

Identification of *Tomato brown rugose fruit virus* by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP)

Identificación de *Tomato brown rugose fruit virus* por RT-PCR de una región codificante de la replicasa (RdRP)

Johan Rodríguez-Mendoza, Clemente de Jesús García-Ávila, José Abel López-Buenfil, Karina Araujo-Ruiz, Andrés Quezada-Salinas, José Manuel Cambrón-Crisantos*, 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: ccrisantos@colpos.mx.

Recibido: 27 de Febrero, 2019.

Aceptado: 23 de Abril, 2019.

Rodríguez-Mendoza J, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA, Araujo-Ruiz K, Quezada-Salinas A, Cambrón-Crisantos JM and Ochoa-Martínez DL. Identification from *Tomato brown rugose fruit virus* by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 345-356.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1902-6

Primera publicación DOI: 30 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 30, 2019.

Resumen. En la actualidad es de importancia estratégica contar con herramientas de diagnóstico rápido y preciso que permitan conocer si el material de interés está infectado con algún virus de importancia cuarentenaria o económica. Por tal motivo, en el presente trabajo se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para la detección del ToBRFV por RT-PCR, considerando una región de la secuencia codificante de la RdRP localizada

Abstract. Currently, it is of strategic importance to have fast and accurate diagnostic tools that allow us to know if the material of interest is infected with a quarantine or economic important virus. For this reason in the present work we designed a pair of specific oligonucleotides for the detection of ToBRFV by RT-PCR, considering a region of the coding sequence of the RdRP located in the ORF1 and the methodology to detect it was standardized. Additionally, the amplicons were cloned and sequenced, the products were used to predict the evolutionary relationship between ToMMV, ToMV, TMV and ToBRFV by the Maximum Likelihood method. The results indicated that the oligonucleotides designed in the present work allows the identification of fast and specific ToBRFV.

Key words: Solanaceae, Tobamovirus, specific oligonucleotides, standardization

en el ORF1 y la metodología para detectarlo fue estandarizada. Adicionalmente, los amplicones fueron clonados y secuenciados, los productos fueron usados para predecir la relación evolutiva entre ToMMV, ToMV, TMV y ToBRFV por el método *Maximum Likelihood*. Los resultados indicaron que los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo permiten la identificación de manera rápida y específica del ToBRFV.

Palabras clave: *Solanaceae*, *Tobamovirus*, oligonucleótidos específicos, estandarización

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*), representan una actividad de importancia económica a nivel mundial (Li *et al.*, 2017). Históricamente, plantas de las familias *Solanaceae* y *Cucurbitaceae* se han visto afectadas por algunas especies del género *Tobamovirus* como: *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Dombrovsky y Smith, 2017). En tomate, la resistencia a estos virus se introdujo por introgresión; sin embargo, la durabilidad de la resistencia se ve comprometida por la presión de selección de los patógenos (Dombrovsky y Smith, 2017; Maayan *et al.*, 2018). La importancia de los tobamovirus se debe a su fácil dispersión, principalmente por medios mecánicos (Dombrovsky *et al.*, 2017); también a través de semillas contaminadas, las partículas virales de los tobamovirus son extremadamente estables preservando su infectividad durante varios años (Dombrovsky y Smith, 2017). Recientemente, se reportó la presencia del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en México, afectando tomate y chile (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). Las plantas enfermas desarrollaron menor cantidad de flores y frutos; necrosis del pedúnculo y cáliz del fruto. Además, en frutos se observaron áreas amarillas, rugosidades y áreas necróticas (Salem *et al.*, 2015).

Tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili crops (*Capsicum annuum*) are an economically important activity worldwide (Li *et al.*, 2017). Historically, plants of the *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* families have been affected by some species of the *Tobamovirus* genus, such as *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Dombrovsky and Smith, 2017). Tomato resistance to these viruses was introduced by introgression. However, the durability of resistance is compromised by the pathogen's selection pressure (Dombrovsky and Smith, 2017; Maayan *et al.*, 2018). Tobamoviruses are important because they are easily dispersed, mainly by mechanical means or through contaminated seed (Dombrovsky *et al.*, 2017); the viral particles of tobamoviruses are extremely stable and remain infectious for several years (Dombrovsky and Smith, 2017). Recently, the presence of the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) was reported in Mexico, which affects tomato and chili crops (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). The infected plants produced fewer flowers and fruits, and developed necrosis on the peduncle and fruit calyx. In addition, yellow and necrotic areas, as well as rugosity, were observed on fruits (Salem *et al.*, 2015).

To identify tobamoviruses, the use of oligonucleotides has been reported for universal detection, which were designed using an alignment matrix from regions located in the ORF1 that encodes the RdRP of 32 tobamoviruses (Li *et al.*, 2018), but currently there are no reports on specific oligonucleotides. Therefore, the objective of this study was to develop a specific method for detecting ToBRFV, including the design of a pair of specific oligonucleotides to amplify an encoding region of the ToBRFV's viral RdRP (ORF1) through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) specifically considering the nucleotidic regions of the structural or catalytic *motifs*, as well as standardize the detection method.

