

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry leaf mottle virus (BLMoV)



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: "Síntomas en plantas de arándano infectados con BLMoV" (Martin *et al.*, 2012)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Acrónimo en virus	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS	2
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 BLMoV	5
Reacción de RT-PCR en dos pasos	5
PCR punto final	6
Electroforesis.....	6
Controles para las pruebas moleculares.....	6
Interpretación de resultados	7
REGISTROS	9
REFERENCIAS	9
AVISO.....	10

Blueberry leaf mottle virus (BLMoV)

GENERALIDADES

El virus del moteado de la hoja del arándano (BLMoV), está conformado por partículas pseudo icosaédricas de 28 a 30 nm de diámetro, con un genoma de ARN monocatenario bipartito de sentido positivo (Kwak *et al.*, 2016; ViralZone, 2021). Posee ARN-1 y ARN-2 que se traducen en dos poliproteínas, el ARN-1 codifica las proteínas necesarias para la replicación, mientras que el ARN-2 codifica la proteína de la cápside y proteínas de movimiento (ViralZone, 2021). El BLMoV se transmite por semillas y polen infectado. Aunque es un Nepovirus, no se ha reportado algún nematodo como vector (Martin *et al.*, 2012).

Este virus se describió por primera vez en arándanos de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum*) en Estados Unidos (Kwak *et al.*, 2016), siendo este su principal hospedante. También se ha detectado en diferentes variedades e híbridos de tipos de arándanos. Otros hospedantes son las vides americanas (*Vitis labrusca*) y vides búlgaras (*Vitis vinifera*) (Kwak *et al.*, 2016; EPPO y CABI).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry leaf mottle virus

Acrónimo en virus

BLMoV

Nombres comunes

Virus del moteado de la hoja del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales* Familia: *Secoviridae*, Género: *Nepovirus*,
Especie: *Blueberry leaf mottle virus*

(ICTV, 2020)

SÍNTOMAS

Las plantas de arándano infectadas con BLMoV se tornan atrofiadas con arrosetamiento, presentan hojas pequeñas de color verde pálido, deformadas y moteadas (Figura 1A y B) (EPPO y CABI). Las plantas afectadas desarrollan muerte regresiva del tallo y se atrofian. Los síntomas se presentan en distribución asimétrica y su intensidad depende de la variedad de arándano (Martin *et al.*, 2012). En la vid el virus causa retraso en la brotación, alargamiento irregular de frutos, follaje verde pálido y racimos de frutos desordenados (Kwak *et al.*, 2016).

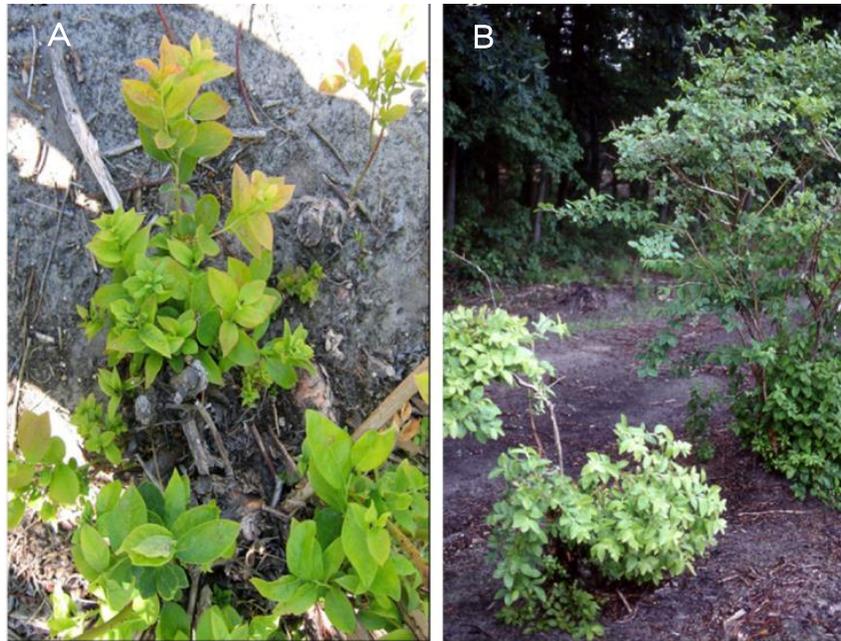


Figura 1. Síntomas en plantas de arándano infectados con BLMoV. (A) Hojas pequeñas color verde pálido, estrechas y en roseta. (B) Planta de arándano infectado (a la izquierda) (Martin *et al.*, 2012)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

