

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROPLASTICULTURA

**Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de aislados
mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV.**

TESIS

Presentada por:

EZEQUIEL LINARES ESTRADA

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

Dra. Mona Kassem.

Dra. Yolanda Ortega Ortega.

Saltillo, Coahuila de Zaragoza

Agosto, 2024.



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CIOA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

Salttillo, Coah, a 16 de agosto de 2024

Declaración de documento libre de plagio:

Mediante esta declaración manifestamos que el documento de tesis titulado **"Detección por hibridación molecular, y caracterización molecular de aislados mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV"** redactado por **EZEQUIEL LINARES ESTRADA**, y revisado por el (la) **Dras. Mona Kassem y Yolanda Ortega Ortega**, está libre de plagio cumpliendo los siguientes aspectos:

| Autenticidad y crédito a las fuentes | Revisado* |
|---|------------------|
| Los textos son originales | X |
| El documento está libre de oraciones y párrafos copiados de otras fuentes bibliográficas, sitios de internet, etc. | X |
| El documento está libre de traducciones literales emanadas de literatura en otro idioma | X |
| Los textos están debidamente referenciados | X |
| Las citas textuales (si las hay) están entrecomilladas y referenciadas | X |
| Fotografías, esquemas, gráficas, tablas y otros materiales emanados de otras fuentes están referenciados. | X |
| Se adjunta reporte de revisión realizado con el software <u>iThenticate</u> con un registro de <u>25</u> % de similitud | X |

*Marque con una "X"

Ezequiel L. E.

EZEQUIEL LINARES
ESTRADA

Mona Kassem

Dra. Mona Kassem

Yolanda Ortega Ortega

Dra. Yolanda Ortega Ortega



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 21 de agosto de 2024

Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

Coordinación de Posgrado

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **EZEQUIEL LINARES ESTRADA** titulado "**Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de aislados mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV**" el cual fue presentado el día 20 de agosto de 2024, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES

Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Presidente

Dr. Adrien Gallou
Secretario

Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Vocal

Vo. Bo. de los Asesores

Dra. Mona Kassem
Asesora

Dra. Yolanda Ortega Ortega
Co-asesora

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: EZEQUIEL LINARES ESTRADA FIRMA Ezequiel L.E.

TITULO: Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de aislados mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV.

ASESORES: Dra. Mona Kassem

FIRMA Mona Kassem

Dra. Yolanda Ortega Ortega

FIRMA Yolanda Ortega Ortega

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 20 de Agosto de 2024



Julieta Torres González
Dra. Julieta Torres González
Directora General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de
aislados mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV**

Presentada por:

EZEQUIEL LINARES ESTRADA

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia en Agroplasticultura

Asesorado por:

Dra. Mona Kassem
Dra. Yolanda Ortega Ortega

Saltillo, Coahuila, México.

Agosto, 2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de aislados
mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV**

Presentada por:

EZEQUIEL LINARES ESTRADA

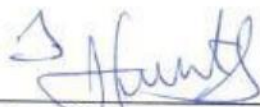
Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia en Agroplasticultura

Asesorado por:

**Dra. Mona Kassem
Dra. Yolanda Ortega Ortega**

SINODALES



Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Presidente



Dr. Adrien Gallou
Secretario



Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 20 de agosto de 2024

Ezequiel L.E.

EZEQUIEL LINARES ESTRADA

Nombre y Firma

Agradecimientos

Agradezco al CONAHCYT por haberme otorgado una beca. Este apoyo ha sido fundamental para la realización de mis estudios de posgrado y para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Expreso mi más profundo agradecimiento al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por brindarme la invaluable oportunidad de cursar la maestría en Agroplasticultura. La experiencia adquirida durante este tiempo ha sido fundamental para mi desarrollo profesional y personal. También agradezco por facilitar las instalaciones y los recursos necesarios por medio del proyecto 6698.

Expreso mi más profundo agradecimiento a mis asesoras, la Dra. Mona Kassem y la Dra. Yolanda Ortega Ortega, por el invaluable apoyo y orientación brindados. Su guía, inspiración y motivación, junto con la generosa compartición de sus conocimientos, han sido fundamentales para la realización de este trabajo de investigación. Agradezco sinceramente su tiempo, esfuerzo, paciencia y dedicación, sin los cuales este proyecto no habría sido posible.

Agradezco sinceramente a mis sinodales, el Dr. Adrien Gallou, el Dr. Humberto Valenzuela y la Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández, por dedicar su valioso tiempo y expertise en la revisión de este trabajo, contribuyendo así a su mejora y enriquecimiento como investigación. Sus comentarios y sugerencias han sido fundamentales para alcanzar un estándar superior en este estudio.

Agradezco profundamente a todos los doctores del CIQA que compartieron conmigo un vasto cúmulo de conocimientos.

Dedicatorias

Con todo mi amor y gratitud, dedico este trabajo a toda mi familia, quienes siempre han creído y confiado en mí. En especial, a mi madre Adriana Estrada Callejas, cuyo amor incondicional, apoyo constante y fe inquebrantable han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza. Sin su presencia en mi vida, este logro no hubiera sido posible. Gracias por siempre estar a mi lado y por brindarme el valor necesario para alcanzar mis metas.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 8 |
| Dedicatorias | 9 |
| Índice de figuras | 13 |
| Índice de Tablas | 15 |
| Tabla de abreviaturas | 17 |
| Resumen | 20 |
| I. Introducción..... | 22 |
| II. Antecedentes | 25 |
| 1.1 El virus rugoso de tomate | 25 |
| 1.2 Métodos de detección del ToBRFV | 28 |
| 1.3. Clonación y caracterización molecular de aislados en el mundo | 31 |
| III. Hipótesis | 37 |
| IV. Objetivo general | 38 |
| V. Objetivos específicos | 39 |
| VI. Materiales y Métodos | 40 |
| 6.1. Material vegetal y aislado viral..... | 40 |
| 6.2. Extracción del material genético | 41 |
| 6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 41 |
| 6.3.1. PCR para la identificación de ToBRFV | 41 |
| 6.3.2. PCR para secuenciación | 42 |
| 6.3.3. PCR para la comprobación de la clonación..... | 44 |
| 6.4. Construcción de la sonda molecular marcada con digoxigenina-11-UTP..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 6.4.1. Sonda BRF-S457 | 45 |
| 6.4.2. Sonda BRF-S1065 | 45 |
| 6.5. Clonación de cDNAs | 47 |
| 6.6. Secuenciación y Análisis bioinformático | 48 |
| VII. Resultados | 51 |
| 7.1 Construcción de las sondas moleculares marcadas con digoxigenina para detectar ToBRFV | 51 |
| 7.1.1. Extracción de ARN total e identificación del virus | 51 |
| 7.1.2. Clonación y transcripción | 52 |
| 7.1.2.1. Sonda BRF-S457 (CP)..... | 52 |
| 7.1.2.2. Análisis de la eficiencia de la sonda BRF-S457 (CP) por la técnica de hibridación molecular | 53 |
| 7.1.3. Aplicación de la sonda BRF-S457 (CP) en estudios experimentales: Prospecciones de terreno | 56 |
| 7.1.4. Sonda BRF-S1065 (MP)..... | 57 |
| 7.1.4.1. Análisis de la eficiencia de la sonda BRF-S1065 (MP) por la técnica de hibridación molecular | 59 |
| 7.2. Amplificación del genoma completo de ToBRFV | 60 |
| 7.3. Secuenciación y análisis de la relación filogenética de los aislados obtenidos del ToBRFV del mismo género..... | 65 |
| 7.3.1. Estructuras genómicas y dominios funcionales | 65 |
| 7.3.2. Estructura poblacional y distancia genética..... | 66 |
| 7.3.3. Relaciones filogenéticas a nivel internacional..... | 69 |
| 7.3.4. Relaciones filogenéticas a nivel regional y nacional..... | 71 |
| 7.3.5. Relación filogenética a nivel de cada ORF..... | 72 |
| VIII. Discusión | 75 |

| | |
|-----------------------|----|
| IX. Conclusiones..... | 81 |
| Perspectivas | 82 |
| X. Referencias..... | 83 |
| XI. Anexos..... | 88 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación del genoma (ssARN) del virus rugoso del tomate (ToBRFV) y los dos subgenómicos (sgARNs) correspondientes | 26 |
| Figura 2. Representación de las regiones utilizadas para la identificación del ToBRFV por RT-PCR. | 29 |
| Figura 3. Diagrama representativo de la técnica utilizada para conseguir el clon infectivo del ToBRFV. | 33 |
| Figura 4. Árbol filogenético representativo de la estimación del tiempo de divergencia de ToBRFV con otros diez tobamovirus. | 35 |
| Figura 5. Árbol filogenético sin raíz construido a partir de 136 secuencias del genoma completo del ToBRFV mediante el método de máxima verosimilitud (ML) | 36 |
| Figura 6. Muestra representativa del tejido vegetal de tomate con síntomas característicos de infección por tobamovirus | 40 |
| Figura 7. Posición y tamaño de dos fragmentos amplificados cubriendo al genoma completo del ToBRFV | 43 |
| Figura 8. Esquema representativo del diseño de oligos específicos para la secuenciación directa del aislado de Hidalgo. | 43 |
| Figura 9. Fragmentos identificados correspondientes a cada uno de los 4 ORFs que conforman al genoma completo | 45 |
| Figura 10. Etapas del proceso de Hibridación Molecular por la técnica de Dot Blot (Roche Diagnostics). | 47 |
| Figura 11. Electroforesis de ARN total en gel de agarosa al 1%. | 51 |
| Figura 12. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de RT-PCR utilizando oligos específicos al virus rugoso de tomate | 52 |
| Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. | 53 |
| Figura 14. Eficiencia de la sonda BRF-S457 (CP) | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Análisis del umbral de detección de la sonda BRF-S457 (CP)..... | 55 |
| Figura 16. Aplicación de la sonda BRF-S457 (CP) en una prospección de un terreno en el estado de Hidalgo | 57 |
| Figura 17. Digestión del clon pTOPOBRF3´ en gel de agarosa al 1%.. | 58 |
| Figura 18. Umbral de detección de la sonda BRF-S1065 (MP)..... | 60 |
| Figura 19. Amplificación del genoma completo de ToBRFV por RT-PCR | 61 |
| Figura 20. Amplificación del genoma del ToBRFV por RT-PCR..... | 61 |
| Figura 21. Amplificación por PCR a partir de colonias bacterianas transformadas en geles de agarosa al 1% | 62 |
| Figura 22. Digestión con las enzimas <i>NotI</i> y <i>KpnI</i> en gel de agarosa al 1% | 63 |
| Figura 23. Productos de RT-PCR en gel de agarosa al 1% de 7 fragmentos solapantes..... | 64 |
| Figura 24. Árboles filogenéticos con secuencias internacionales de ToBRFV, generados con tres modelos [(A) Máxima Verosimilitud, (B) <i>Union de Vecinos</i> y (C) Evolución Mínima] | 70 |
| Figura 25. Árboles filogenéticos representativos de las secuencias regionales (Norte América) del genoma completo del ToBRFV | 71 |
| Figura 26. Árboles filogenéticos relacionando 27 aislados Norte Americanos en las regiones genómicas ORF1 y ORF2 | 73 |
| Figura 27. Árboles filogenéticos relacionando 27 aislados Norte Americanos en las regiones genómicas MP y CP | 74 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diseminación mundial del virus rugoso del tomate (ToBRFV). Adaptado de (Nolasco-García <i>et al.</i> , 2020) | 27 |
| Tabla 2: Descripción de los clones pTOPOBRF5' y pTOPOBRF3' | 63 |
| Tabla 3: Concentración de cada purificación de los fragmentos amplificados. | 64 |
| Tabla 4: Marcos abiertos de lectura detectados en el genoma del aislado ToBRFV-Mx-Ja. | 66 |
| Tabla 5: Datos obtenidos con el programa Mega 11 de los alineamientos nucleotídicos de aislados del virus rugoso de tomate. | 67 |
| Tabla 6: Diversidad nucleica* para cada marco abierto de lectura del genoma de ToBRFV. | 68 |

Anexos

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diseño de oligos utilizados en diferentes técnicas | 88 |
| Tabla 2. Pares de oligos diseñados para la secuenciación del aislado de Guadalajara Jalisco. | 89 |
| Tabla 3. Pares de oligos diseñados para la secuenciación del aislado de Hidalgo. | 89 |
| Tabla 4. Condiciones utilizadas en los fragmentos amplificados para secuenciación directa del aislado de Hidalgo. | 90 |
| Tabla 5. Protocolo de Hibridación Molecular mediante la técnica Dot Blot..... | 91 |
| Tabla 6. Aislados utilizados para determinar el promedio de distancia genética por población. | 94 |

Tabla de abreviaturas

| Abreviación | Descripción |
|-------------|--|
| a.a | Aminoácidos |
| ACLSV | Virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| AGB | Agrobiotecnología |
| APLPV | Virus latente de la viruela del ciruelo en la manzana |
| ApLV | Virus latente del albaricoque |
| ApMV | Virus del mosaico de la manzana |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BPeMV | Virus de la mota de la vaina del frijol |
| BRF-S1065 | Sonda perteneciente a la proteína de movimiento |
| BRF-S457 | Sonda perteneciente a la proteína de la cápside |
| CaMV | Virus del mosaico de la coliflor |
| CGCS | Tira inmunocromatográfica de oro coloidal |
| CGMMV | Virus del Mosaico Verde Jaspeado del Pepino |
| CI | Clon Infeccioso |
| CIQA | Centro de Investigación en Química Aplicada |
| CP | Proteína de la Capsida (<i>del inglés</i> capsid protein) |
| CPMMV | Virus del moteado leve del ají |
| CRISPR-CAS | Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas |
| cRNA | ARN complementario |
| CYSDV | Virus del Desorden de Amarillez y Aturdimiento del Pepino |
| DAS-ELISA | Doble Antígeno unido por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| DIG | Digoxigenina |
| DIC-UTP | Uridina Trifosfato conjugada con Digoxigenina |
| dot | Punto (Mancha circular) |
| dN | Sustituciones de no sinónimo |
| dS | Sustituciones de sinónimo |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| E.S | Error estándar |
| fg/μl | Relación Fentogramo por Microlitro |
| FR1 | Fragmento amplificado 1 (1,700 pb) |
| FR2 | Fragmento amplificado 2 (1.017 pb) |
| FR3 | Fragmento amplificado 3 (1,190 pb) |

| | |
|-------------------|---|
| FR4 | Fragmento amplificado 4 (1,000 pb) |
| FR5 | Fragmento amplificado 5 (1,030 pb) |
| FR6 | Fragmento amplificado 6 (1,330 pb) |
| FR7 | Fragmento amplificado 7 (660 pb) |
| Fw | Oligonucleótido Directo |
| GTP | Guanosina Trifosfato |
| HDRz | Ribozima del virus de la hepatitis delta (<i>del inglés</i> Hepa Delta Ribozyme) |
| IBt | Instituto de Biotecnología |
| kDa | Kilodalton |
| L | Marcador de peso molecular de ADN |
| ME | Máxima parsimonia |
| M | Molar |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| ML | Máxima Verosimilitud |
| MP | Proteína de movimiento (<i>del inglés</i> protein Movement) |
| ng | Nanogramo |
| ng/μl | Relación nanogramo por microlitro |
| nm | Nanómetros |
| nt | Nucleótido |
| N ₂ | Nitrógeno líquido |
| NJ | Unión de vecinos (<i>del inglés</i> Neighbor-joining) |
| ObPV | Virus del pimiento obuda |
| OH | Grupo Hidroxilo |
| ORF1a | Proteína de Metiltransferasa y Helicasa de 126 kDa |
| ORF1b | Proteína de Metiltransferasa, Helicasa y Replicasa de 183 kDa |
| ORFs | Marcos de lectura abiertos (<i>del inglés</i> Open Reading Frame) |
| p/v | Relación Peso Volumen |
| pb | Pares de bases |
| PBNSPaV | Necrosis de la corteza de ciruela y virus asociado a las picaduras del tallo |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (<i>del inglés</i> Polymerase Chain Reaction) |
| PDV | Virus del enanismo de la poda |
| pg/μl | Relación picogramo por microlitro |
| pi | Post infección |
| PNRSV | Virus de la mancha anular necrótica de Prunus |
| PPV | Virus de la viruela del ciruelo |
| R2 | Coeficiente de determinación |
| RdRP | ARN polimerasa dependiente de ARN (<i>del inglés</i> RNA-dependent RNA polymerase) |
| RGB | Imágenes RGB (<i>del inglés</i> red, green y blue) |
| RNAseq | Secuenciación de ARN |
| RheMV | Virus del Mosaico del Ruibarbo |

| | |
|---------------|--|
| Rv | Oligonucleótido Reverso |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| RT-LAMP | Amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa |
| SENASICA | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria |
| sgARNs | ARN subgenómico (<i>del inglés</i> subgenomic RNAs) |
| Sr | Señor |
| ssARN | ARN de cadena sencilla (<i>del inglés</i> single-stranded RNA) |
| SYBR Green | Tinte fluorescente SYBR Green |
| Tm | Temperatura de fusión |
| TMRCA | Tiempo relativo del ancestro común más reciente (<i>del inglés</i> Time to the Most Recent Common Ancestor) |
| TMGMV | Virus del mosaico verde leve del tabaco |
| TMV | Virus del mosaico del tabaco |
| ToBRFV | Virus Rugoso del Tomate (<i>del inglés</i> Tomato Brown Rugose Fruit Virus) |
| ToBRFV-Mx-Hgo | Aislado secuenciado del Virus Rugoso del Tomate en Hidalgo, México |
| ToBRFV-Mx-Ja | Aislado secuenciado del Virus Rugoso del Tomate en Jalisco, México |
| ToMMV | Virus del moteado de tomate |
| ToMV | Virus del mosaico del tomate |
| pTOPOBRF 3' | Clon con fragmento amplificado de 2,712 pb |
| pTOPOBRF 5' | Clon con fragmento amplificado de 4,718 pb |
| TosMMV | Virus del moteado leve de la cola amarilla |
| tNos | Ribozima del virus de la hepatitis delta |
| USA | Estados Unidos de América |
| UTP | Uridina Trifosfato |
| VOCs | Compuestos orgánicos volátiles (<i>del inglés</i> Volatile Organic Compounds) |
| °C | Grados centígrados |
| μM | Micromolar |

Resumen

El virus rugoso del tomate (ToBRFV) fue reportado por primera vez en México en 2018. Este virus afecta a las plantas de tomate, pimiento y berenjena y puede causar pérdidas económicas significativas en su producción. En el presente trabajo de investigación se desarrolló la técnica de detección por hibridación molecular (Dot-Blot) para ToBRFV con la construcción por transcripción de dos sondas complementarias a dos regiones en los marcos de lectura 3 y 4 del genoma viral de ToBRFV; BRF-S457 y BRF-S1065, respectivamente. Las sondas fueron amplificadas clonadas y marcadas con Digoxigenina-11-UTP por transcripción. Adicionalmente, se secuenciaron dos aislados de ToBRFV (ToBRFV-Mx-Ja y ToBRFV-Mx-Hgo) provenientes de los estados de Jalisco e Hidalgo para su caracterización. Por ello, se realizaron ampliaciones por RT-PCR del genoma total de cada aislado y purificaciones. Los datos obtenidos fueron analizados para estudiar sus estructuras genómica y poblacional.

La sonda BRF-S457 perteneciente a la CP demostró capacidad de hibridación al ARN viral tanto en extractos de ARN genómico como en ARN sintetizado *in vitro* con una concentración de 0.085 ng/ml. Su umbral de detección del virus fue de 1 pg/μl. Adicionalmente, se comprobó su aplicación en ensayo de prospección de un terreno y la posibilidad de ser utilizada para detección semicuantitativa. La sonda BRF-S1065 perteneciente a la MP, mostró eficiencia en la detección de ARN viral a una concentración de 1 ng/ml, su umbral de detección fue 50 pg/μl, y se comprobó la posibilidad de usarla para análisis semicuantitativo.

Las secuencias de los aislados analizados fueron obtenidas a partir de cDNA amplificados por RT-PCR. En el caso de ToBRFV-Mx-Ja, se obtuvieron dos cDNA de 4.7 y 2.7 kb que fueron clonados posteriormente y en el caso de ToBRFV-Mx-Hgo, se obtuvieron siete fragmentos de tamaños variables entre 0.66 y 1.7 Kb. Los análisis posteriores mostraron que los dos aislados conservan su estructura genómica, se determinaron los 4 marcos de lectura ORFs y sus dominios funcionales descritos previamente en el género *Tobamovirus* al cual pertenece ToBRFV. No se detectaron inserciones o deleciones a lo largo del genoma comparado con secuencias de ToBRFV publicados en la base de datos NCBI. La estimación

de la diversidad genética en posición sinónima de toda la población (genoma total) fue de 0.0071 ± 0.0008 para la población regional (29 aislados de México, Estados Unidos y Canadá) y de 0.0057 ± 0.0001 para la población mundial (64 aislados internacionales). Nuestros resultados muestran la eficiencia de las sondas generadas para detectar virus en ensayos de estudios con gran número de muestras y la posibilidad de ser utilizadas como técnica semicuantitativa de la carga viral. Hasta el momento no se ha confirmado la especificidad y la sensibilidad de las sondas por lo cual no es recomendable para diagnóstico temprano en el campo. Por otra parte, esta tesis ofrece datos de dos nuevos aislados de ToBRFV en México como primer paso para estudios posteriores.

I. Introducción

La palabra virus procedente del latín *virus* significa veneno o toxina (Gázquez Martínez, 2023). Un virus vegetal es un agente infeccioso microscópico, que contiene un solo tipo de ácido nucleico, ADN o ARN envuelto en una cápside proteica o lipoproteica. Los virus no tienen la capacidad de replicarse por sí mismos, estos deben invadir células de otros organismos para utilizar su maquinaria de replicación y así poder producir copias de ellos mismos en muy poco tiempo (Gray y Banerjee, 1999).

Los tobamovirus son virus de ARN monocatenario de sentido positivo de la familia *Virgaviridae*. La estabilidad de su estructura, y su capacidad de persistir largo tiempo en el suelo, drenaje o agua de riego tienen una gran importancia epidemiológica ya que esto conlleva a una rápida diseminación, causando brotes de enfermedades en todo el mundo. El género de *Tobamovirus* consta de varios patógenos como el virus del mosaico del tomate (ToMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del moteado de tomate (ToMMV), virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) y el virus del Mosaico Verde Jaspeado del Pepino (CGMMV) (Zhang *et al.*, 2022). Recientemente el virus rugoso del tomate (ToBRFV) surgió como un nuevo miembro de esta familia, el cual se describió por primera vez en 2016 en Jordania (Salem *et al.*, 2016).

ToBRFV fue reportado en México por Cambrón-Crisantos *et al.*, (2018). Este virus afecta a las plantas de tomate y puede causar pérdidas económicas significativas en la industria agrícola. En México aún no se cuenta con información que refiera a pérdidas económicas y umbrales de infección por ToBRFV (Nolasco-García *et al.*, 2020). Sin embargo, de acuerdo con el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) se ha detectado este virus en los cultivos de tomate y chile pimiento, “siendo Sinaloa, Yucatán, Tamaulipas, Zacatecas, Michoacán, Guanajuato, Jalisco, Baja California, los estados con mayor prevalencia, y que afectaría a las 47,151 hectáreas sembradas de jitomate y más de 151,607 hectáreas de Chile a nivel Nacional” (SIAP, 2020).

Debido a la alta estabilidad que poseen los tobamovirus, se consideran buenos candidatos a ser usados como herramientas biotecnológicas, especialmente en la agricultura y en la medicina. Su transformación a clones infectivos o su uso como vectores virales exige como primeros pasos: (i) identificar y caracterizar el aislado con que se trabaja, (ii) clonar su genoma en un vector binario, (iii) verificar y analizar su efectividad para transformar plantas. Durante cada uno de estos pasos se requiere de una confirmación continúa, por lo tanto, se necesita de un método de detección fiable, barato y rápido. Actualmente la técnica de RT-PCR es la más usada, sin embargo, esta técnica es relativamente cara cuando se trabaja con un número grande de muestras.

Esta tesis tiene como objetivo fundamental establecer una base sólida para utilizar un aislado de ToBRFV como una herramienta biotecnológica aplicable. El ToBRFV es un patógeno que afecta al cultivo de tomate y otras solanáceas, causando importantes pérdidas económicas en la agricultura, en este proyecto se abordan dos aspectos importantes:

En primer lugar, se desarrolla una técnica de hibridación molecular utilizando una sonda marcada con digoxigenina para la detección eficiente y fiable del ToBRFV. La hibridación molecular es una técnica altamente específica que permite detectar la presencia del virus mediante la unión de la sonda marcada con secuencias específicas del genoma viral. Esta técnica ofrece ventajas significativas en términos de sensibilidad y precisión en la detección del virus, lo que la hace ideal para su aplicación en programas de monitoreo y control de enfermedades en cultivos.

El desarrollo de esta técnica de detección molecular es un paso importante en la lucha contra el ToBRFV, ya que proporciona una herramienta confiable y eficiente para la identificación temprana del virus en los cultivos. Esto permite a los agricultores y autoridades fitosanitarias tomar medidas preventivas y de control de manera oportuna, reduciendo así el riesgo de propagación y los daños económicos asociados a esta enfermedad.

En segundo lugar, se lleva a cabo una caracterización molecular de dos aislados del ToBRFV obtenidos de las regiones de Jalisco e Hidalgo. Esta caracterización implica el análisis de la secuencia genética del virus, así como la identificación de sus distintas variantes y posibles

mutaciones. Este paso es crucial para comprender la diversidad genética del virus y su comportamiento en diferentes condiciones ambientales y geográficas.

II. Antecedentes

1.1 El virus rugoso de tomate

El virus rugoso de tomate (ToBRFV de sus siglas en inglés “Tomato Brown Rugose Fruit Virus”) pertenece al género *Tobamovirus* y a la familia *Virgaviridae*. Es un virus emergente que ha afectado la producción de tomate en diferentes partes del mundo, se transmite principalmente por contacto directo entre plantas infectadas y sanas, a través de herramientas de poda, manipulación y por semillas contaminadas (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) (Tabla 1). Su virión tiene la forma de un bastón y consiste de una sola cadena de ARN con polaridad positiva (ssRNA+) envuelta de una capa proteica (del inglés capsid protein, CP). Su genoma mide alrededor de 6,400 nucleótidos (nt), con una organización típica de tobamovirus y consta de cuatro marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés open reading frame) (Figura 1): los primeros ORFs (ORF1a y ORF1b) codifican dos proteínas relacionadas con la replicación del virus de 126 kDa y 183 kDa, respectivamente. Los ORFs 2 y 3 codifican las proteínas de movimiento (del inglés movement protein, MP) y de la cápside (CP) a través de dos ARN subgenómicos sgARN1 y sgARN2 y con unos tamaños de 30 kDa y 17.5 kDa, respectivamente (Spiegelman y Dinesh-Kumar, 2023).

Cuando la partícula viral entra a la célula, su genoma se separa de la cápside, y forma un complejo con las proteínas de replicación y con la MP, el retículo endoplásmico y los microtúbulos de la célula. Las proteínas de replicación aseguran la multiplicación viral, mientras que MP asegura el desplazamiento del ARN viral a otras células por los plasmodesmos formando focos de infección en la hoja infectada. La proteína de la cápside se polimeriza para formar nuevas partículas virales de 300 x 18 nm y son necesarios para que con el movimiento a larga distancia dentro de la planta pueda alcanzar otros órganos usando el sistema vascular de una planta a otra (Spiegelman y Dinesh-Kumar, 2023).

