

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DETECCIÓN DE TOMATO MOTTLE MOSAIC VIRUS EN SEMILLA
COMERCIAL DE TOMATE Y PIMIENTO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTORA: Dña. María Mut Bertomeu

TUTORA: Dra. María Isabel Font San Ambrosio

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Dra. Ana Olvido Alfaro Fernández

Curso académico: 2020/2021

Valencia, Julio 2021

Resumen: El tobamovirus del mosaico moteado del tomate (Tomato mottle mosaic virus, ToMMV) fue descrito por primera vez en 2013 infectando cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en México. Posteriormente se detectó en América, Asia y Europa causando infecciones en los cultivos de tomate y pimiento (*Capsicum annuum* L.). También se detectó en 2019 en semillas de pimiento para siembra importadas por Australia y procedentes de los Países Bajos. Al igual que otros tobamovirus, ToMMV es un virus altamente contagioso que se transmite mecánicamente de una planta a otra a través de prácticas culturales comunes y por abejorros, y pueden permanecer viable en el suelo durante largos períodos en los residuos de cultivos. Hasta ahora, la transmisión de ToMMV por semilla no se ha demostrado claramente, pero las observaciones sugieren que las semillas podrían desempeñar un papel en la dispersión del virus por todo el mundo. Durante muchos años, el virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus, TMV) y el virus del mosaico del tomate (Tomato mosaic virus, ToMV) han sido los principales tobamovirus que infectaban los cultivos de tomate, pero se pudieron controlar con el empleo de cultivares resistentes y lotes de semillas libres de virus. Sin embargo, la reciente aparición de nuevos tobamovirus como el ToMMV y el virus del fruto marrón rugoso del tomate (Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) que pueden superar la resistencia de estos cultivares, podría representar una seria amenaza para la industria del tomate y pimiento. Un estudio reciente concluyó que ToMMV podría representar un alto riesgo para la producción de tomate y pimiento en los estados miembros de la UE, cultivos considerados muy importantes para la región EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Por lo tanto, ToMMV se ha incluido recientemente en la lista de alertas de la EPPO. Se necesitan más estudios sobre ToMMV para determinar mejor su distribución geográfica, rango de hospedadores, epidemiología e impacto económico, pero mientras tanto, parece deseable evitar su mayor propagación dentro de la región de la EPPO y para ello es necesario el control sanitario de las semillas.

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es analizar la presencia de ToMMV en lotes de semillas de tomate y pimiento importados por empresas españolas comercializadoras de semillas y procedentes de países de fuera de la UE entre 2019 y 2021. La detección de ToMMV en semillas se realizó mediante la técnica molecular RT-PCR empleando cebadores específicos para este virus y realizando previamente la extracción de RNA de cada una de las muestras.

Se analizaron un total de 215 muestras de semilla de tomate y pimiento (130 muestras de semillas de tomate y 85 de pimiento) de distintos orígenes (Chile, China, India, Israel, Estados Unidos, Tailandia y Turquía) y se amplificó un fragmento de 625 pares de bases (pb) correspondiente al tamaño esperado para ToMMV en 6 muestras de semillas de tomate (1 de origen Israel, 3 de origen China y 1 de origen USA). La secuenciación directa de estas secuencias confirmó que se trataba de ToMMV, ya que la secuencia de los aislados detectados presentaba una identidad nucleotídica (nt) superior al 99% con aislados de ToMMV recogidos en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

Palabras claves: Análisis, cubierta seminal, pimiento, tobamovirus, tomate, ToMMV, transmisión, RNA, RT-PCR.

Resum: El tobamovirus del mosaic motejat de la tomata (*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV) va ser descrit per primera vegada en 2013 infectant cultius de tomata (*Solanum lycopersicum* L.) en Mèxic. Posteriorment es detectà en Amèrica, Àsia i Europa provocant infeccions en els cultius de tomata i pimentó (*Capsicum annuum* L.). També va ser detectat en 2019 en llavors de pimentó importades per Austràlia i procedents dels Països Baixos. Com altres tobamovirus, ToMMV és un virus molt contagiós que es transmet mecànicament d'una planta a una altra per pràctiques culturals comuns i poden estar viables en el sòl llargs períodes en els residus dels cultius. Fins ara, la transmissió de ToMMV per llavor no ha sigut demostrada clarament, però les observacions indiquen que les llavors podrien tindre un paper important en la dispersió del virus a nivell mundial. Al llarg de molts anys, el virus del Mosaic del tabac (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i el virus del Mosaic de la tomata (*Tomato Mosaic virus*, ToMV) han sigut els principals tobamovirus que infectaven els cultius de tomata, però varen poder ser controlats amb el ús de cultivars resistent i lots de llavors lliures de virus. Per un altra banda, la aparició actual de nous tobamovirus com el ToMMV i el virus del fruit marró rugos de la tomata (*Tomato brown rugose fruit virus*, ToBRFV) que pot superar la resistència de aquests cultivars, podria representar una greu amenaça per la indústria de la tomata i pimentó. Un estudi va concloure que ToMMV podria representar un alt risc per la producció de tomata i pimentó en els estats membres de la UE, considerats aquests cultius molt importants per a la regió EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Per tant, ToMMV ha sigut inclòs en la llista de alertes de la EPPO. És necessari més estudis sobre ToMMV per determinar millor la distribució geogràfica, hospedants, epidemiologia e impacte econòmic, però mentre tant, pareix desitjable evitar una major propagació dins la regió de la EPPO, seguint necessari el control sanitari de les llavors.

L'objectiu d'aquest Treball Fi de Màster es analitzar la presència de ToMMV en diferents lots de llavors de tomata i pimentó importats per empreses espanyoles comercialitzadores de llavor i procedents de països de fora de la UE enviats per inspectors de Punts de Control de Fronteres en ports i aeroports d'Espanya entre 2019 i 2021. La detecció de ToMMV en llavors es du a terme amb la tècnica molecular RT-PCR empleant cebadors específics per aquest virus i realitzant previamente la extracció de RNA de cada mostra.

Varen ser analitzades un total de 215 mostres de llavors de tomata i pimentó (130 mostres de llavors de tomata i 85 de pimentó) de diferents orígens (Xile, Xina, Índia, Israel, Estats Units, Tailàndia i Turquia) i se va amplificar un fragment de 625 parells de bases (pb) corresponent al tamany esperat per a ToMMV en 5 mostres de llavors (1 d'origen Israel, 3 d'origen xinès i 1 mostra d'origen d'EE. UU). La secuenciació directa d'aquests fragments va confirmar que era el ToMMV, ja que la seqüència dels aïllats presentava una identitat nucleotídica (nt) superior al 99% amb altres aïllats de ToMMV de la base de dades del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

Paraules clau: Anàlisi, coberta seminal, pimentó, tobamovirus, tomata, ToMMV, transmissió, RNA, RT-PCR.

Abstract: *Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV was first described in 2013 infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) crops in Mexico. It was subsequently detected in America, Asia and Europe causing infections in tomato and pepper (*Capsicum annuum*) crops. This virus was also detected in 2019 in pepper seeds imported from Australia proceeded from Netherlands. Like other tobamovirus, ToMMV is a highly contagious virus that is mechanically transmitted from plant to plant through common cultural practices and by bumblebees, and can remain viable in soil for long periods in crop residues. So far, transmission of ToMMV by seed has not been clearly demonstrated, but observations suggest that seeds could play a role in the spread of the virus around the world. For many years, tobacco mosaic virus (TMV) and the tomato mosaic virus (ToMV) have been the principal tobamovirus that infected tomato crops but controlled with resistant varieties and virus-free seeds. However, the recent emergence of new tobamovirus such as ToMMV and ToBRFV (*Tomato brown rugose fruit virus*), which can overcome the resistance of these cultivars, could pose a serious threat to the tomato and pepper industry. A recent study concluded that ToMMV could pose a high risk for tomato and pepper production in EU which are considered very important crops for the EPPO region (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Therefore, ToMMV has been recently added to the EPPO alert list. Further studies on ToMMV are needed to better determine the geographic distribution, host range, epidemiology, and economic impact, but in the meantime, it seems desirable to prevent its further spread within the EPPO region through controlling the seeds.

The objective of this work was to analyze the presence of ToMMV in different batches of tomato and pepper seeds imported by Spain companies from third countries between 2019 and 2021. The detection of ToMMV in seeds was carried out by the molecular technique RT-PCR using specific primers of ToMMV prior extraction of RNA from each sample.

A total of 215 tomato and pepper seed samples (130 tomato and 85 pepper) from different origins (Chile, China, India, Israel, the United States, Thailand and Turkey) were amplified a fragment of 625 base pairs (bp) that it corresponded to the expected size for ToMMV in 5 tomato seed samples (1 of Israel origin, 3 of Chinese origin and 1 of US origin). Direct sequencing of these amplicons confirmed the infection with ToMMV, and the sequences show more than 99% nucleotide identity with ToMMV isolates retrieved from the Gen Bank database from the NCBI (National Center of Biotechnology Information).

Key words: Analysis, seed coat, pepper, tobamovirus, tomato, ToMMV, transmission, RNA, RT-PCR.

*Agradecer a Isabel la oportunidad que me ha ofrecido para realizar este trabajo,
su paciencia y su dedicación.*

También a Ana y Esmeralda, por hacerme más ameno el trabajo en el laboratorio.

