

Disinfectants effectiveness in *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) transmission in tobacco plants

Efectividad de desinfectantes en la transmisión del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en plantas de tabaco

Cinthia Iraís Rodríguez-Díaz, Erika Janet Zamora-Macorra*, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5, carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230; Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230; Ramiro González-Garza, BioCiencia S.A. de C.V. Agustín Melgar 2317 Norte, colonia Monterrey, Nuevo León, México Reforma. C.P. 64550.

*Corresponding author: erikazam@gmail.com.

Received: November 15, 2022.

Accepted: April 12, 2022.

Rodríguez-Díaz CI, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL and González-Garza R. 2022. Disinfectants effectiveness in *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) transmission in tobacco plants. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 240-253.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2111-2>

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 20, 2022.

Abstract. The importance of the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in the tomato and pepper crops in the world has created the need to investigate and test alternatives for its management. Preventive tactics are the best option to manage a viral disease, so the objective of this study was to evaluate the effectiveness of sodium hypochlorite, ethyl alcohol, quaternary ammonium salts, liquid soap and milk powder dissolved in water, applied by spraying and immersion of razor blades infested with the virus and inoculating mechanically on *Nicotiana rustica* and *N. benthamiana* leaves. A completely randomized design with five repetitions

Resumen. La importancia del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en el cultivo de jitomate y pimiento ha creado la necesidad de investigar y probar alternativas para su manejo, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio, alcohol etílico, sales cuaternarias de amonio, jabón líquido y leche en polvo disuelta en agua, aplicados por aspersión e inmersión en navajas infestadas con ToBRFV e inoculadas sobre *Nicotiana rustica* y *N. benthamiana*. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y la unidad experimental fue el área de una hoja de tabaco delimitada por un rectángulo, la variable respuesta fue el número de lesiones locales/cm² (LC/cm²). Se utilizó un análisis no paramétrico y una prueba de Kruskal Wallis de comparación de medias para evaluar los tratamientos, encontrando diferencias significativas ($J_i < .0001$). El hipoclorito de sodio (aspersión) y la posterior aplicación de la leche evitaron la aparición de lesiones locales y la transmisión del ToBRFV. Mientras que los peores tratamientos fueron el

was used and the experimental unit was the area of a tobacco leaf delimited by a rectangle, and the response variable was the number of local lesions/cm² (LL/cm²). A non-parametric analysis and a Kruskal Wallis test for comparison of means were used to evaluate the treatments, and significant differences were found ($J_i < .0001$). Sodium hypochlorite (spraying) and the subsequent application of milk prevented the appearance of local lesions and the transmission of ToBRFV. While the worst treatments were ethyl alcohol (immersion) with an average of 12 LL/cm², and quaternary ammonium salts (immersion) with 3.22 LL/cm². The rest of the treatments significantly reduced the number of LL/cm² (<1), but did not prevent the appearance of systemic symptoms in the inoculated plants.

Key words: Tobamovirus, milk, sodium hypochlorite, preventive management, spraying, immersion.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) crop is of worldwide importance due to its consumption, both fresh and processed. In 2019, a total of 243,635,433 tons were harvested worldwide (FAO, 2021; Foolad and Panthee, 2012). However, in recent years, its production has been reduced by the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), which was first reported in 2014 in Israel in tomato plants (Luria *et al.*, 2017) and in 2015 in Jordan (Salem *et al.*, 2016). From that time onwards, ToBRFV has been found in practically all tomato-producing countries (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018, Menzel *et al.*, 2019; Fidan *et al.*, 2019; Skelton *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Alkowni, 2019; EPPO, 2019a,b; MAA, 2020). In 2018 it was also found in pepper plantations in Mexico (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) and since

alcohol étílico (inmersión) con un promedio de 12 LC/cm² y las sales cuaternarias de amonio (inmersión) con 3.22 LC/cm². El resto de los tratamientos redujeron significativamente el número de LC/cm² (<1), pero no evitaron la aparición de síntomas sistémicos en las plantas inoculadas.

Palabras clave: Tobamovirus, leche, hipoclorito de sodio, manejo preventivo, aspersion, inmersión.

El cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza de importancia mundial por su consumo en fresco y procesados. En 2019 se cosecharon 243 635 433 toneladas a nivel mundial (FAO, 2021; Foolad y Panthee, 2012). Sin embargo, en años recientes su producción se ha visto reducida por el *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), el cual fue reportado por primera vez en 2014 en Israel en plantas de jitomate (Luria *et al.*, 2017) y en el 2015 en Jordania (Salem *et al.*, 2016). A partir de esa fecha, el ToBRFV se ha detectado prácticamente en todos los países productores de jitomate (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018, Menzel *et al.*, 2019; Fidan *et al.*, 2019; Skelton *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Alkowni, 2019; EPPO, 2019a,b; MAA, 2020). En 2018 se detectó también en cultivos de pimiento en México (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) y a partir de 2020 se ha reportado en invernaderos de pimiento en Italia y Jordania (Salem, 2020; Panno, 2020a).

El ToBRFV es un tobamovirus con partículas en forma de varilla rígida, su genoma es de ARN de cadena sencilla de sentido positivo (+ssARN) y se compone de cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF1 y ORF2 codifican la ARN polimerasa-ARN dependiente; el ORF3 codifica la proteína de movimiento y el ORF4, de menor tamaño, codifica la proteína de cubierta (Luria *et*

2020, it has been reported in pepper greenhouses in Italy and Jordan (Salem, 2020; Panno, 2020a).

ToBRFV is a tobamovirus with particles shaped like a stiff rod, its genome is positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) and it is composed of four open reading frames (ORFs). ORF1 and ORF2 codify RNA polymerase-RNA dependent; ORF3 codifies movement protein and ORF4, of a smaller size, codifies the coat proteins (Luria *et al.*, 2017). This virus is easily transmitted by mechanical means, since its particles are very stable, therefore the cultural work implied by the manipulation of plants with tools or hands are the main means of virus spread in greenhouses (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020b). In addition, it is widely known that bumblebees (*Bombus terrestris*) are potential transmitters of the ToBRFV during pollination (Levitzky *et al.*, 2019) and in the tomato, the virus has a low transmission rate via seeds (Salvatore *et al.*, 2020).

