



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS
ESPECÍFICOS E INÉDITOS PARA LA
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL
*VIRUS DEL MOTEADO ATENUADO DEL
CHILE* (PMMoV) EN UNA REACCIÓN RT-
PCR MULTIPLEX**

CARLOS OMAR MEDINA MOLINA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
2020

La presente tesis titulada: **Diseño de oligonucleótidos específicos e inéditos para la detección e identificación del *Virus del moteado atenuado del chile* (PMMoV) en una reacción RT-PCR multiplex** realizada por el alumno: **Carlos Omar Medina Molina**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

ASESOR:



DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTINEZ

ASESOR:



M. EN C. JOHAN RODRIGUEZ MENDOZA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre 2020

**DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS E INÉDITOS PARA LA
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL *VIRUS DEL MOTEADO ATENUADO DEL
CHILE (PMMoV)* EN UNA REACCIÓN RT-PCR MULTIPLEX**

Carlos Omar Medina Molina, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

México importa semillas de chile (*Capsicum annum*) de China, Japón, Francia, España, Turquía, Holanda, EUA y Hungría, países donde se encuentra el virus del moteado atenuado del chile (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV). Este virus ocasiona síntomas de arrugamiento, deformación, moteado amarillo o tonos verdes claros en hojas y frutos afectando la producción en el cultivo de chile. Actualmente, el diagnóstico molecular del virus PMMoV es por reacción RT-PCR usando solo un juego de oligonucleótidos que podrían favorecer la probabilidad de obtener falsos resultados, debido al potencial de mutación del virus o de la alineación de los oligonucleótidos con el genoma de otras especies del género *Tobamovirus* al cual pertenece el virus PMMoV. El genoma del virus PMMoV está constituido por una molécula de RNA monocatenario, de sentido positivo, con una longitud de 6357 nucleótidos, organizado en cuatro marcos de lectura abierta (ORF) que codifican proteínas esenciales para su ciclo viral. Por lo anterior, el objetivo general fue diseñar oligonucleótidos específicos e inéditos que trabajen en conjunto e hibriden el cDNA diana para la detección e identificación del virus PMMoV que puedan ser utilizados en una reacción RT-PCR multiplex para obtener una mayor especificidad y un poder aumentado de detección. Para esto se diseñaron cinco oligonucleótidos específicos e inéditos: A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E, a partir de 13 secuencias completas disponibles en el GenBank NCBI, con tamaño mínimo de 6300 nucleótidos. De estos solamente los oligonucleótidos C/C' y E/E' generaron los amplicones esperados de 417 y 509 pb, respectivamente, en reacciones RT-PCR y RT-PCR multiplex, con temperatura de anillamiento de 64 °C. Los resultados obtenidos en este estudio indican que los oligonucleótidos C/C' y E/E' amplifican los sitios catalíticos de las proteínas 30 K, responsable de la replicación, y 17.5 K, de la cápside, respectivamente, del virus PMMoV.

Palabras clave: *Pepper mild mottle virus*, oligonucleótidos, PMMoV, RT-PCR multiplex.

**NOVEL SPECIES-SPECIFIC PRIMERS DESIGNED FOR A MULTIPLEX RT-PCR
ASSAY FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE PEPPER MILD MOTTLE
VIRUS (PMMoV).**

Carlos Omar Medina Molina, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

Mexico imports pepper seeds (*Capsicum annuum*) from China, Japan, France, Spain, Turkey, the Netherlands, USA and Hungary; countries where the Pepper mild mottle virus (PMMoV) is commonly detected. This virus causes symptoms such as wrinkling, deformation and yellow or light green mottling in leaves and fruits which affects crop production. Currently, molecular diagnosis of the PMMoV virus is performed by RT-PCR using one set of primers, this could favor the probability of obtaining false results due to the mutation rates of the virus or due to alignment of said primers to the genome of other species of the genus *Tobamovirus*. The PMMoV virus genome is a single-stranded, positive-sense RNA molecule with a length of 6,357 nucleotides, organized into four open reading frames (ORFs) that encode essential proteins for its viral cycle. the main goal of this research was to design specific and unpublished primers that work together and hybridize to the target cDNA for the detection and identification of the PMMoV virus in order to be used in a multiplex RT-PCR reaction to obtain higher specificity and increased detection potential. To achieve this, five specific and unpublished primers were designed: A/A', B/B', C/C', D/D' and E/E' using 13 complete genome sequences available in the GenBank database of the NCBI, with a minimum size of 6,300 nucleotides as templates. Only the C/C' and E/E' primer pairs generated the expected amplicons of 417 and 509 bp, respectively, in both multiplex RT-PCR and RT-PCR reactions with an annealing temperature of 64 °C. Results obtained in this study indicates that the C/C' and E/E' primer pairs amplify the catalytic sites of the 30 K protein responsible for viral replication and the 17.5 K capsid protein of the PMMoV virus, respectively.

Keywords: *Pepper mild mottle virus*, primers, PMMoV, multiplex RT-PCR.

AGRADECIMIENTOS

Al Senasica y al Colegio de Postgraduados por el Convenio de colaboración, a través del **proyecto PM17-4048**, para el desarrollo en conjunto de la Maestría en Ciencias en Fitosanidad para el personal técnico.

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), al Laboratorio de Virología y Nematología por facilitar sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mi consejera, la Dra. Ana María Hernández Anguiano por siempre estar al pendiente de mi situación personal, por su dirección, apoyo y comprensión para culminar exitosamente este trabajo de investigación.

A mis asesores, el Dr. Johan Rodríguez Mendoza y el Dr. Daniel L. Ochoa Martínez por orientarme en el diseño experimental de esta investigación, por el compromiso mostrado para finalizar exitosamente esta investigación.

Al Dr. Andrés Quezada Salinas y el Dr. Clemente de Jesús García, del Grupo Especialista Fitosanitario por haberme proporcionado el extracto de material vegetal infectado con el virus PMMoV.

A la Maestra Rocío Hernández Hernández por todo su apoyo, comprensión, consejos brindados a lo largo de este proceso.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio de virus y nematodos (Bere, Edgar, Salome, Leonel, Poncho y la Sra. Lore) por brindarme su amistad, conocimientos, apoyo, confianza, por su tiempo para escucharme, reírnos de todo y generar un ambiente de familia.

Y a todos mis compañeros de maestría por el ambiente que se generó dentro de las clases, viajes y trabajo, de compañerismo y autoayuda para que todos llegáramos a la meta y culmináramos con éxito este objetivo.

DEDICATORIA

Al universo y a la vida, que por más que se ha vuelto difícil en ocasiones el andar, me han permitido seguir adelante, aprendiendo de mis logros y fracasos.

A mi mamita querida, que aunque nos estés presente físicamente vives eternamente en mis recuerdos y en mi corazón, por haberme apoyado en todo momento, por tus consejos, tus valores, tu amistad, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por tu amor.

A mi papa (Diego Carlos) *y a mis hermanos* (Diego y Karina), por estar siempre presente en mi vida, por cada momento de risas, discusiones o peleas. Que aun que se ponga dura la vida, nos tenemos para seguir adelante.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Virus del moteado atenuado del chile (<i>Pepper mild mottle virus</i> , PMMoV	3
2.1.1. Posición Taxonómica	4
2.1.2. Síntomas y hospedantes del virus PMMoV	4
2.1.3. Características estructurales	5
2.1.4. Importancia económica.....	9
2.1.5. Distribución de PMMoV a nivel internacional	9
2.1.6. Estados productores de chile en México.....	11
2.1.7. Estatus normativo o legal.....	13
2.2. Técnicas de detección y diagnóstico.....	13
2.2.1. Plantas bioindicadoras	13
2.2.2. Microscopia.....	14
2.2.2.1. Inclusiones virales y partículas virales.....	14
2.2.2.2. Microscopia de inmunofluorescencia.....	15
2.2.3. Pruebas serológicas.....	15
2.2.4. Técnicas moleculares.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Material biológico.....	18
3.2. Diseño de oligonucleótidos.....	19
3.2.1. Determinación de la especificidad <i>in silico</i>	22
3.2.2. Determinación de la especificidad <i>in vitro</i>	22

3.2.2.1.	Comprobación del funcionamiento con la temperatura de anillamiento.	22
3.2.2.2.	Especificidad de los oligonucleótidos con otros virus del género <i>Tobamovirus</i>	23
3.2.2.3.	Especificidad de los oligonucleótidos con el virus PMMoV.....	24
3.2.2.4.	Exclusividad de los oligonucleótidos C y E con la matriz.....	25
3.2.2.5.	RT-PCR Multiplex.....	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.	Detección e identificación del virus PMMoV con oligonucleótidos diseñados.....	28
4.1.1.	Especificidad <i>in silico</i>	28
4.1.2.	Especificidad <i>in vitro</i>	31
4.1.2.1.	Funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados con la temperatura de anillamiento.....	31
4.1.2.2.	Especificidad de TMV/CPF y TMV/CPR con especies de <i>Tobamovirus</i>	34
4.1.2.3.	Especificidad de C/C' y E/E' con especies de <i>Tobamovirus</i>	35
4.1.2.4.	Exclusividad de los oligonucleótidos C/C' y E/E' con la matriz.....	37
4.2.	RT-PCR Multiplex.....	39
4.3.	Detección del virus PMMoV en chile habanero con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas.....	41
5.	CONCLUSIONES.....	45
6.	LITERATURA CITADA	46
7.	ANEXO	52

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Estados de mayor producción anual de chile verde (<i>Capsicum annum</i>) en México	12
Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para la detección del virus PMMoV en chile Habanero.....	21
Cuadro 3. Análisis termodinámico de los oligonucleótidos diseñados para la detección del virus PMMoV en chile habanero.....	29

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Síntomas producidos por el virus	5
Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de partículas del virus PMMoV.....	6
Figura 3. Organización del genoma del <i>Virus del mosaico del tabaco</i> (TMV).....	7
Figura 4. Distribución mundial de PMMoV	11
Figura 5. Zonas con mayor producción de chile en México	12
Figura 6. Hoja de chile con síntomas de moteado clorótico y deformación, posiblemente por infección del virus PMMoV	18
Figura 7. Regiones identificadas para el diseño de los oligonucleótidos en el genoma del virus PMMoV.	20
Figura 8. Amplificación de las regiones codificantes de las proteínas 126K, 183K, 30K y 17.5K con los oligonucleótidos diseñados	32
Figura 9. Amplificación de la región que codifica la proteína responsable de la replicación del virus con los oligonucleótido C/C'	33
Figura 10. Amplificación de la región que codifica la proteína de la cápside con los oligonucleótido E/E'.	34
Figura 11. Amplificación de la región que codifica la proteína de la cápside de especies del género <i>Tobamovirus</i> con los oligonucleótidos TMV/CPF y TMV/CPR.	35
Figura 12. Ensayo de especificidad del par C/C' con especies del género <i>Tobamovirus</i>	36
Figura 13. Ensayo de especificidad del par E/E' con especies del género <i>Tobamovirus</i>	36
Figura 14. Ensayo de especificidad del par C/C' con la matriz	38
Figura 15. Ensayo de especificidad del par E/E' con la matriz.....	39
Figura 16. RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C', E/E' y TMV/CPF y TMV/CPR.....	40
Figura 17. RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C', E/E' y TMV/CPF y TMV/CPR.....	40

1. INTRODUCCIÓN

El virus del moteado atenuado del chile (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) ocasiona grandes pérdidas en el cultivo de chile (*Capsicum annuum*). Cuando la incidencia de la enfermedad es alta (80 %), este virus puede ocasionar hasta un 100 % de pérdidas en la producción debido a los síntomas que ocasiona tanto en frutos como en hojas (Green *et.al.*, 1991) En frutos, reducción de tamaño, deformación, moteado amarillo y manchas necróticas hundidas; en hojas, moteado en tonos verde claro y arrugamiento; y retraso en el crecimiento (atrofia) en la planta (CABI, 2019).

El virus PMMoV fue originalmente caracterizado como una cepa latente del virus *Tobacco mosaic virus* (TMV) afectando principalmente el cultivo del chile (Wetter *et al.*, 1984). Actualmente se reconoce como una especie bien caracterizada dentro del género *Tobamovirus* cuyo genoma consta de una molécula de RNA monocatenario de sentido positivo con una longitud de 6357 nucleótidos, organizada en cuatro marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORF) que codifican cuatro proteínas esenciales para su ciclo viral (Tena *et. al.*, 2012).

La distribución del PMMoV se ha descrito en algunos países de América del Norte y Central, África, Australia, Asia y Europa. (CABI, 2019). El virus tiene la capacidad de transmitirse por semillas, el mejor mecanismo de distribución, además de tener alta prevalencia en restos de material vegetal (Lamb, 2001). En la actualidad podemos encontrar como parte de reservorios de este virus el tracto digestivo de animales y humanos (Aguado-García *et.al.*, 2020).

México está posicionado como el líder mundial en la exportación de chiles y pimientos, exportando a 43 países. Sin embargo, para llegar a esta posición es necesario la importación de semillas de chile de China, Japón, Francia, España, Turquía, Holanda, EUA y Hungría. Países donde se encuentra presente el virus PMMoV, y los cuales están regulados bajo el módulo de requisitos fitosanitarios para la importación de semilla.

En etapas jóvenes del cultivo, las plantas enfermas desarrollan síntomas foliares leves (Jarret *et. al.*, 2008) lo que dificulta la detección del virus PMMoV a través del reconocimiento de síntomas característicos. Actualmente, el diagnóstico molecular del virus PMMoV, es a través de una reacción de retrotranscripción (RT) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés)(González-Garza, 2017). Sin embargo, el diagnóstico por reacción RT-PCR, usando solo un juego de oligonucleótidos, tiene el inconveniente de incrementar la probabilidad de obtener falsos resultados, dados por el potencial de mutación del virus y de la alineación de los oligonucleótidos con el genoma de otras especies del género *Tobamovirus* al cual pertenece el virus PMMoV (Moreno *et.al.*, 2015). Por lo que el contar con un set de oligonucleótidos que trabajen en conjunto para la detección oportuna y eficaz del virus PMMoV es deseable a través de una reacción PCR multiplex. La PCR multiplex es una variante de la PCR tradicional, mediante la cual se pueden detectar dos o más fragmentos distintos de DNA blanco en la misma reacción (González-Garza, 2017). Lo anteriormente señalado dio pauta para realizar la presente investigación con las hipótesis y objetivos siguientes.

1.1. Hipótesis

Se contará con al menos dos oligonucleótidos específicos, que se alinean a los sitios estructurales y catalíticos de las secuencias génicas codificantes para detectar e identificar al virus PMMoV en chile habanero en una reacción RT-PCR multiplex.

Los síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas en plantas de chile habanero son inducidos por el virus PMMoV y se podrá detectar con los oligonucleótidos diseñados en este estudio.

1.2 Objetivo general

Diseñar oligonucleótidos específicos e inéditos para la detección e identificación del virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) que puedan ser utilizados en una reacción RT-PCR multiplex para obtener una mayor especificidad y un poder aumentado de detección.

1.2.1 Objetivos específicos

- 1) Diseñar cinco oligonucleótidos específicos e inéditos para la detección e identificación del virus PMMoV que infecte chile habanero (*Capsicum annum*).
- 2) Estandarizar la técnica RT-PCR multiplex para la detección e identificación del virus PMMoV en chile habanero con los oligonucleótidos diseñados.
- 3) Confirmar la presencia del virus PMMoV en hojas de chile habanero con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas con los oligonucleótidos diseñados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Virus del moteado atenuado del chile (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)

El virus PMMoV pertenece al género *Tobamovirus*, de la familia *Virgoviridae*. Los miembros de este género se caracterizan por tener un genoma no segmentado de alrededor de 6.3 a 6.5 kb de longitud, que codifica por lo general cuatro proteínas: una estructural, una involucrada en la replicación del RNA, una relacionada con el movimiento entre células y una de la cápside. Los *Tobamovirus* son virus con partículas en forma de bastón, cilíndricos, rígidos y alargados, con simetría helicoidal (ICTV, 2019), con un diámetro de alrededor de 18 nm y longitud de 300 a 310 nm.