*Gracias a las tres por el trato que me habéis dado en todo momento y la confianza
que habéis depositado en mí.*

*Agradecer también este trabajo a todas las personas que me he ido encontrando
a lo largo de este camino, aportando una parte de ellos en mí.*

*En especial a mis padres y a mi hermano por el apoyo incondicional que me han
ofrecido.*

Gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia económica del cultivo del tomate y pimiento.....	1
1.2 Características de los virus con transmisión por semilla	2
1.3 Virosis en tomate y pimiento transmitidas por semilla	4
1.4 Tobamovirus del mosaico moteado del tomate (ToMMV)	4
1.4.1 Origen y distribución geográfica	4
1.4.2 Encuadre taxonómico y morfología de la partícula viral.....	5
1.4.3 Sintomatología	6
1.4.4 Formas de transmisión.....	8
1.4.5 Gama de hospedadores.....	9
1.4.6 Pérdidas económicas producidas por el ToMMV.....	10
1.4.7 Medidas de control.....	10
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Material vegetal	13
3.2 Procesado de las semillas para su análisis.....	14
3.3 Análisis de semillas mediante la técnica molecular RT-PCR	15
3.4 Purificación del producto de RT-PCR y secuenciación	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Análisis de semillas mediante la técnica molecular RT-PCR	18
4.2 Purificación y secuenciación del producto obtenido en la RT-PCR	22
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25
7. ANEXOS	

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Producción mundial de tomate (A) y pimiento (B). Fuente: FAO, 2019.....	1
Gráfico 2. Evolución de la producción y superficie en España de tomate (A) y pimiento (B). Fuente: FAO, 2019.....	2
Gráfico 3. Origen de las muestras analizadas a ToMMV de cultivo de tomate y pimiento entre noviembre de 2019 y julio 2021.....	20
Gráfico 4. Origen de procedencia de las muestras analizadas positivas a ToMMV.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial del ToMMV. Fuente: EPPO Global Database, 2021.....	5
Figura 2. Síntomas de tomato mottle mosaic virus, ToMMV en planta de tomate (A) y en planta de pimiento (B) Fuente: Ambrós et al., 2017	6
Figura 3. Síntomas de tomato mottle mosaic virus, ToMMV en planta de tomate (A: Lesiones necróticas y clorosis en hojas; B: deformación de la hoja) Fuente: Xuelian et al., 2017.....	7
Figura 4. Síntomas de Tomato mottle mosaic virus, ToMMV en frutos de tomate (A: Lesiones necróticas en frutos; B: Necrosis del fruto). Fuente: Xuelian et al., 2017	7
Figura 5. Síntomas causados por tobamovirus en tomate II. Fuente: Seminis	8
Figura 6. Hoja de control enviada por el PIF y una muestra de semilla de tomate	14
Figura 7. Bolsa de extracción con forma de “U” (Bioreba).....	14
Figura 8. Obtención del extracto de semilla previo a la extracción de RNA.....	15
Figura 9. Termocicladores. A: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems); B: Labcycler (SensoQuest)	16
Figura 10. TransiluminadorEZEE gelONE (Cleaver Scientific).	17
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en TAE 1X donde se visualizan los resultados de la RT-PCR con cebadores específicos de ToMMV. Marcador de 100 pb (M), Control blanco (NT), Tomate sano (TS), Muestras de semilla que han dado positivo (A: muestra 622/19; B: muestra 87/20; C: muestra 520/20 y muestra 614/19; D: muestra 101/21 con tres submuestras; E: muestra 208/21 con tres submuestras); Positivos controles (PC).....	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Tomato mottle mosaic virus (ToMMV). Fuente: ICTV, 2020	6
Tabla 2. Cebadores específicos para la detección de ToMMV. Fuente: Xuelian et al., 2017	16
Tabla 3. Muestras de semilla con resultado positivo tras ser analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos de ToMMV	18
Tabla 4. Porcentaje de muestras positivas a ToMMV del total de muestras importadas en España entre noviembre 2019 y julio 2021	21
Tabla 5. Porcentaje de identidad nucleotídica obtenido tras el análisis BLAST de las secuencias amplificadas en este TFM	23

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los virus son entidades submicroscópicas capaces de causar enfermedades en plantas y otros organismos vivos, los cuales no tienen metabolismo propio, constituidos por una cubierta proteica y ácido nucleico en su interior. Al no tener metabolismo propio, se trata de parásitos obligados, por lo que únicamente pueden vivir en presencia de otro organismo (Sepúlveda, 2019).

El estudio de virus en plantas es importante desde tres puntos de vista: el primero es que los virus causan una gran cantidad de enfermedades en las plantas cultivadas y ornamentales afectando económicamente, siendo necesario ir desarrollando métodos adecuados de diagnóstico y prevención de epidemias; el segundo se trata del estudio de las relaciones virus-planta a nivel celular y molecular, siendo clave para conocer los sistemas de defensa de las plantas y comprender los mecanismos de patogénesis y el último punto a indicar es tener conocimiento de los mecanismos de replicación y expresión de genoma viral en plantas, el cual permite utilizar los virus como vectores para expresar en plantas proteínas de interés económico y controlar plagas mediante la expresión de proteínas y anticuerpos. (Moreno *et al.*, 2016).

1.1 Importancia económica del cultivo del tomate y pimiento

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) está ampliamente distribuido y es una de las hortalizas de mayor valor económico, con una producción mundial en el año 2019 de 180 millones de toneladas, siendo el 13,4% procedente de la Unión Europea (UE) (Gráfico 1-A). En España se cultivaron un total de 56.940 ha con una producción de 5 millones de toneladas (FAO, 2019) (Gráfico 1-B).

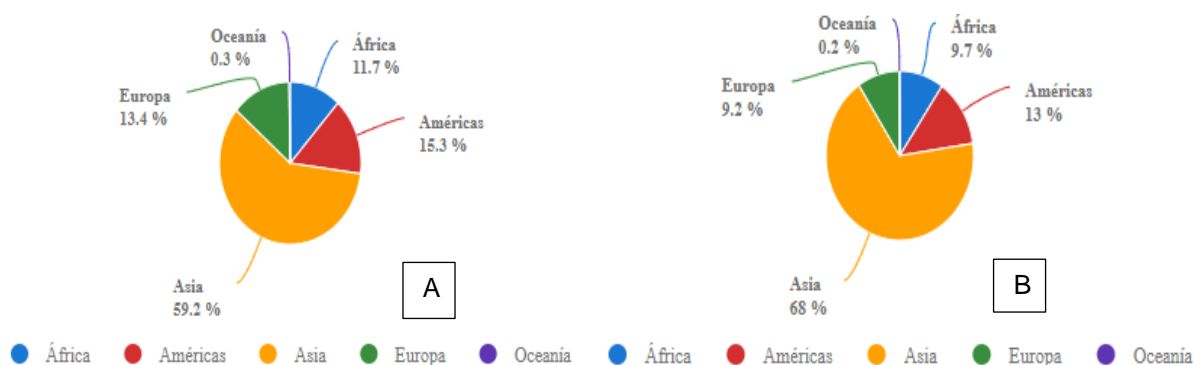


Gráfico 1. Producción mundial de tomate (A) y pimiento (B). Fuente: FAO, 2019

Respecto al pimiento (*Capsicum annuum* L.), es también un cultivo mundialmente extendido, con una producción anual en 2019 de 38 millones de toneladas, siendo el 9,2% procedente de la Unión Europea (Gráfico 2-A). España es el quinto país que produce una mayor cantidad de pimiento a nivel mundial, teniendo una superficie total cultivada de 21.430 ha y una producción de 1 millón y medio de toneladas, observando un incremento constante a lo largo de los años (FAO, 2019) (Gráfico 2-B).

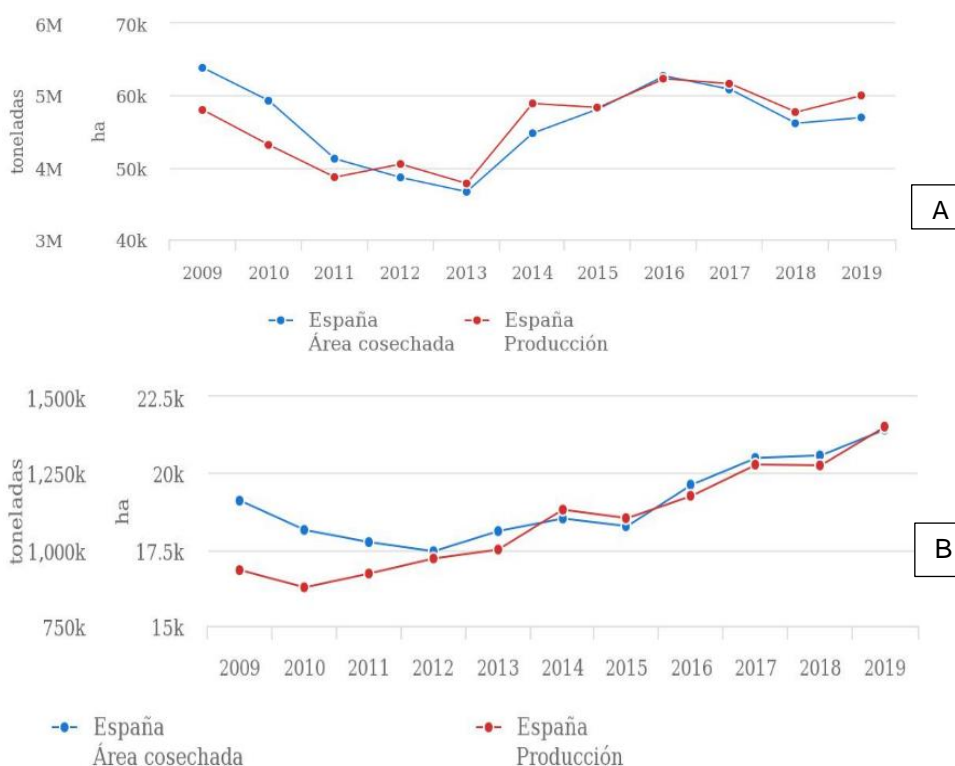


Gráfico 2. Evolución de la producción y superficie en España de tomate (A) y pimiento (B). Fuente: FAO, 2019

1.2 Características de los virus con transmisión por semilla

Los virus vegetales tienen diversas formas de transmisión como pueden ser: a través de semilla, por propagación vegetativa, polen, mecánicamente, plantas parásitas y/o por vectores.

