



Nota Fitopatológica

Variabilidad genética de dos aislados mexicanos de *Tomato brown rugose fruit virus* y expresión de síntomas en jitomate y chile

Norma Ávila-Alistac¹, Gustavo Mora-Aguilera², *Héctor Lozoya-Saldaña¹, Erika J. Zamora-Macorra³, Camilo Hernández-Juárez⁴, ¹Departamento de Fitotecnia, ³Preparatoria Agrícola, ⁴Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México, C.P. 56230; ²Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230.

*Autor de
correspondencia:
Héctor Lozoya-Saldaña
picti87@gmail.com

Sección:
Edición periódica

Recibido:
30 Noviembre, 2023

Aceptado:
06 Marzo, 2024

Publicado:
15 Marzo, 2024

Cita:
Ávila-Alistac N,
Mora-Aguilera G,
Lozoya-Saldaña H,
Zamora-Macorra EJ y
Hernández-Juárez C. 2024.
Variabilidad genética de
dos aislados mexicanos
de *Tomato brown rugose
fruit virus* y expresión de
síntomas en jitomate y
chile. *Revista Mexicana de
Fitopatología* 42(2): 16.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2311-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2311-2)



RESUMEN

Objetivo/Antecedentes. El objetivo fue analizar la variabilidad de dos aislados mexicanos de ToBRFV posterior a un proceso de inoculación y multiplicación en diferentes variedades comerciales y criollos mexicanos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (15 materiales) y chile (*Capsicum annuum*) (20 materiales), y evaluar la expresión de síntomas en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos. En invernadero, se analizó la variabilidad postinfección de dos aislados: EM-JI2021 (Edo. de México) y C-JI2021 (Colima) en 15 genotipos de jitomate y 20 de chile. Cada aislado se inoculó mecánicamente en cinco plantas por genotipo con un total de 150 plantas (56 días de edad) de jitomate y 200 de chile. Se emplearon tres plantas por genotipo como testigos. Sesenta y un días después de inoculación se colectó una hoja por planta para RT-PCR. Se registró incidencia y expresión de síntomas. La extracción de ARN fue por CTAB 2 %. Se utilizó oligos ToBRFV-F/ToBRFV-R que amplifican 475pb del gen RpRd (SENASICA-CNRF). Se secuenciaron 24 productos RT-PCR, se limpiaron y alinearon con registros del *Genbank NCBI* mediante MEGAv11.0.13. Con criterio epidemiológico, se seleccionaron 34 secuencias del *GenBank* para análisis de variabilidad.

Resultados. Diez días después de la inoculación, los genotipos de jitomate exhibieron mosaico severo, leve, reducción del área foliar. En chile se observaron síntomas diferenciados por genotipo, incluyendo reacción de hipersensibilidad, deformación foliar, necrosis en tallo, mosaico, amarillamiento, lesiones necróticas y condición asintomática. Entre la posición 2,124 al 2,500 pb se tuvo 99.74 % de homología con

el primer reporte de ToBRFV en Jordania (KT383474.1). Se encontró homología >99.74 % con aislados de USA (MT002973.1) y Canadá (OQ674195.1). C-JI2021 no exhibió variabilidad, mientras que EM-JI2021 generó tres haplotipos: En Mulato (chile) y Don R (jitomate) se detectó cambio de un nucleótido (c.2,355T>C), mientras que en Santawest, Altius, Sahariana y Nebula (jitomate) se detectaron dos sustituciones (c.2,278A>T; c.2,355T>C).

Conclusión. La intensidad patogénica de ToBRFV varió de asintomática a severa según combinación de hospedero, genotipo y haplotipo. En periodos cortos de infección se detectaron tres haplotipos lo que sugiere capacidad mutagénica del virus en función del hospedero.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, ToBRFV, aislados.

