



Necrosis de tallo, sépalos y frutos causada por el ToBRFV.

Salvatore Walter  
Davino, Stefano  
Panno

Department of  
Agricultural, Food  
and Forest Sciences,  
University of Palermo  
(Italia)

## *Tomato brown rugose fruit virus: una nueva amenaza para el tomate en Europa*

El patógeno *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) -virus rugoso del tomate- es un tobamovirus muy peligroso que causa enfermedades graves en los cultivos de pimiento y de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En Italia, el primer brote de ToBRFV en el cultivo de tomate se produjo en varias provincias sicilianas a finales de 2018. Se llevó a cabo en Sicilia un estudio epidemiológico con caracterización molecular y biológica de aislado del ToBRFV.

El muestreo se realizó de octubre de 2018 a finales de septiembre de 2019. Durante este periodo, se recogieron tres mil muestras que fueron analizadas mediante inmunocaptura-RT-PCR en tiempo real por Panno y sus colaboradores (2019). La caracterización molecular del aislado siciliano ToB-SIC01/19, con genoma de 6.391 nt, mostró una identidad del 99 % con los aislados de TBRFV-P12-3H y TBRFV-P12-3G de Alemania, Tom1-Jo de Jordania y TBRFV-IL de Israel. Se logró la transmisión del ToB-SIC1/19 a *Solanum lycopersicum* L. y a *Capsicum annuum* L. a través de inoculaciones mecánicas. El estudio examinó la dispersión y la diversidad genética de los aislados de ToBRFV en Sicilia. Se analizaron un total de dos mil plantas de tomate. El mayor porcentaje de dispersión de ToBRFV en Sicilia se observó en la provincia de Ragusa. No obstante, la incidencia de ToBRFV en otras provincias parece ser crítica, salvo en la provincia de Agrigento. La rápida propagación del ToBRFV en Sicilia puede representar una seria amenaza para la producción de tomate; consecuentemente, es muy importante llevar a cabo un manejo adecuado de los cultivos mediante aplicación de estrategias de resistencia genética y de medidas fitosanitarias más restrictivas.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo hortícola de gran importancia, como prueba su producción mundial, que en 2017 superó los 182 millones de toneladas (FAO, 2017). En los últimos años, la presencia de enfermedades endémicas y la aparición de nuevos patógenos -y la probabilidad de su establecimiento- están haciendo estragos en el cultivo de tomate. Entre los patógenos más comunes, y también más peligrosos, se encuentran los virus, responsables de pérdidas económicas considerables en todo el mundo (Hanssen y col., 2010). De hecho, la producción de tomate de invernadero en Italia está sufriendo importantes pérdidas debido a la presencia en los cultivos de virus diferentes, como el virus del mosaico del pepino (PepMV), el virus del mosaico del tomate (ToMV), el virus del bronceado del tomate (TSWV) (Panno y col., 2012), el virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) (Panno y col., 2019a), el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) – virus del rizado amarillo del tomate de Cerdeña (TYLCSV), virus recombinantes de ambos (Davino y col., 2009, 2012; Panno y col., 2018) y, desde finales de 2018, el *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Panno y col., 2019b). La introducción del ToBRFV en Sicilia a lo largo del último año ha podido producirse por dos vías: bien a través de frutos infectados y su posterior manipulación, bien a través de semillas infectadas. Desde octubre de 2018, el ToBRFV ha sido responsable de brotes graves en los cultivos de tomate de las provincias sicilianas. En Jordania, en 2016, Salem y su equipo de colaboradores (2016) realizaron la primera descripción del ToBRFV en plantas de tomate cultivadas en invernadero. A esta descripción siguió la que se llevó a cabo en Israel en 2017 en plantas de tomate con el gen Tm-22 (Luria y col., 2017). Más tarde se detectó en México, en cultivos de tomate y pimiento (Cambrón-Crisantos y col., 2018), y posteriormente se propagó por Alemania, Estados Unidos (California), Palestina, Italia y Turquía (Menzel y col., 2019; Ling y col., 2019; Alkowni y col., 2019; Panno y col., 2019b; Fidan y col., 2019). Este virus pertenece al género Tobamovirus, familia Virgaviridae. Su genoma