La transmisión por semilla es importante en la epidemiología de algunas enfermedades, ya que las semillas les permiten perpetuarse, trasladarse a largas distancias y ser fuente de inóculo primario de una enfermedad, pudiendo llegar a producir grandes pérdidas económicas para el agricultor (Sepúlveda, 2019).

Esta forma de transmisión es una de las más importantes y comunes de infección de las cosechas (Borodynko-Filas *et al.*, 2017).

La transmisión por semilla es una propiedad intrínseca demostrada en aproximadamente 21 familias de virus vegetales. Más del 18% de virus vegetales son transmitidos por esta vía en uno o más hospedantes y se estima que un tercio de los citados virus son transmitidos en, al menos, un hospedante (Johansen *et al.*, 1994; Sastry, 2013).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que algunos de estos virus tienen la propiedad de mantener su capacidad infectiva en semilla durante periodos largos de tiempo, permitiendo así su persistencia en el campo con el paso de los años. Por lo tanto, un pequeño porcentaje de semillas infectadas puede llegar a generar una epidemia en zonas que estén libres del virus, agravándose esta situación en caso de no presentarse síntomas concretos, aunque la semilla sea portadora de la partícula viral (Johansen *et al.*, 1994; Hull, 2004).

En los virus vegetales que se transmiten por semilla, existen dos formas de transmisión diferenciadas que dependen de la ubicación del virus en la semilla, ya que las partículas virales infectivas pueden localizarse en el embrión, endospermo, tegumento y parte interna de la cubierta seminal o testa (localización interna) y/o en la superficie de la semilla o testa (localización externa).

Respecto a los mecanismos de transmisión de virus localizados en el embrión, la infección se puede producir tanto por la infección de los tejidos reproductivos antes de la embriogénesis (infección gamética) o por la invasión del embrión en alguna etapa de la embriogénesis (infección directa del embrión). La transmisión de virus por semilla de manera gametofítica puede ser por vía femenina o vía masculina con el polen. La vía de transmisión por polen consiste en la transmisión de la partícula viral desde el hospedante masculino infectado hasta el óvulo de la planta femenina (Mink, 1993). La transmisión por polen y transmisión por semilla de virus vegetales están estrechamente relacionadas (Mink, 1993; Hull 2004).

Por otra parte, los mecanismos de transmisión de virus localizados fuera del embrión tienen lugar de forma más esporádica en virus muy estables, donde el contagio se produce mediante transmisión mecánica durante la germinación de esta, aprovechando las pequeñas heridas producidas (Sastry, 2013). Es un mecanismo peculiar de transmisión ya que los virus deben permanecer durante el almacenamiento y las condiciones de humedad deben ser bajas (Johansen *et al.*, 1994).

1.3 Virosis en tomate y pimiento transmitidas por semilla

Las enfermedades causadas por virus son las principales limitaciones en la producción de tomate y pimiento entre otras enfermedades causadas por patógenos conocidos (Hanssen *et al.*, 2010).

El género *Tobamovirus* es el más grande de la familia *Virgaviridae* y consta de 37 especies y 6 especies tentativas, con el virus del mosaico del tomate (Tomato mosaic virus, ToMV) como especie tipo (Adams *et al.*, 2009; King *et al.*, 2012). Las especies virales incluidas en este género se consideran las de mayor importancia, existiendo una clasificación para estos en diferentes subgrupos conforme a su estructura genómica, el rango de hospedadores y la composición de aminoácidos de las cubiertas entre otras.

1.4 Tobamovirus del mosaico moteado del tomate (ToMMV)

1.4.1 Origen y distribución geográfica

El Tobamovirus del mosaico moteado del tomate (Tomato mottle mosaic virus, ToMMV) es una de las especies más recientes caracterizadas y que ha mostrado una rápida propagación a nivel mundial. ToMMV se describió por primera vez en 2013 infectando tomate en México (Li *et al.*, 2013) y posteriormente en diferentes partes del mundo como Israel (2014), España y USA (2015), China (2018), Brasil (2019) y República Checa (2020), pero su distribución podría ser más amplia que la que se muestra en el mapa (Webster *et al.*, 2014; Filmer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Turina *et al.*, 2016; Ambrós *et al.*, 2017; Luria *et al.*, 2017; Che *et al.*, 2018; Nagai *et al.*, 2019; EPPO, 2020) (Fig. 1).

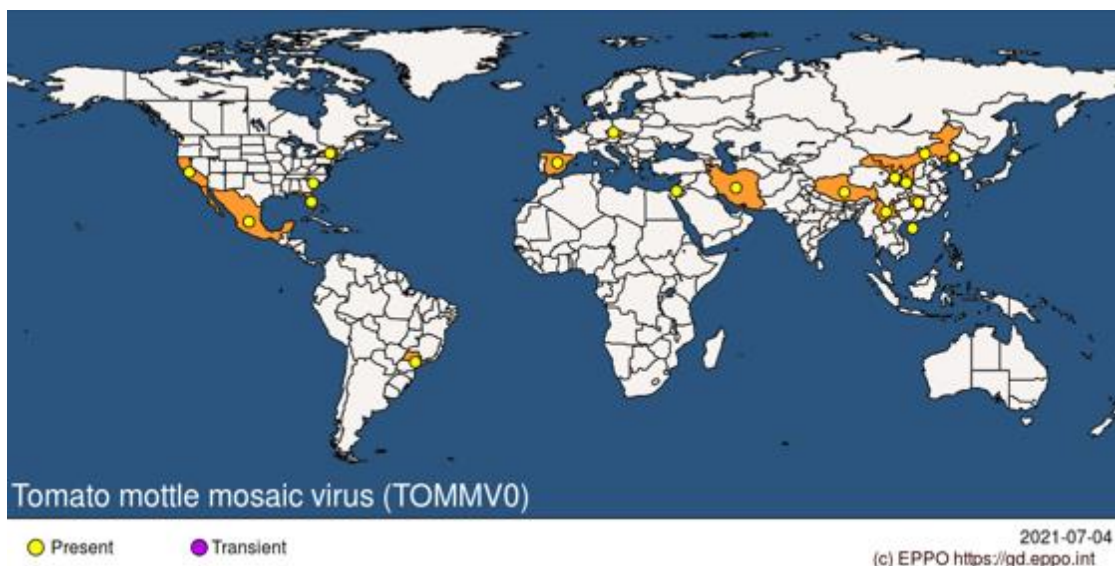


Figura 1. Distribución mundial del ToMMV. Fuente: EPPO Global Database, 2021

Como el ToMMV es un virus emergente que presenta similitudes con otro tobamovirus emergente como es el virus del fruto marrón rugoso del tomate (Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV – Lista EPPO A2), y dado que el pimiento y el tomate son cultivos importantes en la región de la EPPO, el Panel de Medidas Fitosanitarias de la EPPO recomendó que se agregase a la lista de alertas de la EPPO (EPPO, 2020). El objetivo principal de la Lista de alerta de la EPPO es llamar la atención de los países miembros de la UE sobre ciertas plagas que posiblemente presenten un riesgo para estos y lograr una alerta temprana. La EPPO también puede utilizarlo para seleccionar candidatos que pueden someterse a un análisis de riesgo de plagas (PRA, Pest Risk Analysis). En sí misma, la Lista de alerta de la EPPO no es una lista de cuarentena ni constituye una recomendación para las regulaciones fitosanitarias.

1.4.2 Encuadre taxonómico y morfología de la partícula viral

El virus del mosaico moteado del tomate, (Tomato mottle mosaic virus, ToMMV), pertenece a la familia *Virgaviridae*, género *Tobamovirus* (Tabla 1; ICTV, 2020). La partícula viral es alargada en forma de varilla de aproximadamente 200nm de longitud y 18nm de diámetro. El genoma completo del virus está constituido por una molécula de RNA monocatenario de sentido positivo, y tiene un contenido total del 5% de RNA y el resto de proteína (Zhan *et al.*, 2018). Su genoma está compuesto por 6399 nt organizado en cuatro pautas de lectura abierta (ORF, Open reading frames) o genes. Los genes ORF I y ORF II, separados por un codón de parada que codifican el complejo proteico replicasa de 126 y 183, respectivamente; ORF III

codifica la proteína de movimiento (MP) de 30 kDa y ORF IV codifica la proteína de cubierta (CP) de 17,5 kDa (Dombrovsky *et al.*, 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV). Fuente: ICTV, 2020

Dominio	<i>Riboviria</i>
Reino	<i>Orthornavirae</i>
Filo	<i>Kitrinoviricota</i>
Clase	<i>Alsuviricetes</i>
Orden	<i>Martellivirales</i>
Familia	<i>Virgaviridae</i>
Género	<i>Tobamovirus</i>
Especie	<i>Tomato mottle mosaic virus</i>

1.4.3 Sintomatología

Las plantas de tomate infectadas por ToMMV muestran distorsión de las hojas, mosaico, moteado y necrosis. De forma general, en la siguiente figura se observan los síntomas típicos en planta de tomate (Fig. 2-A), estando en la izquierda la planta no infectada y en la derecha la infectada. Las plantas de pimiento infectadas presentan síntomas de atrofia, moteado sistémico y necrosis y en planta de pimiento (Fig. 2-B), estando en la izquierda la planta no infectada y en la derecha la infectada, que muestra necrosis y amarilleo severo de los brotes apicales (Ambrós *et al.*, 2017).



