



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Idaeovirus rubi

Raspberry bushy dwarf
virus (RBDV)

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Idaeovirus rubi

Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)





GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

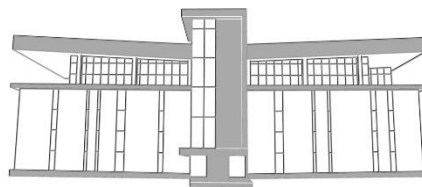


SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Idaeovirus rubi

Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)



Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

2022

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA),
[2022]

Todos los derechos reservados.

Imagen de anteportada: Síntomas del *Idaeovirus rubi* en frambuesa variedad 'Marion', Tomado de Strik y Martin, 2003.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades.....	1
Información taxonómica.....	2
SÍNTOMAS.....	2
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	3
Técnicas moleculares	3
Toma de muestra y Extracción de RNA.....	4
Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría	4
Ensayo de Gen Endógeno.....	5
Síntesis de cDNA con <i>primers</i> específicos	5
PCR punto final	6
Ensayo para la detección específica de RBDV	6
Reacción de RT-PCR en un paso.....	6
Electroforesis.....	8
Controles para las pruebas moleculares.....	8

Interpretación de resultados.....	9
Identificación de plaga	9
Corroboración de resultados.....	10
Criterios para el análisis de secuencias Sanger	10
REGISTROS.....	10
REFERENCIAS.....	11
AVISO.....	12

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La especie viral *Idaeovirus rubi* conocida como Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) es un miembro del género *Idaeovirus*. Su genoma es de ssRNA (+) lineal, tripartito, segmentado, por lo que la replicación tiene lugar en el citoplasma (Viralzone, 2021). Las partículas de RBDV tienen aproximadamente 33 nm de diámetro y son ligeramente aplanadas (Figura 1) (Ziegler *et al.*, 1992), el virión no está envuelto, es icosaédrico, tiene tres componentes de RNA, 2 genómicos y 1 subgenómico (Viralzone, 2021). Los hospedantes naturales pertenecen al género *Rubus*, como son la frambuesa (*Rubus idaeus*), frambuesa negra (*Rubus occidentalis*), zarzamora (*Rubus ursinus*) (Virus-Host DB, 2021) y los híbridos como moras (*R. loganobaccus*) y zarza de Boysen (*R. ursinus*), aunque se ha detectado también en la vid (*Vitis vinifera*), principalmente en variedades blancas. El RBDV puede transmitirse por semillas y polen, se encuentra distribuido en países como: China, Sudáfrica, Japón, Francia, Italia, USA, Nueva Zelanda, Ecuador, Chile, Costa Rica, Canadá, entre otros (Jevremović y Paunović, 2011; EPPO, 2022).

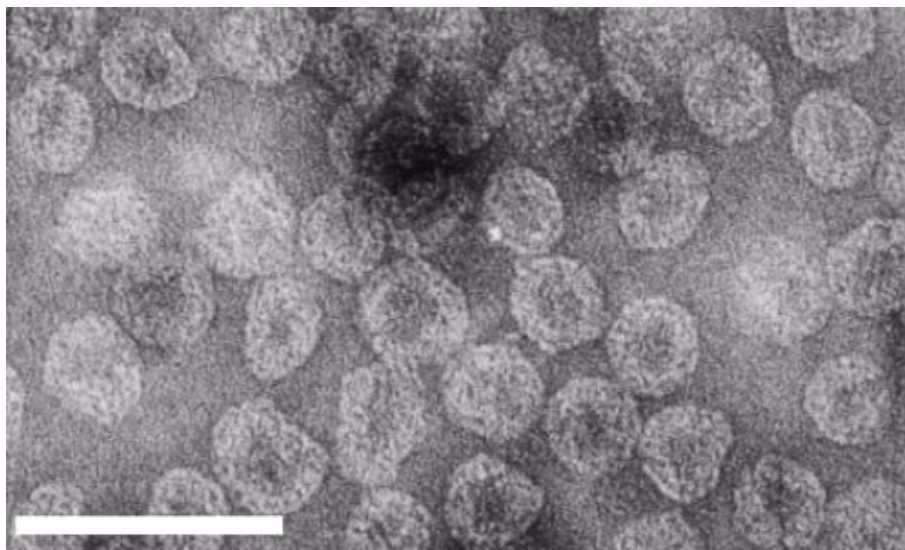


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra partículas isométricas de RBDV teñidas con acetato de uranilo. La barra representa una escala de 100 nm. Tomado de Murant, 1976.