Además del tomate, el ToBRFV también se ha detectado en el pimiento (Ortiz-Martínez *et al.*, 2021) y en la berenjena (Matsushita *et al.*, 2024). Su rápida propagación ha llevado a que en varios países se hayan implementado medidas de control y prevención para evitar su

diseminación. Estas medidas se basen principalmente en utilizar semillas sanas (libres de virus), el uso sugerido de varios desinfectantes de semillas, sitio de producción libre de ToBRFV, rotación de cultivos, desinfección de los instrumentos de siembra como: cuchillos, contenedores, bandejas, carros y tuberías de riego. Todo el personal de trabajo deben seguir protocolos de higiene y en dado caso que se presente una infección de ToBRFV se deben erradicar todas las plantas infectadas y sospechosas (Zhang *et al.*, 2022).

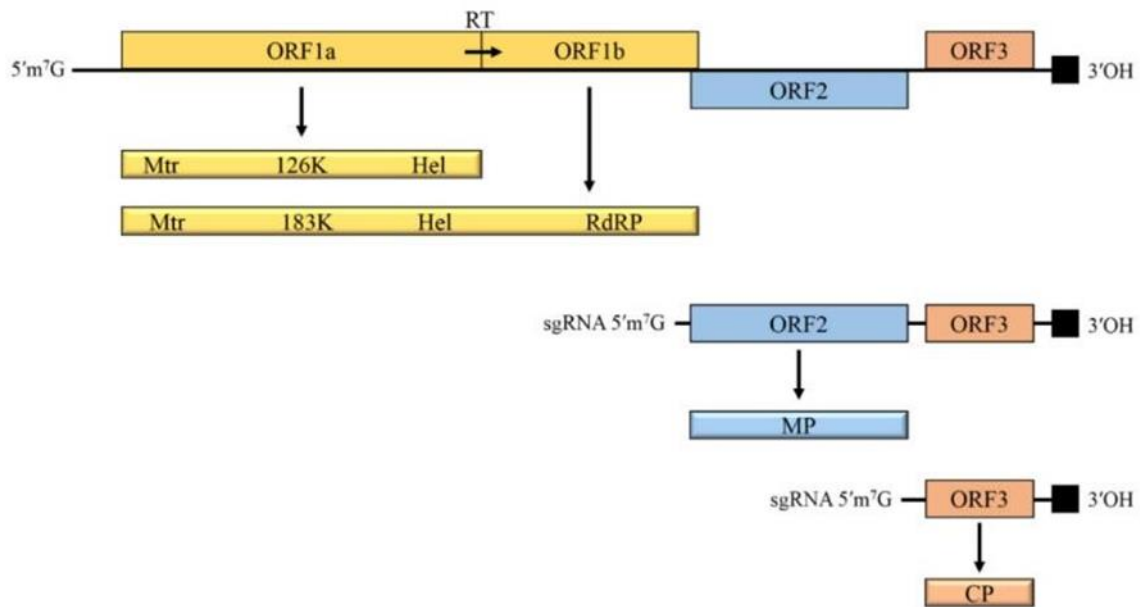


Figura 1. Representación del genoma (ssARN) del virus rugoso del tomate (ToBRFV) y los dos subgenómicos (sgARNs) correspondientes. Las flechas verticales señalan las proteínas expresadas (tamaño y dominios importantes). La flecha horizontal refiere a que la proteína del ORF1b resulta de la supresión [el ribosoma ignora una señal de terminación, codón de parada y continúa sintetizando la cadena polipeptídica (Read Through)] del codón de terminación de ORF1a. El genoma y sus subgenómicos inician con la estructura Cap (5´m⁷G) y terminan con OH. Imagen obtenida de Caruso *et al.* (2022).

Tabla 1. Diseminación mundial del virus rugoso del tomate (ToBRFV). Adaptado de (Nolasco-García *et al.*, 2020)

| Lugar de detección. | Fecha de reporte. | Hospedero. | Método de detección. | Referencia. |
|-----------------------------|-------------------|--|--|--|
| Jordania. | Abril 2015 | <i>Solanum. lycopersicum</i> | ELISA, RT-PCR, ensayos en plantas, secuenciación del genoma | (Salem <i>et al.</i> , 2016) |
| Westphalia, Alemania. | Julio 2018 | <i>S. lycopersicum</i> | Ensayos en plantas, RT-PCR, secuenciación del genoma | (Menzel <i>et al.</i> , 2019) |
| Baja California, México. | Julio 2018 | <i>S. lycopersicum</i> | RT-PCR | (Camacho-Beltrán <i>et al.</i> , 2019) |
| California, Estados Unidos. | Septiembre 2018 | <i>S. lycopersicum</i> | ELISA, RT-PCR, microscopio de electrones, ensayos en plantas, secuenciación del genoma | (Luria <i>et al.</i> , 2017) |
| Michoacán, México. | Septiembre 2018 | <i>S. lycopersicum</i> <i>Capsicum. annum</i> | RT-PCR, TEM, secuenciación del genoma | (Cambrón-Crisantos <i>et al.</i> , 2018) |
| Sicilia, Italia. | Octubre 2018 | <i>S. lycopersicum</i> | RT-PCR, ensayos en plantas, secuenciación del genoma | (Panno <i>et al.</i> , 2019) |
| Antalya, Turquía. | Enero 2019 | <i>S. lycopersicum</i> | RT-PCR, secuenciación del genoma, ensayos en plantas, | (Fidan <i>et al.</i> , 2019) |
| Shandong, China. | Abril 2019 | <i>S. lycopersicum</i> | ELISA, RT-PCR, ensayos en plantas, secuenciación del genoma | (Yan <i>et al.</i> , 2019) |
| Sur de Inglaterra. | Julio 2019 | No mencionado | No mencionado | (Skelton <i>et al.</i> , 2019) |
| Alemania. | Julio 2018 | <i>S. lycopersicum</i> | PCR | (Menzel <i>et al.</i> , 2019) |
| Grecia. | Verano-otoño 2019 | <i>S. lycopersicum</i> | RT-PCR y ELISA | (Beris <i>et al.</i> , 2020) |
| Países bajos. | Octubre 2019 | <i>S. lycopersicum</i> | DAS-ELISA, RT-PCR en tiempo real y Illumina RNAseq. | (van de Vossenberg <i>et al.</i> , 2020) |
| Palestina. | 2019 | <i>S. lycopersicum</i> | | (Alkowni <i>et al.</i> , 2019) |
| Egipto. | Junio 2019 | <i>S. lycopersicum</i> cv. Elquds E448 | RT-PCR | (Amer y Mahmoud, 2020) |

1.2 Métodos de detección del ToBRFV

La detección del ToBRFV en muestras de hojas, semillas o frutos de plantas ha involucrado el uso de diversas técnicas. Si bien muchas de estas técnicas fueron originalmente desarrolladas para detectar otros virus, su adaptación para el ToBRFV es fundamental debido a su notable capacidad de propagación mecánica o por semilla. Esto resalta la importancia de detectar este virus de manera temprana. La mayoría de las técnicas efectivas para detectar el ToBRFV son de naturaleza molecular o serológica, dado que cumplen con los criterios de rapidez y especificidad necesarios para abordar la detección temprana de este virus. Sin embargo, también se han explorado recientemente algunas como; ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, CRISPR-Cas, entre otras, para su detección y ampliando así el espectro de herramientas disponibles en la lucha contra esta enfermedad.

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una técnica común y sensible para detectar el ToBRFV, se basa en el uso de oligonucleótidos específicos, que son capaces de amplificar una zona conservada del genoma de los aislados de ToBRFV, capaz de distinguir a este virus de otros aislados externos. Esta técnica fue usada en el artículo que describió por primera vez este virus (Salem *et al.*, 2016), en la figura 2 se presentan todas las regiones del genoma total del virus que han sido utilizadas por diferentes autores para su identificación. La región CP es la más utilizada debido a que es considerada conservada y específica. La figura incluye las referencias correspondientes de cada autor. Un ejemplo de un estudio que ha utilizado esta técnica de RT-PCR es el realizado por Rodríguez-Mendoza *et al.* (2019), quienes diseñaron oligonucleótidos específicos (ToBRFV-FMX y ToBRFV-RMX), que hibridan en la región codificante de la RdRP correspondiente al ORF1 a una temperatura de 55 °C que permiten la amplificación de un fragmento de 475 pb.

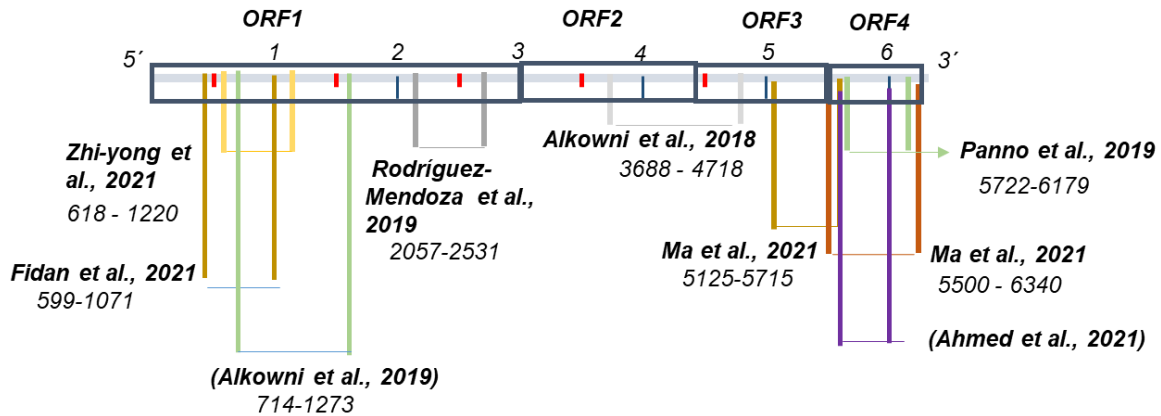


Figura 2. Representación de las regiones utilizadas para la identificación del ToBRFV por RT-PCR.

Otra técnica molecular utilizada para detección del ToBRFV es por amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) y detección visual (visual RT-LAMP) donde se analizaron hojas y semillas de pimiento y tomate. Utilizaron la secuencia publicada en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), específicamente con el número de acceso MN815773, como referencia para diseñar los oligonucleótidos específicos al virus utilizando el software LAMP Designer (OptiGene Limited, Horsham, Reino Unido), (ToBRFV_B3, ToBRFV-F3, ToBRFV_FIP, ToBRFV_BIP, ToBRFV_LoopB y ToBRFV_LoopF) que amplifican fragmentos de 278 y 163 pb, respectivamente. De acuerdo con los autores las pruebas de especificidad y sensibilidad para RT-LAMP y visual RT-LAMP son del 100% con un límite de detección de 2,25 femtogramo por microlitro ($\text{fg}/\mu\text{L}$) ($1 \text{ fg}/\mu\text{L} = 1000000 \text{ ng}$), también compararon su técnica con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) utilizando el colorante SYBR Green, arrojando parámetros de eficiencia similares a la RT-LAMP (Dietzgen *et al.*, 2021).

Se ha empleado otra técnica molecular de vanguardia, conocida como CRISPR-Cas (del inglés, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated systems Cas), para la identificación específica tanto del virus rugoso del tomate (ToBRFV) como del virus del mosaico del tomate (ToMV). Para ello, se diseñaron ARNs guías CRISPR (crRNA) específicos para cada virus utilizando el sistema computacional CRISPOR. Posteriormente, fusionaron ambas secuencias en un mismo crRNA y las insertaron en un promotor T7. Según

los autores, esta estrategia les permitió detectar la presencia de ToMV y ToBRFV a partir de 15 a 30 nanogramos (ng) de producto de RT-PCR, incluso en mezclas con ambos virus. Esta innovadora técnica representa un avance significativo en la detección precisa y específica de virus en plantas, proporcionando una herramienta valiosa para la investigación y el control de enfermedades virales en cultivos de tomate (Alon *et al.*, 2021).

Así mismo, los métodos serológicos son ampliamente implementados en la detección del ToBRFV, destacándose un estudio realizado en China. En este estudio se produjeron anticuerpos monoclonales sensibles y específicos a ToBRFV utilizando viriones de ToBRFV purificados como inmunógeno y también desarrollaron una tira inmunocromatográfica de oro coloidal (CGCS). Los autores probaron ambas técnicas descritas en siete tobamovirus y tres que infectan solamente a tomate. En dicho estudio muestran una sensibilidad límite en diluciones de 1:6,400 y 1:10,000 (p/v, g/mL) de tejido infectado para ambas técnicas dot-ELISA y CGICS (Zhao *et al.*, 2024). Según los autores, la empresa Agdia (EE.UU) ha comercializado un kit de diagnóstico basado en la técnica de ELISA (*Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) ImmunoStrip®), sin embargo, existe el riesgo de una detección cruzada con virus de la familia *Tobamovirus* como el TMV y ToMV. Por lo tanto, argumentan que el CGICS puede ser empleado como una detección rápida y sensible en campo a ToBRFV sin necesidad de equipos ni de un laboratorio.

Recientemente, se han implementado técnicas innovadoras para la detección del ToBRFV, resaltando la propuesta por Edith y sus colaboradores en 2023 (Edith *et al.*, 2023). Esta técnica se basa en el uso de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como biomarcadores de algunas enfermedades que afectan al cultivo del tomate, incluyendo el ToBRFV. En su estudio, las plantas de tomate fueron inoculadas con el virus y se analizaron en diferentes momentos post infección (pi), específicamente a las 3, 6 y 24 horas. Según los autores, desde las 3 horas pi con el virus, se logró detectar la presencia de varios VOCs, incluyendo ocimeno, cimol, verbenona y farnesol. A las 6 y 24 horas pi, se detectaron los VOCs cimol, verbenona y farnesol, los cuales se identificaron como indicadores significativos para la detección indirecta del ToBRFV. Otro avance significativo es el método de detección del ToBRFV mediante visión por computadora en imágenes RGB (del inglés red, green y blue) desarrollado por Angélica *et al.* (2023). Estos autores diseñaron una metodología propia y

encontraron que las redes neuronales y las máquinas de soporte vectorial fueron los mejores clasificadores para identificar el ToBRFV en hojas de tomate. Estos clasificadores lograron una exactitud del 84%, con precisiones del 85% y 82%, respectivamente.

La hibridación molecular con sondas marcadas (método dot-blot), es una técnica de detección común en virología molecular, se aumentó su uso con el desarrollo de precursores no radiactivos como la digoxigenina (Pallás *et al.*, 2017). Esta técnica implica la aplicación directa de un ácido nucleico sobre membranas de nitrocelulosa o nylon y su posterior detección con sondas específicas de viroides. Las sondas se sintetizan incorporando digoxigenina (DIG) en transcritos de ARN mediante transcripción *in vitro*. Las muestras que pueden ser ARN totales o ARN viral purificado se fijan a la membrana con luz UV. La detección con el sistema DIG, fue desarrollada por la empresa Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, German), donde se optimizaron varios factores que podrían afectar la eficiencia de la hibridación ARN:ARN como la temperatura, la concentración de sal y los desajustes de bases y la inclusión de aceleradores de hibridación (Barratt y Arkell, 2020; Pallás *et al.*, 2017).

1.3. Clonación y caracterización molecular de aislados en el mundo

El primer reporte sobre la secuencia del genoma completo del ToBRFV de un aislado de Jordania fue presentado por Salem *et al.* (2016). Los autores usaron enzimas de alta fidelidad, para amplificar el genoma en varios fragmentos y conservarlos en plásmidos de clonación (pCRBlunt de Invitrogen). La secuenciación se llevó a cabo utilizando la técnica de Sanger, y actualmente se encuentra en la base de datos del NCBI con el número de acceso KT383474. Chanda *et al.* (2020) examinaron muestras de California, secuenciando el genoma completo del ToBRFV mediante la técnica de Illumina. Su secuencia está disponible en el NCBI con el número de acceso MT002973.

Por otro lado, Zhi-yong *et al.* (2021) amplificaron el genoma total del ToBRFV utilizando muestras de China mediante RT-PCR. Posteriormente, clonaron el genoma en un vector PCB301 y realizó la secuenciación utilizando el método de Sanger. La información de esta secuencia se encuentra en el NCBI con el número de acceso MT018320. Finalmente, un estudio que reporta por primera vez la presencia del ToBRFV en Suiza ensambló el genoma completo del virus, con un tamaño de 6386 pb. Este genoma fue secuenciado mediante la

técnica Illumina en un servicio externo. La secuencia obtenida está registrada en el NCBI con el número de acceso OM305070 (Mahillon *et al.*, 2022). Se han realizado diversos trabajos de secuenciación del genoma completo del ToBRFV en México. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Camacho-Beltrán y colaboradores (2019). En este trabajo, los autores diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar dos fragmentos del genoma utilizando una enzima de alta fidelidad. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y se secuenciaron estos clones por separado. Luego, las secuencias obtenidas fueron unidas para obtener el genoma completo del ToBRFV, que tiene un tamaño de 6189 pares de bases (pb). Esta secuencia se encuentra disponible con el número de acceso MK319944 en la base de datos del NCBI.

Un clon infectivo (CI) de ADNc se crea a partir de copias estables de ADNc de secuencias virales. Estos clones representan materiales genéticos virales que pueden utilizarse para establecer infecciones continuas de los virus (Tu *et al.*, 2021). El proceso generalmente comienza con la amplificación del genoma completo del virus de interés, que luego se introduce en un vector de transcripción utilizando el promotor del bacteriófago T7 y una ARN polimerasa del T7, también se utiliza el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) el cual fue propuesto por Odell *et al.* (1985).

Los tobamovirus son virus de ARN monocatenario de sentido positivo de la familia *Virgaviridae*. La estabilidad de su estructura, y su capacidad de persistir largo tiempo en el suelo, drenaje o agua de riego los han convertido en alternativas para usarse como herramientas biotecnológicas en este caso como un CI, tal es el caso de un estudio realizado en China por Tu *et al.* (2021) quienes diseñaron un clon infectivo del genoma completo del virus del mosaico moteado del tabaco (ToMMV). Primero amplificaron el genoma total mediante la técnica de PCR con una enzima de alta fidelidad y tres pares de cebadores específicos, los cuales amplifican tamaños aproximados de 2000 a 2300 pb dejando áreas complementarias entre ellas para posteriormente concatenar los fragmentos y obtener el genoma completo del ToMMV, por último lo clonaron en un vector. Una vez construido el clon infectivo utilizaron huéspedes naturales como *Solanum lycopersicum*, *Solanum capsicum* y *Nicotiana benthamiana* para agroinfiltrar con el CI y verificar su funcionamiento.

Según las micrografías electrónicas se observó una gran cantidad de viriones de ToMMV en forma de varilla rígida en las hojas de *N. benthamiana*

Hasta el momento, el estudio realizado en China por Xiuling *et al.* (2021) destaca como la única referencia que ha logrado obtener un clon infectivo de ADNc de genoma completo del ToBRFV. Analizaron la secuencia genómica completa de ToBRFV–Y2020-3 con número de acceso MZ004925, la cual consta de un tamaño de 6390 nucleótidos. Amplificaron dos fragmentos (A y B) con una zona complementaria, después los concatenaron en el vector binario pCB301 bajo el control de un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor HDRz, ribozima del virus de la hepatitis delta: tNos. Figura 3.

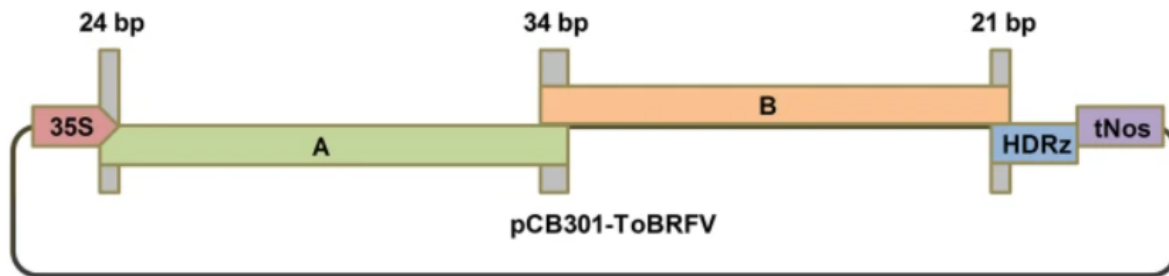


Figura 3. Diagrama representativo de la técnica utilizada para conseguir el clon infectivo del ToBRFV. **bp**= pares de bases, **HDRz**= virus del mosaico de la coliflor, **tNos**= ribozima del virus de la hepatitis delta. Imagen obtenida de Xiuling *et al.* (2021).

El estudio de la estimación del tiempo relativo del ancestro común más reciente (TMRCA) de ToBRFV fue abordado por Esmaeilzadeh *et al.* (2023). Utilizando la comparación de la relación de las distancias patrísticas entre ToBRFV y otros virus, pudieron construir un árbol filogenético de máxima probabilidad que proporcionó información detallada sobre el tiempo relativo estimado de cada nodo. En este análisis, se evaluaron siete aislados de ToBRFV junto con diez aislados de tobamovirus provenientes de diversos países. La inclusión de estos aislados en una única filogenia permitió estimar el tiempo de divergencia entre ToBRFV y otros tobamovirus, situándose aproximadamente entre 0,8 y 2,7 unidades de tiempo (datos de análisis relativos) (Figura 4).

Se ha estudiado la diversidad genética del ToBRFV, y se ha encontrado la agrupación de 3 clados distintos, en un clado se agrupan aislados de México, Países Bajos, Italia, Estados Unidos, Canadá, Egipto, y Perú; otro clado conformado por Francia y otro clado por Bélgica, Países Bajos e Inglaterra (Salih Yilmaz, 2023). Sin embargo, en un estudio realizado por Vargas-Mejía *et al.* (2023), secuenciaron un aislado mexicano y se comparó con otro aislado previamente descrito en el país. Los resultados mostraron que el aislado recién secuenciado se agrupaba en un clado diferente, junto con aislados de Medio Oriente, Perú, Egipto y los Países Bajos. Los autores concluyeron que al menos dos introducciones de ToBRFV han ocurrido en México. Dado que México importa una gran cantidad de semillas de los Países Bajos, la secuencia publicada sugiere que el aislado podría haber llegado desde este país (Figura 5).

El conocer molecularmente su genoma total del ToBRFV es esencial para desarrollar estrategias efectivas para su control, detección y su manejo en cultivos agrícolas. Para ello, es crucial comprender todos los aspectos de su biología, incluyendo su manera de replicación, cómo afecta a las plantas provocando marchitez, enanismo, deformaciones y halos concéntricos, conocer la manera en que logra superar la resistencia y tolerancia de las plantas, así como su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y cultivos. El análisis del genoma completo del ToBRFV proporciona información invaluable sobre su estructura genética y las estrategias que ha desarrollado para adaptarse y sobrevivir en diversos entornos. Dado que cada región y cultivo presenta condiciones únicas como; la temperatura, el pH y otros factores, entender la adaptabilidad del virus es fundamental para comprender su dispersión y su impacto en la agricultura. Con esta comprensión detallada del ToBRFV, podemos desarrollar enfoques de control más efectivos. Por ejemplo, el diseño de genes de resistencia o la creación de plantas genéticamente modificadas para tolerar el virus se vuelven posibles al conocer los mecanismos que emplea el virus para infectar y propagarse en las plantas.

En este contexto, la detección temprana y precisa del ToBRFV es fundamental para implementar medidas de control oportunas. La técnica de hibridación molecular utilizando una sonda marcada con digoxigenina representa una herramienta valiosa en este sentido. Esta

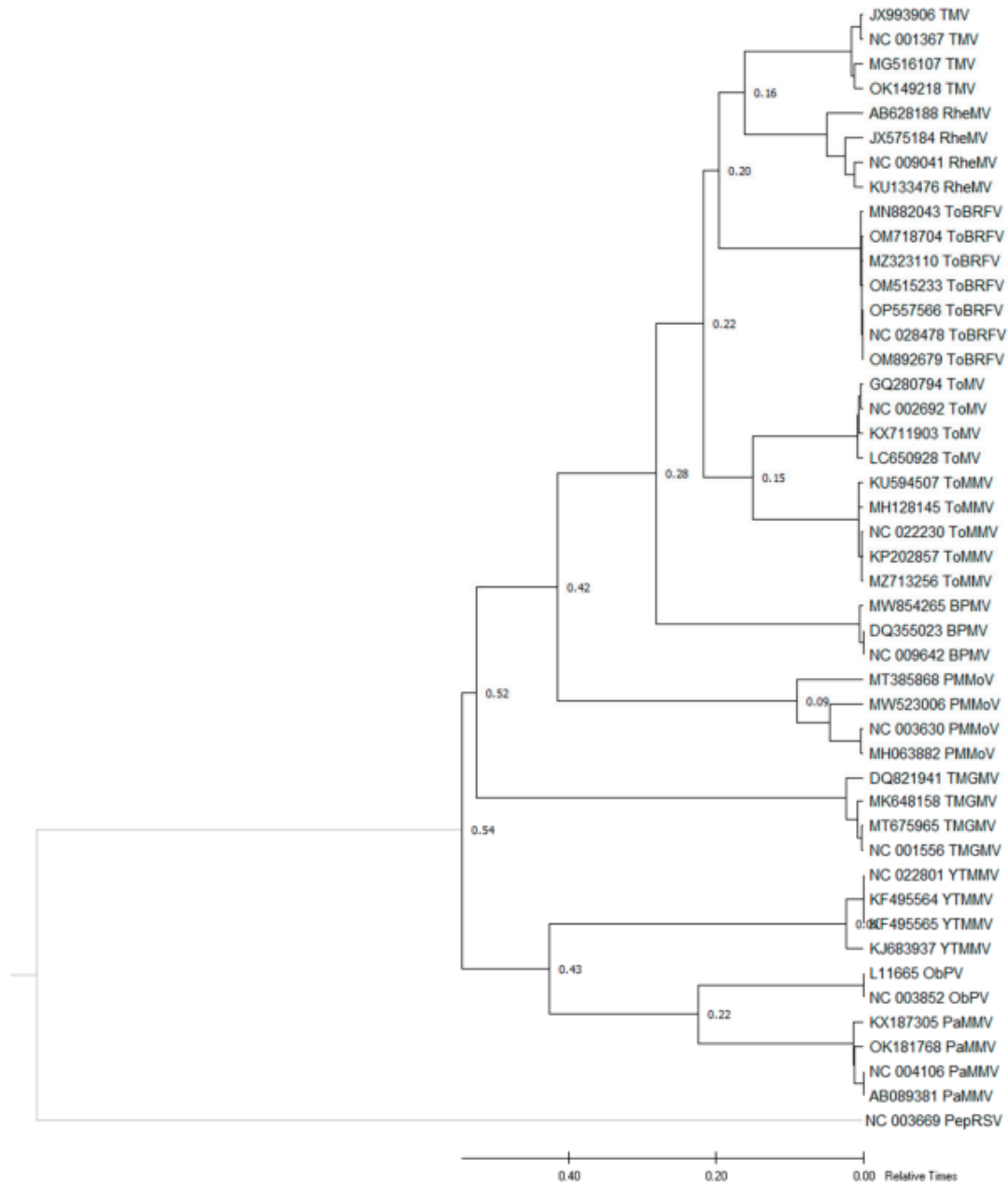


Figura 4. Árbol filogenético representativo de la estimación del tiempo de divergencia de ToBRFV con otros diez tobamovirus, incluyendo el virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV), el virus del mosaico del tomate (ToMV), el moteado del tomate virus del mosaico (ToMMV), el virus del moteado leve del pimiento (PMMoV), el virus del mosaico verde leve del tabaco (TMGMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del moteado leve del pimentón (PaMMV), el mosaico de rehmannia virus (RheMV), el virus del moteado del pimiento (BPMV), el virus del moteado leve de la cola amarilla (YTMMV), y el virus del pimiento obuda (ObPV). Imagen obtenida de Esmaeilzadeh et al. (2023).

