

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry red ringspot virus (BRRV)



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: "Severely distorted fruit is rare, so far only seen on "Ozarkblue" infected with BRRV" (Cline, 2008)

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.....	3
RT-PCR punto final en un paso	3
Ensayo para la detección específica de BRRV	5
PCR punto final	5
Electroforesis.....	6
Controles para las pruebas moleculares.....	6
Interpretación de resultados de PCR punto final	6
Identificación del patógeno	7
REGISTROS	8
REFERENCIAS	8
AVISO.....	10

Blueberry red ringspot virus (BRRV)

GENERALIDADES

Blueberry red ringspot virus es un miembro de la familia *Caulimoviridae*. Se trata de un virus circular de DNA de doble cadena (dsDNA) con partículas isométricas de 42 a 46 nm de diámetro, las cuales pueden encontrarse en el núcleo, como partículas individuales, o en el citoplasma incrustadas en cuerpos de inclusión (Glasheen *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2012). Se ha identificado la presencia del virus en Bielorrusia, Canadá, República Checa, Corea del Sur, Eslovenia, Estados Unidos, Japón y Polonia (Saad *et al.*, 2020).

Su rango de hospedantes se limita al cultivo de arándanos (*Vaccinium*), afectando especies como *V. corymbosum*, *V. formosum*, *V. australe* y *V. macrocarpon*. Muchos cultivares de arándanos son sensibles a BRRV, como "Blueray", "Bluetta", "Coville", "Earlyblue", entre otros, mientras que los cultivares "Bluecrop" y "Jersey" parecen ser resistentes a la infección por este virus (Pleško *et al.*, 2010).

BRRV se transmite a través de material propagativo, y puede permanecer latente en plantas asintomáticas por periodos de tiempo prolongados. Se cree que algunos insectos pueden actuar como vectores potenciales (Polashock y Ehlenfeldt, 2009; Saad *et al.*, 2020; Williford, *et al.*, 2016).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry red ringspot virus

Acrónimo en virus

BRRV

Nombres comunes

Cranberry ringspot disease (inglés)

Virus del anillo rojo del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Ortervirales*, Familia: *Caulimoviridae*, Género: *Soymovirus*, Especie: *Blueberry red ringspot virus*

(EPPO, 2021; ICTV, 2021)

SÍNTOMAS

La sintomatología asociada a la presencia de BRRV, se caracteriza por la aparición de pequeñas manchas rojas o manchas en forma de anillos en los tallos verdes (Figura 1C), por lo general, a principios del verano. Conforme avanza la estación, las manchas se presentan en ramas y hojas de las plantas infectadas (Figura 1A y 1B). En las hojas más viejas, las manchas pueden volverse de color marrón rojizo o púrpura, y expandirse hasta cubrir toda la hoja (Glasheen *et al.*, 2002; Polashock y Ehlenfeldt, 2009). En el caso de los frutos, se observan manchas circulares rojas o de color claro, deformación y crecimiento retardado (Figura 1D) (Isogai *et al.*, 2009).

