya plants. We hypothesize this infection corresponds to a recent introduction and discussed how cultural traditions impact the distribution of plant viruses. Recent literature suggested that CsCMV is a re-emergent virus affecting cassava production. The results herein highlighted the need to study its distribution and diversity throughout Latin America.

Keywords: chicasquil, virus spread, *Cnidoscolus aconitifolius*, var. Chayamansa, var. Estrella

Chaya, spinach tree or, in Costa Rica known as ‘chicasquil’ (*Cnidoscolus aconitifolius* spp. *aconitifolius*, Euphorbiaceae; syn. *Cnidoscolus chayamansa*) is a Mesoamerican shrub, probably native to southern Mexico and Guatemala, and distributed from southern Texas through South America. It was introduced to the Caribbean islands and from there to Florida, tropical Africa, Asia, and Oceania. Chaya is cultivated since pre-Hispanic times, it is used in traditional medicine, and

in the cuisine for indigenous groups and traditional recipes of several countries, including Costa Rica (Ebel *et al.*, 2019; Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002).

At least four cultivated varieties: ‘Chayamansa’, ‘Redonda’, ‘Estrella’, and ‘Picuda’ are recognized in Yucatan and Guatemala, in addition to the wild forms of the species. The plant is clonally propagated by stem cuttings and these varieties produce few or no seeds (Ebel *et al.*, 2019; Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002). In Costa Rica, Hammel *et al.* (2010) mentioned that at least two varieties are cultivated, the most common and distributed one, is called ‘Chicasquil’ and seems to correspond to variety ‘Picuda’, var. ‘Redonda’ is very rare, mainly in Baja Talamanca, where it is known as chaya among the indigenous communities.

In March 2020, mosaic symptoms were observed on new growth of a planted cutting of chaya (sample 20.222, Table 1) in a backyard in Moravia, San José (9.964091, -84.041644). Cuttings were given away among family and friends as: “chaya, a medicinal tree from southern Mexico”. As the new plant developed a light-green/dark-green mosaic was notorious in all leaves (Fig. 1a, b). The plant seems like chaya plant (chicasquil), but leaf morphology had some differences. There is no tradition in recognizing chaya varieties in Costa Rica, and we found discrepancies in the illustrations for the varieties between Ebel *et al.* (2019) and Ross-Ibarra and Molina-Cruz (2002), especially var. ‘Chayamansa’. Thus, our identification of the varieties is tentative, based on the authors descriptions and illustrations. The symptomatic plant seems to be var. ‘Estrella’ (uncommon in Costa Rica).

We hypothesized the observed symptoms correspond to a viral infection; therefore, the objective of this work was to verify the viral nature of the plant disease and to identify the virus species.

Table 1. Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) samples evaluated for viral symptoms and sources of stem cuttings for transmission assays.

Sample Code	Canton, Province	Collection Date	Variety	Symptoms	RT-PCR ^x
20.222	Moravia, San José	4/2020	Estrella	Mosaic	Positive ^y
20.439^z	Montes de Oca, San José	11/2020	Picuda	No	Negative
20.451	Pococí, Limón	11/2020	Estrella	No	Negative
21.030^z	Vázquez de Coronado, San José	2/2021	Chayamansa	No	Negative
21.031^z	Alajuela, Alajuela	2/2021	Picuda	No	Negative

^x Retro-transcription-Polymerase Chain Reaction with primer pair Potex4/Potex5 (Miglino *et al.*, 2006).

^y GenBank accession number OK642586, RdRp partial sequence.

^z Codes in Bold. Stakes (stem cuttings) were obtained to establish plants for inoculation assays (modified Koch’s postulates).

To test the hypothesis of a putative virus infection, the symptomatic plant was uprooted and transplanted to a nursery plastic pot #3000 (3 gallons vol.) using soil from the site of collection. The plant (20.222) is kept at LaFOV-CIBCM (Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José) greenhouse A (aphid-proof screen house with polycarbonate roof). Fresh leaf tissue was grinded in potassium phosphate buffer (0.05M, pH 7.0) and inoculated by rubbing a cotton swab wet with the leaf extract on the second and third younger leaves (from top to bottom) of 12 *Nicotiana benthamiana* plants sprinkled with carborundum. *N. benthamiana* plants were ca. two months old from germination, kept in a LaFOV-CIBCM greenhouse B, and in plastic nursery plant pots #100 with steam-disinfested soil. Additionally, 12 plants were inoculated with buffer as controls. Plants were evaluated once every seven days after inoculation (dai). A piece of the same chaya symptomatic tissue was fixed with Karnovsky solution in 0.05 M cacodylate buffer pH 7 at 6 - 8 °C and afterwards processed for Transmission Electron Microscopy (TEM) following previously described protocols (Montero-Astúa *et al.*, 2008).

Total Ribonucleic Acid (RNA) was extracted from chaya (sample 20.222) and from the symptomatic *N. benthamiana* (i20.222-Nb) following the protocol of the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). cDNA was obtained by retrotranscription with Maxima H minus first strand cDNA kit (Thermo Scientific, Lithuania) following the manufactures protocol. The cDNAs were tested for *Potexvirus* genus presence with degenerate genus specific primers, Potex4 (5'-AGCATGGCGCCATCTTGTGACTG-3') /Potex5 (5'-CTGAAGTCACAATGGGTGAAGAA-3'), 280bp amplicon (Migolino *et al.*, 2006; Table 2) in a final reaction volume of 25µL, containing 2 uL of the cDNA, 1X DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania), and 200nM each primer. Reactions were run in a thermal cycler (MJMini, Bio-Rad, Singapore) with the profile: 94 °C x 2 min; 45 x (94 °C x 30 sec; 60 °C x 1 min; 68°C x 1 min); 72 °C x 10 min. Additionally, PCR reactions were set with potexvirus primer pairs Potex1RC (5'-TCAGTRTTDGCRTCRAARGT-3') /Potex5V (5'-CAYCARCARGCMAARGAYGA-3') or Potex2RC (5'-AGCATRGCNSRCTCYTG-3') / Potex5V; expected amplicons of 735bp and 584bp, respectively (van der Vlugt and Berendsen, 2002) with the same PCR conditions as before and with the thermal profile: 95°C x 5min; 35 x (92°C x 30sec; 51.5°C x 30sec; 72°C x 10min); 72°C x 10min. Negative controls (PCR reaction mixture without cDNA, water instead) were included in all PCR runs and potexvirus positive controls with *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) from CIBCM-UCR collection (Montero-Astúa *et al.*, 2017). Amplification products were visualized by running a 1% agarose gel in 1X TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM glacial acetic acid, and 1 mM EDTA) at 90 volts, using GelRed® nucleic acid gel stain (10000X in water, Biotium, USA)

at 0.6/ml in sample loading buffer (TriTrack DNA Loading Buffer 6X, Thermo Scientific, Lithuania) and observed on a UV transilluminator (55W, BXT-26.M, Uvitec, France). Amplicons were sent to Macrogen (Macrogen Inc., South Korea) for purification and Sanger sequencing, in both directions, using the same primer pairs utilized for amplification. Sequences were edited and contigs obtained in BioEdit (v.7.0.5.3). Sequences of CsCMV were downloaded from GenBank and phylogenetic analysis was done with MEGA X (v.10.1.5) with Maximum Likelihood statistical method, using Tamura-Nei (TN93) nucleotide substitution model and modeling non-uniformity of evolutionary rates among sites by a discrete Gamma distribution (+G). Test of the phylogeny was done by bootstrap method with 2000 replications.

After identifying a putative virus associated with the symptoms, additional plants were identified at different locations and visually evaluated for mosaic symptoms. Four plants were sampled (one young fully expanded leaf/plant) for further analysis by RT-PCR with primers Potex4/Potex5 as previously described (Table 1). Modified Kochs postulates for plant viruses were conducted. Stem cuttings from three of those additional plants sampled and negative for potexviruses presence by RT-PCR (20.439, 21.030, 21.031, Table 1) were sown in plastic nursery plant pots #400 with steam-disinfested soil and kept at LaFOV-CIBCM greenhouse B. The established plants, four months after sowing were inoculated with sample 20.222 as previously described herein. One cutting from each mother plant was mock inoculated with buffer as controls, thus 13 plants virus inoculated, and three plants mock inoculated. Plants were evaluated once every seven days until 35 dai. Leaf tissue was collected from the symptomatic chaya inoculated plants and a compound sample was obtained per origin of the cuttings (n=3, 20.439, 21.030, 21.031). The samples were stored at -35°C and processed for RT-PCR with primer pair Potex5/Potex5 as previously described.

Chlorotic mosaic developed in three *N. benthamiana* plants 28 days after mechanical inoculation with sample 20.222. A second inoculation was done to confirm symptoms, using as inoculum symptomatic *N. benthamiana* tissue obtained from the previous inoculation; and 3 out of 4 *N. benthamiana* showed strong chlorotic mosaic and leaf blistering, 28 dai (Fig. 1c).

Chloroplasts showing lack of lenticular shape, alteration or absence of thylakoids, and increased presence of osmiophilic granules were observed by TEM in ultra-thin sections obtained from leaf tissue of the symptomatic chaya (20.222) (Figure 2). Those alterations are similar to the ones described for CsCMV in cassava by Zanini *et al.* (2021). Particles or aggregates associated to potyviruses (pinwheels), isometric particles (e.g. cucumoviruses), bacilliform (badnaviruses) or bullet shaped (plant rhabdoviruses) were not observed. Nuclei showed regular appearance, without inclusions nor viral particles. Banded inclusions were

observed in the sample (Fig. 2), corresponding to the ones reported for potexviruses and similar to those reported for CsCMV in chaya (Zettler and Elliott, 1986) and cassava (Zanini *et al.*, 2014).

Chaya (20.222) and tissue from the inoculated-symptomatic *N. benthamiana* (iNb-20.222) resulted positive to potexviruses by RT-PCR with several *Potexvirus* genus degenerate primers. Sequencing of the amplicons obtained from the chaya sample (20.222) and from *N. benthamiana* (iNb-20.222) rendered partial sequences corresponding to *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) and resulted in the identification of the same viral pathogen in both chaya (sample 20.222) and inoculated-symptomatic *N. benthamiana* (iNb-20.222). Amplicons with different primer pairs overlapped, therefore a final contig for the symptomatic chaya sample (20.222) was deposited in GenBank (Accession Number OK642586). A phylogenetic tree with the sequence and several sequences available from GenBank for CsCMV showed the chaya sequence of Costa Rica to group in an independent cluster with CsCMV-chaya sequences from Venezuela (Mejías *et al.*, 2015) and separated from CsCMV sequences from cassava, including the one reported as from Costa Rica (Lozano *et al.*, 2017) (Figure 3).

We searched mosaic symptoms at several locations with a total of 13 chaya shrubs visually evaluated in addition to the first symptomatic sample (20.222). No mosaic symptoms as in sample 20.222 were observed (Table 1). Four selected additional samples resulted negative to potexviruses by RT-PCR (Table 1).

Only three plants (tentative var. ‘Chayamansa’ originating from sample 21.030) showed mosaic symptoms 21 dai and were confirmed to be infected with CsCMV by RT-PCR of total 13 chaya plants inoculated with sample 20.222. There were no symptoms 35 dai on 4/4 and 4/4 var. ‘Picuda’ shrubs propagated by cuttings from samples 20.439 and 21.031, respectively. Thus, modified Koch’s postulates were fulfilled, and pathogenicity of the virus to chaya demonstrated. Moreover, a differential reaction was observed among varieties: the Costa Rican var. ‘Picuda’ seems resistant.

