

First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico

Primer reporte de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en Michoacán, México

José Manuel Cambrón-Crisantos, Johan Rodríguez-Mendoza*, Jessica Berenice Valencia-Luna, Salomé Alcasio Rangel, Clemente de Jesús García-Ávila, José Abel López-Buenfil, Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Carretera Federal México-Pachuca, Km 37.5, CP 55740 Tecámac, Estado de México, México; Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. *Autor para correspondencia: rodriguezjmj@cinvestav.mx

Recibido: 29 de Octubre, 2018.

Aceptado: 06 de Diciembre, 2018.

Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA and Ochoa-Martínez DL. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5

Primera publicación DOI: 10 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 10, 2018.

Resumen. A nivel mundial, la producción de jitomate y chile es de gran relevancia. Recientemente, en Israel y Jordania se notificó la presencia de un nuevo miembro del género *Tobamovirus* en plantaciones de jitomate, al cual se le llamó *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Los frutos de plantas infectadas manifiestan áreas amarillas, necróticas o de color marrón incluso rugosidades. En los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, se han

Abstract. The production of tomato and pepper is of great importance worldwide. Recently, in Israel and Jordan, the presence of a new member of the *Tobamovirus* genus was reported in tomato crops, which was called *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). The fruits of infected plants can develop yellow areas, roughness, as well as necrotic or brown areas. In Yurécuaro and Tanhuato municipalities of Michoacan, crops of tomato and pepper have shown symptoms similar to those described, thus the objective was to determine if the ToBRFV is present in those places. Leaf tissue of tomato with symptoms was included and RT-PCR was performed with primers that amplify a segment of the ORF2 of the genome of this virus; further, grids were prepared for observation under the transmission electron microscope (TEM). The expected amplicon was obtained and the sequences had a similarity of 99 to 100 % with ToBRFV. At the TEM, rigid rod-shaped viral particles typical of tobamoviruses were observed. To our knowledge,

observado cultivos de jitomate y chile con síntomas similares a los antes mencionados por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si el ToBRFV se encuentra presente en estas localidades. Se colectó tejido foliar de jitomate con síntomas y se realizó RT-PCR con iniciadores que amplifican un segmento del ORF2 del genoma de este virus; además, se prepararon rejillas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). Se obtuvo el amplicón esperado y las secuencias tuvieron una similitud de 99 a 100 % con ToBRFV. Al MET se observaron partículas virales en forma de varilla rígida típicas de tobamovirus. Hasta donde sabemos este es el primer reporte de la presencia del ToBRFV asociado a plantas de jitomate y chile cultivados en México.

Palabras clave: *Tobamovirus*, *Solanaceae*, RT-PCR, microscopía electrónica de transmisión

De acuerdo a Dombrovsky y Smith (2017) el comercio mundial de semillas ha contribuido a la transmisión y diseminación de brotes de nuevas enfermedades en diferentes países, particularmente de virus pertenecientes al género *Tobamovirus*, entre ellos el ToBRFV. Los cultivos de tabaco, jitomate y chile (familia *Solanaceae*) son afectados severamente por virus del género *Tobamovirus*: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Dombrovsky y Smith, 2017).

Las especies del género *Tobamovirus* son partículas de varilla rígida, poseen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de ~6.4 kb con cuatro marcos de lectura abierto (ORFs por sus siglas en inglés de *Open reading frames*). El ORF1 y ORF2 están separados por un codón de paro y codifican dos proteínas relacionadas con la replicación

it is the first report of the presence of ToBRFV associated to tomato and pepper plants grown in Mexico.

Key words: *Tobamovirus*, *Solanaceae*, RT-PCR, transmission electron microscopy

According to Dombrovsky and Smith (2017), world seed trade has contributed to the transmission and dissemination of outbreaks of new diseases, particularly from viruses belonging to the genus *Tobamovirus*, including the ToBRFV. Tobacco, tomato and chili pepper (*Solanaceae* family) crops are severely affected by the virus of the genus *Tobamovirus*: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Dombrovsky and Smith, 2017).