Información taxonómica

Posición taxonómica: Dominio: *Riboviria*, Reino: *Orthornavirae*, Filo: *Kitrinoviricota*, Clase: *Alsuviricetes*, Orden: *Martellivirales*, Familia: *Mayoviridae*, Género: *Idaeovirus*, Especie: *Idaeovirus rubi* (ICTV, 2022).

Nombres comunes: Raspberry bushy dwarf virus, Symptomless decline of raspberry (inglés), Virus enano tupido de la frambuesa (español).

Acrónimo en virus: RBDV

SÍNTOMAS

En la mayoría de los cultivares de frambuesa, la infección por este virus es asintomática, sin embargo, el virus puede causar epinastia, clorosis intervenal, amarillamiento, necrosis, defoliación prematura, disminución del vigor y aborto de las pequeñas drupas individuales que forman un fruto carnoso agregado de la frambuesa, dando como resultado frutos desmenuzados. En moras (*R. loganobaccus*), zarza de Boysen (*R. ursinus*) y frambuesa negra (*R. occidentalis*) los síntomas son inciertos. Aunque el virus causa síntomas leves, puede afectar la calidad de la fruta, especialmente en infecciones mixtas (Jevremović y Paunović 2011).

En combinación con otras especies virales, como *Grapevine virus A*, *Grapevine fleck virus* y *Arabis mosaic virus* (Figura 2A), las hojas presentan patrones de líneas pronunciadas de color amarillo brillante clorótico y/o amarillamiento de las venas. Solo con *Grapevine fleck virus*, las áreas amarillas a menudo se unen para producir un amarillamiento parcial o completo de las hojas afectadas (Figura 2B, 3C-D). (Jevremović y Paunović 2011).

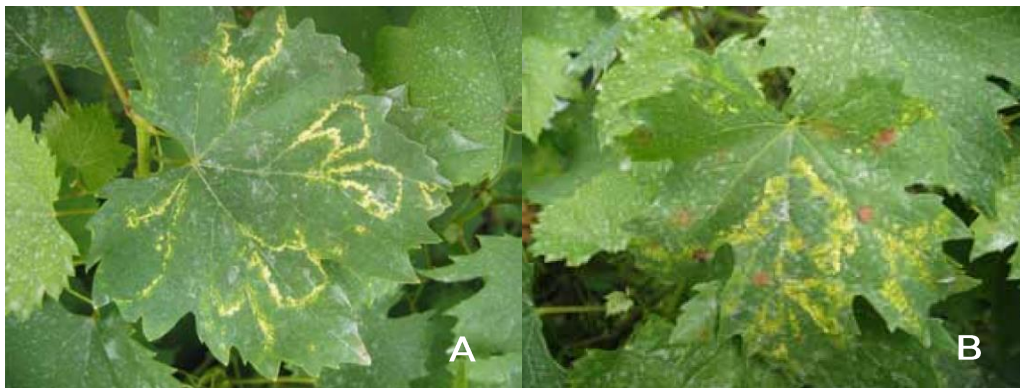


Figura 2. Síntomas del *Idaeovirus rubi* en vid. A) Patrón de línea irregular, y B) patrón de mosaico (Jevremović y Paunović 2011).



Figura 3. Síntomas del *Idaeovirus rubi* en frambuesa variedad 'Marion'. A) Fruto sano, B) Fruto con desmenuzamiento severo de la frambuesa, C) Clorosis en hojas, D) clorosis foliar en etapa de fructificación (Strik y Martin, 2003).

La fruta de cultivares de frambuesa infectados con el virus puede presentar una condición conocida como fruta que se desmorona/desmenuzamiento (Figura 3B) a diferencia de la fruta sana (Figura 3A). Esta condición surge del aborto de algunas drupas y del desarrollo desigual de otras, lo que da como resultado frutos deformes que, al ser recogidos, tienden a desintegrarse (Strik y Martin, 2003).

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

Debido a que RBDV es un virus de RNA de cadena positiva, el diagnóstico molecular de este patógeno se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR), la cual permite, gracias a la retrotranscripción inicial, detectar la presencia de RNA viral incluso cuando se encuentra en un bajo número de copias.