Although the transmission of the virus by seed is low, the practices of grafting, transplanting seedlings, and the different types of cultural work in general allow for its quick dissemination (Salem *et al.*, 2016). Under experimental tomato production conditions in a greenhouse, it was proven that, with an incidence of 1.45% of plants infected with ToBRFV at the beginning of the productive cycle, the crop management favored dissemination and in only 4 months, 80% of the plants were infected and by the end of the cycle, this figure increased to 100% (Panno *et al.*, 2020b). The efficient management of the ToBRFV requires the identification and application of a series of phytosanitary practices in protected crops, such as the use of certified propagation material, rapid diagnose techniques and the removal of infected plants, among others (Panno *et al.*, 2020b). A preventive, continuous and efficient cultural practice is to disinfect cutting tools to prevent the mechanical transmission of

al., 2017). Este virus se transmite fácilmente de forma mecánica ya que sus partículas son muy estables, por lo que las labores culturales que impliquen manipular las plantas con herramientas o las manos, son la principal forma de diseminación en los invernaderos (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020b). Además, se sabe que los abejorros (*Bombus terrestris*) son dispersores potenciales del ToBRFV durante la polinización (Levitzky *et al.*, 2019) y en jitomate el virus tiene una baja transmisión por semilla (Salvatore *et al.*, 2020).

Aunque la transmisión del virus de semilla a plántula sea baja, las prácticas de injerto, trasplante de plántulas y las diferentes labores culturales en general permitirán su rápida propagación (Salem *et al.*, 2016). En condiciones experimentales de producción de jitomate bajo invernadero, se demostró que con una incidencia del 1.45% de plantas infectadas con ToBRFV al inicio del ciclo productivo, el manejo del cultivo favoreció la dispersión y en solo 4 meses el 80% de las plantas estaban infectadas, y para el fin del ciclo el 100% (Panno *et al.*, 2020b). El manejo eficiente del ToBRFV requiere identificar y aplicar una combinación de prácticas fitosanitarias en cultivos protegidos, como el uso de material de propagación certificado, técnicas rápidas de diagnóstico y la eliminación de plantas infectadas, entre otras (Panno *et al.*, 2020b). Una práctica cultural preventiva, continua y eficiente es desinfectar herramientas de corte para prevenir la transmisión mecánica de virus. De manera general, se recomienda que los desinfectantes utilizados sean: económicos, de disponibilidad inmediata, efectivos, confiables, inocuos para la gente, las plantas y el ambiente, de acción rápida (menos de un minuto), estables en las condiciones ambientales del invernadero, que su uso sea legal y con un amplio espectro (Chase, 2014). Con base en lo anterior, se realizó el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto de cinco desinfectantes en

viruses. In general terms, it is recommended that disinfectants be cheap, readily available, effective, reliable, innocuous for humans, plants and the environment, quickly acting (under one minute), stable in the environmental conditions of the greenhouse, and that its use is legal and with a broad spectrum (Chase, 2014). Based on this, the present study was carried out with the aim of evaluating the effect of five disinfectants on the ineffectiveness of the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), under greenhouse conditions.

This investigation was carried out and the laboratory and greenhouse belonging to the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, in the 2020.

Source of inoculant. The inoculum source was taken from the foliar tissue of a tomato plant (*S. lycopersicum*) that had previously tested positive to ToBRFV by RT-PCR. With the tissue, a *Nicotiana glutinosa* plant was mechanically inoculated and local necrotic lesions were formed. One of these lesions was cut and used to inoculate a second *N. glutinosa* plant; the latter process was carried out twice. A local lesion of the fourth *N. glutinosa* plant was used to inoculate a tomato plant and 30 days later, it was analyzed by RT-PCR to verify the presence of the ToBRFV. Next, the inoculum source was increased, and for this, 2 g of tomato leaves infected with ToBRFV were macerated in a phosphate buffer at pH 7.0. The macerate was rubbed with a cotton swab on the first two true leaves of three tomato seedlings previously dusted with carborundum 400 mesh. Later, the inoculated leaves were rinsed with sterile distilled water. The plants were inspected visually every 24 hours until the appearance of systemic symptoms, typical of the ToBRFV.

Analysis by RT-PCR of the source of inoculant. The infection of the ToBRFV in the inoculated

la infectividad del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), bajo condiciones de invernadero.

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero pertenecientes al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, durante el 2020.

Fuente de inóculo. El inóculo se obtuvo a partir de tejido foliar de jitomate (*S. lycopersicum*) positivo a ToBRFV mediante RT-PCR. Con el tejido se inoculó mecánicamente una planta de *Nicotiana glutinosa* y se formaron lesiones locales necróticas. Una de estas lesiones locales se cortó y con ella se inoculó una segunda planta de *N. glutinosa*; este último proceso se repitió dos veces. Una lesión local de la cuarta planta de *N. glutinosa* se utilizó para inocular una planta de jitomate y 30 días después se analizó mediante RT-PCR para verificar la presencia del ToBRFV. Posteriormente, se incrementó el inóculo para lo cual se maceraron 2 g de hojas de jitomate infectadas con ToBRFV en buffer de fosfatos pH 7.0. El macerado se frotó con un hisopo sobre las primeras dos hojas verdaderas de tres plántulas de jitomate previamente espolvoreadas con carborundum 400 mallas. Posteriormente, las hojas inoculadas se enjuagaron con agua destilada estéril. Las plantas se inspeccionaron visualmente cada 24 horas hasta la aparición de síntomas sistémicos típicos del ToBRFV.

