

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Peach rosette mosaic virus (PRMV)



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: "Symptoms on American grape (*Vitis labrusca* cv. *Concord*)" (WR Allen Agriculture Canada, 2021)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Acrónimo en virus	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS.....	2
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	2
Técnicas moleculares.....	2
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 PRMV.....	5
Reacción de RT-PCR en dos pasos	5
PCR punto final	7
Electroforesis.....	8
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados de PCR punto final.....	8
Identificación del patógeno	9
REGISTROS	10
REFERENCIAS	10
AVISO.....	11

Peach rosette mosaic virus (PRMV)

GENERALIDADES

Peach rosette mosaic virus (PRMV) es un miembro del género *Nepovirus*. Es un virus de RNA de cadena sencilla de sentido positivo (CABI, 2021) compuesto por dos partículas virales encapsuladas en una partícula isométrica de 28-30 nm de diámetro (ViralZone, 2021). Su genoma viral está formado por dos segmentos genómicos, ARN1 y ARN2 que se traducen en dos poliproteínas que se procesan en dos proteínas funcionales. El ARN-1 codifica las proteínas necesarias para la replicación, mientras que el ARN-2 codifica la proteína de la cápside y los productos implicados en el movimiento de célula a célula (ViralZone, 2021). El PRMV infecta varios cultivos perennes como frutas de hueso, durazno, ciruela, uva y arándano (Ho *et al.*, 2018; CABI, 2021), así como diente de león y varias especies de malezas (*Rumex crispus*, *Solanum carolinense* y *Taraxacum officinale*) (Lee *et al.*, 2016). Se transmite por semillas y especies de nematodos de los géneros *Xiphinema* y *Longidorus* (Ho *et al.*, 2018).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Peach rosette mosaic virus

Acrónimo en virus

PRMV

Nombres comunes

Virus del mosaico roseteado del durazno (español)

Grape decline virus (inglés)

Grapevine degeneration virus (inglés)

Rosette mosaic virus (inglés)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales*, Familia: *Secoviridae*, Género: *Nepovirus*,
Especie: *Peach rosette mosaic virus*

(ICTV, 2021)

SÍNTOMAS

La infección causada por PRMV generalmente ocasiona senescencia y formación de rosetas en el follaje, además produce deformidades, crecimiento anormal y decoloración en hojas y frutos (Lee *et al.*, 2016). Los árboles de durazno infectados con PRMV, presentan retraso en la inducción de brotes, los entrenudos de los brotes se acortan, dando lugar a rosetas que representan el rasgo característico de la enfermedad (Figura 1A). Las hojas producidas en primavera manifiestan moteado, deformación y reducción en su tamaño. En general, los árboles infectados se atrofian y producen pocos frutos o ninguno. En uvas infectadas también puede retrasarse el brote de yemas, que pueden mostrar brotes acortados y torcidos, hojas moteadas y deformadas. Los racimos son desordenados, pequeños (Figura 1B). Las vides infectadas se atrofian y muestran un declinamiento progresivo que puede conducir a su muerte. Las plantas de arándanos infectadas presentan deformaciones en las hojas (CABI, 2021).



Figura 1. Síntomas característicos de PRMV. A) Árbol de durazno con acortamiento de entrenudos y rosetas con hojas deformadas. B) Racimo de uva desordenado, con crecimiento anormal de frutos. Tomado de: WR Allen Agriculture Canada, 2021

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular para el diagnóstico de PRMV es la 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, 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).
- 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		Volumen 1X (µL)
	Inicial	final	
<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	100-25ng/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 PRMV

Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus PRMV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, para enriquecer el cDNA, para ello se utilizarán los *primers* (Nepo RdRp F / Nepo RdRp R) diseñados por Ruíz (2014). Los cuales se hibridan a una región del RNA que codifican para el gen de la cápside (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Primers* utilizados para la detección de PRMV mediante RT-PCR. Ruíz (2014)

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Ensayo
Nepo RdRp F	GGNYTNAAYTGYGAYTAYWSNAARTTYGAYGG	450 pb	PRMV
Nepo RdRp R	NCCRTCNGTDATNGTDATNCCNACNSWNGCC		

1) Realizar la mezcla de reacción A, según lo señalado en el siguiente Cuadro 5:

Cuadro 5. Mezcla de reacción A para la síntesis de cDNA enriquecido para PRMV

Reactivos	Concentración		Volumen 1X (µL)
	Inicial	final	
RNA	100-10 ng/ µL	30-3 ng/ µL	3
Nepo RdRp F	10 µM	1.0 µM	1
Nepo RdRp R	10 µM	1.0 µM	1
Volumen subtotal			5

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

Cuadro 6. Programa de térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
72 °C	2 minutos	1
12 °C	∞	