Para la identificación de tobamovirus, se han reportado oligonucleótidos para su detección universal, los cuales fueron diseñados tomando una matriz de alineamiento de regiones conservadas en los ORF1 que codifican la RdRP de 32 tobamovirus (Li *et al.*, 2018); sin embargo, hasta el momento no hay reportes de oligonucleótidos específicos para la detección de ToBRFV; por lo que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de detección específico para ToBRFV, incluyendo el diseño de un par de oligonucleótidos específicos para la amplificación de una región codificante de la RdRP viral (ORF1) del ToBRFV por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), considerando, específicamente las regiones nucleotídicas de los *motifs* estructurales o catalíticos; así como, la estandarización del método de detección.

El diseño del par de oligonucleótidos específicos para ToBRFV consideró los genomas completos de las especies más representativas del género *Tobamovirus*, reportados por el Centro Nacional de Información Biotecnológica, (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como: *Tobacco mosaic virus* (TMV, Virgaviridae) (NC_001367.1, FR878069.1, HE818443.1 y V01408.1), *Tomato mosaic virus* (ToMV, Virgaviridae) (NC_002692.1, KY967227.1, MF002490.1 y AF332868.1), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV, Virgaviridae) (NC_022230.1, FX898034.1, KR824950.1 y KF477193.1), adicionalmente, se consideraron los genomas de dos aislamientos de ToBRFV (Virgaviridae), *Tomato brown rugose fruit virus* aislado Israelí TBRFV-IL (KX619418.1) y *Tomato brown rugose fruit virus* aislado de Jordania (KT383474.1). Con el programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) se hizo un alineamiento global de los genomas utilizando el algoritmo Clustal W para generar la primer matriz e identificar regiones variables entre

To design the pair of specific oligonucleotides for ToBRFV the whole genome of the most representative species of the *Tobamovirus* genus reported by the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was considered, including *Tobacco mosaic virus* (TMV, Virgaviridae) (NC_001367.1, FR878069.1, HE818443.1 and V01408.1), *Tomato mosaic virus* (ToMV, Virgaviridae) (NC_002692.1, KY967227.1, MF002490.1 and AF332868.1), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV, Virgaviridae) (NC_022230.1, FX898034.1, KR824950.1 and KF477193.1); the genomes of two ToBRFV isolates (Virgaviridae) were also considered: the *Tomato brown rugose fruit virus*, an isolate from Israel TBRFV-IL (KX619418.1), and the *Tomato brown rugose fruit virus*, an isolate from Jordan (KT383474.1). A global alignment of the genomes was carried out using the BioEdit program version 7.0.5.3 (Hall, 1999) and the Clustal W algorithm in order to create a matrix and identify variable regions between them (Figure 1). The selected region was used to obtain the oligonucleotides sequences, which were then analyzed *in silico* using the OligoAnalyzer server version 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/Analyzer/Home/Instructions>) to predict their physical and chemical properties (Annex 1). The oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT).

To standardize the process, seven tomato plants were used as a ToBRFV positive control, and one of chili with putative ToBRFV symptoms collected in the state of Michoacan (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018), which were stored at -70 °C in the facilities of the National Center for Phytosanitary Reference (CNRF, for its acronym in Spanish), Plant Health General Directorate, National Service for Plant Health, Safety and Agri-Food Quality (SENASICA, for its acronym in Spanish). The central midrib of leaves (0.5 cm wide approximately) was taken to

ellos (Figura 1). La región seleccionada se usó para obtener las secuencias de los oligonucleótidos, éstas se analizaron *in silico* usando el servidor OligoAnalyzer versión 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/Analyzer/Home/Instructions>) para predecir sus propiedades fisicoquímicas (Anexo 1). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT).

Para el proceso de estandarización se utilizaron como control positivo de ToBRFV, siete plantas de tomate y una de chile con síntomas putativos a ToBRFV, recolectadas en el Estado de Michoacán (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018); resguardadas y almacenadas a -70 °C en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. La nervadura central de las hojas fue separada de un ancho de 0.5 cm aproximadamente para formar una muestra compuesta, la cual se picó finamente. La Extracción de RNA total, se realizó a partir de 100 mg de nervadura con el Kit SV Total RNA Isolation System Start-Up® (Promega™), siguiendo las especificaciones del fabricante; la pureza y concentración del RNA se cuantificó por espectrofotometría (Nano Drop 2000®, Thermo

prepare a composite sample that was then finely chopped. The total RNA extraction was performed using 100 mg of leaf midrib with the SV Total RNA Isolation System Start-Up® kit (Promega™), following the manufacturer's specifications; RNA purity and concentration was quantified by spectrophotometry (Nano Drop 2000®, Thermo Scientific™). We used as negative controls ten plants individually infected with the positive-sense single-stranded RNA genome virus: *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV, Virgaviridae), *Tobacco mosaic virus* (TMV, Virgaviridae), *Tomato mosaic virus* (ToMV, Virgaviridae), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV, Virgaviridae), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Bromoviridae) and *Papaya meleira virus* (PMeV, Totiviridae), as well as with the DNA genome of *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV, Geminiviridae) and *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV, Geminiviridae).