El diagnóstico de BLMoV puede realizarse mediante RT-PCR, la cual usa *primers* específicos. La técnica usa una cadena de RNA como molde y con la acción de una enzima retrotranscriptasa se obtiene el cDNA, posteriormente éste se amplifica por PCR tradicional.

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 tejido de hojas, yemas o brotes.

- Hoja: tomar secciones del tejido de parénquima (limbo foliar) (0.5-1.0 cm de ancho x 1.0 cm de largo).
- Flores: tomar botones florales.
- 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 $A_{260}/280$ y $A_{260}/230$, 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

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 Inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
<i>Buffer</i> 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-F</i>	10 µM	0.4 µM	1.0
<i>NAD5-R</i>	10 µM	0.4 µM	1.0
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	100 U/Rnx	0.5
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/µL	2.5 U/Rnx	0.5
RNA	100-25 ng/µL	4-1 ng/µL	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 BLMoV

Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus BLMoV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, para la síntesis del cDNA se emplea Oligo dT, para la PCR se utilizarán los *primers* (BLMoV F / BLMoV R) diseñados por Kwak *et al.*, 2016 (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de BLMoV mediante RT-PCR. Kwak *et al.* (2016)

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5´ - 3´)	Tamaño del amplicón	Ensayo
BLMoV F	AGGTTAGTTGTGCTGATTTGC	500 pb	BLMoV
BLMoV R	GACGCTTCTCCACTGAGACA		

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

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para BLMoV

Reactivos	Concentración		Volumen 1X (µL)
	Inicial	final	
<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
Oligo dT	50 µM	2.5 µM	1
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	50 U/Rnx	0.25
RNA	100 ng/µL	25 ng/µL	5.0
Agua ° PCR	---	---	7.25
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	30 minutos	1
99 °C	5 minutos	1
5 °C	5 minutos	1

PCR punto final

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

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la PCR punto final para BLMoV

Reactivos	Concentración	Concentración	Volumen 1X
	Inicial	final	(μ L)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
BLMoV F	10 μ M	0.4 μ M	1.0
BLMoV R	10 μ M	0.4 μ M	1.0
Taq polimerasa	5 U/ μ L	1.25 U/Rnx	0.25
cDNA	---	---	5
Agua ° PCR	---	---	14
Volumen final			25

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

Cuadro 8. Programa de termociclaje para la detección de BLMoV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	35
Alineamiento	61 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	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 peso molecular. Para observar los fragmentos amplificados, teñir el gel con una solución de 1 μ g/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, 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 sin el 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 (ácido nucleico). Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

Interpretación de resultados

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 BLMoV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 500 pb, aproximadamente (Figura 3).