Cassava common mosaic virus (CsCMV) is a plant virus (*Potexvirus*, *Alphaflexiviridae*) infecting cassava and other hosts in several countries of South America: Brazil, Colombia, Paraguay, Peru and Argentina (Costa and Kitajima, 1972; Di Feo *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2017; Tascon *et al.*, 1975); and from China (Tuo *et al.*, 2020). The virus is transmitted by asexual reproduction and no vector is known (Costa and Kitajima, 1972). Currently, it is considered a re-emergent pathogen in Argentina (Zanini *et al.*, 2018); meanwhile in Colombia it is not associated with high incidence or economic impact (Lozano *et al.*, 2017).

A CsCMV strain was reported initially in chaya (CsCMV-Ch) from Florida (USA) and Yucatan (Mexico). The strain CsCMV-Ch is serologically related, but distinct, from the strains infecting cassava of South America (Elliott and Zettler,

1987; Zettler and Elliott, 1986). Currently, CsCMV infection in chaya has been reported from Florida (introduced plant material from Puerto Rico, Zettler and Elliott, 1986), Mexico (Elliott and Zettler, 1987), Tuvalu (Jones *et al.*, 1998) and Venezuela (Mejías *et al.*, 2015).

Presence of CsCMV in Costa Rica is not confirmed locally; neither there are official reports, nor we found local publications, thesis or bulletins with results of its detection. Likewise, the EPPO Global Database (<https://gd.eppo.int/>) and CABI Compendium (<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium>) do not include Costa Rica in the geographical distribution. There is a CsCMV sequence reported from a Costa Rican cassava accession (Lozano *et al.*, 2017, supplementary table 1) that was obtained from material collected in 2012 and conserved *in vitro* at the International Center for Tropical Agriculture (CIAT, Colombia). We suggest the need to confirm *in situ* the current presence of the virus in Costa Rica, as with the case of Argentina (Di Feo *et al.*, 2015). Moreover, several arguments are justifications to consider more attention to this potexvirus: i) diversity of CsCMV strains, ii) efficient mechanical transmission, iii) re-emergence of the

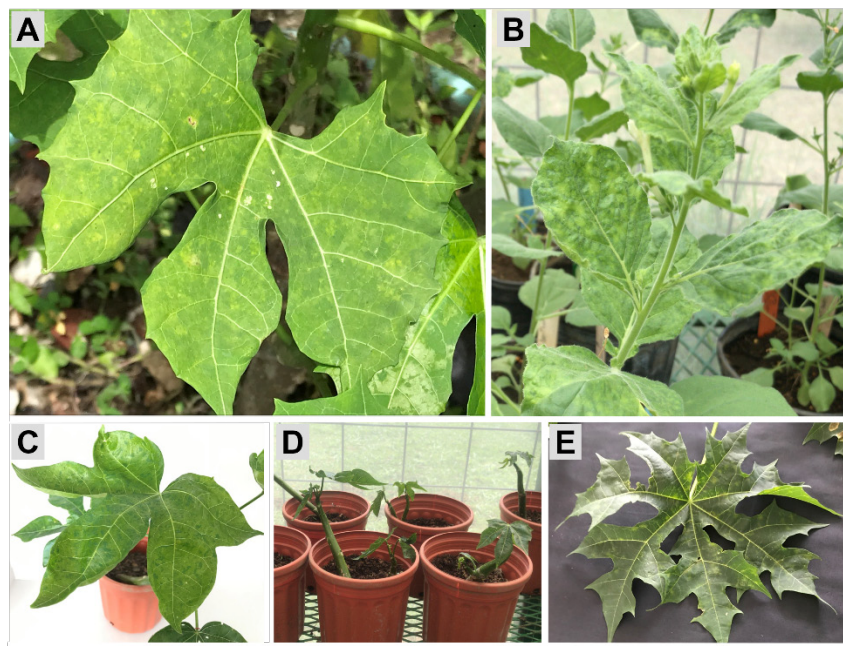


Figure 1. Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) sample 20.222, tentative var. 'Estrella', with mosaic symptoms and positive for *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) (A). Mechanical inoculation of sample 20.222 on *Nicotiana benthamiana* (B) and chaya, tentatively var. 'Chayamansa' (C) showing mosaic symptoms. Stablished cuttings from sample 21.030 in LaFOV-CIBCM greenhouse (D). Leaf morphology of var. 'Picuda' (E).

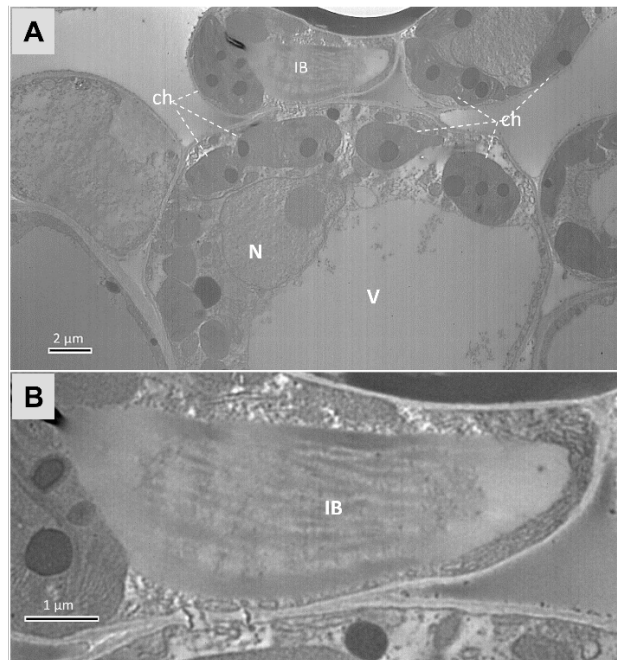


Figure 2. Transmission electron microscope observations of leaf tissue of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) with mosaic symptoms detected in Costa Rica. Damage observed in chloroplasts (ch), with loss of their typical shape and thylakoids, and a banded inclusion (IB), similar to those associated with potexviruses (A). Detail of IB (B). N: nucleus, V: vacuole.

disease in South America, iv) capacity to cause disease without presence of other cassava viruses, v) climate change that may alter the plant-virus interaction, and because vi) cassava is a subsistence and staple food in different regions (Lozano *et al.*, 2017; Venturini *et al.*, 2016; Zanini *et al.*, 2014, 2018).

The detection of CsCMV reported herein is not a confirmation of the presence of cassava common mosaic disease (CCMD) in Costa Rica, because phylogenetic analysis with the only partial sequences of the virus from chaya (Costa Rica and Venezuela) clustered independently to the isolates of the virus infecting cassava. A survey in some states of Venezuela did not detect CsCMV in cassava plants (Chaparro-Martínez and Trujillo-Pinto, 2003), but the chaya strain was reported in Venezuela (Mejías *et al.*, 2015). We hypothesize the infection reported herein is an independent and probably recent introduction to Costa Rica of the chaya strain of CsCMV (CsCMV-Ch) because i) the name chaya is not widely used in Costa Rica Central Valley. ii) the ‘Estrella’ variety is unknown in the country. iii) cuttings shared as: “chaya, a medicinal tree from southern Mexico” indicates something foreign or new, not associated with the comestible shrub ‘chicasquil’. And iv) the phylogenetic analysis suggested a different strain compared to CsCMV sequences from cassava (Figure 3).

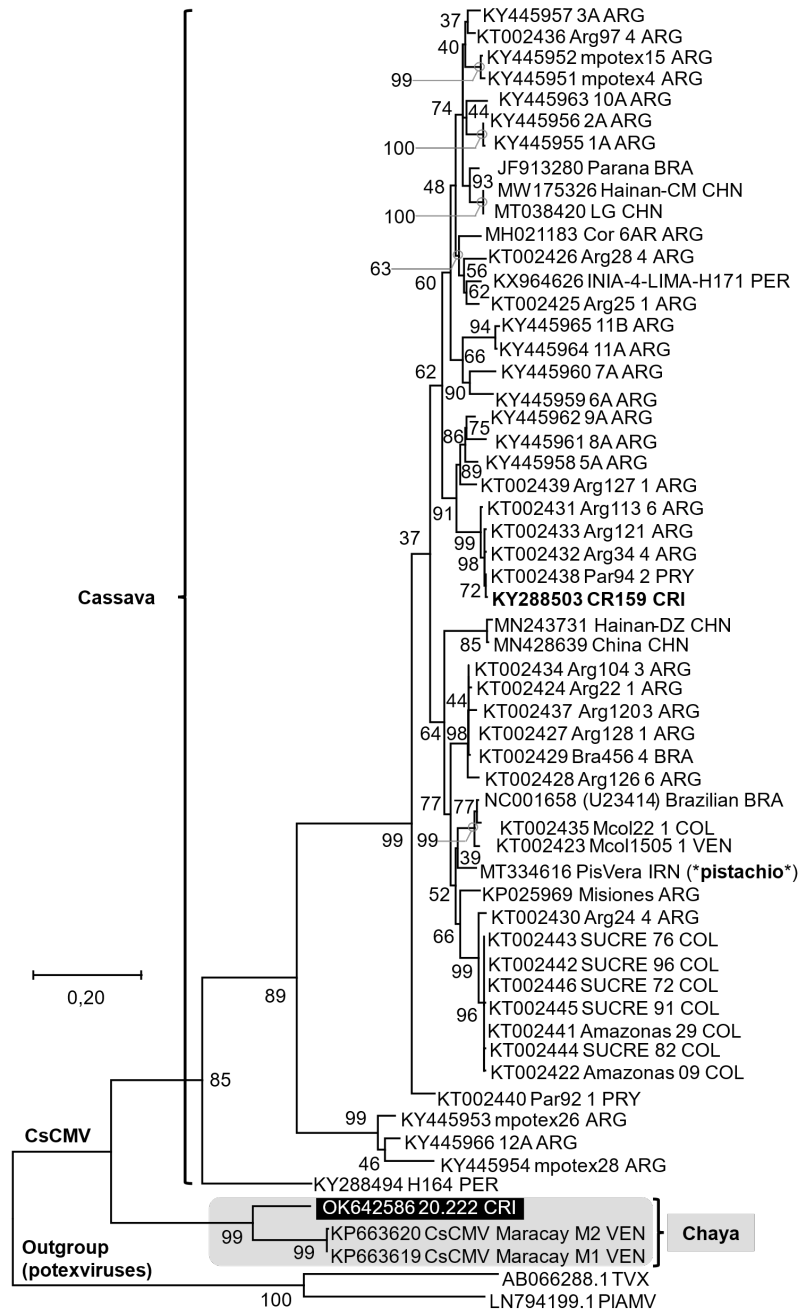


Figure 3. Phylogenetic analysis of partial replicase ORF (618 nucleotides) of *Cassava common mosaic virus* (CsCMV). Gray shaded isolates from chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*) host; black shaded the Costa Rica chaya isolate, and in bold the sequence of CsCMV in cassava (*Manihot esculenta*) reported as from Costa Rica. Virus isolates codes: GenBank accession number, isolate identification and three-letter country codes. Maximum likelihood analysis with Tamura-Nei and Gamma distribution model with 2000 replications (bootstrap method) in MEGA X.