The cDNA synthesis of the positive control was performed with random oligonucleotides (Random Hexamer, Invitrogen™), following the manufacturer's instructions, under the following conditions: 1 cycle at 42 °C for 30 min, 1 cycle at 99 °C for 5 min, and finally at 12 °C for 5 min. For PCR, the specific oligonucleotides designed in

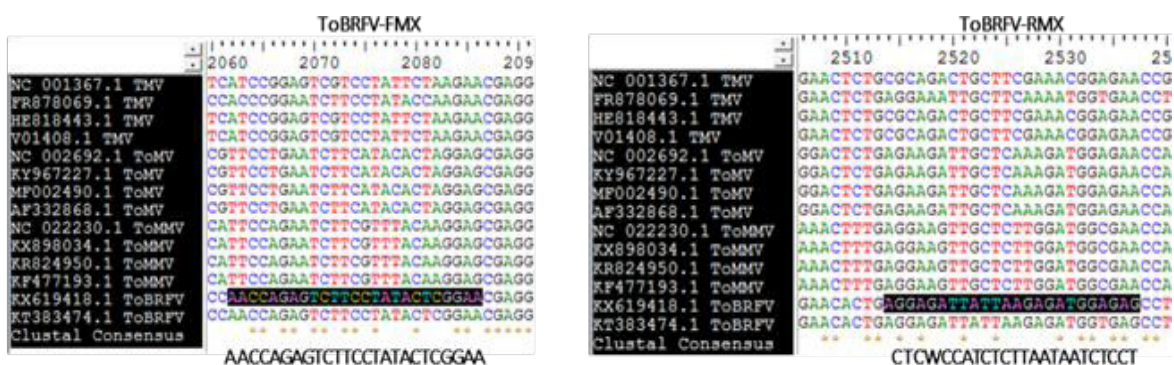


Figura 1. Región seleccionada para el diseño de los oligonucleótidos específicos para detectar a ToBRFV. A) Se consideraron los genomas de los *Tobamovirus* TMV, ToMV, ToMMV y ToBRFV.

Figure 1. Selected region to design the specific oligonucleotides to detect ToBRFV. A) The *Tobamovirus* genomes TMV, ToMV, ToMMV and ToBRFV were considered.

Scientific™). Como control negativo se utilizaron diez plantas infectadas individualmente con virus de genoma de ARN monocatenario de sentido positivo: *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RC-NaV, Virgaviridae), *Tobacco mosaic virus* (TMV, Virgaviridae), *Tomato mosaic virus* (ToMV, Virgaviridae), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV, Virgaviridae), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Bromoviridae) y *Papaya meleira virus* (PMeV, Totiviridae); así como con genoma DNA *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV, Geminiviridae) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV, Geminiviridae).

La síntesis de cDNA del control positivo, se hizo con oligonucleótidos aleatorios (Random Hexamer, Invitrogen™), siguiendo las indicaciones del fabricante, bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 42 °C por 30 min, 1 ciclo a 99 °C por 5 min y finalmente a 12 °C durante 5 min. En la PCR se usaron los oligonucleótidos específicos diseñados en el presente trabajo (ToBRFV-FMX y ToBRFV-RMX) (Cuadro 1), que amplifican un fragmento de 475 pb, que codifica una región de la RdRP. La mezcla de reacción consistió en 18.9 µL de agua grado biología molecular (Invitrogen), 2.5 µL de Buffer 10X (Invitrogen), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0.25 µL dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0.75 µL del primer ToBRFV-FMX (10 µM), 0.75 µL del primer ToBRFV-RMX (10 µM), 0.1 µL de Platinum™ Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 µL del templado de cDNA, en un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación fue: 1 ciclo de 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s

the present study (ToBRFV-FMX and ToBRFV-RMX) were used (Table 1), which amplify a 475 pb fragment that encodes the RdRP region. The reaction mixture was prepared using 18.9 µL of molecular biology grade water (Invitrogen), 2.5 µL of 10X buffer (Invitrogen), 0.75 µL of MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0.25 µL dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0.75 µL of the ToBRFV-FMX primer (10 µM), 0.75 µL of the ToBRFV-RMX primer (10 µM), 0.1 µL of Platinum™ Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 1 µL of the cDNA in a final volume of 25 µL. The amplification program was as follows: 1 cycle at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s and at 72 °C for 40 s with a final extension at 72 °C for 7 min. Later, the PCR amplification of the viral RdRP fragment (positive plasmidic control) was cloned in the pGEM®-T Easy cloning vector (Promega), and the insert ligation of 474 pb was performed in a total volume of 5 µL of reaction mixture; the components were: 2.5 µL of 2X ligation buffer, 0.5 µL of pGEM®-T Easy vector, 0.5 µL of DNA Ligase T4 2X, 1 µL of the product to be cloned and 0.5 µL of water, keeping the mixture at 15 °C for 20 h. Subsequently, One Shot Mach1-T1 chemically-competent *E. coli* cells (Invitrogen) were transformed. For this, 150 µL of competent cells mixed with the 5 µL of the ligation reaction were used; the mixture was incubated in ice for 30 min and a thermal shock was applied at 42 °C for 2 min; then the tube was placed on ice for 2 min. 350 µL of LB medium were added and then

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos específicos para detectar a ToBRFV.
Table 1. Characteristics of specific oligonucleotides to detect ToBRFV.