Análisis por RT-PCR de la fuente de inóculo. La infección del ToBRFV en las plantas inoculadas se verificó mediante RT-PCR. Para ello, se extrajo el ARN total a partir de 0.1 g del material vegetal. Se utilizó Trizol[®] siguiendo la metodología descrita por Jordon-Thaden y colaboradores (2015), usando nitrógeno líquido como disruptor de membranas. La calidad y cantidad del ARN extraído se verificó y cuantificó con un Nanodrop 2000[®]. El ARN total se ajustó a 300 ng μL^{-1} y se utilizó 1 μL para realizar RT-PCR con los oligos y protocolos descritos

plants was verified by RT-PCR. In order to carry this out, the total RNA was extracted from 0.1 g of the plant material. Trizol[®] was used following the method described by Jordon-Thaden and collaborators (2015), with liquid nitrogen as a membrane disruptor. The quality and quantity of the RNA extracted was verified and quantified with a Nanodrop 2000[®]. The total RNA was adjusted to 300 ng μL^{-1} and 1 μL was used to perform a RT-PCR with the oligos and protocols described by Cambrón and collaborators (2018). The products of the RT-PCR were charged in a 1.5% agarose gel and electrophoresis was performed. The fragments were verified under UV light to be within the expected weight (450 pb) and they were purified with EXO-SAP[®] following the instructions by the manufacturer. The purified products were sent to be sequenced to Macrogen, Korea. Total RNA of ToBRFV infected plants got from the virus bank of the integral phytosanitary diagnose laboratory was used as a positive control. Sterile distilled water was used as a negative control for the RT-PCR reaction.

Nursery beds, transplanting and establishing nicotianas. Three *N. benthamiana* and *N. rustica* nursery beds were established in 1 L plastic containers with vermiculite substrate. Seeds of each one of the species were sown broadcast and the surface of the containers was covered with plastic film. The *N. rustica* seedbed was put in a sunny place to obtain a higher percentage of germination, and the *N. benthamiana* seedbed was kept in complete darkness until seedling emergence. When the seedling displayed two true leaves, three to four seedlings of each plant species were transplanted into 1 L styrofoam cups with sterilized Peat moss substrate, and were later placed in cages to avoid the presence of putative insects, vectors of other viruses. Six weeks later, thinning was carried out, leaving only two vigorous and developed plants.

por Cambrón y colaboradores (2018). Los productos de RT-PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y se realizó electroforesis. Se verificó bajo luz UV que los fragmentos estuvieran dentro del peso esperado (450 pb) y se purificaron con EXO-SAP[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea. Como control positivo se utilizó ARN proveniente de plantas infectadas con ToBRFV existentes en el banco de virus del Laboratorio de diagnóstico integral fitosanitario. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril para la reacción de RT-PCR.

Almácigos, trasplante y establecimiento de nicotianas. Se establecieron tres almácigos de *N. benthamiana* y *N. rustica* en recipientes de plástico de 1 L con vermiculita como sustrato. Se sembraron al voleo semillas de cada una de las especies y se selló la superficie con hule para emplear. El almácigo de *N. rustica* se colocó en un lugar soleado, para tener mayor porcentaje de germinación, mientras que el de *N. benthamiana* se mantuvo en completa oscuridad hasta la emergencia de las plántulas. Cuando las plántulas presentaron dos hojas verdaderas, se trasplantaron de tres a cuatro plántulas de cada especie vegetal en vasos de unicel de 1 L de capacidad con Peat moss como sustrato, previamente esterilizado, y se colocaron en jaulas para evitar la presencia de insectos putativos vectores de otros virus. A las seis semanas se realizó el raleo, dejando sólo dos plantas vigorosas y desarrolladas.

Bioensayos

Preparación de las plantas de tabaco y fuente de inóculo. Cuando las plantas de nicotiana presentaron cinco hojas completamente desarrolladas se seleccionaron 2 o 3 hojas del estrato medio y en cada una de ellas se marcó un rectángulo con un marcador de tinta indeleble y se midió la base y

Bioassays

Preparation of tobacco plants and source of inoculant. When the nicotiana plants presented 5 fully developed leaves, 2 or 3 were selected from the mid-section and on each one of them, a rectangle was drawn using a permanent marker and the base and height was measured using a ruler to obtain the area. The experimental unit was the area defined by the rectangle drawn and for each treatment evaluated (Table 1), five rectangles were used. Every leaf was labelled with progressive numbers. Immediately afterwards, a maceration was prepared from tissue infected with ToBRFV in a phosphate buffer pH 7.0, and the maceration was divided into equal parts to inoculate *N. rustica* and *N. benthamiana*, respectively.

Disinfection of blades and mechanical inoculation. The marked areas of the leaves to

altura con ayuda de una regla para obtener así el área. La unidad experimental fue el área delimitada por el rectángulo marcado y por cada tratamiento evaluado (Cuadro 1), se utilizaron cinco rectángulos. Cada hoja fue etiquetada con números progresivos. Inmediatamente después se preparó un macerado de tejido infectado de ToBRFV en buffer de fosfatos pH 7.0, y el macerado se dividió en partes iguales para inocular *N. rustica* y *N. benthamiana*, respectivamente.

Desinfección de navajas e inoculación mecánica. Las áreas marcadas de las hojas a inocular se espolvorearon con carborundum 400 mallas y la navaja estéril se sumergió durante cinco segundos en el macerado de la fuente de inóculo o en macerado vegetal sano. Posteriormente, se sumergió la navaja de bisturí en un vaso de precipitado estéril con el tratamiento correspondiente (Cuadro 1) durante 30 segundos (inmersión) o se asperjó con ayuda de

Table 1. Treatments evaluated as disinfectants to avoid the mechanical spreading of the Tomato brown rugose fruit virus in *N. rustica* and *N. benthamiana* plants.
Cuadro 1. Tratamientos evaluados como desinfectantes para evitar la transmisión mecánica del Tomato brown rugose fruit virus en plantas de *N. rustica* y *N. benthamiana*.

Tratamiento	Concentración (%)	Aplicación
Hipoclorito de sodio	3 ^{a, b}	Aspersión
Hipoclorito de sodio	3 ^{a, b}	Inmersión
Leche en polvo (Svelty®)	6 ^{a, b}	Aspersión
Leche en polvo (Svelty®)	6 ^{a, b}	Inmersión
Alcohol etílico	70 ^a y 96 ^b	Aspersión
Alcohol etílico	70 ^a y 96 ^b	Inmersión
Sales cuaternarias de amonio	0.4 ^a y 2 ^b	Aspersión
Sales cuaternarias de amonio	0.4 ^a y 2 ^b	Inmersión
Jabón líquido comercial	18 ^a y 7.5 ^b	Inmersión
Jabón líquido comercial	7.5 ^b	Aspersión
Hipoclorito de sodio y leche en polvo (Svelty®).	3 y 6 ^{a, b}	Aspersión
Hipoclorito de sodio y leche en polvo (Svelty®).	3 y 6 ^{a, b}	Inmersión
Agua destilada estéril (Testigo positivo)	No aplica	Aspersión
Agua destilada estéril (Testigo positivo)	No aplica	Inmersión
Agua destilada estéril (Testigo negativo)	No aplica	Aspersión
Agua destilada estéril (Testigo negativo)	No aplica	Inmersión

^a= Concentration tested on *Nicotiana rustica*. / ^a= Concentración probada en *Nicotiana rustica*.

