

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry shock virus (BIShV)



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 BISHV" (Thomas-Sharma *et al.*, 2018)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Acrónimo en virus	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS	2
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	3
Técnicas moleculares.....	3
Toma de muestra y Extracción de RNA.....	3
Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría.....	3
Ensayo de Gen Endógeno	4
RT-PCR punto final en un paso	4
Ensayo para la detección específica de B1ShV.....	5
Reacción de RT-PCR en dos pasos	5
Síntesis de cDNA	5
PCR punto final	6
Electroforesis.....	7
Controles para las pruebas moleculares.....	7
Interpretación de resultados	7
Identificación del patógeno	8
REGISTROS	9
REFERENCIAS	10
AVISO.....	11

Blueberry shock virus (BIShV)

GENERALIDADES

El BIShV está conformado por partículas cuasi-esféricas, de aproximadamente 29 nm de diámetro, compuesta por 180 proteínas de cubierta, con un genoma tripartito de ARN monocatenario de sentido positivo (ssRNA+) (Thomas-Sharma *et al.*, 2018; ViralZone, 2021). El virus se detectó por primera vez en arándanos en la región del noroeste del Pacífico de los Estados Unidos, sitio en donde actualmente se encuentra muy distribuido (Martin y Tzanetakis, 2018), además se ha detectado en otras regiones productoras en EUA y Canadá (Thomas-Sharma *et al.*, 2018).

El BIShV se transmite a través del polen de arándano infectado (Martin *et al.*, 2012; Thomas-Sharma *et al.*, 2018; Mustapha, 2020). La infección del arándano se produce específicamente durante la floración, con la ayuda de las abejas y otros polinizadores que transfieren polen de plantas infectadas a flores de plantas sanas (Thomas-Sharma *et al.*, 2018). Se considera que el BIShV tiene un rango limitado de hospedantes, dado que no se ha detectado en la vegetación nativa que rodea los campos de arándanos, ni en las malezas de los campos infectados. Pruebas de transmisión mecánica mostraron que en algunas variedades de tabaco causa síntomas similares a manchas anulares (MacDonald *et al.* 1991).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry shock virus

Acrónimo en virus

BIShV

Nombres comunes

Virus del choque del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Martellivirales* Familia: *Bromoviridae*, Género: *Ilarvirus*, Especie: *Blueberry shock virus*

(ICTV, 2020)

SÍNTOMAS

Las plantas de arándano, suelen desarrollar síntomas de 1 a 2 años después de la infección con BISHV comenzando en una o dos ramas. Eventualmente, todas las partes de la planta se infectan (Figura 1E), incluidas las raíces. Las plantas enfermas muestran síntomas durante 1 a 4 años, luego se recuperan y permanecen asintomáticas incluso pueden producir frutos de buena calidad, pero continúan como reservorios, dado que su polen transportará el virus a las plantas no infectadas (Schilder, 2019; Mustapha, 2020). Los síntomas asociados con BISHV en el arándano incluyen tizón de las hojas (Figura 1C), muerte súbita de flores (Figura 1B) y brotes jóvenes, madurez prematura de las bayas (Figura 1A) (Retamales y Hancock, 2018; Thomas-Sharma *et al.*, 2018; Schilder, 2019). Los tejidos afectados generalmente se caen, la planta produce nuevos brotes y parecerán recuperarse, pero no producirán frutos. Un año después de los síntomas iniciales, la planta puede mostrar manchas rojas en las hojas (Figura 1D) (Schilder, 2019).

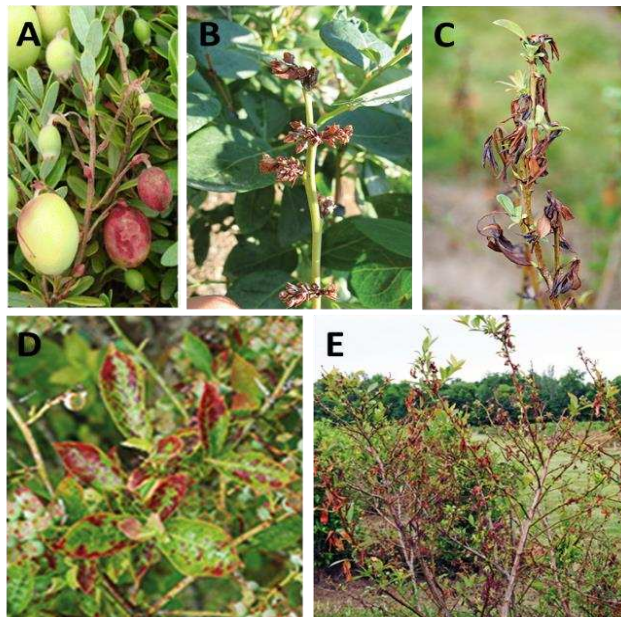


Figura 1. Síntomas en plantas de arándano infectados con BISHV. (A) Bayas sintomáticas con madurez prematura. (B) Muerte súbita de racimos de flores. (C) Tizón de hojas en planta infectada. (D) Manchas rojas en las hojas de arándano. (E) Planta de arándano infectado (Thomas-Sharma *et al.*, 2018; Schilder, 2019)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