The detection of CsCMV in a chaya shrub in Costa Rica is an example of ease to spread plant viruses by vegetatively propagated plants, and calls attention on important factors to consider. i) High risk of virus introduction to new regions and countries in vegetatively propagated plants, due to human movement, socioeconomic factors, and cultural traditions. In this case, the use of medicinal plants and the tradition to share plant cuttings, runner daughter plants and seeds, among families and friends, helps to propagate and spread the plants and their diseases. Economic speculations or consumer demands may urge producers to trade plant material within regions of a country or even among countries, without the appropriate phytosanitary surveillance, as was mentioned for cassava case in the north of Argentina (Zanini *et al.*, 2018), and for cape gooseberry ('uchuva', *Physalis peruviana* L.) and several *Passiflora* spp. in Colombia (Rodríguez *et al.*, 2016). ii) As a consequence, the phytopathological problem requires a transdisciplinary approach with the participation of phytopathologists, biologists, sociologists, politicians, and social communicators, among other disciplines. iii) On another perspective, local traditions and traditional genetic resources of a particular region may be at risk from introduced plant pathogens toward which the local plants, a genetic reservoir, are naive to the virus.

The findings, questions, and hypothesis reported herein signal the need to test the susceptibility of different *Cnidoscolus aconitifolius* varieties to CsCMV-Ch and warrants further study of CsCMV occurrence in cassava in Costa Rica.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Carlos Chacón Díaz and Luis Orlando Barboza Barquero (Universidad de Costa Rica) for providing plant material. This research was funded by Universidad de Costa Rica (grant 801-C0-274 and Research Activity 801-A1801).

LITERATURE CITED

- Chaparro-Martínez EI and Trujillo-Pinto G. 2003. Enfermedades virales en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en algunos estados de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 20:461-467. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-78182003000400006&lng=es&nrm=is&tlng=en
- Costa AS and Kitajima EW. 1972. Cassava common mosaic virus. CMI/ABB Description of Plant Viruses No. 90. Commonwealth Agricultural Bureaux and the Association of Applied Biologists. Wm. Cuiross and Son Ltd., UK. 4p.
- Di Feo L, Zanini A, Rodríguez Pardina P, Cuervo M, Carvajal-Yepes M and Cuellar WJ. 2015. First Report of *Cassava common mosaic virus* and Cassava frogskin-associated virus Infecting Cassava in Argentina. *Plant Disease* 99:733-733. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1088-PDN>
- Ebel R., Méndez Aguilar MJ, Castillo-Cocom JA and Kissmann S. 2019. Genetic diversity in nutritious leafy green vegetable - Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*). Pp. 161-189. In: Nandwani D (eds) *Genetic Diversity in Horticultural Plants*. Sustainable

- Development and Biodiversity. Vol 22. Springer, Cham. 297p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96454-6_6
- Elliott MS and Zettler FW. 1987. Cassava common mosaic virus infections of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) in Yucatán, Mexico. *Plant Disease* 71:353-356. https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1987Articles/PlantDisease71n04_353.pdf
- Fernandez E, Espinoza I, Lozano I, Bolaños C, Carvajal-Yepes M and Cuellar WJ. 2017. First Report of Cassava Common Mosaic Disease and Cassava common mosaic virus Infecting Cassava (*Manihot esculenta*) in Peru. *Plant Disease* 101:1066-1066. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1540-PDN>
- Hammel BE, Grayum MH, Herrera C and Zamora N (eds). 2010. Manual de plantas de Costa Rica. Available at: Manual de plantas de Costa Rica. <http://legacy.tropicos.org/Name/12802542?projectid=66>
- Jones P, Devonshire J, Dabek A and Howells C. 1998. First report of cassava common mosaic potexvirus infecting chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) in Tuvalu. *Plant Disease* 82:591-591. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.591B>
- Lozano I, Leiva AM, Jimenez J, Fernandez E, Carvajal-Yepes M, Cuervo M and Cuellar WJ. 2017. Resolution of cassava-infecting alphaflexiviruses: Molecular and biological characterization of a novel group of potexviruses lacking the TGB3 gene. *Virus Research* 241:53-61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.019>
- Mejías A, Rodríguez-Román E, Romano M, Zambrano K and Marys E. 2015. New record of cassava common mosaic virus infecting chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaugh) in Venezuela. *Plant Disease* 99:1190-1190. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0132-PDN>
- Migolino R, Jodłowska A and Van Schadewijk AR. 2006. Detection and identification of a novel potexvirus infecting *Allium* by paramagnetic beads ssRNA isolation and one tube RT-PCR assay with a new potexvirus genus primer set. *Acta Horticulturae* 722:285-292. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.35>
- Montero-Astúa M, Garita L, Vásquez E, Hammond J and Moreira L. 2017. Detection of Plantago asiatica mosaic virus in lily hybrid plants (*Lilium* spp.) in Costa Rica grown from imported bulbs. *Australasian Plant Disease Notes* 12:57. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0281-2>
- Montero-Astúa M, Chacón-Díaz C, Aguilar E, Rodríguez C, Garita L, Villalobos W, Moreira L, Hartung J and Rivera C. 2008. Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa Rica. *Journal of Microbiology* 46:482-490. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0072-8>
- Rodríguez MH, Niño NE, Cutler J, Langer J, Casierra-Posada F, Miranda, D, Bandte M and Büttner C. 2016. Certificación de material vegetal sano en Colombia: Un análisis crítico de oportunidades y retos para controlar enfermedades ocasionadas por virus. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 10:164-175. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i1.4921>
- Ross-Ibarra J and Molina-Cruz A. 2002. The ethnobotany of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* s.sp. *aconitifolius* Breckon): A nutritious Maya vegetable. *Economic Botany* 56:350-365. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2002\)056\[0350:TEOCCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2002)056[0350:TEOCCA]2.0.CO;2)
- Tascon Â, Kitajima EW and Costa AS. 1975. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico comum da mandioca nos tecidos foliares de diferentes plantas hospedeiras. *Bragantia* 34:5-10. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051975000100023>
- Tuo DC, Zhao GY, Yan P, Li RM, Chen X, Wang WQ, Li XY, Yao Y, Cui HG, Shen WT and Zhou P. 2020. First report of Cassava common mosaic virus infecting cassava in mainland China. *Plant Disease* 104:997-997. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1585-PDN>
- Venturini MT, Araújo TDS, Abreu EFM, Andrade ECD, Santos VDS, Silva MRD and Oliveira E JD. 2016. Crop losses in Brazilian cassava varieties induced by the Cassava common mosaic virus. *Scientia agricola (Piracicaba, Braz.)* 73:520-524. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0374>
- van der Vlugt RAA and Berendsen M. 2002. Development of a general potexvirus detection method. *European Journal of Plant Pathology* 108:367-371. <https://doi.org/10.1023/A:1015644409484>
- Zanini AA, Cuellar WJ, Celli MG, Luque AV, Medina RD, Conci VC and Di Feo LV. 2018. Distinct strains of the re-emergent Cassava common mosaic virus (genus: Potexvirus) infecting cassava in Argentina. *Plant Pathology* 67:1814-1820. <https://doi.org/10.1111/ppa.12869>

- Zanini AA, Di Feo LV, Luna DF, Paccioretti P, Collavino A and Rodríguez MS. 2021. Cassava common mosaic virus infection causes alterations in chloroplast ultrastructure, function, and carbohydrate metabolism of cassava plants. *Plant Pathology* 70:195-205. <https://doi.org/10.1111/ppa.13272>
- Zanini AA, Rodríguez- Pardina P, Luque A and Di Feo LV. 2014. Identificación y caracterización de Cassava common mosaic virus en cultivos de mandioca en Argentina. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales* 4:31-38. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/35246>
- Zettler FW and Elliott MS. 1986. An antigenically distinct strain of cassava common mosaic virus infecting *Cnidocolus aconitifolius*. *Phytopathology* 76:632-638. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n06_632.pdf



Phytopathological Note

Comparison of molecular protocols to detect *Tomato brown rugose fruit virus* in solanaceae hosts

Erika J. Zamora-Macorra, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; **Katia Aviña-Padilla***, Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato, Irapuato 36821, México; **Hammond Rosemarie W**, USDA, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705, USA; **Daniel L. Ochoa-Martínez** Colegio de Postgraduados, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Texcoco 56230, México. *Corresponding Author: katia.avinap@cinvestav.mx

***Corresponding Author:**

Erika J. Zamora-Macorra
katia.avinap@cinvestav.mx

Section:
Special Number

Received:
23 August, 2023

Accepted:
24 November, 2023

Published:
30 November, 2023

Citation:
Zamora-Macorra
EJ, Aviña-Padilla K,
Rosemarie HW and
Ochoa-Martínez DL. 2023.
Comparison of molecular
protocols to detect *Tomato
brown rugose fruit virus* in
solanaceae hosts. Mexican
Journal of Phytopathology
41(4): 95-108.
DOI: [https://doi.
org/10.18781/R.MEX.
FIT.2023-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-5)



ABSTRACT

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) has emerged as a significant threat to Solanaceae crops, including tomato and pepper. Its presence in Mexico since 2018 has raised concerns about its impact on agricultural production. Early and accurate detection of this pathogen is crucial to prevent its spread and mitigate its effects. In Mexico, several molecular techniques are employed for its diagnosis, including endpoint RT-PCR, RT-qPCR, and multiplex RT-qPCR. The objective of this research was to assess the efficiency of different RNA extraction methods in combination with specific PCR primers for detecting ToBRFV. Among the methods tested, the CTAB-Trizol RNA extraction protocol combined with nested PCR using primers reported by Dovas et al. (2004) was identified as the most sensitive molecular method for detecting the virus. This finding highlights the significance of selecting the appropriate combination of extraction and amplification protocols to achieve optimal sensitivity and accuracy in ToBRFV detection.

Keywords: ToBRFV, Solanaceae crops, RNA extraction, RT-PCR, molecular detection, agricultural production.

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) poses a grave threat to tomato production. Initially identified in Israel in 2014 (*Solanum lycopersicum*) (Luria et al., 2017), it extended to Jordan in 2015 (Salem et al., 2016). Since then, its footprint has expanded dramatically. ToBRFV has been identified in tomato crops across diverse regions, including Mexico (Cambrón-Crisantos et al., 2018), Germany (Menzel et al., 2019), Turkey (Fidan et al., 2019), the United Kingdom (Skelton et al., 2019), China (Yan et al., 2019), Netherlands (Van de Vossenbergh et al., 2020),

the United States (Ling *et al.*, 2019), Italy (Panno *et al.*, 2019), Palestine (Alkowni, 2019), Greece (EPPO, 2019/210), Spain (EPPO, 2019/238), and France (MAA, 2020). Notably, in 2020, it infiltrated chili greenhouses in Italy and Jordan (Salem *et al.*, 2020; Panno *et al.*, 2020a), while in 2018, commercial pepper greenhouses in Mexico also were affected (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). This pervasive spread of ToBRFV across continents underscores its substantial threat to tomato cultivation. Urgent measures are imperative to combat its rampant expansion and protect agricultural ecosystems.

ToBRFV, classified as a Tobamovirus, exhibits a distinctive rigid rod-shaped morphology in its particles. Its genome comprises a straightforward single-stranded RNA chain (+ssRNA) containing four open reading frames (ORFs). Within these ORFs, ORF1 and ORF2 govern the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) function. ORF3 orchestrates the movement protein (MP), while the concise ORF4 oversees the capsid protein (CP) synthesis (Luria *et al.*, 2017). This virus is notable for its particle stability, facilitating its remarkably easy mechanical transmission. Consequently, greenhouse cultivation practices serve as the primary conduit for its dissemination (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020b). The robustness of ToBRFV's particles amplifies its potential to spread rapidly, emphasizing the pressing need for stringent measures to curtail its propagation and safeguard crop ecosystems.