Los *Tobamovirus* generalmente, se transmiten mecánicamente, pero también se pueden transmitir por semilla sin afectar el embrión. Pueden sobrevivir en la savia de la planta, restos de cosechas y en semilla (Melgarejo *et al.*, 2010; Rodríguez, *et al.*, 2004; González *et al.*, 2014). Actualmente, este grupo comprende 37 especies organizadas en cuatro subgrupos informales de acuerdo con sus diferencias en las secuencias genómicas y a la familia que afectan: *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae* y *Solanaceae* (ICTV, 2019).

2.1.1. Posición Taxonómica

Dominio: Riboviria
Reino: Orthornavirae
Phyllum: Kitrinoviricota
Clase: Alsuviricetes
Orden: Martellivirales
Familia: Virgoviridae
Género: *Tobamovirus*
Especie: *Pepper mild mottle virus*
(ICTV, 2019)

2.1.2. Síntomas y hospedantes del virus PMMoV

El virus PMMoV induce la formación de pequeños frutos moteados y deformes que suelen exhibir manchas necróticas hundidas, moteado leve de las hojas y atrofia de las plantas (**Figura 1**). Los síntomas a menudo son más severos en las plantas infectadas a temprana edad. La gravedad de los síntomas depende de la virulencia de la cepa del virus, la tolerancia del cultivo y de los factores ambientales durante el desarrollo del cultivo. El virus no induce inicialmente síntomas conspicuos, por lo que solo puede identificarse de manera confiable mediante procedimientos de diagnóstico molecular (CABI, 2019).

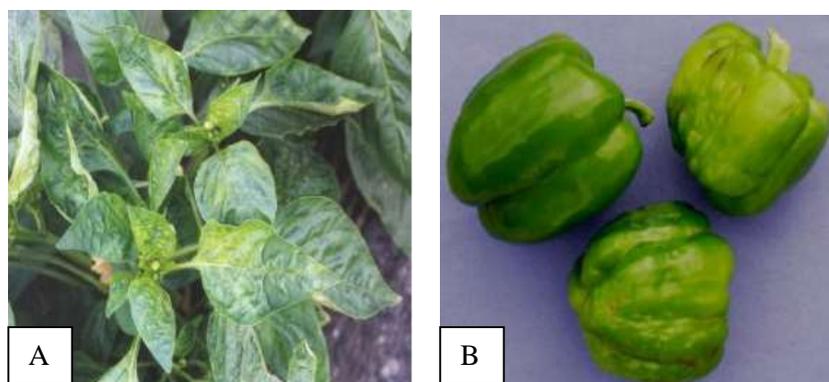


Figura 1. Síntomas producidos por el virus PMMoV. A) En hojas mosaico, moteado verde claro y deformación. B) En frutos reducción de tamaño, moteado amarillo, deformación, abultamiento en la epidermis y manchas necróticas hundidas (DGSV-CNRF, 2011).

Las especies vegetales del género *Capsicum* a las que pertenecen los cultivos de chiles y pimientos (spp.) son los hospedantes más importantes del virus PMMoV. Aunque experimentalmente, puede infectar a 24 especies botánicas de la familia *Solanaceae* y a cinco especies de las familias *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae* y *Plantaginaceae* (Wetter *et al.*, 1984; Avgelis, 1986) así como a *Nicotiana glutinosa*, *N. sylvestris*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, especies en las cuales puede ocasionar una reacción de hipersensibilidad con el desarrollo de lesiones necróticas (Brunt *et al.*, 1996; CABI, 2019).

2.1.3. Características estructurales

El virus PMMoV pertenece al género *Tobamovirus*. Los viriones son rígidos no segmentados (**Figura 2**), con formas de bastón, aproximadamente de 312 x 18 nm, constituidos por 2130 unidades de una molécula polipeptídica, denominada proteína de la cápside de 17 a 18 kDa, distribuidas de forma helicoidal alrededor de una molécula de ARN monocatenario de sentido

positivo. Estos viriones son muy estables en condiciones de invernadero, donde la elevada densidad de plantación y las labores culturales fomentan su diseminación además de poder persistir durante largo tiempo en raíces en el suelo, y herramientas contaminadas (Hull, 2002).

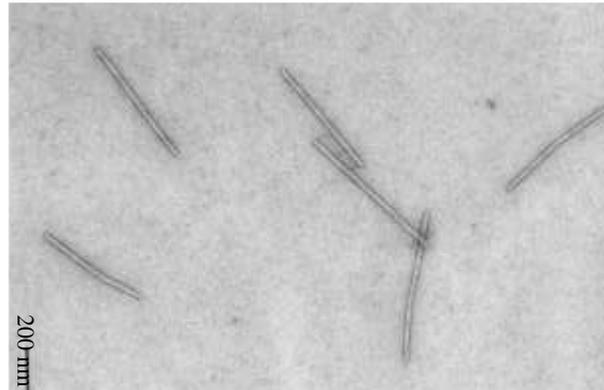


Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de partículas del virus PMMoV (Melgarejo *et al.*, 2010).

El genoma del virus PMMoV cuenta con una secuencia líder de 69 nucleótidos en el extremo 5' denominada fragmento O y una secuencia de 199 nucleótidos en el extremo 3' que adopta una estructura RNA de transferencia (Ávila-Rincón *et al.*, 1989). Su organización genética es similar a la descrita para el virus TMV (**Figura 3**). El RNA está organizado en cuatro marcos de lectura abierta (ORF) que codifican cuatro proteínas diferentes. El primer ORF comienza en el nucleótido 70, se extiende hasta el nucleótido 3423, y codifica una proteína de 1117 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 126 304 Da, denominada 126 kDa la cual contiene los dominios de metiltransferasa (Mtr) y helicasa (Hel) (ICTV, 2019). La supresión de un codón de tipo *amber* (UAG), posibilita la lectura hasta el nucleótido 4908, codificando una proteína de 1612 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 183 340 Da, denominada 183 kDa. Ambas proteínas, 126 y 183 kDa, poseen fragmentos de secuencias similares con las proteínas 126 y 183 kDa del virus TMV las cuales están implicadas en el proceso de replicación viral (Quadt y Jaspars,

1989), por lo que probablemente también estén involucradas en la replicación del virus PMMoV. El tercer ORF comienza en el nucleótido 4909 y termina en el 5682, codifica una proteína de 257 aminoácidos con un peso molecular estimado de 28 347 kDa que posee una alta compatibilidad con la secuencia de la proteína 30 kDa del virus TMV la cual interviene en el movimiento célula a célula del virus a través de los plasmodesmos (Meshi *et al.*, 1987; Deom *et al.*, 1987). Por último, el cuarto ORF que se extiende entre los nucleótidos 5 685 y 6 158 codifica una proteína de 156 aminoácidos con un peso molecular de 17 110 kDa denominada 17.5 kDa la cual forma los capsómeros de la cápside del virus.

En todos los *Tobamovirus* en los que ha sido estudiada la estrategia de replicación viral, las proteínas 126 y 183 kDa se traducen directamente en RNA viral, mientras que las proteínas 30 y 17.5 kDa lo hacen a partir de dos RNA mensajeros subgenómicos 3'coterminales (Palukaitis *et al.*, 1983). Que se sintetizan utilizando como molde las cadenas negativas originadas a partir del RNA genómico en el transcurso de la replicación viral (Hull, 2002).

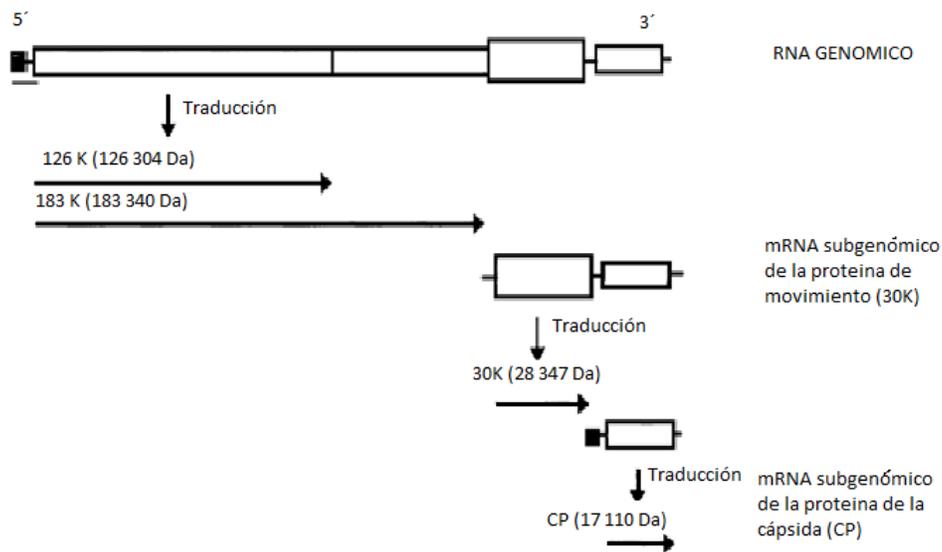


Figura 3. Organización del genoma del *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) (ICTV, 2020).

La proteína 126 kDa tiene en su extremo amino un dominio con actividad metiltransferasa (aminoácido 1 al 494), necesario para la formación de la estructura cap-5' (alteración química en el extremo 5') en los RNA genómicos y subgenómicos (Ahlquist *et al.*, 1985; Dunigan y Zaitlin, 1990; Schuman y Schwer, 1995). En su extremo carboxilo (aminoácido 833 al 1086) presentan un dominio con actividad helicasa necesario para desenrollar los RNA bicatenarios originados durante la replicación viral (Gorbalenya *et al.*, 1989; Goregaoker *et al.*, 2003). Las proteínas helicasas han sido clasificadas en tres superfamilias (SF1, SF2, SF3) (Hodgman, 1988) perteneciendo las helicasas virales de los *Tobamovirus* a la superfamilia SF1, que posee cinco dominios conservados (I, II, III, IV y V) (Kadare, 1997). Además, existen otras funciones del dominio helicasa como el desencadenar la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco con el gen N (Erickson *et al.*, 1999).

Existe una región entre los dominios helicasa y metiltransferasa de las proteínas 126 y 183 kDa la cual no tiene ninguna función específica (Koonin y Dolja, 1993) pero si es conocida su participación en la interacción necesaria para llevar a cabo la replicación entre las proteínas 126 y 183 kDa (Goregaoker *et al.*, 2001). En el año 2005, Liu *et al.*, demostraron que la proteína 126 kDa está implicada en el movimiento intracelular a lo largo de los microfilamentos (Hirashima y Watanabe, 2003). Las proteínas 126 y 183 kDa cumplen funciones independientes al ciclo de infección viral, siendo responsables por ejemplo de los síntomas diferenciales producidos por distintas cepas virales en plantas de Chile (Tena *et al.*, 2012).

La proteína 30 kDa o proteína del movimiento es necesaria para el movimiento célula a célula del virus (Deom *et al.*, 1987; Meshi *et al.*, 1987) a través de los plasmodesmos (pequeños conductos en las paredes celulares que permiten el paso de moléculas entre el citoplasma de células

vegetales vecinas) (Megías *et al.*, 2020). El paso del RNA viral por los plasmodesmos se lleva a cabo tras su interacción con la proteína de movimiento a través de un dominio de unión con ácidos nucleicos facilitando así su desplazamiento (Oparka *et al.*, 1997). Entre otras funciones, la proteína de movimiento de los *Tobamovirus* está implicada en el desarrollo de síntomas en ciertas especies vegetales (Culver, 2002).

La proteína 17.5 kDa de la cápside cumple una función estructural como proteína de cubierta del virus, siendo necesaria para el movimiento a larga distancia debido a que es imprescindible una cubierta funcional para la encapsidación viral (Nelson, 1998).

2.1.4. Importancia económica

El virus PMMoV causa pérdidas de rendimiento considerables (20-30 %) en cultivos de chile cultivados en campo a cielo abiertos y protegidos, así como también pérdidas significativas en la calidad de los frutos (CABI, 2019). La eliminación de plantas infectadas y adyacentes, para minimizar la propagación secundaria de la infección en cultivos protegidos, contribuye a la reducción del rendimiento. Incluso la cepa debilitada utilizada para la protección cruzada en Italia tiene algún efecto debilitante en las plantas protegidas (Cartia *et al.*, 1985). La infección total puede ocurrir en cultivos establecidos en campo, lo que resulta en rendimientos muy reducidos de frutos comercializables (CABI, 2019).

2.1.5. Distribución de PMMoV a nivel internacional

De acuerdo con lo documentado por Brunt *et al.*, (1996) y citado en DGSV-CNRF (2011) el virus PMMoV se encuentra distribuido en poco más de 10 países: Argentina, Australia,

Dinamarca, Francia, Hungría, Islandia, Italia, Japón, Holanda, España. Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica. En contraste, según lo publicado en el CABI (2019) (**Figura 4**) la distribución del PMMoV abarca 35 países: China (Beijing, Hebei, Hubei, Liaoning, Ningxia, Xinjiang), Israel, Japón (Hokkaido, Honshu), República de Corea, Taiwán, Turquía, Egipto, Senegal, Sud África, Tunisia, Zambia, Canadá (British Columbia, Ontario), E.U.A (Colorado, Florida, Georgia, Oregon, Carolina del Sur, Texas), Antigua y Barbuda, Barbados, Haití, Jamaica, Montserrat, Panamá, Santa Lucía, Trinidad y Tobago, Argentina, Brasil (Sao Paulo), Surinam, Venezuela, Bélgica, Bulgaria, República Checa, Dinamarca, Francia, Grecia, Hungría, Islandia, Italia (Sicilia), Holanda, España, Reino Unido, Australia (Nuevo Sur de Gales) y Nueva Zelanda.

Según lo reportado en el CABI, el virus PMMoV se encuentra presente en México. Sin embargo, no se indica la referencia en la que se basa este registro por lo que se considera no fiable por el departamento de análisis de riesgo de plagas, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Este reporte carece de características esenciales que sustenten su identificación o detección en cultivos de Chile. Por ejemplo, no indica quién fue el especialista taxónomo que detectó e identificó al virus, cuál fue el tipo de diagnóstico discriminatorio que se utilizó, la ubicación de dónde y cuándo se tomó la muestra, y en qué documento o publicación se encuentra esta información para poderlo considerar al virus PMMoV presente en el territorio nacional (NIMF 8, 1998).



Figura 4. Distribución mundial del virus PMMoV según el CABI (2019).

2.1.6. Estados productores de chile en México

El chile se produce en prácticamente todo el territorio nacional. Las más de cien variedades se concentran en 22 grupos de chiles verdes y 12 de chiles secos. Entre estas variedades de chile destacan los picantes, como el jalapeño (*Capsicum annuum* L. subsp. *annuum* L. cv. Jalapeño), el poblano (*Capsicum annuum* L. cv. Poblano) y el serrano (*Capsicum annuum* subsp. *acuminatum*); así como algunos considerados dulces, como el morrón (*Capsicum annuum* var. *annuum*,). Sin embargo, el chile verde, es la principal variedad cultivada en el país por volumen y valor de producción (**Cuadro 1**); variedad que se cultiva durante la mayor parte del año. Siendo los estados de Sinaloa, Chihuahua y San Luis Potosí los de mayor producción anual (SIAP, 2019).