INTRODUCCIÓN

En Jordania, en 2015, se reportaron síntomas de rugosidad marrón en frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum*), con incidencia de 100 % a nivel invernadero. Estudios etiológicos determinaron un nuevo *Tobamovirus* denominado *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Salem *et al.*, 2016). Se ha postulado que ToBRFV pudo haber surgido de la recombinación de 314 nucleótidos de la región 534-848 del gen de la replicasa (Maayan *et al.*, 2018). El *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) y *Tobacco mosaic virus* (TMV) se han propuesto como ancestros directos, siendo este último el principal (Salem *et al.*, 2016). El genoma del ToBRFV, provenientes de diferentes países, en general exhiben baja variabilidad, lo que sugiere un proceso evolutivo a partir de un descendiente común (Salem *et al.*, 2016). Adicionalmente, Maayan y colaboradores (2018) mediante estudios filogenéticos en *Tobamovirus* concluyeron que ToBRFV ha tenido un proceso de evolución divergente con adaptación a diferentes hospederos, pero con baja tasa de mutación en un lapso de 3-4 años. En general, los virus tienen potencial para evolucionar y adaptarse rápidamente bajo la presión de selección natural debido a altas tasas poblacionales resultado de la efectiva replicación intraespecie, ocurrencia de cuasiespecies y ausencia de mecanismos de corrección de genomas (virus de ARN) lo que facilitan la variación genética, y tiempos cortos de generación (Hanssen *et al.*, 2010).

En México, el ToBRFV fue reportado por primera vez en 2018 (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). Este *Tobamovirus* se transmite principalmente por semilla. Actualmente se ha reportado en 20 estados de la república incluyendo las principales entidades de producción de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum*

annuum) (Camacho-Beltran *et al.*, 2019; Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). Los frutos en jitomate se asocian con una coloración amarilla, manchas verdes y deformación, estriado verde y manchas irregulares color marrón. En follaje se observa mosaico, moteado y amarillamiento. Los primeros reportes de virus incluyeron pérdida total de producción (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue analizar la variabilidad de dos aislados mexicanos de ToBRFV posterior a un proceso de inoculación y multiplicación en diferentes variedades comerciales y criollos mexicanos de jitomate (*S. lycopersicum*) (15 materiales) y chile (*C. annuum*) (20 materiales), y evaluar la expresión de síntomas mantenidos bajo condiciones de invernadero hasta etapa de floración.

Inoculación de ToBRFV. Se utilizaron dos aislados del virus proveniente del Estado de México (EM-JI2021) y Colima (C-JI2021). Los aislados se inocularon en un total de 15 genotipos de jitomate, 13 comerciales y dos criollos mexicanos y, 20 de *C. annuum*, cuatro variedades, 15 genotipos y un criollo. Las inoculaciones se realizaron en condiciones de invernadero en plantas de 56 días de edad. Previo a la inoculación, se aplicó Imidacloprid (1.5 mL L^{-1}) como medida preventiva a insectos vectores. La inoculación se realizó en la segunda hoja más joven, asperjando carborondum y posteriormente se aplicó el buffer de fosfatos con el macerado del tejido de jitomate infectado con el virus (dos aislados). Se consideró cinco plantas por genotipo, 150 plantas de jitomate (para ambos aislados) y 200 plantas de chile. Las plantas testigo (tres plantas por material vegetal) se aislaron para evitar contaminación. Las variables evaluadas fueron: incidencia del virus en plantas y se registró el tipo de síntomas en los materiales de jitomate y chile. Tejido de hojas jóvenes fueron colectadas a los 61 días después de la inoculación, se registró fotográficamente y se preservaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tejidos macerados con nitrógeno líquido para el estudio molecular.

Extracción de ARN y RT-PCR. Se realizó la extracción de los ácidos nucleicos con el método de CTAB 2 % (Yu, 2012; modificado por CP-LANREF, 2021). Las concentraciones y calidades del ARN se midieron en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA). Para la RT-PCR se utilizaron los oligos ToBRFV-F 5'-AACCAGAGTCTTCCTATACTGGGAA-3' y ToBRFV-R 5'-CTCWC-CATCTCTTAATAATCTCCT-3 que amplifica parte de la subunidad pequeña de la replicasa RpRd con 475 pb (SENASICA, 2018). La retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se realizó en el termociclador T-100 (BioRad). Para la retrotranscripción (RT) se utilizó el oligo R ($10 \mu\text{M}$), agua y $2 \mu\text{L}$ de ARN ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) para obtener un volumen de $16.375 \mu\text{L}$ y se incubó a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min. Posteriormente, se adicionó a cada reacción previa, la mezcla de: Buffer-RT (5X), dNTPs (10 mM), RNAsin ($40 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) y M-MLV-RT ($200 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) con un volumen

de 8.625 µL. La mezcla se incubó a 44 °C por 60 min y 92 °C por 10 min. Para PCR, se utilizó MgCl₂, dNTPs, los oligos, Taq polimerasa, agua libre de nucleasas y cDNA en un volumen final de 25 µL. Las condiciones fueron desnaturalización inicial 98 °C por 90 s, desnaturalización 98 °C por 10 s, alineamiento 55 °C por 20 s, extensión a 72 °C por 40 s, extensión final a 72 °C por 5 min y finalmente 72 °C (SENASICA, 2018). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