III. Hipótesis

La amplificación, clonación y caracterización molecular del genoma completo de ToBRFV aportará informaciones indispensables para futuros estudios tal como el estudio de la diversidad, la evolución y la epidemiología de ToBRFV y obtención de clones infectivos. Por otro lado, la construcción de una sonda molecular marcada con digoxigenina y complementaria a una zona específica del genoma de ToBRFV permitirá su uso para detectar el virus en estudios con un gran número de muestras como prospecciones de terrenos y análisis semi-cuantitativo en pruebas experimentales.

IV. Objetivo general

Caracterizar aislados mexicanos del virus ToBRFV por secuenciación molecular y desarrollar una sonda marcada digoxigenina para la identificación del virus usando la técnica de hibridación molecular.

V. Objetivos específicos

- 1.** Construir una sonda molecular marcada con digoxigenina específica a ToBRFV y determinar su eficiencia y sensibilidad para detectar el virus.
- 2.** Amplificar y clonar el genoma completo de un aislado de ToBRFV.
- 3.** Secuenciar y analizar la relación filogenética de los aislados obtenidos de México con virus del mismo género reportados de otros países.

VI. Materiales y Métodos

6.1. Material vegetal y aislado viral

Se utilizaron hojas de tomate, con síntomas típicos de la infección con tobamovirus: rugosidad, necrosis y amarilleo. Estas hojas fueron colectadas en dos lugares y fechas diferentes; (i) marzo del 2019 en los invernaderos de la empresa NatureSweet Tomatoes en el estado de Jalisco (Guadalajara), y (ii) agosto 2023, de invernaderos del Sr. Victor Cruz en el estado de Hidalgo (Alfajayucan). Todas las muestras llegaron por correo rápido, en condiciones de refrigeración a los laboratorios del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del Centro de Investigación en Química Aplicada (DBA-CIQA).

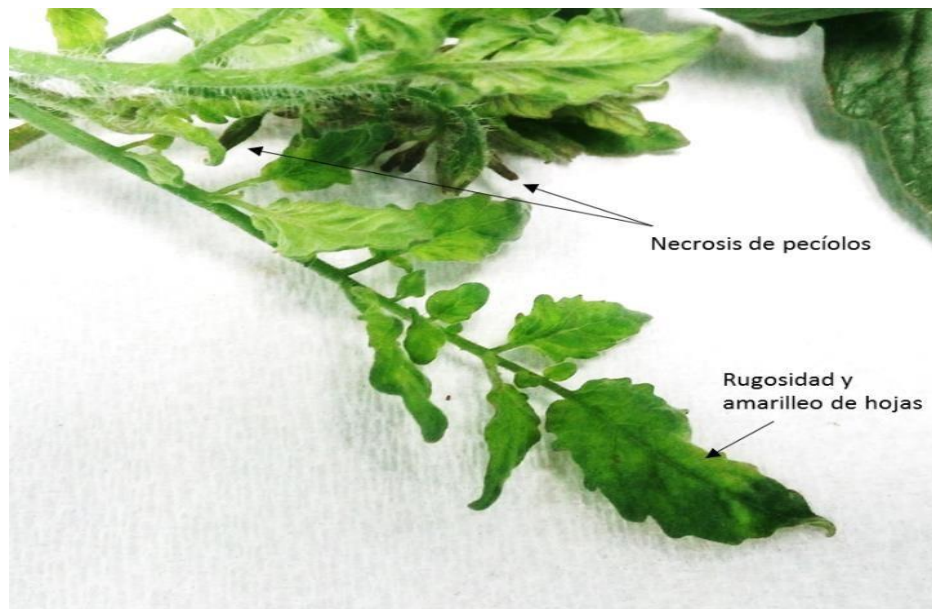


Figura 6. Muestra representativa del tejido vegetal de tomate con síntomas característicos de infección por tobamovirus. Las flechas indican el tipo de síntomas observados. Imagen de autoría.

A partir de estas muestras, se tomó tejido de hojas para llevar a cabo las extracciones de ARN total y posteriormente la RT-PCR para corroborar la presencia del virus ToBRFV. El resto de las muestras se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la Figura 6 se muestra una imagen representativa de las muestras con infección viral utilizadas en este estudio.

6.2. Extracción del material genético

La extracción de ARN total se realizó usando el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente: para llevar a cabo la lisis de las células, cada muestra se molió previamente en presencia de nitrógeno líquido (N₂l) y se homogenizó con el reactivo Tri Reagent (solución monofásica que contiene fenol con tiocianato de guanidina, proporcionada por la empresa Ambion). Para la retención, el lavado y la elución del ARN se usó; un filtro de silica en la columna Zymo-Spin™, una solución a base de etanol y agua estéril libre de nucleasas, respectivamente. Por último, la concentración, la pureza y la integridad del ARN total se midieron por espectrofotometría (BioTeK, Epoch2, Microplate Spectrophotometer, USA) y por electroforesis (Bio RAD, PowerPac Basic 300; cámara Labnet; USA) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado en el fotodocumentador Gel-Doc EZ BioRad USA, respectivamente.

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR y la PCR con retro-transcripción (RT-PCR), se usaron en varias actividades de esta tesis. Todos los cADNs fueron sintetizados a partir de los extractos de ARN total (apartado 6.2). Para la amplificación de las secuencias de interés por PCR se utilizaron diferentes pares de oligonucleótidos (oligos) que se describen en la Tabla 1 del Anexo I, para sus diseños se usó como referencia el aislado de Jordania con el número de acceso KT383474.1. Para la comprobación del producto generado se utilizó la técnica de electroforesis (Bio RAD, PowerPac Basic 300; cámara Labnet; USA) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visalizado en el fotodocumentador Gel-Doc EZ BioRad USA.

6.3.1. PCR para la identificación de ToBRFV

Para identificar la presencia del virus en las muestras de tejido vegetal se usaron oligos específicos AGB-123/124 que hibridan en la región CP del genoma viral y amplifican un fragmento de 457 pb que comprende los nucleótidos 6292-5874. Las reacciones de RT y PCR se llevaron a cabo usando las enzimas SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y Taq ADN Polymerase, recombinant (Invitrogen), respectivamente, siguiendo el protocolo del fabricante y usando un termociclador (Labnet, model: TC-020-24, Multigene™ MINI).

Las amplificaciones se realizaron en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El mismo fragmento se usó para construir la sonda BRF-S457 (apartado 6.4)

6.3.2. PCR para secuenciación

Los cADNs destinados para la secuenciación directa o la clonación para su secuenciación, fueron amplificados con oligos específicos (Tabla 2, Anexo II). La RT y la PCR se realizaron con enzimas de alta fidelidad: la retrotranscriptasa Transcriptor High Fidelity cADN Synthesis (Roche) y la polimerasa ADN de Platinum SuperFi II (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que incluye: 1X tampón de reacción, 10 µM de cada oligo, 200 µM dNTPs y 1X de polimerasa y se desarrollaron en un termociclador de la marca Labnet (model: TC-020-24, Multigene™ MINI), bajo las siguientes condiciones; un ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 segundos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 98-°C durante 15 segundos, de hibridación durante 30 segundos, de extensión a 72 °C y de extensión final a 72 °C por 1 minuto. Las temperaturas de hibridación y el tiempo de polimerización de cada fragmento se ajustaron según las temperaturas de fusión (T_m) de los oligos y la longitud del fragmento amplificado, respectivamente (Tabla 4, Anexo IV).

En el caso del aislado de Jalisco se amplificaron dos fragmentos solapantes F5' de 4,718 pb y F3' de 2,712 pb y corresponden al genoma total (Figura 7). Se usó el oligo AGB-188 para generar la primera cadena complementaria y los oligos AGB-190/121 y AGB-122/188, para cada fragmento. Estos fragmentos se clonaron por separado (apartado 6.5)

En el caso del aislado de Hidalgo, se amplificaron 7 fragmentos solapantes que cubren la longitud total del genoma (Tabla 3, Anexo III). Estos fragmentos se nombraron según su orden desde FR1 hasta FR7 (Figura 8). Para llevar a cabo este objetivo se sintetizó una cadena complementaria por RT usando el oligo AGB-188. A partir de esta cadena se realizaron las amplificaciones usando varios pares de oligos. Los productos generados para clonación o secuenciación fueron purificados a partir del gel de agarosa con el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up de Promega, siguiendo el protocolo del fabricante.

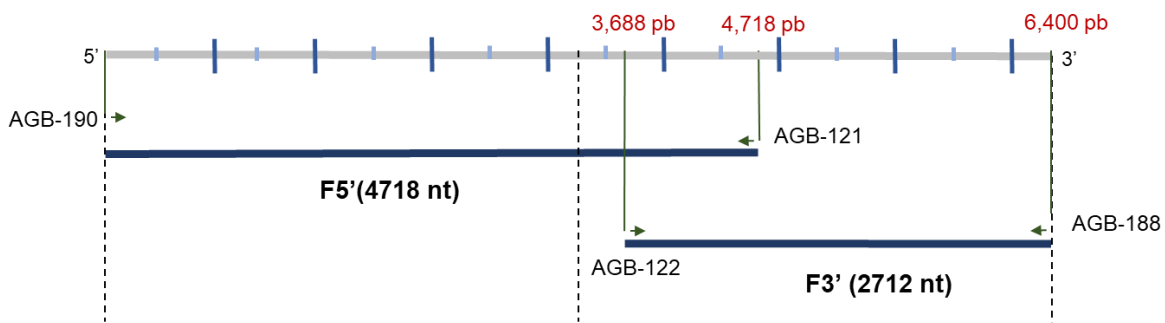


Figura 7. Posición y tamaño de dos fragmentos amplificados cubriendo al genoma completo del ToBRFV.

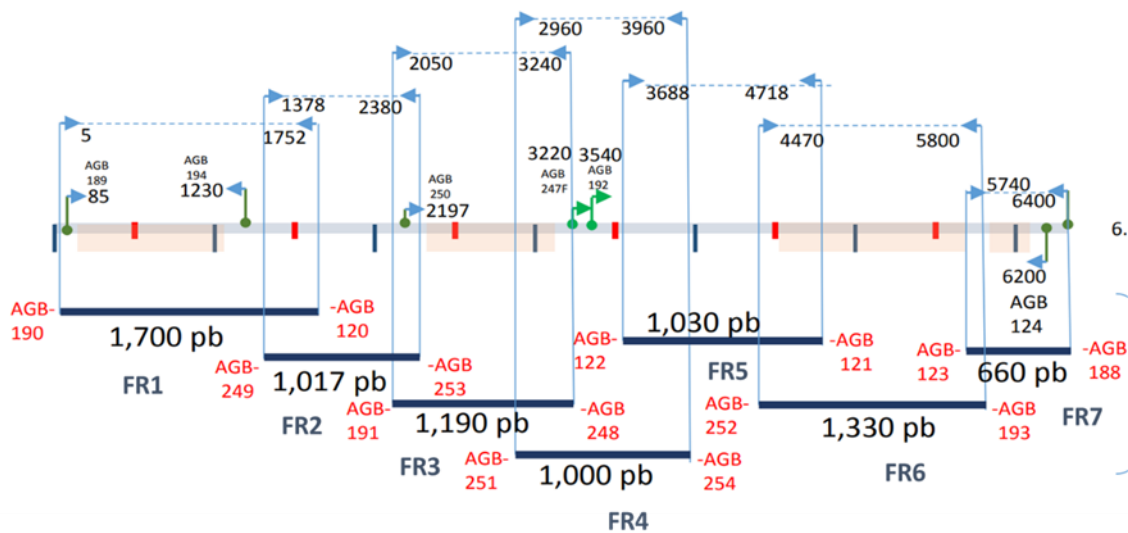


Figura 8. Esquema representativo del diseño de oligos específicos para la secuenciación directa del aislado de Hidalgo.

6.3.3. PCR para la comprobación de la clonación.

Para comprobar la correcta inserción de los fragmentos clonados en los vectores, se realizó una PCR con oligos específicos diseñados dentro del fragmento de interés. Las amplificaciones se llevaron a cabo con las mismas condiciones para la identificación del virus. En caso de comprobación directa de una colonia bacteriana, previamente, se resuspendió cada colonia en 100 μ l de agua desionizada y se hirvió (~90 °C) para liberar los plásmidos y se tomó 1 μ l de la mezcla por reacción de PCR.

Para comprobar la dirección del fragmento en la construcción recombinante, a partir del extracto de plásmidos se realizó una PCR, que lleva un oligo específico del inserto y otro estándar correspondiente a la región de uno de los promotores del vector usado. Se usaron diferentes oligos internos del inserto, dependiendo del fragmento clonado, siempre se tomó en consideración la temperatura de hibridación de los oligos y el tiempo de extensión de la polimerasa. Todas las reacciones se realizaron usando la polimerasa platinum Taq DNA polimerase de Invitrogen.

6.4. Construcción de la sonda molecular marcada con digoxigenina-11-UTP.

Para elegir las zonas del genoma viral con potencial de especificidad que permite distinguir ToBRFV de otros tobamovirus, se realizó un alineamiento de las secuencias de aislados de ToBRFV y otros miembros de la familia tobamovirus disponibles en la base de datos del NCBI. Se pretendió encontrar zonas con alto porcentaje de similitud entre los miembros ToBRFV y relativamente distintos de otros tobamovirus. Se identificaron 4 regiones correspondientes a cada uno de los 4 ORFs que lleva el genoma (Figura 9). Sin embargo, en esta tesis solo se trabajó con las zonas localizadas en los ORF 3 y 4.

El primer paso fue la obtención de clones que lleva el amplificado de cada zona (apartado 6.5). Para obtener los transcritos, los clones se llevaron a un siguiente paso de digestión y transcripción. La construcción de las sondas marcadas con digoxigenina, se realizó siguiendo procedimientos estándar (Green y Sambrook, 2012).

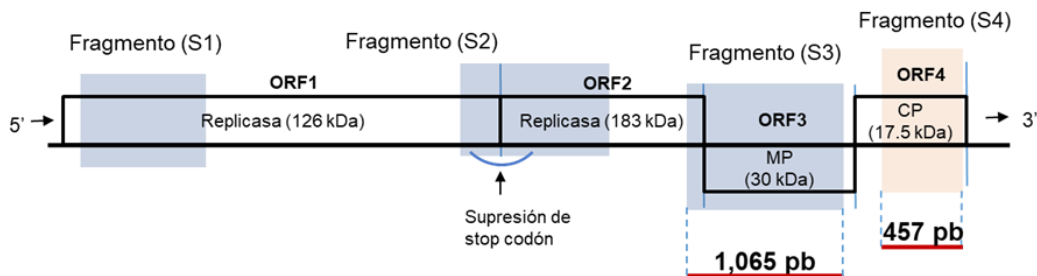


Figura 9. Fragmentos identificados correspondientes a cada uno de los 4 ORFs que conforman al genoma completo. Fragmento S1; localizado en el ORF1. Fragmento S2; en el ORF2. Fragmento S3; localizado en el ORF3 y el Fragmento S4; presente en el ORF4.

6.4.1. Sonda BRF-S457

Para generar los transcritos negativos marcados con digoxigenina o sonda con dirección complementaria al inserto viral, el plásmido pGEM-BRFV457 (apartado 6.5) se digirió con la enzima *SacII* que se encuentra río arriba del extremo 5' del inserto. El ADN linealizado se purificó y se sometió a una reacción de transcripción usando la transcriptasa SP6 (Roche) y una mezcla de los ribonucleótidos, ATP, CTP, GTP y el nucleótido UTP marcado con digoxigenina (DIG-UTP). La reacción se incubó por 2 horas a 37 °C.

Para generar los transcritos positivos (dirección viral 5'→3') o control positivo: el plásmido pGEM-BRFV457, se digirió con la enzima *SacI* que se encuentra río abajo del extremo 3' del inserto viral. Tras purificación del producto linealizado, se realizó la transcripción usando la transcriptasa T7 (Sigma) y una mezcla de nucleótidos no marcados con digoxigenina. La reacción se incubó 2 horas a 37 °C.

6.4.2. Sonda BRF-S1065

En el caso de la segunda sonda se siguió el mismo procedimiento. Sin embargo, para generar los transcritos negativos marcados con digoxigenina o sonda, el plásmido pTOPO-BRFV1065 (apartado 6.5) se linealizó con la enzima *HindIII* que se encuentra río arriba del extremo 5' del inserto y se purificó a partir del gel de agarosa al 1 %. La transcripción se

realizó usando la transcriptasa de ARN T7 (Promega) y una mezcla de los ribonucleótidos, con el nucleótido UTP marcado con digoxigenina (DIG-UTP), la reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Para generar los transcritos positivos o control positivo, el plásmido pTOPO-BRFV1065 se digirió con la enzima *ApaI* que se encuentra río abajo del extremo 3' del inserto viral. Tras purificación del producto linealizado, se realizó la transcripción usando la transcriptasa SP6 (Roche) y una mezcla de nucleótidos no marcados con digoxigenina. La reacción se incubó 2 horas a 37-°C.

Al final de todas las reacciones de transcripción se eliminó el ADN plasmídico de la reacción con adición de 5U de DNAsa y su incubación durante 15 min a 37-°C. Posteriormente, los restos de enzimas se eliminaron por precipitación con 2.5 volúmenes de etanol al 100%, 8M de MgCl₂, 4M EDTA y los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis y cuantificados por espectrofotometría para confirmar la obtención de la sonda.

La eficacia de las sondas para detectar la presencia de ToBRFV en las muestras se realizó mediante la técnica de hibridación molecular tipo dot-blot en los extractos de ARN usando el sistema DIG de detección (protocolo desarrollado por Roche Diagnostics). Para ello, se usó: una membrana de nylon con carga positiva (Roche Diagnostics), una solución de hibridación estándar (Roche Diagnostics) y con sus reguladores de lavado correspondientes. La detección se realizó por quimioluminiscencia usando los reactivos y los protocolos proporcionados en las herramientas de marcaje y detección (Roche Diagnostics). En la figura 10 se ilustra en brevemente las etapas de la técnica y en el anexo V se presenta el protocolo más detallado.

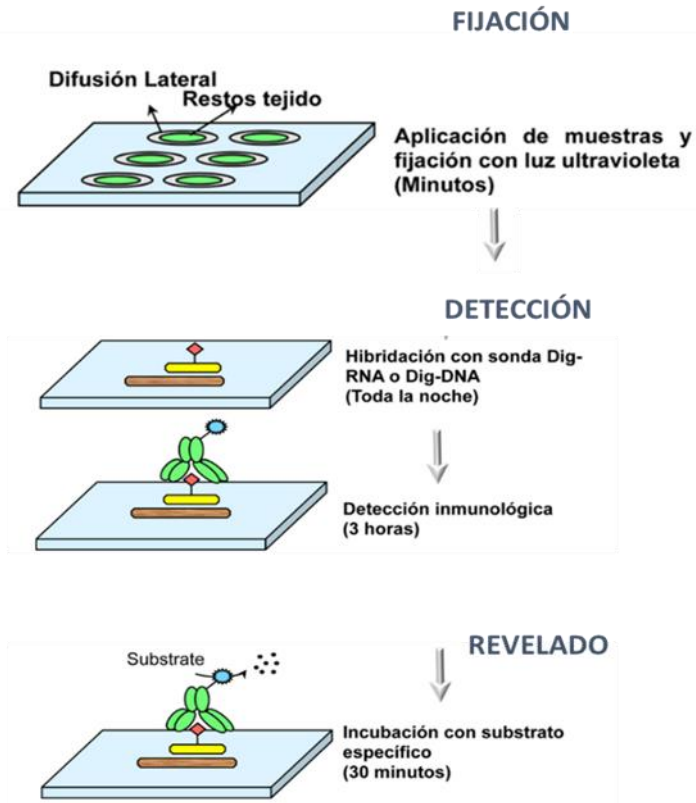


Figura 10. Etapas del proceso de Hibridación Molecular por la técnica de Dot Blot (Roche Diagnostics).

6.5. Clonación de cDNAs

Se usó el sistema “pGEM®-T Easy Vector” de Promega para clonar el fragmento de 457 pb [6292-5874 nt] destinado para la construcción de la sonda BRF-S457 (amplificación del fragmento en apartado 6.3.1 y construcción de la sonda en apartado 6.4). La ligación del inserto con el vector pGEM-T Easy se realizó en un volumen final de 10 µl usando la enzima T4 DNA Ligase a 5 unidades Weiss y siguiendo el protocolo correspondiente. La transformación se realizó en células químicamente competentes de alta eficiencia JM109 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK⁻,mK⁺), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacIqZAM15*]). La digestión con la enzima de restricción *EcoRI* se usó para comprobar la correcta inserción en el vector y la PCR con los oligos AGB 124/T7 para determinar la dirección 5'-3' del inserto viral (CP) con respecto a los promotores del vector.

El clon elegido se nombró pGEM-BRF457, haciendo referencia a vector pGEM, al virus ToBRFV y al tamaño del fragmento clonado 457pb.

Se usó el sistema “Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning”, para clonar los fragmentos F5´ y F3´ del aislado Jalisco (apartado 6.3.4). La ligación y la transformación se realizaron siguiendo el protocolo del producto y a partir de las colonias obtenidas se hizo la primera comprobación por PCR usando los pares de oligos AGB122/121 y AGB 123/124 que generan cADNs de aproximadamente 4718 y 2712 pb en F5´ y F3´, respectivamente. Posteriormente, se hizo extracción de plásmidos de las colonias que dieron un resultado positivo y se realizó la segunda comprobación por digestión usando la enzima de restricción *Hind* III que genera 3 bandas de tamaños: ~4070, 3280 y 884 pb en el gel de agarosa para el clon que lleva F5´ y una banda de ~6231 pb para F3´. Los clones obtenidos se llamaron pTOPOBRF5´ y pTOPOBRF3´.

A partir del clon pTOPOBRF3´, se obtuvo una estructura más reducida que lleva únicamente un fragmento 1065 pb localizado en la región MP del genoma y destinado a construir la segunda sonda BRF1065 (construcción de la sonda apartado 6.4). El proceso se realizó en dos etapas de digestión y ligación: la primera digestión se hizo con la enzima *Kpn*I que corta 2 veces pTOPOBRF3´ y permitió eliminar un fragmento de 760 pb del inserto viral desde su extremo 5´ dejando extremos compatibles, la religación con la enzima T4 ligasa de Promega (incubación 16 h a 4 °C) terminó reconstruyendo el sitio de restricción *Kpn*I. Para comprobar el éxito de la clonación se realizó una digestión con la misma enzima *Kpn*I.

La segunda digestión se realizó con la enzima *Apa*I que a su vez corta en dos sitios de restricción y permitió eliminar un fragmento de 959 pb del inserto viral en su extremo 3´ dejando extremos compatibles, la religación con la enzima T4 ligasa de Promega se terminó reconstruyendo el sitio de restricción *Apa*I. Para comprobar el éxito de la clonación se realizó una digestión con la misma enzima *Apa*I. El clon obtenido se nombró pTOPO-BRF1065.

6.6. Secuenciación y Análisis bioinformático

Con el fin de realizar la secuenciación de los aislados de ToBRFV se prepararon cantidades suficientes de plásmidos usando el kit de FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction o de productos de PCR purificados usando el kit de Promega Wizard SV Gel and PCR Cleanup. Se diseñaron veintinueve oligos para asegurar una secuenciación completa a lo largo del

genoma viral (Figura 8; Tabla 1, Anexo I). La secuenciación se realizó con el secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl) perteneciente al Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este equipo tiene la capacidad de secuenciar fragmentos de ADN de aproximadamente 800 a 1000 pb en una sola corrida, por lo que se amplificó el genoma completo del virus en fragmentos de este tamaño.

Los datos recibidos, fueron sometidos a procesos de limpieza quitando extremos con fondo y de ensamblaje considerando las zonas solapantes con el programa BioEdit versión 5.0.9 (Hall, 1999). La búsqueda de ORFs se realizó utilizando el programa ORF Finder disponible en la página de NCBI. Los perfiles y dominios de las proteínas se analizaron en las bases de datos de dominios y familias de Proteínas Prosite (prosite.expasy.org) y pfam (<http://motif.genome.jp>).

Para estudiar las relaciones filogenéticas, entre los nuevos aislados secuenciados y otros de diferentes orígenes geográficos, se realizaron alineamientos de secuencias completas (nucleicos) y parciales (nucleicos y aminoácidos) de cada ORF usando el programa Clustal X (Larkin *et al.*, 2007). Los aislados usados en este estudio fueron tomados de la base de datos NCBI. Se pretendió, considerar la diversidad genética descrita por Van de vossenberg (2020). Todos los oligos usados se encuentran en la tabla 6 del Anexo VIII.

Las relaciones se infirieron usando el programa Mega 11 (Tamura *et al.*, 2021) y la estimación de la distancia genética se realizó según el modelo de dos parámetros (Kimura, 1980), considerando que la tasa de transición es diferente a la tasa de transversión, que todos los nucleótidos ocurren con igual frecuencia y las distintas sustituciones son equiprobables.

El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó a los datos de secuencia fue el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano, el cual se utilizó para evaluar las distancias de nucleótidos entre los aislados de STV e inferir sus relaciones filogenéticas mediante el método de máxima verosimilitud (ML) (Tamura *et al.*, 2021). El papel de la selección natural a nivel molecular se evaluó comparando la tasa de sustituciones no sinónimos por sitio no sinónimo (dN) y la tasa de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) según el método de Pamilo y Bianchi (1993). Todos estos análisis se realizaron con Mega 11. Las sustituciones sinónimas, también llamadas mutaciones sinónimas o neutras, son cambios en la secuencia

de nucleótidos del ADN que no alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante. Debido a que no afectan la estructura de la proteína, estas sustituciones reflejan de manera más precisa la diversidad genética real. En contraste, las sustituciones no sinónimas, también conocidas como mutaciones no sinónimas o cambiantes, modifican la secuencia de aminoácidos de la proteína, lo cual puede alterar su estructura y función.

VII. Resultados

7.1 Construcción de las sondas moleculares marcadas con digoxigenina para detectar ToBRFV

7.1.1. Extracción de ARN total e identificación del virus

Las extracciones del ARN total se realizaron a partir de muestras de hojas de tomate provenientes de los estados de Jalisco e Hidalgo en México. En total se procesaron 10 muestras, 5 de cada estado (Figura 11). El patrón de bandas obtenido incluyendo las dos bandas correspondientes a las subunidades del ARN ribosomal indica que el material genético no sufrió degradaciones.

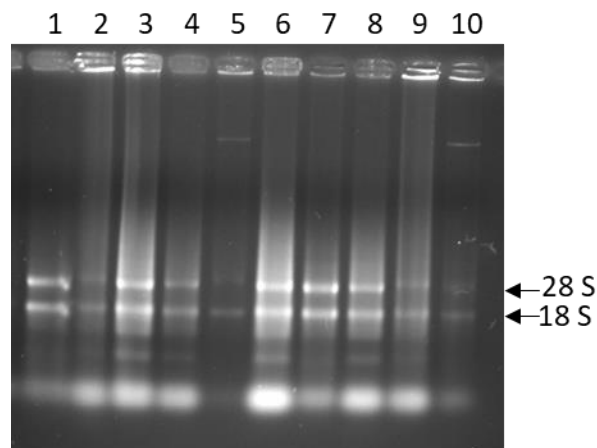


Figura 11. Electroforesis de ARN total en gel de agarosa al 1%. Los carriles 1 a 10: extractos de ARN total de hojas de tomate. La apariencia clara del ARN ribosomal 28S y 18S (marcados con flechas) sin manchas indica que se obtuvo ARN de buena calidad.

Una vez obtenido el ARN total, la identificación del virus se realizó por la técnica de RT-PCR, en todas las muestras se obtuvo el producto de ADN (cADNs) del tamaño esperado de 457 pb (Figura 12).