Figura 2. Síntomas de *tomato mottle mosaic virus*, ToMMV en planta de tomate (A) y en planta de pimiento (B) Fuente: Ambrós *et al.*, 2017

Respecto a la sintomatología en hojas, se observa que el ToMMV provoca clorosis y deformaciones en hojas, así como lesiones necróticas y retraso en el crecimiento (Fig. 3) (Xuelian *et al.*, 2017).

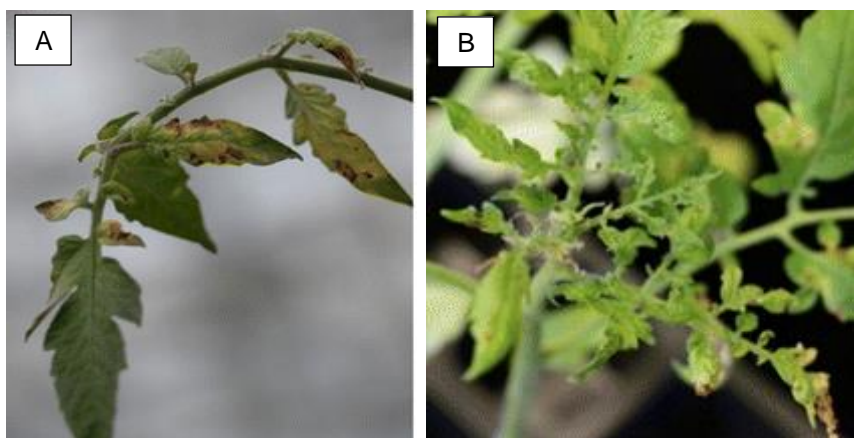


Figura 3. Síntomas de *tomato mottle mosaic virus*, ToMMV en planta de tomate (A: Lesiones necróticas y clorosis en hojas; B: deformación de la hoja) Fuente: Xuelian *et al.*, 2017

Los frutos de tomate infectados muestran un mosaico en diferentes tonos rojizos, anaranjados o amarillentos, siendo también común la aparición de deformaciones acompañadas de una maduración irregular y reducción del tamaño y número de frutos (Fig. 4) (Xuelian *et al.*, 2017).

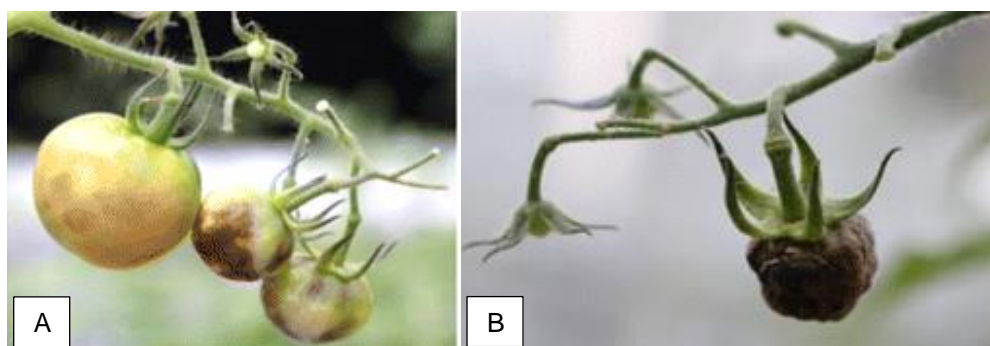


Figura 4. Síntomas de *Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV en frutos de tomate (A: Lesiones necróticas en frutos; B: Necrosis del fruto). Fuente: Xuelian *et al.*, 2017

La sintomatología asociada a la infección por ToMMV descrita anteriormente (Fig. 3 y 4), es muy similar a la descrita para infección por tobamovirus (Fig. 5). Esto pone de manifiesto que la introducción de un nuevo tobamovirus como ToMMV puede confundirse en campo con otros virus de este género ya presentes en la zona.

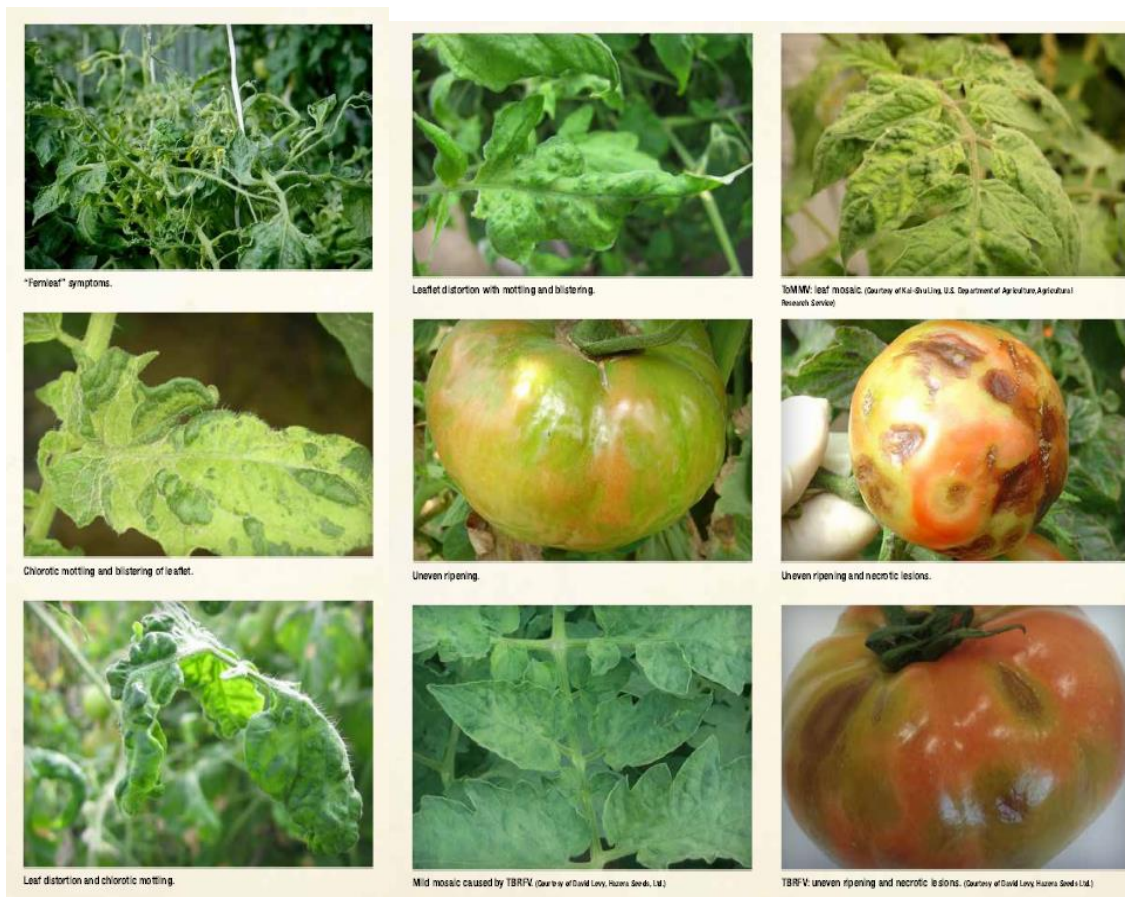


Figura 5. Síntomas causados por tobamovirus en tomate II. Fuente: Seminis

1.4.4 Formas de transmisión

Los tobamovirus, teniendo en cuenta que son altamente estable, tienen diversas formas de transmisión que son explicadas a continuación (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013):

- **Mecánica:** también se transmite con una gran facilidad, por el simple contacto que se produce entre plantas o a través del agricultor al realizar las labores de cultivo.
- **Vectores de forma mecánica:** puede existir algún caso, donde la forma de transmisión es puramente mecánica, como puede ser los escarabajos comedores de hojas o abejorros, que durante su alimentación rozan con su mandíbula el tejido vegetal, produciendo así la inoculación del virus.
- **Suelo:** en restos vegetales de plantas infectadas ya secos, debido a su exposición a condiciones de altas temperaturas los tobamovirus puede sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo. Los restos vegetales hay que tenerlos muy en cuenta en la gestión de este tipo de enfermedades

debido a que si el material está infectado puede ocasionar la infección del siguiente cultivo al rozar con las plántulas trasplantadas.

- Semilla: el porcentaje de transmisión de tobamovirus por semilla puede llegar a ser alto, debido en gran parte a los restos mucilaginosos que pueden quedar en las vellosidades de la semilla, con altos porcentajes de transmisión de forma mecánica cuando emerge el embrión.

En el caso concreto del ToMMV, se necesitan más estudios sobre la transmisión de ToMMV, pero las observaciones sugieren que, como otros tobamovirus, es un virus altamente contagioso que se transmite mecánicamente de una planta a otra a través de prácticas culturales comunes. Al igual que el virus del fruto marrón rugoso del tomate, los abejorros también pueden transmitir el ToMMV. La mayoría de los tobamovirus contaminan la cubierta de la semilla (pero no necesariamente el embrión) de sus plantas hospedantes. Hasta ahora, la transmisión de ToMMV por semillas no se ha demostrado claramente, pero las observaciones sugieren que las semillas podrían desempeñar un papel en la rápida propagación del virus a nivel mundial. ToMMV fue detectado en 2019 por la ONPF (Organización Nacional de Protección Fitosanitaria) australiana en un lote de semillas importadas de *C. annuum* y actualmente se están tomando medidas de emergencia para prevenir cualquier entrada adicional del virus en Australia (EPPO, 2021).

