

Respuesta de variedades de Chile a la infección con *Tomato brown rugose fruit virus*

Luis Enrique Ortiz-Martínez¹, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, Reyna Isabel Rojas-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹, Manuel Ángel Gómez Cruz²

¹Colegio de Postgraduados, Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, CP. 56230, México, México.

²Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Investigaciones Interdisciplinarias para el Desarrollo Rural Integral, Carretera México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, Texcoco, CP. 56230, México, México.

Autor para correspondencia: Daniel Leobardo Ochoa-Martínez (ldaniel@colpos.mx)

Data de chegada: 06/04/2021. Aceito para publicação em: 28/10/2021

10.1590/0100-5405/250747

RESUMEN

Ortiz-Martínez, L.E.; Ochoa-Martínez, D.L.; Rojas-Martínez, R.I.; Aranda-Ocampo, S.; Cruz, M.A.G.. Respuesta de variedades de Chile a la infección con *Tomato brown rugose fruit virus*. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.209-215, 2021.

El *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) es un virus emergente que amenaza la producción de tomate y Chile en todo el mundo. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la infección del ToBRFV en la morfología de la planta y calidad de frutos en ocho variedades de Chile y proponer una escala diagramática para evaluar la severidad en hojas infectadas considerando el porcentaje de área foliar afectada. Se probaron 16 tratamientos, que incluyeron ocho variedades de Chile y dos condiciones experimentales (inoculado y no inoculado). Cinco días después del trasplante, cada variedad de Chile se inoculó mecánicamente con ToBRFV y se evaluaron variables morfológicas y de calidad de frutos.

La comparación de medias de cada variedad inoculada versus no inoculada se realizó con la prueba t-Student ($P \leq 0.05$) para grupos independientes. El ToBRFV infectó a todas las variedades inoculadas ocasionando lesiones locales necróticas, clorosis, mosaico, moteado, necrosis de tallo, amputación, deformación, enrollamiento y necrosis de hoja; asimismo, se observaron plantas asintomáticas. El ToBRFV afectó significativamente la altura, número de entrenudos, número de flores, peso fresco de raíz, peso promedio de fruto, número de semillas y diámetro polar-ecuatorial del fruto. La variedad Chile habanero mostró la menor severidad, mientras que la mayor severidad se observó en la variedad de Chile serrano 'Tampiqueño'.

Palabras clave: Escala de severidad, ToBRFV, síntomas, variables morfológicas y calidad de frutos.

ABSTRACT

Ortiz-Martínez, L.E.; Ochoa-Martínez, D.L.; Rojas-Martínez, R.I.; Aranda-Ocampo, S.; Cruz, M.A.G. Response of chili varieties to the infection with *Tomato brown rugose fruit virus*. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.209-215, 2021.

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is an emerging virus that threatens tomato and chili production worldwide. The objective of this work was to evaluate the effect of ToBRFV infection on plant morphology and fruit quality in eight varieties of pepper and to propose a diagrammatic scale to evaluate severity in infected leaves considering the percentage of affected leaf area. Sixteen treatments were tested, consisting in eight varieties of chili and two experimental conditions (inoculated and non-inoculated). Five days after transplanting, each chili variety was mechanically inoculated with ToBRFV and morphological and fruit quality variables were evaluated. The comparison of

means of each inoculated versus non-inoculated variety was performed with the t-Student test ($P \leq 0.05$) for independent groups. ToBRFV infected all inoculated plants causing local necrotic lesions, chlorosis, mosaic, mottling, stem necrosis, amputation, deformation, rolling and leaf necrosis depending of the variety; likewise, asymptomatic plants were observed. ToBRFV significantly affected height, number of internodes, number of flowers, fresh root weight, average fruit weight, number of seeds, and polar-equatorial diameter of the fruit. The habanero chili showed the least severity, while the highest severity was shown in the serrano chili 'Tampiqueño'.

Keywords: Severity scale, ToBRFV, symptoms, morphological variables and fruit quality.

RESUMO

Ortiz-Martínez, L.E.; Ochoa-Martínez, D.L.; Rojas-Martínez, R.I.; Aranda-Ocampo, S.; Cruz, M.A.G.. Resposta de variedades de pimenta à infecção com *Tomato brown rugose fruit virus*. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.209-215, 2021.