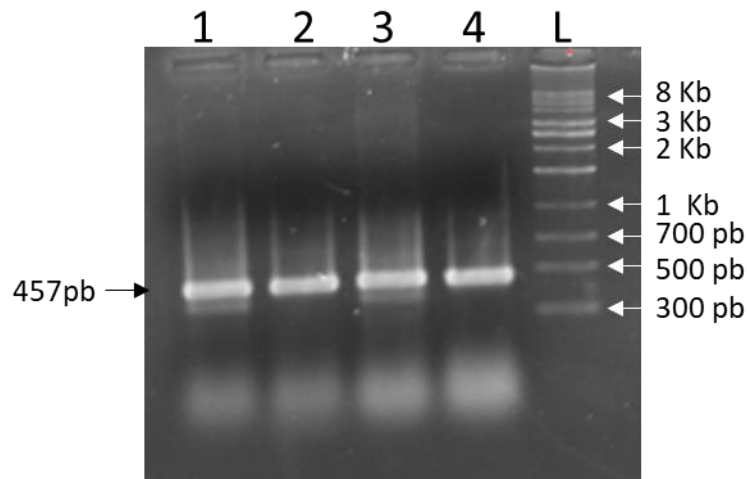


Figura 12. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de RT-PCR utilizando oligos específicos al virus rugoso de tomate. Los carriles 1 al 4 corresponden a las muestras analizadas (el tamaño del producto amplificado se muestra a la izquierda de la imagen), el carril L corresponde al marcador de tamaño molecular ADN (ADN Ladder 300pb-8000 pb/Axygen), y a su derecha los tamaños correspondientes.

7.1.2. Clonación y transcripción

7.1.2.1. Sonda BRF-S457 (CP)

A partir de los cADNs obtenidos y purificados se realizó la clonación en el vector pGEM-T-easy (apartado 6.4.1). La clonación exitosa se comprobó por la digestión con la enzima *EcoRI* que digirió el plásmido en dos sitios y liberó el fragmento clonado de 457 pb (Figura 13A). La dirección 5' a 3' del inserto (dirección positiva del genoma viral) con respecto al promotor T7 se comprobó por PCR usando los oligos T7 y AGB124. Todas las digestiones que dieron un fragmento de ~ 500 pb tienen la posición del extremo 5' del inserto río abajo del promotor T7. La ausencia de este amplificado indica la dirección contraria (Figura 13B). El clon elegido se llamó pGEM-BRF457.

El ADN linealizado con *SacII* se purificó y se sometió a una reacción de transcripción usando la transcriptasa SP6 y una mezcla de nucleótidos con digoxigenina. La concentración de transcritos obtenidos fue de 1.7 ng/μl en un volumen de 10 μl.

El ADN linealizado con *SacI* se purificó y se usó para realizar la transcripción con la transcriptasa T7 y una mezcla de nucleótidos no marcados con digoxigenina. La concentración de transcritos obtenidos fue de 0.5 ng/μl en un volumen total de 20 μl.

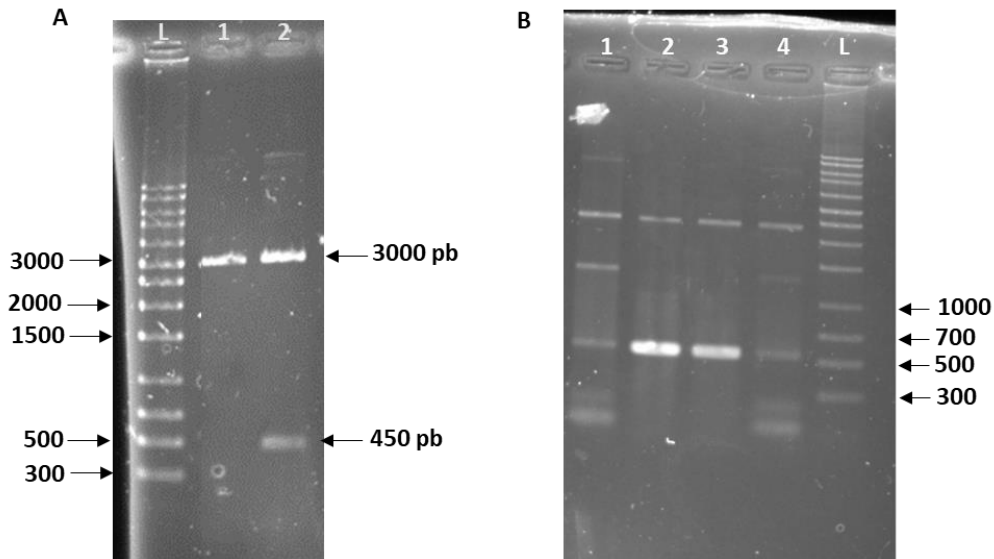


Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. **A.** Digestión con la enzima *EcoRI* de dos clones (carril 1 sin fragmento y carril 2 con fragmento), y el carril L muestra el marcador de tamaño molecular de ADN (ADN Ladder 300pb-8000pb/Axygen). Los números de la izquierda muestran el tamaño de bandas del marcador de ADN y a la derecha los tamaños de los fragmentos obtenidos. **B.** Productos de PCR para verificar la dirección del inserto usando oligos T7/AGB124 y correspondientes a 4 clones (del carril 1 al 4). En la muestra 2 y 3, se observa una banda de buena intensidad con un tamaño esperado ~500 pb, lo que indica que el inserto viral tiene su lado 5' genómico después del promotor T7. Los clones de los carriles 1 y 4 tendrán el inserto en dirección contrario.

7.1.2.2. Análisis de la eficiencia de la sonda BRF-S457 (CP) por la técnica de hibridación molecular

Para verificar la capacidad de la sonda de hibridar a su complementario en sus dos formas ARN genómico viral en extractos de ARN total y ARN sintetizado *in vitro* (transcrito +), se aplicó el sistema DIG de detección y se prepararon membranas tipo dot-blot (Figura 14). La sonda se aplicó a una concentración de 0.085 ng/ml.

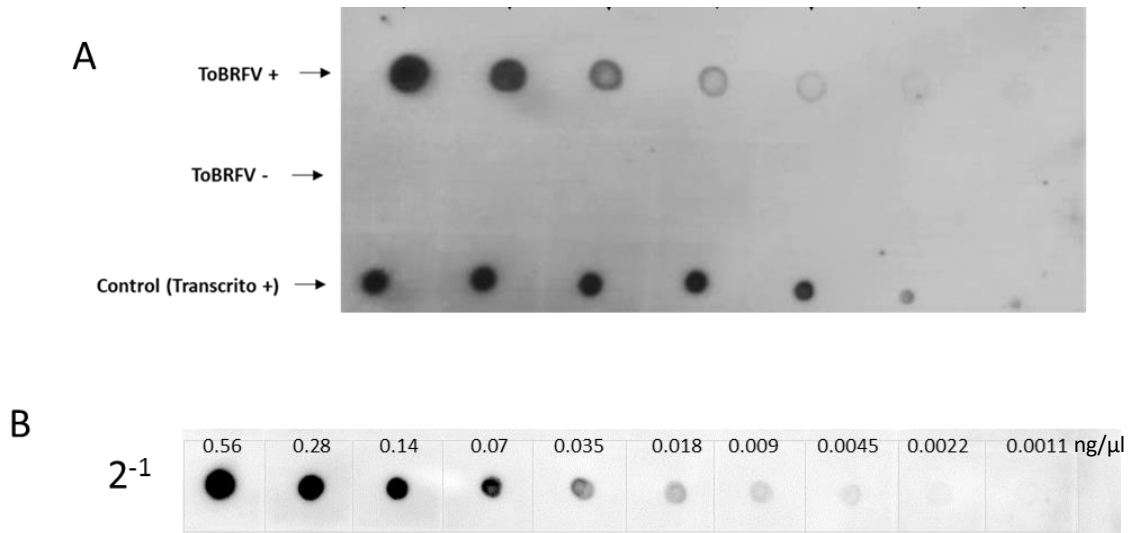


Figura 14. Eficiencia de la sonda BRF-S457 (CP). **(A)** Película radiográfica con muestra de ARN total con presencia de ToBRFV, muestra libre de virus y transcrito positivo. **(B)** Película radiográfica mostrando el umbral de detección a tiempo mayor de 15 min de exposición de la membrana a película radio X.

La sonda reveló la presencia del virus en la muestra que lo lleva, manifestando señales de intensidades graduadas en las distintas diluciones aplicadas. Igual, se observaron señales de detección del transcrito + y ninguna señal en la muestra libre de ToBRFV (Figura 14A).

Para determinar el umbral de detección se preparó una membrana con distintas diluciones del transcrito positivo de 2⁻¹ (Figura 14B). Los resultados muestran que el límite de detección puede llegar hasta 1pg/μl.

Para verificar la eficiencia de la sonda para aplicaciones semicuantitativas, se preparó una membrana con distintas diluciones del transcrito positivo de 2⁻¹, 3⁻¹, 5⁻¹ y 10⁻¹ (Figura 15A). Sin embargo, para poder cuantificar la película Rayos X se expuso menos de 15 min a la membrana con quimioluminiscente activo, para evitar saturaciones de intensidad. Se cuantificó la intensidad de cada señal obtenida. Los valores se presentan en la Figura 15B ordenados por concentraciones de ARN aplicadas en la membrana.

Las señales fuertes (círculos de color negro intenso) manifestaron un estado de saturación y se detectaron en las primeras escalas de las diluciones hasta valores alrededor de 0.23 ng/μl.

A partir de esta concentración se observó un gradiente de intensidad llegando a ser débilmente visibles entre 10 y 20 pg/μl. Bajo estas concentraciones no se detectó el transcrito positivo. Una curva de calibración se formó con un rango de detección entre 0.1 y 0.04 ng/μl con una relación lineal entre la concentración de ARN aplicada y la intensidad de señal observada y una $R^2 = 0.95$ (Figura 15C).

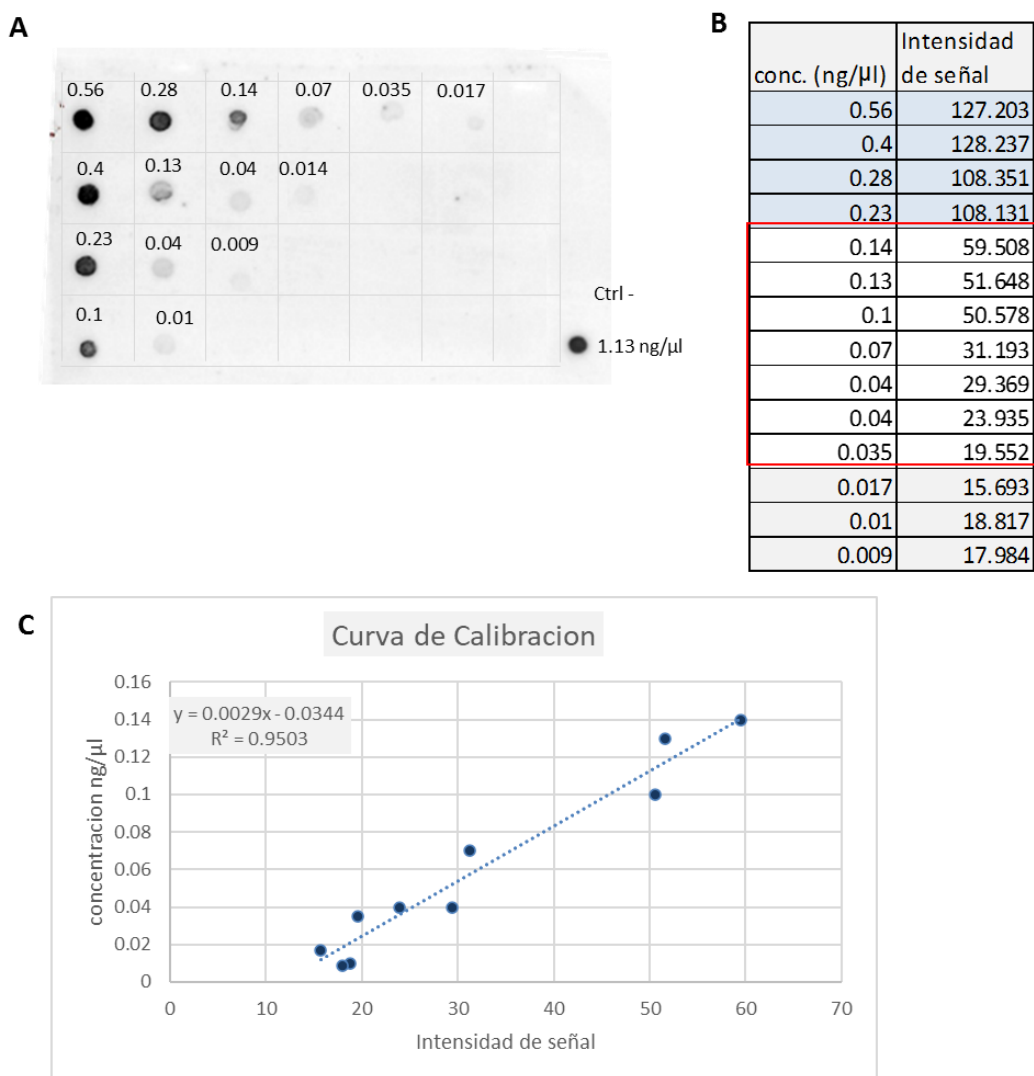
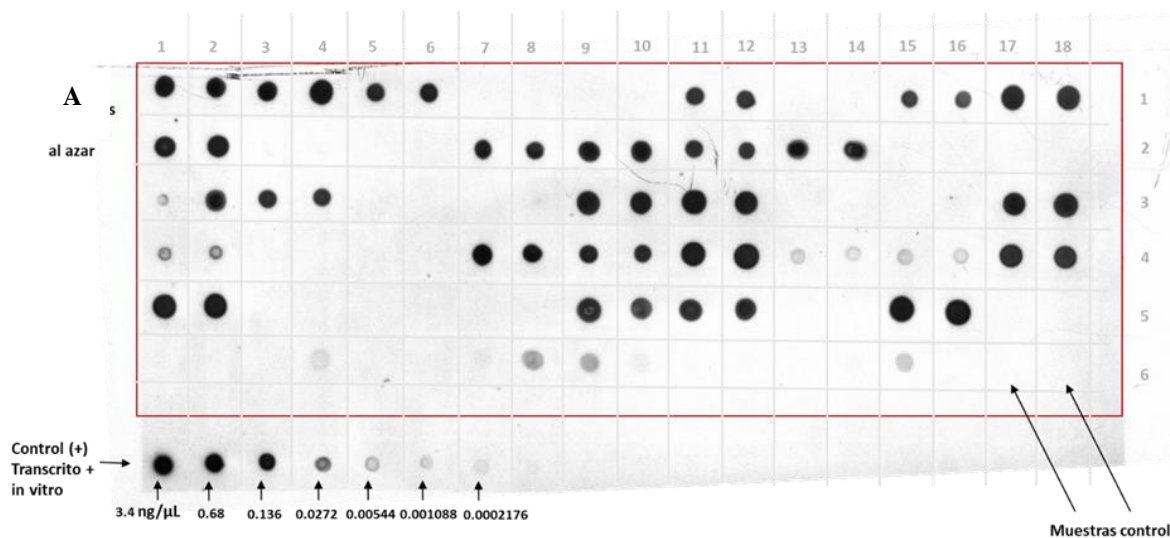


Figura 15. Análisis del umbral de detección de la sonda BRF-S457 (CP). **A.** Película radiográfica que muestra el umbral de detección de la sonda con el transcrito positivo a las diluciones de 2^{-1} , 3^{-1} , 5^{-1} y 10^{-1} . **B.** Análisis semicuantitativo de la sonda, cuantificación de la intensidad de cada señal en base a las concentraciones de ARN utilizadas. **C.** Curva de calibración de la relación lineal de 0.1 y 0.04 ng/μl de ARN contra la intensidad de la señal analizada con el programa Photoshop obteniéndose una $R^2 = 0.95$.

Es necesario mencionar que la especificidad de la sonda en comparación con otros miembros del género *Tobamovirus*, hasta el momento no se ha podido realizar debido a la falta de muestras con la infección correspondiente.

7.1.3. Aplicación de la sonda BRF-S457 (CP) en estudios experimentales: Prospecciones de terreno

La sonda se utilizó en un estudio como prospección de un terreno de cultivo de tomate en el estado de Hidalgo y analizar la posible presencia del virus ToBRFV. Se recolectaron y analizaron un total de 106 muestras de hojas, cada una proveniente de una planta distinta, tomadas de manera aleatoria. Los resultados de la hibridación molecular, presentados en la Figura 16 A, revelaron que 58 muestras (54%) fueron positivas para la presencia del virus. Este resultado se confirmó mediante la técnica de RT-PCR utilizando cebadores específicos para ToBRFV y TMV (descrito como el tobamovirus más cercano genéticamente al ToBRFV). De las muestras positivas, se seleccionaron seis de manera aleatoria. Los resultados mostraron amplificación únicamente con los oligos específicos para ToBRFV en las muestras positivas. En el caso del TMV, no se obtuvo amplificación, lo que indica que este virus no estaba presente en las muestras analizadas (Figura 16 B).



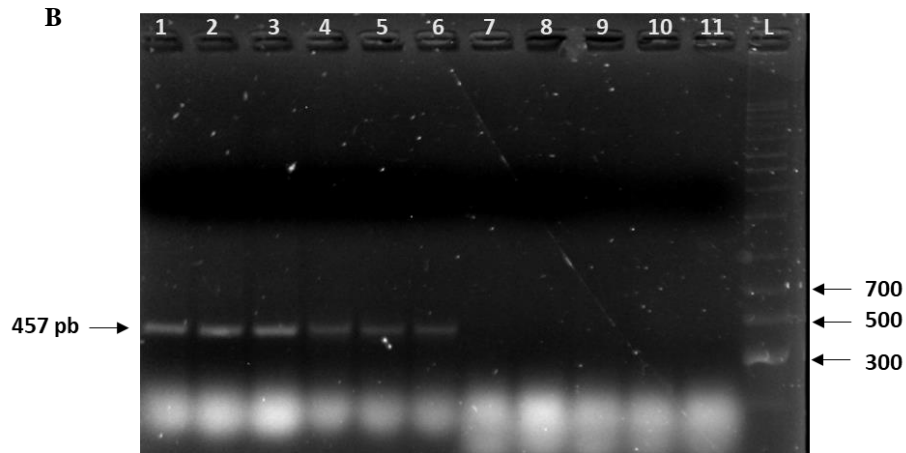


Figura 16. Aplicación de la sonda BRF-S457 (CP) en una prospección de un terreno en el estado de Hidalgo. **A.** La imagen muestra el resultado de la hibridación molecular de la sonda con ARN total de muestras de hoja de tomate con síntomas virales. El cuadro rojo delimita el área de aplicación de todas las muestras analizadas y cada cuadrado representa una muestra. Como control positivo de la técnica se aplicó el transcrito positivo a diferentes diluciones (5^{-1}) y como negativo un extracto de muestra sin ToBRFV. Las muestras con círculos fueron analizadas por RT-PCR. **B.** Resultados de RT-PCR, los carriles 1 a 6 corresponden al ToBRFV y del carril 7 al 11 corresponden al TMV. A la derecha la escala de referencia (Axygen 1Kb) y a la izquierda tamaño del fragmento amplificado.

7.1.4. Sonda BRF-S1065 (MP)

Como se mencionó en materiales y métodos el clon que lleva el segundo fragmento destinado a construir la sonda BRF-S1065 de la región MP del genoma viral se obtuvo tras modificaciones realizadas al clon pTOPOBRF3' (descrito en apartado 6.5 y 7.3). En la Figura 17A se muestra la digestión del clon pTOPOBRF3' con *KpnI* que dio un fragmento de ~5491 pb (3,500 pb del vector + 1,991 pb del inserto) y un fragmento no deseado de ~688 pb. El fragmento grande se religó a sí mismo. En la Figura 17B se muestra la digestión del plásmido derivado con *ApaI*, en esta digestión se obtuvieron igualmente dos fragmentos uno de ~4565 pb (3,500 pb del vector + 1,065 pb del inserto) y un fragmento no deseado de ~926 pb. El producto de la digestión se religó para obtener el clon pTOPO-BRF1065. El fragmento viral en pTOPO-BRF1065 es de 1065 pb con dirección 5'-3' río abajo del promotor SP6.

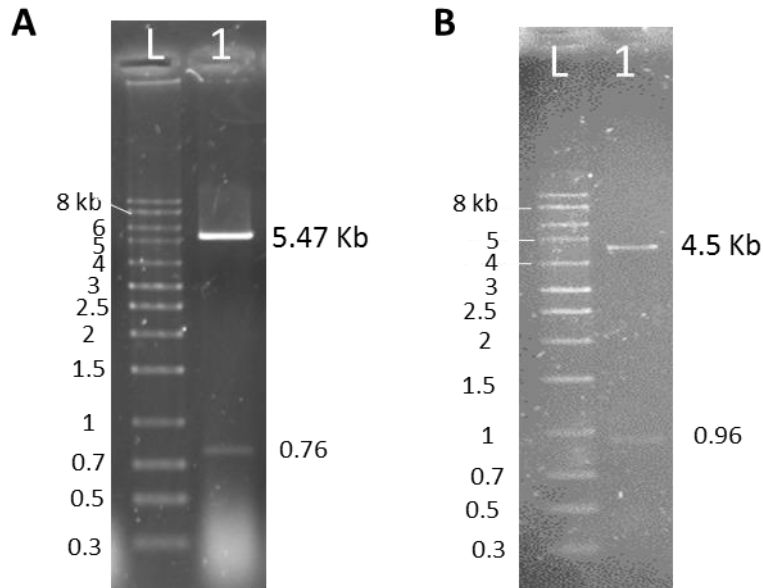


Figura 17. Digestión del clon pTOPOBRF3' en gel de agarosa al 1%. **A.** Carril 1, digestión con *KpnI* donde muestra un fragmento de ~5491 pb y un fragmento no deseado de ~688 pb, el carril L muestra el marcador de tamaño molecular de ADN (ADN Ladder 300 pb-8000pb/Axygen). Los números de izquierda muestran el tamaño de bandas del marcador de ADN y a la derecha los tamaños de los fragmentos obtenidos. **B.** Carril 1, digestión con *ApaI* donde se muestra un fragmento de ~4565 pb y un fragmento no deseado de ~926 pb, el carril L muestra el marcador de tamaño molecular de ADN (ADN Ladder 300 pb-8000 pb/Axygen). Los números de izquierda muestran el tamaño de bandas del marcador de ADN y a la derecha los tamaños de los fragmentos obtenidos.

El ADN linealizado con *KpnI* se purificó y se sometió a una reacción de transcripción usando la transcriptasa T7 y una mezcla de nucleótidos, que contiene uradina trifosfato dUTP marcado con digoxigenina (Digoxigenin-11-UTP) La concentración de transcritos obtenidos fue mayor de 100 ng/μl en un volumen de 25 μl.

El ADN linealizado con *ApaI* se purificó y se usó para realizar la transcripción con la transcriptasa Sp6 y una mezcla de nucleótidos no marcados con digoxigenina. La concentración de transcritos obtenidos fue de 50 ng/μl en un volumen total de 20 μl.

7.1.4.1. Análisis de la eficiencia de la sonda BRF-S1065 (MP) por la técnica de hibridación molecular

Para verificar la capacidad de la sonda de hibridar a su complementario en sus dos formas ARN genómico viral en extractos de ARN total y ARN sintetizado *in vitro* (transcrito viral +), se aplicó el sistema DIG de detección y se prepararon membranas tipo dot-blot (Figura 19 A). La sonda se usó a una concentración de 1 ng/ml.

La sonda reveló la presencia del virus en la muestra que lo lleva, manifestando señales de intensidades graduadas en las distintas diluciones aplicadas. Igual, se observaron señales de detección del transcrito+ y ninguna señal en la muestra libre de ToBRFV. El transcrito positivo se aplicó en la misma membrana a distintas diluciones 2^{-1} , 3^{-1} , 5^{-1} y 10^{-1} (Figura 18 A). Los resultados muestran que el límite de detección puede llegar hasta 12 pg/ μ l.

Para verificar la eficiencia de la sonda para aplicaciones semicuantitativas, se cuantificó la intensidad de cada señal obtenida. Los valores se presentan en la Figura 18 B ordenados por concentraciones de ARN aplicadas en la membrana.

Las señales fuertes (círculos de color negro intenso) manifestaron un estado de saturación y se detectaron en las primeras escalas de las diluciones hasta valores alrededor de 5.6 ng/ μ l. A partir de esta concentración se observó un gradiente de intensidad llegando a ser débilmente visibles bajo 0.4 ng/ μ l. Sin embargo, se consiguió detectar una señal positiva a concentración 0.05 ng/ μ l. Una curva de calibración se realizó con 9 concentraciones que oscilan entre los valores de 0.39 a 5 ng/ μ l y relaciona la concentración de ARN con respecto a la intensidad de señal en una ecuación lineal con una $R^2=0.87$ (Figura 18 C).

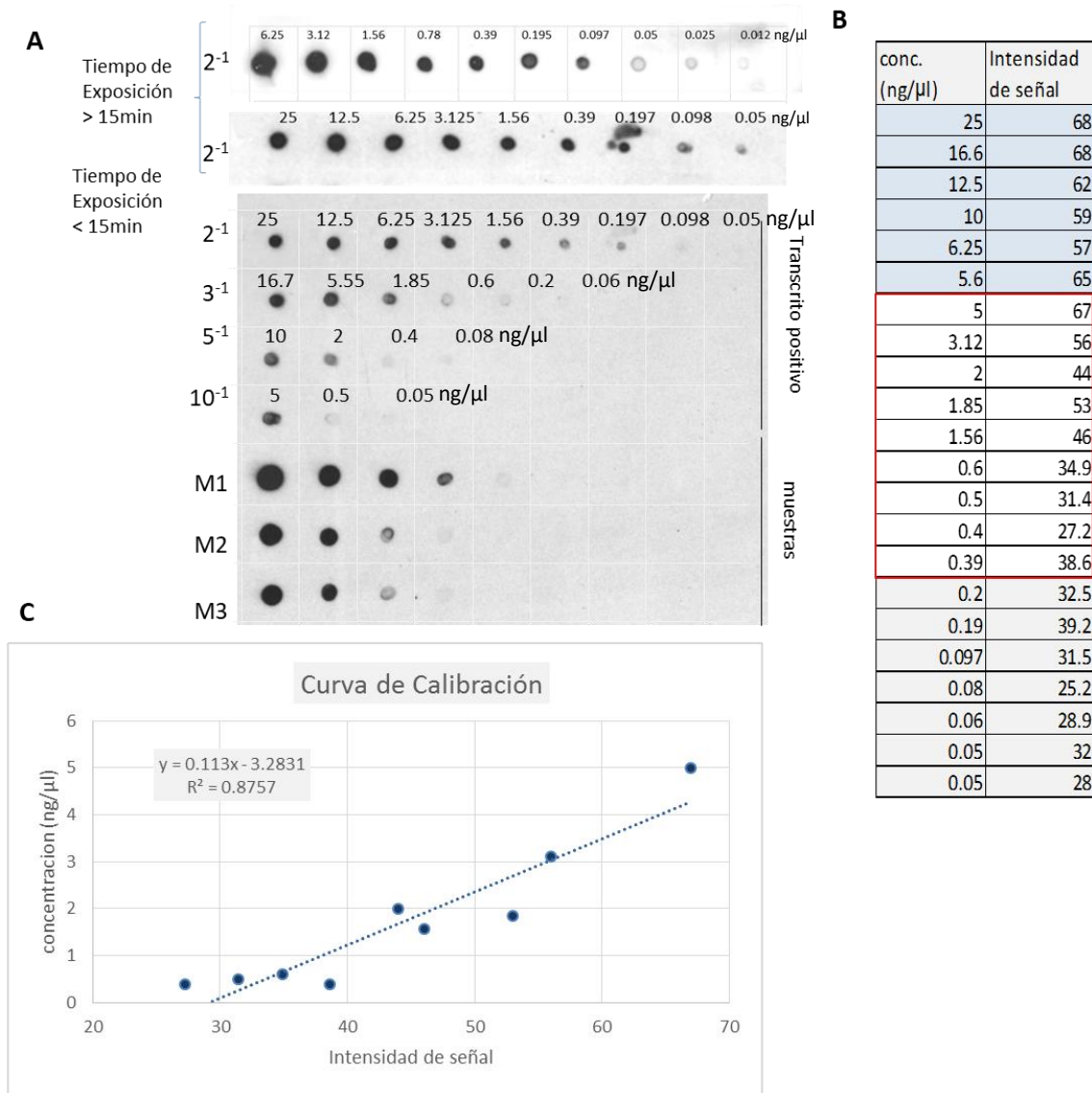


Figura 18. Umbral de detección de la sonda BRF-S1065 (MP). **A.** Películas radiográficas que muestra el umbral de detección de la sonda con el transcrito positivo a las diluciones de 2^{-1} con su exposición de las películas a la luminiscencia mayor de 15 min y a las diluciones 2^{-1} , 3^{-1} , 5^{-1} y 10^{-1} (menor de 15 min de exposición). **B.** Análisis semicuantitativo de la sonda, cuantificación de la intensidad de cada señal en base a las concentraciones de ARN utilizadas. **C.** Curva de calibración de la relación lineal de 0.39 a 5 ng/μl de ARN contra la intensidad de la señal analizada con el programa Photoshop obteniéndose una $R^2=0.87$.