1.4.5 Gama de hospedadores

Solo se han informado infecciones naturales de ToMMV en cultivos de tomate y pimiento al aire libre y bajo invernadero (Xuleian *et al.*, 2017). Sin embargo, experimentos de laboratorio han demostrado que la gama de hospedantes de ToMMV podría ser más amplia, ya que el virus puede transmitirse mecánicamente a otras solanáceas (*Nicotiana* spp., *Petunia hybrida*, *Physalis* spp.) y *Brassicaceae* (*Brassica* spp., *Raphanus sativus*). La presencia de ToMMV también ha sido detectada por metagenómica en garbanzo [*Cicer arietinum* (*Fabaceae*)] en Italia, pero esto no ha sido confirmado por estudios adicionales. Aunque falta ser confirmado, estudios realizados en China muestran posibles infecciones mixtas de ToMMV con el virus del mosaico verde suave del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) en berenjena causando síntomas y pérdidas de rendimiento (EPPO, 2020).

1.4.6 Pérdidas económicas producidas por el ToMMV

Desde la detección del primer caso de infección en tomate por ToMMV en España, que supuso la primera detección en Europa, se ha convertido en una preocupación importante para el sector productor de tomate y pimiento, como lo era antes ToMV. Su rápida difusión mostrada en muchas partes del mundo pone de relieve el temor de su introducción en nuevas áreas agronómicas causando epidemias en ambos cultivos (Martínez *et al*, 2017). Además, la preocupación aumenta ya que ToMMV podría superar la resistencia a ToMV, como ya se ha demostrado que sucede en algunos cultivares de tomate (Zhan *et al.*, 2018).

Las pérdidas agronómicas provocadas por virus vegetales dependen de una serie de factores como pueden ser el aislado viral, la edad de la planta en el momento de la infección por agente viral, así como también de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo.

1.4.7 Medidas de control

ToMMV, al igual que otros tobamovirus, es un virus cuyas partículas son muy estables y pueden persistir durante largos periodos sin infectar a un hospedante vivo.

La primera medida de control debe realizarse a nivel de semilla, la cual debe estar libre de virus. Hay diversos tratamientos tanto con productos químicos, termoterapia o la realización de lavados con disoluciones específicas (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013) que podrían emplearse para la inactivación del ToMMV en semilla, pero faltan estudios al respecto.

Los tratamientos químicos, pueden ser efectivos para inactivar virus alojados en la parte externa de la testa, ya que se considera un tratamiento superficial. Si se hiciera uso de estos tratamientos químicos cuando el virus está localizado en el embrión no tendrían ningún efecto en la inactivación del virus (Herrera-Vázquez *et al.*, 2009).

Respecto a los tratamientos térmicos, se pueden realizar con calor seco, manteniendo la semilla en estufa durante un tiempo y una temperatura concreta. Este método es muy recomendado en la inactivación del ToMV de semillas de tomate (24 horas a 80°C con calor seco) (MAGRAMA, 1990).

Por tanto, utilizar material vegetal libre de patógenos es importante para prevenir cualquier enfermedad transmitida por semilla. Para prevenir problemas causados por ToMMV, se debería de emplear semillas con certificaciones que verifiquen que está

libre de ToMMV. Esta medida evitaría la introducción del patógeno en áreas donde no está presente o una infección temprana de los cultivos.

Además de partir de semillas libres de ToMMV, esta medida se debería implementar con la higiene del material que esté en contacto con el cultivo a lo largo de su ciclo (Van Dorst, 1988). La desinfección de las herramientas utilizadas en las diferentes labores mediante fosfato trisódico al 10% durante 30 min reduce las posibilidades de transmisión mecánica planta a planta, pero no de hoja a hoja por contacto entre plantas. También es de suma importancia la desinfección de los operarios siempre que vayan de una instalación a otra, siendo eficaz el empleo de guantes desechables (Blancard & Pitrat, 2000).

Hay que tener muy en cuenta que ToMMV tiene una gran facilidad para la transmisión mecánica, por lo que las distintas labores culturales a realizar favorecen en gran parte la extensión de la enfermedad con rapidez y eficacia, por lo que está aconsejado la desinfección de manos y utensilios y el tratamiento con disoluciones de fosfato trisódico o simplemente el lavado con jabón y agua.

En el caso de detectar plantas afectadas, una medida útil es eliminar aquellas afectadas y las vecinas que puedan haber mantenido un estrecho contacto. Las plantas para retirar se deberían introducir en bolsas cerradas para evitar posibles contaminaciones futuras. También hay que tener en cuenta que en los restos de cultivo el virus se puede mantener infectivo, por lo que se deben compostar o ser sometidos a biofumigación durante aproximadamente dos meses para eliminar el virus, haciendo así un aporte extra de materia orgánica al suelo.

Por tanto, realizar un exhausto control tanto de la semilla como de las plántulas en los semilleros, realizando limpiezas y desinfecciones de los utensilios y personal es primordial. Se deben, asegurar así las debidas garantías fitosanitarias y la sanidad de las plántulas, empleando siempre material de plantación con sus certificados pertinentes (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En 2013 se detectó por primera vez en México el tobamovirus del mosaico moteado del tomate (ToMMV), y posteriormente en América, Asia y Europa (EPPO, 2021) causando infecciones y pérdidas económicas importantes en los cultivos de tomate y pimiento. Recientemente se ha detectado en semillas de pimiento para siembra importadas en Australia y procedentes de los Países Bajos. ToMMV es un virus muy estable y aunque su transmisión por semilla no se ha demostrado claramente, las observaciones sugieren que las semillas podrían desempeñar un papel en la dispersión del virus a otras zonas.

Aunque el porcentaje de semilla comercial contaminada y su tasa de transmisión pueda ser bajo, unas pocas plántulas infectadas actuarían como fuente de inóculo primario, pudiendo ocasionar la rápida propagación del virus durante el cultivo, ya que se transmite fácilmente por contacto entre plantas y de forma mecánica durante las labores propias del cultivo.

El sector está preocupado con la posible introducción de este virus por semilla procedente de otros países, surgiendo así la necesidad de evaluar la sanidad de las semillas comerciales de tomate y pimiento que llegan a España.

Por tanto, en este Trabajo Fin de Máster se planteó como objetivo determinar la presencia de ToMMV en distintos lotes de semillas de tomate y pimiento procedentes de países de fuera de la UE entre noviembre de 2019 y julio 2021. Para llevar a cabo este estudio, aprovecharon los lotes de semillas que habían sido muestreados en estas fechas por los inspectores de los Puntos de Control Fronterizos españoles y enviados al Laboratorio Nacional de Referencia para la identificación y diagnóstico de virus y fitoplasmas en especies vegetales no leñosas y productos vegetales (Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València, IAM-UPV) para su análisis a ToBRFV siguiendo las indicaciones del MAPA y en cumplimiento del Reglamento Ejecución (UE) 2020/1191 de la Comisión Europea (DOUE-L-2020-81270).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

El material vegetal de partida empleado en el presente trabajo para analizar a ToMMV comprende 130 muestras de semillas de tomate y 85 de pimiento procedentes de Chile, China, India, Israel, Estados Unidos Tailandia y Turquía (Anexo 7.1), así como una muestra positiva a ToMMV, cedida por el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), que se ha utilizado como control positivo en los análisis (Anexo 7.1). Las muestras de semillas fueron muestreadas entre noviembre de 2019 y julio de 2021 por los Inspectores de Fronteras (Personal Inspector de Frontera, PIF) de los Puntos de Control Fronterizos (PCF) españoles de Valencia, Alicante, Madrid y Barcelona y enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia para la identificación y diagnóstico de virus y fitoplasmas en especies vegetales no leñosas y productos vegetales (Laboratorio de Virología, IAM-UPV) para su análisis a ToBRFV en cumplimiento con los Reglamentos de Ejecución de la UE 2019/1615 (Anexo 7.4.1) y 2020/1191 (Anexo 7.4.2) para el análisis de la presencia del ToBRFV.

Los datos de variedad de la semilla, país de origen, fecha de importación, código de la empresa importadora, número de semillas analizadas, así como los resultados previos obtenidos en el LNR para su análisis a ToBRFV se encuentran detallados en el Anexo 7.1.

El número de semillas que conforman las muestras enviadas por los PIFs para su análisis depende del tamaño del lote de semilla importado. Por ello los tomaron las muestras siguiendo la metodología para muestreo de envíos de 2008 NIMF n.º 31 (Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias) (NIMF, 2008).

3.2 Procesado de las semillas para su análisis

Después de recibir la muestra en el laboratorio para su análisis (Fig. 6), cada muestra de semillas a analizar se subdividió en submuestras de 250 semillas como máximo cada una. Seguidamente, cada submuestra se introdujo en bolsas de extracción con forma de “U” (Bioreba) (Fig. 7) para su mejor triturado y homogenización en 10 mL y 20 mL de tampón de extracción de Loewe por cada 250 semillas de tomate y pimiento, respectivamente (Anexo 7.2.1).



Figura 6. Hoja de control enviada por el PIF y una muestra de semilla de tomate



Figura 7. Bolsa de extracción con forma de “U” (Bioreba)

Una vez obtenido el homogenizado, se transfirieron 75 μ L de cada submuestra de 250 semillas a un tubo Eppendorf de 1,5 mL agrupando un máximo de 4 submuestras (extracto agrupado de 1.000 semillas). Esos 300 μ L se emplearon para la extracción de RNA que se describe a continuación (Fig. 8).