^b= Concentration tested on *N. benthamiana*. / ^b= Concentración probada en *N. benthamiana*.

be inoculated were dusted with carborundum 400 mesh and the sterile scalpel blade was submerged five seconds in the maceration of the inoculum source or in the healthy plant maceration. Later, this sterile blade was submerged in a sterile beaker with the corresponding treatment (Table 1) for 30 seconds (immersion) or it was sprayed on both sides of the blade (spraying), and immediately afterwards, the blade was rubbed on the surface of the rectangle drawn on the leaf. In the case of the leaves treated simultaneously with sodium hypochlorite and milk, they were first submerged or sprayed with sodium hypochlorite, followed immediately by milk. As a positive control, we used a blade that had only submerged in, or sprayed with, sterile distilled water after being submerged in the infectious macerated. As a negative control, the blade was submerged in the healthy plant macerate and then submerged in, or sprayed with, sterile distilled water. The inoculated leaves were rinsed with sterile water to remove the carborundum. For each treatment evaluated, different sterile blades were used.

Data evaluation and analysis. The local chlorotic lesions in the rectangle drawn on each leaf (local lesions/cm² =LL/cm²) were counted beginning five days after inoculation (dai) and up to 8 dai. The plants used for the treatments were kept in the greenhouse until they flowered to record the appearance of systemic symptoms. With the LL/cm², a non-parametric means comparison analysis was carried out with a Kruskal Wallis test; $\alpha \leq 0.05$ was considered for the statistical significance. The data were analyzed in the program JMP by SAS®.

The tomato plants used as the inoculant source amplified the expected fragment of 450 pb and its sequence had a similarity of 95% with *Tomato brown rugose fruit virus* isolate CA18-01 (Sequence ID: MT002973.1).

un atomizador por ambas caras de la navaja (aspersión), e inmediatamente después se frotó la superficie del rectángulo marcado en la hoja con la navaja. En el caso de las hojas tratadas simultáneamente con hipoclorito de sodio y leche, primero se sumergió o asperjó con hipoclorito de sodio e inmediatamente después con la leche. Como testigo positivo, se utilizó una navaja que se sumergió o asperjó solo con agua destilada estéril después de ser sumergida en el macerado infectivo. Como testigo negativo, la navaja fue sumergida en el macerado de una planta sana y posteriormente sumergida o asperjada con agua destilada estéril. Las hojas inoculadas se enjuagaron con agua estéril para eliminar el carborundum. Para cada tratamiento evaluado, se utilizaron diferentes navajas estériles.

Evaluación y análisis de datos. Las lesiones locales cloróticas en el rectángulo delimitado en cada hoja (lesiones locales/cm²=LC/cm²) se contabilizaron desde los cinco días después de la inoculación (ddi) y hasta los 8 ddi. Las plantas utilizadas para los tratamientos se mantuvieron en el invernadero hasta su floración para registrar la aparición de síntomas sistémicos. Con las LC/cm² se realizó un análisis no paramétrico de comparación de medias mediante una prueba de Kruskal Wallis, se consideró un $\alpha \leq 0.05$ para la significancia estadística. Los datos fueron analizados en el programa de JMP de SAS®.

Las plantas de jitomate utilizadas como fuente de inóculo amplificaron el fragmento esperado de 450 pb y su secuencia tuvo una similitud del 95% con *Tomato brown rugose fruit virus* isolate CA18-01 (Sequence ID: MT002973.1).

Bioensayos. Para *N. rustica*, la prueba de Kruskal Wallis mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($J_i < 0.0001$). Los mejores fueron el hipoclorito de sodio al 3% seguido de la leche en

Bioassays. For *N. rustica*, the Kruskal Wallis test displayed a significant difference between treatments ($J_i < .0001$). The best was sodium hypochlorite at 3%, followed by powdered milk, both by immersion and sprayed. These two treatments behaved in the same way as the negative control (Table 2). The treatment with the greatest number of LL/cm² was ethyl alcohol at 70% by immersion, with values higher than those of the positive control (Table 2). The sodium hypochlorite and powdered milk, applied individually, reduced by 99 and 96% the number of local lesions, respectively, in relation to the positive control; meanwhile, the liquid soap by immersion and ethyl alcohol at 70% as a spray reduced the appearance

polvo tanto en inmersión como asperjado. Estos dos tratamientos se comportaron igual al testigo negativo (Cuadro 2). El tratamiento con el mayor número de LC/cm² fue el alcohol etílico al 70% en inmersión, con valores superiores a los del testigo positivo (Cuadro 2). El hipoclorito de sodio y la leche en polvo, aplicados de manera individual, tuvieron una reducción del 99 al 96% del número de lesiones locales, respectivamente, con relación al testigo positivo; mientras que el jabón líquido en inmersión y el alcohol etílico al 70% en aspersión, redujeron la aparición de lesiones locales en 85 y 83%, respectivamente. En el caso de las sales cuaternarias de amonio se tuvo una reducción en el número de lesiones locales del 30%.

Table 2. Means and standard deviation of the number of local lesions/cm² obtained on leaves of *Nicotiana rustica* and *N. benthamiana* from every disinfectant evaluated.

Cuadro 2. Medias y desviación estándar del número de lesiones locales/cm² obtenidas en hojas de *Nicotiana rustica* y *N. benthamiana* de cada desinfectante evaluado.