In this context, the detection of ToBRFV in plants has been approached through a range of techniques, encompassing ELISA, electronic transmission microscopy, RT-PCR, second-generation sequencing, qRT-PCR, and LAMP (Oladokun *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Sarkes *et al.*, 2020). These methods differ in terms of their sensitivity limits, cost implications, and the level of expertise required for their execution. Selecting the optimal technique hinges on the specific diagnostic objectives, the type of plant material under scrutiny, budget constraints, and the time available for analysis. The array of detection techniques underscores the need for a tailored approach, aligning the chosen method with the particular demands of the diagnosis. This pragmatic approach ensures both accuracy and resource optimization in combating ToBRFV's proliferation.

In Mexico, the National Center of Phytosanitary Reference (CNRF) initially advocated the use of molecular techniques for ToBRFV identification, specifically endpoint RT-PCR employing the ToBRFV F/ToBRFV-R primer pair (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2019). However, a recent update in the molecular diagnostic protocols has introduced comprehensive enhancements. The revised procedures now encompass a combination of endpoint RT-PCR, RT-qPCR, and multiplex RT-qPCR. According to the latest guidelines issued by CNRF, the diagnosis of ToBRFV requires an integrated approach, whereby a positive result should be corroborated by at least two of the aforementioned techniques (SENASICA, 2022).

This shift towards a multifaceted diagnostic strategy underscores the significance of robust and cross-validated results, aligning with international best practices. The heightened emphasis on diagnostic accuracy is pivotal in containing the spread of ToBRFV within Mexico's agricultural landscape.

Indeed, the aim of this study was to undertake a comprehensive comparison of diverse RNA extraction protocols, evaluating their efficacy in detecting ToBRFV. In addition, the research aimed to assess the limit of detection for three distinct primer pairs, employing both RT-PCR and nested-RT-PCR methodologies. By conducting this comparative analysis, the study sought to determine the most efficient and sensitive combination of RNA extraction methods and primer pairs for accurate ToBRFV detection. This research contributes to enhancing the precision and reliability of diagnostic techniques crucial for managing the spread of ToBRFV in agricultural settings.

Plant material for inoculum source

During September 2020, tomato plants (*Solanum lycopersicum*), showing chlorosis, leaf narrowing, and mosaics (typical symptoms of ToBRFV infection) were collected from commercial greenhouses in Colima Mexico (Figure 1). The inoculum source tested positive for ToBRFV by RT-PCR. A *Nicotiana glutinosa* plant was mechanically inoculated using this tissue, and local necrotic lesions were observed. One of these lesions was cut to inoculate a second *N. glutinosa* plant. This process was repeated twice. A local lesion of the fourth *N. glutinosa* plant was used to inoculate a tomato plant. Then, 30 days post-inoculation (dpi), it was analyzed by RT-PCR using the specific primers and conditions described by Rodríguez-Mendoza *et al.* (2018). The expected fragments were then sequenced and compared in the Genbank. The inoculum source was increased by mechanical inoculation on tomato plants to perform the different host bioassays.

Evaluation of total RNA extraction methods

Pepper and tomato healthy seeds were germinated in Petri dishes with paper towels moistened with sterile distilled water. After 10 to 20 days, when the cotyledonary leaves emerged and expanded, 100 mg of complete seedlings (stem, leaves, and root) of each plant species were separately used to perform total RNA extraction. Likewise, three seeds were planted in 1L Styrofoam cups with peat of most of each plant species. Plants were maintained under greenhouse conditions. After 45 days, 100 mg of foliar tissue (pedicels, leaves, and shoots) were collected to perform total RNA extraction. A total of four RNA extraction methods were

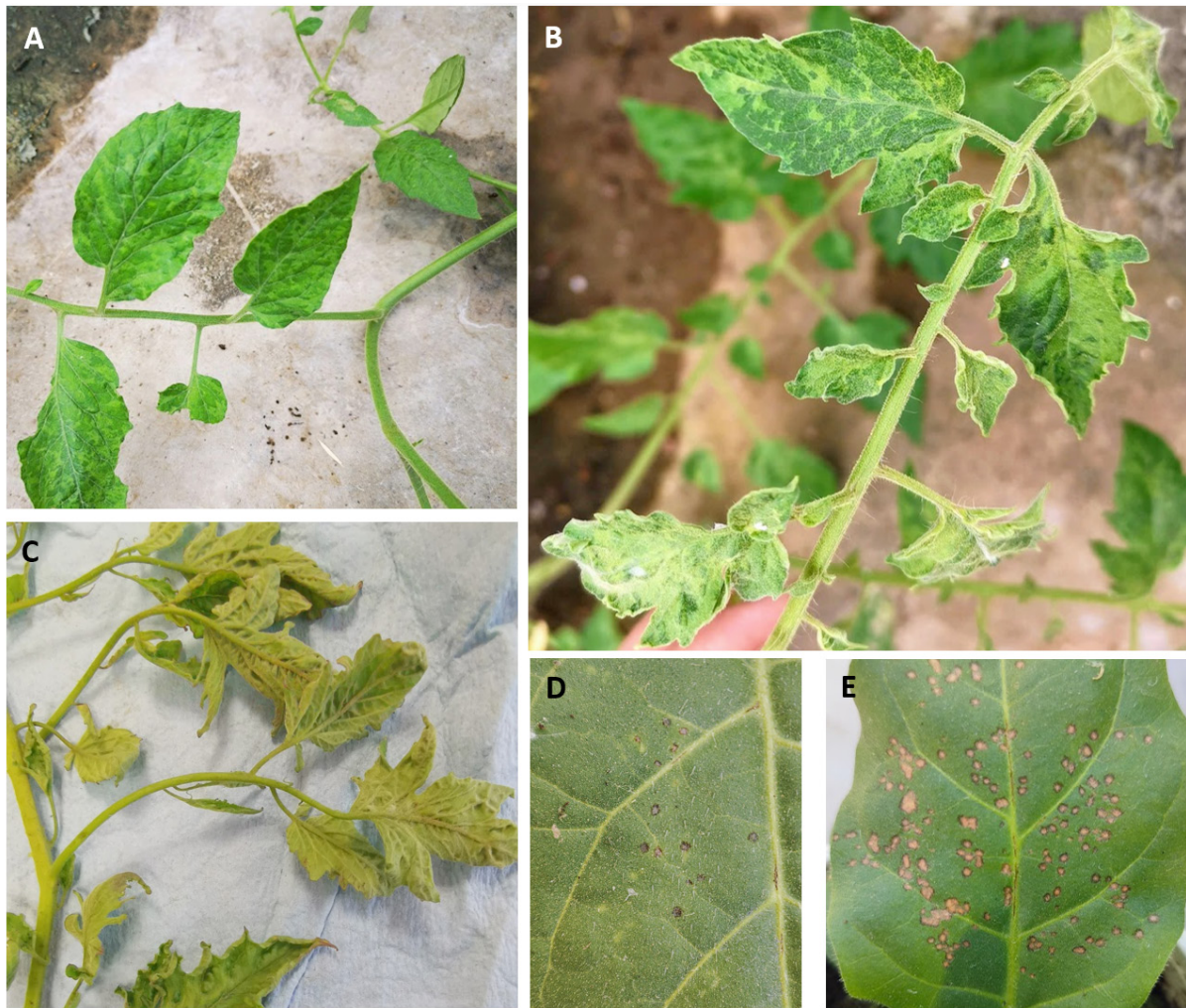


Figure 1. A-E: Symptoms of mosaic, leaf deformation, and leaf narrowing were evident in tomato Saladette plants gathered from greenhouse settings. These plants tested positive for *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Additionally, visual observations on inoculated *Nicotiana* leaves revealed the presence of localized chlorotic and necrotic lesions caused by ToBRFV infection. The virus-positive plants utilized for the study were sourced from Tecoman, Colima.

evaluated: PlantRNAeasy miniKit®, following the manufacturer's instructions; Trizol®, CTAB2 % and CTAB2%-Trizol® following the protocol described by Jordon-Thaden et al. (2015) (minor modifications, appendix 1). Plant tissue maceration was performed with liquid nitrogen in a sterile mortar. The amount and quality of the extracted RNA were quantified using a Nanodrop 2000®, and the absorbance measurements 260/280 and 260/230 were recorded.

Primer evaluation and sensitivity limit

Three replicates of tomato, eggplant, and tomatillo seedlings were mechanically inoculated. Then, at 30 dpi, when plants showed chlorosis and mosaic symptoms, the total RNA extraction using the previously described CTAB-Trizol protocol was performed. The quality and quantity of the extracted RNA were verified using a Nanodrop 2000®. The final concentration was adjusted to 300 ng/μL. Subsequently, serial dilutions of each tRNA extraction were made and adjusted to 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, and 0.0001 ng/μL. Pairs of specific primers, described by Ling *et al.* (2019) and Rodríguez-Mendoza *et al.* (2018), and reported by Dovas *et al.* (2004), were tested, Table 1. The specifications described in the protocols reported for each primer were followed.

Table 1. Primers tested in this study for ToBRFV detection.

Nucleotide sequences of the primers (5' to 3')	Expected fragment size for the PCR amplification	Reference
ToBRFV-FMX: AACCAGAGTCTTCCTATACTCGGAA ToBRFV-RMX: CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT	475 bp	Rodríguez-Mendoza <i>et al.</i> , 2018
TobN up3: GCGYTGACARACIATHGTITAYCA TobN do4: GTRTTICCIATRAAIGTIGTIACRTC TobN do4G: GCCGATRAAGGTGGTGACRTC	400 bp	Dovas <i>et al.</i> , 2004
ToBRFV-F: GAAGTCCCGATGTCTGTAAAGG ToBRFV-R: TGCCTACGGATGTGTATGA	842 bp	Ling <i>et al.</i> , 2019

Evaluation of total RNA extraction methods

In our comparison of methodologies, it became evident that tomato and pepper seedlings yielded a notably higher concentration of total RNA. Significantly, the CTAB-Trizol protocol exhibited the most pronounced outcome in terms of nanograms per microliter, attaining the highest concentration. In contrast, the RNA isolation Kit manifested the lowest concentration among the evaluated methods (Figure 2).