Análisis filogenético. Productos de PCR (24 muestras) se enviaron a secuenciar a Macrogen® (Seúl, Corea). Las secuencias (ambos sentidos) se limpiaron y eliminaron los extremos con el programa SeqAssem (https://science.do-mix.de/software_seqassem.php). Con las secuencias se realizaron consenso, para identificar y comparar la homología con secuencias del banco de genes (Genbank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se seleccionaron secuencias de genomas completas de ToBRFV de México (tres secuencias) y de otros países (30 secuencias) del banco de genes para realizar el alineamiento con secuencias del fragmento del gen empleado en esta investigación. Se realizó el alineamiento con Mega 11.0.13 y Geneious 2023.0.4 (www.geneious.com) para determinar la variabilidad entre secuencias. Se seleccionaron 34 secuencias virales con enfoque epidemiológico (Cuadro 1).

Síntomas en jitomate y chile asociados a ToBRFV. Todos los materiales comerciales y criollas de jitomate expresaron síntomas a los 10 días después de la inoculación de los aislados EM-JI2021 y C-JI2021. Los síntomas observados en jitomate inducidos por ToBRFV fueron principalmente mosaicos ligeros a severos. También se observó deformación y reducción foliar severa con remanencia de nervadura (Cuadro 2 y Figura 1). En algunas variedades se observó aclaramientos de nervaduras.

Zhi-Yong *et al.* (2021) evaluó 50 cultivares de jitomate y ningún material expresó resistencia al ToBRFV, mostrando diferentes síntomas como mosaico leve a severo, formación de ampollas en hojas, necrosis en sépalos y pedicelos, deformación y, en fruto manchas amarillas, así como lesiones necróticas con rugosidad marrón. Además, inoculó *C. annum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *Solanum melongena* y *S. tuberosum* cv. Kexin 1, donde observó síntomas de necrosis en hojas inoculadas y tallos, así como enanismo.

En Chile, todos los materiales manifestaron una diversidad de síntomas después de la inoculación, principalmente reacción de hipersensibilidad con caída de la hoja inoculada. Inicialmente se observó en hojas inoculadas lesiones necróticas y posteriormente, desprendimiento de la hoja. En algunos materiales se observó

Cuadro 1. Secuencias completas de *Tomato brown rugose fruit virus* obtenidas del banco de genes (NCBI) utilizadas para el alineamiento y comparados con secuencias de ToBRFV de la investigación.

No. de accesión	Pares de bases	Hospedante	Tejido	Lugar
MZ945420.1	6379	<i>Solanum lycopersicum</i>		Belgica
OQ674194.1	6374	<i>S. lycopersicum</i>		Canada
OQ674195.1	6242	<i>S. lycopersicum</i> cultivar Yari		Canada
OM515230.1	6375	<i>S. lycopersicum</i>		Netherlands
OM515231.1	6373	<i>S. lycopersicum</i>		United Kingdom
OM515232.1	6373	<i>S. lycopersicum</i>		United Kingdom
MZ323110.1	6394	<i>S. lycopersicum</i>		Jordan
MK648157.1	6388	<i>Capsicum annuum</i>		Jordan
KT383474.1	6393	<i>S. lycopersicum</i>		Jordan
MN882030.1	6379	<i>S. lycopersicum</i>		Egypt
MN882031.1	6379	<i>S. lycopersicum</i>		Egypt
MW349655.1	6379	<i>C. annuum</i> cultivar Tampiqueno		Mexico
OM515233.1	6369	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Peru
OM515258.1	6376	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Peru
OM515256.1	6361	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	China
MT018320.1	6392	<i>S. lycopersicum</i>		China
OM515237.1	6377	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Israel
OM515234.1	6371	<i>C. annuum</i>	Semillas	Israel
OM515257.1	6367	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Israel
OM515266.1	6364	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Israel
OM515250.1	6371	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Israel
OM515261.1	6376	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto	Belgium
OM515265.1	6375	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto	Belgium
MN815773.1	6354	<i>S. lycopersicum</i>		Greece
OM305070.1	6386	<i>S. lycopersicum</i>		Switzerland
MT107885.1	6386	<i>S. lycopersicum</i>		Turkey
OM515234.1	6371	<i>C. annuum</i>	Semillas	Israel
OM782671.1	6356	<i>S. lycopersicum</i>		Mexico
OM892675.1	6384	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto importado	Mexico
OM892676.1	6381	<i>S. lycopersicum</i>	Semillas	Peru
OM892677.1	6392	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto de tienda	USA
OM892678.1	6393	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto importado	Peru
OM892679.1	6375	<i>S. lycopersicum</i>	Fruto de tienda	USA
OM892681.1	6357	<i>S. lycopersicum</i>	Hoja	USA

