

# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

*Blueberry scorch virus (BIScV)*



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: Enrojecimiento de la hoja en arándanos (Bristow *et al.*, 2000).

# ÍNDICE

**Pág.**

GENERALIDADES .....	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Nombres comunes:.....	1
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
RT-PCR punto final en un paso .....	5
Ensayo para la detección de B1ScV .....	6
Síntesis de cDNA.....	7
PCR punto final .....	7
Electroforesis.....	8
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados.....	9
Identificación de plaga .....	10
REFERENCIAS .....	11
AVISO.....	12



# Blueberry scorch virus (BIScV)

## GENERALIDADES

El BIScV es un virus de RNA de sentido positivo (ssRNA(+)) de una sola hebra, pertenece al género *Carlavirus* y familia Flexiviridae, los viriones son varillas flexibles de 690 nm de largo y 14 nm de ancho (Schilder *et al.*, 2021).

El virus asociado a la quemadura del arándano se describió inicialmente en plantas de arándano en Nueva Jersey en 1970 como "enfermedad de Sheep Pen Hill", pero no se identificó como una enfermedad viral hasta 1980 a partir de estudios sobre plantas infectadas en el oeste de Oregón y Washington (Bristow *et al.*, 2000). Catlin and Schloemann, 2004, reportan al virus como un virus problemático para los productores en Nueva Jersey, Oregón, Washington y Columbia Británica. Se han informado pérdidas de rendimiento de hasta el 80 % (Schilder *et al.*, 2021).

El BIScV puede haber evolucionado en huéspedes nativos ya que se reportan cepas en material de siembra (Bristow *et al.*, 2000).

El virus se transmite por áfidos, principalmente *Ericaphis fimbriata* e *Illinoia pepperi* de manera no persistente, recogen partículas de virus en sus partes bucales y pueden transmitirlos durante unos 15 minutos, la transmisión puede ocurrir entre principios de mayo y agosto, una vez que una planta está infectada, los síntomas pueden tardar de 1 a 3 años o más en desarrollarse, esto hace que la detección temprana sea vital para controlar la enfermedad (Bristow *et al.*, 2000; Catlin and Schloemann., 2004; Schilder *et al.*, 2021).

BIScV también se transmite por injerto y mecánicamente a especies vegetales como: *Nicotiana occidentalis*, *Solanum tuberosum*, *Gomphrena globosa*, *Lyonia mariana* y especies de *Chenopodium*. Los numerosos cultivares tolerantes y otros huéspedes asintomáticos pueden funcionar como reservorios del virus (Bristow *et al.*, 2000).

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Dominio: Riboviria, Orden: Tymovirales, Familia: Betaflexiviridae, Subfamilia: Quinvirinae, Género: Carlavirus, Especie: *Blueberry scorch virus* (ICTV, 2021)

### Nombres comunes:

Virus de la quemadura del arándano

## **Sinónimos:**

Virus de la quemadura del arándano (español), vírus do escaldão do mirtilo (portugués)

**Acrónimo en virus:** BIScV

## **SÍNTOMAS**

Los síntomas depende del cultivar y el virus. En la mayoría de los cultivares, la infección causa el marchitamiento de flores, hojas y tizón de los brotes durante el período de floración. Los síntomas pueden estar presentes en algunas ramas o en todo el arbusto. Los tejidos contaminados a menudo permanecen adheridos durante mucho tiempo y se vuelven de un gris plateado si se retienen durante el invierno (Kalinowska *et al.*, 2013). El tizón puede parecerse a una lesión por helada, algunos cultivares muestran síntomas leves como clorosis, márgenes amarillos o patrones de líneas rojas en las hojas en el otoño. Otros permanecen asintomáticos, pero aún pueden servir como reservorios de virus. Las plantas con síntomas de necrosis reducen considerablemente la producción de frutos y el crecimiento de brotes. Los síntomas reaparecen todos los años, generalmente comienza en una o dos ramas pero finalmente se infecta toda la planta en 1 a 3 años y pueden morir después de 3 a 6 años. No se produce una pérdida de rendimiento observable en plantas infectadas asintomáticas (Schilder *et al.*, 2021).