7.2. Amplificación del genoma completo de ToBRFV

A partir del ARN total de muestras de tomate infectadas con el ToBRFV del aislado de Hidalgo se amplificó el genoma total ToBRFV por RT-PCR usando los oligos AGB190 y AGB188 (Figura 19; Tabla 1, Anexo I), sin embargo, el clonaje con el genoma viral completo

no se alcanzó en el tiempo dedicado para esta tesis. En el caso del aislado de Jalisco (ToBRFV-Ja-Mx), se amplificaron dos fragmentos solapantes de 4,718 y 2,712 kb, y se clonaron en separado en el vector pCR™-Blunt II-TOPO®. Estos fragmentos se nombraron F5' y F3', en base a su posición del lado 5' y 3' del genoma, respectivamente. La posición y el tamaño de los fragmentos en el genoma y el producto de su amplificación por RT-PCR se muestran en la figura 20.

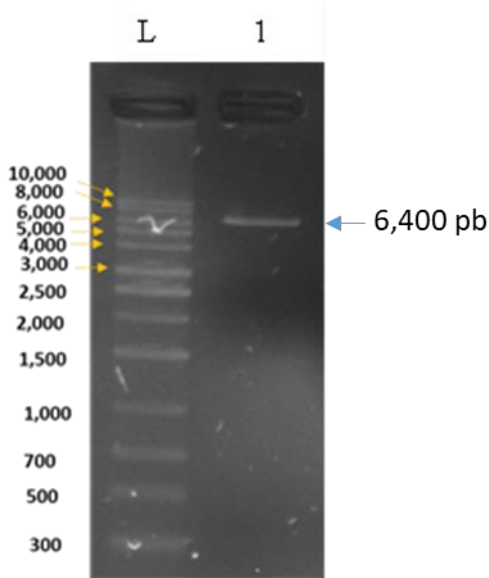


Figura 19. Amplificación del genoma completo de ToBRFV por RT-PCR. **A.** Gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación de una banda de 6.4 kb, que corresponde al genoma completo del ToBRFV carril 1. Marcador de tamaño molecular de 1kb (L).

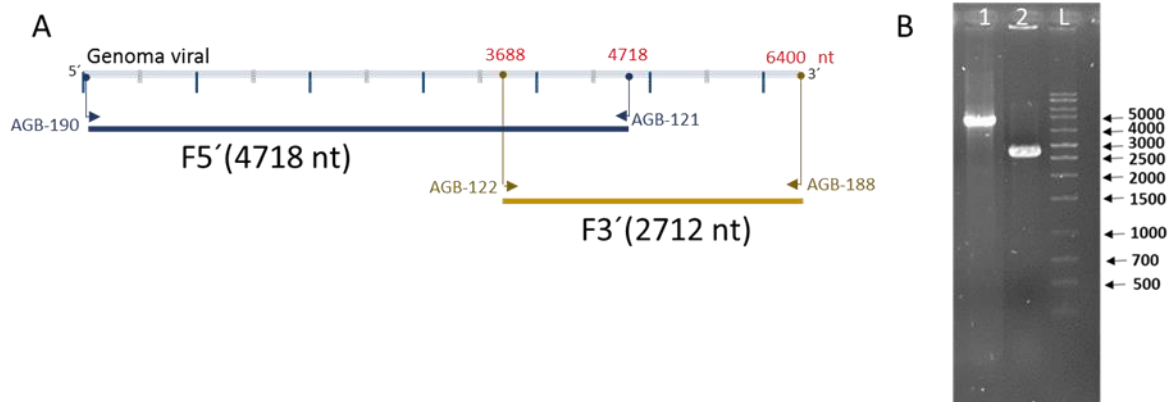


Figura 20. Amplificación del genoma del ToBRFV por RT-PCR. **A.** Ilustración que ejemplifica los fragmentos parciales amplificados y la posición de los oligonucleótidos. **B.** Gel de agarosa al 1% de la amplificación de los fragmentos parciales F5' y F3', con un tamaño de 4,718 y 2,712 kb, respectivamente. Marcador de tamaño molecular de 1kb.

Se comprobaron los dos clonajes realizando una amplificación por PCR usando como molde las colonias transformadas y una digestión de plásmidos extraídos por minipreps. El par de oligos AGB-149/153 amplificó la región localizada entre los nucleótidos 1363 - 2319 del genoma viral (F5'), y generó un producto de ~1016 pb en 3 colonias de 10 elegidas al azar (Figura 21A). El par de oligos AGB-123/124 amplificó la región localizada entre los nucleótidos 5699 - 6156 (F3'), y generó un producto de ~457 pb a partir de 6 colonias de nueve analizadas (Figura 21B). Todas las colonias que dieron el producto esperado se consideraron clones recombinantes compuestos del vector pCR™-Blunt II-TOPO e inserto viral (F3' o F5').

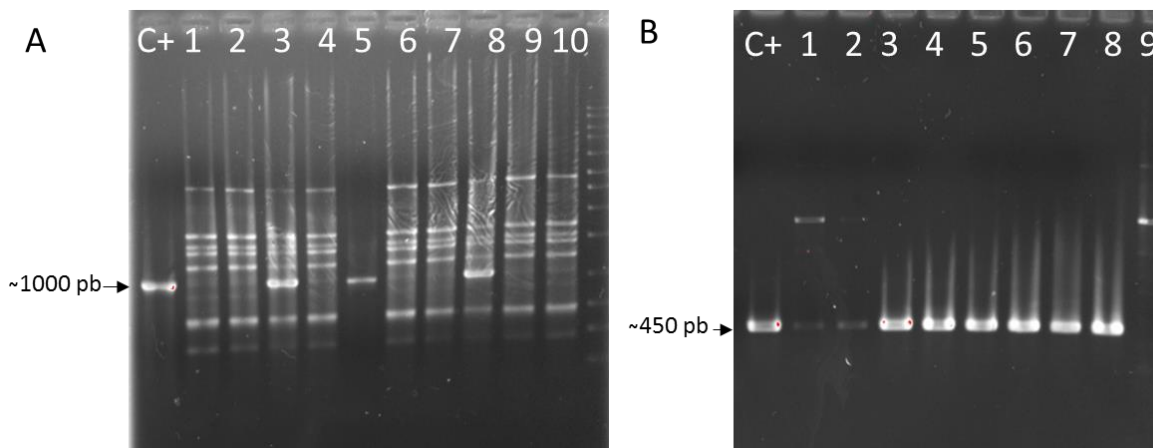


Figura 21. Amplificación por PCR a partir de colonias bacterianas transformadas en geles de agarosa al 1%. Las amplificaciones fueron realizadas con los oligos AGB149 y 153 (A) y los oligos AGB123-124 (B), los carriles C+: control positivo corresponden a una RT-PCR de extracto de RNA total positivo para ToBRFV usando los mismos oligos en cada caso. El tamaño esperado se presenta a la izquierda de cada gel.

Todos los plásmidos recombinantes extraídos, dieron los patrones esperados tras la digestión con las enzimas *NotI* y *KpnI* (Figura 22).

Ambas enzimas cortan en el Sitio de Clonación Múltiple (el polylinker) del plasmido pCR™-Blunt II-TOPO®. Sin embargo, *NotI* no corta dentro del genoma viral y por lo cual, su uso permitió la linealización del ADN plasmidico generándose un producto con el tamaño total del plásmido y el inserto que lleva, estos productos fueron de 8,237 pb para el clon que lleva F5' y de 6,231 pb para F3'.

En cambio, *KpnI* corta el genoma viral en un sitio de restricción común en F5' y F3' específicamente en la posición 4376. Su uso generó 2 bandas de 5471 y 660 pb para el clon que lleva F5' y de 7857 y de 380 pb, para el clon que lleva F3'.

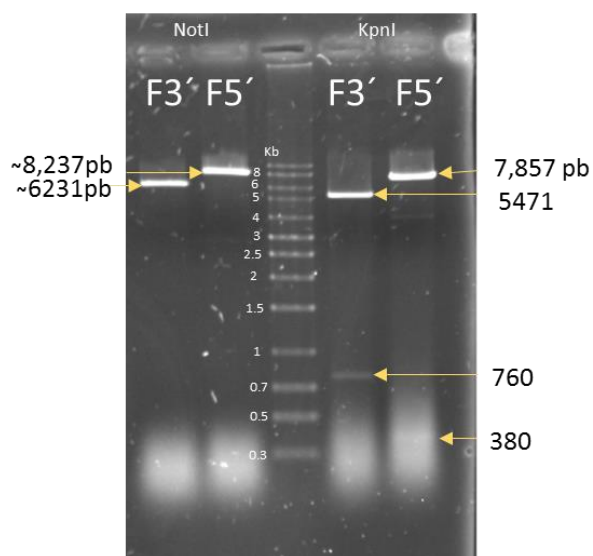


Figura 22. Digestión con las enzimas *NotI* y *KpnI* en gel de agarosa al 1%. Se muestran los carriles correspondientes a cada enzima y a los clones que llevan F5' o F3'. En el centro se muestra el marcador de tamaño molecular de 1kb de Axygen. Las flechas amarillas indican las bandas generadas y los tamaños esperados.

En la tabla 2 se describen los datos de los clones obtenidos: nombre, tamaño, posición del inserto, tipo de plásmido y origen del aislado viral.

Tabla 2: Descripción de los clones pTOPOBRF5' y pTOPOBRF3'

| Nombre del clon | Plásmido | Tamaño (posición nucleótido inicial y final) | Origen del fragmento clonado |
|-----------------|------------|--|------------------------------|
| pTOPOBRF'5 | Blunt TOPO | 4718 (19; 4718) | Jalisco |
| pTOPOBRF'3 | Blunt TOPO | 2712 (3688; 6370) | Jalisco |

Por problemas técnicos no se consiguió clonar el aislado de Hidalgo en las dos formas completo o parcial. Sin embargo, se generaron por RT-PCR 7 fragmentos solapantes que cubren la longitud total del genoma. Los oligos usados y sus posiciones se presentan en la

Figura 7 en Materiales y métodos. Los productos de PCR (cADNs) generados se muestran en geles de agarosa al 1% (Figura 23). Todos los fragmentos fueron purificados y cuantificados, las concentraciones en ng/μL obtenidos se presentan en la tabla 3.

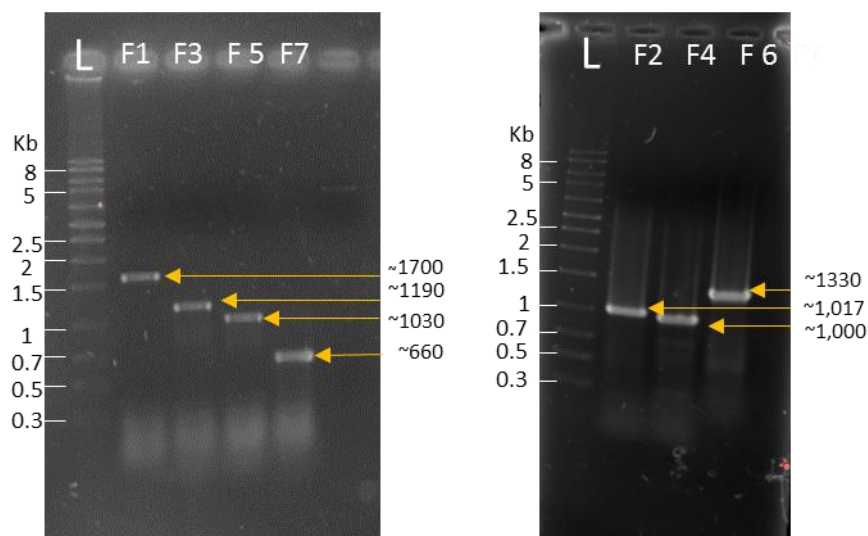


Figura 23. Productos de RT-PCR en gel de agarosa al 1% de 7 fragmentos solapantes. L: marcador de tamaño molecular Axygen 1 kb. F: fragmento y el numero corresponde al fragmento amplificado en el orden 5'→ 3' del genoma. Las flechas amarillas indican los productos obtenidos, a su derecha se presentan los tamaños esperados y a la izquierda de cada gel se presenta la escala del marcador.

Tabla 3: Concentración de cada purificación de los fragmentos amplificados.

| Pares de oligos | Tamaño del fragmento | Concentración (ng/μl) |
|------------------|----------------------|-----------------------|
| FR1= AGB-190/120 | 1,700 pb | 41 |
| FR2= AGB-249/253 | 1,017 pb | 105 |
| FR3= AGB-191/248 | 1,190 pb | 91 |
| FR4= AGB-251/254 | 1,000 pb | 84 |
| FR5= AGB-122/121 | 1,030 pb | 50 |
| FR6= AGB-252/193 | 1,330 pb | 100 |
| FR7= AGB-123/188 | 660 pb | 80 |

FR=fragmento. **ng**= nanogramo. **μl**= microlitro. **pb**= pares de bases.

7.3. Secuenciación y análisis de la relación filogenética de los aislados obtenidos del ToBRFV del mismo género.

A partir de los clones descritos en la Tabla 2, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo del aislado de ToBRFV de Jalisco, utilizando 29 oligos (Tabla 1 en el Anexo I). El ensamblaje resultó en un total de 6,332 pb, denominándose este aislado como ToBRFV-Mx-Ja. En el caso del aislado de Hidalgo, se secuenció directamente de productos de PCR, utilizando los mismos oligos de secuenciación para el aislado de Jalisco, cubriendo igualmente un total de 6,332 pb, y se nombró ToBRFV-Mx-Hgo. Las secuencias del genoma completo de los aislados de Jalisco e Hidalgo se pueden observar en el Anexo VI y VII. Una vez obtenidos los ensamblajes, se compararon con la secuencia nucleotídica del aislado mexicano descrito en el 2021 (MW349655) en la base de datos del NCBI para realizar los estudios bioinformáticos.

7.3.1. Estructuras genómicas y dominios funcionales

El alineamiento de los aislados secuenciados con el aislado de referencia mostró una longitud similar, sin inserciones o deleciones de nucleótidos a lo largo de las secuencias. La búsqueda de potenciales marcos abiertos de lectura (ORFs) reveló una conservación en la estructura genómica comparada con otros aislados de ToBRFV descritos hasta la fecha. Ambos aislados presentaron ORFs de los mismos tamaños: 3351, 1422, 801 y 480 nucleótidos (nt). El primer ORF1a, de sentido positivo, comienza en el marco de lectura 3 en el nucleótido 54 y termina en el nt 3404, codificando una proteína de 1116 aminoácidos (aa). ORF1b inicia en el mismo marco de lectura que ORF1a, comenzando en el nt 3480 y terminando en el nt 4901, codificando una proteína de 473 aa. Los ORFs 2 y 3 empiezan y terminan entre los nucleótidos 4888/5688 y 5691/6170, respectivamente, expresando proteínas de 266 y 159 aa, correspondientes a las proteínas de la cápside y del movimiento (Tabla 4).

Tabla 4: Marcos abiertos de lectura detectados en el genoma del aislado ToBRFV-Mx-Ja.

| ORFs | Sentido | Cuadro | Posición del primer nucleótido | Posición del último nucleótido | Longitud (nt/a.a) |
|------|---------|--------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| ORF1 | + | 3 | 54 | 3404 | 3351 1116 |
| ORF2 | + | 3 | 3480 | 4901 | 1422 473 |
| ORF3 | + | 1 | 4888 | 5688 | 801 266 |
| ORF4 | + | 3 | 5691 | 6170 | 480 159 |

nt= nucleótidos, a.a= aminoácidos.

La predicción de dominios funcionales se realizó con las bases de datos Prosite (prosite.expasy.org) y Pfam (<http://motif.genome.jp>). Se identificó en los dos primeros ORFs, el dominio Metyltransferasa (Alphavirus-like methyltransferase) desde el a.a 50 hasta el a.a.440, el dominio Helicasa [(+) RNA virus helicase core domain] desde 830 hasta 1085 a.a. y el dominio conservado en todas las ARN polimerasa, ARN dependiente de virus de ARN cadena simple y sentido positivo, los tres dominios mencionados fueron previamente descritos para los miembros del género *Tobamovirus*. Adicionalmente, se demostró que los ORF 2 y 3 mantienen conservada las funciones de movimiento y de la cápside de los tobamovirus.

7.3.2. Estructura poblacional y distancia genética.

Se realizó un alineamiento de las secuencias nucleicas del genoma completo de todos los aislados de ToBRFV (total 150 secuencias) descritos en la base de datos de NCBI. Debido a la dificultad de trabajar con este número se eligieron solo 62 aislados representativos de todos los países y considerando los distintos grupos filogenéticos descritos por Van de Vossenberg *et al.* (2021) (población mundial) (Tabla 6, Anexo VIII). En paralelo, se realizó otro alineamiento incluyendo solo aislados de México, Estados Unidos y Canadá (población

regional). Se consiguió ajustar un total de 6367 nucleótidos, quitando los extremos no alineados. En la tabla 5 se muestran algunos datos relacionados con estos alineamientos.

Tabla 5: Datos obtenidos con el programa Mega 11 de los alineamientos nucleotídicos de aislados del virus rugoso de tomate.

| Población | Nº de aislados | Nº total de nucleótidos | Nº de variables | Nº de Singleton | (Nº de singleton en ToBRFV-Mx-Ja) y posición | (Nº de singleton en ToBRFV-Mx-Hgo) y posición |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|--|---|
| Mundial | 64* | 6367 | 307 | 229 | (2) 2891, 4358 | (8) 1631, 3266, 3641, 3905, 5071, 5358, 5934, 6104 |
| Regional (Norte de América) | 29** | 6367 | 101 | 78 | (2) 2891, 4358 | (10) 1430, 1631, 2999, 3266, 3641, 3905, 5071, 5358, 5934, 6104 |

*60 aislados de la base de datos (mundial) y 2 nuevos de Jalisco e Hidalgo (México).

**27 aislados de la base de datos (México, Estados Unidos y Canadá) y 2 nuevos de Jalisco e Hidalgo (México).

Con el fin de estudiar la estructura poblacional de ToBRFV y la diversidad nucleica entre las secuencias nuevas de esta tesis y las reportadas en la base de datos, a partir de los alineamientos de la secuencia completa del genoma viral y las secuencias nucleicas y aminoacidas de cada ORF, se estimó la distancia genética entre pares de aislados usando el método de PBL y se generaron árboles filogenéticos de la secuencia usando los modelos de Maxima Verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*), de unión de vecinos (NJ, *Neighbor-joining*) y Evolución Mínima (ME, *Minimum Evolution*). El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó a los datos de secuencia fue el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano en el caso de la secuencia completa y Kimura 2 parámetros en el caso de ORFs.

La estimación de la diversidad genética en posición sinónima y no sinónima de toda la población (genoma total) fue 0.0025 ± 0.0003 y 0.0027 ± 0.0002 para las poblaciones regionales y mundial, respectivamente. Lo que indica que no existe gran diferencia de diversidad nucleica entre las dos poblaciones.

Debido a que la sustitución sinónima refleja la tasa de mutación en gran medida, se estimó la diversidad genética en posición sinónima de toda la población. Los valores obtenidos fueron de 0.0071 ± 0.0008 para la población regional y 0.0057 ± 0.0001 para la población mundial.

Se calcularon en separado las distancias nucleicas medias entre pares de aislados en sitios sinónimos (dS) y no sinónimo (dN) (Tabla 5) de cada ORF.

A nivel internacional la región genómica menos diversa fue ORF3 (MP) con valor de dS igual a 0.0024 ± 0.0006 . A nivel regional, ORF4 CP con valor dS igual a 0.0048 ± 0.0016 seguido por ORF3 MP con valor dS igual a 0.0039 ± 0.0017 fueron las regiones genómicas menos diversas. La región genómica con mayor diversidad fue ORF2 en las dos poblaciones internacional y regional, con valores de dS igual a 0.0066 ± 0.0015 y 0.0098 ± 0.0028 , respectivamente.

Tabla 6: Diversidad nucleica* para cada marco abierto de lectura del genoma de ToBRFV.

| ORF | Internacional** (64 aislados) | | | | | Regional*** (29 aislados) | | | | |
|-----------|-------------------------------|---------|--------|---------|---------------|---------------------------|---------|--------|---------|---------------|
| | dNS | E.S | dS | ±E.S | dNS/dS | dNS | E.S | dS | ±E.S | dNS/dS |
| ORF1 | 0.0014 | ±0.0002 | 0.0057 | ±0.0008 | 0.2456 | 0.0002 | ±0.0000 | 0.0067 | ±0.0012 | 0.0299 |
| ORF2 | 0.0006 | ±0.0002 | 0.0066 | ±0.0015 | 0.0909 | 0.0003 | ±0.0002 | 0.0098 | ±0.0028 | 0.0408 |
| ORF3 (MP) | 0.0032 | ±0.0012 | 0.0024 | ±0.0006 | 1.3333 | 0.0026 | ±0.0013 | 0.0049 | ±0.0016 | 0.5306 |
| ORF4 (CP) | 0.0012 | ±0.0004 | 0.0051 | ±0.0016 | 0.2353 | 0.0012 | ±0.0004 | 0.0039 | ±0.0017 | 0.3077 |

*La diversidad nucleica se define aquí como el número medio de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las diversidades de nucleótidos se calcularon por separado para las posiciones no sinónimas (dNS) y sinónimas (dS) utilizando el método PBL. Los errores estándar (E.S.) se calcularon utilizando el método bootstrap con 500 réplicas. dNS= sustituciones no sinónimas, dS= sustituciones sinónimas, E.S= error estándar.

**60 aislados de la base de datos (mundial) y 2 nuevos de Jalisco e Hidalgo (México).

***27 aislados de la base de datos (México, Estados Unidos y Canadá) y 2 nuevos de Jalisco y Hidalgo (México).

Por último, se calculó el índice dNS/dS para cada ORF (Tabla 6) para predecir la dirección y fuerza de la presión de selección actuando sobre las distintas regiones codificantes dentro de la población viral.

En la población internacional, los valores del índice dN/dS resultó menor de la unidad en los ORFs 1, 2 y CP. Eso significa que estas regiones están sometidos a una presión purificadora que está restringiendo la variabilidad funcional de los ORFs. Además, esta presión se ejerce con mayor magnitud en ORF2 ($dS/dNS = 0.09$). En cambio, MP muestra un valor del índice dN/dS cerca de la unidad, lo que significa que este gen está bajo selección neutra.

En la población regional, en todos los ORFs el valor del índice $dS/dNS < 1$. Eso significa que estas regiones están sometidos a una presión purificadora igual en una población más amplia, sin embargo, esta presión se encuentra casi 10 veces mayor en ORF1 y ORF2 que en CP y MP.

7.3.3. Relaciones filogenéticas a nivel internacional

Posteriormente, se obtuvieron 3 árboles filogenéticos (Figura 24), los resultados no muestran una gran diferencia entre las topografías generadas por los 3 modelos. Los aislados ToBRFV-Mx-Ja y ToBRFV-Mx-Hgo se encontraron en el mismo clado (Cuadro rojo en la figura 25) con 6 aislados mexicanos previamente descritos, 4 de los Estados Unidos (EUA), 2 de Gran Bretaña, y uno de cada uno de los siguientes países: Países Bajos, Bélgica, Italia, Suiza y Canadá, con un porcentaje de confianza (*bootstrap*) superior al 80%. Los demás aislados mexicanos se encontraron en un clado separado (Cuadro azul de la figura 25) con un porcentaje de confianza superior al 87% junto con aislados de Estados Unidos y Canadá.

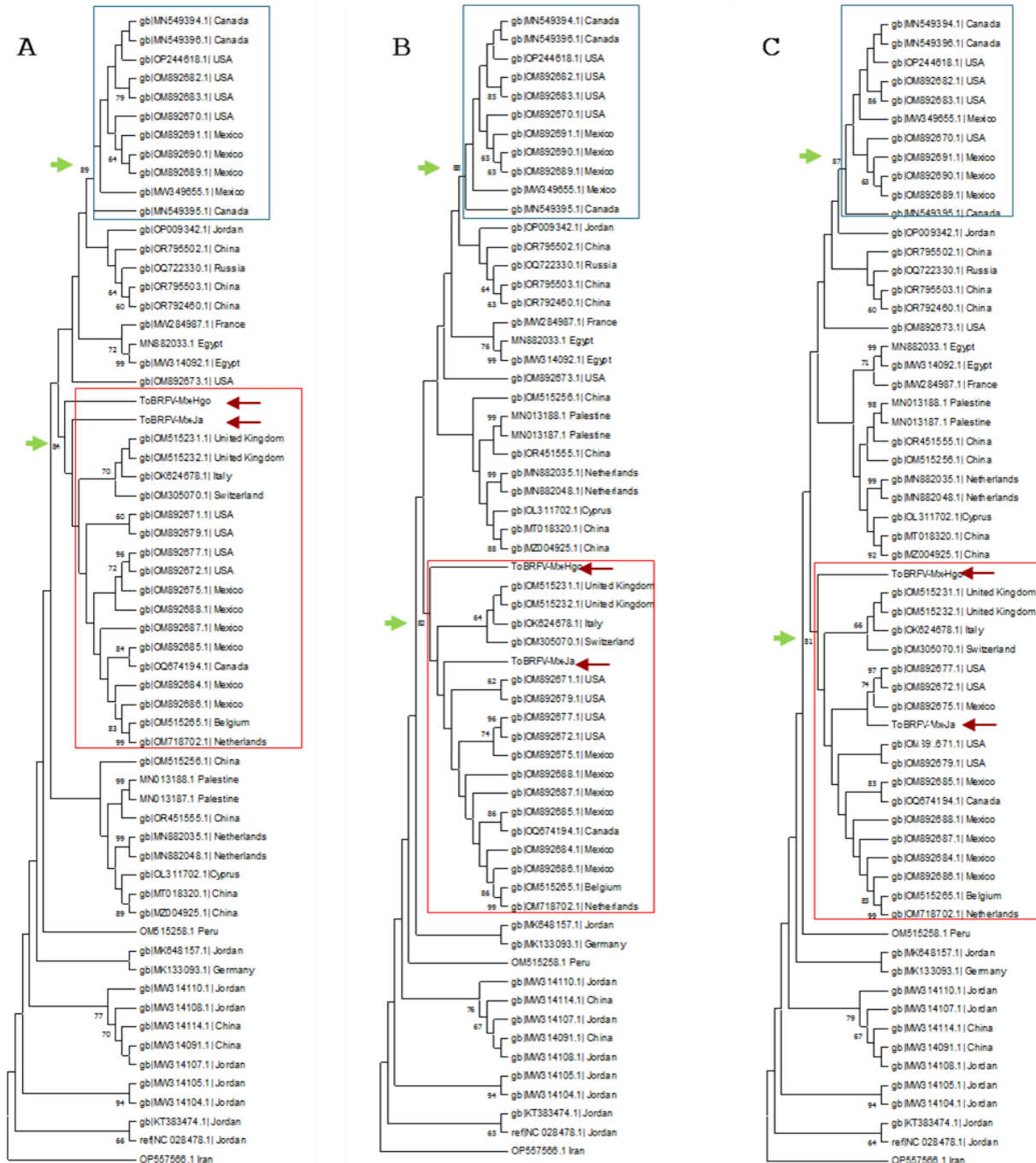


Figura 24. Árboles filogenéticos con secuencias internacionales de ToBRFV, generados con tres modelos [(A) Máxima Verosimilitud, (B) *Union de Vecinos* y (C) Evolución Mínima]. Los cuadros azules y rojos representan la agrupación de aislados mexicanos, con bootstrap >80% (flechas verdes). Flechas rojas indican los aislados ToBRFV-Mx-Ja y ToBRFV-Mx-Hgo. Software Mega 11.