The species of the *Tobamovirus* genus have rod-shaped particles, and a positive-sense single-stranded RNA genome of ~6.4 kb with four Open Reading Frames (ORFs). ORF1 and ORF2 are separated by a stop codon and they codify two proteins related to the replication of the virus with a weight of 126 and 183 kDa, respectively. ORF3 codifies the movement protein of 30 kDa, while ORF4 codifies the capsid of 17.5 kDa (Luria *et al.*, 2017).

The tobamoviruses are easily transmitted mechanically and via seeds (infectious particles in the testa) that infect sprouts when they germinate. The virus may remain in plant residues and soils contaminated with the virus for several months, and in infected seeds for several years (Dombrovsky and Smith, 2017).

Recently, in Israel (Luria *et al.*, 2017) and Jordan (Salem *et al.*, 2015), there were reports of tomatoes infected by a new tobamovirus called

del virus con un peso de 126 y 183 kDa, respectivamente. El ORF3 codifica la proteína de movimiento de 30 kDa, mientras que el ORF4 codifica para la cápside de 17.5 kDa (Luria *et al.*, 2017).

Los tobamovirus se transmiten fácilmente de forma mecánica y semilla (partículas infecciosas en la testa) que al germinar infectan las plántulas. El virus puede permanecer en residuos vegetales y suelos contaminados con virus durante varios meses y en semillas infectadas durante varios años (Dombrovsky y Smith, 2017).

Recientemente en Israel (Luria *et al.*, 2017) y Jordania (Salem *et al.*, 2015) se reportó un nuevo tobamovirus denominado *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) infectando jitomate, el cual ocasiona una reducción en la cantidad de flores y frutos, necrosis en el pedúnculo del fruto y hojas del cáliz. En los frutos de plantas enfermas se observan áreas de color amarillo o marrón y rugosidades en su superficie (Salem *et al.*, 2015).

En 2018, productores de jitomate y chile de la región de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, han reportado síntomas en frutos con coloración amarilla, manchas verdes y deformación, estriado verde y manchas irregulares color marrón (**Fig. 1a**) y en hojas síntomas de mosaico, moteado y amarillamiento. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el ToBRFV se encuentra presente en Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, afectando los cultivos de jitomate y chile.

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. En septiembre de 2018, en los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, se colectó tejido foliar, flores y frutos de plantas de jitomate y chile con síntomas de la enfermedad: frutos con coloraciones amarillas, manchas y estriados verdes, manchas irregulares de color marrón y deformación, mientras que en el follaje, moteados cloróticos y mosaicos. En flores no se observaron

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), which causes a reduction in the amount of flowers and fruits, necrosis in the peduncle of the fruit and leaves of the calyx. The fruits of infected plants presented yellow or brown areas and rough areas on their surface (Salem *et al.*, 2015).

In 2018, tomato and chili farmers of the region of Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, have reported symptoms on fruits regarding yellow colors, green spots and deformations, green grooves and irregular brown spots (**Fig. 1a**), and on leaves, mosaic symptoms, spots and yellowing. The aim of the present work was to determine if ToBRFV is present in Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, affecting tomato and chili crops.

The present study was carried out in the facilities of the National Plant Health Reference Center. In September of 2018, in the municipal areas of Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, leaf tissue, flowers and fruits were taken from tomato and chili plants with symptoms of the disease: fruits showing yellowing, spots and green grooves, irregular brown spots and deformation, while the foliage presented chlorotic spots and mosaic. No symptoms were found in flowers, according to reports by other authors. In Yurecuaro, two samples were taken of tomato plants in different production units, and in Tanhuato, six samples were taken (five of tomato and one of chili). The samples were properly labeled and taken to the laboratory, where they were maintained at 4 °C.

In each sample, midribs of the leaves were separated and cut transversally to divide the sample into two parts: the first was used for the preparation of grids for the transmission electron microscope, and the second, for the extraction of total RNA.