síntomas severos como deformación en follaje apical, necrosis en tallo, necrosis en las nervaduras y lesiones necróticas en hojas no inoculadas (Cuadro 2, Figura 2). Estos síntomas coinciden con Fidan *et al.* (2021) donde observaron necrosis en hojas inoculadas, lesiones necróticas en tallo y amarillamiento en hojas.

Variabilidad en aislados ToBRFV. Del total de genotipos de jitomate y chile inoculados, se enviaron a secuenciar cinco muestras de chile, una inoculada con

Cuadro 2. Síntomas de *Tomato brown rugose fruit virus* en materiales comerciales y criollos de jitomate y chile expresados bajo condiciones de invernadero.

Nombre	Cultivo	Síntomas	Nombre	Cultivo	Síntomas
Santawest	Jitomate ^y	MM	Conga	Chile ^z	A
Citali	Jitomate	MM, LF, LR	Fascinato	Chile	A
IR143466	Jitomate	SM, LF, LR	Felicitas	Chile	NLNI
Sicilia	Jitomate	SM, LF, LR	Botaron	Chile	A, SN
Sahariana	Jitomate	SM, LF, LR	Godzilla	Chile	NLNI
Altius	Jitomate	SM, LF, LR, GI SM, LF, LR, CV	Kathia	Chile	A
Don R	Jitomate	MS, LF, LD	Almuden	Chile	LD, NLNI, DAA, SN, NLN
Nebula	Jitomate	MM, LF	Bachia	Chile	LNI
Volcano	Jitomate	MM, LF, CV	Cannon	Chile	A
Ametrino	Jitomate	MM, LF, CV	Gina	Chile	NLNI, SN
Angelle	Jitomate	SM, LF, LD, CV	Confidaro	Chile	A
Olmecca	Jitomate	SM, LF, LR			
UAM-X	Jitomate	SM, LF, LR, CV	Cayenne	Chile	DAA, NL
Rio Grande	Jitomate	SM, LF, CV			
Totolapan, Mor.	Jitomate	MM	Mulato	Chile	A
Cavanna	Chile	A	Serrano	Chile	SM, GI
Shir	Chile	A	Zongolica	Chile	MM, CR
Orangela	Chile	A	Chile pasilla	Chile	A
			Manzano-Ver	Chile	A

^yJitomate. ML: mosaico ligero; MS: Mosaico severo; DF: Deformación foliar; AF: Apollamiento foliar; RF: Reducción foliar; AN: Aclaramiento de nervaduras; IV: Islas verdes.

^zChile: A: Asintomática; ML: mosaico ligero; MS: Mosaico severo; DF: Deformación foliar; LN: lesiones necróticas en hojas; LNI: lesiones necróticas en hojas no inoculadas; NT: Necrosis tallo; DFA: Deformación área apical; NN: necrosis nervaduras en hojas; AF: Apollamiento foliar; AN: Aclaramiento de nervaduras; IV: Islas verdes; AC: anillos concéntricos.

C-JI2021 y cuatro inoculadas con EM-JI2021 y, 19 muestras de jitomate, seis muestras con EM-JI2021 y 13 con C-JI2021. Las secuencias en estudio se alinearon con el 80.2 % del total del fragmento del gen parcial del RpRd (475 pb). Las secuencias mostraron una identidad con accesiones del banco de genes con una homología que osciló entre 99.74 al 100 % incluyendo la secuencia del virus originalmente descrito por Salem *et al.* (2016) (Cuadro 3, Figura 3). Las secuencias que mostraron una identidad 99.74 y 99.75 % fueron muestras inoculadas con EM-JI2021 (Cuadro 3). Todas las secuencias se alinearon con accesiones de USA y Canadá (Cuadro 3). Cinco secuencias con identidad menor al 100 % se alinearon con OQ6741195.1 de Canadá y con una secuencia de USA (MT002973.1).

