

# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

*Arabid mosaic virus (ArMV)*



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: Moteado producido por *Arabis mosaic virus* (ArMV) ([www.bitkisagligi.net](http://www.bitkisagligi.net))

# 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
Síntesis de cDNA con <i>primers</i> específicos.....	4
PCR punto final.....	5
Ensayo para la detección específica de ArMV.....	6
Reacción de RT-PCR en dos pasos .....	6
Electroforesis.....	7
Controles para las pruebas moleculares.....	7
Interpretación de resultados .....	8
Identificación de plaga .....	9
REGISTROS .....	9
REFERENCIAS .....	10
AVISO.....	11



# *Arabis mosaic virus* (ArMV)

## GENERALIDADES

El virus asociado a la enfermedad del mosaico de *Arabis*, es de la familia *Secoviridae*, pertenece al grupo *Nepovirus*, las partículas de virus son isométricas y tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm, que sedimentan en tres clases: T (53S), M (93S) y B (126S), tiene un genoma bipartito con dos RNA de pesos moleculares de 2.4 y 1.4 x 10<sup>6</sup> (Murant, 1981; Francki *et al.*, 1985). Tiene hospedantes naturales, se encuentra en: cerezos, damascos, duraznero, fresas, lúpulo, cáñamo, uva, geranios, rosas, remolacha azucarera, apio, rábano picante, lila, melocotón, lechugas y *Rubus* spp. (Brunt, 1996). El primer reporte fue realizado por Smith y Markham en 1994 en plantas de *Arabis hirsuta* en Inglaterra. Los cultivos de fresas y frambuesas pueden ser severamente afectados y en algunos cultivares las plantas pueden incluso morir a causa del virus. En cerezas, se pueden presentar infecciones mixtas de ArMV con el virus enano de la ciruela pasa. La enfermedad se distribuye en: Rumania, Argentina, Chile, Checoslovaquia, Croacia, Moldavia, Noruega, Rusia, Suiza, Turquía, Ucrania, Yugoslavia, Kazakhstán, Sudáfrica, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Austria, Bélgica, Dinamarca, Francia, Hungría, Irlanda, Italia, Lituania, Luxemburgo, Países Bajos, Eslovaquia, Eslovenia, República Checa, Alemania y Polonia (CABI, 2003).

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

*Arabis mosaic virus*

### Acrónimo en virus

ArMV

### Nombres comunes

*Arabis mosaic virus* (inglés)

Virus del mosaico del *Arabis* (español)

### Posición taxonómica

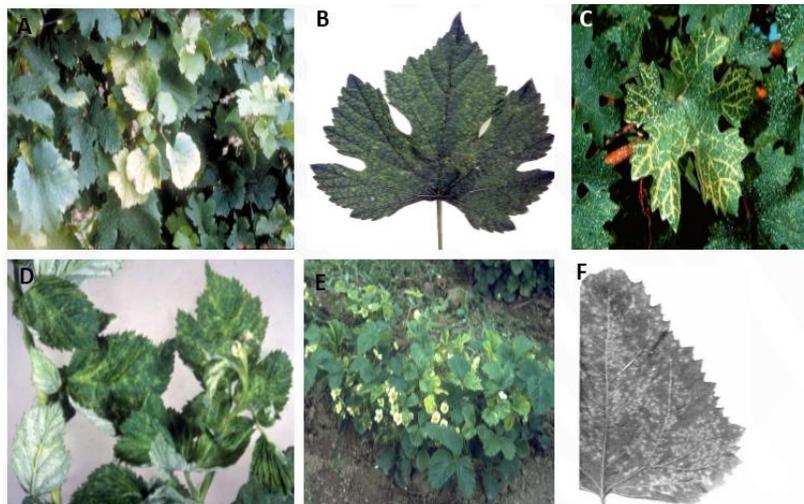
Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales*, Familia: *Secoviridae*, Subfamilia: *Comovirinae*, Género: *Nepovirus*, **Especie:** *Arabis mosaic virus*

(ICTV, 2021)

## SÍNTOMAS

Los síntomas más comunes inducidos por ArMV son moteados de las hojas, aparición de hojas atrofiadas, enaciones, arrositado, protuberancias, acortamiento de entrenudos, síntomas de declive en la vid, reducción de vigor, retraso en el crecimiento y en las formas más severas de infección, se producen varios tipos de deformación. Inicialmente se observa coloraciones verdes amarillentas de aspecto aceitoso que contrastan con el verde de la hoja. Se producen distorsiones de tamaño, forma y simetría dando el aspecto de hoz (hoja curvada). En la base de las hojas se presentan sobre-crecimientos aserrados, pequeñas hojas o crestas de gallo. La severidad de los síntomas varía de hoja a hoja, pero todas ellas se vuelven quebradizas. También aparecen necrosis. El crecimiento se detiene bruscamente y los frutos, poco numerosos, resultan pequeños. El virus de las manchas anulares (*Raspberry ringspot virus*) produce en la fresa los mismos síntomas. Los síntomas varían mucho dependiendo del huésped (variedad, portainjerto), la cepa del virus y estación del año (condiciones ambientales) (Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino, s.f.) (Figura 1). La mayoría de las infecciones por ArMV son latentes y la planta no presenta síntomas. Se han atribuido a ArMV pérdidas de rendimiento de hasta del 50 % (INTA, s.f.).