7.3.4. Relaciones filogenéticas a nivel regional y nacional

Se repitieron los análisis con 31 aislados procedentes de México, Estados Unidos y Canadá (Norte de América), los árboles generados usando 3 modelos diferentes mostraron una población genéticamente dividida en 2 clados principales, idénticos a los clados destacados a nivel internacional con soporte estadístico significativo (Figura 25). En este caso el aislado ToBRFV-Mx-Hgo se distinguió de los demás miembros del clado II quienes forman un subclado con un soporte estadístico superior a 85% (Figura 25).

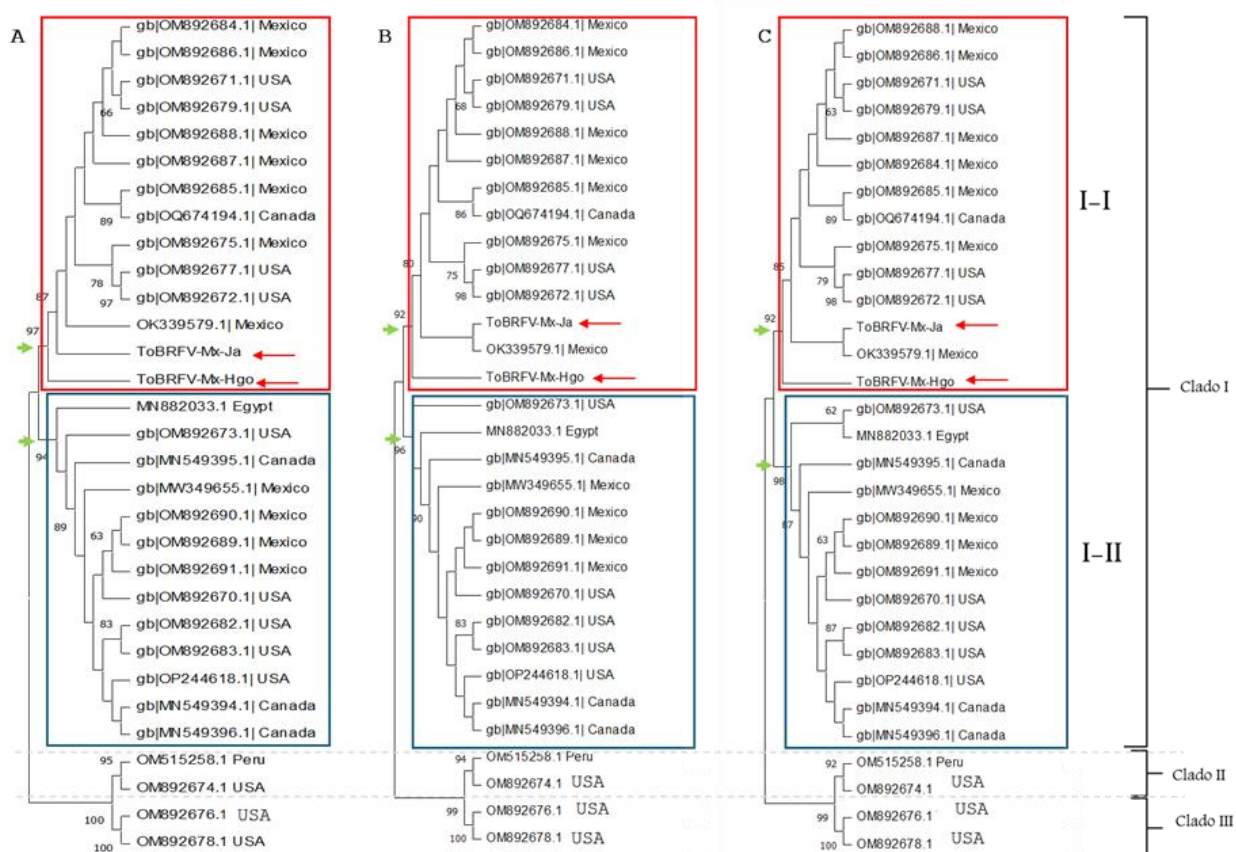


Figura 25. Árboles filogenéticos representativos de las secuencias regionales (Norte América) del genoma completo del ToBRFV. Ensamble filogenético generado por tres modelos [(A) Máxima Verosimilitud, (B) Unión de Vecinos y (C) Evolución Mínima]. La figura muestra los valores de bootstrap >60%. Los cuadros azules y rojos agrupan los aislados mexicanos. Las llaves de la derecha representan los 3 clados publicados que dividen la población de ToBRFV en el mundo. Software Mega 11.

7.3.5. Relación filogenética a nivel de cada ORF.

La relación filogenética entre aislados de ToBRFV se realizó para cada ORF del genoma viral. A partir de los mismos aislados analizados a nivel internacional y luego regional se construyeron arboles usando los métodos ML, NJ y ME (Figura 26 y 27; Anexo VIII) e incluyendo los aislados ToBRFV-Mx-Ja y ToBRFV-Mx-Hgo.

Los clados I-I y I-II observados en los árboles correspondientes a las secuencias completas (Figura 24y 25) se detectaron en ORF1 con un soporte estadístico aceptable. Y en el cual, los aislados nuevos se clasificaron en el mismo subclado I-I. Mientras que en ORF2, esta estructura no está bien definida, los aislados nuevos no se agrupan en el mismo subclado y se ven más distintos que en ORF1. La división poblacional en MP se formó con bajos valores estadísticos, aunque distingue los miembros del clado I-I en un solo subclado con bootstrap igual a 61%. En CP, no se observó un árbol estructurado, lo que indica que en esta región los aislados son estrechamente relacionados.

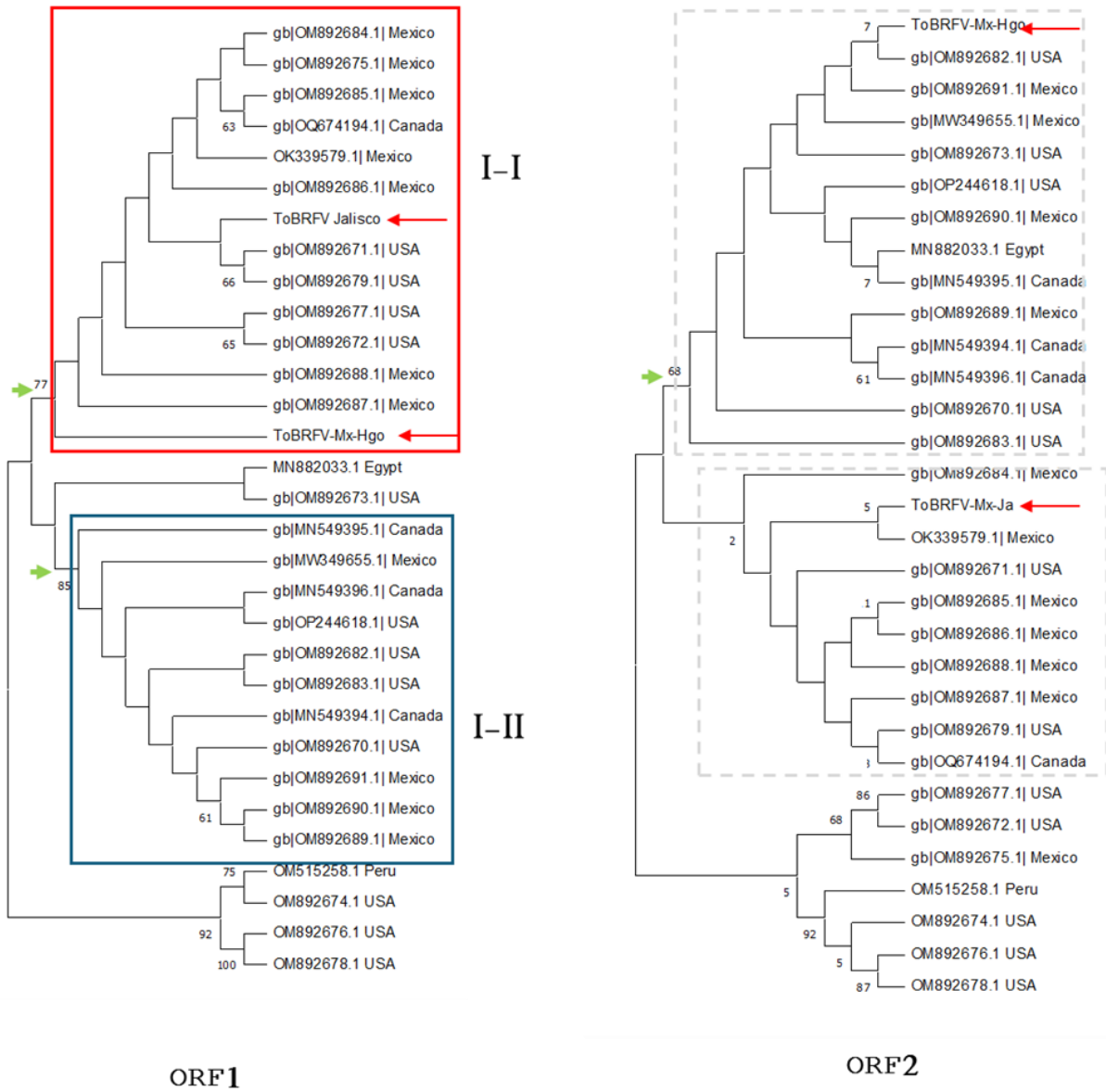


Figura 26. Árboles filogenéticos relacionando 27 aislados Norte Americanos en las regiones genómicas ORF1 y ORF2. Generados por el método Máxima Similitud. Con valores de bootstrap >60%.

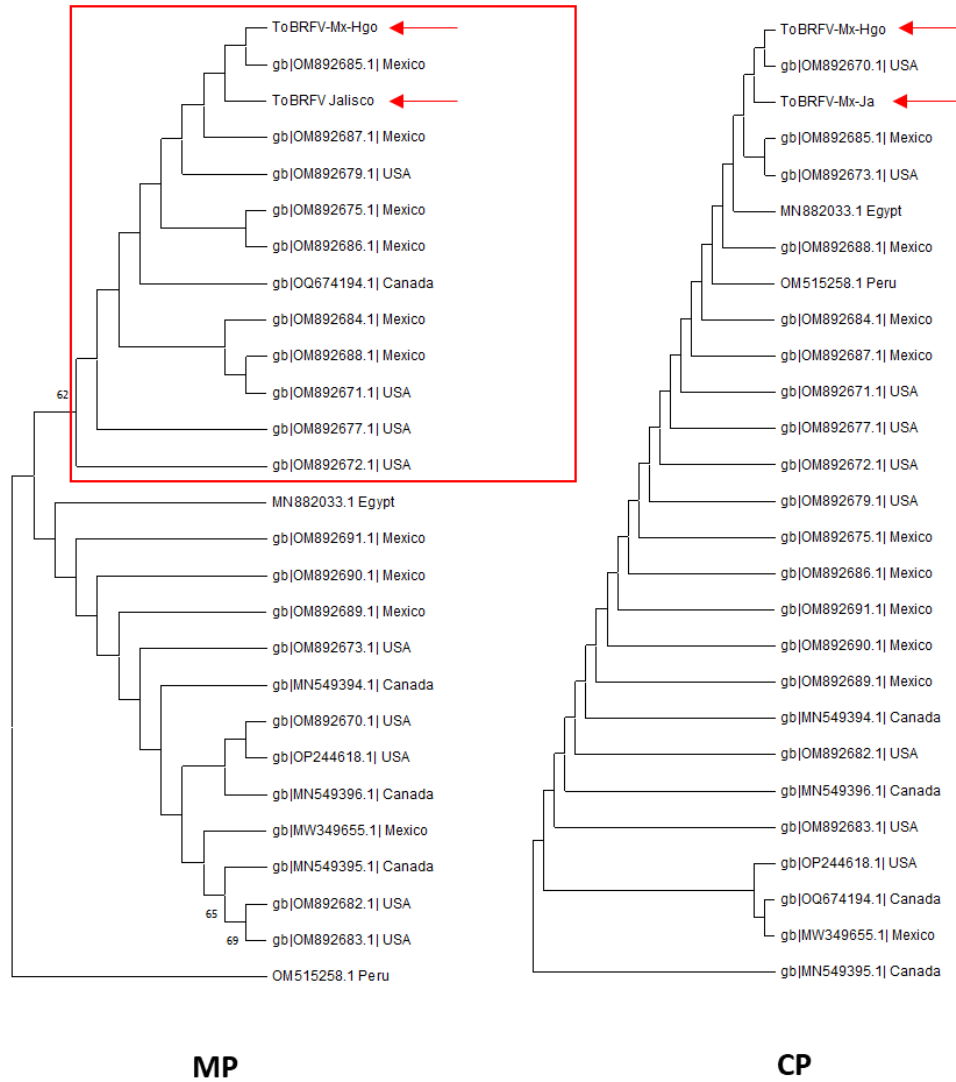


Figura 27. Árboles filogenéticos relacionando 27 aislados Norte Americanos en las regiones genómicas MP y CP. Generados por el método Máxima Similitud. Con valores de bootstrap >60%.

VIII. Discusión

En este trabajo de tesis se construyeron dos sondas marcadas con digoxigenina correspondientes a la región CP y MP del genoma de ToBRFV, para su uso como herramienta crucial para aplicar la técnica de hibridación molecular dot-blot usando el sistema DIG de detección (Roche Diagnostics-Alemania). Esta técnica ha sido ampliamente usada en virología vegetal y en algunos casos se desarrolló para una detección simultánea de ocho virus: Virus del mosaico de la manzana (ApMV), Virus de la mancha anular necrótica de Prunus (PNRSV), Virus del enanismo de la poda (PDV), Virus latente de la viruela del ciruelo en la manzana (APLPV), Virus de la viruela del ciruelo (PPV), Virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV), Virus latente del albaricoque (ApLV), Necrosis de la corteza de ciruela y virus asociado a las picaduras del tallo (PBNSPaV) (Peiró *et al.*, 2012).

Las dos sondas (BRF-S1066 y BRF-S475) demostraron la capacidad de hibridar con eficiencia a sus transcritos complementarios y al genoma viral en extracto de ARN total y sin marcar señales en muestras libres de virus. El límite de detección de las diluciones de transcritos complementarios a las sondas fueron aproximadamente entre 1 y 2 pg/μl. Estos valores entran en el rango mínimo de detección de sondas descritas previamente con otras sondas que oscilan entre 0.2 y 5 pg/μl (Sánchez-Navarro *et al.*, 2018). Sin embargo, concentraciones menores de 1 pg/μl pueden producir un falso negativo, por lo cual limitan la sensibilidad de la técnica y la identificación temprana de la enfermedad en sus primeras etapas. Recientemente, en un trabajo realizado por Ontañón *et al.* (2024), los autores compararon dos técnicas de detección: hibridación molecular y RT-PCR, y demostraron que esta última representa un límite de detección 125 veces superior al observado con la hibridación dot-blot.

Rubio *et al.*, (2020) manifestaron que los procedimientos de diagnóstico deben optimizarse para lograr una precisión en la detección del número máximo de miembros dentro del grupo (sensibilidad como tasa de verdaderos positivos) y en la distinción de los virus externos (especificidad como tasa de verdaderos negativos), argumentando con casos de estudios que la variabilidad genética dentro de cada especie de virus y las relaciones genéticas con otras especies de virus son factores importantes que afectan esta precisión (Rubio *et al.*, 2020). En

el laboratorio de Agrobiotecnología en CIQA no se cuenta con aislados virales distintos a ToBRFV, y los dos aislados analizados fueron proporcionados de invernaderos, por lo cual no hay datos que describen la sensibilidad de las sondas generadas ni la especificidad, sin embargo, sabiendo que el porcentaje de identidad y de similitud entre los miembros de esta especie supera el 98%, esto nos lleva a considerar que las sondas generadas en este trabajo pueden detectar cualquier variante correspondiente. Por otro lado, los porcentajes de identidad de ToBRFV con otros tobamovirus oscilan entre 69.5 a 82.5%, donde los porcentajes más altos corresponden a aislados de TMV y ToMV (Salem *et al.*, 2016). Estos valores pueden ser preocupantes, sin embargo, recientemente dos *Tobamovirus*: el virus del moteado del pimiento (BPeMV) y el virus del moteado leve del ají (CPMMV), se detectaron con sondas marcadas con digoxigenina, para ello se usaron dos sondas que hibridan en dos sitios del genoma de CPMMV y una en el genoma de BPeMV. Estos 3 sitios en el genoma comparten el 80.6, 75.8 y 89.4 % de identidad entre los dos aislados. Los resultados obtenidos revelaron que las tres sondas eran específicas, no mostrando hibridación cruzada entre el tejido infectado con CPMMV y con BPeMV y sin señal en el tejido sano. Aquí, probablemente el tamaño de la sonda fue crucial porque las sondas generadas fueron de 142, 351 y 291 nt (Ontañón *et al.*, (2024) en comparación a los tamaños de las generadas en esta tesis que fueron de 475 y 1065 pb. De igual manera, una sonda marcada con digoxigenina, fue diseñada para el tobamovirus del mosaico moteado del tomate (ToMMV) de 406 pb, demostró fiabilidad de detección similar a la obtenida con RT-PCR y sin cruzamiento con el virus de mayor similitud, el TMV que comparte un porcentaje de identidad genética, entre el 94% y 97%, dependiendo del aislado analizado (Ambrós *et al.*, 2017).

Las pruebas realizadas en este trabajo mostraron la ventaja de la técnica de hibridación molecular de analizar un gran número de muestras (106) en un solo proceso. No obstante, teniendo herramientas adecuadas este número podrían ser aún mayor. Por ejemplo, los tubos de cristal en los cuales se realiza la hibridación existen en dos tamaños, el uso del tubo más largo exige un cassette donde se expone la membrana a la película de Rayos X, de tamaño mayor, la disponibilidad de estas dos herramientas nos permite doblar el número de muestras.

En esta tesis se consiguió realizar una curva de calibración para cada sonda, demostrando la capacidad de usar esta técnica para la semicuantificación del ToBRFV. Esta aplicación

semicuantitativa fue documentada en trabajos como los de (Marco y Aranda, 2005; Kassem *et al.*, 2013). Las imágenes digitalizadas se analizaron informáticamente para cuantificar la intensidad de la señal en cada punto (dot). Los autores de estos trabajos se basaron en los valores que proporcionan los dots correspondientes a las muestras de ARN transcrito viral para calibrar la relación entre la intensidad de la señal y la cantidad de ARN viral. No obstante, el éxito de esta técnica y el rango de esta curva dependen de varios factores: la concentración de la sonda, del transcrito positivo y del virus en las muestras, además, del tiempo de exposición de la película de Rayos X en el momento de la captura de señales quimioluminiscentes emitidas por las muestras marcadas. Lo que exige realizar varias pruebas de calibración y optimización.

Otro de los objetivos planteados en esta tesis fue la detección y la secuenciación del genoma total de dos aislados de ToBRFV procedentes de los estados de Jalisco (2019) e Hidalgo (2023). Los estados donde se reportó la presencia del virus en México fueron ocho desde el primer reporte en Michoacán en el 2018 (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018), seguido de Baja California Sur (Camacho-Beltrán *et al.*, 2019) y Sinaloa (EPPO, 2019), y recientemente en Guanajuato (Nolasco-García *et al.*, 2023), Jalisco (Vargas-Mejía *et al.*, 2023), Coahuila (Vásquez-Gutiérrez *et al.*, 2024), Colima y en el Estado de México (Ávila-alistac *et al.*, 2024).

Hoy día, existen alrededor de 260 secuencias completas en la base de datos que corresponden a ToBRFV, de los cuales, según los análisis filogenéticos, 150 secuencias son de origen holandés (van de Vossenbergh *et al.*, 2020). México aportó 12 secuencias completas: tres fueron secuenciadas en proyectos nacionales (aislados de Sinaloa, Ciudad de México y Guanajuato) y 9 (de origen desconocido por ser colectados en mercado local) fueron mencionados en un estudio realizado en Estados Unidos (Abrahamianes *et al.*, 2022). Las nuevas secuencias presentadas en esta tesis, pueden aportar más información respecto a la diversidad genética del virus dentro del país, sin embargo, más secuencias representativas de diferentes regiones del país son necesarias para llegar a plasmar un estudio global de la diversidad, la evolución y la epidemiología de ToBRFV en México y como consecuencia poder comprender las interacciones entre las plantas hospedadoras y el virus (Caruso *et al.*, 2022).

Adicionalmente, los análisis bioinformáticos de las secuencias virales rastrean la propagación del virus y estiman sus rutas de transmisión. Lo que se considera esencial para desarrollar estrategias de supervisión y para prevenir la migración del virus a otros lugares. La identificación de patrones de dispersión puede ayudar a predecir brotes futuros y preparar a los agricultores para enfrentar posibles infecciones. Además, las secuencias genómicas contribuyen al conocimiento molecular del virus para mejorar las estrategias de diagnóstico y control, y facilita el desarrollo de herramientas de diagnóstico más precisas (Rubio *et al.*, 2020).

Los aislados ToBRFV-MX-Ja y -Hgo conservan la estructura genómica y funcional de ToBRFV en comparación con el aislado de referencia Tom1-Jo de Jordania. Parecido al observado en la mayoría de los aislados estudiados en el trabajo de Abrahamian *et al.* (2022), no se detectaron mutaciones en los seis aminoácidos H67, N125, K129, A134, I147, y I168 de la MP, unas mutaciones en esos aminoácidos pueden causar la pérdida de virulencia de ToBRFV en tomates que portan el locus *Tm-22* (Yan *et al.*, 2021; Abrahamian *et al.*, 2022). Sin embargo, en la región (60-180 de la MP) descrita como responsable de la patogenicidad (Abrahamian *et al.*, 2022), el aislado ToBRFV-Mx-Hgo sufrió modificación no sinónima en la posición D62.

La relación de filogenia en la población mundial de ToBRFV está dividida entre tres clados (van de Vossenbergh *et al.*, 2020; Esmailzadeh *et al.*, 2023). Acorde a Abrahamian *et al.* (2022), la población estadounidense de ToBRFV se divide igual en estos tres clados. Dos de ellos agrupan solo pocos aislados de Estados Unidos. Mientras que todos los aislados de México y Canadá (considerados en el trabajo) y otra mayoría de EUA se encuentran en el tercer clado. En el análisis filogenético, no se llegó a distinguir estos tres clados a nivel internacional, probablemente los aislados elegidos no fueron representativos, pero a nivel regional los tres clados fueron estadísticamente definidos, efectivamente todos los aislados mexicanos se encontraron en un solo clado, y dentro de este clado, abarcaron en dos subclados igualmente bien definidos, los aislados de Sinaloa (ClnSin/ OM782671.1), de la Ciudad de México (ToBRFV-MX-CP/ MW349655) y de Guanajuato (ToBRFV-Mex2/ OK339579.1). Esto coincide con los resultados de Vargas-Mejía *et al.* (2023) quienes confirmaron que dos aislados de México se encuentran en dos clados distintos: uno formado

solamente de aislados norteamericanos y otro agrupado con aislados de Holanda y el Medio Oriente, llegaron a sugerir que se han producido al menos dos introducciones separadas de este virus al país (Vargas-Mejía *et al.*, 2023). Los estudios filogenéticos de Salih Yilmaz (2023), no reveló ninguna asociación notable entre la diversidad genómica y los orígenes geográficos de los aislados analizados. Sin embargo, los autores usaron en los análisis las secuencias completas de la región CP. Según los resultados obtenidos, esta región no demostró diversificación significativa en la población y probablemente los resultados obtenidos no son descriptivos a la realidad.

La variación genética de una población viral es la base para la evolución y adaptación de los virus en sus huéspedes, vectores o a su entorno. Durante la infección, los virus sufren mutaciones, recombinaciones y reordenamiento y por lo cual generan una nube de variantes. La acumulación de las diferencias genéticas a lo largo del tiempo genera una divergencia genética en la población. Varios factores contribuyen a la fijación de estos cambios, los principales como la presión y la deriva genética. Estos factores en conjunto dan forma a la trayectoria evolutiva de los linajes y determinan el patrón de divergencia observado en los árboles filogenéticos (Caruso *et al.*, 2022; Garcia-Ruiz, 2022). En esta tesis, la variabilidad genética en la población de ToBRFV fue estimada basándose en la diversidad genética.

El valor de la diversidad en posición sinónima y no sinónima de toda la población (genoma total) dentro la población regional (0.0027 ± 0.0002) fue mayor del estimado en el trabajo de Esmailzadeh *et al.* (2023), igual a 0.0022, para la misma región, esta diferencia fue probablemente por limitar los aislados mexicanos a los descritos en el trabajo de (Abrahamian *et al.*, 2022; Esmailzadeh *et al.*, 2023). Por otro lado, la diversidad estimada con los dos nuevos aislados se encuentra en la misma magnitud que la diversidad observada en varias poblaciones del tobamovirus TMV (variable entre 0.014 y 0.022) y 8 veces menor de uno a otro tobamovirus TMGMV (Tobacco mild green mosaic virus) (entre 0.002 y 0.004) (Zamfir *et al.*, 2023).

La mutación por sustitución de nucleótidos se considera uno de los mecanismos evolutivos importantes por ser la principal fuente de nuevas variantes de virus de ARN (Hanada *et al.*, 2004). No obstante, la selección natural no influye fuertemente en la probabilidad de fijación de la sustitución sinónima, al menos a nivel de proteína, y por lo tanto la tasa de sustitución

sinónima refleja la tasa de mutación en gran medida (Hanada *et al.*, 2004). En nuestros análisis se estimó el promedio de diversidad genética para cada población en posición sinónima los valores obtenidos muestran una diversidad regional levemente mayor que la mundial. Según estudios recientes realizados con poblaciones de ToBRFV, este virus tiene una diversidad muy limitada (Esmaeilzadeh *et al.*, 2023; Abrahamian *et al.*, 2022; Vossenbergh *et al.*, 2020) a pesar de que su diversidad es 10 veces mayor que el virus de extrema estabilidad y su diversidad es muy limitada CYSDV (dS igual a 0.00068; Marco y Aranda, 2005).