O vírus do tomate rugoso marrom (tomato brown rugose fruit virus - ToBRFV) é um vírus emergente que ameaça a produção de tomate e pimenta em diferentes países. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da infecção do ToBRFV na morfologia vegetal e na qualidade do fruto em oito variedades de pimenta malagueta e propor uma escala diagramática para avaliar a severidade em folhas infectadas considerando a porcentagem de área foliar afetada. Dezoisessis tratamentos foram testados, que incluíram oito variedades de pimentão e duas condições experimentais (inoculadas e não inoculadas). Cinco dias após o transplante, plantas de cada variedade de pimenta foram inoculadas mecanicamente com ToBRFV e as variáveis morfológicas e de qualidade dos

frutos foram avaliadas. A comparação das médias de cada variedade inoculada versus não inoculada foi realizada com o teste t de Student ($P \leq 0,05$) para grupos independentes. O ToBRFV infectou todas as variedades inoculadas causando lesões necróticas locais, clorose, mosaico, mosqueamento, necrose do caule, amputação, deformação, enrolamento e necrose da folha; da mesma forma, foram observadas plantas assintomáticas. O ToBRFV afetou significativamente a altura, número de entrenós, número de flores, peso fresco da raiz, peso médio do fruto, número de sementes e diâmetro polar-ecuatorial do fruto. A variedade de pimenta habanero apresentou a menor severidade da doença, enquanto a maior severidade foi observada na variedade de pimenta serrano 'Tampiqueño'.

Palavras-chave: Escala de severidade, ToBRFV, sintomas, variáveis morfológicas e qualidade do fruto.

El chile (*Capsicum* spp.) es una de las especias más importantes en la gastronomía del mundo (2). Una de las limitantes más importantes de la producción del cultivo son las enfermedades causadas por patógenos como nematodos, hongos, bacterias y virus. En 2016, se reportó un nuevo virus llamado *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (20) infectando materiales de tomate con genes de resistencia para tobamovirus y posteriormente en plantas de pimiento con genes *L*^{1,3,4} que confieren resistencia para tobamovirus (10). En México, el ToBRFV se reportó por primera vez en 2018 afectando cultivos de tomate y chile (4). Los síntomas asociados al ToBRFV incluyen mosaico con protuberancias verde oscuro, moteado y amarillamiento en las hojas, mientras que en frutos provoca maduración irregular con presencia de zonas amarillas y verdes, estriado verde, deformación y manchas irregulares de color marrón que los hace no aptos para el mercado (4, 12). En México se cultivan diferentes genotipos de chile de importancia económica y, a la fecha, se desconoce su comportamiento a la infección ocasionada por el ToBRFV. Dada la importancia del cultivo y consumo de chile en México, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la infección del ToBRFV en la morfología de la planta y calidad de frutos en ocho variedades de chile y proponer una escala diagramática para evaluar la severidad en hojas de plantas infectadas por este virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo de ToBRFV

El aislamiento de ToBRFV se purificó a partir de una lesión local mediante cuatro transferencias en *Nicotiana glutinosa* y posteriormente se incrementó la fuente de inóculo en *Solanum lycopersicum* (9).

Variedades de chile

Se sembraron ocho variedades de chile en una charola de unicel de 200 cavidades con peat moss estéril en condiciones de invernadero, con una temperatura diurna y nocturna de 45 ± 2 °C y 15 ± 2 °C, respectivamente y humedad relativa del 41 – 83 %. A los 45 días después de la siembra, se realizó el trasplante de las plántulas en bolsas negras de polietileno de 25 X 25 cm con tezontle como sustrato.

Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron 16 tratamientos (T), producto de ocho variedades de chile y dos condiciones experimentales (inoculado y no inoculado): ancho 'San Luis' (T1), serrano 'Tampiqueño' (T3), habanero (T5), árbol 'Criollo' (T7), jalapeño 'M' (T9), húngaro 'Santa Fe' (T11), pimiento de cayenne (T13) y una línea endogámica recombinante de CM-334 (RIL-CM) (T15), con sus respectivos controles negativos (T2, T4, T6, T8, T10, T12, T14 y T16). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con ocho repeticiones y la unidad experimental consistió en una planta por bolsa.

Inoculación de *Tomato brown rugose fruit virus*

Cinco días después del trasplante, se inocularon mecánicamente con ToBRFV las plantas de cada variedad de chile. Las plantas fueron espolvoreadas con carborundum, frotadas con un hisopo con el macerado del tejido infectado en amortiguador de fosfatos 0.01M pH 7.0; al término del proceso las hojas inoculadas se enjuagaron con agua destilada. Como control negativo se tuvieron plantas de cada variedad espolvoreadas con carborundum y frotadas únicamente con el amortiguador de fosfatos. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero, se fertilizaron cada dos días con solución nutritiva (17)

y se observaron diariamente para registrar el período de incubación (días desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas) e incidencia de plantas enfermas.

Detección del ToBRFV

Las plantas de chile inoculadas con ToBRFV se analizaron mediante RT-PCR a los ocho días después de la inoculación.