Cuadro 1. Estados de mayor producción anual de chile verde (*Capsicum annum*) en México.

Estado	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)	Valor de producción (miles de pesos)
Sinaloa	16 681.62	757 769.05	9 831 515 861
San Luis Potosí	28 419.9	269 038.26	4 872 044 895
Zacatecas	35 445.5	218 173.67	4 350 547 108
Chihuahua	27 800.74	624 996.07	4 228 704 453
Jalisco	4 620.08	150 405.59	1 875 139 688
Sonora	4 523.45	192 365.19	1 831 750 554
Michoacán	4 173.43	131 772.07	1 269 669 702
Baja California Sur	1 529	65 910.29	801 062 733.5
Durango	4 187.22	33 621.46	584 702 389
Total	132 519.93	2 577 197.53	30 933 008 623

Las condiciones de relieve y las características del suelo, la dosis de fertilización, el clima, el agua disponible, entre otros, pueden ser la diferencia entre un producto de calidad y uno para desecho. De manera natural, son aparentemente pocas las zonas que reúnen los requisitos de éxito (**Figura 5**), no obstante, la tecnificación, innovación, experiencia y vocación de los productores han permitido que el cultivo de chile se produzca en la mayor parte del país con altos estándares de calidad (SIAP, 2019).



Figura 5. Zonas con mayor producción de chile en México (SIAP, 2019).

Potencialmente en todas las zonas donde se cultiva el chile es posible el establecimiento del virus PMMoV, siempre y cuando las condiciones ambientales, la variedad del hospedante y la patogenicidad del virus, así lo permitan (Agrios, 1999).

2.1.7. Estatus normativo o legal

En México el virus PMMoV es considerado como una plaga cuarentenaria regulada por el módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de semillas de *Capsicum annum* con origen de China, Tanzania, España, Francia, Hungría, Tailandia, Tanzania, Turquía y Vietnam (MCRF, 2020). Este virus se encuentra dentro del listado de plagas reglamentadas para México (IPPC, 2015).

2.2. Técnicas de detección y diagnóstico

2.2.1 Plantas bioindicadoras

Los síntomas causados por virus en plantas fueron la primera forma de detectar e identificar virus y el nombre de éstos deriva de los síntomas que causan en la planta hospedante como en el caso del *Virus del moteado atenuado del chile* (PMMoV) o el *Virus del mosaico del pepino* (CMV); sin embargo, muchas variantes de un mismo virus producen síntomas muy diferentes o bien diferentes virus producen síntomas muy similares (González-Garza, 2017).

La reacción de hipersensibilidad es un mecanismo de resistencia de la planta al ataque de patógenos. En esta reacción, las células alrededor de donde ha penetrado el patógeno mueren con la finalidad de prevenir su avance e infección. Por ende, la reacción de hipersensibilidad forma parte de los mecanismos de defensa de la planta, siempre que no formen parte del rango de hospedantes del virus (Sazón *et al.*, 2011). Considerando esta reacción, se ha propuesto el uso de

plantas bioindicadoras u hospedantes diferenciales para trabajar con virus puros, observando las diferencias en virulencia de los aislamientos de un virus por las diferencias en los síntomas producidos (González-Garza, 2017).

Los siguientes son hospedantes de diagnóstico útiles *Capsicum annuum*, *C. chacoense*, *C. frutescens*, *C. praetermissum*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris* y *N. tabacum* cvs. White Burley, Xanthi-nc y Samsun. (CABI, 2019).

La utilización de plantas diferenciales infectadas por transmisión mecánica, injerto o vector ha ampliado la capacidad de detectar e identificar muchos de los virus patógenos de las plantas. (García-Luque *et al.*, 1990).

2.2.2 Microscopia

2.2.2.1 Inclusiones y partículas virales

Al observar mediante microscopía óptica se pueden diferenciar alteraciones subcelulares causadas por la infección viral entre las que destacan: reorganización de organelos, inclusiones cristalinas formadas por agrupamientos de partículas o proteínas virales no estructurales, entre otras. Las alteraciones producidas pueden ser características de ciertos grupos virales y con ello se puede orientar el diagnóstico. La observación de las partículas virales (viriones) se lleva a cabo mediante el microscopio electrónico de transmisión. La morfología y dimensiones de los viriones o inclusiones inducidas por virus pueden permitir asignar el virus a un grupo taxonómico. Ambos métodos son lentos y poco específicos (no permite identificar especies virales), se requiere personal experimentado, y en el caso de la microscopía electrónica, el equipo es muy costoso (Rangel, 2014).

2.2.2.2 Microscopia de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que utiliza anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para evidenciar la presencia de una determinada molécula (Brlansky, *et al.* 1982). Esta metodología ha sido usada en la identificación y detección de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos fitopatógenos (EPPO, 2009).

Existen dos tipos de técnicas de inmunofluorescencia: directa e indirecta. La inmunofluorescencia directa utiliza un solo anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula viral y se une a ella directamente. En el caso de utilizarse como técnica de tinción inmunohistoquímica la región donde se deposita la molécula viral puede ser identificada al microscopio de fluorescencia como una zona brillante (Kopke, *et al.*, 2000).

En la inmunofluorescencia indirecta, el anticuerpo primario es detectado por otro anticuerpo que ha sido conjugado con un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (Miller, 1995). La sensibilidad y especificidad obtenidas de las pruebas de inmunofluorescencia en la inmunolocalización de virus fitopatógenos es alta. Además, los resultados de inmunofluorescencia son equiparables a los obtenidos con la prueba de ELISA (Acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Narayanasamy, 2017).

2.2.3. Pruebas serológicas

En la actualidad, la técnica serológica ELISA es la más usada para el diagnóstico rutinario de virus (Hu *et. al.*, 1995, Martín *et. al.*, 2004) ya que su diseño permite el procesamiento de muchas muestras simultáneamente. Esta técnica se basa en la inmovilización de la proteína viral

y su posterior detección mediante anticuerpos conjugados con una enzima, que hidroliza un sustrato dando lugar a un producto coloreado cuya acumulación es proporcional a la de la proteína viral (Rangel, 2014).

Aunque los métodos serológicos son los más usados en diagnóstico y detección de virus, existen ciertas desventajas. La técnica está basada en las propiedades antigénicas de la cubierta proteica (cápside) de los virus, la cual representa aproximadamente solo el 10 % del genoma total del virus y no toma en cuenta el resto del genoma viral (González-Garza, 2017).

2.2.4 Técnicas moleculares

El diagnóstico molecular del virus PMMoV se basa en el método de la retrotranscripción (o transcripción reversa) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones específicas del genoma del virus, mediante una copia de cDNA (DNA complementario) a partir de una región del genoma de RNA del virus, y una reacción subsecuente de PCR.

La PCR multiplex es una variante de la PCR tradicional (punto final), mediante la cual se pueden detectar dos o más fragmentos distintos de DNA blanco en la misma reacción. La amplificación se realiza utilizando dos o más oligonucleótidos y aumentando proporcionalmente los reactivos de la reacción. De esta forma se ahorra tiempo en la detección múltiple de patógenos y se aumenta la especificidad en la detección de patógenos (González-Garza, 2017).

Actualmente, no existen juegos de oligonucleótidos que puedan trabajar en conjunto en una RT-PCR multiplex para la detección del virus PMMoV ya que no cuentan con la misma

temperatura de anillamiento (Mnari-Hattab *et al.*, 2006; Jarret *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016), provocando cierta incertidumbre en los resultados.

México al ser un país importador de múltiples semillas de hortalizas y estas ser consideradas como vías de dispersión de patógenos, la detección oportuna y específica de fitopatógenos es importante para así evitar la introducción de nuevas enfermedades virales que puedan repercutir en la economía nacional. El virus PMMoV es un patógeno que se transmite por esta vía, y se encuentra actualmente regulado por el módulo de requisitos fitosanitario para la importación de productos vegetales (MCRF, 2020).

La información generada en esta investigación a través del diseño de juegos de oligonucleotidos específicos ayudará a disminuir los posibles falsos resultados provocados por el potencial de mutación que tiene el virus PMMoV, o por los actuales oligonucleótidos utilizados para la identificación del virus. Con los oligonucleótidos actualmente disponibles se corre el riesgo de que estos se alineen con secuencias génicas de otras especies del género *Tobamovirus* o del hospedante (Mnari-Hattab *et al.*, 2006). Mediante una reacción RT-PCR multiplex y utilizando varios oligonucleótidos específicos e inéditos, que trabajen a una misma temperatura de anillamiento y que se alineen en sitios catalíticos de las proteínas estructurales, se detectará con mayor confiabilidad y especificidad la identidad del virus cuando se realice el diagnóstico en plantas de Chile y contribuirán a un diagnóstico integral que se lleva a cabo en la SADER.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de virología de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), ubicado en Tecámac, Estado de México.

3.1. Material biológico

Se utilizaron plantas de chile habanero (*Capsicum annum* var. habanero) con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas, inducidos posiblemente por el ataque del virus PMMoV, fueron donadas por la Unidad de Tratamientos Cuarentenarios y crecidas en la celda 1 del invernadero del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para implementarles como referencia y posible fuente de inóculo (**Figura 6**).



Figura 6. Hoja de chile con síntomas de moteado clorótico y deformación, posiblemente por infección del virus PMMoV.

Una muestra positiva al virus PMMoV en chile habanero (QZ) fue proporcionada por el Dr. Andrés Quezada Salinas quien la registró como procedente del municipio de Baca, Yucatán (21.12226 N, -89.36903 W). A partir de esta muestra se prepararon extractos de ácidos nucleicos con el kit comercial SV Total RNA Isolation System Promega®. Esta muestra se distribuyó en alícuotas de 50 µL, con concentración aproximada de 30 ng/µL, y se mantuvo a -20 °C.

También se extrajeron ácidos nucleicos positivos a los virus TMV, ToMV de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), RCNaV en nopal (*Opuntia ficus-indica*) proporcionados por el Dr. Daniel Ochoa Martínez, y se utilizó extracto de ácidos nucleicos de ToBRFV proporcionados por el laboratorio de Virología del CNRF.

3.2. Diseño de oligonucleótidos

De la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se descargaron 13 secuencias de genomas disponibles con tamaño mínimo de 6300 nucleótidos (nt) para el virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (**Anexo**) y para las de las especies más cercanas de *Tobamovirus* que infectan a las solanaceas. Entre las secuencias de *Tobamovirus* se encuentran las de *Bell pepper mottle virus* (BPMoV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV), *Rehmannia mosaic virus* (ReMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV).

Después de ser descargadas, todas las secuencias se alinearon mediante el software BioEdit® v.7.0.9.0 para generar secuencias consenso de cada especie de *Tobamovirus*, incluyendo la del virus PMMoV y localizar sitios conservados.

Considerando que el genoma del virus PMMoV cuenta con cuatro marcos de lectura abiertos primero se separaron estas regiones del genoma para después proceder con la traducción

de los nucleótidos a aminoácidos mediante el portal de recursos ExPASy (<https://www.expasy.org/>). En la **Figura 7** se indican en recuadros en color los cuatro ORF los cuales corresponden a las proteínas codificantes denominadas 126 K, 183 K, 30 K y 17.5 K.

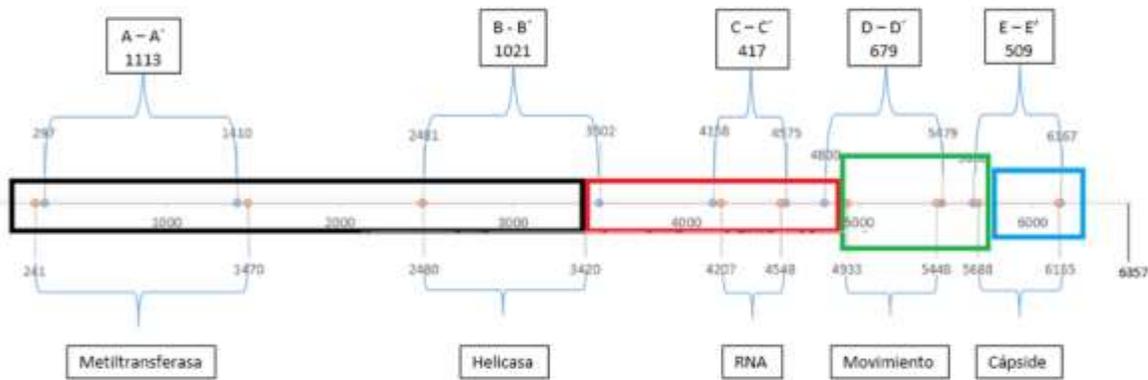


Figura 7. Regiones identificadas para el diseño de los oligonucleótidos en el genoma del virus PMMoV. En los recuadros superiores se indica con letra en mayúscula la clave los oligonucleótidos diseñado y el número de nucleótidos comprendidos, mientras que en las “llaves” inferiores se indican los sitios activos de las proteínas del virus PMMoV.

Para determinar el tipo de proteína resultante e identificar sus dominios, las secuencias aminoacídicas se analizaron en la plataforma InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) y mediante el logaritmo BLASTp (<https://www.uniprot.org/blast/>), para la ubicación de los sitios catalíticos de la proteína y seleccionar los aminoácidos que la conforman. Se determinaron los genes codificantes de la proteína mediante traducción inversa de los aminoácidos, así como el inicio y/o final de cada sitio catalítico.

Con la información de la posición de los nucleótidos codificantes al sitio de la proteína y de las secuencias consenso de las especies de *Tobamovirus*, incluyendo las del virus PMMoV se diseñaron cinco pares de secuencias de nucleótidos (potenciales oligonucleótidos) denominados A-A', B-B', C-C', D-D' y E-E', los cuales amplifican amplicones de 1113, 1021, 417, 679 y 509 pares de bases (pb), respectivamente (**Figura 7, Cuadro 2**).

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para la detección del virus PMMoV en Chile Habanero.

Forward (5' - 3')	Reverse (3' - 5')
A GCA GAA CGC TGT GCA CAG TCT CGC	A' GCC TTA TCC ACA TCC CAC TCT GAG CGC
B GTA GAG TCG CAG TGA GCT CCG AAT CTT TGG TG	B' GCA TGT CAG AAA CAT CTC CTG TTT TTG GTG CTG C
C GCC TAC ACA GAT CGA AGA ATT TTT CTC AGA TCT GGA CTC TAA TGT TCC	C' CCA GAG AAG GTT TGC GCC CTG TTG AAT ATC GG
D CGC TGT CGG TGA GGT TAT TAA AAC CGC ACC	D' CTG TAA GTT CAA CGG GTC CTC CTT CTG ACA CAC
E GGA CGC CGA GTC TTC TTC GTT TTA ACT ATG GCT TAC AC	E' CCA TCA TGT TTA AGG AGT TGT AGC CCA GGT GAG TC

Las cinco regiones se sometieron a análisis mediante el software OligoAnalyzer para determinar la temperatura de fusión (por sus siglas en inglés, T_m: *Melting Temperature*), la relación entre las bases nitrogenadas guanina y citosina (G+C %), la formación de horquillas o estructuras secundarias, la tendencia de autodímeros y heterodímeros, peso molecular, y longitud del oligonucleótido (análisis termodinámico).