Primer evaluation and sensitivity limit

Our findings delineate the varying sensitivity limits of different primer sets in detecting ToBRFV using total RNA extracted from tomato, tomatillo, and eggplant plants. Specifically, the primers devised by Ling *et al.* (2019) exhibited the capacity

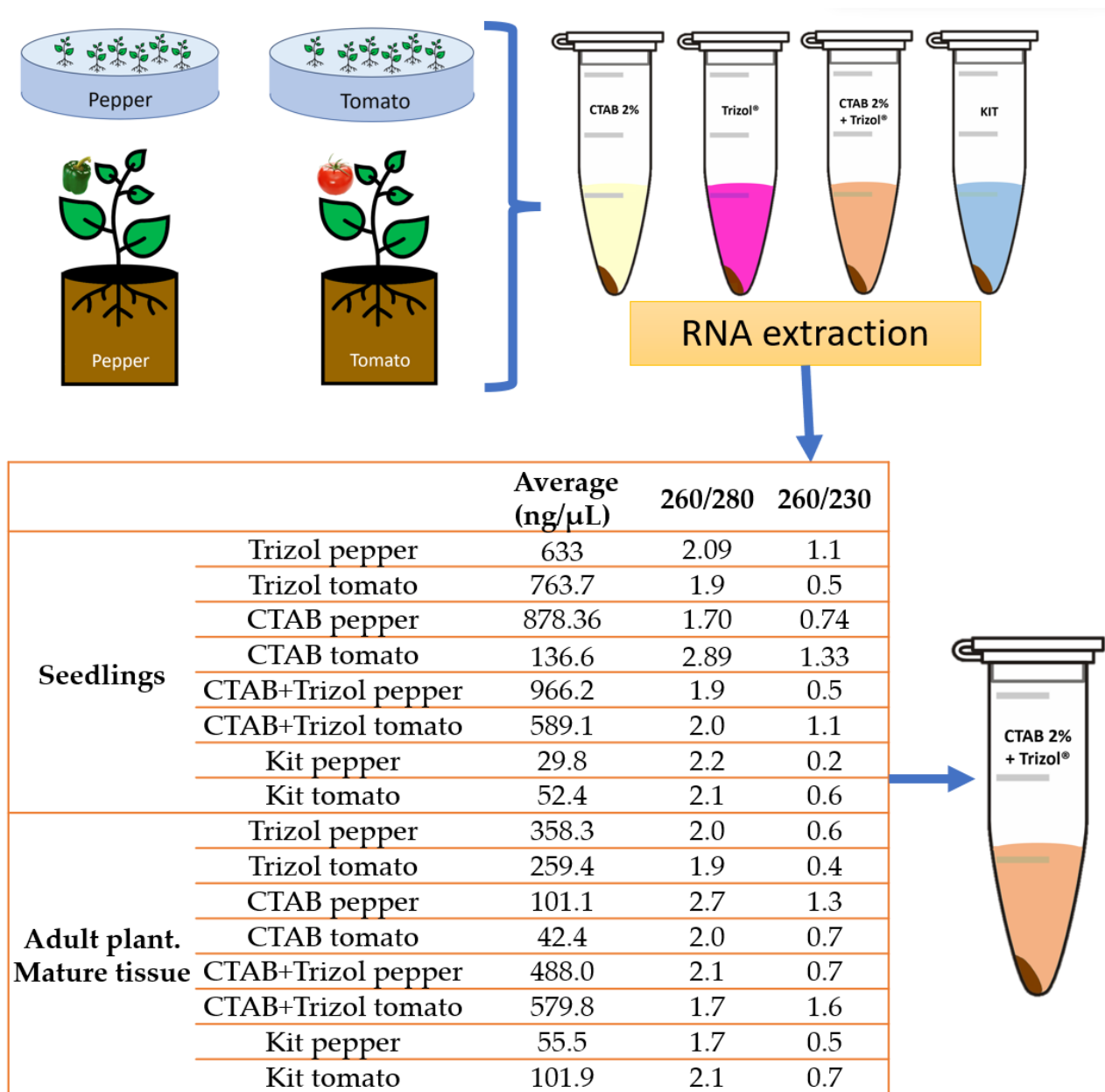


Figure 2. The evaluation of total RNA extraction methods involved comparing their effectiveness and yield, as measured by absorbance readings on a Nanodrop 2000® spectrophotometer. Among the methods tested, including Trizol®, CTAB 2%, and CTAB 2%-Trizol®, the CTAB 2%-Trizol® protocol yielded the highest concentration of total RNA, while the RNA isolation Kit produced the lowest concentration. This data was recorded through absorbance measurements at wavelengths of 260/280 and 260/230. The Nanodrop 2000® was used to quantify the extracted RNA's concentration and assess its quality by these absorbance ratios. The results indicated that the CTAB 2%-Trizol® protocol was particularly effective in extracting high-quality RNA from the plant samples, making it a suitable choice for subsequent molecular analyses.

to detect the virus down to a concentration of 0.01 ng/ μ L in tomato and tomatillo samples. In contrast, their sensitivity in eggplant RNA samples manifested at a higher concentration of 1 ng/ μ L. In parallel, the primers developed by Rodríguez-Mendoza *et al.* (2018) showcased a detection limit of 0.1 ng/ μ L in tomato and 0.01 ng/ μ L in tomatillo. Irrespective of the primer selection, the sensitivity threshold for virus detection in eggplant samples consistently resided at 1 ng/ μ L.

Notably, an intriguing escalation in sensitivity thresholds was observed for both tomato and tomatillo samples through the employment of the nested RT-PCR technique coupled with the primer set elucidated by Dovas *et al.* (2004). This optimization enabled the identification of an elevated level of sensitivity in detecting ToBRFV – 0.0001 ng/ μ L in tomato, 0.001 ng/ μ L in tomatillo, and 1 ng/ μ L in eggplant samples (Figure 3). These nuanced distinctions in sensitivity thresholds emphasize the significance of primer selection and nested RT-PCR amplification in optimizing the detection capability of ToBRFV in diverse plant species.

Several RNA extraction methods have been developed with a central aim: to yield optimal concentrations of high-quality RNA. This is particularly crucial considering that plant tissues often harbor significant amounts of potentially interfering substances such as phenolic compounds, polysaccharides, pigments, and RNases (Wang *et al.*, 2009). Phenolic content within plants is remarkably diverse and subject to fluctuations determined by various factors, including the developmental stage of the plant and its exposure to biotic and abiotic environmental influences. In the context of tomato leaves, the phenol content may exhibit a decline with the progression of age. However, it's noteworthy that the composition of various phenolic compounds can exhibit dynamic variations throughout different stages of leaf development (Dadáková *et al.*, 2020). This intricate interplay between RNA extraction techniques and the complex composition of plant tissues underscores the importance of selecting appropriate methods to ensure reliable and representative RNA samples for downstream analyses.

Polyphenolic compounds notably engage in intricate interactions, forming intricate molecular aggregates with proteins and nucleic acids. This propensity to create large molecular weight complexes further complicates the extraction process. Concurrently, the presence of polysaccharides compounds the challenge, as they have a tendency to co-precipitate with RNA in the presence of alcohol-based extraction protocols. This phenomenon leads to the persistence of polysaccharide contaminants within the final extracted RNA product, thereby affecting its integrity (Salzman *et al.*, 1999).

The effectiveness of the CTAB and Trizol methods transcends their cost-efficiency. These methods have gained widespread adoption across diverse plant species and tissues, consistently yielding favorable outcomes (Gambino *et al.*,

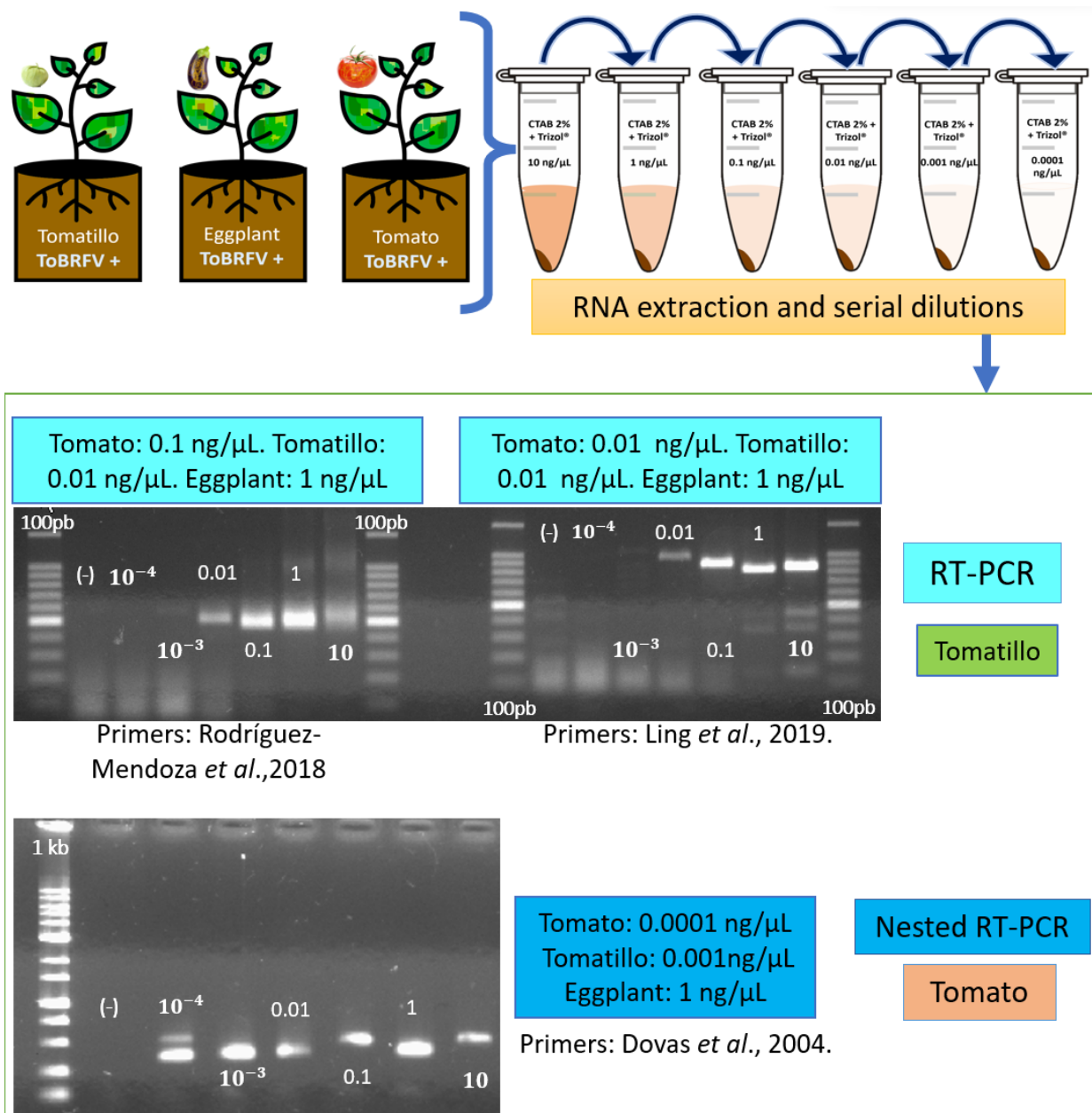


Figure 3. Evaluation and sensitivity of PCR primers. 1.5% agarose gels electrophoretic analysis of RT-PCR and Nested RT-PCR products (Ling's primers expected size 842 pb; Rodríguez-Mendoza's primers expected size 475 pb and Dovas's primers expected size 400 pb). (-): sterilized water instead RNA. 100pb= 100bp DNA Ladder (Invitrogen®). 1Kb= 1000 bp DNA ladder (Promega®). 10⁻³ and 10⁻⁴ = 0.001 and 0.0001 ng/μL.

2008). The commendable quality and purity of RNA, coupled with the expedited and budget-friendly nature of these extraction techniques, render them particularly suitable for virus detection (Mathioudakis *et al.*, 2020). The CTAB method particularly facilitates rapid RNA extraction from challenging tissues, eliminating the need for hazardous chemicals (Chang *et al.*, 1993). It is noteworthy that while the Trizol method yields quality RNA extractions, it also concurrently extracts DNA. Employing Trizol in conjunction with CTAB extraction further enhances the quality of total RNA extraction.