La extracción de ARN se realizó a partir de 100 mg de tejido foliar apical de cada planta por tratamiento, de acuerdo con el protocolo descrito por Barbier et al. (1). La concentración y pureza de ácidos nucleicos totales se determinó por espectrofotometría (Nano Drop 2000[®], Thermo Scientific[™]), mientras que la integridad se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La mezcla de reacción, compuesta por 0.5 µL del iniciador ToBRFV-FMX, 0.5 µL de ToBRFV-RMX, 5 µL de agua y 1 µL de ARN se desnaturalizó a 70 °C durante 5 min. La retrotranscripción se realizó con la enzima M-MLV (Promega, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla de reacción para la retrotranscripción consistió en: 2 µL de amortiguador M-MLV 5X, 1 µL de agente reductor RT 10X, 0.5 µL de dNTP's 10 mM, 0.5 µL de M-MVL y 5 µL del compuesto de ARN previamente desnaturalizado. La mezcla anterior se incubó a 42 °C durante 60 min y posteriormente a 72 °C por 10 min. Los iniciadores utilizados ToBRFV-FMX y ToBRFV-RMX, amplifican 475 pares de bases de la región codificante de la replicasa viral (18). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 10 µL con lo siguiente: 2 µL de amortiguador Taq polimerasa 5X, 0.6 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.2 µL de dNTP's 10 mM, 0.6 µL iniciador ToBRFV-FMX, 0.6 µL iniciador ToBRFV-RMX, 4.9 µL de agua libre de nucleasas, 0.1 µL de Taq DNA polimerasa 500 U y 1 µL de cADN. La amplificación se llevó bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 40 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

Escala de severidad

Para cuantificar el porcentaje de área foliar afectada, se desarrolló una escala diagramática siguiendo el protocolo establecido por Ortega-Acosta et al. (15) con algunas modificaciones. Se seleccionaron 10 hojas de cada variedad de chile con diferentes grados de área afectada a los 60 días después a la inoculación. Las hojas se digitalizaron con una impresora EPSON 14150 (Epson America, USA) y con el programa ImageJ 1.53e (NIH, USA) se cuantificó el área total de cada una de las hojas, así como el área afectada. El porcentaje de severidad (área afectada) se calculó con la fórmula: Severidad = $\left(\frac{\text{área afectada}}{\text{área total}}\right) 100$ (14). De acuerdo con los síntomas exhibidos y el porcentaje de severidad calculado, se definieron cuatro clases con el programa 2LOG 2.0 (13).

Variables evaluadas

Después de la inoculación, se registró cada 15 días por dos meses la altura y número de entrenudos en las variedades de chile. El número de flores, diámetro polar-ecuatorial del fruto, peso promedio de fruto y número de semillas se evaluaron cada 15 días a medida que fueron apareciendo estos órganos. Finalmente, el peso fresco de follaje, peso fresco de raíz y diámetro de tallo se evaluaron una vez concluido el experimento (100 días después de la inoculación).

Variables morfológicas

La altura de la planta se midió desde la base al ápice del tallo con un flexómetro, el peso fresco de follaje y de raíz se obtuvo con una

balanza digital BASE-5EP (Truper, China), el diámetro de tallo se midió en la base del mismo con un vernier (Stainless Hardened, China) y el número de flores se evaluó por un mes.

Variabes de calidad

Se seleccionaron 10 frutos al azar por cada tratamiento para calcular las siguientes variables: peso promedio de fruto, se obtuvo dividiendo el peso total de frutos entre el número de frutos; el diámetro polar-ecuatorial del fruto consistió en el promedio de la suma del diámetro polar y el diámetro ecuatorial de cada fruto.

Análisis estadístico

La comparación de medias de cada variedad inoculada versus no inoculada se realizó con la prueba t-Student ($P \leq 0.05$) para grupos

independientes (19, 21). La prueba t-Student se realizó con el software RStudio 1.3.1093 (5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas

Las plantas inoculadas con ToBRFV mostraron diferentes síntomas (Figura 1), periodo de incubación, severidad e incidencia por variedad (Tabla 1). Todas las variedades evaluadas, excepto el chile habanero, mostraron ampulaciones foliares y mosaico. El chile ancho ‘San Luis’, serrano ‘Tampiqueño’ y jalapeño ‘M’ mostraron deformación foliar, así como necrosis de tallo y hoja. En pimiento de cayenne y chile de árbol ‘Criollo’, las plantas inoculadas presentaron ampulaciones

