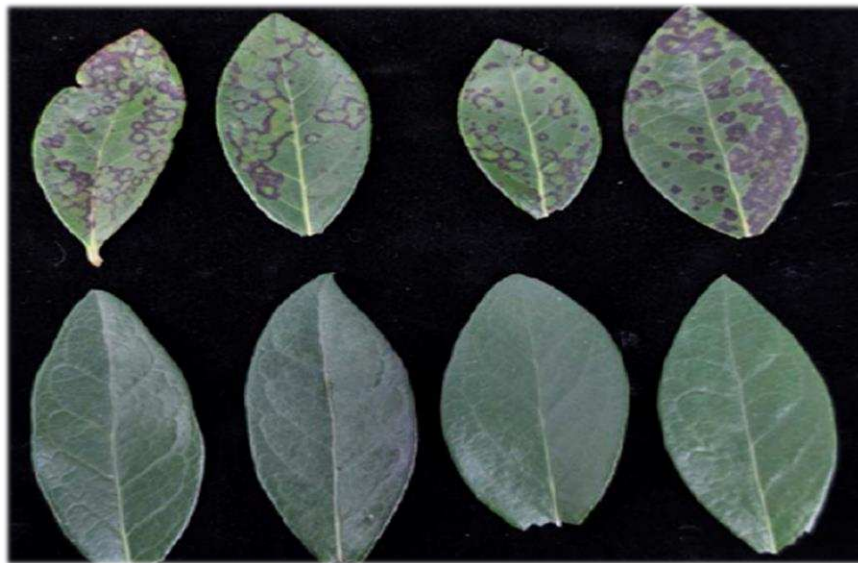


FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV)



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: "Mancha anular necrótica del arándano" 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	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 BNRBV.....	5
Síntesis de cDNA	5
PCR punto final	6
Electroforesis.....	7
Controles para las pruebas moleculares.....	7
Interpretación de resultados	7
REGISTROS	9
REFERENCIAS	9
AVISO.....	10

Blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV)

GENERALIDADES

El virus asociado a la mancha anular necrótica del arándano pertenece al género *Blunervirus*, presenta un genoma RNA monocatenario positivo (ssRNA(+)), el cual contiene tres características que lo distinguen significativamente: (1) la presencia de dos dominios helicasa con diferentes vías evolutivas, (2) la existencia de tres tramos de nucleótidos conservados ubicados en 39 regiones no codificantes de cada segmento del RNA y (3) la conservación de motivos de nucleótidos terminales en cada segmento y tiene un genoma de cuatro partes que carece de una cola poli (A) en todos los segmentos de RNA. La presencia de un segundo dominio de helicasa en el genoma de BNRBV es única (Quito-Avila *et al.*, 2013).

El BNRBV se ha detectado en el sureste de los Estados Unidos de América (Robinson *et al.*, 2016).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry necrotic ring blotch virus

Acrónimo en virus

BNRBV

Nombres comunes

Virus de la mancha anular necrótica del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Order: *Martellivirales*, Familia: *Kitaviridae*, Género: *Blunervirus*,
Especie: *Blueberry necrotic ring blotch virus*

(ICTV, 2021)

SÍNTOMAS

Las plantas infectadas por este virus, muestran anillos de color marrón rojizo a negro o manchas circulares de forma irregular con o sin centros verdes en las superficies superior e inferior de las hojas (Figura 1). En casos graves los síntomas también están acompañados de defoliación prematura (Quito-Avila *et al.*, 2013). Eventualmente, las manchas pueden fusionarse para cubrir toda la hoja, y puede confundirse con los síntomas causados por otros patógenos. Los síntomas son frecuentes en las hojas más viejas de la parte inferior del dosel (Martín *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2016).

La gran variación en la intensidad de la enfermedad observada de un año a otro en las plantaciones de arándanos infectadas sugiere un movimiento sistémico limitado, pero no se ha determinado el grado en que el virus se mueve localmente frente a sistémicamente en las plantas infectadas. La transmisión del BNRBV a través de la propagación vegetativa es mínima (Robinson *et al.*, 2016).

La incidencia de BNRBV puede variar mucho de un año a otro en las plantaciones afectadas. La ausencia de BNRBV detectable en estas plantas sugiere que el virus no persiste después de la abscisión de las hojas en el otoño, lo que indicaría que el virus no infecta las plantas sistémicamente a través del sistema vascular. Por lo tanto, los síntomas en las hojas individuales son el resultado de nuevas infecciones localizadas probablemente asociadas con la alimentación de un vector potencial. Se suele solo detectar en la parte de la hoja que muestra síntomas (Robinson *et al.*, 2016).