The quality and concentration of extracted RNA wields a profound impact on the precision and reliability of various plant molecular studies, including RT-PCR (Gambino *et al.*, 2008) and gene expression analysis (Toni *et al.*, 2018). However, in the context of large-scale detection assays, the selection of an RNA extraction method is further influenced by cost considerations. In this regard, methodologies like CTAB and Trizol emerge as cost-effective alternatives compared to commercially available kits. The versatility and efficacy of the CTAB and Trizol methods extend across diverse plant species and tissues, consistently yielding favorable outcomes (Gambino *et al.*, 2008). These approaches offer dual benefits of attaining high-quality and pure RNA swiftly and economically, rendering them particularly advantageous for expedited virus detection (Mathioudakis *et al.*, 2020).

Our findings unequivocally highlight the variability in sensitivity limits exhibited by each pair of primers across different plant species. This phenomenon likely arises due to variations in the expression levels and concentration of the pathogen within different host plants. Interestingly, eggplant displayed consistent sensitivity limits irrespective of the primer set employed. In the case of tomatillo, both Ling's and Rodríguez-Mendoza's primers demonstrated equivalent sensitivity limits, while for tomato, Ling's primers exhibited tenfold greater sensitivity. Notably, Ling's primers are meticulously designed to target the coat protein region, whereas Rodríguez-Mendoza's primers detect the RdRp region. A noteworthy observation by Magaña-Álvarez *et al.* (2021) underscores the superior performance of coat protein-targeting primers in ToBRFV detection within tomato plants compared to RdRp-targeting primers.

It has been established that nested PCR, while more time and resource-intensive, offers heightened sensitivity and reliability in comparison to conventional PCR (Shin *et al.*, 2004). As anticipated, the Dovas primers displayed an impressive sensitivity that was a hundredfold higher in tomato and tenfold higher in tomatillo. Altogether our results show that the optimal detection protocol for ToBRFV, within the scope of these experimental conditions, emerges as the CTAB-Trizol RNA extraction method paired with nested RT-PCR employing the primers delineated by Dovas *et al.* (2004).

In conclusion, we performed a comprehensive comparison of various molecular protocols for the detection of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Solanaceae hosts. ToBRFV poses a significant threat to tomato production globally, and its early and accurate detection is crucial to mitigate its impact. The study evaluated RNA extraction methods and specific PCR primer pairs for their efficiency in detecting the virus. The CTAB-Trizol RNA extraction protocol combined with nested PCR using primers reported by Dovas et al. (2004) was identified as the most sensitive method for ToBRFV detection. Our study underscores the importance of selecting appropriate combinations of extraction and amplification protocols to achieve optimal sensitivity and accuracy in ToBRFV detection. These findings could contribute to enhancing the precision of diagnostic techniques crucial for managing the spread of ToBRFV in agricultural settings.

Appendix 1

A) Trizol protocol:

Macerate 100 mg of plant tissue with liquid nitrogen and add it immediately on an Eppendorf tube with 1 mL of cold Trizol. Give a pulse of vortex and leave them for 5 minutes on ice.

Add 400 μ L of chloroform and mix by inversion 7 times. Leave the tube on ice for 10 minutes.

Centrifuge by 10 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Recover carefully the supernatant (approx. 400 μ L) and transfer it in a clean Eppendorf tube.

Add 1.5 V of cold isoamyl alcohol and leave the tube at -20°C for 20 minutes.

Centrifuge by 15 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Discard the alcohol taking care of the pellet at the bottom of the tube.

Wash the pellet with 1 mL of cold ethanol at 90% and centrifuge again by 5 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Discard all the ethanol taking care of the pellet and let it dry at room temperature.

Resuspend and dissolve the pellet in 30 to 50 μ L of RNAsa free distilled water.

B) CTAB 2% protocol:

Macerate 100 mg of plant tissue with liquid nitrogen and add it immediately on an Eppendorf tube with 700 μ L of CTAB 2% + PVP (1%) + BME (0.2%). Give a pulse with a vortex.

Incube at 55 °C in a water bath for 10 minutes.

Add 470 μ L of cold chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and mix by inversion 7 times.

Centrifuge by 10 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Recover carefully the supernatant (approx. 400 μ L) and transfer it in a new Eppendorf tube.

Add 1 V of cold isoamyl alcohol and 1/10 V of sodium acetate (3M) and mix by inversion. Left the tube at -20 °C for 20 minutes.

Centrifuge by 15 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Discard the liquid taking care of the pellet at the bottom of the tube.

Wash the pellet with 1 mL of cold ethanol at 90% and centrifuge again by 5 minutes at 13,000 rpm at 4 °C.

Discard all the ethanol taking care of the pellet and let it dry at room temperature.

Resuspend and dissolve the pellet in 50 to 100 μ L of RNAsa free distilled water.

C) CTAB2% + Trizol

Follow the steps 1 to 5 of section B) of appendix 1.

Add 500 µL of Trizol and mix by inversion 7 times.

Follow the steps 2 to 10 of section A) of appendix 1.

ACKNOWLEDGMENTS

K.A.-P. (CVU:227919), received financial support from CONACyT.

LITERATURE CITED

- Alkowni R, Alabdallah O and Fadda Z. 2019. Molecular identification of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology* 101:719–723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Rangel SA, García-Ávila DJC and López-Buenfil JA. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37: 185–192. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>
- Chang S, Puryear J and Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>.
- Dadáková K, Heinrichová T, Lochman J and Kašparovský T. 2020. Production of Defense Phenolics in Tomato Leaves of Different Age. *Molecules* 25(21): 4952. <https://doi.org/10.3390/molecules25214952>.
- Dovas CI, Efthimiou K, Katis NI. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dl-containing primers along with homologous dG-containing primers. *Journal of Virological Methods* 117: 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.004>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Reporting Service 2019/210. Available online: <https://gd.eppo.int/reporting/article-6640>. (Consulted in March 2023).
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Reporting Service. 2019/238. Available online: <https://gd.eppo.int/reporting/article-6668>. (Consulted in March 2023).
- Fidan H, Sarikaya P and Calis O. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato in Turkey. *New Disease Reports* 39:18. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>
- Gambino G, Perrone I. and Gribaudo, I. 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19(6): 520-5. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>.
- Jordon-Thaden IE, Chanderbali AS, Gitzendanner MA, Soltis DE. 2015. Protocol note. Modified CTAB and Trizol protocols improve RNA extraction from chemically complex embryophyta. *Applications in Plant Sciences* 3(5): 1400105. <https://doi.org/10.3732/apps.1400105>.
- Ling KS, 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: 1439. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, *et al.* 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of *Tomato brown rugose fruit virus* contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS ONE*, 14(1): e0210871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, *et al.* 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PloS One* 12(1): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429> PMID: 28107419
- Mathioudakis MM, Saponari M, Hasiów-Jaroszevska B, Elbeaino T, Koubouris G. 2020. Detection of viruses in olive cultivars in Greece, using a rapid and effective RNA extraction method, for certification of virus-tested propagation material. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 203-211. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11033>.

- Magaña-Álvarez AA, Pérez-Brito D, Vargas-Hernández BY, Ramírez-Pool JA, Núñez-Muñoz LA, Salgado-Ortiz H, de la Torre-Almaraz R, Ruiz-Medrano R and Xoconostle-Cázares B. 2021. Detection of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in solanaceous plants in Mexico. *Journal of Plant Disease Protection* 128: 1627–1635. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00496-1>.
- 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 Disease Report* 39:1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Ministère de L'Agriculture et de L'Alimentation (MAA). 2020. Available online: <https://agriculture.gouv.fr/virus-tobrfv-le-ministere-confirme-la-contamination-de-tomates-en-serre-dans-le-finistere> (Consulted in March 2022).
- Oladokun J, Halabi M, Barua P and Nath PJPP. 2019. Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology* 68: 1579-1586. <https://doi.org/10.1111/ppa.13096>.
- Panno S, Caruso AG and Davino S. 2019. First Report of *Tomato brown rugose fruit virus* on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* 103: 1443. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Panno S, Caruso AG, Blanco G and Davino S. 2020a. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting sweet pepper in Italy. *New Disease Report* 41: 20. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
- Panno S, Caruso GA, Stefano B, Lo Bosco G, Ezequiel RA and Salvatore D. 2020b. Spread of *Tomato brown rugose fruit virus* in Sicily and evaluation of the spatiotemporal dispersion in experimental conditions. *Agronomy*: 10, 834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>
- Rodríguez-Mendoza J, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA, Araujo-Ruiz K, Quezada-Salinas A y Cambrón-Crisantos JM. 2018. Identification of *Tomato brown rugose fruit virus* by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 1-12. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1902-6>.
- Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM and Bressan RA. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Report* 17: 11-17. <https://doi.org/10.1023/A:1007520314478>.
- Salem N, Mansour A, Ciuo M, Falk BW and Turina M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch. Virol* 161: 503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salem NM, Cao MJ Odeh S, Turina M and Tahzima R. 2020. First Report of *Tobacco mild green mosaic virus* and *Tomato brown rugose fruit virus* Infecting *Capsicum annuum* in Jordan. *Plant Disease* 104: 601. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1189-PDN>
- Sarkes A., Fu H., Feindel D., Harding, M.W., and Feng J. 2020. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). *PLoS ONE* 15(6): e0230403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230403>
- SENASICA. 2022. Procedimientos de diagnóstico: *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Virus del fruto rugoso café del tomate). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/759117/Procedimientos_de_Diagn_stico_ToBRFV_2022.pdf (Consulta en julio de 2023).
- Shin Y, Cho K, Cho H, Kang S, Kim H, Kim Y and Park N. 2004. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Australian Veterinary Journal*, 82(1-2), 83–86. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb14651.x>.
- Skelton A, Buxton-Kirk A, Ward R., Harju V, Frew L, Fowkes A, Long M, Negus A., Forde S, Adams IP, 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 Disease Report* 40: 12. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>
- Toni LS, Garcia AM, Jeffrey DA, Jiang X, Stauffer BL, Miyamoto SD and Sucharov CC. 2018. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* 5, 599-608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>.
- Van de Vossenbergh TLH, Visser M, Bruinsma M, Koenraadt HMS, Westenberg M, and Botermans M. 2020. Real-time tracking of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain. *PLoS One* 15:e0234671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234671>

Wang HM, Yin WC, Wang CK and To KY. 2009. Isolation of functional RNA from different tissues of tomato suitable for developmental profiling by microarray analysis. *Botanical Studies* 50(2): 115-125. <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2009/2/Bot502-01.pdf>

Yan ZY, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP and Li X. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in China. *Plant Disease* 103: 2973. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>



Uso de microorganismos endófitos para el manejo del *Tomato brown rugose fruit virus* en cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Carlos D. Ramos-Villanueva¹, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; **Guadalupe Carrillo-Benitez**², Humus y Derivados de Lombriz de México SPR DE RI, Carretera Federal Puebla-Tehuacan Km 42.2, El Empalme, Tepeaca, Puebla. CP. 75215; **Erika J. Zamora-Macorra**^{*3}, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; **Eduardo Santiago-Elena**³, **Samuel Ramírez-Alarcón**¹, **Jezael Jimenez-Vidals**¹, **Ricardo Ávila López**². Autor de correspondencia: *erikazam@gmail.com

*Autor de correspondencia:
Erika J. Zamora-Macorra
erikazam@gmail.com

Sección:
Número Especial

Recibido: 31 Julio, 2023

Aceptado:
23 Noviembre, 2023

Publicado:
30 Noviembre, 2023

Cita:
Ramos-Villanueva CD, Carrillo-Benitez G, Zamora-Macorra EJ, Santiago-Elena E, Ramírez-Alarcón S, Jimenez-Vidals J y Ávila López R. 2023. Uso de microorganismos endófitos para el manejo del *Tomato brown rugose fruit virus* en cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*). Revista Mexicana de Fitopatología 41(4): 109-117. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-1>



RESUMEN

El *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) es uno de los principales patógenos del cultivo de jitomate en México. A pesar de los esfuerzos para evitarlo, es casi imposible por el bajo porcentaje de transmisión que tiene en semilla y la gran facilidad para ser transmitido mediante las labores culturales; por lo tanto, se buscan alternativas de manejo. Esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de microorganismos endófitos aplicados al suelo, en plantas de jitomate infectadas por el ToBRFV. Las variables respuesta fueron altura de la planta, peso fresco de la parte aérea y de la raíz y la severidad observada. Los tratamientos que se evaluaron fueron *Beauveria peruvienensis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Pseudomonas* sp. y agua como testigo. Se utilizó una planta de jitomate como unidad experimental, con 13 repeticiones por tratamiento. Al analizar las mediciones de las variables mediante pruebas HSD de Tukey-Kramer por cada par, se encontraron diferencias significativas. El tratamiento que favoreció más el desarrollo de la planta infectada y disminuyó su severidad fue *B. peruvienensis*, seguido de *Pseudomonas* sp. El tratamiento que provocó menor desarrollo de la planta e inclusive aumentó la severidad fue *T. longibrachiatum*.