La transmisión se realiza por injerto, nematodos, por inoculación mecánica, contacto y semilla. En general se transmite por los nematodos *Xiphinema diversicaudatum*, *X. cosyi*, *X. bakeri*, *Paralongidorus* y *Longidorus* spp. El nematodo *X. diversicaudatum*, es el principal vector de ArMV, transmitiéndolo en el estado de juvenil y adulto (INTA, s.f.). El método principal de diseminación es mediante el movimiento de material propagativo infectado.



**Figura 1.** Moteado producido por *Arabis mosaic virus* (ArMV) sobre hoja de A-C) Vid, D) Frambuesa roja, E) Fresa, F) *Chenopodium amaranticolor*. Tomado de: [www.bitkisagligi.net](http://www.bitkisagligi.net)

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular que se emplea para el diagnóstico preciso de ArMV es la 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 nervaduras centrales de hojas, yemas o brotes.

- Hoja: tomar secciones de la lámina foliar que incluya la nervadura central y 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 o el protocolo propuesto por Zamboni *et al.* (2008).

### 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 %. Se debe 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

### Síntesis de cDNA con *primers* específicos

El ensayo de gen endógeno consiste en la amplificación, mediante RT-PCR, de un fragmento del gen *18S* ribosomal para descartar falsos negativos debido a inhibidores en la muestra de RNA. La síntesis de cDNA se realiza con los *primers* propuestos por Zamboni, 2008 (Cuadro 1), los cuales dirigen la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad.

**Cuadro 1.** *Primers* utilizados para la detección de ArMV y Gen endógeno *18S* mediante RT-PCR

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5'- 3')	Tamaño del amplicón	Ensayo
<i>18S</i> Fw	ACGGATCGCACGGCCTTCGTG	300 pb	Gen Endógeno
<i>18S</i> Rv	ACCAGACTTGCCCTCCAATGG		
ArMV_F	TGACAACATGGTATGAAGCACA	402 pb	ArMV
ArMV_R	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT		

1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el Cuadro 2:

**Cuadro 2.** 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 <sub>2</sub>	50 mM	5.0 mM	2.0
dNTP's	10 mM	1.0 mM	2.0
<i>18S</i> Fw	10 µM	0.2 µM	0.4
<i>18S</i> Rv	10 µM	0.2 µM	0.4
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/Rxn	0.5
RT M-MLV	200 U/µL	50 U/Rxn	0.25
RNA	100-10 ng/ µL	25 - 2.5 ng/ µL	5.0
Agua ° PCR	---	---	7.45
Volumen final			<b>20</b>

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 3):

**Cuadro 3.** Programa térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	30 minutos	1
99 °C	5 minutos	1
12 °C	∞	

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 4:

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción para la PCR punto final del gen endógeno 18S

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.20 mM	0.5
18S Fw	10 µM	0.4 µM	1.0
18S Rv	10 µM	0.4 µM	1.0
Taq polimerasa	5 U/µL	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua ° PCR	---	---	18
Volumen final			<b>25</b>

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 5):

**Cuadro 5.** Programa de termociclaje para la detección del gen endógeno 18S

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	90 segundos	1
Desnaturalización	94 °C	40 segundos	30
Alineamiento	55 °C	40 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	3 minutos	1

## Ensayo para la detección específica de ArMV

### Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus ArMV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, se utilizarán los *primers* (ArMV-F/ ArMV-R) diseñados por Gambino y Gribaudo, 2006. Los cuales hibridan a una región del RNA que codifican para el gen de la cápside (Cuadro 1).

1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el siguiente Cuadro 6:

**Cuadro 6.** Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA enriquecido para ArMV

Reactivos	Concentración		Volumen 1X ( $\mu$ L)
	Inicial	final	
Agua ° PCR	---	---	9.5
Buffer de PCR	10 X	1 X	2
DTT	100 mM	7.5 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.5 mM	1
ArMVR	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1
Inhibidor de RNA	40 U/ $\mu$ L	40 U/Rxn	1
RT M-MLV	200 U/ $\mu$ L	200 U/Rxn	1
RNA	100 ng/ $\mu$ L	15 ng/ $\mu$ L	3
Volumen total			<b>20</b>

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 7):

**Cuadro 7.** Programa térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
37 °C	50 minutos	1

3) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el siguiente Cuadro 8:

**Cuadro 8.** Mezcla de reacción para la síntesis de PCR de ArMV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
Buffer de PCR	10 X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
ArMV-F	10 μM	0.3 μM	0.625
ArMV-R	10 μM	0.3 μM	0.625
Taq polimerasa	5 U/μL	0.5 U/Rxn	0.1
cDNA			2
Agua ° PCR			17.9
Volumen final			<b>25</b>

4) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 9):

**Cuadro 9.** Programa de termociclaje para la detección de ArMV

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94 °C	4 minutos	1
94 °C	30 segundos	35
64 °C	45 segundos	
72 °C	1 minutos	
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 esta ficha técnica, 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.