3.2.1. Determinación de la especificidad *in silico*

Pruebas *in silico* se generaron para verificar la especificidad y sensibilidad de los cinco juegos de oligonucleótidos A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E'. Para esto generó un alineamiento mediante BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) con poca similitud al virus PMMoV, otro alineamiento dirigido a PMMoV y uno más dirigido a la matriz del tejido vegetal del chile habanero, donde generalmente se localiza el virus. Determinada la especificidad de los oligonucleótidos, estos se mandaron sintetizar a la empresa mexicana Oligo 4T, para establecer las pruebas de funcionalidad *in vitro*.

3.2.2. Determinación de la especificidad *in vitro*

3.2.2.1. Comprobación del funcionamiento con la temperatura de anillamiento

Se verificó la funcionalidad de los oligonucleótidos mediante el establecimiento de reacciones de retrotranscripción (RT) acopladas a la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las mezclas de reacción consistieron en un volumen final de 25 μL : 2.5 μL de amortiguador de PCR 10X, 1.25 de DTT (Dithiothreitol, Invitrogen®) (100 mM), 0.75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL dNTP (10 mM), 1 μL por cada oligonucleótido (10 μM), 0.25 μL de *Taq* polimerasa (5U/ μL , Invitrogen®), 0.5 μL de M-MLV (Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney, M-MLV, Invitrogen®) (200U/ μL), 1 μL de KCl (1 M), 0.5 μL RNaseOUT (40 U/ μL) 1 μL de RNA (30 ng/ μL) y 14.75 μL de agua grado molecular. En cada reacción se incluyeron cinco repeticiones con el RNA del virus PMMoV y agua grado molecular como control negativo.

Las mezclas se procesaron en un termociclador (BioRad, Cabezal Real-Time System, CFX96) con las condiciones de amplificación siguientes. Un ciclo a 50 °C por 30 min, 94 °C por 3

min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 120 s y un ciclo a 72 °C por 5 min.

Un volumen de 10 µL de cada producto amplificado se mezcló con 3 µL de amortiguador de corrida (Naranja G), se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.4 % mezclado con 7 µL GelRed® mediante la aplicación de 90 V por 80 min. Se consideró una amplificación efectiva cuando la banda de cDNA del tamaño molecular esperado se visualizó después de su separación en un fotodocumentador (BioRad, Gel Doc™ EZ Imager).

3.2.2.2. Especificidad de los oligonucleótidos con otros virus del género

Tobamovirus

Con la finalidad de verificar la amplificación a nivel del género *Tobamovirus* se estableció una reacción RT-PCR con extractos de RNA (ácido ribonucleíco) de las especies de *Tobamovirus* TMV, ToMV, RCNaV y ToBRFV, incluyendo el del virus PMMoV y con los oligonucleótidos generales TMV/CPR y TMV/CPF (De la Torre *et al.*, 2007).

Las mezclas de reacción consistieron en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos y volúmenes: 2.5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1.25 de DTT (20 mM), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 2.5 µL dNTP(10 mM), 0.5 µL por cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL, Invitrogen), 1 µL de M-MLV (Invitrogen®) (200U/µL), 1 µL de KCl (1 M), 0.5 µL RNaseOUT (40 U/µL) 2 µL de RNA (30 ng/µL) y 12 µL de agua de grado molecular.

Las mezclas se procesaron en un termociclador (BioRad, Cabezal Real-Time System, CFX96) con las siguientes condiciones de amplificación: Un ciclo a 42 °C por 90 min, seguido de 31 ciclos a 95 °C por 2 min, 56 °C por 2 min y 72 °C por 2 min.

En cada reacción se incluyeron dos repeticiones con el RNA del virus PMMoV como control positivo y agua grado molecular como control negativo. Se consideró una amplificación efectiva cuando se obtuvo un amplicón de 250 pb después de la electroforesis en un fotodocumentador (BioRad, Gel DocTM EZ Imager).

3.2.2.3. Especificidad de los oligonucleótidos con el virus PMMoV

Se estableció una nueva reacción de RT-PCR con una mezcla como la que se describió anteriormente con los extractos de RNA de las especies de los *Tobamovirus* pero ahora con los oligonucleótidos C/C' y E/E' diseñados en este estudio para corroborar su especificidad. En cada reacción se consideraron por duplicado muestras de RNA de los virus TMV, ToMV, RCNaV, ToBRFV y PMMoV y agua grado molecular, como control negativo.

Las mezclas de reacción consistieron en un volumen final de 25 μ L con los siguientes reactivos y volúmenes: 2.5 μ L de amortiguador de PCR 10X, 1.25 de DTT (100 mM), 0.75 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ L dNTP (10 mM), 1 μ L por cada oligonucleótido (10 μ M), 0.25 μ L de *Taq* polimerasa (5 U/ μ L, Invitrogen®), 0.5 μ L de M-MLV (200 U/ μ L), 1 μ L de KCl (1 M), 0.5 μ L RNaseOUT (40 U/ μ L) 1 μ L de RNA (30 ng/ μ L) y 14.75 μ L de agua grado PCR. En cada reacción se incluyeron cinco repeticiones con el RNA del virus PMMoV y agua grado molecular como control negativo.

Las mezclas se procesaron en un termociclador (BioRad, Cabezal Real-Time System, CFX96) con las condiciones de amplificación siguientes. Un ciclo a 50 °C por 30 min, 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 120 s y un ciclo a 72 °C por 5 min.

Se consideró una amplificación efectiva al obtener un amplicón visible de 417 pb con los oligonucleótidos C/C' y otro de 509 pb con el par E/E' después de la electroforesis en un fotodocumentador (BioRad, Gel DocTM EZ Imager).

3.2.2.4. Exclusividad de los oligonucleótidos C y E con la matriz

Se establecieron reacciones de RT-PCR para determinar la exclusividad de los oligonucleótidos diseñados C/C' y E/E'. Las reacciones se establecieron con muestras de extracto de tejido (matriz) de: chile manzano (*Capsicum pubescens*), chile piquín (*Capsicum annuum* var. Pequin), chile pimienta (*Capsicum annuum*), chile habanero (*Capsicum chinense*) “sano”, chile habanero “con síntomas de enfermedad” y chile habanero (*Capsicum chinense*) procedente de Yucatán (QZ).

Las mezclas de reacción consistieron en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos y volúmenes: 2.5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1.25 de DTT (100 mM), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL dNTP (10 mM), 1 µL por cada oligonucleótido (10 µM), 0.25 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL, Invitrogen®), 0.5 µL de M-MLV (200 U/µL), 1 µL de KCl (1 M), 0.5 µL RNaseOUT (40 U/µL) 1 µL de RNA (30 ng/µL) y 14.75 µL de agua grado molecular. En cada reacción se consideraron por duplicado muestras de los extractos vegetales, de agua grado molecular y del virus PMMoV, como control positivo.

Las mezclas resultantes se procesaron en un termociclador (BioRad, Cabezal Real-Time System, CFX96) con las condiciones de amplificación siguientes. Un ciclo a 50 °C por 30 min, 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 120 s y un ciclo a 72 °C por 5 min.

Los ácidos nucleicos de la matriz (hoja) se obtuvieron con el siguiente método de extracción del kit comercial SV Total RNA Isolation System Promega®. Se utilizaron 100 mg de tejido vegetal, el cual se cortó finamente y se colocó en un tubo de 2 mL con 584 µL de buffer Lysis RNA (RLA) (+BME, β-Mercaptoethanol) y se mezcló por inversión, posteriormente se le añadió 350 µL de buffer de elución de RNA (RDA, azul). Posteriormente se centrifugó a 14000 rcf durante 10 min y aproximadamente 500 µL del sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, en el cual se le añadió 200 µL de etanol al 95 %. La mezcla se transfirió a la columna de separación (spin) y se centrifugó a 14 000 rcf durante un minuto. Se le adiciono 600 µL de solución de lavado RNA (RWA) (etanol +) y se volvió a centrifugar a 14 000 rcf durante un minuto. Posteriormente, se le adicionaron 50 µL de la mezcla de DNasa (40 µL de amortiguador amarillo Core, 5 µL de MnCl₂ al 0.09 M. y 5 µL de DNasa I, por cada muestra) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para detener la acción de la DNasa se agregó 200 µL de DNasa solución stop (DNA)(etanol+) y se centrifugó durante un minuto a 14 000 rcf. Después de este paso se dieron dos lavados con RNA (RWA) (etanol +); el primero con 600 µL seguido de una centrifugación de 14 000 rcf durante un minuto, y el segundo con 250 µL seguido de una centrifugación de 14 000 rcf durante dos minutos. Finalmente se añadió 50 µL de agua libre de nucleasas en dos tiempos y se centrifugó a 14 000 rcf durante un minuto para eluir el RNA. Los ácidos nucleicos de la matriz se mantuvieron a -20 °C y se utilizaron inmediatamente después de haberse obtenido.

3.2.2.5. RT-PCR Multiplex

Con la finalidad de estandarizar la técnica RT-PCR múltiplex para la detección e identificación del virus PMMoV en chile habanero con los oligonucleótidos diseñados C/C' y E/E'

en conjunto con los oligonucleótidos TMV/CPR y TMV/CPF se establecieron reacciones con mezclas consistentes en un volumen final de 25 μL : 2.5 μL de amortiguador de PCR 10X, 1.25 de DTT (100 mM), 0.75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.75 μL dNTP (10 mM), 0.6 μL por cada oligonucleótido *Forward* (10 μM), 0.75 μL por cada oligonucleótido *Reverse* (10 μM), 0.7 μL de *Taq* polimerasa (5 U/ μL , Invitrogen), 0.5 μL de M-MLV (200 U/ μL), 1 μL de KCl (1 M), 0.5 μL RNaseOUT (40 U/ μL), 1 μL de RNA (30 ng/ μL) y 12 μL de agua grado PCR. El programa de termociclaje para los tres oligonucleótidos funcionando en conjunto fue el siguiente. Un ciclo a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ por 120 s y un ciclo a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Se consideraron por duplicado muestras de las especies de virus TMV, ToMV, RCNaV, ToBRFV (*Tobamovirus*), de extracto de hoja de chile habanero como control negativo, agua grado molecular y muestras del virus PMMoV, como control positivo.

Las reacciones anteriores se establecieron nuevamente bajo las mismas condiciones para confirmar los resultados con los oligonucleótidos diseñados C/C' y E/E' en conjunto con el par TMV/CPR en la mezcla de la reacción RT-PCR directamente. Se incluyeron cuatro muestras de inóculo de PMMoV (repeticiones) y dos de agua grado molecular. Se consideró una amplificación efectiva cuando se visualizaron claramente tres bandas: una de 250 pb (TMV/CPR), otra de 417 pb (C/C') y una más de 509 pb (E/E') después de la electroforesis en un fotodocumentador (BioRad, Gel DocTM EZ Imager).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Detección e identificación del virus PMMoV con oligonucleótidos diseñados

4.1.1 Especificidad *in silico*

El análisis de los resultados *in silico* mostró que los oligonucleótidos diseñados A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E', los cuales amplifican regiones de 1113, 1021, 417, 679 y 509 pb, respectivamente, son específicos para el virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y estables a las condiciones de PCR. Para el diseño de estos oligonucleótidos se tomó como base 13 secuencias del genoma del virus PMMoV y las secuencias de las especies del género *Tobamovirus*: *Bell pepper mottle virus* (BPMoV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV), *Rehmannia mosaic virus* (ReMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) así como los sitios conservados de las proteínas codificantes denominadas 126K, 183K, 30K y 17.5K, y las propiedades fisicoquímicas preestablecidas (**Cuadro 3**).

En el diseño de oligonucleótidos es importante considerar el contenido de las bases nitrogenadas citosina y guanina, el cual debe estar entre 40 y 60 %. En este estudio, en el diseño de los oligonucleótidos se consideró no solo este porcentaje en el contenido de citosina y guanina, en todas las secuencias de los oligonucleótidos, sino también las temperaturas de anillamiento de los oligonucleótidos, las cuales se encontraron en el intervalo de 52 a 58 °C, para obtener mejores resultados (Rodríguez-Mendoza, 2018).

Cuadro 3. Análisis termodinámico de los oligonucleótidos diseñados para la detección del virus PMMoV en chile habanero.

Oligonucleótido (5' - 3')	Tm °C	G/C %	Horquillas ΔG , °C	Autodímeros n (ΔG)	Heterodímeros n (ΔG)	Peso molecular g/mol	Tamaño pb
A (24 nucleótidos) GCA GAA CGC TGT GCA CAG TCT CGC	64.6	62.5	(-1.5, 39.7) (-1.2, 37.8) (-0.75, 34.1) (-0.74, 34.2)	19 (-16.84, 1.34)	24 (-8.35,-1.57)	7338.8	1113
A' (27 nucleótidos) GCC TTA TCC ACA TCC CAC TCT GAG CGC	64.5	59.3	(0.54, 17.1) (0.67, 9.8) (0.8, 7.5) (0.91, 4.7) (1.22, 3.2) (1.23, -2.4)	18 (-9.89, -0.96)		8116.3	
B (32 nucleótidos) GTA GAG TCG CAG TGA GCT CCG AAT CTT TGG TG	64.2	53.1	(-3.49, 47.8)	21 (-9.49, -0.96)	32 (-6.69,-1.34)	9911.4	1021
B' (34 nucleótidos) GCA TGT CAG AAA CAT CTC CTG TTT TTG GTG CTG C	64.0	47.1	(-2.58, 40.5) (-2.23, 34.1) (-1.5, 32.2)	23 (-7.18, -1.34)		10 414.8	
C (30 nucleótidos) CGC TGT CGG TGA GGT TAT TAA AAC CGC ACC	64.1	53.3	(-6.08, 58.3) (-3.85, 43.8)	21 (-8.02, -1.34)	25 (-6.68,-1.34)	9207	417
C' (33 nucleótidos) CTG TAA GTT CAA CGG GTC CTC CTT CTG ACA CAC	63.9	51.5	(-0.63, 31.7) (-0.55, 32.2) (0.32, 22.6)	24 (-3.61, -0.96)		10 024.5	

Símbolos o abreviaciones indican: °C, grados centígrados; n, número; ΔG (Delta G), energía libre de la secuencia de oligo que se une a su complemento perfecto; y pb, pares de bases.

Cuadro 3. Análisis termodinámico de los oligonucleótido (**Continuación**).

Oligonucleótido (5' - 3')	T _m °C	G/C %	Horquillas ΔG, °C	Autodímeros n (ΔG)	Heterodímeros n (ΔG)	Peso molecular g/mol	Tamaño pb
D (38 nucleótidos) GGA CGC CGA GTC TTC TTC GTT TTA ACT ATG GCT TAC AC	64.4	47.4	(-1.67, 42.1) (-1.5, 33.6) (-1.3, 34.1) (-1.05, 31.1) (-0.71, 32.2)	29 (-6.21, -0.96)	36 (-7.81, -0.96)	11 610.6	679
D' (36 nucleótidos) CCA TCA TGT TTA AGG AGT TGT AGC CCA GGT GAG TCC	64.7	50	(-0.22, -28.7) (0.17, 22.7) (0.33, 21.8) (0.39, 21.2) (0.74, 18.5)	24 (-5.38, -0.96)		11 091.2	
E (48 nucleótidos) GCC TAC ACA GAT CGA AGA RTT TTT CTC AGA TCT GGA YTC TAA TGT TCC	64.5	41.7	(-4.17, 43.3) (-2.71, 37) (-2.13, 34.5)	51 (-11.73, -0.96)	44 (-8.2, -0.96)	14 692.1	509
E' (32 nucleótidos) CCA GAG AAG GTT TGC GCC CTG TTG AAT ATC GG	64.9	53.1	(-0.06, 26) (0.15, 2.5) (0.32, 20.9) (0.68, 12.2)	26 (-9.89, -1.47)		9880.4	

Símbolos o abreviaciones indican: °C, grados centígrados; n, número; ΔG (Delta G), energía libre de la secuencia de oligonucleótido que se une a su complemento perfecto; y pb, pares de bases

.Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo al ser específicos amplifican las regiones conservadas del virus PMMoV, como son las de la proteína RNA polimerasa dependiente del RNA (RdRp, *RNA dependent RNA polymerase*), responsable de la replicación del virus y proteína de la cápside. El uso de oligonucleótidos degenerados, como TMV/CPF (5'-GCI YTI GGI AAY CAR TTY CAR ACI CAR CA-3') y TMV/CPR (5'-IGC RTC IAR IGT YTC IGC IGT IGT IGG RTT-3') propuestos por De la Torre (2007) y, TobamodF (5'-TKG AYG GNG TBC CNG GNT GYG G-3') y TobamodR (5'-ACN GAV TBN ABC TGT AAT TGC TAT-3') por Li (2018), aunque muestran alta eficiencia de amplificación solo dan indicios sobre las diferentes especies del género *Tobamovirus* al que corresponde el virus PMMoV.