Oligo (tamaño)	Secuencia 5' - 3'	T _m (°C)	G/C (%)	Amplificación
ToBRFV-FMX (25 nt)	AACCAGAGTCTTCCTATACTCGGAA	56.7	44	475 pb
ToBRFV-RMX (24 nt)	CTCWCATCTCTTAATAATCTCCT	51.5	37.5	

y 72 °C por 40 s con una extensión final a 72 °C por 7 min. Posteriormente, el producto de la PCR del fragmento de la RdRP viral (Control plasmídico positivo) se clono en el vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega), la ligación del inserto de 474 pb se llevó a cabo en un volumen total de 5 µL de mezcla de reacción, los componentes fueron: 2.5 µL de 2X Buffer de ligación, 0.5 µL vector pGEM®-T Easy, 0.5 µL de DNA Ligasa T4 2X, 1 µL del producto a clonar y 0.5 µL de agua, manteniendo la mezcla a 15 °C durante 20 h. Posteriormente, se transformaron células One Shot Mach1-T1 *E. coli* (Invitrogen), quimiocompetentes. Para ello se utilizaron 150 µL de células competentes, mezcladas con los 5 µL de la reacción de ligación, esta se incubó en hielo por 30 min y se dio un choque térmico a 42 °C durante 2 min, después, el tubo se colocó en hielo durante 2 min. Se adicionaron 350 µL de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 min. Finalmente, se cultivó en placas con medio LB, 40 µL de ampicilina, 40 µL de IPTG y 40 µL de Xgal (20 mg mL⁻¹) a 37 °C durante 16 h. La construcción pGEM/RdRP-ToBRFV (CP-1, ~3490 nt) obtenida de esta clonación se usó como control positivo para la estandarización de la RT-PCR del fragmento de la RdRP. Posteriormente, los fragmentos clonados se secuenciaron por la metodología Sanger en el Laboratorio de Biología Molecular del CNRF, con el equipo Applied Biosystems modelo 3130.

La estandarización del método se realizó siguiendo las condiciones de reacción señaladas previamente. Para determinar la temperatura de anillamiento óptima, se analizaron seis temperaturas de *anillamiento* con diferencia de 4 °C (47, 51, 55, 59, 63 y 67 °C), a partir de seis controles a una sola concentración (100 ng µL⁻¹): un control plasmídico positivo a ToBRFV (CP-1), dos controles biológicos infectados con ToBRFV, To-P-100-2 y Ch-P-100-1, correspondientes a tomate y chile, respectivamente; un control matriz por cultivo

the tube was incubated at 37 °C for 45 min. Finally, the mixture was sown on plates containing LB medium, 40 µL of ampicillin, 40 µL of IPTG and 40 µL of Xgal (20 mg mL⁻¹) at 37 °C for 16 h. The pGEM/RdRP-ToBRFV (CP-1, ~3490 nt) construct obtained from this cloning was used as a positive control for standardizing the RT-PCR of the RdRP fragment. Later, the cloned fragments were sequenced in the Molecular Biology Laboratory of CNRF using the Applied Biosystems equipment model 3130, following the Sanger's methodology.

The method standardization was achieved under the reaction conditions previously described. To determine the optimal annealing temperature, six *annealing* temperatures with a 4 °C difference between them (47, 51, 55, 59, 63 and 67 °C) were analyzed using six controls in a single concentration (100 ng µL⁻¹): one positive plasmidic control to ToBRFV (CP-1), two biological controls infected with ToBRFV, To-P-100-2 and Ch-P-100-1 corresponding to tomato and chili, respectively; one matrix control per crop (CM-Ch-100-3 and CM-To-100-1) and one of reagents (NTC). The working range was calculated and determined using a positive plasmidic control to ToBRFV (CP-1) at a 1000 ng µL⁻¹ concentration, and then serial dilutions were made in order to obtain three work concentrations (100, 10 and 1 ng µL⁻¹) (Figure 2A). The lower limit of detection was established using the last dilution of the working range (1 ng µL⁻¹), and then serial dilutions were made in order to obtain three work concentrations (0.1, 0.01 and 0.001 ng µL⁻¹) (Figure 2B). The specificity was verified using RCNaV, TMV, ToMV, PMMoV, CMV and PMeV negative controls, as well as DNA genome such as PepGMV and OYMMV (Figure 2C).

Standardization data were used to detect ToBRFV from the plant samples collected in the state of Michoacan and stored at -70 °C; the cDNA

(CM-Ch-100-3 y CM-To-100-1) y uno de reactivos (NTC). El intervalo de trabajo se realizó y determinó a partir del control plasmídico positivo a ToBRFV (CP-1) a una concentración de $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, se hicieron diluciones seriadas para obtener tres concentraciones de trabajo (100 , 10 y $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) (Figura 2A). El límite de detección inferior, se estableció a partir de la última dilución del intervalo de trabajo ($1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) se hicieron diluciones seriadas, para obtener tres concentraciones de trabajo (0.1 , 0.01

synthesis was performed as previously described. The specific oligonucleotides designed in the present were used for PCR, which amplify a 475 pb fragment that encodes one RdPR region. The reaction mixture was prepared using $18.9 \mu\text{L}$ of molecular biology grade water (Invitrogen), $2.5 \mu\text{L}$ of 10X buffer (Invitrogen), $0.75 \mu\text{L}$ of MgCl_2 (50 mM) (Invitrogen), $0.25 \mu\text{L}$ of dNTP (10 mM) (Invitrogen), $0.75 \mu\text{L}$ of the ToBRFV-FMX primer ($10 \mu\text{M}$), $0.75 \mu\text{L}$ of the ToBRFV-RMX