Central midribs of infected leaves (0.1 g) were grinded in 500 µL of bi-distilled water using a sterile plastic mortar; the macerate was centrifuged at 9000 g for three minutes to eliminate any

síntomas de acuerdo a lo reportado por otros autores. En Yurécuaro se tomaron dos muestras simples dirigidas de plantas de jitomate de diferentes unidades de producción y en Tanhuato seis muestras (cinco de jitomate y una de chile). Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio donde fueron resguardadas a 4 °C hasta su análisis.

De cada muestra, se separó la nervadura central de las hojas y se les realizó un corte trasversal para dividir la muestra en dos partes: la primera se utilizó para la preparación de rejillas y observarlas al microscopio electrónico de transmisión, y la segunda para la extracción de RNA total.

Se maceró 0.1 g de nervadura central de hojas infectadas en 500 µL de agua bidestilada con un pistilo de plástico estéril; el macerado fue centrifugado a 9000 g durante tres minutos para eliminar restos de tejido vegetal. Sobre rejillas de cobre de 300 mallas (Electron Microscopy Sciences®) recubiertas con una membrana de formvar/carbon® se colocaron 10 µL de sobrenadante y 10 µL de ácido fosfotúngstico al 1 % (Fluka analytical), se mezclaron por pipeteo y se dejaron durante 30 segundos, al término de los cuales se eliminó el exceso con un pedazo de papel filtro. Las rejillas se observaron por microscopía electrónica de transmisión y las imágenes fueron fotografiadas.

El RNA total se extrajo a partir de 100 mg de nervaduras centrales con el Kit SV Total RNA Isolation System Start-Up® (Promega™), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría (Nano Drop 2000®, Thermo Scientific™).

La retrotranscripción se realizó con iniciadores aleatorios (Random Hexamer, Invitrogen™), siguiendo las indicaciones del fabricante con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 42 °C por 30 min, 1 ciclo a 99 °C por 5 min y

remaining plant tissue. Copper grids of 300 mesh (Electron Microscopy Sciences®) covered with a formvar/carbon® membrane, were covered with 10 µL of supernatant and 10 µL of phosphotungstic acid at 1 % (Fluka analytical), both were mixed with a pipette and left them for 30 seconds and the excess was eliminated with a piece of filter paper. Grids were observed under a transmission electron microscope and the images were photographed.

Total RNA was extracted from 100 mg of central midribs by the SV Total RNA Isolation System Start-Up® (Promega™) kit, according to the indications of the manufacturer. The purity and concentration of the RNA extracted was quantified by spectrophotometry (Nano Drop 2000®, Thermo Scientific™).

Retrotranscription was carried out using random primers (Random Hexamer, Invitrogen™), according to the manufacturer instructions. Conditions of amplification were: 1 cycle at 42 °C for 30 min, 1 cycle at 99 °C for 5 min, and finally, 12 °C for 5 min. PCR was performed with primers F-3666 (5'-ATGGTACGAACGGCGGCAG-3') and R-4718 (5'-CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC-3') which amplified a fragment of 1052 pb of ORF2 (Luria *et al.*, 2017). The reaction mixture consisted of 12.5 µL of Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (2X) (Invitrogen), 5 µL of Super Fi™ GC Enhancer (5X) (Invitrogen), 3 µL of molecular biology degree water (Invitrogen), 1.25 µL of primer F-3666 (10 µM), 1.25 µL of primer R-4718 (10 µM) and 2 µL of cDNA template, in a final volume of 25 µL. The amplification was performed under the following conditions: 1 cycle at 98 °C for 5 min, 25 cycles at 98 °C for 1 min, 62 °C for 3 min and 72 °C for 3 min with a final extension of 72 °C for 10 min. The amplified products were observed by electrophoresis in an agarose gel at 1.5 %.

finalmente a 12 °C durante 5 min. En la PCR se usaron los iniciadores F-3666 (5'-ATGGTACGA-ACGGCGGCAG-3') y R-4718 (5'-CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC-3') que amplifican un fragmento de 1052 pb del ORF2 (Luria *et al.*, 2017). La mezcla de reacción consistió en 12.5 µL de Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (2X) (Invitrogen), 5 µL de Super Fi™ GC Enhancer (5X) (Invitrogen), 3 µL de agua grado biología molecular (Invitrogen), 1.25 µL del primer F-3666 (10 µM), 1.25 µL del primer R-4718 (10 µM) y 2 µL del templado de cDNA, en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 98 °C por 5 min, 25 ciclos a 98 °C por 1 min, 62 °C por 3 min y 72 °C por 3 min con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 %.

