

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario
Departamento de Fitopatología
Laboratorio de Virología**

Instrucciones generales para la detección de virus fitopatógenos en fresa de importación.

Elaboró:

Liliana Elizabeth Ronces Frutos

Revisó:

Jessica Berenice Valencia Luna

Tecámac, Estado de México, agosto 2020



INSTRUCCIONES GENERALES PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN MUESTRAS DE FRESA DE IMPORTACIÓN

I. OBJETIVO

La finalidad de este documento es servir como guía general para llevar a cabo el diagnóstico molecular de los virus fitopatógenos reglamentados en el módulo de requisito para la importación de fresa para sembrar o plantar. Las metodologías descritas a continuación se realizaron utilizando tejido foliar y nervaduras centrales.

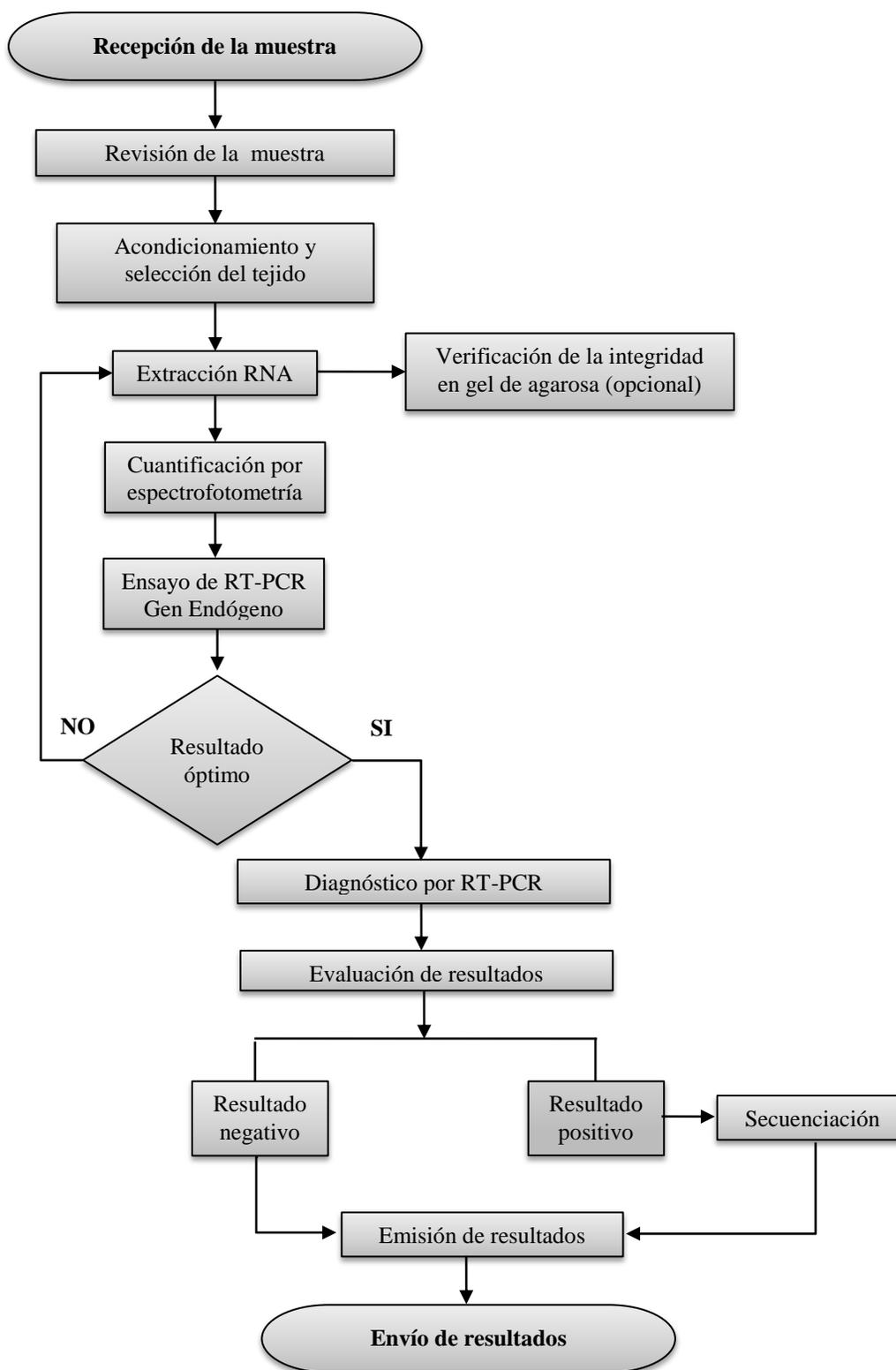
II. GENERALIDADES

El diagnóstico molecular de virus fitopatógenos en frutillas de importación se realiza con ayuda de la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a la Transcripción reversa (RT-PCR), debido a que la mayoría de estos virus poseen un genoma formado por RNA. En el presente documento, se describe el flujo de trabajo a seguir así como las consideraciones pertinentes para la interpretación de los resultados. Además, se anexan las fichas con las condiciones de reacción para la detección por RT-PCR de cada uno de los virus enlistados.