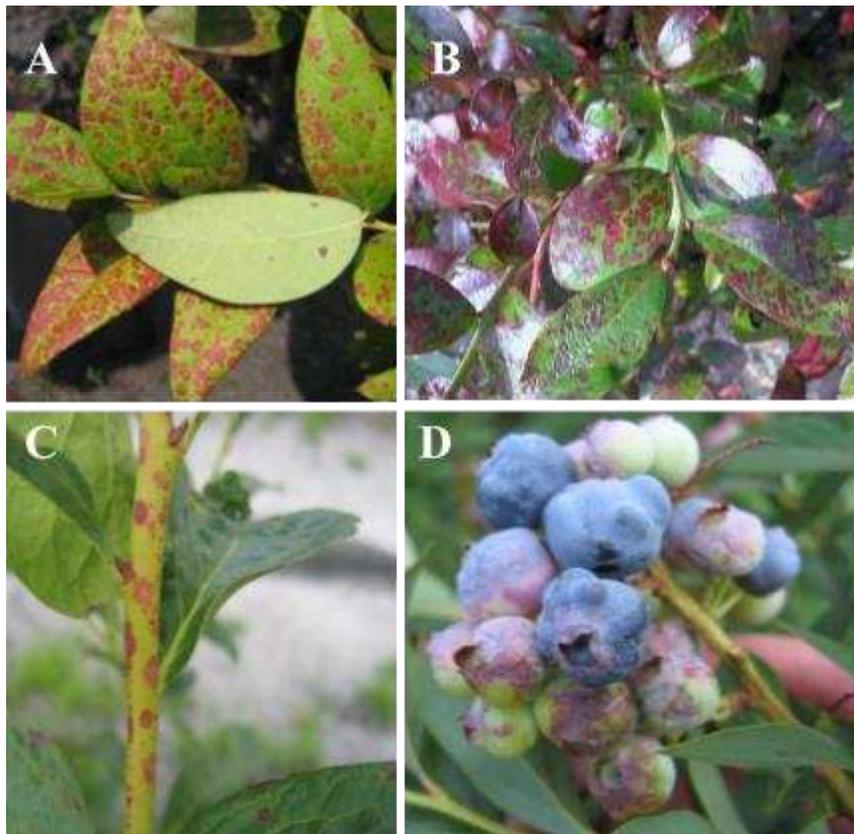


Figura 1. Síntomas de BRRV. La infección se caracteriza por la presencia de manchas anulares rojas en tallos, ramas y hojas, así como deformación en frutos. Tomado de: A), C) y D) Cline, 2008. B) Polashock *et al.*, 2017)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

Al tratarse de virus de DNA (dsDNA), el diagnóstico molecular de BRRV se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*, en inglés).

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 tejido de hojas (incluyendo nervadura central) y tallos. Se sugiere utilizar una modificación al protocolo de extracción con 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 DNA 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 DNA 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 primers	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*

Etapas	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 BRRV

PCR punto final

La detección de BRRV se realiza a partir de los pares de *primers* propuestos por Polashock y Ehlenfeldt (2009) (Cuadro 4). Para llevar a cabo la amplificación mediante PCR, se utiliza la mezcla de reacción mostrada en el Cuadro 5, así como las temperaturas de termociclaje presentadas en el Cuadro 6.

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de BRRV. Polashock y Ehlenfeldt (2009)

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
RRSV3-F	5'- ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA - 3'	549 pb
RRSV4-R	5'- TCCGAAAAATAGATAGTGTCAGC - 3'	

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la detección de BRRV

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10 x	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
RRSV3-F	10 µM	0.4 µM	1
RRSV4-R	10 µM	0.4 µM	1
Taq DNA Polymerase	5 U/µL	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1
Agua grado PCR	---	---	18
Volumen total			25

Cuadro 6. Condiciones de termociclaje para la detección de BRRV

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Alineamiento	57 °C	45 segundos	30
Extensión	72 °C	45 segundos	
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 µg/mL de bromuro de etidio o alguna otra solución que permita visualizar exitosamente los productos amplificados.

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 templado. 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 BRRV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar ningún amplicón con los *primers* específicos. El control positivo debe mostrar un fragmento de 549 pb, aproximadamente (Polashock y Ehlenfeldt, 2009).