Tratamiento	Concentración (%)	Aplicación	<i>Nicotiana rustica</i>		<i>Nicotiana benthamiana</i>	
			Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Agua - Testigo negativo	No aplica	Aspersión	0	0	0	0
Agua - Testigo negativo	No aplica	Inmersión	0	0	0	0
Hipoclorito de sodio y leche en polvo	3 y 6 ^{y,z}	Aspersión	0	0	0	0
Hipoclorito de sodio y leche en polvo	3 y 6 ^{y,z}	Inmersión	0	0	0.04	0.05
Leche en polvo	6 ^{y,z}	Inmersión	0.05	0.06	0.7	1.18
Hipoclorito de sodio	3 ^{y,z}	Inmersión	0.27	0.31	0.32	0.66
Hipoclorito de sodio	3 ^{y,z}	Aspersión	0.32	0.32	0.06	0.09
Leche en Polvo	6 ^{y,z}	Aspersión	0.38	0.3	0	0
Jabón líquido comercial	18 ^y y 7.5 ^z	Inmersión	0.73	0.63	0.48	0.32
Jabón líquido comercial	7.5 ^z	Aspersión	--	--	0.14	0.22
Alcohol etílico	70 ^y y 96 ^z	Aspersión	0.79	0.4	2.04	1.52
Sales cuaternarias de amonio	0.4 ^y y 2 ^z	Aspersión	2.49	2	0	0
Sales cuaternarias de amonio	0.4 ^y y 2 ^z	Inmersión	3.22	2.16	0.16	0.19
Agua - Testigo positivo	No aplica	Inmersión	3.44	1.89	1.7	1.45
Agua - Testigo positivo	No aplica	Aspersión	4.78	1.46	9.64	3.16
Alcohol etílico	70 ^y y 96 ^z	Inmersión	12.03	11.66	1.42	0.88

^y= Concentración probada en *Nicotiana rustica*. / ^z= Concentración probada en *Nicotiana rustica*.

^y= Concentración probada en *N. benthamiana*. / ^z= Concentración probada en *N. benthamiana*.

of local lesions by 85 and 83%, respectively. In the case of the quaternary ammonium salts, there was a reduction of 30% in the number of local lesions.

For *N. benthamiana*, the Kruskal Wallis test displayed significant differences between treatments ($J_i < .0001$). The 3% sodium hypochlorite followed by the powdered milk, the powdered milk and the quaternary ammonium salts, applied by spraying, were the treatments with the least local lesions that behaved in the same way as the negative control. The contrary was true for the ethyl alcohol at 96%, which had the highest number of local lesions, yet below the positive control (Table 2).

The 3% sodium hypochlorite, applied by spraying, reduced the LL/cm² by 99%, whereas its application by immersion reduced them by 94%, in comparison with the average of the positive control. The commercial liquid soap, applied by spraying and immersion, reduced the number of LL/cm² by 91 and 97%, respectively. The powdered milk, applied by immersion, reduced the appearance of LL/cm² by 87%. In general terms, the treatments applied by spraying appeared to be more effective than by immersion. Probably, the effect of the pressure with which the treatment is fired from the container favors the “cleanliness” of the blade and more viral particles are eliminated.

In *N. benthamiana* and *N. rustica*, the local chlorotic lesions appeared 4 to 6 days after inoculation. Later, the chlorotic lesions turned necrotic and coalesced (Figures 1 and 2). The appearance of systemic symptoms (severe chlorosis and mosaic) was recorded at 15 dai in treatments in which the number of LL/cm² was higher and in the treated plants with less LL/cm² the appearance of symptoms was recorded at 20 to 23 dai. Only in treatments with 0 LL/cm², including the negative controls, no systemic symptoms were observed.

The dose of quaternary ammonium salts applied on the treatments in this investigation surpass

Para *N. benthamiana*, la prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($J_i < .0001$). El hipoclorito de sodio al 3% seguido de la leche en polvo, la leche en polvo y las sales cuaternarias de amonio, aplicados por aspersión, fueron los tratamientos con menos lesiones locales que se comportaron igual que el testigo negativo. Caso contrario, el alcohol etílico al 96% tuvo el mayor número de lesiones locales, pero por debajo del testigo positivo (Cuadro 2).

El hipoclorito de sodio al 3% aplicado por aspersión redujo en un 99% las LC/cm², mientras que su aplicación en inmersión redujo el 94%, comparado con el promedio del testigo positivo. El jabón líquido comercial aplicado por aspersión e inmersión redujo en 91 y 97%, respectivamente, el número de LC/cm². La leche en polvo aplicada por inmersión redujo en 87% la aparición de LC/cm². De manera general, se observó que la aplicación por aspersión fue más efectiva que por inmersión. Probablemente el efecto que tiene la presión con la que sale disparado el tratamiento del propio aspersor, favorezca la “limpieza” de la navaja y se eliminen más partículas virales.

En *N. benthamiana* y *N. rustica* las lesiones locales cloróticas aparecieron entre los cuatro y seis días después de la inoculación. Posteriormente, las lesiones cloróticas se necrosaron y coalescieron (Figura 1 y 2). La aparición de síntomas sistémicos (clorosis severa y mosaico) se registró a los 15 ddi en los tratamientos cuyo número de LC/cm² fue mayor y en las plantas tratadas que tuvieron menos LC/cm² se registró la aparición de síntomas entre los 20 y 23 ddi. Solamente en los tratamientos que tuvieron 0 LC/cm², incluyendo los testigos negativos, no se observaron síntomas sistémicos.