Los productos de la RT-PCR fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, utilizando el equipo Applied Biosystems modelo 3130; las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas para obtener tamaños de 900 pb y comparadas en la base de datos del GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). El alineamiento local se realizó utilizando el programa MEGA v7.0.26 y el algoritmo MUSCLE. Se construyó una matriz con secuencias de *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) para realizar un análisis filogenético. Se usaron como grupo externo dos secuencias correspondientes a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (NC_003630.1) y *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (AB078435.1). Se usó el método *Maximum Likelihood* (ML) basado en el modelo de Tamura-Nei, con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-

RT-PCR products were sequenced in the National Plant Health Reference Center Molecular Biology Lab. (Applied Biosystems, model 3130); sequences were assembled and edited to obtain sizes of 900 bp, and compared in the GenBank database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Local alignment was carried out with MEGA v7.0.26 and the algorithm MUSCLE. A matrix was built with *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) sequences to carry out a phylogenetic analysis. As an external group, we used two sequences from *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (NC_003630.1) and *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (AB078435.1). The *Maximum Likelihood* (ML) model was used, based on the model by Tamura-Nei, with 1000 bootstrap iterations. The initial trees for the heuristic analysis were obtained automatically by applying the Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a distance by estimated pairs matrix, using the *Maximum Composite Likelihood* (MCL) approach and selecting the topology with a higher log verosimilitude value with MEGA v7.0.26.

Symptoms in tomato fruits and plants observed in Yurecuaro and Tanhuato were similar to those reported by Luria *et al.* (2017) and Salem *et al.* (2015) (**Figure 1a**). The samples analyzed amplified the expected product of 1052 bp. Sequences obtained from samples M1 (MK273183), M2 (MK273184), M5 (MK273187) and M7 (MK273189) had a similarity of 100 % with those from Israel (KX619418.1) and Jordan (KT383474.1), while samples M3 (MK273185), M4 (MK273186), M6 (MK273188) and M8 (MK273190) had a similarity of 99 % for both isolates (**Figure 1b**).

The phylogenetic tree with the highest probability of registering (-2680.43) shows that the sequences of samples M1-M8 were grouped within

Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior con el programa MEGA v7.0.26.

Los síntomas en frutos y plantas de jitomate colectadas en Yurécuaro y Tanhuato fueron similares a los reportados por Luria *et al.* (2017) y Salem *et al.* (2015) (**Figura 1a**). Las muestras analizadas amplificaron el producto esperado de 1052 pb. Las secuencias obtenidas de las muestras M1 (MK273183), M2 (MK273184), M5 (MK273187) y M7 (MK273189) tuvieron 100 % de identidad con las secuencias de las muestras identificadas en Israel (KX619418.1) y Jordania (KT383474.1), mientras que las muestras M3 (MK273185), M4 (MK273186), M6 (MK273188) y M8 (MK273190) mostraron 99 % de identidad con las secuencias de Israel y Jordania. (**Figura 1b**).

En el árbol filogenético con la mayor probabilidad de registro (-2680.43) se observa que las secuencias de las muestras M1-M8 se agruparon dentro del nodo que tiene las secuencias de Israel (KX619418.1) y Jordania (KT383474.1) (**Figura 1c**). Todos los grupos correspondientes a las otras especies de *Tobamovirus* tienen porcentajes de inferencia del 90 – 100 % a partir de 1000 iteraciones bootstrap. En las rejillas preparadas con extractos de hojas de jitomate se observaron partículas virales en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 nm de longitud similares a las reportadas por Luria *et al.* (2017) (**Figura 1d**).