Palabras clave: *Beauveria*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, Severidad.

El cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los más rentables y consumido por sus diversos productos, durante el 2021 se cosecharon 256 770 679.92 toneladas (FAO, 2023). Sin embargo, su producción se ha visto amenazada

por el *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), el cual fue reportado en 2014 en Israel y en 2015 Jordania en plantas de jitomate (Luria *et al.*, 2017; Salem *et al.*, 2016). A partir de esa fecha, el ToBRFV ha sido detectado en diversos países, incluyendo México (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018; Menzel *et al.*, 2019; Fidan *et al.*, 2019; Skelton *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Alkowni, 2019).

El ToBRFV es un Tobamovirus que forma partículas de varilla rígida, su genoma es de RNA de cadena sencilla (+ssRNA) y se compone de cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs) (Luria *et al.*, 2017). Este virus se transmite fácilmente de forma mecánica ya que sus partículas son muy estables, por lo que las actividades culturales son la principal forma de diseminación en los invernaderos (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020); aunado a que puede transmitirse por semilla (Davino *et al.* 2020). En el caso del ToBRFV, se han reportado porcentajes de transmisión del 1.8% en semilla de jitomate y de menos del 1% en semillas de tabaco (Davino *et al.* 2020; Zamora-Macorra *et al.*, 2023); y se sabe que un porcentaje de transmisión tan bajo como 0.001% tiene el potencial de iniciar con una epidemia (Mohan *et al.*, 2020). Por lo anterior, el ToBRFV se ha diseminado ampliamente en México y se están buscando continuamente estrategias para prevenirlo pues para este tipo de patógenos, las tácticas de control directas y efectivas son limitadas; no obstante, se han explorado estrategias como el uso de variedades resistentes y la inducción de las defensas naturales en las plantas (Kloepper *et al.*, 2004).

La resistencia sistémica inducida en plantas es potenciada por microorganismo endófitos, epífitos y rizosféricos. Estos forman relaciones mutuas con las plantas, mejoran la asimilación de nutrientes, promueven el crecimiento, aumentan la tolerancia al estrés e induce las defensas contra microorganismos fitopatógenos (Umesha *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2020). La mayoría de las bacterias que se han reportado como promotoras del crecimiento pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, pero existen muchos otros (Vessey, 2003). Hay diversas investigaciones que demuestran que la inoculación de las cepas de microorganismos promotores del crecimiento en cultivos, incluyendo jitomate, mejora el desarrollo de las plantas e inclusive reduce la incidencia y severidad de las enfermedades virales (Samaniego, 2017; Kandan *et al.* 2005; Beris *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2003; Dashti *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de microrganismos aplicados a la raíz de plantas de jitomate infectadas con el ToBRFV, utilizando variables respuesta como crecimiento aéreo y radicular de la planta y la severidad observada.

Los tratamientos que se evaluaron fueron: 1) *Beauveria peruvienensis* en plantas enfermas, 2) *Trichoderma longibrachiatum* en plantas enfermas, 3) *Pseudomonas* sp. en plantas enfermas, 4) Agua en plantas sanas y 5) Agua en plantas enfermas.

Las cepas de microorganismos utilizados fueron obtenidas de la colección del laboratorio de control biológico de la maestría en Protección Vegetal. Se utilizaron aislamientos de 15 días de crecimiento en medio Agar Dextrosa Papa para *T. longibrachiatum* y Agar Dextrosa Saboraud para *B. peruvienis*. Las cajas Petri de ambos hongos se incubaron a 27 °C, por 15 días. La bacteria (*Pseudomonas* sp.) se sembró en Agar Nutritivo, incubado a 27 °C por 24 horas y para obtener una concentración más alta, se reaisló en medio líquido (Caldo Nutritivo) en agitación a 140 rpm, a temperatura ambiente. Posteriormente, los microorganismos se suspendieron en líquido para realizar conteos celulares con la cámara de Neubauer, usando diluciones seriadas. Las concentraciones utilizadas para los tratamientos fueron de 1×10^8 para los hongos y en el caso de la bacteria, se usó 1×10^9 .

Los experimentos se realizaron de febrero a junio de 2023 en el invernadero del departamento de parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En contenedores de 1L, se sembraron plantas de jitomate saladete utilizando como sustrato peatmost previamente esterilizado. Cuando las plantas tuvieron dos folíolos verdaderos se les aplicaron 20 mL de los diversos tratamientos al suelo y dos días después se inocularon mecánicamente con el virus, para lo cual se provocó un daño subletal en las hojas con ayuda de carborundum 400 mallas e inmediatamente después se frotaron con un macerado de la fuente de inóculo en tampón de fosfatos pH 7.5. La fuente de inóculo del ToBRFV se obtuvo de la colección biológica del laboratorio de virus fitopatógenos del Colegio de Postgraduados. A los 41 días después de la inoculación mecánica (ddim), se volvió a aplicar 20 mL de la suspensión de los microorganismos al suelo de cada planta.

Se utilizó un diseño completamente al azar, la unidad experimental fue una planta de jitomate, y por tratamiento se tuvieron 13 repeticiones. A los 15 ddim y al finalizar el experimento se registró la altura de cada planta y su severidad, para lo cual se utilizó una escala progresiva, donde 1= sin síntomas, 2= ligera clorosis, 3= mosaico 4= reducción del crecimiento, 5= deformación de hojas y 6 = muerte. También se registró el peso fresco de la parte aérea y de la raíz de cada planta tratada al finalizar el experimento, que fue cuando inició la floración. A los 30 ddim, se tomaron muestras de las plantas enfermas tratadas para corroborar la infección viral mediante RT-PCR, utilizando los primers descritos por Dovas y colaboradores (2004); también se analizaron muestras compuestas de las plantas tratadas con agua (sanas).

Los datos obtenidos fueron analizados con una prueba no paramétrica de medias, una vez que se identificó aquellas con diferencias significativas ($\alpha=0.05$), se realizaron pruebas HSD de Tukey-Kramer por cada par.

Todas las plantas inoculadas con el virus mostraron síntomas sistémicos a los 15 días después de la inoculación (Figura 1); estos fueron similares a los reportados en plantas de jitomate, los cuales consistieron en mosaico clorótico y moteado de



Figura 1. 1: plantas enfermas con ToBRFV a las que se les aplicó diferentes microorganismos y el testigo enfermo al que se le aplicó solo agua. 2: plantas sanas, utilizadas como testigo. 3: comparación entre plantas enfermas con ToBRFV tratadas con diferentes microorganismos y 4: síntomas ocasionados por el ToBRFV, donde se observa el mosaico en hojas a los 20 días después de la inoculación (ddi) y la deformación de brotes a los 35 ddi.

zonas verde oscuro, en hojas, ampollamiento e inclusive con estrechamiento de la lámina foliar (Fidan *et al.*, 2019; Alkowni *et al.*, 2019; Menzel *et al.*, 2019). Respecto a la RT-PCR, solo se obtuvieron los fragmentos del peso esperado en las plantas enfermas tratadas por lo que se corroboró la infección.

Las plantas con el tratamiento de Agua-Sanas (plantas sanas) tuvieron el mayor desarrollo radical y aéreo, y todas las variables respuesta fueron estadísticamente diferentes al resto ($p < .0001$) (Tabla 1). Cuando se comparó el testigo enfermo (Agua-Enferma) con los tratamientos aplicados a las plantas infectadas, el que favoreció el crecimiento y desarrollo, y disminuyó la severidad fue *B. peruvienensis*, seguido de *Pseudomonas* sp. ($p < 0.0001$ y $p = 0.0016$); aunque la severidad fue estadísticamente similar (Cuadro 1). Las plantas enfermas tratadas con *T. longibrachiatum* tuvieron el menor peso y la mayor severidad, inclusive que las que solo se trataron con agua (testigo) (Figura 2).

Existen diversas rizobacterias promotoras del crecimiento que se han probado en cultivos y han disminuido la incidencia y severidad de las enfermedades virales;

Cuadro 1. Grupos formados por la comparación de medias, de las variables por tratamiento, mediante la prueba HSD de Tukey-Kram.

Variable respuesta	Tratamiento	Letras de unión ²
Altura (cm)	Aguas-Sanas	A
	<i>Beauveria</i>	B
	<i>Pseudomonas</i>	B C
	<i>Trichoderma</i>	C D
	Aguas-Enfermas	D
Severidad	<i>Trichoderma</i>	A
	Aguas-Enfermas	A
	<i>Pseudomonas</i>	A
	<i>Beauveria</i>	A
Peso aéreo (g)	Aguas-Sanas	B
	Aguas-Sanas	A
	<i>Beauveria</i>	B
	<i>Pseudomonas</i>	B
	Agua-Enferma	B
	<i>Trichoderma</i>	B
Peso raíz (g)	Aguas-Sanas	A
	<i>Beauveria</i>	A B
	Aguas-Enferma	B C
	<i>Pseudomonas</i>	B C
	<i>Trichoderma</i>	C

²Letras o conjuntos diferentes representan diferencias significativas.