Las dosis de las sales cuaternarias de amonio aplicadas en los tratamientos de la presente investigación exceden la recomendada por el fabricante como “viricida” (0.5 L/400 L de agua =0.125%);

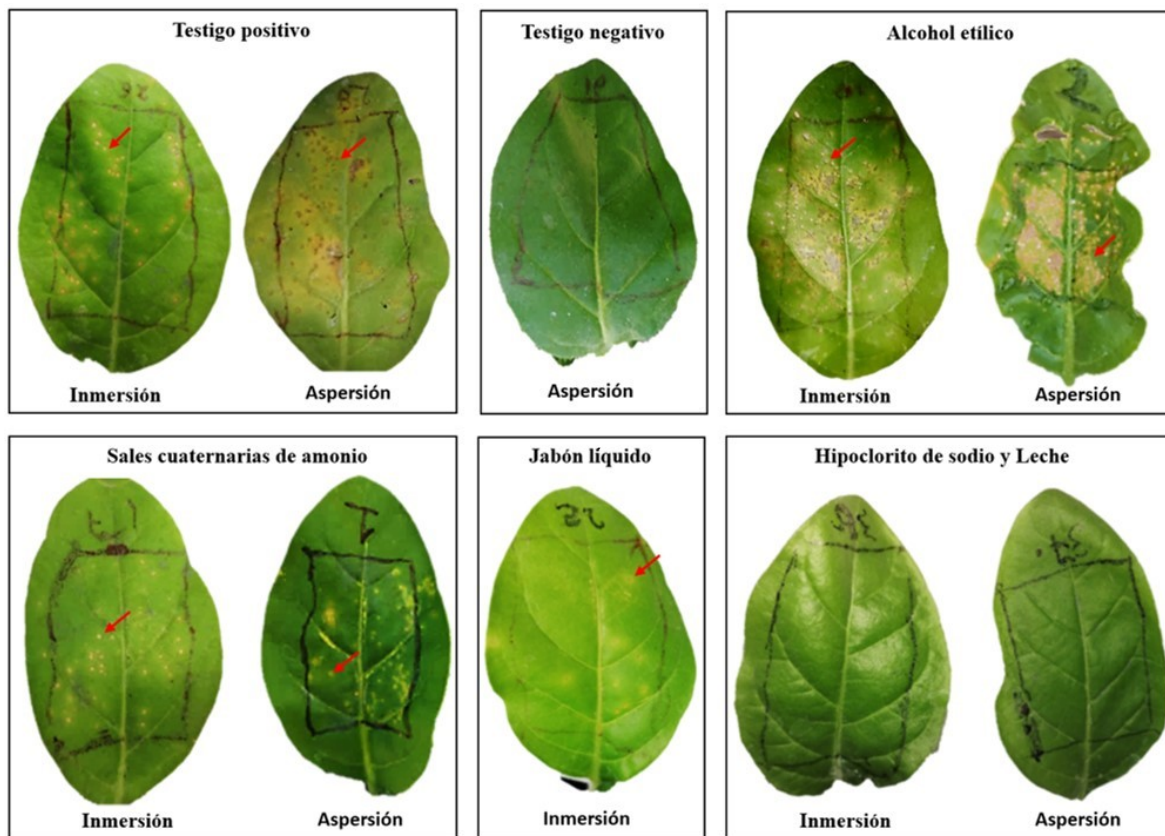


Figure 1. Local chlorotic and necrotic lesions on *Nicotiana rustica* leaves (arrows) caused by ToBRFV after 13 days post inoculation with blades treated with different disinfectants.

Figura 1. Lesiones locales cloróticas y necróticas en hojas de *Nicotiana rustica* (flechas) ocasionadas por ToBRFV después de 13 días de la inoculación con navajas tratadas con diferentes desinfectantes.

the dose recommended by the manufacturer as “viricidal” (0.5 L/400 L water =0.125%), although it did not avoid the appearance of local lesions or systemic symptoms. Despite the range of action of the quaternary ammonium compounds being wide and presenting disinfectant activity over bacteria and fungi, it is well-known to work better on viruses with a lipid cover (Diomedi *et al.*, 2017). Both the quaternary ammonium salts and ethyl alcohol are widely recommended to eliminate viruses. However, in this study and in the one carried out by Chanda and collaborators (2021), the

sin embargo, no logró evitar la aparición de lesiones locales ni de síntomas sistémicos. Si bien el espectro de acción de los compuestos de amonio cuaternario es muy amplio presentando actividad desinfectante sobre bacterias y hongos, se sabe que funciona mejor en virus envueltos en una capa lipídica (Diomedi *et al.*, 2017). Tanto las sales cuaternarias de amonio como el alcohol etílico son ampliamente recomendados para eliminar virus; sin embargo, en este estudio y en el realizado por Chanda y colaboradores (2021), los tratamientos con sales cuaternarias y alcohol no fueron efectivos