Nuestros resultados confirman que la selección purificadora influyó con diferentes intensidades entre las regiones genómicas. En la población regional, una fuerte selección purificadora está actuando sobre el ORF1 y 2 y en la internacional en el ORF2. Mientras, que el valor más alto se observó para ORF 3 (MP), nuestros resultados no coinciden con el trabajo de Güller *et al.* (2023) quienes realizaron análisis con 6 aislados turcos de ToBRFV, llegando a la conclusión que CP y MP se encuentran bajo fuerte presión negativa. De igual manera contradicen con la teoría que las presiones de selección negativa parecen ser más fuertes en los genes que codifican proteínas expuestas en la superficie del virión por lo cual este estudio debe ser revisado a detalle. A nivel internacional el valor dNS/dS en la región MP es cerca de 1, lo que refleja una evolución neutra.

En resumen, en este trabajo se consiguió generar dos sondas marcadas con digoxigenina que hibridan en las zonas MP y CP del genoma de ToBRFV. Se comprobó su eficiencia al usarlas en experimentos controlados de laboratorio donde el único virus usado fue el ToBRFV, de igual manera se comprobó la posibilidad de ser usadas como técnica semicuantitativa de la carga viral. Hasta el momento no se ha confirmado la especificidad y la sensibilidad de las sondas por lo cual no es recomendable para diagnóstico temprano en el campo.

Por otra parte, esta tesis ofrece los datos de dos nuevos aislados de ToBRFV en Mexico, procedentes de los estados de Jalisco e Hidalgo. Los análisis realizados, muestran que los dos aislados se encuentran en el mismo clado filogenético que otros aislados de Canadá y de Estados Unidos, mientras las poblaciones de todos los aislados mexicanos descritos se encuentran divididos en 2 subclados. Sus genes están sometidos a una presión purificadora que está restringiendo su variabilidad funcional.

IX. Conclusiones

- La técnica de hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina es una técnica específica y fiable para detectar el virus ToBRFV en experimentos controlados. Por falta de estudio, las sondas generadas no son recomendables para diagnóstico temprano en el campo.
- La técnica de hibridación puede ser usada como método cuantificativo para estimar la carga viral, siempre y cuando se optimice la curva de calibración aplicando suficientes diluciones con concentraciones previamente determinadas y evitando larga exposición de la membrana con el sustrato luminiscente a la película radio X.
- Los dos aislados caracterizados en esta tesis: ToBRFV-MX-Ja y -Hgo se encuentran en uno de los dos clados filogenéticos descritos antes que agrupan los aislados mexicanos junto a aislados de Canadá y Estados Unidos.
- Los dos aislados ToBRFV-MX-Ja y -Hgo conservan su estructura genómica, formada de 4 ORFs y sus dominios funcionales descritos previamente para el género *Tobamovirus* al cual pertenece ToBRFV. No se detectaron inserciones o deleciones a lo largo del genoma comparado con las secuencias de ToBRFV publicadas en la base de datos NCBI.
- La diversidad genética en posición sinónima muestra que la población de ToBRFV incluyendo los dos aislados estudiados es mayor en la zona regional (México, Estados Unidos y Canadá) que la zona global (internacionales) eso puede llevar a la conclusión que el virus entró a la zona por importación comercial, probablemente de varios orígenes.
- Los genes de los aislados ToBRFV se encuentran bajo una presión purificadora que limita su variabilidad funcional.

Perspectivas

- Estudiar la capacidad de las sondas (BRF-S1066 y BRF-S475) a hibridar solo al genoma de ToBRFV sin revelar señales de cruzamiento con otros tobamovirus.
- Construir sondas correspondientes a las regiones de ORF1 y 2 del genoma de ToBRFV y comparar la sensibilidad y especificidad de cada una.
- Clonar el genoma total del virus en un vector binario usando técnicas de clonación que no depende de sitios de restricción como por ejemplo la de Gibson. Esta última se base en la presencia de regiones homólogas en los extremos de los fragmentos de ADN.
- Desarrollar uno o varios clones infectivos, y comprobar su capacidad de transformar plantas.

X. Referencias

- Ahmed, A., Álvarez, M., Pérez, D., Brenda, B., Vargas, Y., Abrahán, J., Pool, R., Alberto, L., Muñoz, N., y Salgado, H. (2021). Detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in solanaceous plants in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6), 1627-1635. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00496-1>
- Alkowni, R., Alabdallah, O., y Fadda, Z. (2019). Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101(3), 719-723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Alon, D. M., Hak, H., Bornstein, M., Pines, G., & Spiegelman, Z. (2021). Differential Detection of the Tobamoviruses Tomato Mosaic, 24-26.
- Ambrós, S., Martínez, F., Ivars, P., Hernández, C., de la Iglesia, F., y Elena, S. F. (2017). Molecular and biological characterization of an isolate of Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in eastern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 261-268. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1180-2>
- Amer, M. A., y Mahmoud, S. Y. (2020). First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Egypt . *New Disease Reports*, 41(1), 24-24. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.024>
- Ávila-alistac, N., Mora-aguilera, G., Lozoya-saldaña, H., y Zamora-macorra, E. J. (2024). Variabilidad genética de dos aislados mexicanos de Tomato brown rugose fruit virus y expresión de síntomas en jitomate y chile, 1-12.
- Barratt, K. S., y Arkell, R. M. (2020). Production of Digoxigenin-Labeled Riboprobes for In Situ Hybridization Experiments. *Current protocols in mouse biology*, 10(2), e74. <https://doi.org/10.1002/cpmo.74>
- Base de datos mundial de la Fiscalía Europea. (2019). Recuperado 21 de junio de 2024, a partir de <https://gd.eppo.int/reporting/article-6622>
- Beris, D., Malandraki, I., Kektsidou, O., Theologidis, I., Vassilakos, N., y Varveri, C. (2020). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Infecting Tomato in Greece. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0212-PDN>, 104(7), 2035. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0212-PDN>
- Camacho-Beltrán, E., Pérez-Villarreal, A., Leyva-López, N. E., Rodríguez-Negrete, E. A., Cenicerros-Ojeda, E. A., y Méndez-Lozano, J. (2019). Occurrence of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato Crops in Mexico. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1974-PDN>, 103(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1974-PDN>
- Cambrón-Crisantos, J. M., Rodríguez-Mendoza, J., Valencia-Luna, J. B., Alcasio-Rangel, S., García-Ávila, C. D. J., López-Buenfil, J. A., y Ochoa-Martínez, D. L. (2018). Primer reporte de Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 185-192. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-5>
- Caruso, A. G., Rizzo, R., Bertacca, S., Parrella, G., Davino, S., y Panno, S. (2022). Tomato brown rugose fruit virus : A pathogen that is changing the tomato production worldwide, (April), 258-274. <https://doi.org/10.1111/aab.12788>
- Chanda, B., Rivera, Y., Nunziata, S. O., Galvez, M. E., Gilliard, A., y Ling, K.-S. (2020). Complete Genome Sequence of a Tomato Brown Rugose Fruit Virus Isolated in the United States . *Microbiology Resource Announcements*, 9(29), 18-20.

- <https://doi.org/10.1128/mra.00630-20>
- Dietzgen, R. G., Parrella, G., y Rizzo, D. (2021). Rapid and Sensitive Detection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato and Pepper Seeds by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays (Real Time and Visual) and Comparison With RT-PCR End-Point and RT-qPCR Methods, 12(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640932>
- Edith, N., Pérez, L., Martínez, J. V., Tamayo, D. O., y Quintana, E. (2023). Detección de fitopatógenos a través de Compuestos Orgánicos Volátiles emitidos por plantas de tomate Detección de fitopatógenos a través de Compuestos Orgánicos Volátiles emitidos por plantas de tomate, (March).
- Esmacilzadeh, F., Santosa, A. I., Çelik, A., y Koolivand, D. (2023). Revealing an Iranian Isolate of Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Complete Genome Analysis and Mechanical Transmission. *Microorganisms*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102434>
- Fidan, H., Sarıkaya, P., y Calis, O. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>
- Garcia-Ruiz, K. L. and H. (2022). Determinants of Virus Variation, Evolution, and Host Adaptation, 1-20.
- Gázquez Martínez, C. (2023). Virus: proyección didáctica.
- Gray, S. M., y Banerjee, N. (1999). Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 128. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.128-148.1999>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). Green 2012.pdf.
- Güller, A., Usta, M., y Randa-zelyüt, F. (2023). Genetic diversity and population structure of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) variants from Antalya province , Turkey, 51(3), 1-13. <https://doi.org/10.15835/nbha51313356>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit_a_user_friendly_biological_seque.pdf. Recuperado a partir de bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
- Hanada, K., Suzuki, Y., y Gojobori, T. (2004). A Large Variation in the Rates of Synonymous Substitution for RNA Viruses and Its Relationship to a Diversity of Viral Infection and Transmission Modes, 21(6), 1074-1080. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh109>
- Kassem, M. A., Juarez, M., Gómez, P., Mengual, C. M., Sempere, R. N., Plaza, M., Elena, S. F., Moreno, A., Fereres, A., y Aranda, M. A. (2013). Genetic Diversity and Potential Vectors and Reservoirs of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Southeastern Spain, 4.
- Kimura, M. (1980). *Journal of Molecular Evolution* ©, 16(1330).
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., y Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2 . 0, 23(21), 2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- López, Angélica Sarahy Trujillo, Dr. Jesús Roberto Millán Almaraz, D. A. Y. R. (2023). Reconocimiento de patrones planta-patógeno usando visión por computadora multispectral. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Luis I.Nolasco-García, Juan L.Marín-León, Ana I.Mireles-Arriaga, J. E. R.-N. y J. H.-R. (2023). ÁREAS GEOGRÁFICAS SUSCEPTIBLES ALVIRUS RUGOSO DEL TOMATE(ToBRFV) EN GUANAJUATO, MÉXICO, 35(1), 13-20.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y.,

- Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., y Dombrovsky, A. (2017). A new israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0170429>
- Mahillon, M., Kellenberger, I., Dubuis, N., Brodard, J., Bunter, M., Weibel, J., Sandrini, F., y Schumpp, O. (2022). First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in Switzerland. *New Disease Reports*, 45(1), 15-17. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12065>
- Marco, C. F., y Aranda, M. A. (2005). Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus Printed in Great Britain, 2, 815-822. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80584-0>
- Matsushita, Y., Takeyama, S., Tomitaka, Y., Matsuyama, M., Ishibashi, K., Shinosaka, H., Osaki, K., y Kubota, K. (2024). Elucidating the nature of seed-borne transmission of tomato brown rugose fruit virus in tomato, bell pepper, and eggplant. *Journal of General Plant Pathology*, 90(1), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s10327-023-01159-9>
- Menzel, W., Knierim, D., Winter, S., Hamacher, J., y Heupel, M. (2019). infecting tomato in Germany, 5197.
- Nolasco-García, L. I., Marín-León, J. L., Ruiz-Nieto, J. E., y Hernández-Ruíz, J. (2020). Identification methods for Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in México. *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 835-844. <https://doi.org/10.15517/AM.V31I3.40655>
- Odell, J. T., Nagy, F., y Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313(6005), 810-812. <https://doi.org/10.1038/313810a0>
- Ontañón, C., Ojinaga, M., Larregla, S., Zabala, J. A., Reva, A., Losa, A., Heribia, R., Bertacca, S., Sanahuja, E., Alfaro-Fernández, A., Font-San Ambrosio, M. I., Corachán, L., Pallás, V., y Sánchez-Navarro, J. Á. (2024). Molecular analysis of a Spanish isolate of chili pepper mild mottle virus and evaluation of seed transmission and resistance genes. *European Journal of Plant Pathology*, 168(2), 401-418. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02765-1>
- Ortiz-Martínez, L. E., Ochoa-Martínez, D. L., Rojas-Martínez, R. I., Aranda-Ocampo, S., y Cruz, M. Á. G. (2021). Response of chili varieties to the infection with Tomato brown rugose fruit virus. *Summa Phytopathologica*, 47(4), 209-215. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/250747>
- Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., Kinard, G. R., y Di Serio, F. (2017). Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Viroids. *Viroids and Satellites*, 369-379. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00035-8>
- Panno, S., Caruso, A. G., y Davino, S. (2019). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>, 103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Peiró, A., Pallás, V., y Sánchez-Navarro, J. Á. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 469-475. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9893-0>
- Peter Abrahamian, Weili Cai, Schyler O. Nunziata, Kai-Shu Ling, Namrata Jaiswal, Vessela A. Mavrodieva, Y. R. and M. K. N. (2022). Comparative Analysis of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Isolates Shows Limited Genetic Diversity, 1-14.
- Rodríguez-Mendoza, J., De Jesús García-Ávila, C., Abel López-Buenfil, J., Araujo-Ruiz, K.,

- Quezada-Salinas, A., y Cambrón-Crisantos, M. (2019). Identification of Tomato brown rugose fruit virus by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP) Identificación de Tomato brown rugose fruit virus por RT-PCR de una región codificante de la replicasa (RdRP). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1902-6>
- Rubio, L., Galipienso, L., y Ferriol, I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution, 11(July), 1-23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., y Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, 161(2), 503-506. <https://doi.org/10.1007/S00705-015-2677-7/TABLES/1>
- Salih Yilmaz, O. B. *. (2023). Co-Infection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus and Pepino Mosaic Virus in Grocery Tomatoes in South Florida : Prevalence.
- Sánchez-Navarro, J. A., Cooper, C. N., y Pallás, V. (2018). Polyvalent detection of members of the genus potyvirus by molecular hybridization using a genus-probe. *Phytopathology*, 108(12), 1522-1529. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0146-R>
- SENASICA. (s. f.). Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios. Recuperado a partir de https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2020/abril/PANToBRFV_bc6c0958-dc49-4fb5-ac21-355322898f15.pdf
- Skelton, A., Buxton-Kirk, A., Ward, R., Harju, V., Frew, L., Fowkes, A., Long, M., Negus, A., Forde, S., Adams, I. P., Pufal, H., Mcgreig, S., Weekes, R., y Fox, A. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in the United Kingdom. 2019. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>
- Spiegelman, Z., y Dinesh-Kumar, S. P. (2023). Breaking Boundaries: The Perpetual Interplay between Tobamoviruses and Plant Immunity. *Annual Review of Virology*, 10(1), 455-476. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-111821-122847>
- Tu, L., Wu, S., Gao, D., Liu, Y., Zhu, Y., y Ji, Y. (2021). Synthesis and characterization of a full-length infectious cDNA clone of tomato mottle mosaic virus. *Viruses*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/v13061050>
- van de Vossenbergh, B. T. L. H., Visser, M., Bruinsma, M., Koenraad, H. M. S., Westenberg, M., y Botermans, M. (2020). Real-time tracking of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain. *PLoS ONE*, 15(10 October), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234671>
- Vargas-Mejía, P., Rodríguez-Gómez, G., Salas-Aranda, D. A., García-López, I. J., Pérez-Alfaro, R. S., de Dios, E. Á., Santoyo-Villa, J. N., Briseño, R. I. A., y Silva-Rosales, L. (2023). Identification and management of tomato brown rugose fruit virus in greenhouses in Mexico. *Archives of Virology*, 168(5), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05757-y>
- Vásquez-Gutiérrez, U., Frías-Treviño, G.A., López-López, H., Delgado-Ortiz, J.C., Aguirre-Urbe, L.A., Flores-Olivas, A. (2024). Evaluation of the pathogenicity of three isolates of Tomato brown rugose fruit virus in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) from Coahuila , Mexico Evaluación de la patogenicidad de tres aislados del Tomato brown rugose fruit virus en plantas de toma, (844), 1-19.
- Vossenbergh, B. T. L. H. Van De, Dawood, T., Wo, M., y Botermans, M. (2021). First Expansion of the Public Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) Nextstrain Build ; Inclusion of New Genomic and Epidemiological Data, 1(4), 359-363.
- Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Han, S. L., Geng, C., Tian, Y. P., y Li, X. D. (2019). First Report of

- Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato in China.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN>, 103(11).
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN>
- Zamfir, A. D., Babalola, B. M., Fraile, A., Mcleish, M. J., y García-arenal, F. (2023). Tobamoviruses Show Broad Host Ranges and Little Genetic Diversity Among Four Habitat Types of a Heterogeneous Ecosystem, 113(9), 1697-1707.
- Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., y Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus : An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide, (April), 1262-1277. <https://doi.org/10.1111/mpp.13229>
- Zhao, X., Wu, J., Ma, Z., Shi, Y., Fang, Z., Wu, J., Yang, X., y Zhou, X. (2024). Development and application of monoclonal antibody-based dot-ELISA and colloidal gold immunochromatographic strip for rapid, specific, and sensitive detection of tomato brown rugose fruit virus. *Journal of Virological Methods*, 323, 114841. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2023.114841>
- Zhi-yong, Y. A. N., Mei-sheng, Z., Hua-yu, M. A., Ling-zhi, L. I. U., Guang-ling, Y., Chao, G., y Yan-, T. (2021). Biological and molecular characterization of tomato brown rugose fruit virus and development of quadruplex RT-PCR detection, 20(7), 1871-1879. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63275-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63275-0)
- Ziyue Ma, Hui Zhang, Ming Ding, Zhongkai Zhang, X. Y. and X. Z. (2021). Molecular Characterization and Pathogenicity of an Infectious cDNA Clone of tomato brown rugose fruit virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/ijms25031620>

XI. Anexos

Anexo I.

Tabla 1. Diseño de oligos utilizados en diferentes técnicas

| Nombre | Secuencia 5'-3' | Temp. (T _m °C) | GC % | No. Nt |
|---------|-----------------------------------|------------------------------|------|--------|
| AGB-123 | CAC AAT CGC AAC TCC ATC GC | 53.8 | 55 | 20 |
| AGB-124 | CAG AGG ACC ATT GTA AAC CGG | 54.4 | 52 | 21 |
| AGB-188 | GGG CCC CTA CCG GGG GTT CC | 64.1 | 80 | 20 |
| AGB-189 | CAC ACA GAC AGC TAC CAC ATC C | 56.7 | 55 | 22 |
| AGB-190 | CCA ACA ACA ACA AAC AAC AAA CAA C | 52.8 | 36 | 25 |
| AGB-191 | GGC CGG TCT GTC TGG AGA C | 57.6 | 68 | 19 |
| AGB-192 | CTC CCA GGT AAT AGC ACC ATG | 54.4 | 52 | 21 |
| AGB-193 | GTC GGC CCA TGC TGA TGA C | 55.4 | 63 | 19 |
| AGB-194 | GGT GTC GAG AGA TAT GTC G | 51.1 | 53 | 19 |
| AGB-247 | GTT GGT CAG ATT GAC TCC GAC | 54.4 | 52 | 21 |
| AGB-248 | GTC GGA GTC AAT CTG ACC AAC | 54.4 | 52 | 21 |
| AGB-249 | CCA GGT CTG AGT GGG ATG TTG AC | 58.8 | 57 | 23 |
| AGB-250 | TTG ATA GCC TGG TAG CAT CAC TCT C | 57.7 | 48 | 25 |
| AGB-251 | GCA GAA CTA CGC TGC GTT GTC | 56.3 | 57 | 21 |
| AGB-252 | GCT TGT TTA GCT TCC ATG TTG CCC | 57.4 | 50 | 24 |
| AGB-253 | CAA CGT GGT ACT TCC TAG CAT GTG | 57.4 | 50 | 24 |
| AGB-254 | TCA AAA TCT GCA AGC TGA CCA ATG G | 56 | 44 | 25 |
| AGB-119 | CAG AGT TTT TGG GTT CCT CCA GCA | 57.4 | 50 | 24 |
| AGB-120 | CTA ATG CGT CTC CCG ACA CT | 53.8 | 55 | 20 |
| AGB-121 | CAA TCC TTG ATG TGT TTA GCA C | 51.1 | 41 | 22 |
| AGB-122 | ATG GTA CGA ACG GCG GCA G | 55.4 | 63 | 19 |
| AGB-257 | GGT GGG AAT TTT GCA TCT CAT CTG | 66.6 | 46 | 24 |
| AGB-258 | ACC AGT AAT TGA CCG ATG AGG | 64.9 | 48 | 21 |
| AGB-259 | TGG AGG AGA CTG AGG TTA TG | 64.8 | 50 | 20 |
| AGB-260 | ACC GAC GAT GTA CAC ATG AC | 64.8 | 50 | 20 |
| AGB-261 | CCG ATG AAT GTT GTA ACG TCC | 64.9 | 48 | 21 |
| AGB-262 | GTG GAA GGT ACG TGA TAC ATC | 64.9 | 48 | 21 |
| AGB-263 | GGC TAT GTA CAT CTT GCT GG | 64.8 | 50 | 20 |
| AGB-264 | CAC AAA CTC TAA TGA CAG CGG | 64.9 | 48 | 21 |

Temp=Temperatura, **GC**= Guanina y Citosina. **No. Nt**= Número de nucleótidos.

Anexo II.

Tabla 2. Pares de oligos diseñados para la secuenciación del aislado de Guadalajara Jalisco.

| Foward | Secuencia | Reverse | Secuencia |
|----------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------|
| AGB-120 | CCA ACA ACA ACA AAC AAC AAA CAA C | AGB-119 | CAG AGT TTT TGG GTT CCT CCA GCA |
| AGB-122 | ATG GTA CGA ACG GCG GCA G | AGB-121 | CAA TCC TTG ATG TGT TTA GCA C |
| AGB-124 | CAG AGG ACC ATT GTA AAC CGG | AGB-123 | CAC AAT CGC AAC TCC ATC GC |
| AGB-189 | CAC ACA GAC AGC TAC CAC ATC C | AGB-188 | GGG CCC CTA CCG GGG GTT CC |
| AGB-191 | GGC CGG TCT GTC TGG AGA C | AGB-190 | CCA ACA ACA ACA AAC AAC AAA CAA C |
| AGB-193 | GTC GGC CCA TGC TGA TGA C | AGB-192 | CTC CCA GGT AAT AGC ACC ATG |
| | | AGB-194 | GGT GTC GAG AGA TAT GTC G |
| AGB-248 | GTC GGA GTC AAT CTG ACC AAC | AGB-247 | GTT GGT CAG ATT GAC TCC GAC |
| AGB-250 | TTG ATA GCC TGG TAG CAT CAC TCT C | AGB-249 | CCA GGT CTG AGT GGG ATG TTG AC |
| AGB-252 | GCT TGT TTA GCT TCC ATG TTG CCC | AGB-251 | GCA GAA CTA CGC TGC GTT GTC |
| AGB-254 | TCA AAA TCT GCA AGC TGA CCA ATG G | AGB-253 | CAA CGT GGT ACT TCC TAG CAT GTG |

Anexo III.

Tabla 3. Pares de oligos diseñados para la secuenciación del aislado de Hidalgo.

| Foward | Secuencia | Reverse | Secuencia |
|----------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------|
| AGB-190 | CCA ACA ACA ACA AAC AAC AAA CAA C | AGB-120 | CTA ATG CGT CTC CCG ACA CT |
| AGB-249 | CCA GGT CTG AGT GGG ATG TTG AC | AGB-253 | CAA CGT GGT ACT TCC TAG CAT GTG |
| AGB-191 | GGC CGG TCT GTC TGG AGA C | AGB-248 | GTC GGA GTC AAT CTG ACC AAC |
| AGB-251 | GCA GAA CTA CGC TGC GTT GTC | AGB-254 | TCA AAA TCT GCA AGC TGA CCA ATG G |
| AGB-122 | ATG GTA CGA ACG GCG GCA G | AGB-121 | CAA TCC TTG ATG TGT TTA GCA C |

| | | | |
|----------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------|
| AGB-252 | GCT TGT TTA GCT TCC ATG TTG CCC | AGB-193 | GTC GGC CCA TGC TGA TGA C |
| AGB-123 | CAC AAT CGC AAC TCC ATC GC | AGB-188 | GGG CCC CTA CCG GGG GTT CC |

Anexo IV.

Tabla 4. Condiciones utilizadas en los fragmentos amplificados para secuenciación directa del aislado de Hidalgo.

| Nombre del fragmento | Desnaturalización inicial | Paso 1 | Paso 2 | Paso 3 | Extensión final | Numero de ciclos. |
|----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| FRAG-1 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 51 °C 30 seg | 68 °C 2 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-2 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 min | 55 °C 30 seg | 68 °C 1.3 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-3 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 53 °C 30 seg | 68 °C 1.3 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-4 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 55 °C 30 seg | 68 °C 1.3 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-5 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 51 °C 30 seg | 68 °C 1.2 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-6 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 55 °C 30 seg | 68 °C 1.4 min | 68 °C 5 min | 30 |
| FRAG-7 | 94 °C 2 min | 94 °C 15 seg | 54 °C 30 seg | 68 °C 1 min | 68 °C 5 min | 30 |

Anexo V.

Tabla 5. Protocolo de Hibridación Molecular mediante la técnica Dot Blot

| Paso | Acción |
|------|--|
| 1 | Preparación de la membrana con las muestras. Fijarla exponiéndola a la luz UV/Crooslinker (E:1200) |
| 2 | Hibridar la membrana con la sonda en el horno. T ^a : 68° C. toda la noche |
| 3 | Lavar con Sol 1 (2X SSC más 0.1% SDS) a RT (opcional a 68° C) / X2 |
| 4 | Lavar con Sol 2 (0.1X SSC más 0.1% SDS). T ^a : 68° C /X2 |
| 5 | Lavar la membrana en Tampón de lavado a temperatura ambiente |
| 6 | Incubar en Tampón II a temperatura ambiente |
| 7 | Incubar con el conjugado Anti-DIG-AP (B & M) diluido 1:10.000 en Tampón II. |
| 8 | Lavar la membrana en Tampón de lavado a RT /X2 |
| 9 | Equilibrar la membrana en 5-7 ml. de Tampón III a RT. |
| 10 | Incubar la membrana en el sustrato CSPD (B & M) diluido 1:100 en Tampón III en oscuridad y a RT. |
| 11 | Envolver la membrana en una bolsa de plástico y colocarla en el casete. |
| 12 | Revelar la película en la cámara oscura (con Revelador / Agua / Fijador) |

Anexo VI.