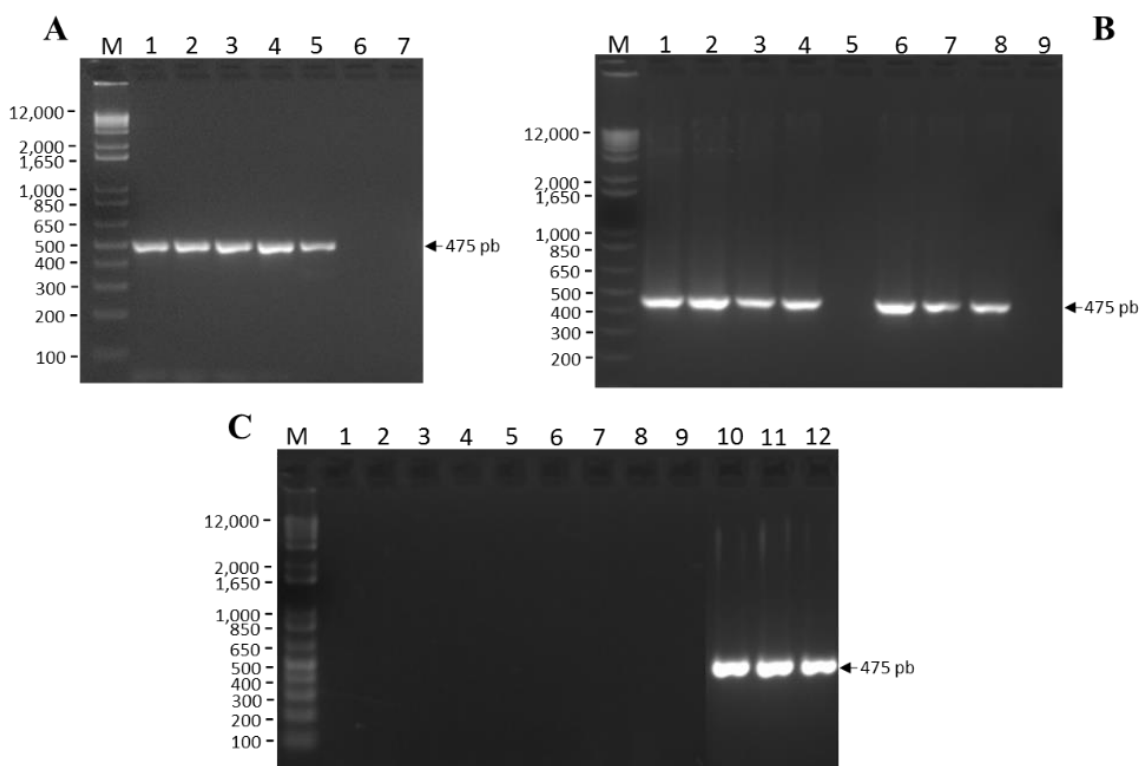


Figura 2. Estandarización de la RT-PCR para la detección específica de ToBRFV.

A) Temperatura de anillamiento: M= Marcador molecular, 1= 47°C , 2= 51°C , 3= 55°C , 4= 59°C , 5= 63°C , 6= 67°C y 7= NTC.

B) Intervalo de trabajo y límite de detección inferior: M= Marcador molecular, 1= $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 2= $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 3= $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 4= $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 5= NTC, 6= $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 7= $0.01 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 8= $0.001 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y 9= NTC.

C) Especificidad: M= Marcador molecular, 1= RCNaV, 2= TMV, 3= CMV, 4= ToMV, 5= PMMoV, 6= PMeV, 7= PepGMV, 8= OYMMV, 9= NTC, 10= CP-1, 11= CM-Ch-100-3, 12= CM-To-100-1.

Figure 2. Standardization of RT-PCR for the specific detection of ToBRFV.

A) Annealing temperature: M= Molecular marker, 1= 47°C , 2= 51°C , 3= 55°C , 4= 59°C , 5= 63°C , 6= 67°C and 7= NTC.

B) Working range and lower detection limit: M= Molecular marker, 1= $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 2= $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 3= $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 4= $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 5= NTC, 6= $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 7= $0.01 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 8= $0.001 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y 9= NTC.

C) Specificity: M= Molecular marker, 1= RCNaV, 2= TMV, 3= CMV, 4= ToMV, 5= PMMoV, 6= PMeV, 7= PepGMV, 8= OYMMV, 9= NTC, 10= CP-1, 11= CM-Ch-100-3, 12= CM-To-100-1

y 0.001 ng μL^{-1}) (Figura 2B). La especificidad se verificó utilizando controles negativos de: RCNaV, TMV, ToMV, PMMoV, CMV, y PMeV, así como con genoma DNA como PepGMV y OYMMV (Figura 2C).

