

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry mosaic associated virus (BIMaV)



SENASICA, AGRICULTURA SANA PARA EL BIENESTAR.

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Imagen de Portada: *Blueberry mosaic associated virus* (EPPO, 2021)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES.....	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA	1
Acrónimo en virus	1
Nombres comunes.....	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS	1
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	2
Técnicas moleculares	2
Toma de muestra y Extracción de RNA.....	2
Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría	3
Ensayo de Gen Endógeno.....	3
RT-PCR punto final en un paso	3
Ensayo para la detección específica de BImaV	4
Reacción de RT-PCR en dos pasos	4
Síntesis de cDNA	5
PCR punto final	6
Electroforesis.....	6
Controles para las pruebas moleculares.....	6
Interpretación de resultados de PCR punto final.....	7
Identificación del patógeno	8
REGISTROS	8
REFERENCIAS.....	9
AVISO.....	10

Blueberry mosaic associated virus (BIMaV)

GENERALIDADES

El virus asociado al mosaico del arándano pertenece al género *Ophiovirus*, posee un genoma segmentado compuesto por tres cadenas de RNA de sentido negativo (ssRNA(-)), las cuales codifican para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (RNA1), una proteína de movimiento (MP) (RNA2) y la proteína de la nucleocápside (NP) (RNA3), más una proteína pequeña de función desconocida (Thekkle-Veetil *et al.*, 2014).

La enfermedad del mosaico del arándano se ha observado en diferentes cultivares de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) en distintas áreas de Estados Unidos, además de contar con reportes de distribución limitada en Argentina, Chile, Europa, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Martin *et al.*, 2012). El virus se transmite de manera natural por el hongo *Olpidium virulentus* (Thekkle-Veetil *et al.*, 2014; Isogai *et al.*, 2016; Shands *et al.*, 2017).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry mosaic associated virus

Acrónimo en virus

BIMaV

Nombres comunes

Virus asociado al mosaico del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Serpentovirales*, Familia: *Aspiviridae*, Género: *Ophiovirus*,
Especie: *Blueberry mosaic associated virus*

(EPPO, 2021; ICTV, 2021)

SÍNTOMAS

Las plantas infectadas con BIMaV pueden desarrollar mosaicos moderados y moteados amarillos, verdes o rosáceos en diferentes ramas del mismo arbusto (Martin y Tzanetakis, 2018) (Figura 1). Retraso en la maduración de la fruta, así como disminución del rendimiento y calidad (Thekke-Veetil *et al.*, 2015). La distribución de los síntomas es irregular; dependiendo del cultivar, pueden observarse síntomas en la mayor parte de la planta, solo en algunas ramas o, incluso, plantas asintomáticas (Ramsdell y Stretch, 1987).