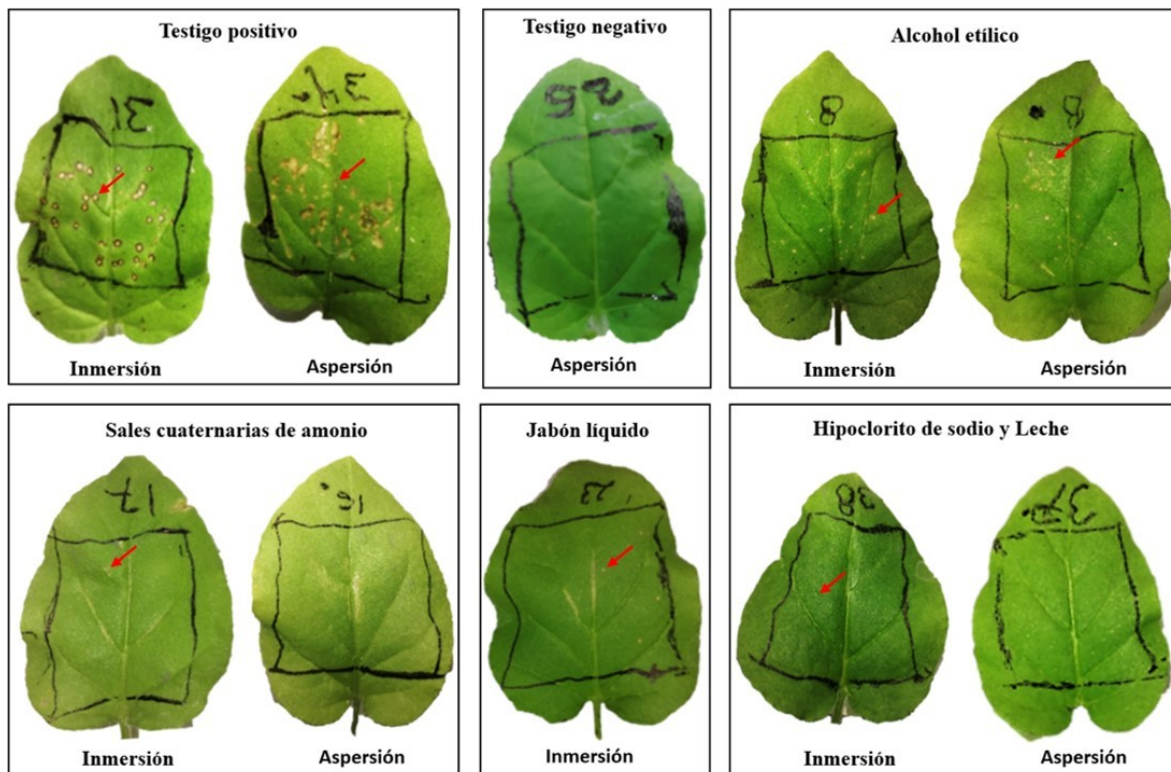


Figure 2. Local chlorotic and necrotic lesions on *Nicotiana benthamiana* leaves (arrows) caused by ToBRFV after 12 days pots inoculation with blades treated with different disinfectants.
 Figura 2. Lesiones locales cloróticas y necróticas en hojas de *Nicotiana benthamiana* (flechas) ocasionadas por ToBRFV después de 12 días de la inoculación con navajas tratadas con diferentes desinfectantes.

treatments with quaternary salts and alcohol were not effective to avoid the spreading of the ToBRFV, probably due to the nature of the protein cover of the tobamovirus that do not have a lipid layer (Luria *et al.*, 2017).

Regarding the soap, the effect of detergents on the stability of viruses has been documented and it is known that it depends widely on their pH (Ward and Ashley, 1979) and on the conformation of the cover of the capsid. In viruses with a lipid cover, such as SARS-CoV-2, the use of soaps has been widely recommended (Welch *et al.*, 2020). The ToBRFV lacks a lipid membrane, and although the soap reduced the number of lesions, it did not avoid the appearance of systemic symptoms.

para evitar la transmisión del ToBRFV, probablemente debido a la naturaleza de la cubierta proteica de los tobamovirus que carece de capa lipídica (Luria *et al.*, 2017).

Respecto al jabón, se ha documentado el efecto de detergentes en la estabilidad de los virus, y se sabe que depende ampliamente de su pH (Ward y Ashley, 1979) y de la conformación de la cubierta de la cápsida. En virus con cubierta lipídica, como el SARS-CoV-2, el uso de jabones ha sido ampliamente recomendado (Welch *et al.*, 2020). El ToBRFV carece de membrana lipídica, y aunque el jabón redujo el número de lesiones no evitó la aparición de síntomas sistémicos.

The 3% sodium hypochlorite is effective to avoid the spreading of viruses and does not produce phytotoxicity (Chanda *et al.*, 2021). Chlorine is one of the disinfectants with intermediate efficiency, since it disactivates drastically in the presence of organic matter (Vignoli, 2006). For this reason, as an independent treatment, it is not as effective when applied by immersion with the tool due to organic matter accumulating in the container and despite having displayed good results when applied by spraying, it did not stop systemic symptoms from appearing.

Lactoferrin was recently proven to be effective in avoiding infections by ToBRFV and the *Cucumber green mottle mosaic virus*, since this glycoprotein probably joins the cell receptor used by the virus (Chanda *et al.*, 2021). It is possible that the proteins in the milk used in this investigation may have a similar function to lactoferrin, lysozyme and lactoperoxidase, among others (Rodríguez *et al.*, 2005) and may, therefore, join the cell receptors of the viral particle, stopping it from attaching to the host cell and unleashing the cell infection process. On the other hand, applying reconstituted fat-free milk can be very effective to reduce the activity of the *Tobacco mosaic virus* on the surfaces of plants, tools and clothing (Chase, 2014). Submerging tools in milk has proven ineffective, therefore they must be sprayed, and sometimes, the treatment may work up to 10 days after applying, so long as they have not been washed (Chase, 2014). However, the problem with applying them directly on plants is that it may promote the development of sooty mold. In addition, there are no guidelines that allow or prohibit the use of milk to control viruses (Chase, 2014).

Under the conditions in which this investigation was carried out, the treatment that avoided the appearance of systemic symptoms in both species of *Nicotiana* was the combination of 3% sodium

En el caso del hipoclorito de sodio al 3% es efectivo para evitar la transmisión de virus y no genera fitotoxicidad (Chanda *et al.*, 2021). El cloro es uno de los desinfectantes de eficiencia intermedia ya que se inactiva drásticamente ante la presencia de materia orgánica (Vignoli, 2006). Por esta razón como tratamiento independiente, no es tan efectivo aplicado por inmersión de la herramienta debido a la acumulación de materia orgánica que se va generando en el recipiente y, si bien, aplicado por aspersión mostró buenos resultados, no impidió la aparición de síntomas sistémicos.

Recientemente se demostró que la lactoferrina fue efectiva para evitar la infección de ToBRFV y del *Cucumber green mottle mosaic virus*, ya que probablemente esta glicoproteína se una al receptor celular que utiliza el virus (Chanda *et al.*, 2021). Es posible que las proteínas de la leche utilizadas en este trabajo tengan una función similar a la lactoferrina, la lisozima y la lactoperoxidasa, entre otras (Rodríguez *et al.*, 2005) y, por tanto, se unan a los receptores celulares de la partícula viral, impidiendo que se adhiera a la célula hospedante y se desencadene el proceso de infección celular. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de la leche sin grasa reconstituida puede ser muy efectiva para reducir la actividad del *Tobacco mosaic virus* sobre superficies vegetales, herramientas y ropa (Chase, 2014). Se ha visto que sumergir las herramientas en la leche no es efectivo, por lo cual debe asperjarse y que, en algunas ocasiones, el tratamiento puede funcionar hasta 10 días después de su aplicación, siempre y cuando no haya lavado (Chase, 2014). Sin embargo, el inconveniente de aplicarla directamente sobre las plantas es que puede favorecer el desarrollo de fumagina; además no existe algún lineamiento que permita o no el uso de leche para controlar virus (Chase, 2014).