De acuerdo al análisis de alineamiento basado en el genoma completo de 34 secuencias de ToBRFV y el genoma parcial de la replicasa de las 24 secuencias

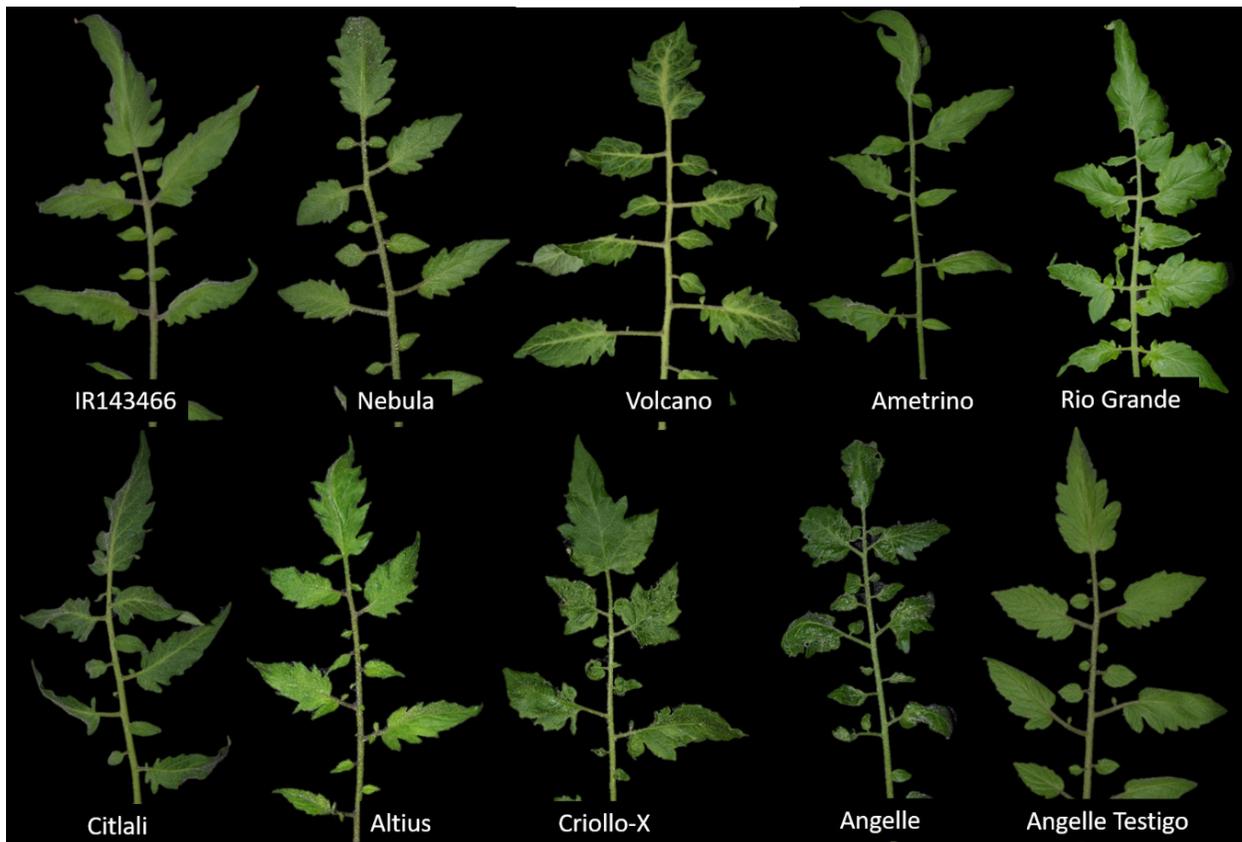


Figura 1. Síntomas en materiales comerciales y criollas de jitomate inoculados con *Tomato brown rugose fruit virus*. Síntomas de mosaico leve (IR143466, Nebula, Ametrino, Rio Grande, Citlali, Altius); mosaico severo, deformación y aclaramiento de nervaduras principales de la hoja (Volcano, Criollo-X y Angelle); planta sana (Angelle testigo).