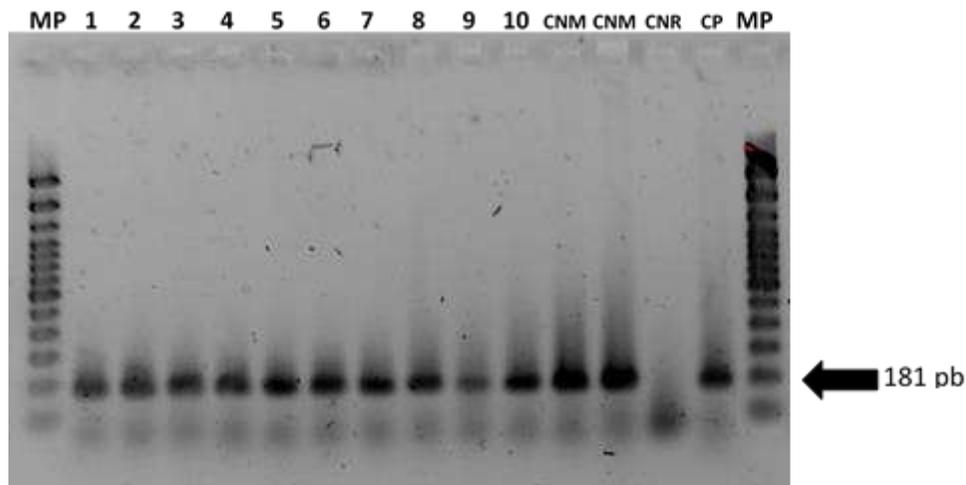


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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

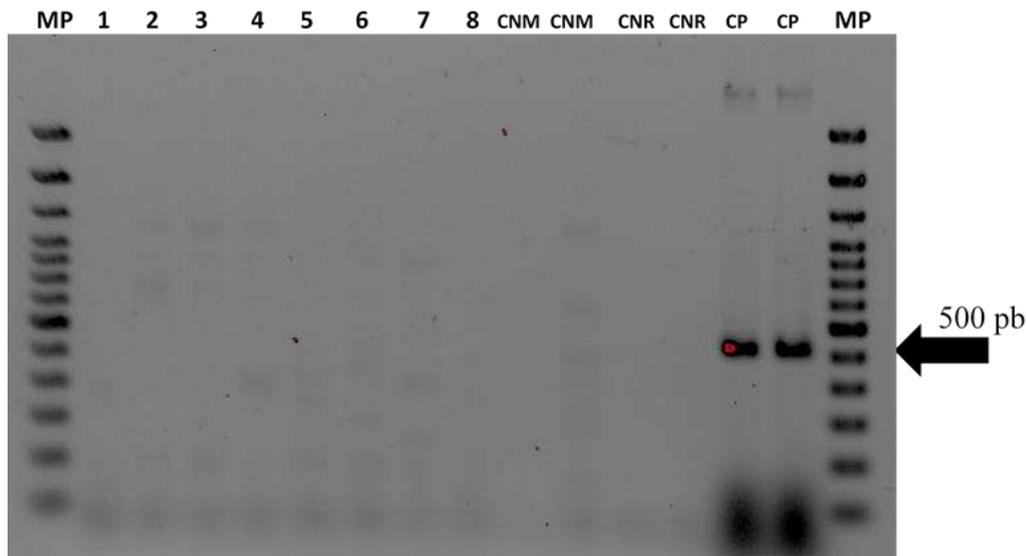


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo de BLMoV. El control positivo presenta un fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondientes al amplicón positivo a BLMoV. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-8: muestras problema; CP: control positivo; CNM: control negativo matriz; CNR: control negativo de reactivos

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 500 pb con los primers específicos BLMoV F/ BLMoV R.

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

Los resultados deben corroborarse mediante secuenciación en ambas direcciones (forward/reverse) del amplicón obtenido en el ensayo de RT-PCR cada que se presenten los siguientes casos:

- No se cuente con control positivo y se deba corroborar la identidad del amplicon 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 corroboración.

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

REGISTROS

Mantener los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de BLMoV, 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). (2020). Disponible en línea con actualizaciones en <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (consultado el 04/05/2021).

Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15

EPPO and CABI. Data Sheets on Quarantine Pests. Blueberry leaf mottle nepovirus. Disponible en línea: https://gd.eppo.int/download/doc/35_datasheet_BLMOVO.pdf.

Kwak, H.R., Yoon, J.S., Shin, J.C., Seo, J.K., Kim, M., Lee, J.K., Lee, K.S., Kim, C.S., Choi, H.S. and Kim, J.S. 2016. First report of *Blueberry leaf mottle virus* on Grapevine in Korea. Plant Disease, 100: 232.

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

ViralZone. 2021. ViralZone SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Nepovirus. <https://viralzone.expasy.org/>

Zamboni A, Pierantoni L, and De Franceschi P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several others woody-plants. iForest 1:122-125

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de SLRSV, 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 leaf mottle virus* (BLMoV). 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 y elaboró
Dra. Olivia Nabor Romero 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”