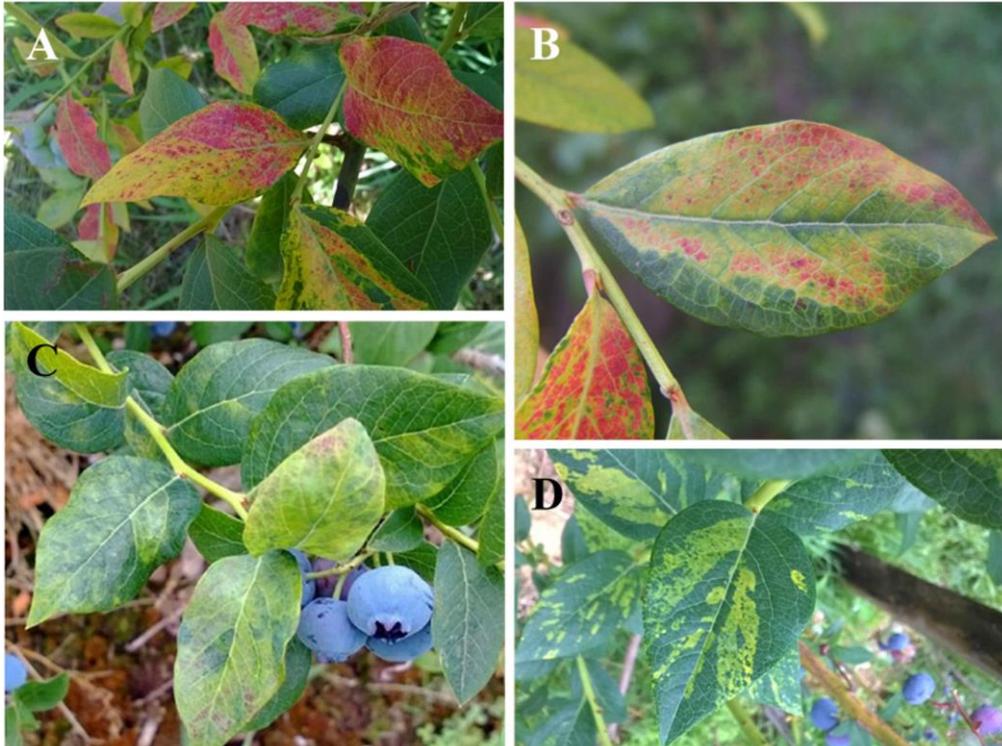


Figura 1. Síntomas de BIMaV. Las plantas afectadas por BIMaV presentan mosaicos amarillos, verdes y rosáceos en las hojas. Tomado de: A), B) y D) EPPO, 2021. C) Thekke-Veetil et al., 2014

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

Al tratarse de virus de RNA de cadena negativa, el diagnóstico molecular de BIMaV se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a la Transcripción Reversa (RT-PCR). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones específicas del genoma viral a partir de una copia de cDNA (DNA complementario) obtenida por retrotranscripción del RNA, la cual se amplifica mediante PCR.

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 ácidos nucleicos se realiza a partir de las nervaduras centrales de hojas.

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 calidad necesaria para llevar a cabo la amplificación por PCR. 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. 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.

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

RT-PCR punto final en un paso

El ensayo de gen endógeno consiste en la amplificación, mediante RT-PCR, de un fragmento del gen *ARNm* de la *NADH deshidrogenasa Subunidad ND-5*, como un método de control interno para conocer la calidad del RNA extraído de una planta, permitiendo descartar falsos negativos debido a la presencia de inhibidores en la muestra. La prueba se realiza con los *primers* propuestos por Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002) (Cuadro 1), los cuales dirigen la síntesis específica.

Cuadro 1. *Primers* utilizados para la detección del Gen endógeno *NAD5* mediante RT-PCR. Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002)

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5´- 3´)	Tamaño del amplicón	Ensayo
<i>NAD5-F</i>	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	181 pb	Gen Endógeno
<i>NAD5-R</i>	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA		

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

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la RT-PCR punto final del Gen endógeno *NAD5*

Reactivos	Concentración	Concentración	Volumen 1X
	Inicial	final	(μ L)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
DTT	100 mM	10 mM	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.25
dNTP's	10 mM	0.25 mM	0.625
<i>NAD5</i> -F	10 μ M	0.4 μ M	1.0
<i>NAD5</i> -R	10 μ M	0.4 μ M	1.0
Inhibidor de RNA	40 U/ μ L	20 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/ μ L	100 U/Rnx	0.5
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/ μ L	2.5 U/Rnx	0.5
RNA	100-25ng/ μ L	4-1 ng/ μ L	1.0
Agua ° PCR	---	---	13.625
Volumen final			25

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

Cuadro 3. Programa de termociclaje para la detección del Gen endógeno *NAD5*

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Retrotranscripción	50 °C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	40
Alineamiento	55 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1

Ensayo para la detección específica de BIMaV

Reacción de RT-PCR en dos pasos

La detección de BIMaV se realiza a partir de los pares de *primers* propuestos por Isogai *et al.* (2016) (Cuadro 4), los cuales amplifican un fragmento de 350 pb de la región que codifica para la proteína de la nucleocápside. La síntesis de cDNA se lleva acabo con ayuda del *Random Primer 6* (Cuadro 5 y 6). La mezcla de reacción y temperaturas de termociclaje para la amplificación por PCR se muestran en los Cuadros 7 y 8.

