

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry shoestring virus (BSSV)



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: "Bayas teñidas de rojo que no maduran normalmente " 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 BSSV	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
REGISTROS	9
REFERENCIAS	9
AVISO.....	11

Blueberry shoestring virus (BSSV)

GENERALIDADES

La enfermedad de la puntilla de los arándanos se reportó por primera vez como una posible enfermedad causada por virus en Nueva Jersey por Varney (1957). Se reporta presente en Michigan y también en Washington, Oregon, New Brunswick y Canadá (Annemiek *et al.*, 2008). Los arándanos son originarios de Michigan y durante los últimos 100 años ha sido el principal productor de arándanos de Estado Unidos de América, pero debido a la reducción del rendimiento, ha experimentado pérdidas anuales de casi 3 millones de dólares (Longstroth y Hanson, 2012). El patógeno asociado a la enfermedad viral es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA(+)), con partículas isométricas de 27 nanómetros de diámetro, miembro del género *Sobemovirus* (Ramsdell and Converse, 1987).

En casos severos, la enfermedad conduce a una gran pérdida de rendimiento y frutos comercializables (Ramsdell and Converse, 1987). El BSSV se transmite por el pulgón del arándano (*Illinoia pepperi*). La transmisión comienza en la primavera cuando emergen los pulgones y termina en el otoño justo antes de que caigan las hojas. Los pulgones pueden pasar de los arbustos infectados a los vecinos sanos y también pueden ser transportados por las hileras mediante recolectores mecánicos (Guardabosques *et al.*, 2006). Los áfidos pueden transmitir el BSSV a las plantas de arándanos hasta 10 días después de alimentarse de plantas infectadas con BSSV (Terhune *et al.*, 1991). Los hospedantes reportados para el BSSV son las plantas de arándano alto, *Vaccinium corymbosum* y arándano bajo, *Vaccinium angustifolium* (Ramsdell, 1979).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Blueberry shoestring virus

Acrónimo en virus

BSSV

Nombres comunes

Virus de la mancha anular necrótica del arándano (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Sobelivirales*, Familia: *Solemoviridae*, Género: *Sobemovirus*, Especie: *Blueberry shoestring virus*

(ICTV, 2021)

SÍNTOMAS

El síntoma común asociado a BSSV, es el desarrollo de rayas rojas en los tallos jóvenes durante la primavera, que normalmente desaparecen a medida que avanza la temporada, o en tallos de un año de edad (Martin *et al.*, 2012). Los síntomas en las hojas varían significativamente, incluyendo enrojecimiento en patrones de tira, media luna y hojas de roble rojo, sin embargo, no todas las hojas muestran síntomas. Las flores infectadas pueden tener un tinte rosado o rayas rojizas en los pétalos (Morimoto and Ramsdell, 1985). La fruta permanece con una decoloración rojo-púrpura en las bayas no desarrolladas, permaneciendo decoloradas y no se vuelven azules. Las plantas de arándano infectadas, se atrofian en su crecimiento, pueden presentar vigor reducido y pueden permanecer asintomáticas durante varias temporadas (Figura 1). A medida que aumenta la gravedad de la enfermedad, se reduce la producción de arándano y las plantas disminuyen lentamente con el tiempo (Annemiek *et al.*, 2008; Vaccinium, 2016).

El BSSV causa una infección sistémica en la planta de arándano, las partículas del virus se transmiten principalmente a través del floema, pero la investigación de Urbano *et al.* 1989, ha demostrado que el virus puede viajar a través del xilema, en forma de savia vegetal, y se encuentra en todos los tejidos vegetales, como el tejido parenquimatoso (Urbano *et al.*, 1989). Sin embargo, el período de latencia (tiempo entre la infección y la expresión de los síntomas) de BSSV puede durar hasta 4 años, lo que dificulta la distinción entre plantas de arándanos sanas e infectadas (Urbano, 1989).



Figura 1. Síntomas causados por BSSV en plantas de arándano: A) rayas rojas en los tallos, B) hojas rojizas, en forma de tiras, causadas por el virus, C) distorsión y coloración de la hoja, D) flores teñidas de rojo, E) bayas teñidas de rojo que no maduran normalmente y F) pulgón del arándano (*Illinoia pepperi*). (Fotos de Mark Longstroth); Fotos cortesía de Mark Longstroth, Michigan State University, EE. UU., Reproducidas con permiso de Martin *et al.* (2012)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

El diagnóstico de BSSV 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 A260/280 y A260/230, 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 BSSV

Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus BSSV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, para la síntesis del cDNA se emplea *Random Primer 6* se utilizarán los *primers* (BSSV-F/ BSSV-R), mientras que para la PCR se utilizarán los *primers* diseñados por el Laboratorio de virología del CNRF (Nabor, 2021), tomando la secuencia publicada por Yanagisawa *et al.* (2016). (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de BSSV (Nabor, 2021; Yanagisawa *et al.*, 2016)

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
BSSV -F	5´ - TACGACGCTGAGGATGATGC - 3´	366 pb
BSSV-R	5´ - GCTCCGCTTCAGATCCTCTC - 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 Inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Buffer 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
Random Primer 6	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

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la detección de BSSV

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
BSSV-F	10 µM	0.5 µM	1.25
BSSV-R	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Polymerase	5 U/µL	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua grado PCR	---	---	17.5
Volumen total			25

Cuadro 8. Condiciones de termociclaje para la detección de BSSV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	35 segundos	30
Alineamiento	57 °C	40 segundos	
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 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 BSSV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar bandas. El control positivo debe mostrar una banda de 366 pb, aproximadamente.