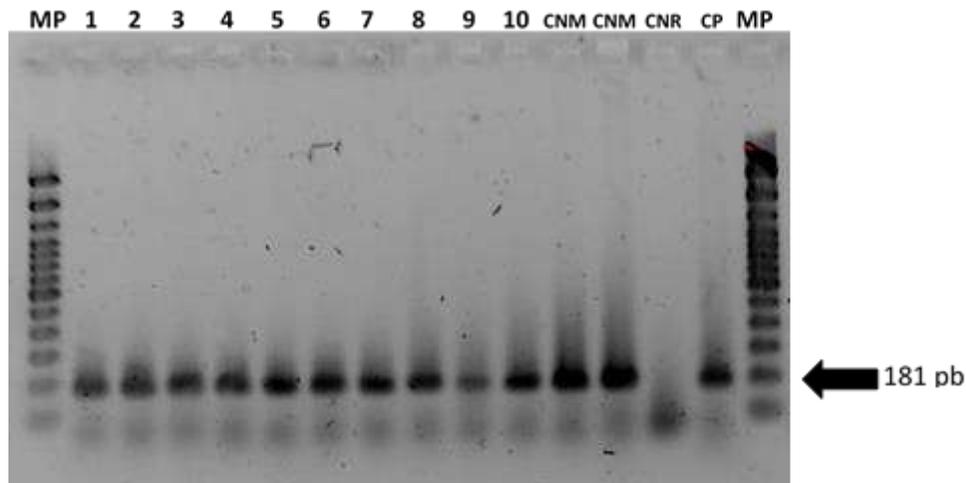


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas a BRRV aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 549 pb con los *primers* específicos RRSV3-F/RRSV4-R.

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

Los resultados positivos deben corroborarse mediante secuenciación, en ambas direcciones (*forward/reverse*), del amplicón obtenido en el ensayo de 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 red ringspot virus* (BRRV), mediante 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 BRRV 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 DNA 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 DNA 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

- Cline, B. (2008). Special reports: Scouting your fields for *Blueberry red ringspot virus*. Small Fruit News. The Southern Region Small Fruit Consortium 8(2): 1. <https://smallfruits.org/files/2019/06/pest-BRRVscoutingguide26feb08.pdf>
- 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 red ringspot virus* (GRRV). Consultado el 23 de abril de 2021 en <https://gd.eppo.int/taxon/BRRV00>
- Glasheen, B.M., Polashock, J.J., Lawrence, D.M., Gillett, J.M., Ramsdell, D.C., Vorsa, N. and Hillman, B.I. (2002). Cloning, sequencing, and promoter identification of *Blueberry red ringspot virus*, a member of the family *Caulimoviridae* with similarities to the “Soybean chlorotic mottle-like” genus. Archives of Virology 147: 2169-2186. DOI: [10.1007/s00705-002-0866-7](https://doi.org/10.1007/s00705-002-0866-7)
- 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., Ishii, K., Umemoto, S., Watanabe, M. and Yoshikawa, N. (2009). First report of blueberry red ringspot disease caused by *Blueberry red ringspot virus* in Japan. Journal of General Plant Pathology 75: 140-143. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0145-5>

- 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)
- 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
- Pleško, M.I., Viršček, M.M. and Koron, D. (2010). Detection of *Blueberry red ringspot virus* in highbush blueberry cv. "Coville" in Slovenia. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruit Crops. *ius-Kühn-Archiv*, 427, 204-205. <https://ojs.openagrar.de/index.php/JKA/article/view/438/1490>
- Polashock J.J., and Ehlenfeldt, M.K. (2009). Molecular detection and discrimination of *Blueberry red ringspot virus* strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. *Plant Disease* 93 (7): 727-733. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-7-0727>
- Polashock, J.J., Caruso, F.L., Averill, A.L. and Schilder, A.C. (2017). Part I: Infectious diseases. *Compendium of blueberry, cranberry and lingonberry diseases and pest*, Second Ed. January 2017, 9-134.
- Saad, N., Alcalá-Briseño, R.I., Polston, J.E., Olmstead, J.W., Varsani, A. and Harmon, P.H. (2020). Blueberry red ringspot virus genomes from Florida inferred through análisis of blueberry root transcriptomes. *Scientific Reports* 10: 12043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68654-3>
- Williford, L.A., Savelle, A.T. and Scherm, H. (2016). Effects of Blueberry red ringspot virus on yield and fruit maturation in southern highbush blueberry. *Plant Disease* 100(1): 171-174. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0381-RE>
- 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 BRRV 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 red ringspot virus* (BRRV). 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”