Las plantas infectadas repiten este ciclo de síntomas cada primavera. Los cultivares tolerantes pueden mostrar algo de color amarillento en los márgenes de las hojas, pero no se marchitan las flores u hojas (Bristow *et al.*, 2000).

Los cultivares Olympia y Stanley presentan necrosis foliar marginal, 'Bluecrop', desarrollan tizón de la flor y clorosis marginal de las hojas, mientras que el cultivar Jersey es el único que permanece asintomático (Catlin and Schloemann, 2004).

El arándano (*V. macrocarpon* L.) y el arándano negro silvestre (*V. membranaceum* L.) se reportan como hospedantes naturales y asintomáticos de BIScV. Los arbustos de saúco infectados cerca de las plantaciones de arándanos altos pueden jugar un papel importante en la propagación del virus (Martin *et al.* 2012; Schilder *et al.*, 2021).



**Figura 1.** Síntomas de causados por BISCv en arándano. A) Márgenes amarillos en hojas de arándanos 'Stanley', B) Clorosis marginal, C) Patrón de líneas rojas durante el otoño, D) Enrojecimiento de la hoja en arándanos 'Concordia', E) Tizón de las flores, necrosis y retención de flores, F) Enrojecimiento de la hoja en arándanos 'Concordia'. Tomado de Martin y Bristow, 1988. Catlin and Schloemann, 2004; Bristow *et al.*, 2000.

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Técnicas moleculares

Debido a que BISCv es un virus de ssRNA 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 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
<i>NAD5-R</i>	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA		Endógeno

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 (µL)
	Inicial	final	
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
DTT	100 mM	10 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	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
Taq polimerasa	5 U/µL	2.5 U/Rnx	0.5
RNA	100-25ng/µL	4-1 ng/µL	1.0
Agua ° PCR	---	---	13.625
Volumen final			<b>25</b>

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 de BScV

Para la detección del virus BScV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, para la síntesis del cDNA se emplea *Random Primer 6*, para la PCR se utilizarán los *primers* (BScV-1F / BScV- 1R) diseñados por Wegener *et al.*, 2006 (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** *Primers* utilizados para la detección de BScV mediante RT-PCR. Wegener *et al.*, 2006

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Ensayo
BScV - 1F	5'-CAGTTATGCCTCCGAAAG-3'	928 pb	BNRBV
BScV - 1R	5'-CCCGCATTTCGATGATTGCG-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		Volumen 1X ( $\mu$ L)
	Inicial	final	
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5.0 mM	2.0
dNTP's	10 mM	1.0 mM	2.0
<i>Random Primer 6</i>	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.5
Inhibidor de RNA	40 U/ $\mu$ L	1 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/ $\mu$ L	50 U/Rnx	0.25
RNA	100-25 ng/ $\mu$ L	25 - 6.25 ng/ $\mu$ L	5.0
Agua ° PCR	---	---	7.75
Volumen final			<b>20</b>

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

**Cuadro 6.** Programa térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	30 minutos	1
99 °C	5 minutos	1

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

## PCR punto final

- 1) Preparar la reacción de PCR de acuerdo a lo señalado en el Cuadro 7:

**Cuadro 7.** Mezcla de reacción para la PCR punto final para B1ScV

Reactivos	Concentración		Volumen 1X ( $\mu$ L)
	Inicial	final	
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
B1ScV - 1F	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0
B1ScV - 1R	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ L	1.25 U/Rnx	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua ° PCR	---	---	18
Volumen final			25

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

**Cuadro 8.** Programa de termociclaje para la detección de B1ScV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	1 minuto	35
Alineamiento	50 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	2 minutos	
Extensión final	72 °C	10 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  $\mu$ 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 esta ficha técnica, 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.