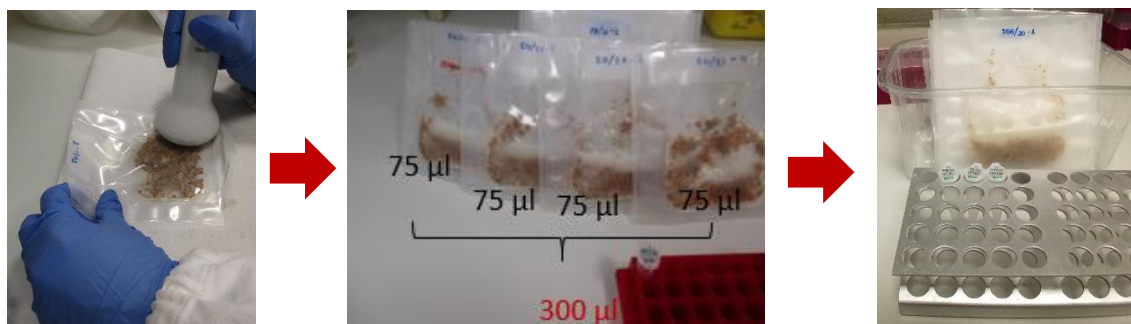


Figura 8. Obtención del extracto de semilla previo a la extracción de RNA

3.3 Análisis de semillas mediante la técnica molecular RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en producir múltiples copias de un segmento determinado de Ácido desoxirribonucleico (DNA), amplificando parte del genoma viral y permitiendo así su detección. En la mayoría de los virus, su genoma está constituido por RNA, por tanto, para realizar la PCR es necesario incluir un paso preliminar donde una transcriptasa reversa realiza la transcripción de RNA a la cadena complementaria de DNA (cDNA) que servirá de molde para la PCR (Rio, 2014). Este proceso recibe el nombre de RT-PCR y es el que se va a seguir en este trabajo ya que el genoma de ToMMV es de RNA.

El paso previo al análisis RT-PCR fue la extracción de RNA mediante el kit comercial NucleoSpin Plant RNA (Macherey-Nagel) (Anexo 7.2.1). Los extractos de RNA obtenidos se analizaron mediante RT-PCR utilizando el enzima SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq® DNA polymerase kit (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España) con la pareja de cebadores específicos de ToMMV (ToMMV-F/ToMMV-R) (Turina *et al.*, 2016) (Tabla 2), que amplifican un fragmento aproximado de 621 pb de dos ORF diferentes: proteína de movimiento o MP en la ORF I; y proteína de la cápside o CP en la ORF II.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores *2720 Thermal Cycler* (Applied BioSystems) y *Labcycler* (SensoQuest, Göttingen, Alemania) (Fig. 9). El programa empleado para la amplificación consistió en una incubación a 50°C durante unos 30 min. para la transcripción inversa del RNA del ToMMV a DNA

complementario (cDNA); después se elevó la temperatura a 94°C durante 2 min. para la desnaturalización del cDNA; a continuación, se llevaron a cabo un total de 40 ciclos que consistieron cada uno de ellos en la desnaturalización a 94°C durante 1 min., seguido del anillamiento, a 55°C durante un tiempo de 45 seg. y por último se produjo la extensión con una duración de 1 min. a 68°C. Posteriormente, para finalizar y poder completarse la amplificación de los fragmentos del PCR que hubieran quedado incompletos las elongaciones previas, se realizó otro paso de elongación en un único ciclo de 10 min. a 68°C. Tras finalizar todos estos pasos, el termociclador mantuvo las muestras obtenidas a 10°C para que estas estén conservadas en buenas condiciones (Anexo 7.2.2) hasta la visualización de los resultados de la RT-PCR.

Tabla 2. Cebadores específicos para la detección de ToMMV. Fuente: Xuelian et al., 2017

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	LOCALIZACIÓN	TAMAÑO DEL PRODUCTO (nt)
ToMMV-F	AAAAGGGCGGTCTAATTC	5614	621
ToMMV-R	TAATTCGTCCTTTATTAC	6199	



Figura 9. Termocicladores. A: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems); B: Labcycler (SensoQuest)

Una vez finalizada la RT-PCR, los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa 1,2% TAE 1X (40 mM Tris pH 7,5, 20 mM acetato sódico, 2 mM EDTA) empleando un marcador DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific) y se tiñeron con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA). Para la visualización con luz UV se empleó en el transiluminador EZEE gelONE, Cleaver Scientific (Fig. 10) (Anexo 7.2.3).



Figura 10. TransiluminadorEZEE gelONE (Cleaver Scientific).

3.4 Purificación del producto de RT-PCR y secuenciación

Con el fin de comprobar que los fragmentos amplificados en la RT-PCR correspondían a ToMMV, estos se sometieron a un proceso de purificación con el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) (Anexo 7.2.4) y se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP) para su secuenciación directa.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) en la página web del NCBI (National Center of Biotechnology Information) obteniendo el porcentaje de identidad nucleotídica de las mismas al compararlas con secuencias contenidas en la base de datos de esta entidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de semillas mediante la técnica molecular RT-PCR

De las 215 muestras de semillas de tomate y pimiento muestreadas entre 2019 y 2021 y analizadas en el desarrollo de este TFM a ToMMV, se ha detectado ToMMV en un total de 6 muestras de semillas de tomate de distintas procedencias: Israel (2019), China (2019, 2020 y 2021) y EE. UU. (2021). Aunque los análisis a ToBRFV mediante RT-qPCR no se han llevado a cabo durante este TFM (ya que fueron realizados previamente por personal del Laboratorio de Virología, IAM-UPV), se incluyen también para complementar la información disponible de estas muestras (Tabla 3). Todos los resultados obtenidos en las muestras a analizar se muestran detallados en el Anexo 7.3.

Tabla 3. Muestras de semilla con resultado positivo tras ser analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos de ToMMV

CÓDIGO LNR	FECHA ENTRADA LABORATORIO	ORIGEN SEMILLA	CÓDIGO EMPRESA IMPORTADORA	N.º SEMILLAS ANALIZADAS	ESPECIE	RT-qPCR ToBRFV	RT-PCR ToMMV
614/19	10/12/2019	ISRAEL	D	250	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO
622/19	11/12/2019	CHINA	F	250	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO
87/20	17/02/2020	CHINA	K	1000	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO
520/20	09/11/2020	USA	P	500	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO
101/21	09/03/2021	CHINA	P	3712	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO
208/21	15/04/2021	CHINA	K	8060	TOMATE	NEGATIVO	POSITIVO

En la Figura 11 se muestran las imágenes de los geles de agarosa al 1,2% en TAE 1x con los resultados obtenidos tras su tinción y visualización en el transiluminador. En ellos pueden observarse, las bandas con el fragmento esperado de 621 pb en algunas de las muestras que han resultado positivas tras su análisis, así como en los controles positivos incluidos en la reacción.

Se observaron diferencias al comparar la intensidad de bandas obtenidas entre las diferentes muestras, como por ejemplo la muestra 87/20 (Fig. 11A) menos intensa que la 101/21 (1) (Fig.11C), o incluso entre las 3 submuestras de la muestra 208/21 (Fig. 11E). Esta mayor intensidad, puede deberse a una mayor concentración del virus en unas muestras que en otras, es decir, a mayor número de semillas infectadas. Aunque la RT-PCR convencional empleada, no es una técnica cuantitativa, si existe relación entre la intensidad de la amplificación visualizada en

agarosa con el número de copias amplificadas en la reacción del RNA empleado como molde.