Estos resultados indican la presencia de *Tomato brown rugose fruit virus* asociadas a plantas de jitomate y chile colectadas en Yurécuaro y Tanhuato y sugieren que proceden de semilla comercial producida en Israel y Jordania. El ToBRFV solo ha sido reportado en Asia y Medio Oriente y se tienen reportes sobre su fácil diseminación mecánica y por semillas (Dombrovsky y Smith, 2017). Con base

the node that contains the Israeli (KX619418.1) and Jordanian sequences (KT383474.1) (**Figure 1c**). All groups of tobamoviruses have percentages of inference of 90 – 100 % from 1000 bootstrap iterations. In grids prepared with tomato leaf extracts, rod-shaped viral particles of approximately 300 nm in length, similar to those reported by Luria *et al.* (2017) were observed (**Figure 1d**).

These results indicate the presence of *Tomato brown rugose fruit virus* associated to tomato and chili pepper plants collected in Yurecuaro and Tanhuato, and suggest its introduction by commercial seeds produced in Israel and Jordan. The ToBRFV has only been reported in Asia and the Middle East, and there are reports that is easily mechanically transmitted and disseminated by seed (Dombrovsky and Smith, 2017). Based on the results obtained, it is necessary to carry out pathogenicity tests in the future.

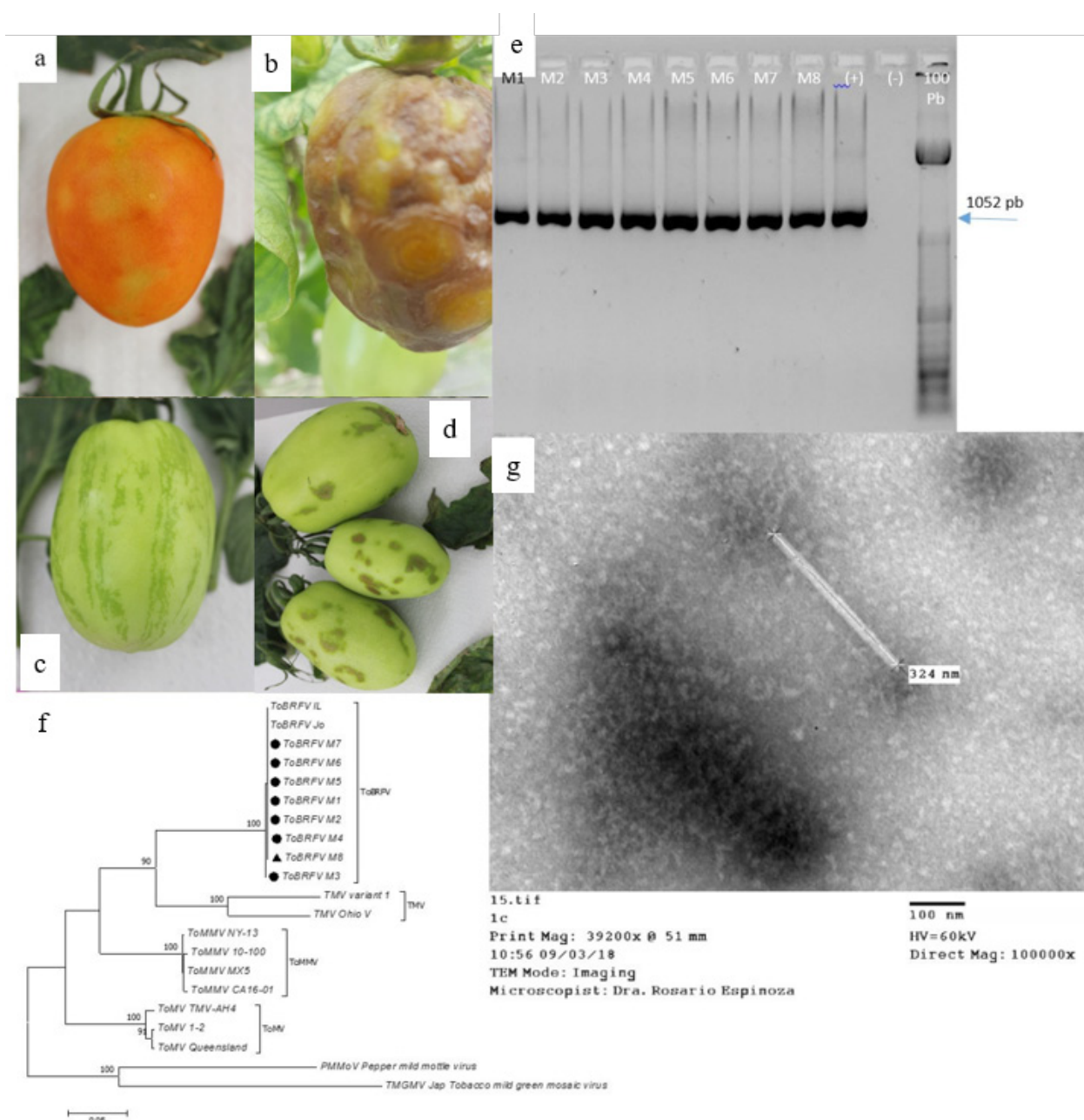
CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the present study, it is established that *Tomato brown rugose fruit virus* is associated to commercial tomato and chili pepper crops from Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan. These plants presented the symptoms described by Luria *et al.* (2017) and Salem *et al.* (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