Coloración marmórea en la piel del tomate inducida por el ToBRFV.

consiste en ARN monocatenario de sentido positivo (ARNg) de ~ 6.400 nucleótidos (nt), con 4 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican dos proteínas de 126 y de 183 kDa relacionadas con la replicación, en las que la segunda se expresa con supresión parcial del codón de terminación (ORF1 y ORF2), una proteína de movimiento (MP) de 30 kDa (ORF3) y la proteína de recubrimiento (CP) de 17,5 kDa (ORF4), que se expresan a través de ARN subgenómicos (sgRNAs) 3'-coterminales (Salem y col., 2016).

Los síntomas del ToBRFV incluyen la deformación de las hojas de tomate, mosaico y amarilleamiento en las venas de las hojas, deformación y necrosis de hojas jóvenes, deformación y necrosis de sépalos y decoloración, deformación y necrosis de frutos jóvenes (Figuras 1, 2 y 3). El ToBRFV se transmite por contacto, a través de, por ejemplo, herramientas contaminadas, las manos, la ropa, el contacto directo de planta a planta, material de propagación, abejorros y semillas (Levitzky y col., 2019). El

presente trabajo tiene como objetivo la caracterización del ToBRFV detectado en Sicilia y el estudio de la propagación de este patógeno en la isla tras los primeros brotes de octubre de 2018 en plantas de tomate (Panno y col., 2019b).

## Materiales y métodos

Para caracterizar el ToBRFV siciliano se utilizó el aislado recogido anteriormente, en octubre de 2018, denominado ToB-SIC01/19.

## Caracterización biológica

El ToBRFV-ToB-SIC01/19 se transmitió mecánicamente a tres plantas de diferentes huéspedes (*Solanum lycopersicum* L., *Solanum melongena* L. y *Capsicum annuum* L.) para llevar a cabo posteriormente su caracterización biológica. Las plantas se cultivaron en suelo esterilizado en un invernadero a prueba de insectos, con un fotoperíodo de 14 horas de luz y una temperatura de aire objetiva fijada en 28/20°C, día/noche. Se realizó un informe semanal de los síntomas y se evaluó la presencia de ToBRFV a

30 ppp por inmunocaptura-RT-PCR en tiempo real (Panno y col., 2019c).

### Caracterización molecular

La secuenciación completa del genoma del aislado de ToB-SIC01/19 se realizó mediante *primer walking* (paseo con cebador) (Knippers y Alpert, 1999), de acuerdo con el procedimiento descrito por Luria y su equipo (2017). Los productos obtenidos se confirmaron mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron usando tinción Sybrsafe. Se purificaron y se secuenciaron los productos en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el programa Contig con software Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, CA, EE. UU.) para obtener la secuencia completa de novo del genoma de ToBRFV. La secuencia obtenida se comparó con las secuencias recién depositadas en GenBank.

### Propagación del ToBRFV en Sicilia

En las provincias de Ragusa, Siracusa, Caltanissetta y Agrigento se recogieron un total de dos mil muestras de tomate en dos períodos diferentes: mil en octubre de 2018 y otras mil en julio de 2019. Las áreas de muestreo se identificaron con GPS mediante la aplicación móvil PLANTHOLOGY (Davino y col., 2017). En cada provincia se recogieron 250 muestras en dos fincas diferentes, de acuerdo con el siguiente esquema: se seleccionaron 25 hileras de entre 250 hileras de plantas (una por cada diez hileras). En cada hilera seleccionada, se tomó una muestra cada diez plantas, hasta alcanzar un total de diez muestras por hilera. Las muestras recogidas se molieron en tampón de extracción (sulfito de sodio anhidro 1,3 g, polivinilpirrolidona MW 24-40.000 20 g, albúmina en polvo de huevo (pollo), Grado II 2 g, Tween-20 20 g en 1 l de agua destilada, pH 7,4) y se almacenaron a +4 °C. Se incubaron en tubos de PCR en tiempo real a 37 °C durante una hora con 100 µl de anticuerpo policlonal para TMV (AGDIA, Elkhart, IN, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se usó tampón de lavado estándar para la limpieza de los