Con los resultados de la estandarización se realizó la detección de ToBRFV a partir de las muestras vegetales recolectadas en el Estado de Michoacán y almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$; la síntesis de cDNA se realizó como se señaló anteriormente. En la PCR se usaron los oligonucleótidos específicos diseñados en el presente trabajo, los cuales amplifican un fragmento de 475 pb que codifica una región de la RdRP. La mezcla de reacción consistió en 18.9 μL de agua grado biología molecular (Invitrogen), 2.5 μL de Buffer 10X (Invitrogen), 0.75 μL de MgCl_2 (50 mM) (Invitrogen), 0.25 μL dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0.75 μL del primer ToBRFV-FMX (10 μM), 0.75 μL del primer ToBRFV-RMX (10 μM), 0.1 μL de Platinum™ *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 μL del templado de cDNA, en un volumen final de 25 μL . La amplificación se realizó a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguida de 30 ciclos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40 s con una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min. Los ocho productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Invitrogen) al 1.5%, y se clonaron en el vector pGEM®-T Easy. Los plásmidos con el inserto fueron secuenciados por la metodología Sanger en el Laboratorio de Biología Molecular del CNRF, utilizando el equipo Applied Biosystems modelo 3130; las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas para obtener tamaños de 400 pb y comparadas en la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para esta sección se utilizaron las ocho muestras utilizadas por Cambrón *et al.* (2018).

Finalmente, para confirmar la identidad del amplicón se realizó un análisis evolutivo, mediante la agrupación de las secuencias para hacer un

primer (10 μM), 0.1 μL of Platinum™ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 1 μL of the cDNA in a final volume of 25 μL . The amplification was performed at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 30 cycles at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 40 s with a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min. The eight amplified sequences were visualized in 1.5% agarose gel (Invitrogen) and cloned in the pGEM®-T Easy vector. The plasmids with the insert were sequenced in the Molecular Biology Laboratory of CNRF using the Sanger's methodology and the Applied Biosystems equipment model 3130. The obtained sequences were assembled and edited to obtain 400 pb sizes and compared with sequences in the NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). For this section, we used the eight samples used by Cambrón *et al.* (2018).

Finally, to confirm the amplicon identity, an evolutionary analysis was conducted by sequence grouping in order to perform a local alignment using the MEGA program version 7.0.26 and the MUSCLE algorithm (Kumar *et al.*, 2016). For the analysis, a matrix was created with sequences of *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV). As external group to obtain the tree root, we used two sequences of *Pepper mild mottle virus*, an isolate from Huludao (PMMV) (MG515725.1) and *Tobacco mild green mosaic virus*, an isolate from Xiamen (ToMGMV) (JX534224.2). The *Maximum Likelihood* (ML) method based on the *Tamura-Nei* model with 1500 *bootstrap* replications was used. The initial trees for heuristic search were automatically obtained by applying the *Neighbor-Join* and *BioNJ* algorithms to a pairwise distance matrix using the *Maximum Composite Likelihood* (MCL) approach and selecting a topology with a higher log-likelihood value (Figure 3).

The *in silico* analysis of the ToBRFV-FMX and ToBRFV-RMX oligonucleotides showed to be

alineamiento local utilizando el programa MEGA versión 7.0.26 y el algoritmo MUSCLE (Kumar *et al.*, 2016). Para realizar este análisis, se construyó una matriz con secuencias de *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV). Para obtener la raíz del árbol se usaron como grupo externo dos secuencias correspondientes a *Pepper mild mottle virus* aislado Huludao (PMMV) (MG515725.1) y *Tobacco mild green mosaic virus* aislado Xiamen (ToMGMV) (JX534224.2). Se usó el método *Maximum Likelihood* (ML) basado en el modelo de *Tamura-Nei*, con 1500 repeticiones de *bootstrap*. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos *Neighbor-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 (Figura 3).

El análisis *in silico* de los oligonucleótidos ToBRFV-FMX y ToBRFV-RMX mostró ser específico para ToBRFV, tomando como base los genomas de varios miembros del género *Tobamovirus*. De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas predichas, los oligonucleótidos son estables a las condiciones de PCR. El amplicón obtenido de ~475 pb por RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados en este trabajo, amplifican solamente en el control positivo a ToBRFV y no en las muestras infectadas de virus con genoma de RNA monocatenario de sentido positivo (incluidos varios tobamovirus) o virus de DNA, demostrando ser específicos. Por su parte, el análisis evolutivo de las secuencias nucleotídicas correspondientes al fragmento de la RdRP de las ocho muestras recolectadas en Michoacán, México, sugiere la relación evolutiva entre TMV, ToMV y ToBRFV. Luria *et al.* (2017) mencionaron una relación evolutiva entre TMV y ToBRFV, los resultados del análisis en este trabajo con un fragmento

specific to ToBRFV, based on the genome of several members of the *Tobamovirus* genus. In keeping with the predicted physical and chemical properties, the oligonucleotides are stable under PCR conditions. The amplicon of ~475 pb obtained by RT-PCR using the oligonucleotides designed in this study amplifies only ToBRFV in the positive control but not in samples infected with positive-sense single-stranded RNA (including several tobamoviruses) or DNA viruses, thus demonstrating that they are specific. The evolutionary analysis of the nucleotide sequences corresponding to the RdRP fragment of the eight samples collected in Michoacan, Mexico, suggests an evolutionary relationship among TMV, ToMV and ToBRFV. Luria *et al.* (2017) mentioned an evolutionary relationship between TMV and ToBRFV. The results of the analysis conducted in this study using an ORF1 fragment that encodes the RdRP are in agreement with the results reported by Cambrón-Crisantos *et al.* (2018), where a 1052 pb PCR product was used with the F-3666 and R-4718 oligonucleotides, reported by Luria *et al.* (2017), which showed high nodal values in the tree they created. The standardization in this study showed that 55 °C is the optimal annealing temperature of the designed oligonucleotides, given that only the 475 pb amplicon was obtained. It was established that the working range for this methodology ranges from 1 ng μL^{-1} to 1000 ng μL^{-1} , and that the lower limit of detection was ranges from 0.001 ng μL^{-1} to 0.1 ng μL^{-1} . The oligonucleotides designed in this study can specifically identify the presence of ToBRFV in plant material, thus providing a methodology for timely detection, in less time and more specifically, compared to using general oligonucleotides for the *Tobamovirus* genus, without producing false positives with other single-stranded RNA genome (+ssRNA) viruses.