3) Realizar la mezcla de reacción B, según lo señalado en el siguiente Cuadro 7:

Cuadro 7. Mezcla de reacción B para la síntesis de cDNA enriquecido para PRMV

Reactivos	Concentración		Volumen 1X (µL)
	Inicial	final	
<i>Buffer</i>	5 X	1 X	2.0
dNTP's	10 mM	1.0 mM	1.0
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/Rnx	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	100 U/Rnx	0.5
DTT	100 mM	10 mM	1.0
Mezcla de reacción A		---	5.0
Volumen final			10

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

Cuadro 8. Programa de termociclaje para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	120 minutos	1
12 °C	∞	

PCR punto final

1) Preparar la reacción de PCR de acuerdo a lo señalado en el Cuadro 9:

Cuadro 9. Mezcla de reacción para la PCR punto final para PRMV

Reactivos	Concentración	Concentración	Volumen 1X (μ L)
	Inicial	final	
Agua ° PCR	--	--	15.8
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Nepo RdRp F	10 μ M	0.8 μ M	2
Nepo RdRp R	10 μ M	0.8 μ M	2
Taq polimerasa	5 U/ μ L	1 U/Rnx	0.2
cDNA	---	---	0.5
Volumen final			25

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 10):

Cuadro 10. Programa de termociclaje para la detección de PRMV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	35 segundos	35
Alineamiento	56 °C	35 segundos	
Extensión	72 °C	45 segundos	
Extensión final	72 °C	7 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 un 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. 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 PRMV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 450 pb, aproximadamente.

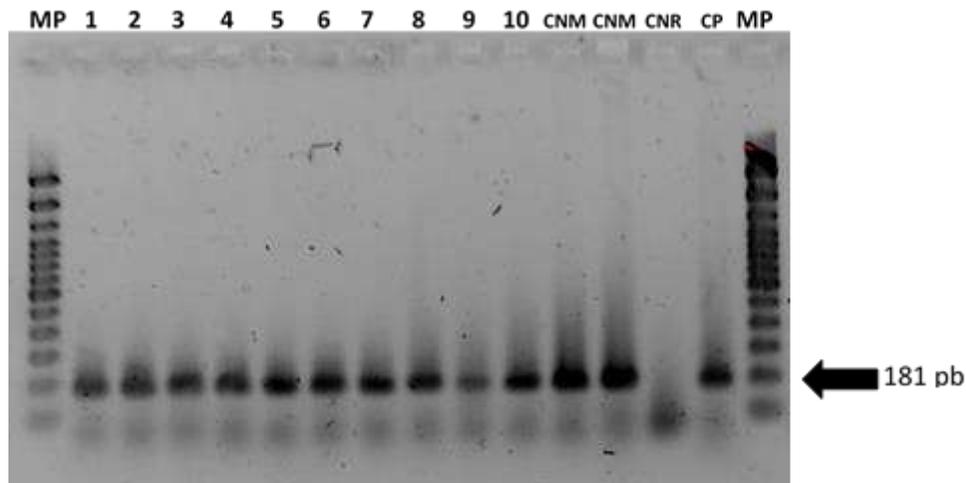


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno *NAD5*. Las muestras presentan un fragmento de 181 pb, correspondientes al amplicón positivo a *NAD5*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-10: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: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

Identificación del patógeno

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 450 pb con los *primers* específicos (Nepo RdRp F / Nepo RdRp R).

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

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 *Peach rosette mosaic virus* (PRMV), 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 PRMV, 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

- CABI, 2021. *Peach rosette mosaic virus*. In: Crop Protection Compendium (CPC). Wallingford, UK: CAB International. <https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet/39224>
- Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15
- Ho T, Harris A, Katsiani A, Khadgi A, Schilder A and Tzanetakis I. E. 2018. Genome sequence and detection of *Peach rosette mosaic virus*. Journal of virological methods 254: 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.004>
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. 2021. Virus taxonomy: 2021 release. Berlin, Germany. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Lee S, Kim C. S, Shin Y. G, Kim J. H, Kim Y. S, and Jheong W. H. 2016. Development of nested PCR-based specific markers for detection of *Peach rosette mosaic virus* in plant quarantine. Indian Journal of Microbiology 56: 108-111. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0548-2>
- 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
- Ruíz M. R, Valencia L. J. B y Negrete, F. G. 2014. Protocolo de diagnóstico de *Peach rosette mosaic virus* mediante la técnica de RT-PCR. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F.
- ViralZone. 2021. ViralZone SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Nepovirus. <https://viralzone.expasy.org/>
- WR Allen Agriculture Canada. 2021. *Peach rosette mosaic virus*. EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/PRMV00/photos>
- 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 PRMV, 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: *Peach rosette mosaic virus* (PRMV). 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. 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”