Mosaico y deformación graves en las hojas de tomate causados por el ToBRFV.

tubos; estos se secaron y se añadió 100 µl de las muestras previamente preparadas. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, los tubos se limpiaron con tampón de lavado estándar. Se añadió a cada tubo una mezcla para ensayo de RT-PCR en tiempo real con sonda TaqMan MGB de 12 µl de volumen final, que contenía 0,5 µM de cebador directo (*forward primer*) ToB5520F (5'-GTAAGGCTTGCAAAATTTCTCG-3') y cebador inverso (*reverse primer*) ToB5598R (5'-CTTTGGTTT-TGTCTGGTTTCTCG-3'), 0,25 mM de sonda TaqMan MGB (FAM-GTT-TAGTAGTAAAAGTGAGAAT-MGB) (Panno y col., 2019c), 0,5 µl de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), 6 µl de 2X QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix, 0,2 µl de QN Probe RT-Mix y agua H<sub>2</sub>O DEPC para alcanzar el volumen final. Las condiciones del ciclo consistieron en transcripción inversa a

45°C durante 10 min, desnaturalización enzimática a 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 95°C durante 5 s y 60°C durante 60 s con fluorescencia medida al final de cada ciclo.

### Resultados

#### Caracterización biológica

Se produjo la transmisión del ToB-SIC01/19 en todas las plantas de *S. lycopersicum* y *C. annuum*, pero no se dio en el caso de *S. melongena*. En el tomate, 22 días después de la inoculación se observaron los siguientes síntomas: amarilleamiento intervenal, deformación y mosaico en hojas jóvenes. En el caso del pimiento, los síntomas aparecieron a los 23 días tras la inoculación y consistieron en necrosis del tallo y amarilleamiento intervenal en las hojas jóvenes. El ensayo de RT-PCR en tiempo real a los treinta días de la inoculación

confirmó la presencia de ToBRFV en plantas de tomate y pimiento y su ausencia en la berenjena.

### Caracterización molecular

Se secuenció por completo el ARNm del aislado de ToBRFV denominado ToB-SIC01/19 de Sicilia. El genoma del ToB-SIC01/19 tiene una longitud de 6.391 nucleótidos y su organización responde a la descrita para el ToBRFV (Luria y col., 2017). El ToB-SIC01/19 mostró unos porcentajes de identidad del 99,8%, 99,7%, 99,7% y 99,7% con las secuencias de TBRFV-P12-3H (Alemania; Acc. N. ° MK133095), TBRFV-P12-3G (Alemania; Acc. N. ° MK133093), Tom1-Jo (Jordania, Acc. N. ° KT383474) y TBRFV-IL (Israel, Acc. N. ° KX619418), respectivamente. Posteriormente, se comparó la identidad de los nucleótidos de los genes individuales del aislado de ToB-SIC 01/19 con los genes correspondientes de las secuencias de TBRFV-P12-3H, TBRFV-P12-3G, Tom1-Jo y TBRFV-IL. El gen que codifica la proteína de recubrimiento mostró una identidad de nucleótidos del 100%, 99,8%, 99,8% y 99,8% con las secuencias del TBRFV-P12-3G (Alemania; Acc. N. ° MK133093), TBRFV-P12-3H (Alemania; Acc. N. ° MK133095), Tom1-Jo (Jordania, Acc. No KT383474) y TBRFV-IL (Israel, Acc. N. ° KX619418), respectivamente. El gen que codifica la proteína de movimiento mostró una identidad de nucleótidos de 99,9%, 99,9%, 99,8% y 99,8% con las secuencias del TBRFV-P12-3G (Alemania; Acc. N. ° MK133093), Tom1-Jo (Jordania, Acc. MK383474), TBRFV-P12-3H (Alemania; Acc. N. ° KT133095) y TBRFV-IL (Israel, Acc. N. ° KX619418), respectivamente. El gen que codifica la proteína de 126 KDa mostró una identidad de nucleótidos del 99,8%, 99,8% 99,8% y 99,7% con las secuencias de TBRFV-P12-3H (Alemania; Acc. N. ° MK133095), Tom1-Jo (Jordania, Acc. N. ° KT383474) y TBRFV-IL (Israel, Acc. MK383474), TBRFV-P12-3G (Alemania; Acc. N. ° MK133093), respectivamente. El gen que codifica la proteína de 183 KDa mostró una identidad de nucleótidos del 99,8% con las secuencias del TBRFV-P12-3H (Alemania; Acc. N. ° MK133095), TBRFV-P12-3G (Alemania; Acc. N. ° MK133093), Tom1-Jo (Jordania, Acc. N. ° KT383474) y TBRFV-IL (Israel, Acc. N. ° KX619418).