4.1.2. Especificidad *in vitro*

4.1.2.1 Funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados con la temperatura de anillamiento.

En la **Figura 3** se presentan los resultados de la prueba establecida para comprobar el funcionamiento de los oligonucleótidos A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E', en reacciones RT-PCR con temperatura de anillamiento de 64 °C, preestablecida durante el diseño, para amplificar las regiones de los sitios catalíticos de las proteínas del virus PMMoV. Con excepción de la reacción establecida con el oligonucleótido D/D' y con una de las repeticiones del oligonucleótido E/E', con todos los oligonucleótidos diseñados se registraron bandas. Sin embargo, solamente las bandas correspondientes a los oligonucleótidos C/C' y E/E' correspondieron con los amplicones esperados de 417 y 509 pb, respectivamente (**Figura 8C, E**). En contraste, las bandas obtenidas con los oligonucleótidos A/A' y B/B' registraron menor tamaño al de los amplicones esperados de 1113

y 1021 pb (**Figura 8A, B**). Con el oligonucleótido D/D' y con la repetición 4 del oligonucleótido E/E' no se obtuvo ninguna banda con el RNA del virus PMMoV. Estos resultados indicaron que la temperatura de anillamiento de 64 °C funcionó bien pero solamente para los oligonucleótidos C/C' y E/E'. En contraste esta temperatura no fue la adecuada para los oligonucleótidos A/A', B/B' y D/D' por lo que se requieren establecer más pruebas para estandarizar la temperatura de anillamiento de estos oligonucleótidos. Rodríguez-Mendoza (2018) sugiere que la temperatura de anillamiento debe de estar 5 °C por debajo de la temperatura de fusión para obtener óptimos resultados. Por otra parte, la no amplificación de la región con la repetición 4 del oligonucleótido E/E' podría deberse a un error durante la preparación de la reacción relacionado con la no adición del extracto de RNA del virus debido a que con las repeticiones restantes de este oligonucleótido si se obtuvo la banda esperada de 417 pb del amplicón (**Figura 8E**).

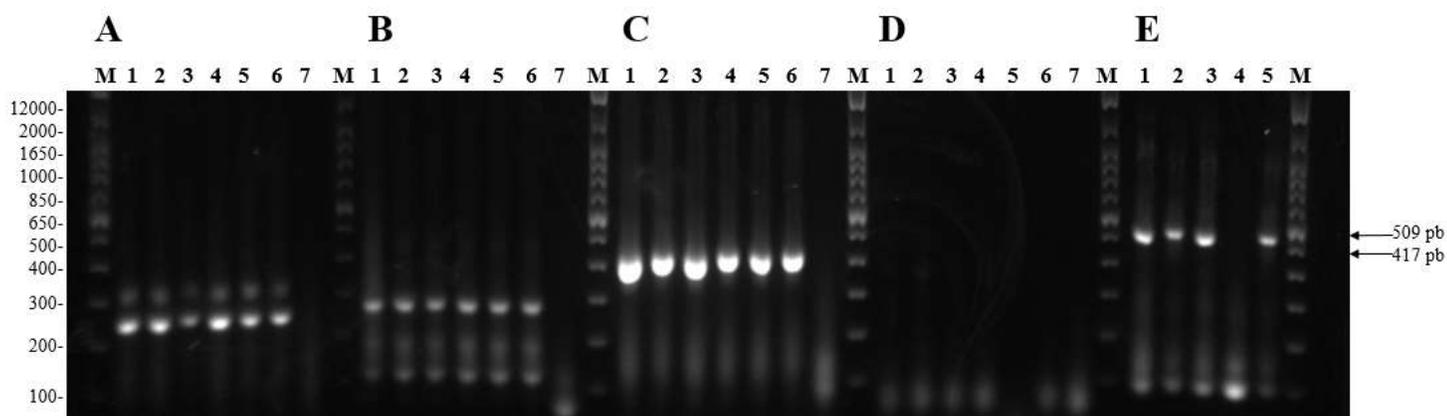


Figura 8. Amplificación de las regiones codificantes de las proteínas 126K, 183K, 30K y 17.5K con los oligonucleótidos diseñados en este estudio, en reacciones RT-PCR con temperatura de anillamiento de 64 °C. Donde A, B, C, D y E corresponden a los resultados de las reacciones establecidas con los oligonucleotidos A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E', respectivamente. M, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); 1-6, aislado de virus PMMoV; 7, agua grado biología molecular (control negativo).

En la **Figura 9** se observan las bandas correspondientes al amplicón de 417 pb del gen de la proteína RdRp, responsable de la replicación del virus; y en la **Figura 10**, las del amplicón de 509 pb del gen para la proteína de la cápside, obtenidas con los oligonucleótidos C/C' y E/E', respectivamente. Estos amplicones se obtuvieron en una reacción RT-PCR con temperatura de anillamiento óptima de 64 °C por 30 s lo que indica que los oligonucleótidos C/C' y E/E' tienen potencial para ser usados en una RT-PCR multiplex.

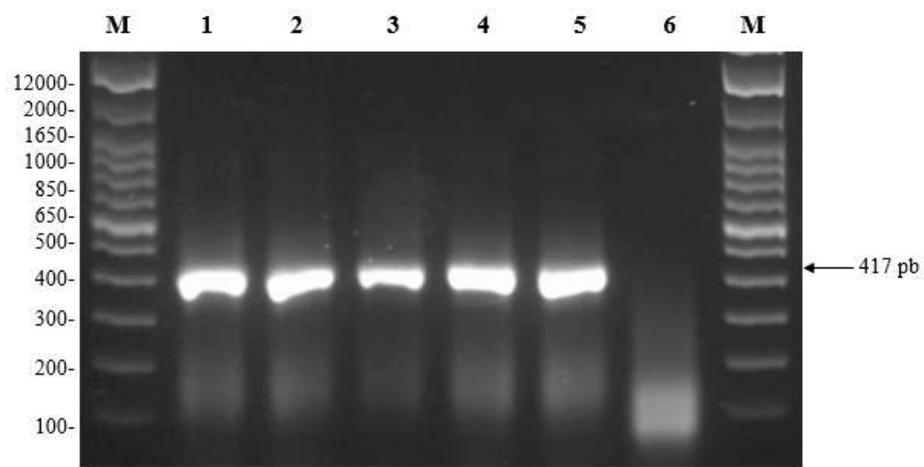


Figura 9. Amplificación de la región que codifica la proteína responsable de la replicación del virus con el oligonucleótido C/C'. Carriles: **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); **1-5**, aislado de virus PMMoV; **6**, agua grado biología molecular (control negativo).

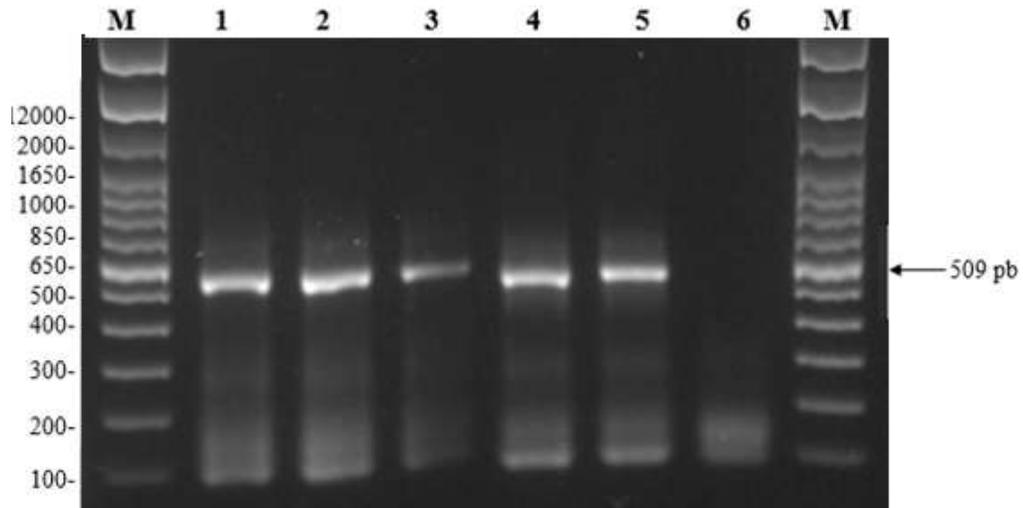


Figura 10. Amplificación de la región que codifica la proteína de la cápside con el oligonucleótido E/E'. M, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); 1-5, aislado de virus PMMoV; 6, agua grado biología molecular (control negativo).

4.1.2.2. Especificidad de TMV/CPF y TMV/CPR con especies de *Tobamovirus*

En la **Figura 11** se observa la banda del amplicón de 250 pb obtenida con los oligonucleótidos generales TMV/CPF y TMV/CPR para los virus TMV, ToMV, RCNaV, ToBRFV y PMMoV. Con excepción de una de las dos repeticiones de la muestra del virus ToBRFV, con todas las muestras se obtuvo el amplicón esperado. Este resultado verifica la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de la cápside presente en las especies TMV, ToMV, CNaV, ToBRFV y PMMoV del grupo de *Tobamovirus* aquí analizadas. Lo anterior indica que los oligonucleótidos generales TMV/CPF y TMV/CPR, propuestos por De la Torre, *et al* (2007), permiten identificar, pero solo a nivel de género *Tobamovirus* cuando se utilizan en reacciones RT-PCR para analizar tejido infectado o extractos vegetales infectados con las especies pertenecientes a este género.

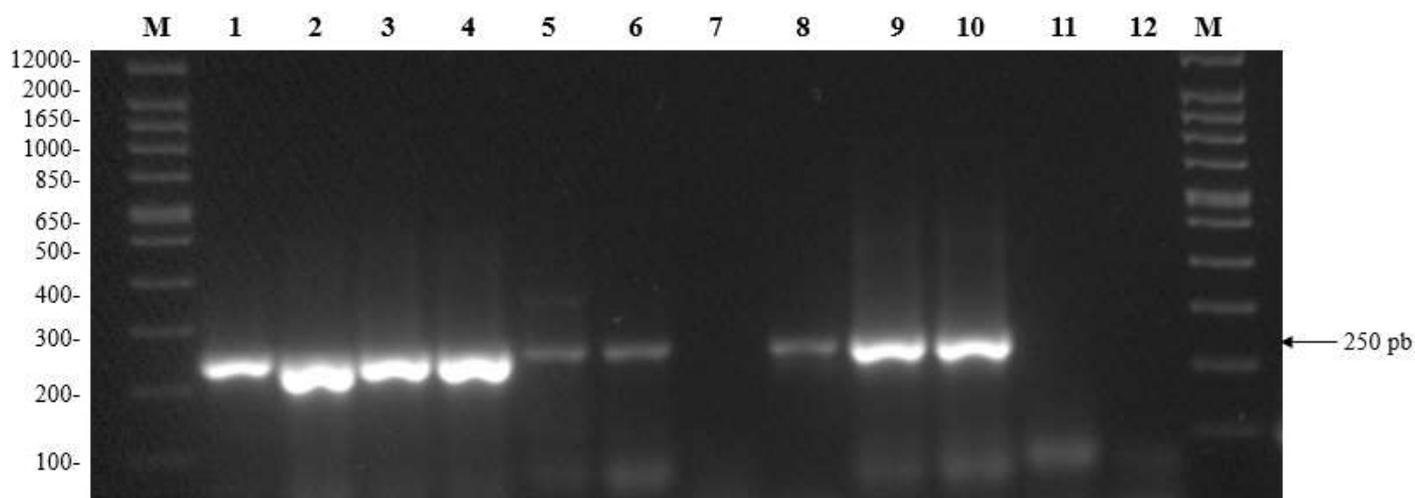


Figura 11. Amplificación de la región que codifica la proteína de la cápside de especies del género *Tobamovirus* con los oligonucleótidos TMV/CPF y TMV/CPR. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); **1-2**, TMV; **3-4**, ToMV; **5-6**, RCNaV; **7-8**, ToBRFV; **9-10**, aislado de virus PMMoV; **11-12**, agua grado biología molecular (control negativo).

4.1.2.3. Especificidad de C/C' y E/E' con especies de *Tobamovirus*

En la reacción RT-PCR establecida con los oligonucleótidos C/C' y E/E', con excepción de las muestras del virus PMMoV, no se observó ninguna banda correspondiente a los amplicones esperados con las muestras de material infectado con los virus TMV, ToMV, RCNaV y ToBRFV. En las **Figuras 12 y 13** se observan las bandas correspondientes a los amplicones de 417 y 509 pb obtenidas con los oligonucleótidos C/C' y E/E', respectivamente. Estos amplicones coincidieron en tamaño con los fragmentos esperados cuando se diseñaron los oligonucleótidos. Los resultados aquí obtenidos indican que oligonucleótidos C/C' y E/E' son específicos para el virus PMMoV.

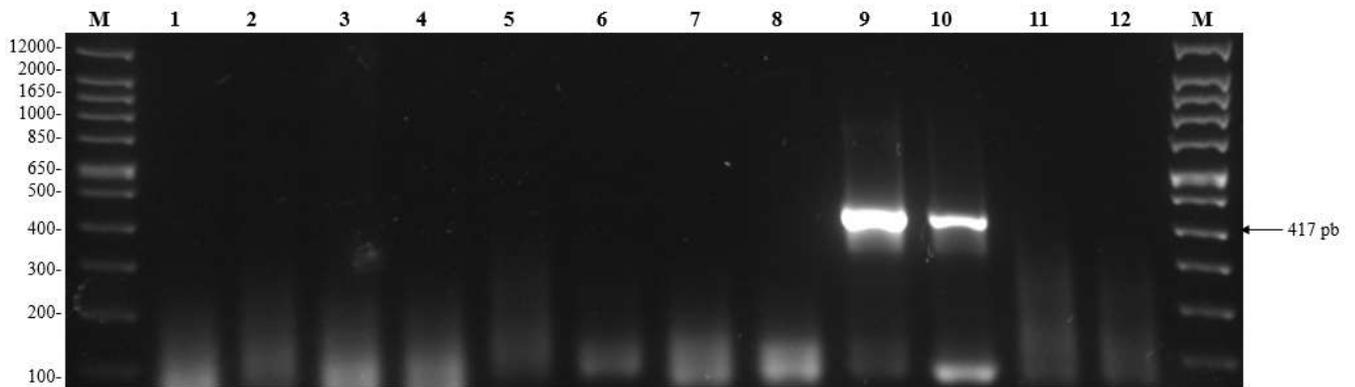


Figura 12. Ensayo de especificidad del par C/C' con especies del género *Tobamovirus*. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control negativo: **1-2** TMV; **3-4**, ToMV; **5-6**, RCNaV; **7-8**, ToBRFV; **9-10**, control positivo: aislado de virus PMMoV; **11-12**, agua grado biología molecular.