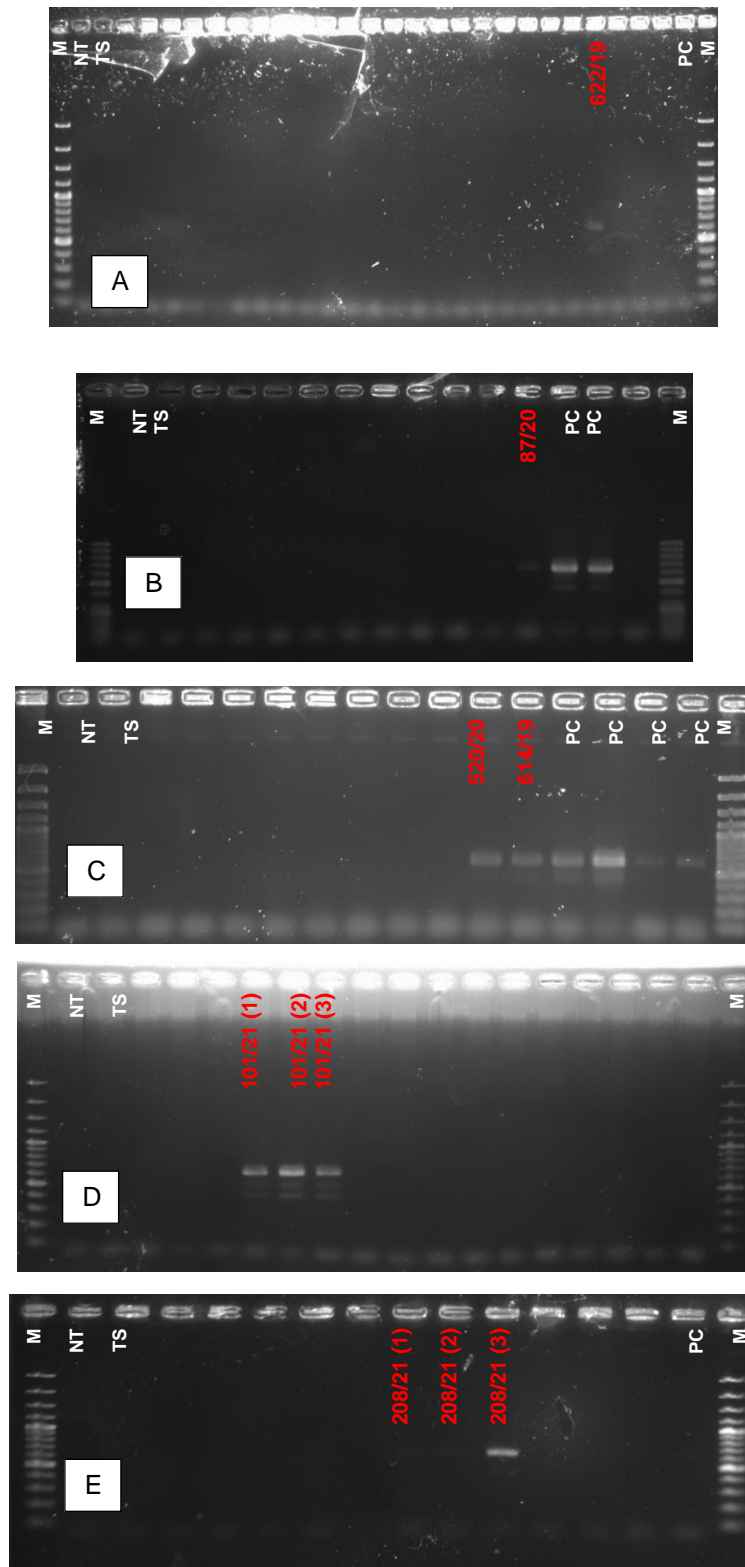


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en TAE 1X donde se visualizan los resultados de la RT-PCR con cebadores específicos de ToMMV. Marcador de 100 pb (M), Control blanco (NT), Tomate sano (TS), Muestras de semilla que han dado positivo (A: muestra 622/19; B: muestra 87/20; C: muestra 520/20 y muestra 614/19; D: muestra 101/21 con tres submuestras; E: muestra 208/21 con tres submuestras); Positivos controles (PC).

En estas muestras positivas, consistentes en la agrupación de semillas, se detectó ToMMV lo que implica que en ellas hay al menos una semilla contaminada, siendo estas submuestras como máximo de 1000 semillas. El protocolo de agrupación de semillas para el análisis es el descrito en el protocolo estándar de detección e identificación de ToBRFV donde también se incluyen protocolos de análisis de semillas mediante RT-PCR convencional (EPPO, 2020), misma técnica que la empleada en este TFM para la detección de ToMMV. En algunos casos cuando el número de semillas era inferior a 1000, sólo consistió en una submuestra (como es el caso de 614/19, 622/19, 87/20 y 522/20); sin embargo, en las muestras 101/21 y 208/21 el número de semillas fue mayor a 1000, analizándose 4 y 8, respectivamente. En este último caso, solo 3 de las agrupaciones de la muestra 101/21 y 208/21 fueron positivas a ToMMV, pero este resultado es suficiente para que se rechace el lote entero de semillas, en caso de que el reglamento lo exija.

Teniendo en cuenta el origen y cultivo de todas las muestras analizadas, se observa que entre noviembre 2019 y julio 2021 hubo una mayor importación en España de semillas de tomate que de pimiento, siendo predominante el origen de procedencia Israel, seguido de China (Gráf. 3).

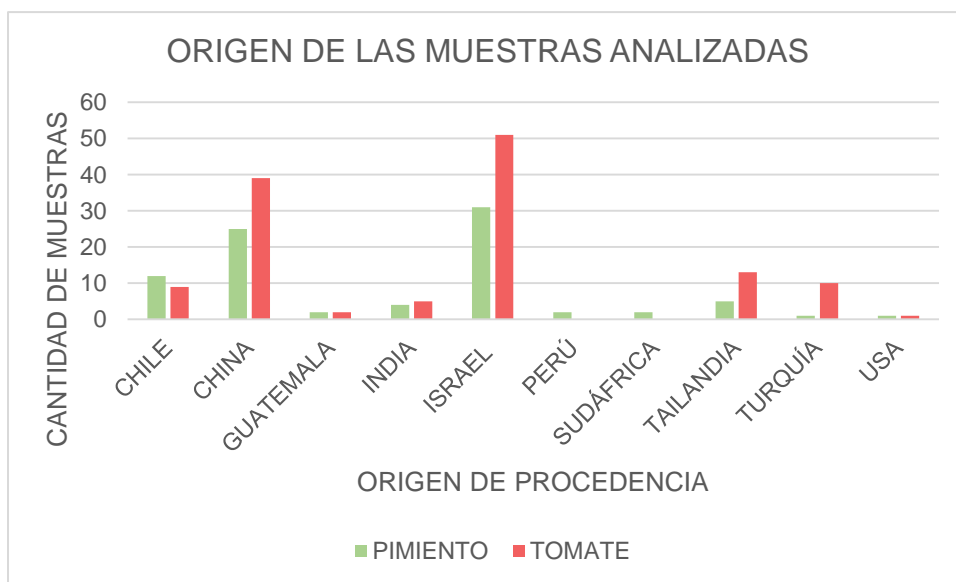


Gráfico 3. Origen de las muestras analizadas a ToMMV de cultivo de tomate y pimiento entre noviembre de 2019 y julio 2021.

Respecto a las muestras de semillas que resultaron positivas a ToMMV se observó que todas eran de tomate, principalmente con origen China y, en un porcentaje menor, de USA e Israel (Gráf. 4).

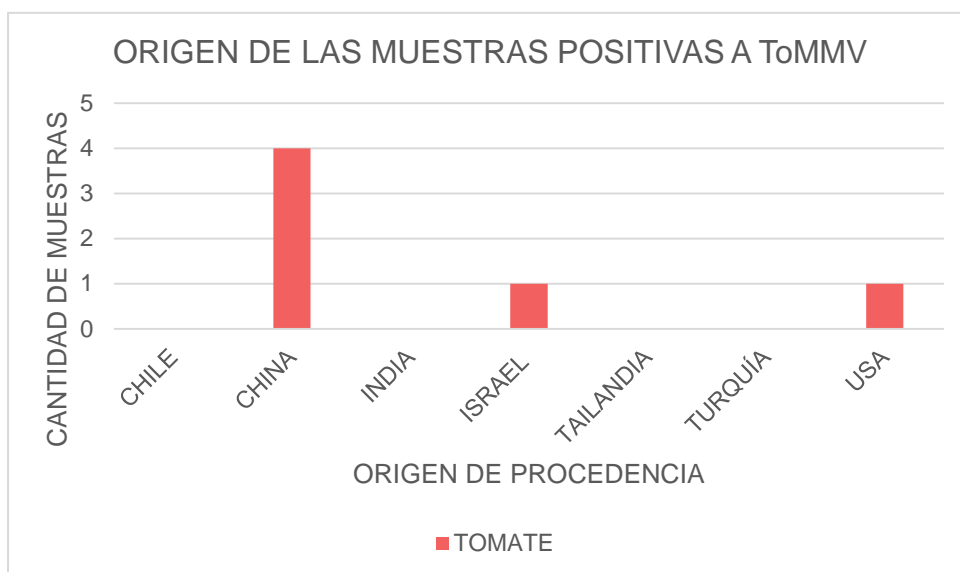


Gráfico 4. Origen de procedencia de las muestras analizadas positivas a ToMMV

En resumen, de las 130 muestras de semillas de tomate analizadas, se ha detectado ToMMV en 6, lo que supone la presencia de ToMMV en el 4,6 % de los lotes de semilla de tomate importados en España. De las 85 muestras de semillas de pimiento analizadas, no se ha detectado en ninguna de ella ToMMV (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de muestras positivas a ToMMV del total de muestras importadas en España entre noviembre 2019 y julio 2021

TOTAL DE MUESTRAS	RESULTADOS POSITIVOS	PORCENTAJE DE POSITIVOS
130	6	4,6%
85	0	0%

La importación de material de plantación infectado con ToMMV, en este caso semillas de tomate, supone un grave riesgo para los cultivos españoles. Por un lado, supone la introducción de un nuevo tobamovirus en algunas zonas productoras de tomate del país. Por otro, implica además la dispersión de este dentro del territorio español ya que las empresas comercializadoras de semillas e incluso los viveros que comercializan las plántulas de tomate, muchas veces, no se restringen a un área

concreta, sino que los reparten en diferentes zonas productoras. Al tratarse de un tobamovirus, cuya dispersión mecánica es fácil (Dombrowsky *et al.*, 2017), puede suponer un riesgo elevado para los cultivos de tomate. La entrada y establecimiento de una enfermedad causada por un nuevo tobamovirus, supondría en un primer momento la erradicación de la enfermedad, estrategia bastante difícil en el caso de estos, ya que, si la vía de entrada se debe a semilla contaminada, esta se introduce en paralelo en diferentes áreas productoras, y es más difícil su detección y rápida respuesta (Dombrowsky *et al.*, 2017). Por tanto, sería prioritaria la detección previa a la comercialización de la semilla.

En este TFM, las muestras de semilla positivas a ToMMV, fueron enviadas al LNR (IAM-UPV) para la detección de ToBRFV, para el cumplimiento de los Reglamentos de Ejecución de la UE 2019/1615 (Anexo 7.5.1) y 2020/1191 (Anexo 7.5.2). Este es un caso parecido al publicado por Lovelock *et al.* (2020) donde se detectó ToMMV en semillas de pimiento importadas a Australia con cebadores generales de Tobamovirus, aunque el tobamovirus legislado en ese país es ToBRFV. Este hecho pone de manifiesto que se controla la entrada únicamente de aquellos virus con reglamentación específica, pudiendo entrar otros al país igual de peligrosos.