La técnica para el diagnóstico de BShV es: RT-PCR, conocidas como Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa, 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, flores, 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 los estambres completos o 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 BISHV

Reacción de RT-PCR en dos pasos

La detección del virus BISHV se realiza mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, la síntesis de cDNA se lleva a cabo con ayuda del *Random Primer 6* y en la PCR se utilizarán los *primers* (BISHV- F/ BISHV- R) diseñados por Sharma *et al.* (2018). Los cuales se hibridan a una región del RNA que codifican para el gen de la cápside (Cuadro 4).

<i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Ensayo
BISHV- F	TATCCGGCAGTCCGATAAC	993pb	BISHV
BISHV- R	TCGGGGCATCTAATTCCTC		

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

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	60 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 BISHV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μ L)
<i>Buffer</i> 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
BISHV- F	10 μ M	0.4 μ M	1.0
BISHV- R	10 μ M	0.4 μ M	1.0
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/ μ 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 BISHV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	40
Alineamiento	55 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 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 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, 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 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. 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 BISHV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 993 pb, aproximadamente (Sharma *et al.*, 2018).

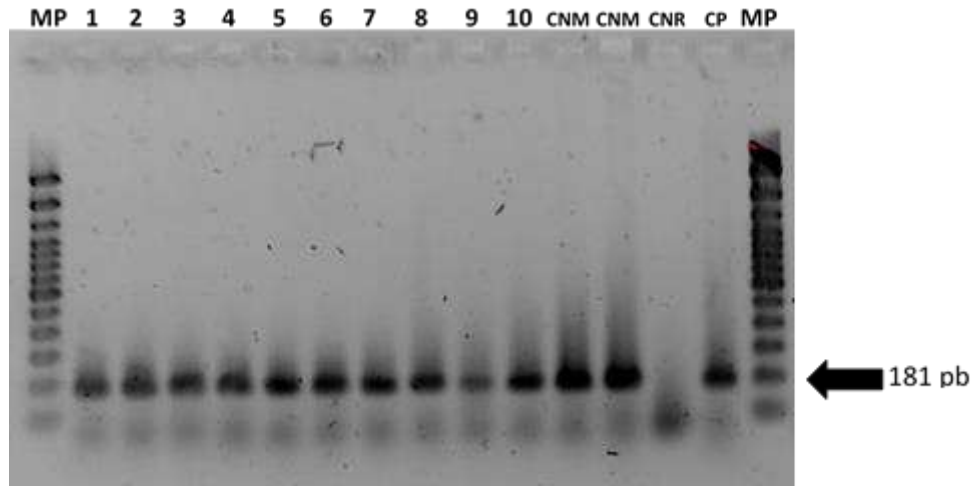


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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


Identificación del patógeno

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 993pb con los *primers* específicos (BISHV- F/ BISHV- R).

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

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 shock virus* (BIShV), 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 BIShV, 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). [En línea]. Disponible en línea con actualizaciones en <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (consultado el 28/04/2021).
- Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15
- MacDonald, S. G., Martin, R. R., and Bristow, P. R. 1991. Characterization of an ilarvirus associated with a necrotic shock reaction in blueberry. *Phytopathology* 81:210-214. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-210>
- 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
- 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
- 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
- Mustapha E. M. 2020. Emerging and reemerging viral pathogens. Volume 1: Fundamental and basic virology aspects of human, animal and plant pathogens. Academic Press, Elsevier. United Kingdom. 1126p.
- Retamales J. B and Hancock J. F. 2018. Blueberries. *Crop production science in horticulture*. CABI 2ª edición. Boston, MA. 413p.
- Schilder A. 2019. Blueberry shock virus. USDA, NIFA Integrated Pest Management Program, the North Central IPM Center and the Land Grant Universities. Disponible en línea en: <https://www.ncipmc.org/projects/pest-alerts1/blueberry-shock-virus-bromoviridae-harvirus/> (consultado el 28/04/2021).
- Thomas-Sharma S, Wells-Hansen L, Page R, Kartanos V, Saalau-Rojas E, Lockhart B. E. L, McManus P. S. 2018. Characterization of Blueberry shock virus, an Emerging ilarvirus in Cranberry. *Plant Disease* 102:91-97. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0551-RE>
- ViralZone. 2021. ViralZone SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Fabavirus. <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 BShV, 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 shock virus* (BShV). 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
Dra. Leticia Robles Yerena 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”