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de BIMaV. Isogai et al. (2016)

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
BIMaV-F	5'- CAAGCGGAAACACAAGGAAA - 3'	350 pb
BIMaV-R	5'- GCCCTGTCAATTCAGTGTTAA - 3'	

Síntesis de cDNA

1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el siguiente Cuadro 5:

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
<i>Buffer</i> 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
<i>Random Primer</i> 6	10 µM	0.2 µM	0.5
Inhibidor de RNA	40 U/µL	1 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	50 U/Rnx	0.25
RNA	100-25 ng/ µL	25 - 6.25 ng/ µL	5.0
Agua ° PCR	---	---	7.75
Volumen final			20

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 6):

Cuadro 6. Programa de térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	60 minutos	1
99 °C	5 minutos	1

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

PCR punto final

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la detección de BIMaV

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> de PCR	10 x	1 x	2.5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.5
BIMaV-F	10 µM	0.2 µM	1.0
BIMaV-R	10 µM	0.2 µM	1.0
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/µL	1 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua grado PCR	---	---	18
Volumen total			25

Cuadro 8. Condiciones de termociclaje para la detección de BIMaV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	40 segundos	30
Alineamiento	56 °C	40 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	7 minutos	1
Pausa	12°C	∞	

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 asegurando la separación adecuada del marcador de peso 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 permita visualizar exitosamente los amplicones.

Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de RT-PCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo (CP): provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede emplearse: 1) RNA genómico, debe ser integrado desde

la síntesis de cDNA, 2) el fragmento clonado del amplicón, debe ser integrado a partir de la PCR; deberán estar confirmados mediante secuenciación antes de su uso.

Control negativo de matriz (CNM): este control corresponde a ácido nucleico extraído de matriz libre del virus (tejido del hospedante). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos (CNR): es la mezcla de reacción sin molde. Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

Interpretación de resultados de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo del control endógeno *NAD5*, el control positivo y cada una de las muestras debe generar un fragmento de 181 pb. El control negativo de reactivos no debe presentar ningún amplicón (Figura 2).
- En el ensayo para la detección de BIMaV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar ningún amplicón con los *primers* específicos. El control positivo debe mostrar un fragmento de 350 pb, aproximadamente (Isogai *et al.*, 2016).

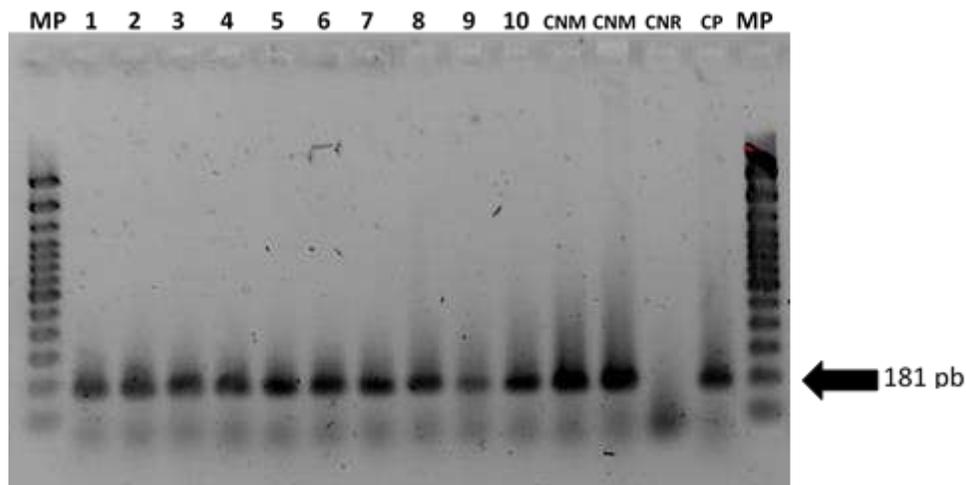


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas a BIMaV aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 350 pb con los *primers* específicos BIMaV-F/BIMaV-R.

El resultado es negativo si hay amplificación del gen endógeno, pero no del fragmento correspondiente a BIMaV.