4.2 Purificación y secuenciación del producto obtenido en la RT-PCR

Los fragmentos de 621 pb amplificados en 5 muestras de las 6 que dieron positivo a ToMMV mediante RT-PCR con los cebadores ToMMVF/R descritos por Turina *et al.*, (2016) (Tabla 5), tras ser purificados, se enviaron a secuenciar obteniéndose 5 secuencias que se analizaron mediante un análisis BLAST en la página web del NCBI. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Todos los fragmentos amplificados mostraron una alta identidad nucleotídica (superior al 99%) con secuencias contenidas en la base de datos del NCBI de aislados de ToMMV. En la Tabla 5, se han incluido dos a modo de ejemplo, las del aislado MX5 de ToMMV de México de 2009 y la del aislado HN procedente de China de 2019. Todas las secuencias obtenidas en este trabajo mostraron identidades menores con aislados de otros tobamovirus como ToMV (86.63% nt. id., N.º de Acceso KY967225) o TMV (85.5% nt. Id., N.º Acceso KT923126). En otros aislados de ToMMV están descritos porcentajes de identidad de más del 99.08% para el genoma completo, y en el caso de las OFR que codifican para la MP y la CP, amplificadas y secuenciadas parcialmente en este TFM, con identidades desde el 98.88 hasta el 100 % (Tu *et al.*, 2021).

Tabla 5. Porcentaje de identidad nucleotídica obtenido tras el análisis BLAST de las secuencias amplificadas en este TFM

Código de muestra	Origen	% identidad nucleotídica	No. Accesoión NCBI
622/19	Israel	99.81%	KF477193 (aislado MX5)
		99.61%	MH381817 (aislado HN)
87/20	China	100%	KF477193 (aislado MX5)
		99.67%	MH381817 (aislado HN)
520/20	USA	99.83%	KF477193 (aislado MX5)
		99.83%	MH381817 (aislado HN)
101/21	China	99.83%	KF477193 (aislado MX5)
		99.83%	MH381817 (aislado HN)
208/21	China	99.52%	KF477193 (aislado MX5)
		99.36%	MH381817 (aislado HN)

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Las semillas de pimiento comerciales importadas por empresas españolas comercializadoras de semillas y procedentes de países de fuera de la UE entre noviembre de 2019 y julio 2021, no presentan contaminación por ToMMV.
- Entre noviembre de 2019 y julio de 2021, un porcentaje importante (4,6%) de lotes de semillas de tomate comerciales importadas por empresas españolas comercializadoras de semillas y procedentes de países de fuera de la UE como China, Israel y USA estaban contaminadas con ToMMV.
- Aunque no se tienen todavía datos de la capacidad infectiva del ToMMV detectado en las semillas comerciales de tomate, su detección incrementa el temor del sector agrícola en la introducción de este virus en nuevas áreas productoras y la preocupación por las pérdidas económicas que ello podría conllevar.
- Al igual que ha hecho la Comisión Europea en el caso de ToBRFV, ésta debería de establecer medidas para evitar la introducción y propagación en la Unión Europea del ToMMV.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, C., Font- San-Ambrosio, I., y Jordá-Gutiérrez, C. (2013). *Virosis relevantes del tomate. Detección, diagnóstico y control*. Valencia, España: Phytoma (235-247).
- Ambrós S, Martínez F, Ivars P, de la Iglesia F, Hernández C, Elena SF (2017) Molecular and biological characterization of an isolate of Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in eastern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 149: 261 – 268.
- Australian Government. Department of Agriculture, Water and the Environment (2019-11) Emergency measures for tomato and capsicum seed: Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) Questions and Answers. <https://www.agriculture.gov.au/import/goods/plant-products/seeds-for-sowing/emergency-measures-tommv-qa#what-evidence-exists-for-tommv-spread-through-the-movement-of-tomato-and-capsicum-seed>.
- Blancard, D., H Pitrat, M. (2000). *Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar* (No. 635.61 B638c esp.). Madrid, ES: *Mundiprensa*.
- Borodynko-Filas, N., Minicka, J., Hasiów-Jaroszewska, B. (2017). The occurrence of *Cucumber green mottle mosaic virus* infecting greenhouse cucumber in Poland. *Plant Disease*, 101, 1336.
- Che HY, Luo DQ, Cao XR (2018). First Report of *Tomato Mottle Mosaic virus* in Tomato Crops in China M. *Plant Disease* 102, 10: 2051.
- Dombrovsky Aviv, Smith Elisheva (2017). Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. *Advances in Seed Biology*, 12, 233-260.
- EPPO Reporting Service (2020) Tomato mottle mosaic virus: addition to the EPPO Alert List. Nº 1. Num. article: 2020/253.
- EPPO, 2020. PM 7/146 (1) Tomato brown rugose fruit virus. *EPPO Bulletin* 51: 178-197.

- EPPO Global Database. 2021. Taxon. ToMMV. Distribution, 29/03/21. Acceso: 7 de junio de 2021. <https://gd.eppo.int/taxon/TOMMV0/distribution>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2021. FAOSTAT. Datos sobre alimentación y agricultura, 2019. Acceso: 20 de mayo de 2021. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Fillmer K, Adkins S, Pongam P, D'Elia T (2015). Complete genome sequence of a Tomato mottle mosaic virus isolate from the United States. *Genome Announcements* 3(2), e00167-15. doi:10.1128/genomeA.00167-15.
- Fletcher, J.T., MacNeil, B.H. (1971). Influence of environmental, cultivar and virus strain on the expression of *Tobacco Mosaic virus* symptoms in tomato. *Can. Journal Plant Science*, 51: 171-179.
- Herrera-Vásquez, J. A., Córdoba-Sellés, M. C., Cebrián, M. C., Alfaro-Fernández, A., Jordá, C. (2009). Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-desinfection treatments. *Plant Pathology*, 58,436-452.
- Hull, R. (2004). *Mathews' Plant Virology*. Academic Press, San Diego, CA.
- ICTV. (2020). International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Online (10th) Report of the ICTV. Acceso: 13 de junio de 2021. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Johansen, E., Edwards, M. C., Hampton, R. O. (1994). Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 363-386.
- Li R, Gao S, Ling KS (2013) Secuencia completa del genoma de un nuevo Tobamovirus infectando naturalmente los tomates en México. *Anuncios del genoma* 1, 5: 794-713.
- Li YY, Wang CL, Xiang D, Li RH, Liu Y, Li F (2014) First Report of *Tomato Mottle Mosaic virus* infection of Pepper in China. *Plant Disease*, 98: 1447
- Lovelock DA, Kinoti WM, Bottcher C, Wildman O, Dall D, Rodoni BC, Constable FE (2020). Tomato mottle mosaic virus intercepted by Australian biosecurity in *Capsicum annuum* seed. *Australasian Plant Disease Notes* 15, 8. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-0378-x>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, Elad N, Tam Y, Sela N, Abu-Ras A, Ezra N, Haberman A, Yitzhak L, Lachman O, Dombrovsky A

- (2017) Un nuevo israelí Tobamovirus aislar infecta las plantas de tomate que albergan Tm-2 2 genes de resistencia. *Plos One*, 12.
- MAGRAMA. (1990). Transmisión de enfermedades por semilla de las hortalizas y su prevención. *Fichas divulgativas*, 6/90.
- Mink, G. (1993). Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 375-402.
- Nagai A, Duarte L.M.L, Chaves A LR, Peres L E P, dos Santos DYAC (2019) Tomato Mottle Mosaic Virus in Brazil and Its Relationship with Tm-22 Gene. *European Journal of Plant Pathology*, 155 (1): 353–59, doi:10.1007/s10658-019-01762-7.
- NIMF 31. 2008. Metodologías para muestreo de envíos. Roma, CIPF, FAO. ISPM_31_2008_Es_2016-01-14.pdf (ippc.int)
- Pedro Moreno, Vicente Medina y Javier Romero. (2016). Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides, Instituto Valenciano de Investigación Agraria (IVIA) Bubok, 1: 25-27.
- Rio, D. C. (2014). Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Protocols 2014.11: pbd-prot080887
- Sastry, K. S. (2013). Seed-borne plant virus diseases. (pp. 343) Springer Science & Business Media, India.
- Seminis Vegetable Seeds, The Ruler (Julio 2017). Tomato Disease Field Guide, 6: 114 - 116
- Sepúlveda R. (2019), Transmisión de virus por semilla, *Tierra adentro*, vol: 18-21.
- Sepúlveda R. (2015). Los virus y sus principales características. *Programa Fitopatología*. INIA- La Platina.
- Tu L., Wu S., Gao D., Liu Y., Zhu Y., Ji Y. (2021) Synthesis and Characterization of a Full-Length Infectious cDNA Clone of Tomato Mottle Mosaic Virus. *Viruses* 13, 1050.
- Turina M, Geraats B, Ciuffo M (2016) First report of Tomato mottle mosaic virus in tomato crops in Israel. *New Disease Reports* 33, 1
- Van Dorst, H. J. M. (1988). Surface water as source in the spread of Cucumber green mottle mosaic virus. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 36, 291-299.

- Webster CG, Roskopf EN, Lucas L, Mellinger HC, Adkins S (2014) Primer informe de Virus del mosaico del moteado del tomate infectando el tomate en los Estados Unidos. *Prog. De Sanidad Vegetal*, 15: 151-152.
- Xuelian Sui, Yi Zheng, Rugang Li, Chellappan Padmanabhan, Tongyan Tian, Deborah Groth-Helms, Anthony P. Keinath, Zhangjun Fei, Zujian Wu, and Kai-Shu Ling (2017). Molecular and Biological Characterization of Tomato mottle mosaic virus and Development of RT-PCR Detection, *Plant Disease*, 101: 704-711
- Yueyue, Gualin, Pingxiu, Ansheng, yong, Ruhui, Fan (2018), Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers, *Journal of Virological Methods*, 219: 122-128.
- Zhan Bin-hui, Cao Ning, Wang Kai-na, Zhou Xue-ping (2018), Detection and characterization of an isolate of *Tomato mottle mosaic virus* infecting tomato in China, *Journal of Integrative Agriculture*, 17(5): 1207-1212.