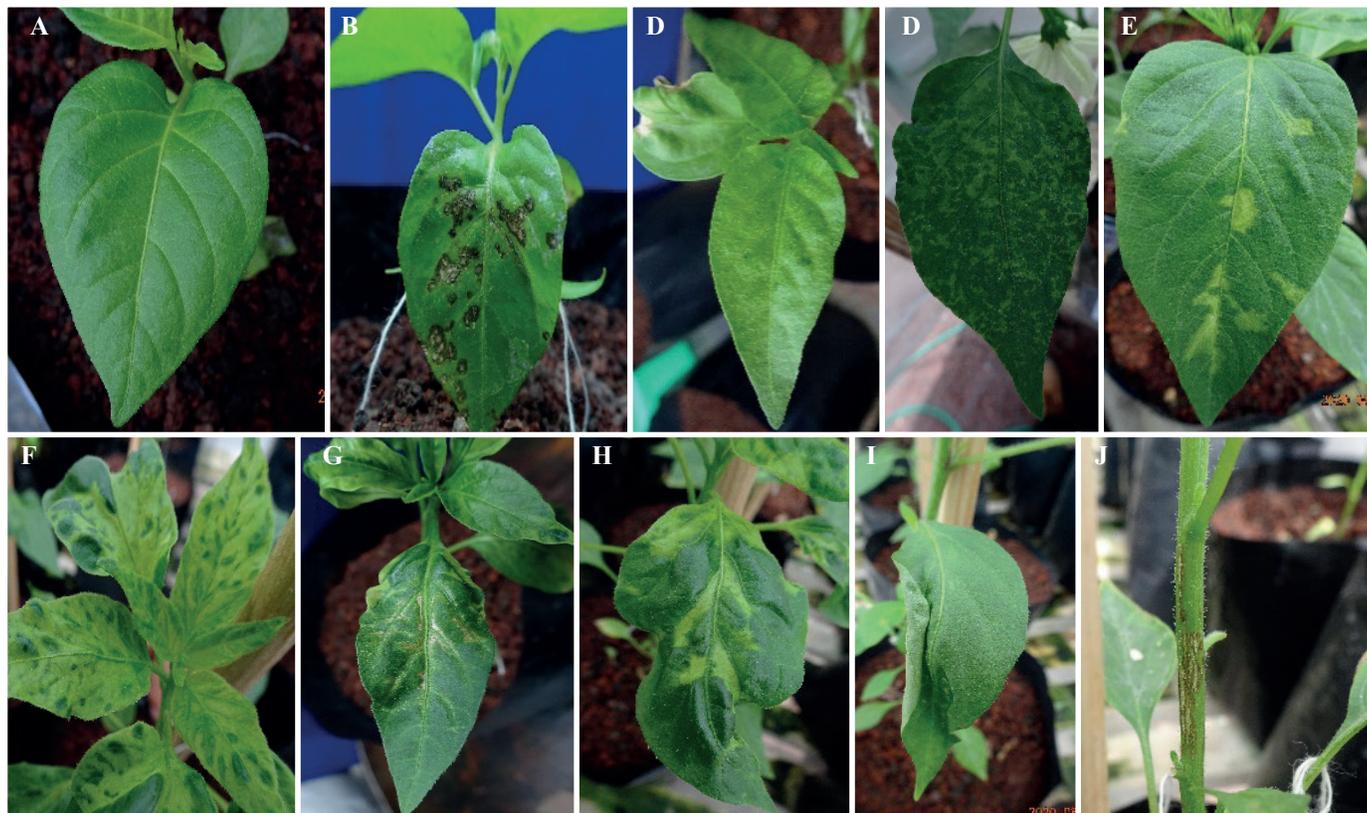


Figura 1. Síntomas en variedades de chile inoculados con ToBRFV. A) planta asintomática, B) lesiones locales necróticas, C) clorosis, D) mosaico, E) moteado, F) ampulación, G) necrosis de hoja, H) deformación, I) enrollamiento de hojas y J) necrosis de tallo.

Tabla 1. Período de incubación, incidencia, severidad y síntomas observados en diferentes variedades de chile.

Varietades de chile	Incidencia (%)	Periodo de incubación (ddi [#])	Severidad promedio 60 ddi (%)	Síntomas
Ancho ‘San Luis’	100	11	52	Ampulaciones, mosaico, deformación de hojas y necrosis de tallo.
Serrano ‘Tampiqueño’	100	3	57	Ampulaciones, mosaico, deformación de hojas y necrosis de hoja y tallo.
Habanero*	0	2	0	Lesiones locales necróticas y abscisión de hojas inoculadas.
Árbol ‘Criollo’	87.5	6	47	Ampulaciones, mosaico y clorosis.
Jalapeño ‘M’	87.5	3	44	Ampulaciones, mosaico, deformación de hojas y necrosis de hoja y tallo.
Húngaro ‘Santa Fe’	100	6	12	Ampulaciones, ligero mosaico y moteado.
Pimiento de cayenne*	62.5	6	35	Ampulaciones, mosaico y clorosis.
RIL-CM**	75	6	20	Ampulaciones, ligero mosaico, clorosis y enrollamiento de hojas.

[#]ddi: días después de la inoculación; *Variedad desconocida; **Línea endogámica recombinante de CM-334 y pimiento Maor.

foliares y mosaico. Las plantas inoculadas de chile húngaro ‘Santa Fe’ y RIL-CM desarrollaron moteado clorótico en las hojas, este último adicionalmente desarrolló enrollamiento de hojas. Los síntomas reportados en el cultivo de chile infectado por ToBRFV son mosaico, clorosis, aclaramiento de nervaduras, necrosis de tallo y distorsión de frutos (16), algunos de los cuales también fueron observados en algunas variedades de chile del presente estudio. El chile habanero desarrolló lesiones locales necróticas en las hojas inoculadas a los dos días después de la inoculación (ddi), las cuales se cayeron a los 9 ddi, posteriormente las plantas continuaron creciendo sin mostrar síntomas. Luria et al. (10) reportaron reacción de hipersensibilidad en plantas de pimiento infectadas con ToBRFV que poseen genes *L*^{1,3,4}.