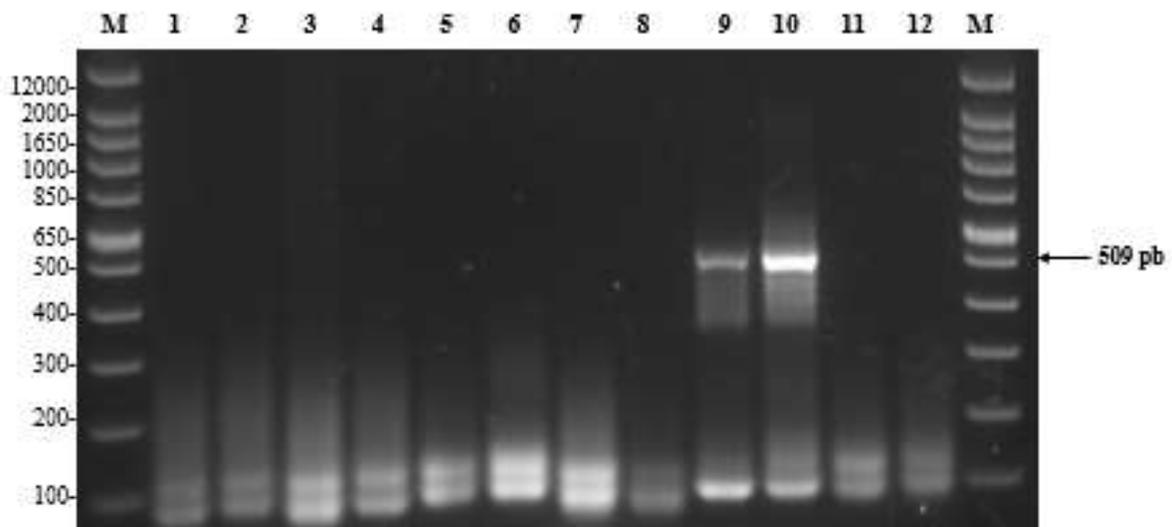


Figura 13. Ensayo de especificidad del par E/E' con especies del género *Tobamovirus*. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control negativo: **1-2**, TMV; **3-4**, ToMV; **5-6**, RCNaV; **7-8**, ToBRFV; **9-10**, control positivo: aislado de virus de PMMoV; **11-12**, agua grado biología molecular.

La presencia de bandas borrosas en los carriles correspondientes a los virus del género *Tobamovirus*, exceptuando a PMMoV, visualizadas en la **Figura 13** puede estar relacionada con

diferentes factores. Por ejemplo, con la concentración, el nivel de pureza o bien con el estado físico (degradación) del RNA empleado en el establecimiento de las reacciones de RT-PCR. Por lo anterior, se sugiere para estudios futuros considerar estos factores.

En el diseño de los oligonucleótidos de este trabajo se tomaron en cuenta las regiones más conservadas del virus PMMoV correspondientes a los sitios catalíticos de las proteínas RdRP, responsable de la replicación, y de la cápside. Estas regiones también fueron consideradas por Rodríguez-Mendoza (2019) en el diseño de los oligonucleótidos específicos ToBRFV-FMX (5'-AAC CAG AGT CTT CCT ATA CTC GGA A-3') y ToBRFV-RMX (5'-CTC WCC ATC TCT TAA TAA TCT CCT -3') para la identificación de ToBRFV. Lo anterior sugiere que estas regiones conservadas del virus PMMoV son especie-específicas.

4.1.2.4. Exclusividad de los oligonucleótidos C/C' y E/E' con la matriz

En las reacciones de RT-PCR establecidas para determinar la exclusividad de los oligonucleótidos diseñados C/C' y E/E' con el tejido vegetal (matriz) no se obtuvo ningún amplicón con las muestras de extracto de hoja de chile manzano, chile piquín, chile pimienta, chile habanero "sano", chile habanero "enfermo" y chile habanero QZ (**Figuras 14 y 15**). En contraste, con las muestras del aislado del virus PMMoV se obtuvieron bandas correspondientes a amplicones de 417 y 509 pb con los oligonucleótidos C/C' y E/E', respectivamente (**Figuras 14 y 15**). Los resultados aquí obtenidos indican que no existe especificidad entre los oligonucleótidos C/C' y E/E' y la matriz vegetal de las especies probadas.

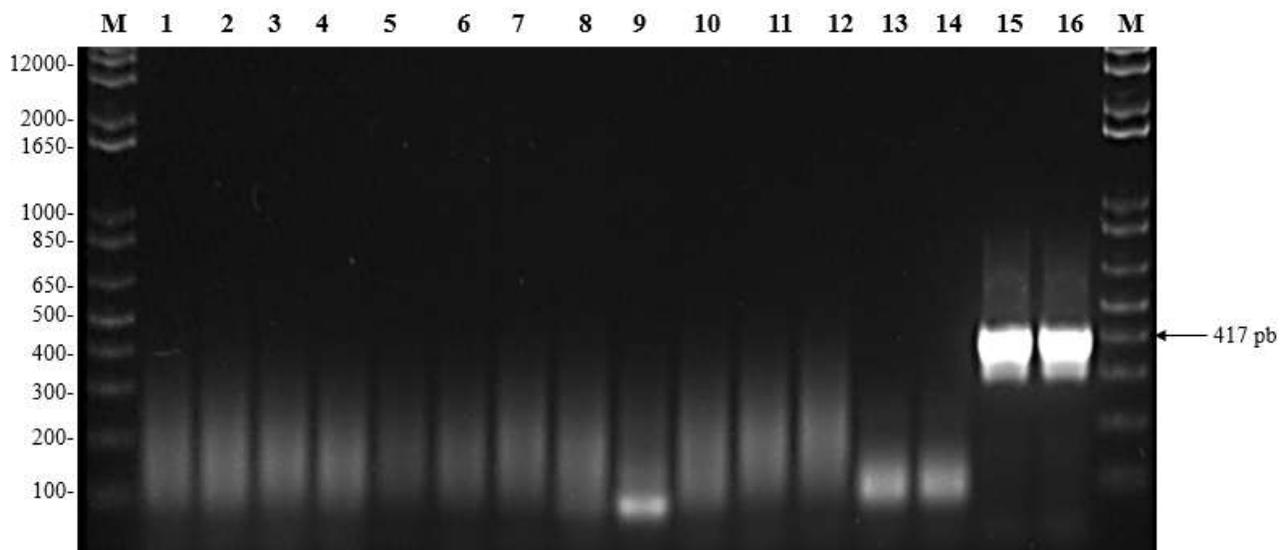


Figura 14. Ensayo de especificidad del par C/C' con la matriz. M, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control negativo: **1-2**, chile manzano; **3-4**, chile piquín; **5-6**, chile pimiento; **7-8**, chile habanero “sano”; **9-10**, chile habanero “enfermo”; **11-12**, chile habanero QZ; **13-14** agua grado biología molecular; control positivo: **15-16**, aislado de virus de PMMoV.

Cabe señalar que las muestras del aislado del virus PMMoV se incluyeron como control positivo al no contarse con extracto de plantas de chile habanero infectadas con el virus PMMoV (verdadero control positivo). Por lo que son requeridos ensayos futuros en los que se incluya la matriz vegetal obtenida de plantas de chile infectadas con el virus PMMoV para confirmar la especificidad de los oligonucleótidos C/C' y E/E' aquí diseñados (Cortazar-Martínez, 2004).

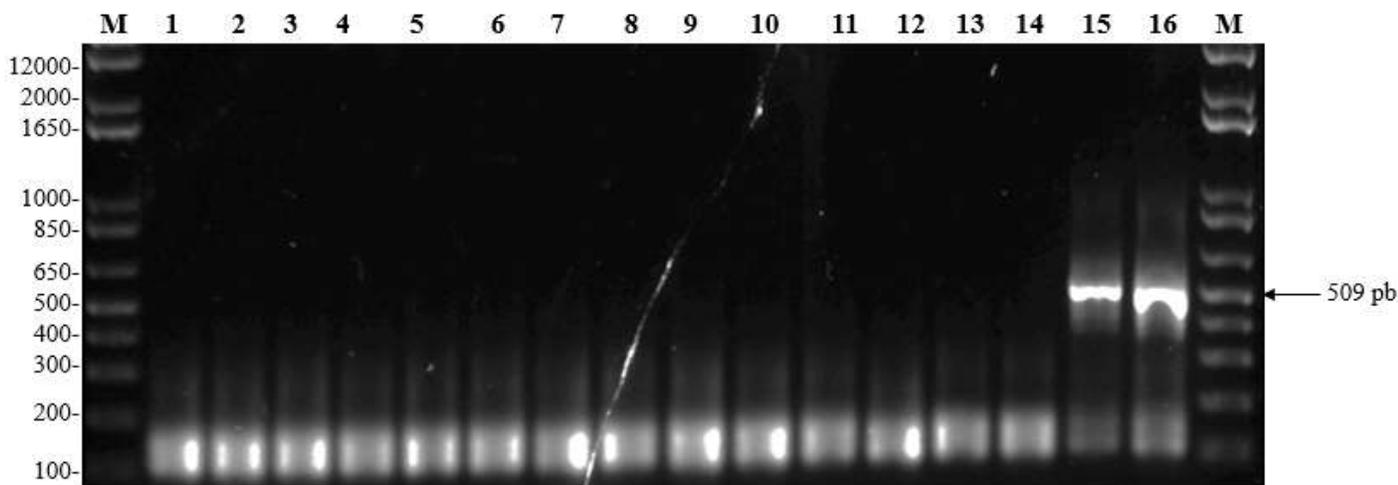


Figura 15. Ensayo de especificidad del par E/E' con la matriz. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control negativo: **1-2**, chile manzano; **3-4** chile piquín; **5-6**, chile pimienta; **7-8**; chile habanero “sano”; **9-10**, chile habanero “enfermo”; **11-12** chile habanero QZ; **13-14**, agua grado biología molecular; **15-16**, control positivo: aislado de virus de PMMoV

4.2. RT-PCR Multiplex

En las reacciones de RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C' y E/E', diseñados en este estudio, y TMV/CPF y TMV/CPR (De la Torre, *et al.* 2007), establecidas con temperatura de anillamiento de 64 °C, se obtuvieron tres bandas con tamaño de amplicón de 417, 509 y 250 pb, respectivamente, pero solo para las muestras correspondientes al aislado del virus PMMoV, incluido como control positivo (**Figuras 16 y 17**). Ninguna banda se registró con las muestras de extractos de RNA de las especies del género *Tobamovirus*: TMV, ToMV, RCNaV y ToBRFV ni del extracto de hoja sana de chile habanero, incluidas como controles negativos (**Figuras 16 y 17**).

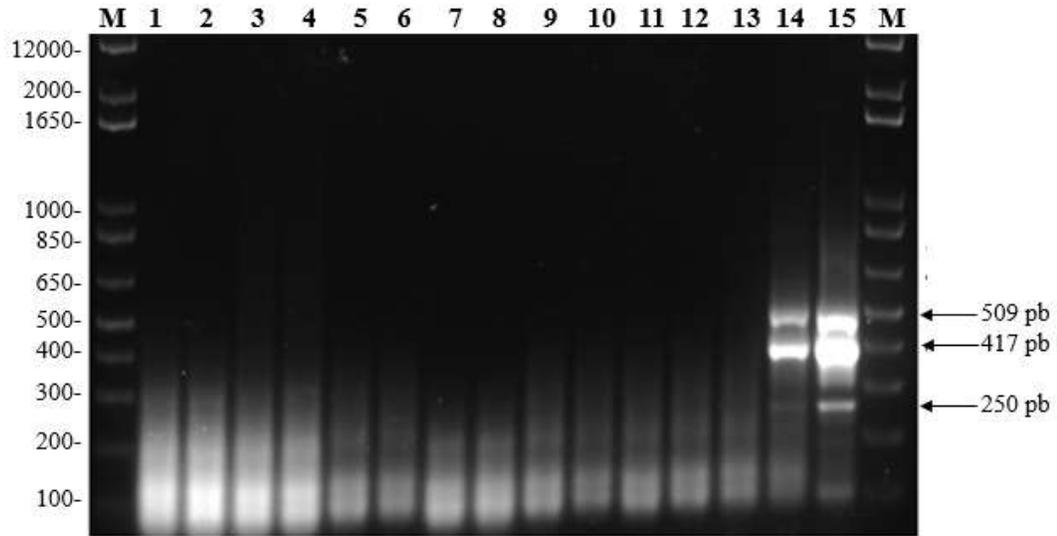


Figura 16. RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C', E/E' y TMV/CPF y TMV/CPR. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control negativo: **1-2**, TMV; **3-4**, ToMV; **5-6**, RCNaV; **7-8**, ToBRFV; **9-11**, chile habanero sano; **12-13**, agua grado biología molecular; **14-15**, control positivo: aislado de virus de PMMoV.

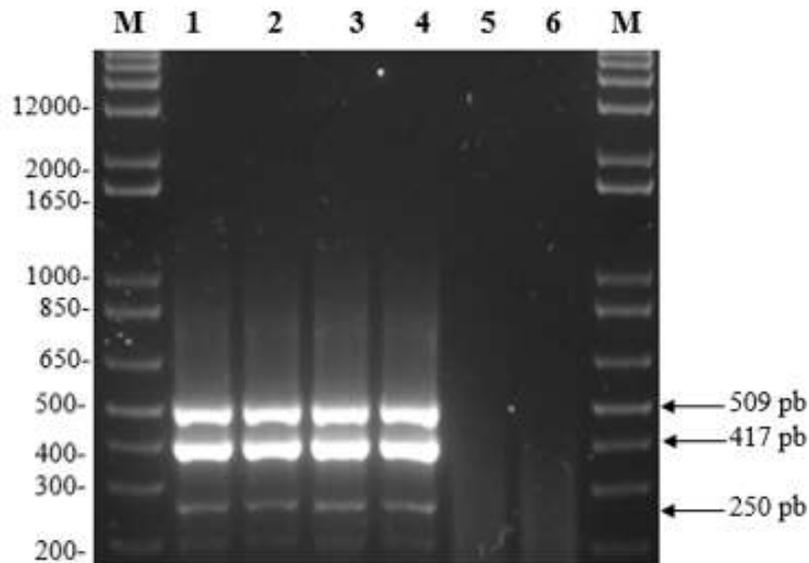


Figura 17. RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C', E/E' y TMV/CPF y TMV/CPR. Usando 1 μ L de RNA a una concentración de 30 ng/ μ L. **M**, Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen®); control positivo: **1-4**, aislado de virus de PMMoV; control negativo, **5-6**, agua grado biología molecular.

4.3 Detección del virus PMMoV en chile habanero con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas

Con los ácidos nucleicos extraídos del tejido de chile habanero “enfermo” no se obtuvo ninguna banda que indicará amplificación de algún fragmento en las reacciones RT-PCR establecidas para determinar la especificidad de los oligonucleótidos C/C' y E/E' con la matriz vegetal. En las **Figuras 14 y 15** solo se visualizan las bandas correspondientes a los amplicones de 417 y 509 pb, esperadas para los oligonucleótidos C/C' y E/E, respectivamente, con las muestras del aislado del virus PMMoV.