Figura 1. Mancha anular necrótica del arándano: Síntomas del virus en el cultivar de arándano 'Star', fila superior, hojas sintomáticas que muestran una gama de anillos y manchas necróticas, fila inferior, hojas sanas (Martín *et al.*, 2012)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

Debido a que BNRBV es un virus de RNA, el diagnóstico molecular se basa en la técnica de 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}/A_{280} y A_{260}/A_{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>	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGT	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 BNRBV

Para la detección del virus BNRBV 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* (BNRBV- F / BNRBV- R) diseñados por Quito-Avila *et al.*, 2013 (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de BNRBV mediante RT-PCR. Quito-Avila *et al.*, 2013

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Ensayo
BNRBV- F	5'-CCAGTTTGGAGGAATTGCAT-3'	432 pb	BNRBV
BNRBV- R	5'- GCGTTTCAGCACCCTAAC-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 (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
<i>Random Primer 6</i>	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 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 detección de BNRBV

Reactivos	Concentración	Concentración	Volumen 1X (µL)
	Inicial	final	
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
BNRBV- F	10 µM	0.4 µM	1.0
BNRBV- R	10 µM	0.4 µM	1.0
Taq polimerasa	5 U/µL	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 BNRBV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 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 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 BNRBV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar bandas. El control positivo debe mostrar una banda de 432 pb.

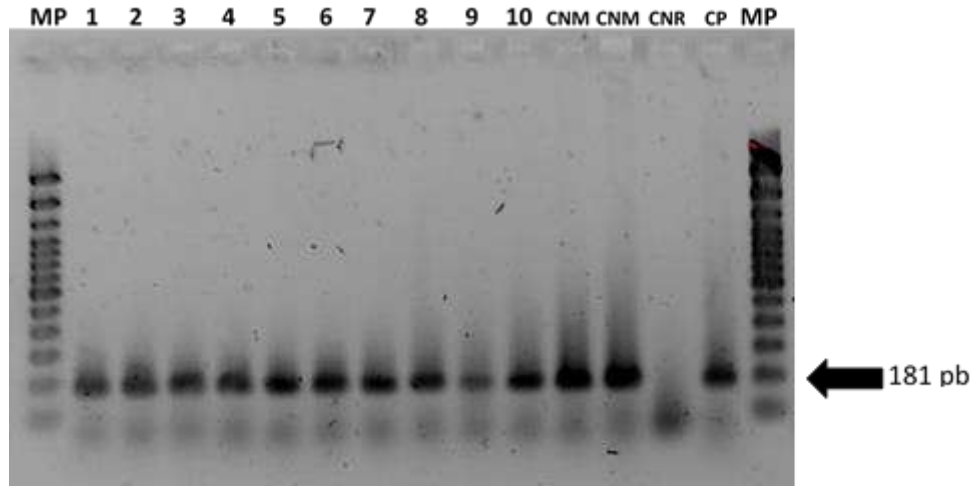


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 432 pb con los *primers* específicos.

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

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 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 corroboración.

Nota: este documento describe el procedimiento para la detección de *Blueberry necrotic ring blotch virus* (BNRBV), 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 BNRBV, 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). (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

Martín R. R., Polashock J. J., Tzanetakis I. E. (2012). New and Emerging Viruses of Blueberry and Cranberry. *Viruses*. 4(11):2831-2852. <https://doi.org/10.3390/v4112831> (Consultado en junio 2021).

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

Quito-Avila, D.F., Brannen, P.M., Cilne, W. O., Harmon, P. F., and Martin R. R. (2013). Genetic characterization of Blueberry necrotic ring blotch virus, a novel RNA virus with unique genetic features. *Journal of General Virology*. 94, 1426-1434 DOI 10.1099/vir.0.050393-01426 050393

Robinson, T. S., Scherm, H., Brannen, P. M. Allen, R. and Deom, C. M. (2016). Blueberry necrotic ring blotch virus in Southern Highbush Blueberry: Insights into In Planta and In-Field Movement. *Department of Plant Pathology, University of Georgia*. 100:1575-1579. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS-09-15-1035-RE> (Consultado en abril de 2021).

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de BNRBV, 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 necrotic ring blotch virus* (BNRBV). 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
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”