La menor incidencia se observó en el chile habanero (0 %), mientras que en el chile ancho ‘San Luis’, serrano ‘Tampiqueño’ y húngaro ‘Santa Fe’ se observó una incidencia del 100 %. En chile de árbol ‘Criollo’ y jalapeño ‘M’ se observó 12.5 % de plantas inoculadas con reacción de hipersensibilidad, mientras que en RIL-CM y pimiento de cayenne fue de 25 y 37.5 %, respectivamente. El periodo de incubación varió desde dos hasta los 11 ddi (Tabla 1).

Detección del ToBRFV

En plantas de las ocho variedades de chile inoculadas con ToBRFV se detectó la presencia del virus, obteniéndose una amplificación del fragmento esperado de 475 pb (Figura 2). En las plantas testigo (no inoculadas) no se detectó la presencia del virus.

Escala de severidad

El área foliar afectada en las plantas inoculadas con ToBRFV varió de 0 a 77 % (Tabla 2). Las variedades de chile se agruparon en diferentes clases en función de la severidad: Clase 0: chile habanero; Clase I: chile húngaro ‘Santa Fe’; Clase II: RIL-CM, pimiento de cayenne, chile jalapeño ‘M’ y árbol ‘Criollo’; Clase III: chile serrano ‘Tampiqueño’ y ancho ‘San Luis’. La variedad que mostró menor severidad fue el chile habanero, mientras que el chile serrano ‘Tampiqueño’ presentó la mayor severidad.

Variables evaluadas

La infección del ToBRFV afectó significativamente la altura de las plantas, excepto para el chile habanero (Figura 3A). Los tratamientos

inoculados con ToBRFV (T1, T3, T7, T9, T11, T13 y T15) mostraron un retraso en el crecimiento del 11.5 al 29.6 %. Se ha reportado que el achaparramiento es el síntoma más común inducido por una infección viral en plantas susceptibles (3).

Las plantas no inoculadas de chile serrano ‘Tampiqueño’ (T4), chile de árbol ‘Criollo’ (T8) y pimiento de cayenne (T14) presentaron mayor número de entrenudos que las plantas inoculadas. En el caso del chile ancho ‘San Luis’ (T1 y T2), habanero (T5 y T6), jalapeño ‘M’ (T9 y T10), húngaro ‘Santa Fe’ (T11 y T12) y RIL-CM (T15 y T16) no se tuvieron diferencias significativas (Figura 3B). Bhat & Rao (3) afirman que las plantas infectadas por virus pueden presentar reducción en el número de entrenudos.

Se tuvo mayor número de flores en plantas no inoculadas de chile ancho ‘San Luis’ (T2) y húngaro ‘Santa Fe’ (T12). Las plantas inoculadas de chile jalapeño ‘M’ (T9) presentaron mayor número de flores que las plantas no inoculadas (T10). En el resto de las variedades no se observaron diferencias significativas (Figura 3C). Harth et al. (7) reportaron que la infección de *Zucchini yellow mosaic virus* afecta la producción de flores en calabaza silvestre, mientras que van Mólken & Stuefer (22) no encontraron diferencias significativas en el número de flores en *Trifolium repens* infectadas y no infectadas por *White clover mosaic virus* (WCIMV). El chile serrano ‘Tampiqueño’ y RIL-CM presentaron retraso en el desarrollo floral, por lo tanto, hubo ausencia de flores en el periodo de evaluación. Temperaturas extremas (inferiores a 15 y superiores a 32 °C) afectan significativamente el crecimiento, floración y rendimiento del chile (11). En este estudio, se registró una temperatura máxima promedio de 45 °C y se asume que dicho factor fue el responsable del retraso de floración y aborto floral. Se ha demostrado que temperaturas superiores a 32 °C afectan principalmente el desarrollo floral en chile (6).

Las plantas inoculadas de chile habanero (T5), árbol ‘Criollo’ (T7) y jalapeño ‘M’ (T9) exhibieron una reducción en la biomasa de raíz del 14.8 al 31.7 %, mientras que en el resto de las variedades no se tuvieron diferencias significativas (Figura 3D). van Mólken & Stuefer (22) encontraron una disminución en la biomasa de raíz en *Trifolium repens* como respuesta a la infección por WCIMV. Para el peso fresco de follaje y diámetro de tallo, no se observaron diferencias estadísticas en los tratamientos (Figura 3E y F).