La ausencia de bandas en los carriles 9 y 10 así como en los carriles 11 y 12 correspondientes a las muestras de chile habanero “enfermo” en las **Figuras 14 y 15**, respectivamente, sugiere que en el tejido empleado para establecer las reacciones RT-PCR no se encontraba infectado con el virus PMMoV. Sin embargo, se requieren establecer pruebas con los oligonucleótidos generales TMV/CPF y TMV/CPR, que amplifican una región consenso conservada del gen de la proteína de la cápside, para saber si se trata de otra especie de virus del género *Tobamovirus* la responsable de ocasionar los síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas, observados en las plantas analizadas en este estudio.

Para la detección del virus PMMoV se han utilizado diferentes técnicas como las basadas en la detección de síntomas o por la técnica serológica DAS-ELISA (Buitrón-Bustamante, 2017). Sin embargo, la PCR multiplex es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico molecular de virus fitopatógenos. Esta técnica permite detectar simultáneamente diferentes géneros o especies de virus o amplificar fragmentos de secuencia conservadas de un mismo virus en una sola reacción mediante la utilización de múltiples oligonucleótidos específicos (hasta ocho), que generan una serie de amplicones correspondientes a los fragmentos amplificados (Martínez-

Cortázar, 2004; Méndez-Álvarez 2004). En este estudio, la RT-PCR multiplex permitió la amplificación de las regiones responsables de la replicación del virus y de la proteína de la cápside, resultado que corrobora la especificidad de los oligonucleótidos C/C' y E/E', para esas regiones, respectivamente.

Con la técnica RT-PCR multiplex no solo se incrementa la especificidad y sensibilidad de la PCR, sino que también se ahorra tiempo y se reducen los costos de corrida empleados para la detección de virus PMMoV (González-Garza, 2017). Sin embargo, se debe tener presente que la alta sensibilidad de la RT-PCR puede generar falsos positivos, debido a uniones inespecíficas de los oligonucleótidos, o bien falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en los extractos del material vegetal. Independientemente del objetivo de la amplificación se debe siempre cuidar que la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos a emplear sea la adecuada (Rodríguez-Mendoza, 2018).

La tecnología de detección RT-PCR multiplex con los oligonucleótidos C/C' y E/E, aquí diseñados, tiene potencial para detectar e identificar al virus PMMoV en plantas de chile habanero y representa una alternativa frente a los métodos serológicos existentes y RT-PCR convencional con los oligonucleótidos P12/3 y P12/3A propuestos por Mnari-Hattab *et al.* (2006) y CP/s y CP/a por Çaglar *et al.* 2013. Estos últimos no permiten realizar la amplificación de varios sitios catalíticos del virus en conjunto.

Los oligonucleótidos C/C' y E/E con temperatura de anillamiento de 64 °C, que trabajan en una RT-PCR multiplex tienen potencial para detectar al virus PMMoV en plantas de chile habanero; sin embargo es importante establecer más pruebas para determinar, entre otros aspectos, el porcentaje de especificidad, esto con ayuda de la capacidad de inclusividad que tienen los oligonucleótidos con patógenos relacionados con la matriz y otros *Tobamovirus* y la capacidad de

exclusividad que tiene con otras cepas del virus de manera analítica. Una vez realizadas estas pruebas se tendría una metodología para la detección oportuna del virus, en menor tiempo y con mayor especificidad, en comparación con el uso de oligonucleótidos generales para el género *Tobamovirus*. Así mismo, se reducirían falsos positivos con otros virus de genoma de ARN monocatenario de cadena sencilla de sentido positivo (+ssRNA) o con la matriz vegetal.

De los cinco oligonucleótidos específicos e inéditos A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E', para la detección e identificación del virus PMMoV en chile habanero solo C/C', y E/E' fueron funcionales en las reacciones de RT-PCR multiplex establecidas. Por lo anterior, se sugiere seguir trabajando con las temperaturas de anillamiento para los oligonucleótidos A/A', B/B', y D/D' con los que no se obtuvo amplificación. Aunque se verificó la funcionalidad de todos estos oligonucleótidos, en cuanto a su especificidad es necesario establecer el límite de detección del virus PMMoV para la reacción RT-PCR multiplex.

Los síntomas moteado clorótico y deformación de hojas jóvenes en chile habanero pueden ser inducidos, además del virus PMMoV, por virus pertenecientes al género *Potyvirus* como el virus del moteado del chile (PepMoV) el cual es transmitido por áfidos (*Myzus persicae*) (González-Garza, 2017). La deformación de hojas también puede ser ocasionada como resultado de la alimentación de insectos como trips (*Frankliniella occidentalis*) (Kirk, *et. al.*, 2003). Por lo anterior, estudios futuros de secuenciación del aislado de virus PMMoV obtenido de plantas de chile habanero con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas son requeridos para corroborar su identidad como se procede con otros virus (González-Garza, 2017; Rodríguez-Mendoza, 2018).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se acepta la hipótesis de que se contará con al menos dos oligonucleótidos específicos, que se hibridan a los sitios consevados

“*motifs*” estructurales y catalíticos de las secuencias génicas codificantes para detectar e identificar al virus PMMoV en chile habanero, mediante una reacción RT-PCR multiplex confiable; sin embargo, se rechaza la hipótesis de que los síntomas de moteado clorótico y deformación en hojas de chile habanero son inducidos por el virus PMMoV detectado con los oligonucleótidos diseñados en este estudio.

5. CONCLUSIONES

Se diseñaron oligonucleótidos específicos e inéditos para detectar e identificar al virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) en reacciones RT-PCR multiplex para obtener mayor especificidad y poder aumentado de detección.

De cinco oligonucleótidos específicos e inéditos diseñados, A/A', B/B', C/C', D/D' y E/E, a partir de 13 secuencias disponibles del GenBank NCBI, con tamaño mínimo de 6300 nucleótidos, solamente los oligonucleótidos C/C' y E/E' amplificaron los sitios catalíticos de las proteínas 30 K y 17.5 K, respectivamente, detectando e identificando al virus PMMoV en chile habanero en una reacción RT-PCR multiplex.

Con los oligonucleótidos C/C' y E/E' se obtuvieron los amplicones esperados de 417 y 509 pb, respectivamente, en reacciones RT-PCR y RT-PCR multiplex, con temperatura de anillamiento de 64 °C, establecidas para muestras del virus PMMoV. Ninguna banda se registró con muestras de las especies del género de *Tobamovirus*: TMV, ToMV, RCNaV y ToBRFV ni de extracto de hoja sana de chile habanero.

El programa de termociclaje para los oligonucleótidos C/C' y E/E' funcionando en conjunto en reacciones RT-PCR multiplex fue: un ciclo a 50 °C por 30 min, un ciclo a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 120 s y un ciclo a 72 °C por 5 min.

Con los oligonucleótidos diseñados C/C' y E/E' no se detectó al virus PMMoV en hojas de chile habanero con síntomas de moteado clorótico y deformación de hojas.

6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Ed. Limusa, México. ISBN: 521-21-05
- Aguado-García, Y., Taboada, B., Morán, P. et al. Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx and gut of infants during their first year of life. *Sci Rep* 10, 13595 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>. Consultado 19 de octubre de 2020
- Ahlquist, P., Strauss, E.G., Rice, C.M., Strauss, J.H., Haseloff, J., y Zimmern, D. (1985). Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contain homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses. *J Virol* 53, 536-542
- Avgelis AD, 1986. A pepper strain of TMV who is new in Crete (Greece). *Phytopathologia Mediterranea*, 25(1-3):33-38
- Avila-Rincon, M.J., Ferrero, M.L., Alonso, E., García-Luque, I., y DiazRuíz, J.R. 1989. Nucleotide sequences of 5' and 3' non-coding regions of *pepper mild mottle virus* strain S RNA. *J Gen Virol* 70 (Pt 11), 3025-3031.
- Brlansky, R., Lee, R., Purcifull, D., Timmer, L., & Raju, B. 1982. Immunofluorescent Detection of Xylem-Limited Bacteria In Situ. *Phytopathology*, 72(11), 1444-1448.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (eds.). 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th
- Buitrón-Bustamante JL, Morillo-Velastegui LE. 2017. Estandarización de un método de detección molecular del *Cucumber mosaic virus* (cmv) en banano ecuatoriano. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(1):113-124
- CABI (CAB International). 2019. Invasive Species Compendium, Datasheets, maps, images, abstract and full text invasive species of the world. *Pepper mild mottle virus* (PMMV) CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/43826> Consultado el 20 de junio de 2020.
- Çaglar BK, Fidan H, Elbeaino T, 2013. Detection and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) from Turkey, 161.
- Cartia G, Pacetto M, Polizzi G, 1985. Effects caused by mild mottle virus on some pepper varieties. *Tecnica Agricola*, 37(2):151-161
- Cortazar-Martinez A. y Silva-Rincón E.P. 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología. PCR. UNAM. México. 43 pp. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf> Consultado el 15 de octubre de 2020

- Culver, J.N. 2002. *Tobacco mosaic virus* assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40, 287-308.
- De La Torre-Almaraz R., Mario Salazar-Segura y Roberto Ruiz-Medrano. 2007. Ocurrencia de un *Tobamovirus* asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia*. 41: 763-773. 2007. México.
- Deom, C.M., Oliver, M.J., y Beachy, R.N. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237, 389-394.
- DGSV-CNRF. 2011. *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSVCNRF). Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 9 p.
- Dunigan, D.D., y Zaitlin, M. 1990. Capping of *Tobacco mosaic virus* RNA. Analysis of viral-coded guanylyltransferase-like activity. *J Biol Chem* 265, 7779-7786.
- Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., y Baker, B. 1999. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J* 18, 67-75.
- EPPO. 2009. Indirect Immunofluorescence Test for Plant Pathogenic Bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO*, 39, 413-416.
- García-Luque I, Serra MT, Alonso E, Wicke B, Ferrero ML, Díaz-Ruiz JR, 1990. Characterization of a Spanish strain of *pepper mild mottle virus* (PMMV-S) and its relationship to other tobamoviruses. *Journal of Phytopathology*, 129(1):1-8
- González Franco AC, Gil Langarica EM, Robles Hernández L, Núñez Barrios A, Pérez Leal R, Hernández Rodríguez O A y Pérez Moreno L. 2014. Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 38-51
- González-Garza R. 2017. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 591-610. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-1
- Gorbalenya, A.E., y Koonin, E.V. 1989. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res* 17, 8413-8440.
- Goregaoker, S.P., y Culver, J.N. 2003. Oligomerization and activity of the helicase domain of the *Tobacco mosaic virus* 126- and 183-kilodalton replicase proteins. *J Virol* 77, 3549-3556.
- Goregaoker, S.P., Lewandowski, D.J., y Culver, J.N. 2001. Identification and functional analysis of an interaction between domains of the 126/183- kDa replicase-associated proteins of

- tobacco mosaic virus. *Virology* 282, 320-328.
- Green, S.K. and Kim, J. S. 1991. Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review. Technical Bulletin No. 18. Asian Vegetable Research and Development Center. 60pp
- Hirashima, K., y Watanabe, Y. 2003. RNA helicase domain of tobamovirus replicase executes cell-to-cell movement possibly through collaboration with its nonconserved region. *J Virol* 77, 12357-12362.
- Hodgman, T.C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333, 22-23.
- Hu J, Li H, Barry K, Wang M, Jordan R. 1995. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two Cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis* 79:902-906
- Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. 4th edition ed Academic Press, New York.
- ICTV.2019. Historia de la taxonomía de ICTV: Virus del moteado leve de la pimienta. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19911845&src=NCBI&ictv_id=19911845
Consultado 19 de octubre de 2020
- IPPC. 2015. Lista de plagas reglamentadas de México a octubre 2015. CIPF. FAO
- Jarret RL, Gillespie AG, Barkley NA, Pinnow DL, 2008. The occurrence and control of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum germplasm collection, 30(1):26-36
- Kadare, G., y Haenni, A.L. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* 71, 2583-2590.
- Kirk, DJ; Terry, IL (2003). The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology* 5: 301 – 310.
- Koonin, E.V., y Dolja, V.V. 1993. Evolution and taxonomy of positivestrand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 375-430.
- Kopke, C., Prata , A., Cristovao , A., Pereira , S., Marques , J., & San Romao, M. 2000. Microbiological Control of Wine: The Application of Epifluorescence Microscopy Method as a Rapid Technique. *Food Microbiol*, 17, 257-260.
- Lamb, E., M. Adkins, S., Shuler, K., D. and Roberts, P. D. 2001. Pepper mild mottle virus. *Plant Pathology Fact Sheet* PP-55

- Li, X.D., M.-N. An, and Y.-H. Wu. 2016. First Report of *Pepper mild mottle virus* in Northeast China. Plant Virology Lab, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China.
- Li Y, Tan G, Lan P, Zhang A, Liu Y, Li R y Li F. 2018. Detection of Tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. Journal of Virological Methods, 259:122–128. DOI:10.1016/j.jviromet.2018.06.012
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., y Nelson, R.S. 2005. The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. Plant Physiol 138, 1853-1865.
- Martín S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, García ML, Grau O, Guerri J, Moreno P. 2004. Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. Eur J Plant Pathol 110:747-757
- MCRF. 2020. Módulo de Consulta de Requisitos Fitosanitarios para a Importación de Mercancía de Origen Vegetal. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México.
- Megías M, Molist P, Pombal MA. 2020. Atlas de histología vegetal y animal. La célula. <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>. Consultado 30 de octubre de 2020
- Melgarejo, N.P., García-Jiménez, J., Jorda, G.M. C. Lopez, G.M.M., Andres, Y. M. F. y Duran-Villa, N. 2010. Patógenos de plantas descritos en España. 2ª Edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Sociedad Española de Fitopatología. España
- Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T., y Okada, Y. 1987. Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J 6, 2557-2563.
- Miller, S. 1995. Plant Disease Diagnosis: Biotechnological Approaches. En S. Miller, Molecular Methods in Plant Pathology (pág. 462). CRC Press Inc.
- Moreno P. M. G. y Garcia-Arenal R. F. Compromisos en la adaptación a distintos huéspedes en virus de plantas. Tesis doctoral. Universidad Politecnica de Madrid. España
- Mnari-Hattab, M. and Ezzaier, K. 2006. Biological, serological, and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) in Tunisia. Tunisian Journal Plant Protection 1: 1-12.

- Narayanasamy, P. 2017. *Microbial Plant Pathogens: Detection and Management in Seeds and Propagules*. John Wiley & Sons.
- Nelson, R.S., y van Bel, A.J.E. 1998. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progr Bot* 59, 476-533
- NIMF 8. 1998. Determinación de la situación de una plaga en un área. CIPF. <http://www.cosave.org/sites/default/files/nimfs/d054967dc844633e764c22e3976e8152.pdf>. Consultada el 2 de noviembre 2020.
- Oparka, K.J., Prior, D.A., Santa Cruz, S., Padgett, H.S., y Beachy, R.N. 1997. Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J* 12, 781-789.
- Palukaitis, P., García-Arenal, F., Sulzinski, M.A., y Zaitlin, M. 1983. Replication of tobacco mosaic virus. VII. Further characterization of single and double-stranded virus-related RNAs from TMV-infected plants. *Virology* 131, 533-545
- Quadt, R., y Jaspars, E.M.J. (1989). RNA polymerases of plus-strand RNA viruses of plants. *Mol plant-Microbe Interact* 2, 219-223.
- Rangel-Aranguren E.A. 2014. Desarrollo de métodos moleculares de detección de virus de rna de cultivos hortícolas. Tesis doctoral. IVIA. España. 171 pp. file:///C:/Users/HP/Downloads/RANGEL%20-%20Desarrollo%20de%20m%C3%A9todos%20moleculares%20de%20detecci%C3%B3n%20de%20virus%20de%20RNA%20de%20cultivos%20hort%C3%ADcolas._repaired.pdf Consultado el 20 de octubre de 2020
- Rodríguez Y, Rangel E, Centeno F, Mendoza O, Parra A, 2004. Detection of viral diseases affecting sweet pepper in Counties Iribarren, Jiménez and Torres of Lara State, Venezuela, using ELISA technique. (Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA.) *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*, 21(2):105-115
- Rodríguez-Mendoza J, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA, Araujo-Ruiz K, Quezada-Salinas A, Cambrón Crisantos JM and Ochoa-Martínez DL. 2019. Identification from *Tomato brown rugose fruit virus* by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 345-356. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1902-
- Rodríguez-Mendoza J. 2018. Guía para el diseño de oligonucleótidos (Tips a considerar y tener mayor éxito). Senasica. DGSV. Mexico.