La principal referencia de los patógenos a buscar se encuentra en las Hojas de Requisitos Fitosanitarios (HRF), las cuales se encuentran en el Modulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancía de origen vegetal (<https://sistemasssl.senasica.gob.mx/mcrfi/>)

En caso de que las HRF no indiquen las especies virales a analizar, el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria propone, en este informe, el listado de virus fitopatógenos que deben analizarse en las muestras de fresa de importación.

II. FLUJO DE TRABAJO



III. MÓDULO DE REQUISITOS FITOSANITARIOS

Para consultar la lista de virus fitopatógenos regulados en las fresas de importación, ingrese a la página del Módulo de Requisitos Fitosanitarios (<https://sistemasssl.senasica.gob.mx/mcrfi/>) (ver **Figura 1**).

Figura 1. Página principal del Módulo de Requisitos Fitosanitarios.

Si se conoce la “Clave de combinación”, esta debe ingresarse en el apartado correspondiente; si no, es necesario seleccionar la opción adecuada para cada criterio en el apartado de “Búsqueda por criterios” (ver **Figura 2**). Los datos del nombre científico, mercancía, origen y procedencia se encuentran en los antecedentes de la muestra. Al dar click en “Obtener requisitos”, se desplegará la lista de requisitos. Al dar click en “Detalle”, aparece la lista de los virus que se deben analizar para cada producto (ver **Figura 3**).

Búsqueda por criterios

Nombre científico (producto):
Mercancía:
Tipo de producto:

Uso:
País de origen:
País de procedencia:

Requisitos

Combinación	Nombre científico	Tipo de producto	Mercancías	Función/uso	País de origen	País de procedencia	Detalle
1515-131-4210-USA-USA	Fragaria spp.	Plántulas	Fresa	SEMBRAR O PLANTAR	E.U.A.	E.U.A.	Detalle

Figura 2. Búsqueda de Requisitos fitosanitarios por criterio.

- El certificado fitosanitario deberá especificar que el producto se encuentra libre de:**
- 4 Aphelenchoides ritzemabosi
 - 5 Colletotrichum acutatum
 - 6 Scirtothrips dorsalis
 - 7 Strawberry Crinkle Cytorhabdovirus
 - 8 Strawberry Latent C Disease
 - 9 Strawberry Latent Ringspot Nepovirus
 - 10 Strawberry Mild Yellow Edge Luteovirus
 - 11 Strawberry Mottle Virus
 - 12 Strawberry Vein Banding Caulimovirus
 - 13 Strawberry Witches Broom Phytoplasma
 - 14 Xanthomonas fragariae
- El tratamiento fitosanitario, puede ser aplicado al material vegetal propagativo en el país de origen, o bien, en el punto de entrada al país.**
- 15 En el caso de aplicación del tratamiento en origen, debe aplicarse un plaguicida autorizado oficialmente en el país de origen como tratamiento en el material vegetal propagativo que se trate, anotando en el Certificado Fitosanitario dicho tratamiento y las dosis aplicadas.

Figura 3. Ejemplo de lista de plagas reglamentadas por producto.

IV. LISTADO DE VIRUS POR PRODUCTO

Cuando la hoja de requisitos fitosanitarios no especifique cuáles son las especies virales que deben analizarse en un producto, se recomienda realizar el diagnóstico de los virus fitopatógenos enlistados en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Virus fitopatógenos a detectar por tipo de producto

Virus	Acrónimo
<i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV
<i>Strawberry crinkle virus</i>	SCV
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV
<i>Strawberry mottle virus</i>	SMoV
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	SMyEV
<i>Strawberry vein banding virus</i>	SVBV

V. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos se realiza a partir de tejido foliar y/o nervaduras centrales. Se sugiere utilizar una modificación al protocolo de extracción con CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1987) o el protocolo propuesto por Zamboni et al. (2008) que se describen en los **Anexos 1 y 2**.