El mayor peso de fruto se registró en plantas no inoculadas de chile ancho ‘San Luis’ (T2) que en plantas inoculadas (T1), mientras que en

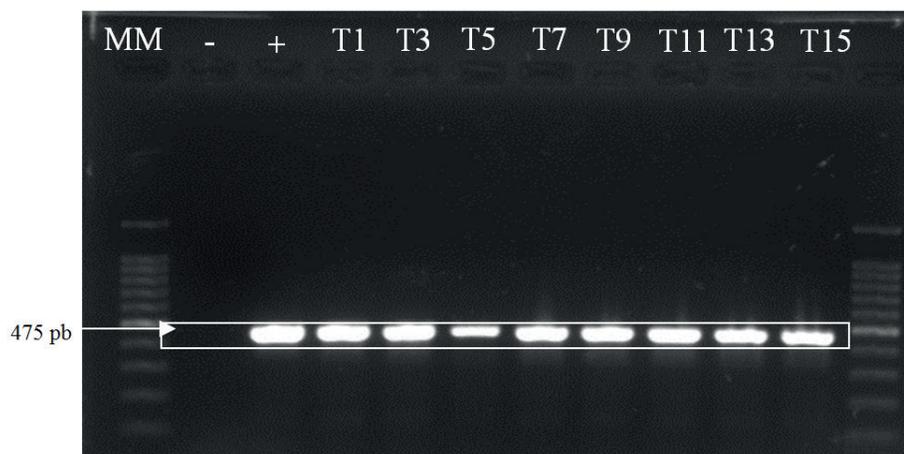


Figura 2. Productos de RT-PCR obtenidos con los iniciadores ToBRFV-FMX/ToBRFV-RMX. MM, marcador molecular 100 pb (Promega®); (-), control negativo; (+), control positivo; T1 (Ancho ‘San Luis’), T3 (Serrano ‘Tampiqueño’), T5 (Habanero), T7 (Árbol ‘Criollo’), T9 (Jalapeño ‘M’), T11 (Húngaro ‘Santa Fe’), T13 (Pimiento cayenne) y T15 (RIL-CM).

Tabla 2. Área foliar afectada en plantas de chile inoculadas con ToBRFV a los 60 días después de la inoculación.