Province		October 2018		July 2019	
		No. of samples collected	No. of positive samples	No. of samples collected	No. of positive samples
Ragusa	Farm 1	125	81	125	79
	Farm 2	125	62	125	65
	<b>subtotal</b>	<b>250</b>	<b>143</b>	<b>250</b>	<b>144</b>
Agrigento	Farm 1	125	15	125	0
	Farm 2	125	32	125	0
	<b>subtotal</b>	<b>250</b>	<b>47</b>	<b>250</b>	<b>0</b>
Siracusa	Farm 1	125	63	125	54
	Farm 2	125	47	125	39
	<b>subtotal</b>	<b>250</b>	<b>110</b>	<b>250</b>	<b>93</b>
Caltanissetta	Farm 1	125	72	125	45
	Farm 2	125	68	125	42
	<b>subtotal</b>	<b>250</b>	<b>140</b>	<b>250</b>	<b>87</b>
<b>Total</b>		<b>1,000</b>	<b>440</b>	<b>1,000</b>	<b>320</b>

Tabla 1. Incidencia de ToBRFV en cuatro provincias sicilianas.

### Propagación del ToBRFV en Sicilia

Un total de 440 muestras de las mil recogidas en octubre de 2018 dieron resultados positivos en la inmunocaptura-RT-PCR en tiempo real, mientras que de las muestras recogidas en 2019 solo 320 de mil dieron resultados positivos (Tabla 1), con una disminución de la propagación del 44% al 32%. En particular, en la provincia de Ragusa la incidencia de la enfermedad no varió, mientras que en la provincia de Agrigento la enfermedad desapareció en las áreas de investigación, probablemente debido a la erradicación inmediata del primer brote. En la provincia de Siracusa, la enfermedad mostró una tendencia descendente del 44% en 2018 al 37,2% en 2019 y en la provincia de Caltanissetta la incidencia de la enfermedad mostró una disminución del 56% en 2018 al 34,8% en 2019.

### Conclusión

La región de Sicilia es una de las áreas de producción de tomate más importantes de la cuenca mediterránea y la isla es el principal punto de acceso de material vegetal a los países europeos. Esta situación supone un grave riesgo para la producción agrícola y pone en peligro el futuro de la horticultura italiana. El brote de ToBRFV representa una amenaza debido a sus múltiples métodos de transmisión y a la ausencia de variedades de tomate y de pimiento resistentes. Actualmente, solo

se puede contener la expansión del ToBRFV con dos herramientas para reducir la introducción y la posterior propagación de ToBRFV por otros países: el diagnóstico precoz y la implementación de medidas preventivas en el manejo de cultivos. La caracterización biológica del aislado de ToB-SIC01/19 mostró la posibilidad de la transmisión mecánica en plantas de tomate y pimiento, tal y como habían descrito anteriormente Luria y col. (2017). La caracterización molecular demostró que el aislado siciliano de ToBRFV ToB-SIC01/19 presenta un porcentaje de identidad del 99% con las secuencias de los aislados de Alemania, Jordania e Israel (Menzel y col., 2019; Salem y col., 2016; Luria y col., 2017). Dado que el ToBRFV se propagó en pocos años por los países de la cuenca mediterránea y por América Central, la escasa variabilidad encontrada entre los aislados respalda la hipótesis de que la reciente introducción en Italia probablemente se produjo a través de semillas infectadas (Panno y col., 2019c). Hasta la fecha, las dos únicas herramientas disponibles para controlar el ToBRFV en todo el mundo son el diagnóstico precoz y la implementación de medidas preventivas de manejo de cultivos, que representan una valiosa ayuda para reducir la introducción y posterior difusión del ToBRFV en otras regiones italianas y europeas.