Después de la extracción, es necesario verificar la calidad de los ácidos nucleicos. La pureza del RNA se determina a partir de la relación de Absorbancia A260/A280 y A260/A230, esperándose valores entre 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente. La integridad se determina mediante visualización directa en un gel de agarosa al 1% o, en su defecto, con un ensayo de gen endógeno que permita comprobar la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR.

VI. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para realizar el diagnóstico molecular, se deben seguir las condiciones de amplificación señaladas en cada una de las fichas de trabajo, según sea el caso.

VII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- Todas las muestras deben cumplir positivamente con el ensayo del gen endógeno.
- Los controles negativos de reactivos y matriz no deben generar ninguna banda de amplificación con los *primers* específicos para cada virus.



- El control positivo debe presentar la banda de amplificación del tamaño esperado para cada virus.

En caso de que no se cumpla alguno de los criterios anteriores, el ensayo debe repetirse.

Cuando no se cuente con control positivo de alguno de los virus, las muestras que presenten bandas de amplificación sospechosas (tamaño cercano al esperado) deben ser secuenciadas para descartar o confirmar la presencia del virus.

La secuenciación también es requerida cuando se presenta alguno de los siguientes casos:

1. Resultado positivo de una muestra proveniente de una zona declarada como libre del patógeno.
2. Primera detección del virus en un nuevo hospedante.

VIII. REGISTROS

Todos los registros y evidencia del proceso de diagnóstico deben ser resguardados conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad. Una vez concluido el diagnóstico, el tejido vegetal y RNA sobrante de las muestras debe ser almacenado por un periodo de tres meses, en caso de resultado positivo, o durante un mes si el resultado fue negativo. Después de este tiempo, el material se esteriliza en autoclave a 15 psi por 20 minutos y se desecha.

IX. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.virologia@senasica.gob.mx

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

X. REFERENCIAS

Zamboni, A., Pierantoni L. y De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other Woody-plants. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 1, 122-125

Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

ANEXO I.

A continuación, se describe la preparación de las soluciones y metodología según el método de extracción de RNA descrito por Zamboni et al. 2008.

A. Soluciones amortiguadoras

Buffer de extracción

2 % (m/v) CTAB

2 % (m/v) PVP

100 mM Tris HCl (pH 8.0)

25 mM EDTA

2 M NaCl

0.05 % (m/v) Trihidrocloruro de espermidina

2 % β -mercaptoetanol (adicionar justo antes de usar el buffer)

Buffer de resuspensión

1 M NaCl

0.5 % SDS

10 mM Tris HCL (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

Recomendaciones de preparación de buffers

- Hacer los cálculos correspondientes para asegurar que los reactivos queden a la concentración final indicada. El técnico determinara el volumen de solución a preparar según sus requerimientos para procesar muestras.
- Pesar en una balanza analítica la cantidad requerida de cada reactivo sólido a utilizar en la preparación de la solución.
- Utilizar probetas o micropipetas según sea el caso, para medir el volumen de cada reactivo líquido a utilizar en la preparación de la solución.
- En un matraz con agitador magnético y sobre una platina de agitación, preparar las soluciones con agua destilada ultra pura grado molecular o tratado con DEPC. Se sugiere ir agregando los reactivos de acuerdo al orden de las listas citadas en el apartado anterior.
- Realizar el aforo de la solución en un matraz aforado con cuello largo y estrecho que llevan grabado a su alrededor una línea transversal (línea de aforo) y que corresponde a la capacidad exacta a la temperatura de 20 °C.
- Verter la solución final en frascos con tapa y posteriormente, esterilizar con autoclave a 15 psi por 20 min.
- Dejar enfriar para su uso.



B. Metodología

- 1) Macerar 80 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido. Colocar el polvo en un tubo de 2 mL y adicionar 800 μ L de *buffer* de extracción.
- 2) Incubar las muestras durante 15 min en un baño María previamente calentado a 65 °C (\pm) 2 °C.

Nota: Se puede emplear un homogenizador de tejidos, siguiendo las instrucciones del fabricante. En ese caso, adicionar el *buffer* de extracción previo a la maceración. Respete las proporciones muestra/*buffer*.

- 3) Adicionar 800 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v:v). Agitar vigorosamente con vórtex y centrifugar a 12 096 x g por 15 min.

Nota: Se recomienda agitar las muestras con ayuda de un *vortex* de 8 a 10 veces durante el tiempo de incubación, previniendo la separación del tejido con el *buffer* de extracción.