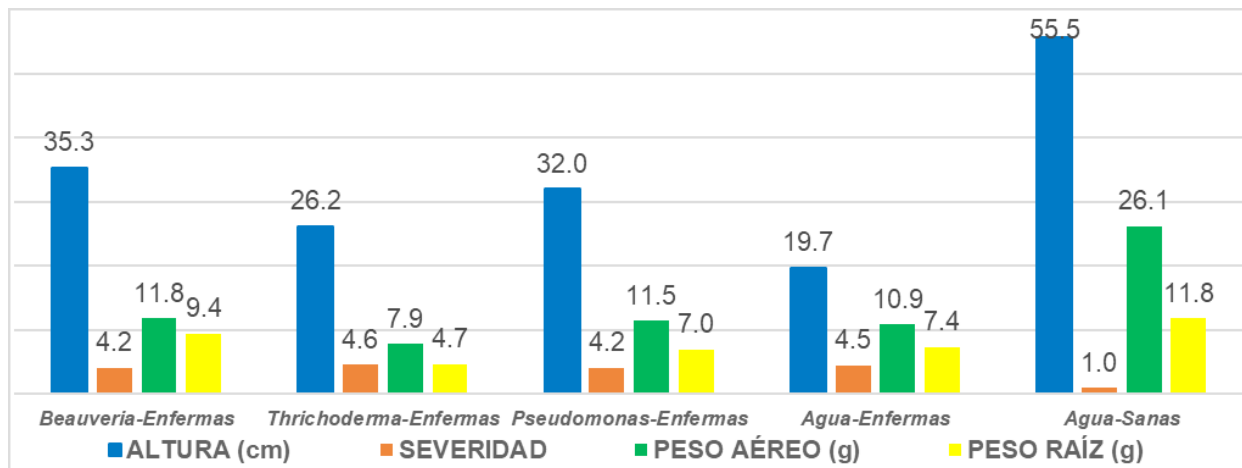


Figura 2. Media de las variables respuesta, obtenidas al finalizar el experimento, por cada tratamiento aplicado en las plantas de jitomate infectadas con ToBRFV (enfermas) y sanas.

varias especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum* han demostrado ser efectivas en plantas infectadas por *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato mottle virus* y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Dashti *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2014; Abdalla *et al.*, 2017; Li *et al.* 2016; Beris *et al.*, 2018). Por ejemplo, las aplicaciones de *Pseudomonas fluorescens* en semillas, plántulas, suelo y en hojas, aumentaron la actividad de la peroxidasa y la fenilalanina-amoniaco-liasa, acumulando compuestos fenólicos, estimularon los fenilpropanoides, lo que provocó una reducción significativa de la severidad e incidencia ocasionada por *Tomato spotted wilt virus* (Kandan *et al.*, 2005).

De igual manera, se ha observado que los hongos tienen también un efecto positivo en plantas infectadas por virus. Estudios realizados en plantas de peino con CMV demostraron que *Trichoderma asperellum* aumentó los niveles de transcripción de los genes relacionados con la resistencia (*pr1*, *pal1*, *etr1*, *sod*, *rip* y *lox1*), y enzimas (SOD, LOX1, POX, CAT) inducen resistencia sistémica en la planta (Tamandegani *et al.*, 2021). En el caso de *T. longibrachiatum*, se ha reportado como patógeno en el cultivo de otros hongos, como champiñón y Ganoderma (Zhang *et al.*, 2018) e inclusive como agente de control biológico de *Sclerotinia cepivorum* en cebollas (Camacho-Luna *et al.*, 2023) y de *Thielaviopsis paradoxa* en agave (Sánchez y Rebolledo, 2010), y hasta esta investigación, se desconocía su efecto como endófito. Lo que se observó en el presente experimento, fue que provocó una mayor severidad en las plantas infectadas con el virus; para determinar los probables mecanismos involucrados y su efecto, es necesario mayor investigación con este hongo.

Por otro lado, se conoce que algunos hongos entomopatógenos son endófitos en plantas; se ha visto que *B. bassiana* pueden colonizar a varias especies vegetales, como: trigo, soya, arroz, frijol, cebolla, jitomate, palma, uva, papa, algodón y maíz (Vega, 2018; Liu *et al.*, 2022; Jaber y Ownley, 2018). Cuando estos hongos son inoculados en semilla, foliarmente o al suelo, invaden el tejido de la planta y promueven su crecimiento (Jaber y Enkerli, 2017). Para el manejo de virus, El-Deeb y colaboradores (2021) aplicaron *B. bassiana* para evaluar resistencia al TYLCV y a la población de *Bemisia tabaci*, y realizaron aplicaciones por inyección al tejido vegetal para colonizarlo, al final observaron un aumento en el contenido de fenoles, mayor altura de la planta y rendimiento de frutos, baja incidencia del TYLCV y una disminución de población de mosquita blanca. El aislamiento de *B. peruvencis* utilizado en el presente estudio se aisló de un picudo de las anonáceas (Hernández, 2023) y se desconocía su efecto como endófito en plantas. En la presente investigación, fue el tratamiento que favoreció más el desarrollo de plantas infectadas y disminuyó la severidad, por lo que su potencial para futuras investigaciones es prometedor.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al programa de formación de nuevos investigadores (PROFONI) de la DGIP-Chapingo por el apoyo otorgado a Carlos D. Ramos-Villanueva y Jezrael Jimenez-Vidals.

LITERATURA CITADA

- Abdalla OA, Bibi S and Zhang S. 2017. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to control Papaya ringspot virus and *Tomato chlorotic spot virus*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 50: 584–597. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1352248>
- Alkowni R, Alabdallah O and Fadda Z. 2019. Molecular identification of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in Palestine. Journal of Plant Pathology 101:719–723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Beris D, Theologidis I, Skandalis, N and Vassilakos N. 2018. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. Scientific Reports 8:10320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3>
- Camacho-Luna V, Pizar-Quiroz AM, Rodríguez-Hernández AA, Rodríguez-Monroy M and Sepúlveda-Jiménez G. 2023. *Trichoderma longibrachiatum*, a biological control agent of *Sclerotium cepivorum* on onion plants under salt stress. Biological Control 180: 105168. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105168>
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Rangel SA, García-Ávila DJC and López-Buenfil JA. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 37: 185–192. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>
- Choi HK, Song GC, Yi HS and Ryu CM. 2014. Field Evaluation of the Bacterial volatile derivative 3-Pentanol in priming for induced resistance in Pepper. Journal of Chemical Ecology 40(8):882-92.
- Dashti NH, Ali NY, Cherian VM and Montasser MS. 2012. Application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in combination with a mild strain of *Cucumber mosaic virus* (CMV) associated with viral satellite RNAs to enhance growth and protection against a virulent strain of CMV in tomato. Canadian Journal of Plant Pathology 34:177–186. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.685495>
- Davino S, Caruso AG, Bertacca S, Barone S and Panno S. 2020. *Tomato Brown Rugose Fruit Virus*: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. Plants 9: 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>
- Dovas CI, Efthimiou K, Katis NI. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. Journal of Virological Methods 117: 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.004>
- El-Deeb HM, Lashin SM and Al-S Y. 2012. Reaction of some tomato leaf curl virus and evaluation of the endophytic colonisation with *Beauveria bassiana* on the disease incidence and its vector, *Bemisia tabaci*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45(13): 1538-1545. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2012.681246>
- Fidan H, Sarikaya P and Calis O. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato in Turkey. New Disease Reports 39:18. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2023. FAOSTAT. Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> (Consulta, julio 2023).
- Hernández Medina, B. 2023. Aislamiento, análisis molecular y metabolitos de *Beauveria peruviana* con potencial entomopatógeno aislados del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) (coleoptera: curculionidae) (pascoe 1889). Universidad Autónoma Chapingo. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/2347>

- Jaber LR and Enkerli J. 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: Can they promote plant growth? *Biocontrol Sci Technol* 27: 28–41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1243227>
- Jaber LR and Ownley BH. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control* 116: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>.
- Kandan A, Ramiah M, Vasanthi VJ, Radjaccomare R, Nandakumar R, Ramanathan A and Samiyappan, R. 2005. Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and enhanced yield in tomato. *Biocontrol Science and Technology*. 15:553–569. <https://doi.org/10.1080/09583150500088546>
- Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94:1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, *et al.* 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of *Tomato brown rugose fruit virus* contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS ONE*, 14(1): e0210871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>
- Li H, Ding X, Wang Ch, Ke H, Wu Z, Wang Y, Liu H and Guo J. 2016. Control of *Tomato yellow leaf curl virus* disease by *Enterobacter asburiae* BQ9 as a result of priming plant resistance in tomatoes. *Turkish Journal Biology*. 40:150–159. <https://doi.org/10.3906/biy-1502-12>
- Ling KS, 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: 1439. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- Liu Y, Yang Y and Wang B. 2022. Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Sci Rep* 12: 15706. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, *et al.* 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PloS One* 12(1): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429> PMID: 28107419
- 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 Disease. Report* 39:1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Mohan BG, Baruah G, Sen P, Deb NP and Kumar BB. 2020. Chapter 11. Host-Parasite Interaction During Development of Major Seed-Transmitted Viral Diseases. Pp: 265-289. *In: R. Kumar, A. Gupta (eds). Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*, Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9046-4_11.
- Murphy JF, Reddy MS, Ryu CM, Kloepper JW and Li R. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 93:1301–1307. <https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.10.1301>
- Panno S, Caruso GA, Stefano B, Lo Bosco GE and Salvatore D. 2020. Spread of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* in Sicily and Evaluation of the Spatiotemporal Dispersion in Experimental Conditions. *Agronomy* 10:834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>
- Panno S, Caruso AG and Davino S. 2019. First Report of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* 103:1443. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Salem N, Mansour A, Ciuo M, Falk BW and Turina M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch. Virol* 161: 503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Sánchez V y Rebolledo O. 2010. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagonica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista mexicana de micología* 32:11-18. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802010000200002&lng=es&tlng=es
- Samaniego GB, Reyes RA, Moreno VOA y Tun SJM. 2017. Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatogénos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *La Revista de Protección Vegetal* 32(1): 10-22. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000100002
- Skelton A, Buxton-Kirk A, Ward R., Harju V, Frew L, Fowkes A, Long M, Negus A., Forde S, Adams IP, 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 Disease Report* 40: 12. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>

- Tamandegani PR, Sharifnabi B, Massah A and Zahravi M. 2021. Induced reprogramming of oxidative stress responses in cucumber by *Trichoderma asperellum* (Iran 3062C) enhances defense against *Cucumber mosaic virus*. *Journal-Biological Control* 164: 104779. Issn:1049-9644. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104779>.
- Umesha S, Singh PK, Singh RP. 2018. Chapter 6 - Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture. Pp. 185–205. *In*: Ram Lakhani Singh, Sukanta Mondal (eds). *Biotechnology for Sustainable Agriculture*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812160-3.00006-4>
- Vega FE. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. *Mycologia* 110: 4–30. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>.
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571–586. <https://doi.org/10.1023/a:1026037216893>
- Wang S, Wu H, Qiao J, Ma L, Liu J, Xia Y and Gao X. 2009. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to *Tobacco mosaic virus* by *Bacillus* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:1250–1258. <https://doi.org/10.4014/jmb.0901.008>
- Yadav AN, Kour D, Kaur T, Devi R, Guleria G, Rana KL and Rastegari AA. 2020. Microbial biotechnology for sustainable agriculture: current research and future challenges. Pp. 331–344. *In*: Rastegari, A.A., Yadav, A.N., Yadav, N. (eds.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820526-6.00020-8>
- Yan ZY, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP and Li X. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in China. *Plant Disease* 103: 2973. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Chavarín-Camacho CY, Hammond RW and Aviña-Padilla K. 2023. ToBRFV Mexican Strain: Seed Transmission Rate, Efficacy of Seed Disinfection Treatment, and Rapid Sensitive Detection in Seed Lots. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202307.1387.v1>
- Zhang T, Lu MZ, Zhang CL and Xu JZ. 2018. First Report of *Trichoderma longibrachiatum* Causing Green Mold Disease on *Ganoderma lingzhi*. *Disease notes of the American Phytopathological Society*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0818-PDN>.