Toma de muestra y Extracción de RNA

Cada muestra deberá ser analizada por duplicado como **mínimo**, es decir, se tendrán **dos o más submuestras** obtenidas separadamente del mismo origen, al mismo tiempo, con el mismo procedimiento, por lo que desde la toma de muestra se debe planificar el número total de análisis, para todo el proceso de diagnóstico.

La extracción de RNA total se realiza a partir de nervaduras centrales de hojas, yemas o brotes.

- Hoja: tomar secciones de la lámina foliar que incluya la nervadura central y tejido de parénquima (limbo foliar) (0.5-1.0 cm de ancho x 1.0 cm de largo).
- Brote: tomar tejido directamente de las hojas circundantes de los brotes.
- Yemas: tomar las yemas disponibles, se puede emplear un muestreo aleatorio simple, en donde todas las unidades muestrales tienen igual probabilidad de ser seleccionadas.
- En caso de no haber presencia de síntomas, tomar tejido vegetal de manera aleatoria, en tres puntos: apical, medio y basal, a nivel de órgano o unidad.

Para el caso de tejido vegetal con alto contenido de fenoles, como el tejido foliar de fresa, frambuesa, arándano, zarzamora y vid), se sugiere utilizar el método de extracción de CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1990) modificado.

Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría

Después de la extracción, es necesario verificar que el material genético obtenido posee la pureza y calidad necesaria para llevar a cabo la amplificación por PCR. La pureza del RNA se determina a partir de la relación de Absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , esperándose valores entre 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente. Aunado a lo anterior, se recomienda verificar la integridad del RNA mediante visualización directa en un gel de agarosa al 1% o, en su defecto, realizar un ensayo de gen endógeno que permita descartar la presencia de inhibidores de la reacción de PCR.

Nota: Los ítems (ácidos nucleicos) que no cumplan con los criterios de Absorbancia podrán ser utilizados para el diagnóstico siempre y cuando cumplan exitosamente con la prueba del gen endógeno.

Ensayo de Gen Endógeno

Síntesis de cDNA con *primers* específicos

El ensayo de gen endógeno consiste en la amplificación, mediante RT-PCR, de un fragmento del gen 18S ribosomal para descartar falsos negativos debido a inhibidores en la muestra de RNA. La síntesis de cDNA se realiza con los *primers* propuestos por Zamboni *et al.*, 2008 (Cuadro 1), los cuales dirigen la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad.

Cuadro 1. *Primers* utilizados para la detección del gen endógeno 18S mediante RT-PCR.

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Amplicón	Ensayo
18S Fw	ACGGATCGCACGGCCTTCGTG	300 pb	gen endógeno
18S Rv	ACCAGACTTGCCCTCCAATGG		

- 1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el siguiente Cuadro 2:

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.0
MgCl ₂	50 mM	5.0 mM	2.0
dNTP´s	10 mM	1.0 mM	2.0
18S Fw	10 μM	0.2 μM	0.4
18S Rv	10 μM	0.2 μM	0.4
Inhibidor de RNA	40 U/μL	20 U/Rxn	0.5
RT M-MLV	200 U/μL	50 U/Rxn	0.25
RNA	100-10 ng/ μL	25 – 2.5 ng/ μL	5.0
Agua libre de nucleasas	---	---	7.45
Volumen final			20

- 2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 3):

Cuadro 3. Programa de térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	30 min	1
99 °C	5 min	1
12 °C	∞	

3) Al finalizar el tiempo de incubación, almacenar las muestras a 4 °C.

PCR punto final

Preparar la reacción de PCR de acuerdo a lo señalado en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Mezcla de reacción para la PCR punto final del gen endógeno 18S.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP´s	10 mM	0.20 mM	0.5
18S Fw	10 μM	0.4 μM	1.0
18S Rv	10 μM	0.4 μM	1.0
Taq polimerasa	5 U/μL	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua libre de nucleasas	---	---	18
Volumen final			25

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 5):

Cuadro 5. Programa de termociclaje para la detección del gen endógeno 18S.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	90 s	1
Desnaturalización	94 °C	40 s	30
Hibridación	55 °C	40 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	3 min	1

Ensayo para la detección específica de RBDV

Reacción de RT-PCR en un paso

Para la detección de RBDV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en un paso utilizando los *primers* descritos en el cuadro 6, diseñados por Kokko *et al.*, 1996.

Cuadro 6. *Primers* utilizados para la detección de RBDV mediante RT-PCR. Tamaño de amplicones según la combinación de *primers* empleados.