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

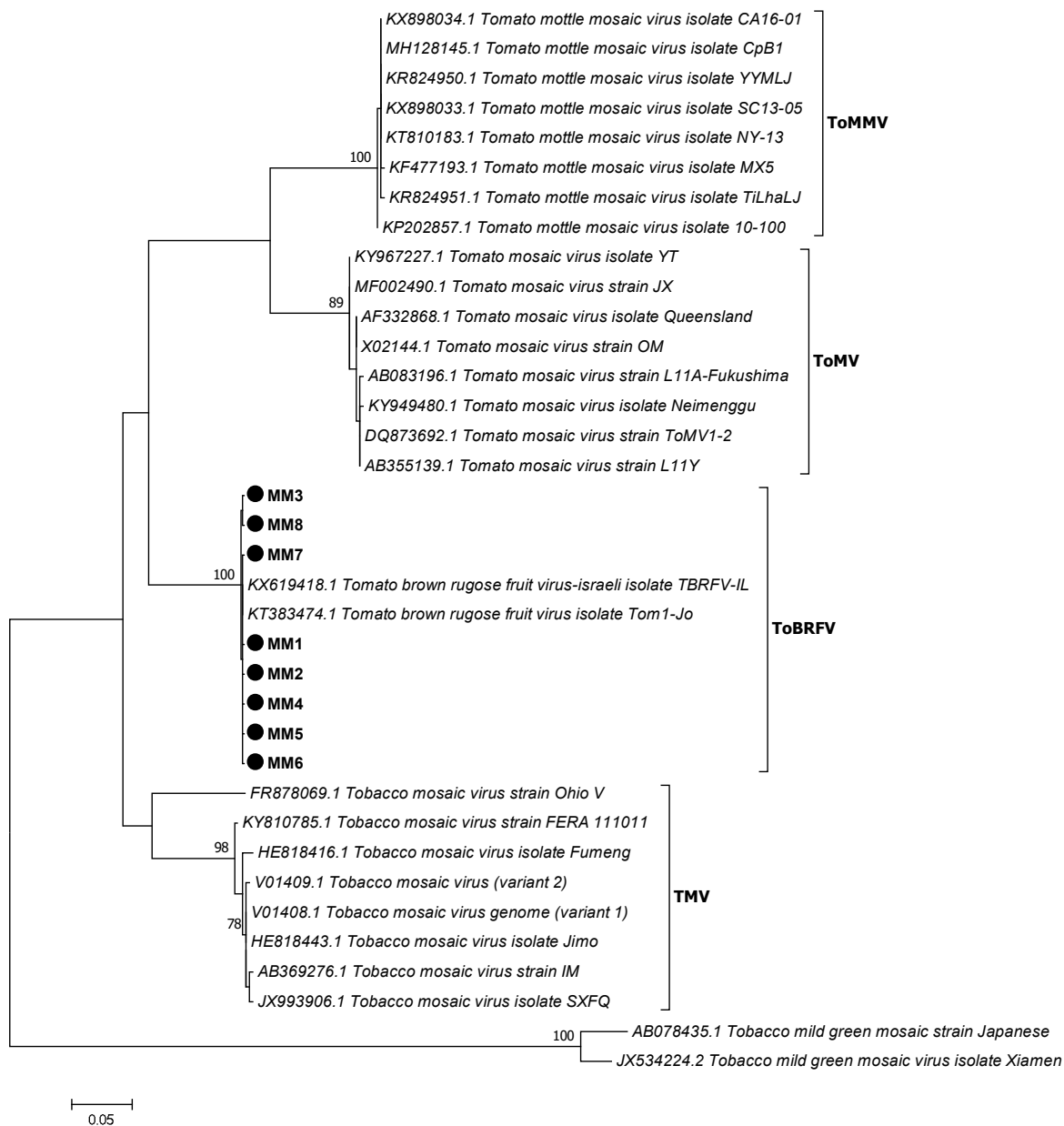


Figura 3. Análisis evolutivo de ToBRFV y virus relacionados con el género *Tobamovirus* basados en el alineamiento de la región correspondiente a RdRP viral. Las secuencias incluidas en el análisis se representan con el acrónimo del virus y los números de acceso a GenBank. Los valores nodales soportan la relación evolutiva de las secuencias analizadas.