de esta investigación, se observó variabilidad a nivel nucleótido en seis secuencias obtenidas de plantas inoculadas con EM-JI2021. Se observó dos cambios: en el nucleótido c.2,278A>T y c.2355T>C (Figura 3). Las secuencias en estudio se alinearon entre la posición 2,124 al 2,500 correspondiente al gen de la replicasa. Las sustituciones de nucleótidos también se observaron en las accesiones MW349655.1 (tejido de chile), OQ674195.1 (hojas de jitomate), y OM515234.1 (semillas de chile), que corresponden a México, Canadá e Israel. Sin embargo, en otra investigación no se encontraron mutaciones de ToBRFV después de un proceso de inoculación en jitomate y chile (Eichmeier *et al.*, 2023). Estos resultados concuerdan con un trabajo que reporta de 2 a 39 sustituciones de nucleótidos a nivel del genoma completo (Abrahamian *et al.*, 2022). Si bien los cambios de nucleótidos son bajos, estos cambios podrían eventualmente generar variabilidad en el comportamiento patogénico y/o epidemiológico del virus. Esto es sustentado con

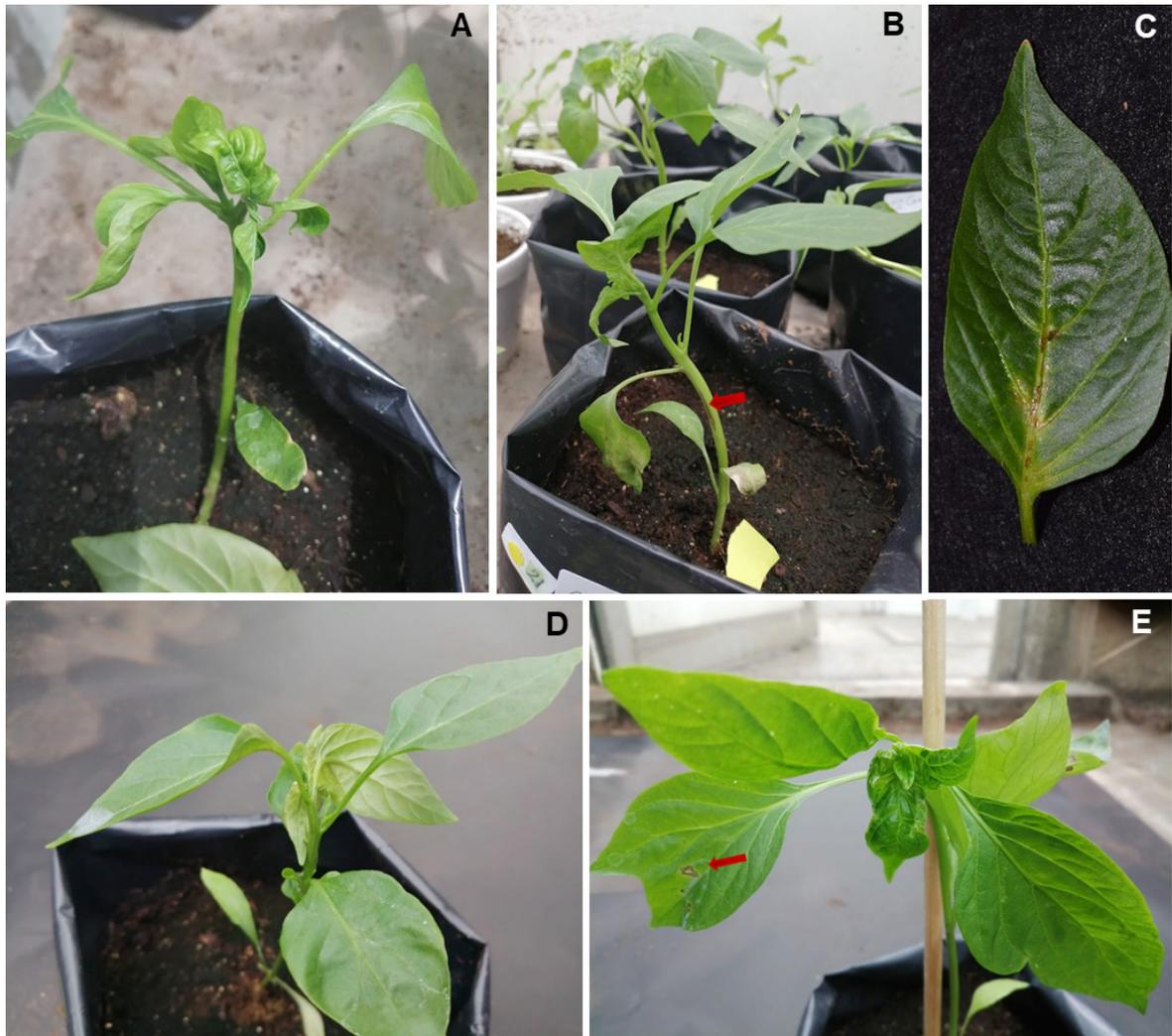


Figura 2. Síntomas en chile (*Capsicum annum*) inoculados con *Tomato brown rugose fruit virus*. A-C) Síntomas de deformación apical, necrosis en tallo y nervaduras en hojas de Almuden; D) Síntomas de deformación apical, ligera necrosis en nervaduras en Cayenne; E) Síntomas de deformación apical, mosaico, lesiones necróticas en hojas no inoculadas en Felicitas.