Nombre de los primers	Secuencia (5´ - 3´)	Combinación	Amplicón
U1	GCTGTTCCACCAATCGTTA	U1-L4	872 pb
U2	TTCATCCTCCAAATCTCAGCAAC	U2-L4	597 pb
L3	CGTCGACGGCACC GCCCACCACA	U1-L3	520 pb
L4	GCTATGCCGTTTATCTCAC	U2-L3	245 pb

- 1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el siguiente Cuadro 7:

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la RT-PCR de RBDV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1X
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
DTT	100 mM	10 mM	2.5
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	1.25
dNTP´s	10 mM	0.25 mM	0.625
*U1 ó U2	10 µM	0.8 µM	2
*L3 ó L4	10 µM	0.8 µM	2
Taq polimerasa	5 U/µL	2.5 U/Rxn	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	100 U/Rxn	0.5
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/Rxn	0.5
RNA	100 ng/ µL	12 ng/ µL	3
Agua libre de nucleasas	---	---	9.625
Volumen final			25

*Colocar los *primers* según la combinación de interés, revisar en el cuadro 6 el tamaño del amplicon esperado.

- 2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 8):

Cuadro 8. Programa de termociclaje para la detección de RBDV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Retrotranscripción	42 °C	60 min	1
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	40
Hibridación	58 °C	90 s	
Extensión	72 °C	90 s	
Extensión final	72 °C	5 min	1

Electroforesis

Los productos de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TAE o TBE 1X, empleando un voltaje de 90-100V durante una hora o el tiempo requerido para asegurar la separación adecuada del marcador de tamaño molecular. Para observar los fragmentos amplificados, teñir el gel con una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio o alguna otra solución que cumpla con la misma función.

Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de RT-PCR descritos en este protocolo, deben incluir los siguientes controles, por duplicado:

- **Control positivo:** asegura la funcionalidad de los reactivos de RT-PCR y provee una referencia con la cual comparar los resultados positivos. Se trata de DNA plásmidico o RNA genómico de la plaga de interés, los cuales deben estar confirmados mediante secuenciación.
- **Control negativo de reactivos:** se trata de la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

De manera adicional, y en caso de contar con él, se puede incluir un **Control negativo de matriz**, que corresponde a un extracto del tejido del hospedante (matriz) libre del virus. El uso de este control asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Interpretación de resultados

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo del control endógeno, el control positivo y cada una de las muestras debe generar un fragmento de 300 pb. El control negativo de reactivos no debe presentar ningún fragmento (Figura 4).
- En el ensayo para la detección de RBDV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 872, 597, 520 o 245 pb, de acuerdo al par de *primers* utilizados (Kokko *et al.*, 1996).

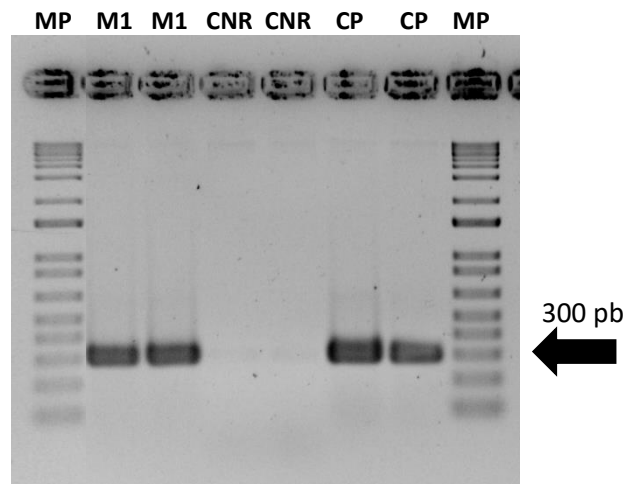


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno. Las muestras presentan un fragmento de 300 pb, correspondientes al amplicón positivo a *18S*. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-2: muestras problema; CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 872, 597, 520 o 245 pb con los *primers* específicos U1-L4, U1-L3, U2-L4 y U2-L3, respectivamente.

El resultado es negativo si hay amplificación del control endógeno pero no del fragmento correspondiente a RBDV.

Nota: este documento describe el procedimiento para la detección de *Idaeovirus rubi* (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV), mediante RT-PCR en un paso, asegura su aplicación siempre y cuando los ítems extraídos cumplan exitosamente con la prueba del gen endógeno.