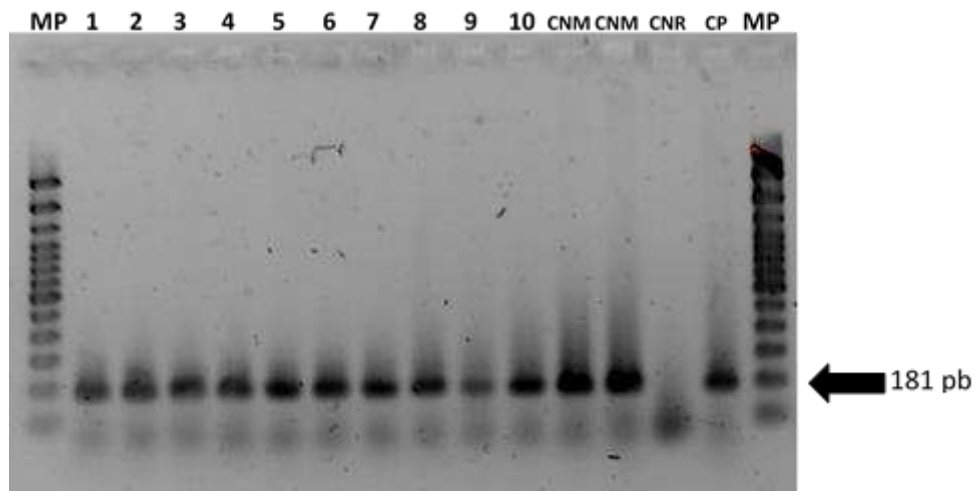
**Control negativo de matriz (CNM):** este control corresponde a ácido nucleico extraído de matriz sin el virus (tejido del hospedante). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**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 B1ScV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar bandas. El control positivo debe mostrar una banda de 928 pb, aproximadamente.



**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 de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 928 pb con los *primers* específicos B1ScV-F/ B1ScV-R.

El resultado es negativo si hay amplificación del control endógeno pero no del fragmento correspondiente a B1ScV.

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 scorch virus* (B1ScV), 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 B1ScV, 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

- Bristow, PR, Martin, RR y Windom, GE 2000. Transmisión, propagación en el campo, respuesta de la variedad e impacto en el rendimiento en arándanos de arbusto alto infectados con el virus de la quemadura de arándanos. *Fitopatología* 90: 474-479.
- Catlin N. J. and Schloemann S.G. 2004. Blueberry Scorch Virus (BIScV). Department of Plant and Soil Sciences. University of Massachusetts .F-129
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). (2021). 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
- Martin R. R., Punja ZK, and Wegener LA. 2012. Primer informe del virus de la quemadura del arándano en Black Huckleberry en la Columbia Británica. *Plant Dis.* 91 (3): 328. doi: 10.1094 / PDIS-91-3-0328C.PMID: 30780587
- Martin, R.R. and Bristow, P.R. 1988. A carlavirus associated with blueberry scorch disease. *Phytopathology* 78:1636-1640.
- Menzel, W; Jelkmann, W; Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RTPCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81-92.
- Kalinowska E., Paduch-Cichal E, Chodorska, M. 2013. Primer informe del virus de la quemadura del arándano en el saúco en Polonia. 97 (11): 1515. doi: 10.1094 / PDIS-03-13-0277-PDN. PMID: 30708456. DOI: [10.1094 / PDIS-03-13-0277-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0277-PDN)
- Schilder A., Martin R., Oudemans P., Polashock J., Sabaratnam S., Ring S., Pscheidt J. 2021. Protección de Cultivos y Manejo de Plagas (2018-70006-28884) del Instituto Nacional de Alimentos y Agricultura del USDA. Consultado 05/06/2021. <https://www.ncipmc.org/projects/pest-alerts1/blueberry-scorch-virus-vaccinium-corymbosum/>
- Wegener, L., MacDonald, L., Sweeney, M., Martin, R.R., and Punja, Z.K. 2003. Epidemiology and strain identification of blueberry scorch virus in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25:114.

## AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de BScV, 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 scorch virus* (BScV). Tecámac, México: Autor.

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

Dr. Ángel Ramírez Suárez <b>Subdirector Técnico</b>	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández <b>Jefa del Departamento de Fitopatología</b>	Revisó
M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna <b>Coordinadora del Laboratorio de Virología</b>	Revisó y elaboró
Dra. Leticia Robles Yerena <b>Técnico del Laboratorio de Virología</b>	Elaboró

### CONTACTO

[lab.virologia@senasica.gob.mx](mailto:lab.virologia@senasica.gob.mx)

Teléfono y extensión (01 (52) 55 5905 1000, 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](http://gob.mx/agricultura)

[gob.mx/senasica](http://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”