Sanzón Gómez, Diana, & Zavaleta Mejía, Emma. 2011. Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. Revista mexicana de fitopatología, 29(2), 154-164.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200007&lng=es&tlng=es. Consultado el 30 de octubre de 2020

Schuman, S., y Schwer, B. 1995. RNA capping enzymes and DNA ligases, a superfamily of covalen nucleotidyl transferases. . Mol Microbiol 17, 405- 410.

SIAP. 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Tena, F., Molina-Galdeano, M., Serra, M.T. y García-Luque.2012. A single amino acid in the helicase domain of PMMoV-S is responsible for its enhanced accumulation in C. chinense (L3 L3) plants at 32 °C. Virology 427: 34-43.

[file:///C:/Users/HP/Downloads/Tesis_Tena_Fatima_UAM_2012%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/Tesis_Tena_Fatima_UAM_2012%20(1).pdf) Consultado el 17 de junio de 2020

Wetter C, Conti M, Alschuh D, Tabillion R, Regenmortel MHVVan, 1984. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. Phytopathology, 74(4):405-410

7. ANEXO

Genoma consenso del virus PMMoV utilizado en este estudio

GTAAATTTYTCACAATTTAACAACAACAACAACAACAACAAMCAACATTMCAA
ACAAAWTACAACACTACAATGGCTTACACACAACAAGCTACCAACGCCGCATTAG
CAAGYACTCTCCGAGGGAAYAACCCCTTGGTGAACGATCTTGCTAATCGGAGAC
TGTACGAATCAGCGGTCGAACAATGCAATGCRCATGACCGCAGGCCCAAGGTTA
ATTTTTTAARGTCGATAAGCGAAGAGCAGACGCTTATCGCAACTAAGGCCTACC
CTGAGTTCCAAATYACGTTCTACAAAYACGCAGAACGCTGTGCACAGTCTCGCAG
GTGGACTTCGGTCYTTGGAAGTACAATACYTATGATGATGCAGRTCCCTAYGGTT
CAACGACATAYGATATCGGGGGAAATTTTGTGCTCACATGTTTAAAGGTCGTG
ACTACGTTTATTGTYTGCATGCCTAAYATGGACTTACGTGAYGTCATGCGTACA
ATGCTCAAARGGATAGCATYGAAGTGTACCTTTCAAAGCTTGCACAAAAGAAAA
AGGTAATACCGCCATATCAAAGCCAKKCTTTGATAAATACACGGACGATCCGC
AATCRGTAGTGTGCTCGAAACCTTTYCAGCACTGCGAAGGCGTTTCGCACTGCA
CGGATAAAGTATACGCTGTYGCTTTGCACAGTTTATACGACATTCCRGCAGATG
AATTTGGKGCAGCACTTCTGAGGAGAAATGTTTCATGTCTGYTATGCTGCTTCC
ACTTTTCTGAGAATCTTCTTTTAGAAGATTCGTATGTYAGTCTTGACGACATAGG
CGCTTTCTTCTCGAGAGAGGGYGATATGTTGAACTTTTCYTTTGTAGCAGAGAG
YACTTTAAATTATACTCATTCTTATAGTAATGTGCTTAAGTATGTGTGTAAGACT
TACTTCCCYGCTTCTAGTAGAGAAGTGTACATGAAGGAGTTTTTRGTAAGTAGG
GTAAATACTTGGTTTTGTAAGTTTTCAAGGYTAGATACCTTTGACTATATAGAG
GTGTRTACCAYAGAGGTGTAGACAAGGAGCAATTTTAYAGTGAATGGAAGAT
GCTTGGCATTACAAAAGACTTTGGCRATGWSAATAGCGAAAGRATCCTCTTR
GAGGATTCATCGTCYGTAAATTATTGGTTTCAAAGATGAARGATATGGTGATA
GTACCTYTGTTCGACGTATCTTTACAGAACGAGGGGAAAAGGTTAGCAAGAAAR
GAGGTYATGGTCAGCAAGGACTTCGTTTATACTGTGCTTAATCATATTCGCACAT
AYCAGTCGAAAGCGCTTACTTACGCCAATGTATTATCRITTCGTTGAGTCGATAA
GATCAAGAGTGATAATYAATGGGGTRACYGCKCGYTCAGAGTGGGATGTGGRY
AAGGCTTTGTTGCAGTCYYTGTCAATGACYTTTTTCTTGCAGACCAAATTGGCCA
TGCTCAARGATGAMCTCGTGGTTCARAAATTYCAAGTGCATTCTYAAATCGCTCA
CTGARTATGTCTGGGATGAGATTACTRCYGCTTTTCACARYTGTTTCTTACAAT
CAAGGAGAGGTTGATTAACAAGAACTCATAACTGTTTCGGAAAAGGCTCTTGA
AATTAAGTACCTGAYTTRTATGTRACYTTCCACGAYAGATTRGTTAARGAGTA
CAAGTCTTCRGTGGARATGCCRGTAYTGGACGTTAAAARGAKSTTGGAAGAAGC
RGAAGTKATGTAYAATGCTTTGTCTRGAAATCTCAATTCTTAARGAYAGTGACAA
GTTTGATGTTGATGTTTTTTCCCGRATGTGTRATACWTTAKGCGTAGATCCATTG
GTGGCMGCAAAGGTAATGGTAGCYGTRGTTTCAAATGAGAGTGGTTTGACCTTA
MCGTTTGAGMGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTTGCATTGCAACCGACAATT
RCAYCAAAGGAGGAAGGTTCTTTRAAGATTGTGTCGTCAGACGTAGGTGAGTCC

TCAATCAAGGAAGTGGTYCGAARATCRGAGATTTCTATGCTWGGTCTAMCAGG
YARCACAGTGTCCGATGAGTTCCAAAGAAGTACAGAAATYGAGTCGTTGCAGC
AGTTCCATATGGTATCCACAGAGACGATTATCCGTAAACAGATGCATGCGATGG
TGTATACWGGTCCGCTAAAAGTTCAACAATGCRAGA ACTATYTAGACAGCCTRG
TAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTATCAAACCTGAAGAAGATAATCAARGACACAG
CTGCKATAGATCTCGAGACTAAGGAAAAATTTGGAGTCTACGACGTGTGCCTYA
AGAAATGGTTGGTGAAACCTCWATCRAAAGRMCATGCTTGGGGTGTGGTGATG
GACTCAGACTATAARTGCTTTGTWGCCTTCTCACATACGATGGYGAGAACATT
GTRTYGGAGAGACATGGCGBAGAGTYGCAGTGAGCTCCGAATCTTTGGTGTAT
TCAGATATGGGGAAGATMAGAGCTATACGCTCWGTGCTTAAAGACGGTGAACC
CCATATAAGYAGTGCAAAGGTTACACTTGTGTGATGGTGTTCWGGTTGYGGRAA
GACARAGGAGATTCTTTCGAGGGTCAACTTTGACGAAGATCTRGTCTRGTACC
AGGAAAACAGGCTGCGYAAATGATAARAAGAARGCAAACAGTTCTGGTTTRA
TCGTGGCKACCAAGGAGAAAGTAAGGACGGTAGACTCTTCTTAATGAATTACG
GWCGAGGTCCGTGCCAATAAAAAGGCTGTTTCTGGATGAAGGTCTAATGTTAC
ACCCYGGTTGTGTTAATTTTCTGGTTGGCATGTCTCTATGCTCCGAGGCTTTYRTT
TATGGAGACACCCAGCAGAYTCCTTACATY AACAGAGTTGCAACTTTCCCTAT
CCTAAGCATTGAGYCAACTCGARGTCGATGCWGTTGARACTCGCAGAACAACR
TTGCGGTGTCCRGCKGATAYYACCTTCTTCTTGAATCAGAAGTACGAAGGGCAA
GTTATGTGCACATCAAGTGTTACACGCTCGGTGTCACACGAGGTCATYCAAGGY
GCAGCRGTAATGAATCCAGTGTCTAAACCACTTAAAGGGAAGGTGATTACATTC
ACTCARTCAGACAAGTCATTGCTGCTCTCRAGGGGTTACGAAGATGTGCATACC
GTTTCATGAGGTGCAAGGGGAAACGTTTGAAGACGTCTCAYTAGTGAGRYTGACG
CCTACRCCCGTGGGAATAATYTC AAAGCAGAGTCCGCACYTGTTGGTCTCRTTG
TCTAGGCATACAAGGTC DATCAAATATTACACWGTTGTRCTAGATGCAGTCGTT
TCAGTKCTYAGAGATYTGAGTGTGTRAGTAGTTACCTRTTAGATATGTACAAA
GTTGATGTGTGCGACTCAATAGCAATTACAGATAGAATCGGTGTAYAAAGGTGTT
AACCTTTTCGTYGCAGCMCCRAAAACRGGAGATGTTTCTGACATGCAATATTAY
TAYGACAAGTGTGTTGCCGGGAAACAGTACWATACTYAATGAGTATGATGCTGT
AACYATGCAAATACGAGARAATARTTTGAATGTCAARGAYTGTGTGTTGGATAT
GTCRAARTCGGTGCCTCTTCCGAGAGAATCTGAGACGACATTGAAACYTGATGAT
CAGGACTGCTGCWGRAAAACCTCGAAAACCTGGATTGTTGGAAAAYTTGGTYG
CGATGATCAAAAAGAAATTTCAACTCTCCCGAATTARTAGGGGTYGTYGACATCG
AAGACACYGCTTCTCTAGTAGTAGAYAAGTTTTTTTGATGCATACTTWATTAAG
AAAAGAAAAAACCHAAAAATATACCTCTGCTTTCAAGGGCGAGTTTGGAAAGA
TGGATMGAAAAGCAAGARAAGTCRACRATTGGCCAGTTGGCTGATTTTGACTTT
ATTGATYTWCCAGCCGTTGATCAATAYAGGCACATGATCAAGCAGCARCCGAA
ACAGCGTYTRGATCTTAGTATTCARACTGARTACCCGGCTTTGCAAACYATTGTG
TATCATAGCAAGAAAATCAAYGCGCTTTTTGGTCCTGTATTTTCAGAATTAACAA
GACARCTGCTAGAGWCAATTGACAGTTCRAGATTYATGTTTTATACAAGGAAAA

CGCCTACACAGATCGAAGARTTTTTCTCAGATCTGGAYTCTAATGTTCCCTATGGA
CATATTAGAGCTRGACATTTCCAAGTATGACAAATCACAGAACGAATTCATTG
TGCAGTYGAGTAYGAGATTTGGAAAAGGTTTRGGCTTAGACGATTTCTTGGCYGA
AGTTTGGAAACAYGGGCATCGKAAGACAACGTTGAAAGACTACACAGCCGMA
TAAAAACGTGTTTGTGGTAYCARAGGAAAAGYGGTGATGTCACCACATTCATTG
GAAACACGATCATTATTGCTGCRGTCTGTCTCTATGCTACCGRTGGAGAGATT
GATTAAAGGTGCCTTTTGTGGTGATGATAGTATAYTATACTTTCCAAAGGGCACT
GATTTCCCYGATATTCAACAGGGYGCAAAYCTTCTCTGGAATTTTGAAGCCAAG
TTGTTYAGGAAGAGATATGGTTACTTTTGCAGYAGGTACATAATYCACCATGAC
AGAGGYTGTATTGTRTATTATGACCCTCTAAAATTGATCTCGAAACTCGGTGCW
AAACACATCAAGAATAGAGAACATTTAGAGGAATTTAGRACCTCTCTTTGTGAT
GTTGCTGGGTCGTTGAACAATTGTGCRTACTATACACATTTGGACGACGCTGTCC
GTGAGGTTATYAARACCGCACCTCCTGGTTCGTTTGTATATAGAGCATTAGTTAA
GTACTTGTGTGATAAAAGGTTTRTTCAAACATTGTTTTYTGGRRTAAATGGCGTTA
GTAGTCAAGGAYGACGTTAAGATTTCTGAGTTCATCAATTTGTCTRCYGCTGAG
AAAYTCTTACCTGTCYRTTATGACTTCRGTCAAGACGGTACGAATTTCGAAAGTT
GACAAAGTGATYGCRTGGAAAACGATTCGTTATCCGATGTRGATTTGCTTAAA
GGTGTWAAGCTTGTYAARGATGGTTATGTGTGTTTRGCAGGGTTAGTTGTGTCC
GGGGAGTGGAACCTACCSGACAACTGCAGAGGTGGAGTAAGCGTTTGTGGTT
GAYAAGAGAATGCAAAGAGATRACGAAGCAACACTTGGATCTTATAGAACCAG
TGCRGCTAAGAAACGATTTGCCTTCAAATTGATYCCGAATTATAGCATTACTACC
GCCGATGCTGARARAAAWGTTTGGCAAGTTTTAGTTAATATTAGAGGTGTYGCC
ATGGAAAAGGGTTTCTGTCTTTATCTTTGGAGTTTGTCTCAGTTTGTATWRTRC
ACAAATCCAATATAAAATTAGGCTTGAGAGAGAAAATTACTAGTGTGTCRGAAG
GAGGACCCGTTGAACTTACAGAAGYAGTYGTTGATGAGTTCATCGAATCAGTTC
CAATGGCTGACAGATTACGTAAATTTTCGCAATCAATCYAAGAAARGAAGTAATA
AGTATGTAGGTAAGAGAAWRATAATAAGGGTKTGAATAAGGAARGGAAGCTG
TTTRATAARGTTAGARTTGGGCAGAACTCGGAGTCRTYGGACGCCGAGTCTTCTT
CGTTTTAACTATGGCTTACACAGTTTCYAGTGCHAATCAATTAGTGTATTTAGGT
TCTGTRTGGGCHGATCCATTAGAGTTACAAAATCTRTGTACTTCSGCGTTAGGYA
ATCAGTTTCAAACACARCAGGCTMGAAMGGTTCAACAGCAGTTCTCTGRTG
TGTGGAARACYATWCCGACCGCTACAGTTAGATTTCCYGCTACYGGTTTCAAAG
TTTTYCGATAYAATGCCGTSCTAGATTCHCTAGTGTCCGGCACTTCYCGGAGCCTT
TGATACTMGGAAAYAGGATAATAGAAGTWGAAAATCCGCAAATCCTACAACCTG
CCGAGACRCTTGATGCGACGAGGCGRGTAGATGATGCGACGGTGGCCATTAGG
GCCAGTATAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACRGAATGTACAAT
CAAGCTCTGTTTCGAGAGCGCGAGTGGACTMACCTGGGCTACAACCTCTTARACA
TGATGGYRTAAATAAGTTGGACGAACRWTAACGTYCGTGGCGAGTACGATAA
CTCGTAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTCGTTTRGGATGGAACGC

AATTWAATACAYGTGTGACGTGTATTTGCGAACGACGTAATTATTTTCAGGGG
TTCGAATCCCCCGAACCGCGGGTAGCGGCCAGCGGCC