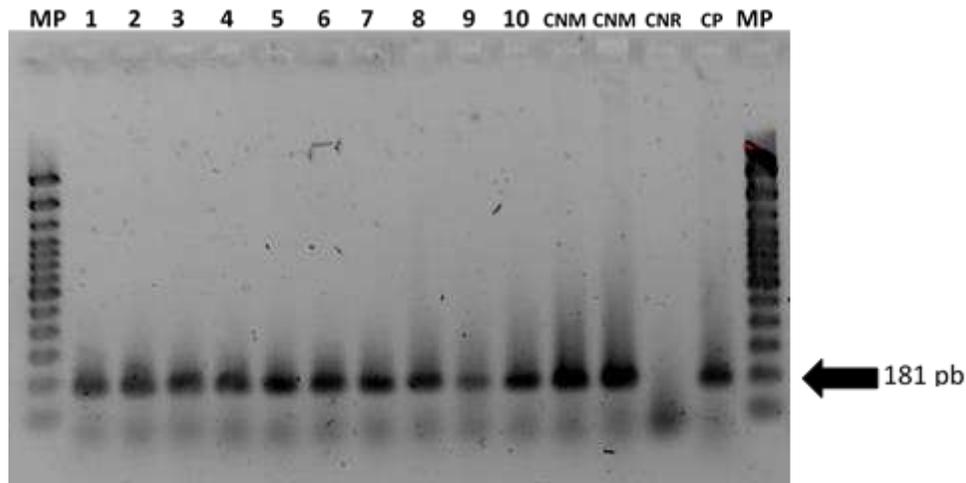


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 366 pb con los *primers* específicos BSSV-F/ BSSV-R.

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

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 shoestring virus* (BSSV), 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 BSSV, 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

- Annemiek C. S. and Timothy D. M. 2008. Virus and Viruslike Diseases of Blueberries Department of Plant Pathology, Michigan State University. Extension Bulletin E-3048.
- 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., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15,
- Guardabosques C. M, Johnson-Cicalese J. Polavarapu S. Vorsa N. 2006. Evaluación de *Vaccinium* spp. para *Illinoia pepperi* (Hemiptera: Aphididae) Rendimiento y contenido fenólico. *J. Econ. Entomol.* 99 (4): 1474-1482.
- Longstroth M. y E. Hanson. 2012. La industria del arándano de Michigan. Extensión MSU.
- Martin R. R., Polashock J. J., Tzanetakis I. E. 2012. New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses* 4: 2831-2852.
- 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
- Morimoto K. M., Ramsdell D. C. 1985. Dinámica de la población de vectores de áfidos y movimiento en relación con la transmisión en el campo del virus de la puntilla de los arándanos. *Fitopatología* 75: 1217-1222.
- Ramsdell D. C. 1979. Virus de la puntilla de los arándanos, no. 204. Descripciones CMI / AAR de virus vegetales. Kew, Surrey, Inglaterra.

- Ramsdell D. C. and Converse R. H. 1987. Enfermedades víricas de frutos pequeños. Departamento de Agricultura de EE. UU., Manual de agricultura núm. 631, Imprenta del gobierno de EE. UU.; Washington, DC, EE. UU.: Págs. 103-105.
- Urbano Los Ángeles, Ramsdell D. C, Klomparens K. L., Lynch T., Hancock J. F. 1989. Detección del virus de la cuerda de los arándanos en los tejidos del xilema y el floema de Highbush Blueberry. *Fitopatología* 79: 488-493.
- Vaccinium (Blueberry & Cranberry) 2016. Post-Entry Quarantine Testing Manual, Ministry for Primary Industries.
- Varney E. H. 1957. Mosaic and shoestring virus diseases of cultivated blueberry in New Jersey. *Phytopathology* 47:307-309.
- Terhune B.T., Ramsdell D. C., Klomparens K. L y Hancock J. F. 1991. Cuantificación de ARN y antígeno del virus de la puntilla del arándano en su vector áfido, *Illinoia pepperi*, durante la adquisición, retención y transmisión. The American Phytopathological Society. DOI: 10.1094 / Phyto-81-1096.

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de BSSV, 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 shoestring virus* (BSSV). 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. Leticia Robles Yerena 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”