lo observado en plantas de jitomate inoculados con el aislado del Edo. de México (EM-JI2021), que se registró mayor altura y diámetro del tallo que las plantas inoculadas con el aislado de Colima (C-JI2021) (Datos no mostrados). También se observó síntomas en jitomate inoculados con el aislado C-JI2021 se asociaron a los síntomas europeos, los cuales fueron más severos que el aislado del Edo. de México (Salem *et al.*, 2016).

La importancia que tiene ToBRFV desde un diagnóstico temprano del virus hasta el impacto en producción en jitomate y chile es relevante. Se han realizado

Cuadro 3. Porcentaje de cobertura e identidad de dos aislados de ToBRFV inoculados en un total de 35 genotipos de jitomate y chile en condiciones de invernadero.

Aislado	Variedad / criollo ^z	Cultivo	Origen aislado	Longitud pb	Cobertura	Identidad	Aislado homologado	
							Accesión	País
EM-JI2021	Almuden	Chile	Edo. México	398	100	100	OQ674195.1	Canada
	<i>Mulato</i>	Chile	Edo. México	390	100	99.74	OQ674195.1	Canada
	<i>Congo</i>	Chile	Edo. México	391	100	99.74	MT002973.1	USA
	Gina	Chile	Edo. México	381	98	100	MT002973.1	USA
	<i>Santawest</i>	Jitomate	Edo. México	402	100	99.75	OQ674195.1	Canada
	Gotzilla	Jitomate	Edo. México	383	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Altius</i>	Jitomate	Edo. México	385	100	99.74	OQ674195.1	Canada
	<i>Don R</i>	Jitomate	Edo. México	407	100	100	OQ674195.1	Canada
	<i>Sahariana</i>	Jitomate	Edo. México	392	100	99.74	OQ674195.1	Canada
<i>Nebula</i>	Jitomate	Edo. México	408	99	99.75	OQ674195.1	Canada	
C-JI2021	Manzano	Chile	Colima	402	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Santawest</i>	Jitomate	Colima	410	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Altius</i>	Jitomate	Colima	407	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Sicilia</i>	Jitomate	Colima	411	100	100	MT002973.1	USA
	IR143466	Jitomate	Colima	418	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Don R</i>	Jitomate	Colima	408	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Ametrino</i>	Jitomate	Colima	384	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Olmecca</i>	Jitomate	Colima	399	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Nebula</i>	Jitomate	Colima	404	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Xochimilco</i>	Jitomate	Colima	384	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Angelle</i>	Jitomate	Colima	399	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Río Grande</i>	Jitomate	Colima	408	100	100	MT002973.1	USA
	<i>Totolapan</i>	Jitomate	Colima	388	100	100	MT002973.1	USA
<i>Citlali</i>	Jitomate	Colima	385	100	100	MT002973.1	USA	

^z Nombres en cursiva son materiales criollos. En negrita secuencias con homología <100%.

estudios de métodos de extracción del ARN para un diagnóstico temprano y preciso en el análisis molecular (Zamora-Macorra *et al.*, 2023), hasta alternativas de manejo del ToBRFV con bajo impacto ambiental como el uso de *Beauveria peruvienis*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Pseudomonas* sp. (Ramos-Villanueva *et al.*, 2023). No obstante, estudios sobre la expresión de síntomas en los diferentes materiales disponibles en el mercado, así como conocer la variabilidad de ToBRFV que existe en campo, da la pauta para conocer mejor la epidemiología del virus y su comportamiento de acuerdo al cultivo y condiciones climáticas que se establecen. Por ello, es importante hacer estudios de la diversidad del virus en campo e invernadero a través del tiempo y asociar la expresión de síntomas con la variabilidad a nivel nucleótidos del virus.