Los resultados positivos deben corroborarse mediante secuenciación, en ambas direcciones (*forward/reverse*), del amplicón obtenido en el ensayo de RT-PCR, siempre y cuando se presente uno de los siguientes casos:

- No se cuente con control positivo y se deba corroborar la identidad del amplicón obtenido en el peso esperado.
- Primeras detecciones.
- Cuando se necesite un sustento molecular de mayor relevancia para la movilidad del tejido vegetal.

Los datos de secuenciación (electroferogramas y lecturas generadas por el secuenciador) deben enviarse al Laboratorio de Virología del CNRF para su análisis y corroboración.

Nota: este documento describe el procedimiento para la detección de *Blueberry mosaic associated virus* (BIMaV), mediante RT-PCR, asegura su aplicación siempre y cuando los ítems extraídos cumplan exitosamente con la prueba del gen endógeno.

REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de BIMaV conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad. Una vez concluido el diagnóstico, considerar lo siguiente:

Muestras positivas: Almacenar el tejido vegetal a -20 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de tres meses, en caso de requerirse una corroboración. Después de este tiempo, esterilizar el material en autoclave a 15 psi por 20 minutos antes de desechar.

Muestras negativas: Almacenar el tejido vegetal a 4 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de un mes, en caso de requerirse una corroboración. Después de este tiempo, esterilizar el material en autoclave a 15 psi por 20 minutos antes de desechar.

REFERENCIAS

- Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2021). EPPO Global Database. *Blueberry Mosaic associated ophiovirus* (GLMAV). Consultado el 23 de abril de 2021 en <https://gd.eppo.int/taxon/BLMAVO>
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2021). ICTV Taxonomy. Consultado el 23 de abril de 2021 en <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Isogai, M., Matsuhashi, Y., Suzuki, K., Yashima, S., Watranabe, M. and Yoshikawa, N. (2016). Occurrence of *Blueberry mosaic associated virus* in highbush blueberry trees with blueberry mosaic disease in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 82: 177-179. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0653-z>
- Martin, R.R., Polashock, J.J. and Tzanetakis, I.E. (2012). New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses* 4 (11): 2831-2852. DOI [10.3390/v4112831](https://doi.org/10.3390/v4112831)
- Martin, R.R. and Tzanetakis, I.E. (2018). High risk blueberry viruses by region in North America; implications for certification, nurseries and fruit production. *Viruses* 10 (7): 342. DOI: [10.3390/v10070342](https://doi.org/10.3390/v10070342)
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99:81-92
- Ramsdell, D.C. and Stretch, A.W. (1987) Blueberry mosaic. En: Converse, R.H. (1987) *Virus diseases of small fruit*. US Department of Agriculture, Washington. pp 119-120
- Shands, A.C., Crandall, S.G. and Miles, T.D. (2017). First report of the ability of *Olpidium virulentus* to vector *Blueberry Mosaic associated virus* (BIMaV) on southern highbush blueberry in California. *Plant Disease* 101(9): 1683. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0201-PDN>
- Thekke-Veetil, T., Ho, T., Keller, K.E., Martin, R.R. and Tzanetakis, I.E. (2014). A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease. *Virus Research* 189: 92-96. DOI [10.1016/j.virusres.2014.05.019](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.019)
- Thekke-Veetil, T., Polashock, J.J., Marn, M.V., Plesko, I.M., Schilder, A.C., Keller, K.E., Marin, R.R. and Tzanetakis, I.E. (2015). Population structure of *Blueberry mosaic virus*: evidence of reassortment in geographically distinct isolates. *Virus Research* 201: 79-84. DOI: [10.1016/j.virusres.2015.02.022](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.022)
- Zamboni, A., Pierantoni L. and De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other Woody-plants. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 1; 122-125.

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de BIMaV 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. 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de: *Blueberry mosaic associated virus* (BIMaV). Tecámac, México: Autor.

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

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa del Departamento de Fitopatología	Revisó
M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna Coordinadora del Laboratorio de Virología	Revisó
M. en C. Liliana Elizabeth Ronces Frutos Técnico del Laboratorio de Virología	Elaboró

CONTACTO

lab.virologia@senasica.gob.mx

Teléfono y extensión (55) 59051000 ext. 51378, 51379, 51414

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- 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



“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”