>Seq. 6332 bp. ToBRFV-Mx-Ja.

```

CCAACAACAACAACAACAACAACAACATCACAATTACTATTTACAaCTACAATGGCATAACACACAGACAGC
TACCACATCCGCTTTGCTCGACACTGTCCGAGGTAACAATAACCTTGGTCAACGATCTTGCGAAGCGGCGTCTT
TATGACACAGCGGTTCGACGAGTTCAACGCTCGTGATCGCAGGCCCAAAGTAAATTTTTCCAAAGTAATAAGTG
AGGAACAGACGCTTATTGCTACTAGGGCATATCCAGAATTCCAGATAACCTTCTATAAATACGCAGAACGCCGT
GCATTGCTTGGCGGTGGACTACGATCCTTAGAACTGGAATATCTAATGATGCAGATCCCCTACGGATCACTC
ACATATGATATAGGTGGGAATTTTGCATCTCATCTGTTCAAAGGACGGGCATATGTTCACTGCTGTATGCCCA
ATCTTGATGTCCGCGACATAATGCGGCACGAAGGCCAGAAAGACAGTATAGAATTATaCCTTTCCAGGCTTGA
GCGGGGCAACAAGTTGTCCCAAATTTCCAAAAGGAAGCTTTTGACAGATACGCTGAAACGCCAGACGAAGTT
GTCTGTACAGTACCTTCCAAACGTGTACGCCAaGcCAGGTGGAAAACACAGGCAGGGtGTATGCTATTGCAT
TGCACAGTATATACGATATACCTGCTGATGAATTCGGAGCGGCACCTTTAAGGAAAAATGTCCATGTTTGTTA
CGCCGCTTCCACTTTTCCGAGAATTTACTTCTCGAAGATTCACACGTCAACCTTGACGAAATCAACGCGTGT
TTTTcGCGTGATGGAGACAAGCTGACTTTTTCTTTTCGCATCTGAGAGCACTTTAAATTATTGTCATAGTTATT
CTAATATTTTAAATACGTGTGCAAACTTACTTCCCGGCATCTAATAGAGAGGTCTACATGAAGGAGTTTTT
GGTCACCAGGGTTAACACCTGGTTTTGTAAGTTTTCTAGGATAGATACTTTTTTTATTATACAAGGGGGTAGCC
CACAAAGGTGTAATAGTGAGCAATTTTACAGCGCAATGGAAGATGCATGGCACTACAAAAAGACTCTTGCAA
TGTGTAACAGCGAGAGGATTCTTCTTGAAGATTCTCATCGGTCAATTACTGGTTcCCAAAAATGAGAGATaT

```

GGTCATAGTTCCTCTATTcGACATATCTCTcGACACCAGTAAAAGGACCCGCAAAGAAGTCTTAGTGTCAAAG
GATTTTGTATTACAGTTTTTAAATCACATTCGCACCTTATCAAGCCAAGGCacTTACATACTCCAATGTTTTAT
CCTTTGTGCAATCAATTCGTTCAAGGGTAATTATCAACGGAGTGACTGCCAGGTCTGAGTGGGATGTTGACAA
ATCTCTTTTGCAATCCTTGTCCATGACATTTTTCTTGCATACAAAGCTTGCCGTTTTAAAAGACGAATTGTTA
ATCAGCAAGTTTTAGTTTTGGGGCCAAAATCAGTAAGCCAGCATGTATGGGATGAGATTTCCCTGGCTTTTGGAA
ACGCATTTCCATCGATCAAGGAGAGACTGCTAAATCgGAAACTAATTAAAGTGTCCGGGAGACGCATTAGAAAT
CAGGGTGCCTGATTTATATGTGACGTTTTACGATAGATTAGTGACTGAGTACAAAACATCGGtgGATATGCCA
GTGCTTGATATCAGAAAGAGAATGGAGGAGACTgAGGTTATGTACAATGCATTGTCTGAGCTATCTGTGCTCA
AGGAGTCGGACAAGTTCGACGTTgATGTTtTTTCCCGGATGTGCCAGACTTTGGAGGTAGACCCAATGACTGC
AGCAAAGGTTATTGTGGCAGTGATGAGCAACGAGAGCGGACTGACTTTACATTTCGAACAGCCAACCTGAAGCA
AATGTGCGATTGGCACTTAAAGATTAGAAAAGCCTCTGAGGGTGCCTAGTGGTTACTTCTAGAGATGTTG
AAGAACCATCCATGAAGGGTTCAATGGCAAGAGGAGAGTTACAATTGGCCGGTCTGTCTGGAGACCAACCAGA
GTCTTCCATACTCGGAACGAGGAAAATAGAGTCATTAGAGCAATTCACATGGCAACGGCTAGTTTCGTTAATT
CGGAAAACAGATGAGTTCGATTGTGTACACGGGCCCATTAAGTTTCAGCAAATGAAAACTTTATTGATAGCC
TGGTAGCATCACTCTCTGCTGCGGTGTGCAACCTAGTCAAGATCCTAAAGGATACAGCTGCTATAGATCTCGA
AACCCGTCAgAAGtTTGGAGTCTTAGATGTTGCGACCAAAGATGGTTAATTAACCTTTAGCCAAGAATCAC
GCATGGGGCGTTATTGAAACACATGCTAGGAAGTACCACGTTGCACTTTTGGAGTATGATGAGCATGGAGTGG
TAACTTGCACAGTTGGAGAAGGGTGGCCGTGAGTCTGAGTCAATGGTTTATTCTGATATGGCAAAGCTCAG
AACACTGAGGAGATTATTAAGGGATGGTGAACCTCATGTGAGCAGTGTAAAGTCGTCTAGTTGACGGTGTG
CCGGTTGTGGAAAGACAAAAGAGATTCTCTCGAAAGTAAATTTTGGAGGAAGATCTAATCTTAGTACCGGGTA
AGCAGGCTGCTGAAATGATAAAGAGGGCTGCTAATGCGTCAGGAATAATTCAAGCCACAAGAGATAATGTTTCG
TACTGTTGATTCATTTATAATGAAcTACGGTAAAGGAACACGCTGTGAGTTCAAAAGGTTATTTATCGACGAA
GGTCTGATGTTGCACACTGGTTGTGTGAATTTTCTTGTCTTCTATGTCTCTGTGCGAAATTCATATGTTTATG
GAGACACACAACAAATTCATACATCAACAGAGTATCCGGTTTTCCGTaCCCTGCACATTTTGCAAAAATAGA
GGTTGATGAGGTGGAACTCGCAGAACTACGCTGCGTGTCCAGCCGACATTACCCACTATCTTAACAGAAGG
TACGACGGACATGTCATGTGTACATCGTCCGTTAAAAAGTCAGTTTCTCAGGAAATGGTGAGCGGGCCGCAA
TGATCAATCCTGTATCTAAGCCACTGAATGGAAAAGTTTTGACTTTCACTCAGTCTGATAAAGAGGGCCGCT
TTCTCGAGGATATACGGACGTCATACAGTACATGAGGTACAAGGTGAGACATATGCAGATGTGTCGTTGGTC
AGATTGACTCCGACACCTGTATCTATCATCGCAGGAGATAGTCCGCACGTTCTTGTAGCTTTGTCAAGGCATA
CCCAAACATTGAAGTATTACACCGTAGTGATGGATCCTCTTGTAAAGTATAATTAGGGATTTAGAAAACTTAG
TTCTTACTTGTTAGATATGTATAAAGTAGATGCAGGGACCCAATAGCAATTACAGGTAGACTCCGTGTTTTAAA
GGTTCTAATCTTTTTGTTGCAGCACCAAAGACTGGAGATATCTCAGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTG
TCCCAGGTAATAGCACCATGTTAAATAACTATGATGCTGTTACCATGAGGTTGACTGACATTTCTCTTAATGT
CAAAGATTGCATATTGGATTTCTCTAAGTCTGTGGCTGCACCGAAGGATCCGATCaCCACTaATTCCAATG
GTACGAACGGCGGCAGAAATGCCACGCCAGACTGGACTATTGGAAAATTTGGTGGCGATGATCAAAAGAACT
TTAATTCACCGGAGTTATCAGGAATAATCGAcATTGAGAATACTGCATCTTTAGTAGTAGATAAATTTTTTGa
TAGTTACTTGTCTAAAGAAAAAAGAAAACCAAATAAAAATGTTTCTTTATTTTGTAGAGAGTCTCTCAATAGA
TGTTTAGAGAAGCAGGAGCAAGTGACCATTGGTCAACTTGAGATTTTGTATTTGTGGATCtTCCTGCCGTTG
ATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCTAAGCAGAAGCTGGATACATCAATTCAAAGCGAATATCCGGC
CTTGCAGACGATTGTGTATCATTGAAAAAGATCAACGCAATCTTCCGGTCTTTGTTTCAGTGAGCTCACAAGG
CAAATGCTCGAAAGCATAGACTCAAGTAAGTTTTTGTCTTTTACAAGGAAGACGCCAGCTCAAATGAGGATT
TCTTCGGAGATCTCGATAGCCATGTCCCTATGGATATCTTGGAGTTGGATATTTTCGAAGTATGACAAATCTCA
GAACGAGTTCCTGTGCAGTAGAGTATGAAATATGGAGAAGACTTGGATTAGAAGATTTTCTGGGAGAAGTT
TGGAAACAAGGCCACAGGAAAACACTCTTAAAGATTACACAGCTGGTATTAAAACGTGTTTATGGTACCAGA
GAAAGAGTGGGGACGTTACAACATTATCGGTAATACGGTGATTATTGCTGCTTGTAGCTTCCATGTTGCC
CATGGAGAAAATAATCAAAGGTGCATTTTGCAGGAGATGACAGTTTACTATACTTCCAAAAGGTTGTGAGTTT
CCTGACATACAGCATAACAGCCAACCTTATGTGGAATTTTCGAGGCTAAGCTATTTCAGAAAAGCAGTATGGtTATT
TCTGTGGAAGGTACGTGATACATCATGACAGAGGGTGTATTGTTTATTATGACCCTTTGAAGTTGATTTCTAA
ACTTGGTGCTAAACACATCAAGGATTGGGATCACTTAGAAGAGTTTCAGAAGATCCCTTTGTGATGTTGCAAAAT
TCGTTGAACAACCTGTGCGTATTACACGCAGTTGGACGACGCTGTGAGTGAGGTCCATAAAAACCGCACCCCGG
GTTTCGTTTGTaTATAAAAGTTTTAGTTAAATATCTGTCCGATAAGGTTCTTTTTAGAAAGTTTGTATTAGATGG
CTCTTGTAAAGGGTAAAGTCAATATTAATGAGTTCATAGACTTGTCAAATCAGAAAATTTCTTCCGTCTaT
GTTACACCTGTTAAGAGTGTGATGATCTCCAAGGTTGATAAGATATTGGTTCATGAAGATGAATCTTTGTGc
GAAGTCAATTTACTCAAAGGTGTAACCTCATTAATGGTGGCTATGTACATCTTGTGCTTGTGTTGAGTGCAG
GTGAATGGAATTTGCCAGATAATTGTGCTGGTGGTGTGAGtGCTGTTTGGTTCGATAAGAGAATGGAGAGAGC
GGACGAGGCAACTCTTGTTCATAcTATACCGCAGCGGCTAAGAAAAGGTTTTAGTTCAAAGTGCCTCCAAAT
TACAACATCACTACCAAGGACGCAGAAAAGGCAGTTTTGGCAAGTACTAGTTAATATTAGAAATGTTAAAATTG

CTGCGGGTTACTGTCCGCTGTCATTAGAGTTTGTGTGTCAGTGTGTATTGTTTATAAAAAATATTATAAAACTCGG
TTTGAGAGAGAAAATTACGAGCGTCACGGATGGAGGGCCCATGGAACATCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTC
ATGGAAGAAGTCCCAGTGTCTGTAAGGCTTGCAAAATTTTCGTTTCGAAGACCGGAAAAAAGTTTAGTAGTAAAA
GTGAGAATAATAGTGGTAATAATAGGCCGAAACCAAAACAAAAACCAAGGAAGGAAAAAGGGTTTTAAAGTTAG
GGTTGAGAAGGATAATTTAATTGAtAatGAATTGGAGACTTACATCGCCGAtTCAGATTTCGTATTAAATATGT
CTtaCACAATCGCAACTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGCATCAGCATGGGCCGACCCTATAGAATTAATAAA
TTTATGTACTAATTCACTAGGTAATCAGTTCCAAACACAACAAGCTAGAACAACCGTTCAACGGCAATTTAGC
GAAGTGTGGAAACCTGTCCCTCAAGTCACTGTTAGGTTTTCTGACAGTGGTTTTAAGGTGTATAGGTACAATG
CGTACTAGATCCCTCTAGTTGCTGCTTTGTTAGGAGCTTTTCGATACTAGAAATAGGATTATAGAAGTCGAAAA
TCAGGCAACCCGACAACCGCCGAAACGTTAGACGCTACTCGTAGAGTAGATGACGCAACCGTGGCTATAAGG
AGCGCTATAAATAAATTTAGTAGTAGAATTTGGTCAAAGGAACAGGCTTGTACAATCAGAGCACATTTGAAAGTG
CATCCGGTTTTACAATGGTCTCTGCACCTGCATCTTGAGATAATCGAGATGCTTAAATAACAGATTGTGTCTG
CAAACACACGTGGTACGTACGATAACGTATAGTGTTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTAGTGTCTTGGAG
CGCGCGGGACAAATGTGTATGGTTCATACACATCCGTAGGCACGTAATAAAGCG

Anexo VII.

>Seq. 6332 bp. ToBRFV-Mx-Hgo.

CCAACAACAACAACAACAACAACAACAATCAACAATTACTATTTACAATACAATGGCATAACACACAGACAGCT
ACCACATCCGCTTTGCTCGACACTGTCCGAGGTAACAATACCTTGGTCAACGATCTTTCGAAGCGGGCTCTTT
ATGACACAGCGGTCGACGAGTTCAACGCTCGTGATCGCAGGCCCAAAGTAAATTTTTCCAAAGTAATAAGTGA
GGAACAGACGCTTATTGCTACTAGGGCATATCCAGAATTCAGATAACCTTCTATAATACGCAGAACGCCGTG
CATTCGCTTGCCGGTGGACTACGATCCTTAGAACTGGAATATCTAATGATGCAGATCCCGTACGGATCACTCA
CATATGATATAGGTGGGAATTTTGCATCTCATCTGTTCAAAGGACGGGCATATGTTCACTGCTGTATGCCCAA
TCTTGATGTCCGCGACATAATGCGGCACGAAGGCCAGAAAGACAGTATAGAATTATACCTTTCCAGGCTTGAG
CGGGGCAACAAGTTGTCCCAAATTTCCAAAAGGAAGCTTTTGACAGATACGCTGAAACGCCAGACGAAGTTG
TCTGTACAGTACCTTCCAAACGTGTACGCACCAGCAGGTGGAAAACACAGGCAGGGTGTATGCTATTGCATT
GCACAGTATATACGATATACCTGCTGATGAATTCGGAGCGGCCTTTTAAGGAAAAATGTCCATGTTTGTAC
GCCGCTTCCACTTTTTCCGAGAATTTACTTCTCGAAGATTACACGTCAACCTTGCAGAAATCAACGCGTGT
TTTTCGCGTGATGGAGACAAGCTGACTTTTTCTTTTCGCATCTGAGAGCACTTTAAATTTATTGTCATAGTTATTC
TAATATTTTAAAATACGTGTGCAAACTTACTTCCCAGCATCTAATAGAGAGGTCTACATGAAGGAGTTTTTG
GTCACCAGGGTTAACACCTGGTTTTGTAAGTTTTCTAGGATAGATACTTTTTTATTATACAAGGGGGTAGCCC
ACAAAGGTGTAATAGTGAGCAATTTTACAGCGCAATGGAAGATGCATGGCACTACAAAAAGACTCTTGCAAT
GTGTAACAGCGAGAGGATTCTTCTTGAAGATTCTCATCGGTCAATTAAGTTCCCAAAAATGAGAGATATG
GTCATAGTTCCCTCTATTTCGACATATCTCTYGACACCAGTAAAAGGACCCGCAAAGAAGTCTTAGTGTCAAAGG
ATTTTGTATTACAGTTTTAAATCACATTTCGACTTATCAAGCCAAGGCCTTACATACTCCAATGTTTTATC
CTTTGTGCAATCAATTCGTTCAAGGGTAATTATCAACGGAGTGACTGCCAGGTCTGAGTGGGATGTTGACAAA
TCTCTTTTGAATCCTTGTCCATGACATTTTTCTTGCATACAAGCTTCCCGTTTTAAAAGACGAATTTGTTAA
TCAGCAAGTTTAGTTTGGGGCCAAAATCAGTAAGCCAGCATGTATGGGATGAGATTTCCCTGGCTTTTGGAAA
CGCATTTCCATCGATCAAGGAGAGACTGCTAAAATCGGAAACTAATTAAGTGTGCGGGAGACGCATTAGAAAAT
AGGGTGCCTGATTTATATGTGACGTTTACGATAGATTAGTGACTGAGTACAAAACATCGGTGGATATGCCAG
TGCTTGATATCAGAAAGAGAATGGAGGAGACTGAGGTTATGTACAATGCATTGTCTGAGCTATCTGTGCTCAA
GGAGTCCGACAAGTTTCGACGTTGATGTTTTTTCCCGGATGTGCCAGACTTTGGAGGTAGACCCAATGACTGCA
GCAAAGGTTATTGTGGCAGTGATGAGCAACGAGAGCGGACTGACTCTTACATTCGAACAGCCAACCTGAAGCAA
ATGTGCGATTGGCACTTAAAGATTTCAGAAAAGCCTCTGAGGGTGCCTAGTGGTTACTTCTAGAGATGTTGA
AGAACCATCCATGAAGGGTTCAATGGCAAGAGGAGATTACAATTTGGCCGGTCTGTCTGGAGACCAACCAGAG
TCTTCTATACTCGGAACGAGGAAATAGAGTCATTAGAGCAATTCACATGGCAACGGCTAGTTCGTTAATTC
GGAAACAGATGAGTTCGATTGTGTACACGGGCCCCATTAAGTTTCAGCAAATGAAAACTTTATTGATAGCCT
GGTAGCATCACTCTCTGCTGCGGTGTGCAACCTAGTCAAGATCCTAAAGGATACAGCTGCTATAGATCTCGAA
ACCCGTGAGAAGTTTGGAGTCTTAGATGTTGCGACCAAAAGATGGTTAATTAACCTTTAGCCAAGAATCACG
CATGGGGCGTTATTGAAACACATGCTAGGAAGTACCAGTTGCACTTTTGGAGTATGATGAGCATGGAGTGGT
AACTTGGCAGAGTTGGAGAAGGGTGGCCGTGAGTTCTGAGTCAATGGTTTTATTCTGATATGGCAAAGCTCAGA
ACACTGAGGAGATTATTAAGGGATGGTGAGCCTCATGTGAGCAGTGCTAAAGTGCCTTAGTTGACGGTGTCC
CGGGTTGTGGAAAGACAAAAGAGATTCTCTCGAAAGTAAATTTTGGGAAGATCTAATCTTAGTACCGGGTAA

GCAGGCTGCTGAAATGATAAAGAGGCGTGCTAATGCGTCAGGAATAATTCAAGCCACAAGAGATAATGTTTCGT
ACTGTTGATTTCATTTATAATGAACTACGGTAAAGGAACACGCTGTCAGTTCAAAAGGTTATTTATCGACGAAG
GTCTGATGTTGCACACTGGTTGTGTGAATTTTCTTGTCTTCTATGTCTCTGTGCGAAATTCATATGTTTATGG
AGACACACAACAAATTCATACATCAACAGAGTATCCGGTTTTCCGTACCCTGCACATTTTGCAAAAATAGAG
GTTGATGAGGTGGAAACTCGCAGAACTACGCTGCGTTGTCCAGCCGACATTACCCACTATCTTAACAGAAGGT
ACGACGGACATGTCATGTGTACATCGTCGGTTAAAAAGTCAGTTTCTCAGGAAATGGTGAGCGGGGCCGAAT
GATCAATCCTGTATCTAAGCCACTGAATGGGAAAGTTTTGACTTTCACTCAGTCTGATAAAGAGGCGCTGCTT
TCTCGAGGATATACGGACGTCCATACAGTACATGAGGTACAAGGTGAGACATATGCAGATGTGTCTGTTGGTCA
GATTGACTCCGACACCTGTATCTATCATCGCAGGAGATAGTCCGCACGTTCTTGTAGCTTTGTCAAGGCATAC
CCAAACATTTGAAGTATTACACCGTAGTGTGGATCCTCTTGTAAAGTATAAATTAGGGATTTAGAAAACTTAGT
TCTTACTTGTTAGATATGTATAAAGTAGATGCAGGGACCCAATAGCAATTACAGGTAGACTCCGTGTTTAAAG
GTTCTAATCTTTTTGTTGCAGCACAAAGACTGGAGATATCTCAGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCT
CCCAGGTAATAGCACCATGTTAAATAACTATGATGCTGTTACCATGAGGTTGACTGACATTTCTCTTAATGTC
AAAGATTGCATATTGGATTTCTCTAAGTCTGTGGCTGCACCGAAGGATCCGATCAAACCACTAATTCCAATGG
TACGAACGGCGGCAGAAATGCCACGCCAGACTGGACTATTGGAAAATTTGGTGGCGATGATCAAAAAGAACTT
TAATTCACCGGAGTTATCAGGAATAATCGACATTGAGAATACTGCATCTTTAGTAGTAGATAAATTTTTTGAT
AGTTACTTGTCTAAAGAAAAAGAAAACCAAATAAAAATGTTTCTTTATTTTGTAGAGAGTCTCTCAATAGAT
GGTTAGAGAAGCAGGAGCAAGTGACCATTGGTCAACTTGCAGATTTTGTATTTGTGGATCTTCTGCGGTTGA
TCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCTAAGCAGAAGCTGGATACATCAATTCAAAGCGAATATCCGGCC
TTGCAGACGATTGTGTATCATTCGAAAAAGATCAACGCAATCTTCGGTCTTTGTTTCAGTGAGCTCACAAGGC
AAATGCTCGAAAGCATAGACTCAAGTAAGTTTTTGTCTTTACAAGGAAGACGCCAGCTCAAATTGAGGATTT
CTTCCGAGATCTCGATAGCCATGTCCCTATGGATATCTTGGAGTTGGATATTTTGAAGTATGACAAATCTCAG
AACGAGTTCCTACTGTGCAGTAGAGTATGAAATATGGAGAAGACTTGGATTAGAAGATTTTTCTGGGAGAAGTTT
GGAAACAAGGCCACAGGAAAACCTACTCTTAAAGATTACACAGCTGGTATTAACCGTGTATGTTTGGTACCAGAG
AAAGAGTGGGGACGTTACAACATTCATCGGTAATACGGTGATTATTGCTGCTTGTTTAGCTTCCATGTTGCC
ATGGAGAAAATAATCAAAGGTGCATTTTGGCGAGATGACAGTTTACTATACTTCCCAAAAGGTTGTGAGTTTC
CTGACATACAGCATAACCAACCTTATGTGGAATTTGAGGCTAAGCTATTAGAAAGCAGTATGGTTATTT
CTGTGGAAGGTACGTGATACATCATGACAGAGGGTGTATTGTTTATTATGACCCTTTGAAGTTGATTTCTAAA
CTTGGTGCTAAACACATCAAGGATTGGGATCACTTAGAAGAGTTCAGAAGATCCCTTTGTGATGTTGCAAAAT
CGTTGAACAACCTGTGCGTATTACACGCAGTTGGACGACGCTGTGAGTGAGGTCCATAAAAACCGCACCCCGGG
TTCGTTTTGTATATAAAAAGTTTAGTTAAATATCTGTCCGATAAGGTTCTTTTTTAGAAGTTTGTATATAGATGGC
TCTTGTAAAGGGTAAAGTCAATATTAATGAGTTTCATAGACTTGTCAAAATCAGAAAAATTTCTTCCGTCTATG
TTCACACCTGTTAAGAGTGTGATGATCTCCAAGGTTGATAAGATATTGGTTCATGAAGATGAATCTTTGTCCG
AAGTCAATTTACTCAAAGGTGTAACACTCATTAAATGGTGGCTATGTACATCTTGCTGGTCTTGTGGTGACAGG
TGAATGGAATTTGCCAGATAATTGTCGTGGTGGTGTGAGTGTCTGTTTGGTCGATAAGAGAATGGAGAGAGCG
GACGAGGCAACTCTTGCTTCATACTATAACCGCAGCGGCTAAGAAAAGGTTTCAGTTCAAAGTCGTTCCAAATT
ACAACATCACTACCAAGGACGCAGAAAAGGCAGTTTGGCAAGTACTAGTTAATATTAGAAATGTTAAAATTGC
TGCGGGTTACTGTCCGCTGTCAATTAGAGTTTGTGTGAGTGTGATTGTTTATAAAAAATATTATAAAACTCGGT
TTGAGAGAGAAAATTACGAGCGTCACGGATGGAGGGCCCATGGAACATCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCA
TGGAAGAAGTCCCGATGTCTGTAAGGCTTGCAAAATTTCTGTTTCAAGACCCGAAAAAAGTTTTAGTAGTAAAAG
TGAGAATAATAGTGGTAATAATAGGCCGAAACCAAAACAAAACCAAAAGGAAGGAAAAGGTTTTAAAAGTTAGG
GTTGAGAAGGATAATTTAATTGATAATGAATTGGAGACTTACATCGCCGATTGAGATTCGATTAATAATATGTC
TTACACAATCGCAACTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGATCAGCATGGGCCGACCCATAGAATTAATAAAT
TTATGTACTAATTCCTAGGTAATCAGTTCCAAACACAACAAGCTAGAACAACCGTTCAACGGCAATTTAGCG
AGTGTGGAACCTGTCCCTCAAGTCACTGTTAGGTTTTCTGACAGTGGTTTTAAGGTGTATAGGTACAATGC
GGTACTAGATCCTCTAGTTGCTGCTTTGTTAGGAGCTTTCGATACTAGAAATAGGATTATAGAAGTCGAAAAT
CAGGCGAACCCGACAACCGCCGAAACGTTAGACGCTACTCGTAGAGTAGATGACGCAACGGTGGCTATAAGGA
GCGCTATAAATAATTTAGTAGTAGAATTGGTCAAAGGAACAGGCTTGTACAATCAGAGCACATTTGAAAGTGC
ATCCGGTTTACAATGGTCCCTCTGCACCTGCATCTTGGAGATAATCGAGATGCTTAAATAACAGATTGTGTCTGC
AAACACACGTGGTACGTACGATAACGTATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTAGTGTCTTGGAGC
GCGCGGGACAAATGTGTATGGTTTCATACACATCCGTAGGCACGTAATAAAGCG

Anexo VIII.

Tabla 6. Aislados utilizados para determinar el promedio de distancia genética por población.

| Número de secuencia | Número de acceso del NCBI | País |
|----------------------------|----------------------------------|----------------|
| 1 | MN882033.1 | Egypt |
| 2 | OM515258.1 | Peru |
| 3 | OR795502.1 | China |
| 4 | MW314114.1 | China |
| 5 | OR795503.1 | China |
| 6 | MT018320.1 | China |
| 7 | OQ722330.1 | Russia |
| 8 | MW314091.1 | China |
| 9 | OR792460.1 | China |
| 10 | OR451555.1 | China |
| 11 | MZ004925.1 | China |
| 12 | OM515256.1 | China |
| 13 | KT383474.1 | Jordan |
| 14 | NC_028478.1 | Jordan |
| 15 | MW314105.1 | Jordan |
| 16 | OP009342.1 | Jordan |
| 17 | MK648157.1 | Jordan |
| 18 | MW314110.1 | Jordan |
| 19 | MW314108.1 | Jordan |
| 20 | MW314104.1 | Jordan |
| 21 | MW314107.1 | Jordan |
| 22 | MW314092.1 | Egypt |
| 23 | OL311702.1 | Cyprus |
| 24 | MN013188.1 | Palestine |
| 25 | MN013187.1 | Palestine |
| 26 | OP557566.1 | Iran |
| 27 | OM515231.1 | United Kingdom |
| 28 | OM305070.1 | Switzerland |
| 29 | OK624678.1 | Italy |
| 30 | OM515232.1 | United Kingdom |
| 31 | OM515265.1 | Belgium |
| 32 | OM718702.1 | Netherlands |
| 33 | MK133093.1 | Germany |
| 34 | MN882035.1 | Netherlands |
| 35 | MN882048.1 | Netherlands |
| 36 | MW284987.1 | France |
| 37 | OM892684.1 | Mexico |
| 38 | OM892688.1 | Mexico |
| 39 | OM892687.1 | Mexico |
| 40 | OM892671.1 | USA |
| 41 | OM892685.1 | Mexico |
| 42 | OM892677.1 | USA |
| 43 | OM892672.1 | USA |

| | | |
|----|------------|--------|
| 44 | OM892679.1 | USA |
| 45 | OM892675.1 | Mexico |
| 46 | OM892686.1 | Mexico |
| 47 | OM892691.1 | Mexico |
| 48 | OM892690.1 | Mexico |
| 49 | OM892689.1 | Mexico |
| 50 | OM892673.1 | USA |
| 51 | MN549394.1 | Canada |
| 52 | OM892682.1 | USA |
| 53 | MN549396.1 | Canada |
| 54 | MN549395.1 | Canada |
| 55 | OQ674194.1 | Canada |
| 56 | OM892670.1 | USA |
| 57 | MW349655.1 | Mexico |
| 58 | OM892683.1 | USA |
| 59 | OM892674.1 | USA |
| 60 | OM892676.1 | USA |
| 61 | OM892678.1 | USA |
| 62 | OP244618.1 | USA |