- 4) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL, sin tomar la fase orgánica y repetir el paso 3.
- 5) Colectar cuidadosamente el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo de 2 mL. Adicionar tres volúmenes de una solución de LiCl 8 M (por ejemplo: sí se transfiere 200 μ L de sobrenadante adicionar 600 μ L de LiCl, respetando la proporción (1:3).
- 6) Mezclar por inversión de 7 a 10 veces e incubar toda la noche (15 h aproximadamente) en refrigeración a 4 °C (\pm) 2 °C.
- 7) Centrifugar la muestra a 16 464 x g por 35 min, para permitir que se forme una pastilla. Posteriormente, decantar el sobrenadante.
- 8) Resuspender la pastilla en 500 μ L de *buffer* de resuspensión.
- 9) Extraer nuevamente la muestra con un volumen de 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v:v).
- 10) Centrifugar a 16 464 x g por 10 min y recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo de 1.5 mL.
- 11) Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto frío, con respecto a la fase acuosa recuperada e incubar por 30 min a -80 °C (\pm) 2 °C para precipitar el RNA.
- 12) Centrifugar a 16 464 x g por 20 min. Al término, decantar el sobrenadante.
- 13) Dejar secar la pastilla colocando el tubo abierto boca abajo a temperatura ambiente, entre 20 a 25 °C. Posteriormente, resuspender en 30 μ L de agua destilada ultra pura grado biología molecular o agua tratada con DEPC.



ANEXO II.

A continuación, se describe la preparación de las soluciones y metodología según el método tradicional CTAB 2% para la extracción de ácidos nucleicos descrito por Doyle y Doyle, 1987.

A. Solución amortiguadora

Buffer de extracción CTAB 2%

1.4 M de NaCl (8.181 g)
20 mM de EDTA (0.744 g),
2 % P/V de CTAB (2 g)

Disolver lo anterior en 75 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termomagnético hasta que las sustancias se disuelvan completamente. Agregar 300 μ l de 2- β -mercaptoetanol en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente, aforar a un volumen de 100 ml con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Mantener a temperatura ambiente entre 20 a 25 °C y antes de iniciar el proceso caliente a 65 °C (\pm) 2 °C.

B. Metodología

- 1) En el área gris del laboratorio, pesar en una balanza analítica 100 mg de tejido vegetal. En caso de observar síntomas, tomar tejido de la zona afectada.
- 2) Dependiendo de la disponibilidad de material se puede realizar la maceración del tejido de la siguiente manera:
 - a. Colocar en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido. Transferir la muestra macerada en un tubo de 2 mL.
 - b. Colocar la muestra en un tubo de matriz de lisis nueva.
- 3) Adicionar al tubo una parte de PVP (1:1) con una espátula estéril. Tener cuidado de no tocar el tubo, en caso de que ocurra, cambiar de espátula.
- 4) Agregar *Buffer* CTAB 2%:
 - a. Adicionar 500 μ L de *Buffer* CTAB 2% previamente calentado a 65 °C (\pm) 2 °C en baño María, mezclar con vortex.



- b. Adicionar 1 mL de *Buffer* CTAB 2% previamente calentado a 65 °C (\pm) 2 °C en baño María. Colocar los tubos en el disruptor de tejido. Programar el equipo el tiempo necesario para que el tejido quede macerado.
- 5) Incubar las muestras a 65 °C (\pm) 2 °C en baño María por 40-50 minutos.
 - 6) Sacar los tubos del baño María y dejar enfriar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos.
 - 7) Centrifugar 1 minuto a 16 464 x g
 - 8) Recuperar el sobrenadante. Colocar en un tubo estéril.
 - 9) Agregar 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
 - 10) Agitar o dar vortex hasta que se encuentre homogenizada la mezcla.
 - 11) Centrifugar a 16 464 x g por 10 minutos.
 - 12) Recuperar de 500 a 700 μ L de la fase superior, Sin tomar la fase intermedia. Transferir a un tubo nuevo.
 - 13) Agregar medio volumen de isopropanol (el reactivo debe estar a una temperatura de -20°C (\pm) 2 °C), mezclar por inversión (En este paso, se puede pausar el proceso dejando la mezcla toda la noche a -20 °C (\pm) 2 °C o incubar de 30 a 40 minutos a 4 °C (\pm) 2 °C.
 - 14) Centrifugar a 16 464 x g por 15 minutos
 - 15) Decantar el sobrenadante, cuidando no tirar la pastilla formada en el fondo del tubo.
 - 16) Lavar la pastilla agregando 350 μ L de etanol al 70 %, mezclar por inversión. Centrifugar a 16 464 x g por 3 minutos. Decantar el etanol.
 - 17) Dejar secar la pastilla hasta que no queden residuos de etanol, colocando los tubos boca abajo sobre papel secante.
 - 18) Resuspender la pastilla en 50 μ L de agua libre de nucleasas.