Corroboración de resultados

Las muestras con resultado positivo deben someterse a corroboración para asegurar que los fragmentos amplificados corresponden al genoma de RBDV. Para ello, es necesario llevar a cabo la Secuenciación Sanger de alguno de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR punto final, cuando se presente alguno de los siguientes casos:

- Se requiere un método confirmatorio de mayor soporte que dé sustento al resultado.
- Primeras detecciones del virus en un nuevo hospedante, producto, clave de combinación, laboratorio aprobado y/o signatario.
- Cuando el área de Laboratorios Aprobados lo solicite, como parte del proceso de supervisión, control y evaluación del desempeño de los laboratorios aprobados (Circular n° 40).

De igual manera, en caso de que el área de Laboratorios Aprobados así lo solicite, los datos de secuenciación originales (en formato. ab1) deberán enviarse y ser canalizados al laboratorio de Virología del CNRF para su análisis y corroboración.

Criterios para el análisis de secuencias Sanger

Las secuencias obtenidas deben ser revisadas con ayuda de algún programa de edición de secuencias para eliminar las regiones iniciales y/o finales que presenten baja calidad en las lecturas y generar una secuencia consenso que contenga la mayor información posible. Las secuencias consenso deben analizarse mediante un alineamiento por comparación con la herramienta BLASTn (NCBI, 2022), para determinar su identidad.

Para considerar que una secuencia corresponde al genoma del patógeno de interés, el alineamiento debe generar, al menos, el 95 % de identidad y 95 % de cobertura con alguna de las secuencias de referencia, así como presentar un *E value* igual o menor a cero.

REGISTROS

Mantener los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de RBDV, conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad, además resguardar y tener disponibles las muestras vegetales o subproductos de estas en caso de requerir corroboración.

REFERENCIAS

- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). (2022). [En línea]. <https://ictv.global/taxonomy> (Consultado 18/11/ 2022).
- EPPO Global Database (2022). *Idaeovirus rubi* (RBDV00). [En línea]. <https://gd.eppo.int/taxon/RBDV00/distribution> (Consultado 18/11/ 2022).
- Jevremović, D., and Paunović, S. (2011). Raspberry bushy dwarf virus a Grapevine Pathogen in Serbia. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade), 26: 55-60. DOI: 10.2298/PIF1101055J.
- Kokko, H., Kivineva, M. and Kärenlampi, S. (1996) Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of raspberry bushy dwarf virus. *BioTechniques* 20:842-846. DOI: 10.2144 / 96205ST03.
- Murant, A. F. (1976). Descriptions of Plant Viruses 165. Raspberry bushy dwarf virus. Ed Murant, A.F and Harrison, B.D. DPV NO: 165. [En línea]. <https://dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=360>
- Strik, B., and Martin, R. R. (2003). Impact of Raspberry bushy dwarf virus on 'Marion' blackberry. *Plant Disease*. 87:294-296.
- Virus-Host DB. (2022) Raspberry bushy dwarf virus. Laboratory of Chemical Life Science. Kyoto University Bioinformatics Center. Institute for Chemical Research. [En línea]. <https://www.genome.jp/virushostdb/12451> (Consultado 18/11/ 2022).
- Ziegler, A., Natsuaki, T., Mayo, M. A., Jolly, C. A. and Murant, A. F. (1992). The nucleotide sequence of RNA-1 of raspberry bushy dwarf virus. *Journal of General Virology* 73, 3213-3218. doi.org/10.1099/0022-1317-73-12-3213.
- Viralzone (2021). *Idaeovirus*. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). [En línea]. <https://viralzone.expasy.org/44> (Consultado 18/11/ 2022).

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de RBDV, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2022. Ficha Técnica de Diagnóstico de: *Idaeovirus rubi*, Raspberry bushy dwarf virus (RBDV). Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Angel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa de Departamento de Fitopatología	Revisó
M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna Coordinadora del Laboratorio de Virología	Revisó y elaboró
Ing. María Monserrat Sánchez Rodríguez Técnico del Laboratorio de Virología	Elaboró

CONTACTO

lab.virologia@senasica.gob.mx

Teléfono y extensión: 01 (52) 55 5905 1000, Ext.51378, 51379, 51414

Dudas sobre:
• Campañas Fito o Zoosanitarias
• Movilización de Productos
Agroalimentarios y Mascotas
800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica
55 5905.1000
Ext 51648

gob.mx/agricultura gob.mx/senasica