## Bibliografía

- Alkowni R, Alabdallah O, Fadda Z. 2019. Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology* 101(3):719–723 DOI 10.1007/s42161-019-00240-7.
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Rangel SA, De Jesús García-Ávila C, López-Buenfil JA. 2018. First report of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1):185–192 DOI 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5.
- Davino S, Panno S, Arrigo M, La Rocca M, Caruso AG, Bosco GL. 2017a. Planthology: an application system for plant diseases management. *Chemical Engineering Transactions* 58:619–624 DOI 10.3303/CET1758104.
- Davino S, Miozzi L, Panno S, Rubio L, Davino M, Accotto GP. 2012. Recombination profiles between Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications. *Journal of General Virology* 93(Pt\_12):2712–2717 DOI 10.1099/vir.0.045773-0.
- Davino S, Napoli C, Dellacroce C, Miozzi L, Noris E, Davino M, Accotto GP. 2009. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. *Virus Research* 143:15–23 DOI 10.1016/j.virusres.2009.03.001.
- FAO. 2017. Food and agriculture organization of the United Nations. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed 7 May 2019).
- Fidan H, Sarikaya P, Calis O. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. *New Disease Reports* 39:18 DOI 10.5197/j.2044-0588.2019.039.018.
- Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BPHJ. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5):539–548 DOI 10.1094/MPMI-23-5-0539.
- Knippers R, Alpert CA. 1999. Recombinant DNA technology. In: Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG, eds. *Biology of the Prokaryotes*. Oxford: Blackwell Science, 416–436.
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, Sela N, Laskar O, Milrot E, Dombrovsky A. 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLOS ONE* 14(1): e0210871 DOI 10.1371/journal.pone.0210871.
- Ling K-S, Tian T, Gerung S, Salami R, Gilliard A. 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease* 103(6):1439 DOI 10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN.
- Luria N, Smith E, Rheingold V, Benkelman I, Lapidot M, Levin I, Lead N, Tam Y, Sela N, Abu-Raps A, Ezra N, Huberman A, Yitzhak L, Lachman O, Dombrovsky A. 2017. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harbouring Tm-22 resistance genes. *PLOS ONE* 12(1):1–19 DOI 10.1371/journal.pone.0170429.
- Mendel W, Kiera D, Winter S, Hamachi J, Heaped M. 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports* 39:1 DOI 10.5197/j.2044-0588.2019.039.001.
- Panno S, Caruso AG, Troiano E, Luigi M, Mangle A, Vatrano T, Iacovo G, Marchionni S, Bergin S, Tomaso L, Parelli G, Davino S. 2019 a. Emergence of tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: estimation of incidence and genetic diversity. *Plant Pathology* 68(3):601–608 DOI 10.1111/ppa.12978.
- Panno S, Caruso AG, Davino S. 2019b. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* 103(6):1443 DOI 10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN.
- Panno S, Ruiz-Ruiz S, Caruso A. G., Alfaro-Fernandez, A., San Ambrosia, M. I. F., & Davino, S. 2019c. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato brown rugose fruit virus and comparison with other techniques. *Peer* DOI 10.7717/peerj.7928
- Panno S, Caruso AG, Davino S. 2018. The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene. *Archives of Virology* 163(3):795–797 DOI 10.1007/s00705-017-3674-9.
- Panno S, Davino S, Rubio L, Rangel E, Davino M, García-Hernández J, Olmos A. 2012. Simultaneous detection of the seven main tomato-infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reactions. *Journal of Virological Methods* 186(1–2):152–156 DOI 10.1016/j.jviromet.2012.08.003.
- Salem N, Mansour A, Cuff M, Falk BW, Turin M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161(2):503–506 DOI 10.1007/s00705-015-2677-7.