CONCLUSIONES

Todos los materiales de jitomate expresaron síntomas de mosaicos, pero sin observar síntomas severos como los reportados por Salem *et al.* (2016), excepto en plantas de jitomate inoculados con el aislado C-JI2021. En Chile se registraron lesiones en las hojas inoculadas (reacción de hipersensibilidad), así como lesiones necróticas en tallo, deformación apical, necrosis en nervaduras de las hojas y condición asintomática.

De acuerdo al análisis de alineamiento de dos aislados de ToBRFV (Edo. de México y Colima), comparado con 34 aislados disponibles en el banco de genes del NCBI, se observó en cinco secuencias de aislados del Edo. de México (EM-JI2021) la sustitución de dos nucleótidos, nucleótido c.2,278A>T y c.2355T>C. Las accesiones MW349655.1 (México), OQ674195.1 (Canadá) y OM515234.1 (Israel) coincidieron con el aislado EM-JI2021 (inoculado en la variedad Don R) en cambio de un nucleótido c.2355T>C. En este trabajo se encontraron un total de tres haplotipos. Este es el primer trabajo que reporta variabilidad de ToBRFV en un tiempo corto en condiciones controladas. Esta información puede ser relevante para estudios de protección cruzada.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca posdoctoral otorgada para realizar el trabajo de investigación. Al equipo LAN-REF-CP por el apoyo metodológico y logístico.

LITERATURA CITADA

- Abrahamian P, Cai W, Nunziata SO, Liing KS, Jaiswal N, Mavrodieva VA, Rivera Y and Nakhla MK. 2022. Comparative analysis of *Tomato brown rugose fruit virus* isolates shows limited genetic diversity. *Viruses* 14:2816. <https://doi.org/10.3390/v14122816>
- Camacho-Beltrán E, Pérez-Villarreal A, Leyva-López NE, Rodríguez-Negrete EA, Cenicerros-Ojeda EA and Méndez-Lozano J. 2019. Occurrence of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato Crops in Mexico. *Disease Notes* 103(6): 1440. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1974-PDN>
- 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. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 185-192. 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Eichmeier A, Hejllova M, Orsagova H, Frejlichova L, Hakalova E, Tomankova K, Linhartova S, Kulich P, Cermak V and Cechova J. 2023. Characterization of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) detected in Czech Republic. *Diversity* 15(2):301. <https://doi.org/10.3390/d15020301>
- Fidan, H, Sarikaya P, Yildiz K, Topkaya B, Erkis G and Calis O. 2021. Robust molecular detection of the new *Tomato brown rugose fruit virus* in infected tomato and pepper plants from Turkey. *Journal of Integrative Agriculture* 20(8): 2170-2179. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63335-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63335-4)

- Hanssen IM, Lapidot M and Thomma BPHJ. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5): 539-548. doi:10.1094/MPMI-23-5-0539.
- Maayan Y, Pandaranayaka EPJ, Srivastava DA, Lapidot M, Levin I, Dombrovsky A and Harel A. 2018. Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. *Archives of Virology* 163: 1863-1875. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3819-5>
- Ramos-Villanueva CD, Carrillo-Benitez G, Zamora-Macorra EJ, Santiago-Elena E, Ramirez-Alarcón S, Jimenez-Vidals J and Ávila López R. 2023. Use of endophytic microorganisms for the management of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato crop (*Solanum lycopersicum*). *Mexican Journal of Phytopathology* 41(4): 1. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-1>
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW and Turina M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives Virology* 161: 503-506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2018. Protocolo de Diagnóstico: *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Virus del fruto marrón rugoso del tomate) [Versión 2.0]. Tecámac, México. 18 pp.
- Yu D, Tang H, Zhang Y, Du Z, Yu H and Chen Q. 2012. Comparison and Improvement of Different Methods of RNA Isolation from Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Agricultural Science* 4(7):51-56. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n7p51>
- Zamora-Macorra EJ, Aviña-Padilla K, Rosemarie HW and Ochoa-Martínez DL. 2023. Comparison of molecular protocols to detect *Tomato brown rugose fruit virus* in solanaceae hosts. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(4): 2. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-5>
- Zhi-Yong Y, Mei-sheng Z, Hua-yu M, Ling-zhi L, Guang-ling Y, Chao G, Yanping T and Xiang-dong L. 2021. Biological and molecular characterization of tomato brown rugose fruit virus and development of quadruplex RT-PCR detection. *Journal of Integrative Agriculture* 20(7): 1871–1879. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63275-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63275-0)