Clases	Severidad (%)
0	0
1	0.1 – 16
2	16.1 - 51.3
3	> 51.4

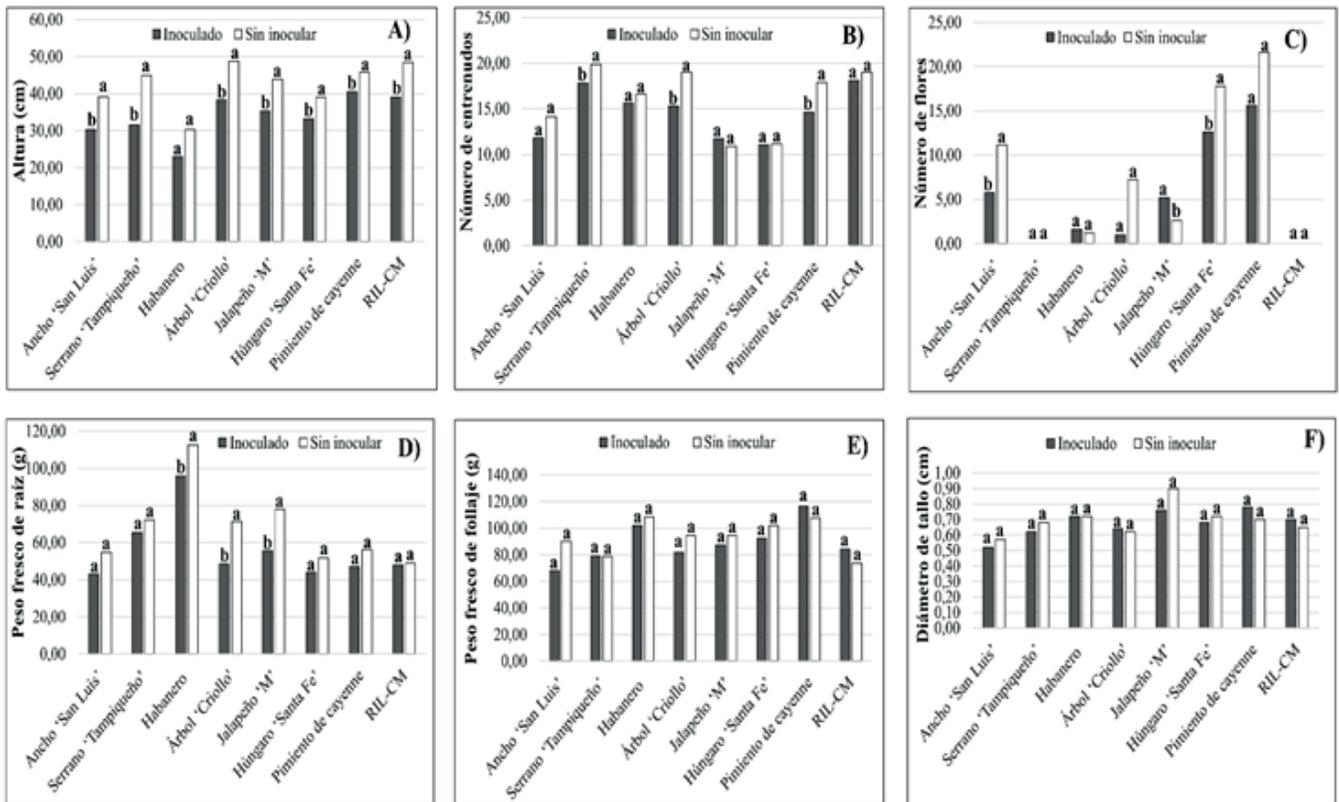


Figura 3. Evaluación de variables morfológicas (A, B, C, D, E, F) y calidad de frutos (G, H, I) en variedades inoculadas (Inoculado) versus no inoculadas (Sin inocular). Dentro de cada variedad, barras con la misma letra no difieren estadísticamente (t-Student, $P \leq 0.05$).

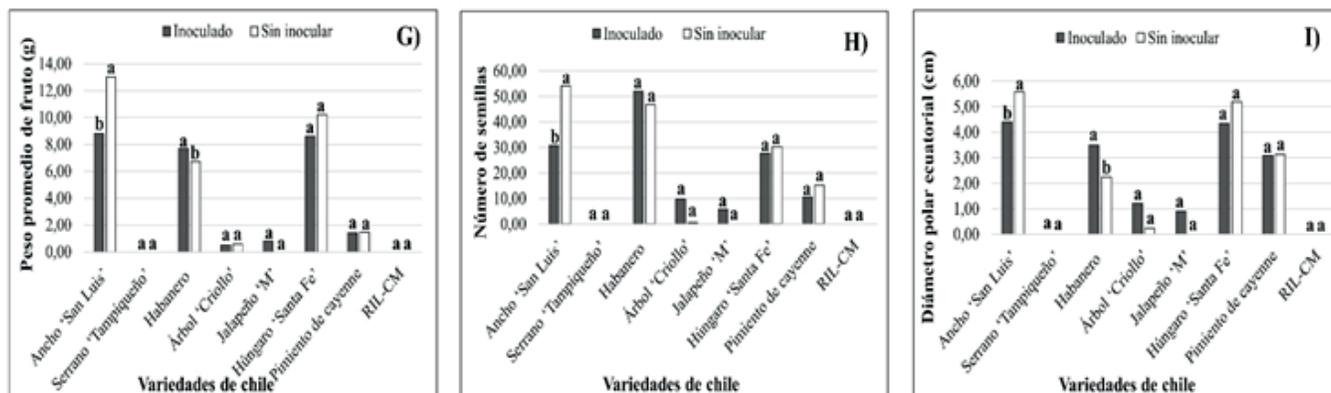


Figura 3. Continuação

plantas inoculadas de Chile habanero (T5) el peso de fruto fue mayor que en plantas no inoculadas (T6) (Figura 3G).

Se tuvo mayor número de semillas en plantas no inoculadas de Chile ancho 'San Luis' (T2) que en plantas inoculadas. En el resto de las variedades no se observaron diferencias significativas (Figura 3H).

Plantas inoculadas de Chile habanero (T5) presentaron mayor diámetro polar-ecuatorial que las plantas no inoculadas (T6), mientras que en Chile ancho 'San Luis', las plantas no inoculadas presentaron mayor diámetro polar-ecuatorial (Figura 3I). Kinyungu et al. (8) reportaron una reducción del rendimiento en plantas de maíz infectadas con *Maize chlorotic mottle virus* y *Sugarcane mosaic virus*.

En este estudio, el ToBRFV afectó significativamente la altura, número de entrenudos, número de flores, peso fresco de raíz, peso promedio de fruto, número de semillas y diámetro polar-ecuatorial en algunas variedades infectadas. Estos resultados indican que la severidad ocasionada por el ToBRFV estuvo asociada a la variedad de Chile. La interacción variedad-patógeno puede determinar la virulencia de este último (22). El Chile habanero fue la variedad menos afectada por el ToBRFV.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al CONACYT por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría en Ciencias en Fitopatología, al Colegio de Postgraduados y a su Consejo Particular.

REFERENCIAS

- Barbier, F.F.; Chabikwa, T.G.; Ahsan, M.U.; Cook, S.E.; Powell, R.; Tannurzio, M.; Beveridge, C.A. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods*, Berlin, v.15, n.62, p.1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3>
- Bargavi, R.; Elumalai, S. Chilli (*Capsicum Annum*) cultivation, diseases, breeding, advanced techniques in biotechnology. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, Bhopal, v.7, n.1, p.171-178, 2010. Disponible en: <http://www.biotech-asia.org/?p=9091>. Acceso en: 18 marzo 2021.
- Bhat, A.I.; Rao, G.P. Symptoms of Virus-Infected Plants. In: Bhat, A.I.; Rao, G.P. *Characterization of Plant Viruses*. New York: Springer, 2020. cap.2, p. 7-22.
- Cambrón-Crisantos, J.M.; Rodríguez-Mendoza, J.; Valencia-Luna, J.B.; Alcasio, R.B.; García-Avila, C.J.; López-Buenfil, J.A.; Ochoa-Martínez, D.L. Primer reporte de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Texcoco, v.37, n.1, p.185-192, 2018. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>
- Equipo RStudio. *RStudio: Desarrollo integrado para R*. Boston: RStudio, 2020. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>. Acceso en: 12 dic. 2020.