Figure 3. Evolutionary analysis of ToBRFV and viruses related to the *Tobamovirus* genus based on the alignment of the region corresponding to viral RdRP. The sequences included in the analysis are represented by the acronym of the virus and GenBank access numbers. The nodal values support the evolutionary relationship of the analyzed sequences.

del ORF1 codificante de la RdRP, coinciden con lo reportado por Cambrón-Crisantos *et al.* (2018), donde se usó un producto de PCR de 1052 pb con los oligonucleótidos F-3666 y R-4718, reportados por Luria *et al.* (2017), mostrando altos valores no-daes en el árbol generado. La estandarización en este trabajo, mostró que 55 °C es la temperatura óptima de anillamiento de los oligonucleótidos diseñados, al obtener solo el amplicón de 475 pb. Se estableció para esta metodología que el intervalo de trabajo va de 1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , por su parte el límite de detección inferior va de 0.001 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 0.1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

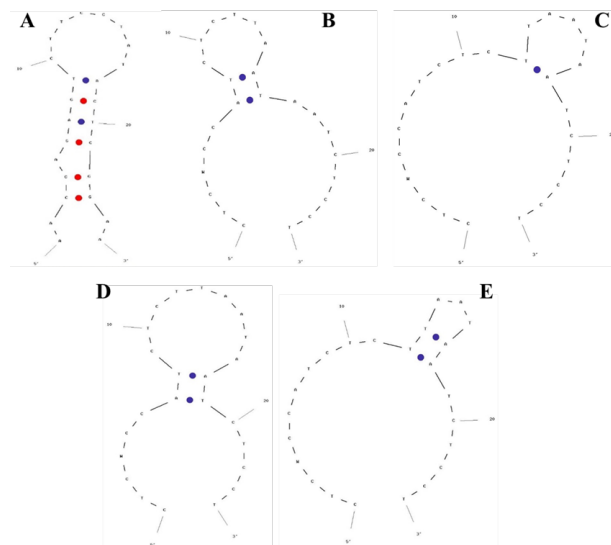
Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo, permiten identificar de manera específica la presencia de ToBRFV en material vegetal, aportando así una metodología para la detección oportuna, en menor tiempo y con mayor especificidad, en comparación con el uso de oligonucleótidos generales para el género *Tobamovirus*, sin generar falsos positivos con otros virus de genoma de ARN monocatenario de cadena sencilla (+ssRNA).

## LITERATURA CITADA

- 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. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Dombrovsky A and Smith E. 2017. Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. *Advances in Seed Biology* (pp. 234–260). DOI: 10.5772/intechopen.70244
- Dombrovsky A, Tran-nguyen LTT, and Jones RAC. 2017. *Cucumber green mottle mosaic virus*: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management. *Review in Advance of Phytopathol*, 55(10): 1–26. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080516-035349
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41: 95–98.
- Li Y, Tan G, Lan P, Zhang A, Liu Y, Li R y Li F. 2018. Detection of Tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *Journal of Virological Methods*, 259: 122–128. DOI:10.1016/j.jviromet.2018.06.012
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, Elad N, Tam Y, Sela N, Abu-Ras A, Erza N, Haberman A, Yitzhak L, Lachman O and Dombrovsky A. 2017. A new israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS ONE*, 12(1): 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0170429
- 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(7): 1863–1875. DOI: 10.1007/s00705-018-3819-5
- 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. DOI: 10.1007/s00705-015-2677-7

## ANEXO 1

Estructuras secundarias de ToBRFV-FMX/ToBRFV-RMX y propiedades fisicoquímicas  
ToBRFV-FMX/ToBRFV-RMX secondary structures and physical and chemical properties.



| Estructura                        | $\Delta G$<br>(kcal mol <sup>-1</sup> ) | T <sub>m</sub><br>(°C) | $\Delta H$<br>(kcal mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$<br>(cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Oligonucleótido ToBRFV-FMX</b> |                                         |                        |                                         |                                                        |
| A                                 | -1.82                                   | 35.4                   | -54.1                                   | -175.34                                                |
| <b>Oligonucleótido ToBRFV-RMX</b> |                                         |                        |                                         |                                                        |
| B                                 | 2.06                                    | -37.9                  | -7.7                                    | -32.74                                                 |
| C                                 | 2.33                                    | -50.2                  | -6.9                                    | -30.96                                                 |
| D                                 | 2.67                                    | -57.4                  | -7                                      | -32.44                                                 |
| E                                 | 2.68                                    | -52.7                  | -7.6                                    | -34.47                                                 |

### Homodímeros y heterodímeros formados

| Estructura                                                                                           | $\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Homodímeros del oligonucleótido ToBRFV-FMX</b>                                                    |                                      |
| 5' AAC CAGAGTCTTCCTTACTCGGAA<br>: :     : :<br>3'             : : : : :<br>AAGGCTCATATCCTTCTGAGACCAA | -6.59                                |
| 5' AAC CAGAGTCTTCCTTACTCGGAA<br>: :     : :<br>3'        AAGGCTCATATCCTTCTGAGACCAA                   | -0.96                                |
| <b>Homodímeros del oligonucleótido ToBRFV-RMX</b>                                                    |                                      |
| 5' CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT<br>:       :<br>3' TCCTCTAATAATTCCTACGWCTC                               | -4.85                                |
| 5' CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT<br>:     :<br>3' TCCTCTAATAATTCCTACGWCTC                                 | -0.96                                |
| <b>Heterodímeros de los oligonucleótidos ToBRFV-FMX/ToBRFV-RMX</b>                                   |                                      |
| 5' AAC CAGAGTCTTCCTTACTCGGAA<br>:       :<br>3' TCCTCTAATAATTCCTACGWCTC                              | -4.77                                |
| 5' AAC CAGAGTCTTCCTTACTCGGAA<br>: :     : :<br>3' TCCTCTAATAATTCCTACGWCTC                            | -1.34                                |