Bajo las condiciones realizadas en esta investigación, el tratamiento que evitó la aparición de

hypochlorite and the latter addition of 6% milk (Svelty®), each in individual containers and sprayed on both sides of the blade in the order mentioned here. It is important to keep the sodium hypochlorite and milk in separate containers and apply the sodium hypochlorite before the milk, since the milk could deactivate the effect of the sodium hypochlorite. It is necessary to study whether 3% sodium hypochlorite acts first on the virions and then the proteins in the milk inactivate the remaining infectious viral particles. It is also important to verify if 3% sodium hypochlorite and 6% milk have the same effectiveness on the cutting tools used on chili pepper or tomato crops.

In conclusion, although most disinfectants reduced local lesions significantly, only spraying 3% sodium hypochlorite, followed by 6% powdered milk on the blade avoided the mechanical transmission of the *Tomato brown rugose fruit virus* in *N. benthamiana* and *N. rustica*.

LITERATURE CITED

- Alkowni R, Alabdallah O and Fadda Z. 2019. Molecular identification of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology* 101: 719–723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Rangel SA, García-Ávila DJC and López-Buenfil JA. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 185–192. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>
- Chanda B, Shamimuzzaman Md, Gilliard A and Ling K-S. 2021. Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: *Tomato brown rugose fruit virus* and *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Virology Journal* 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01479-8>
- Chase AR. 2014. The Truth About Milk and TMV. Chase Agricultural Consulting LLC. Greenhouse Product News. <https://gpnmag.com/article/truth-about-milk-and-tmv/> (Consultada, julio 2021)
- Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, Quintanilla M, Riedel G, Tinoco J y Cifuentes M. 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología*

síntomas sistémicos en ambas especies de *Nicotiana* fue la combinación del hipoclorito de sodio al 3% y la posterior aplicación de leche (Svelty®) al 6%, cada uno contenido en recipientes individuales y asperjados por ambos lados de la navaja en el orden en que son mencionados. Es importante mantener en recipientes separados el hipoclorito de sodio y la leche, y aplicar primero el hipoclorito de sodio y después la leche, ya que la leche podría inactivar el efecto del hipoclorito de sodio. Es necesario estudiar si el hipoclorito al 3% actúa primero sobre los viriones y posteriormente, las proteínas de la leche inactivan las partículas virales infectivas que hayan quedado. También es importante corroborar si el hipoclorito de sodio al 3% y la leche al 6% tiene la misma efectividad sobre las herramientas de corte que se utilizan en los cultivos de chile o jitomate.

En conclusión, aunque la mayoría de los desinfectantes redujeron significativamente las lesiones locales, solo la aspersión de hipoclorito de sodio al 3% seguida de la aspersión de leche en polvo al 6% a la navaja, evitó la transmisión mecánica del *Tomato brown rugose fruit virus* en *N. benthamiana* y *N. rustica*.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- 34: 156-174. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 2019a. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in Greece. Reporting Service 2019/210. <https://gd.eppo.int/reporting/article-6640> (Consultada, febrero 2021)
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 2019b. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in Spain. Reporting Service. 2238. <https://gd.eppo.int/reporting/article-6668> (Consultada, febrero 2021)
- Fidan H, Sarikaya P and Calis O. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato in Turkey. *New Disease Reports* 39: 18. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2021. FAOSTAT. Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. (Consultada, agosto 2021).
- Foolad MR and Panthee DR. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 93-123. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.616057>
- Jordon-Thaden IE, Chanderbali AS, Gitzendanner MA and Soltis DE. 2015. Modified CTAB and TRIZOL protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Applied Plant Sciences* 3(5): apps.1400105. <https://doi.org/10.3732/apps.1400105>.
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, Sela N, Laskar O, Milrot E and 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>
- Ling KS, Tian T, Gurung S, Salati R and Gilliard A. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease* 103: 1439. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- 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): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>.
- Ministère de L'Agriculture et de L'Alimentation (MAA). 2020. Virus ToBRFV: le ministère confirme la contamination de tomates en serre dans le Finistère. <https://agriculture.gouv.fr/virus-tobrfv-le-ministere-confirme-la-contamination-de-tomates-en-serre-dans-le-finistere> (Consultada, febrero 2021)
- Menzel W, Knierim D, Winter S, Hamacher J and Heupel M. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in Germany. *New Disease Report* 39:1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Panno S, Caruso AG and Davino S. 2019. First Report of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* 103: 1443. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Panno S, Caruso AG, Blanco G and Davino S. 2020a. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting sweet pepper in Italy. *New Disease Report* 41: 20. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
- Panno S, Caruso AG, Stefano B, Lo Bosco G, Ezequiel RA and Salvatore D. 2020b. Spread of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* in Sicily and Evaluation of the Spatiotemporal Dispersion in Experimental Conditions. *Agronomy* 10: 834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>
- Rodríguez FDA, Vázquez ML y Ramos CMG. 2005. Actividad antimicrobiana de la Lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47: 102-11. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5166>
- Salem NM, Cao MJ, Odeh S, Turina M and Tahzima R. 2020. First Report of *Tobacco mild green mosaic virus* and *Tomato brown rugose fruit virus* Infecting *Capsicum annuum* in Jordan. *Plant Disease* 104 (2). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1189-PDN>
- Salem NM, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW and Turina M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161: 503-506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salvatore D, Caruso AG, Bertacca S, Barone S and Panno S. 2020. *Tomato Brown Rugose Fruit Virus*: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. *Plants* 9: 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>
- Skelton A, Buxton-Kirk A, Ward R, Harju V, Frew L, Fowkes A, Long M, Negus A, Forde S, Adams IP, Pufal H, McGreig S, Weekes R and Fox A. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in the United Kingdom. *New Disease Report* 40: 12. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>
- Vignoli R. 2006. Esterilización y desinfección. Temas de Bacteriología y Virología para CEFA. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap> (Consultada, mayo 2021).
- Ward RL and Ashley CS. 1979. pH modification of the effects of detergents on the stability of enteric viruses. *Applied Environmental Microbiology* 38: 314-322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243483/pdf/aem00201-0140.pdf>
- Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG and Killip MJ. 2020. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *Journal of Clinical Microbiology* 58: e01713-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-20>
- Yan ZY, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP and Li XD. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in China. *Plant Disease* 103: 2973. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>