- Erickson, A.N.; Markhart, A.H. Flower production, fruit set, and physiology of bell pepper during elevated temperature and vapor pressure deficit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Virginia, v.126, n.6, p.697-702, 2001. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.6.697>
- Harth, J.E.; Winsor, J.A.; Weakland, D.R.; Nowak, K.J.; Ferrari, M.J.; SteSphenon, A.G. Effects of virus infection on pollen production and pollen performance: Implications for the spread of resistance alleles. *American Journal of Botany*, Saint-Louis, v.103, n.3, p.577-583, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1500165>
- Kinyungu, T.N.; Muthomi, J.W.; Subramanian, S.; Miano, D.W.; Olubayo, F.M. Transmission of viruses causing maize lethal necrosis disease through seed in commercial hybrids and effect on growth in the subsequent crop. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, London, v.54, n.3, p.191-207, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1826720>
- Kumari, R.; Bhardwaj, P.; Singh, L.; Zaidi, A.A.; Hallan, V. Biological and Molecular Characterization of Cucumber mosaic virus Subgroup II Isolate Causing Severe Mosaic in Cucumber. *Indian Journal of Virology*, Noida, v.24, n.1, p. 27-34, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0125-9>
- Luria, N.; Smith, E.; Reingold, V.; Bekelman, I.; Lapidot, M.; Levin, I.; Elad, N.; Tam, Y.; Sela, N.; Abu-Ras, A.; Ezra, N.; Haberman, A.; Yitzhak, L.; Lachman, O.; Dombrovsky, A. A new Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-2² resistance genes. *PLOS ONE*, San Francisco, v.12, n.1, p.1-19, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Medina-García, G.; Mena-Covarrubias, G.; Ruiz-Corral, J.A.; Rodríguez-Moreno, V.M.; Soria-Ruiz, J. El cambio climático afecta el número de horas de los rangos térmicos del Chile en el norte-centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Texcoco, v.8, n.8, p.1797-1812, 2017. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.703>
- Menzel, W.; Knierim, D.; Winter, S.; Hamacher, J.; Heupel, M. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports*, London, v.39, n.1, p.1-1, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Mora-Aguilera, G.; Acevedo-Sánchez, G. *Programa para desarrollar escalas de severidad por el método de Horsfall y Barratt*: 2LOG. Versión 2.0. Texcoco, Colegio de Postgraduados, 2018.
- Nutter, Jr. F.W.; Esker, P.D.; Coelho-Netto, R.A. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology*, Amsterdam, v.115, p.95-103, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Ortega-Acosta, S.A.; Velasco-Cruz, C.; Hernández-Morales, J.; Ochoa-Martínez, D.L.; Hernández-Ruiz, J. Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de Jamaica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Texcoco, v.34, n.3, p.270-285, 2016. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-6>
- Panno, S.; Caruso, A.G.; Blanco, G.; Davino, S. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Italy. *New Disease Reports*, London, v.41, n.20, p.20-20, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
- Pérez-Grajales, M.; Castro-Brindis, R. *Guía para la Producción Intensiva de Jitomate en Invernadero*. Texcoco: Universidad Autónoma Chapingo, 1999. v.3, 58p.

18. Rodríguez-Mendoza, J.; García-Ávila, C. de J.; López-Buenfil, J.A.; Araujo-Ruiz, K.; Quezada-Salinas, A.; Cambrón-Crisantos, J.M.; Ochoa-Martínez, D.L. Identificación de Tomato Brown rugose fruit virus por RT-PCR de una región codificante de la replicasa (RdPp). **Revista Mexicana de Fitopatología**, Texcoco, v.37, n.2, p.345-356, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1902-6>
19. Rubio-Hurtado, M.J.; Berlanga-Silvente, V. Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. **Revista d’Innovació i Recerca en Educació**, Catalunya, v.5, n.2, p.83-100, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1344/reire2012.5.2527>
20. Salem, N.; Mansour, A.; Ciuffo, M.; Falk, B.W.; Turina, M. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. **Archives of Virology**, Berlin, v.161, p.503–506, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
21. Sánchez, T.R.A. t-Student. Usos y abusos. **Revista Mexicana de Cardiología**, México, v.26, n.1, p.59-61, 2015. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982015000100009&lng=es&nrm=iso. Acceso en: 18 marzo 2021.
22. Van Mølken, T.; Stuefer, J.F. The potential of plant viruses to promote genotypic diversity via genotype 3 environment interactions. **Annals of Botany**, Exeter, v.107, n.8, p.1391-1397, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcr078>