To José Antonio Castro Mora and Jorge Torres Faburrieta of the Plant Health Epidemiological Surveillance Program of the state of Michoacan for their support for the collection of plants in the field. To Dr. Rosario Espinoza Mellado of the National School for Biological Science of the IPN for her technical assistance for the capturing of images at the transmission electron microscopy.

~~~~~ End of the English version ~~~~~



**Figura 1.** Síntomas observados en frutos de jitomate positivos al ToBRFV. Frutos con coloraciones amarillas (a), manchas verde y deformación (b), estriado verde (c) y frutos con manchas marrón (d). Productos de 1052 pb obtenidos por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos para el género *Tobamovirus* (e). Árbol de máxima probabilidad de las secuencias del fragmento ORF2 de muestras ToBRFV con otros *Tobamovirus* (TMV, ToMMV y ToMV) (f). Partícula viral en forma de varilla rígida presente en muestras de jitomate característico de *Tobamovirus* (g).

**Figure 1.** Symptoms observed on tomato samples positive for ToBRFV. Fruits with yellow colourations (a), green spots and deformation (b), green striate (c) and fruits with brown spots (d). Products of 1052 bp obtained by RT-PCR using the oligonucleotides for the *Tobamovirus* genus (e). Maximum-likelihood tree of sequences of fragment ORF2 from samples ToBRFV with others *Tobamovirus* (TMV, ToMMV and ToMV) (f). Viral rods particle present in tomato samples characteristic of *Tobamovirus* (g).

a los resultados obtenidos, se considera necesario que en el futuro se realicen las pruebas de patogenicidad correspondientes.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se establece que el *Tomato brown rugose fruit virus* se encuentra asociado a plantas de jitomate y chile de cultivos comerciales en los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán. Estas plantas presentaron los síntomas descritos por Luria *et al.* (2017) y Salem *et al.* (2015).

## AGRADECIMIENTOS

A los ingenieros José Antonio Castro Mora y Jorge Torres Faburrieta del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Estado de Michoacán por el apoyo para la colecta de plantas en campo. A la Dra. Rosario Espinoza Mellado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por la asistencia técnica para la toma de imágenes de microscopía electrónica.

## LITERATURA CITADA

- Dombrovsky A and Smith E. 2017. Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. pp: 234-260. *In*: Jose C. Jimenez-Lopez (ed.). Seed Biology. IntechOpen. 338p. <http://doi.org/10.5772/intechopen.70244>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I and Dombrovsky A. 2017. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm- 22 resistance genes. PLoS ONE 12(1): 1–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW and Turina M. 2015. A new Tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Archives of Virology 161(2): 503–506. <http://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>.