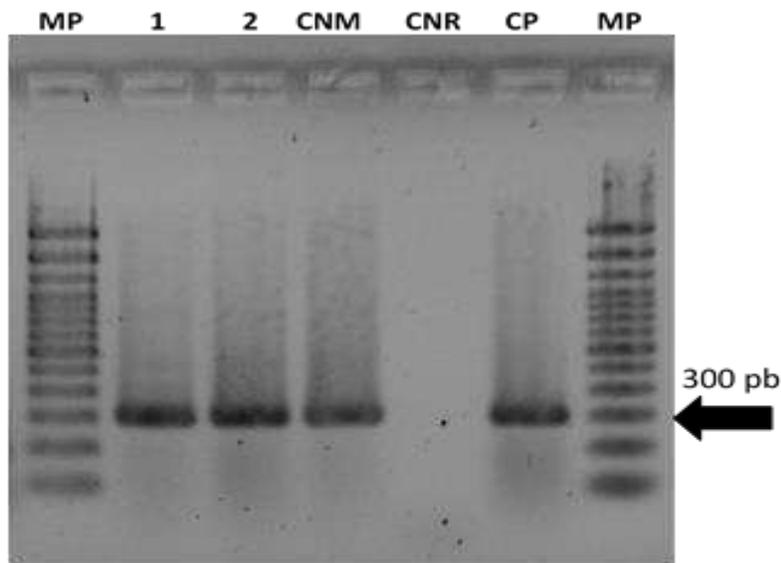
**Control negativo de matriz (CNM):** este control corresponde a un extracto de matriz sin el virus (hospedero). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**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, el control positivo y cada una de las muestras debe generar un fragmento de 300 pb. El control negativo de reactivos no debe presentar ningún fragmento (Figura 2).
- En el ensayo para la detección de ArMV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar amplicones. El control positivo debe mostrar una banda de 402 pb, aproximadamente (Gambino y Gribaudo, 2006).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno. Las muestras presentan un fragmento de 300 pb, correspondientes al amplicón positivo a 78S. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-2: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

## Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 402 pb con los oligonucleótidos específicos ArMV -F/ ArMV -R.

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

Los resultados positivos 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 *Arabis mosaic virus* (ArMV), 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 ArMV, 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

- Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI). 2003. Mapas de distribución de enfermedades en plantas. (Edición 1), Mapa 891 [En línea]. Disponible en línea con actualizaciones en <https://www.cabi.org/dmpd/search?q=strawberry+latent+ringspot+virus> (revisado el 09/02/2018).
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). 2021. [En línea]. Disponible en línea con actualizaciones en <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (revisado el 18/01/2021).
- Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Francki, R.I.B.; Milne R.G. and Hatta, T. 1985. Atlas of plant viruses. Vol. II, pp.23-38. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Gambino G. and Gribaudo, I. 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Plant Virology Institute*. 96:1223-1229
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. EEA Mendoza, Fruticultura (INTA). (s.f) *Arabis mosaic virus*. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-16\\_\\_arabis\\_mosaic\\_nepovirus.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-16__arabis_mosaic_nepovirus.pdf) (consultado 14/01/2021).
- Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. (s.f.). Ficha descriptiva de organismos nocivos. *Arabis mosaic virus* (ArMV). [http://agricultura.gencat.cat/web/.content/ag\\_agricultura/ag02\\_sanitat\\_vegetal/ag02\\_12\\_titulars\\_explotacions/fitxes\\_marm/fitxers\\_estatics/arabis\\_mosaic.pdf](http://agricultura.gencat.cat/web/.content/ag_agricultura/ag02_sanitat_vegetal/ag02_12_titulars_explotacions/fitxes_marm/fitxers_estatics/arabis_mosaic.pdf) (consultado 14/01/2021).
- Murant, A.F. 1981. Nepoviruses. In: Plant virus infections (Ed. by Kurstak, E.), pp. 197-238. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands.
- Zamboni A, Pierantoni L, 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 ArMV, 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: *Arabis mosaic virus* (ArMV). Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez <b>Subdirector Técnico</b>	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández <b>Jefa del Departamento de Fitopatología</b>	Revisó
M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna <b>Coordinadora del Laboratorio de Virología</b>	Revisó y elaboró
Dra. Leticia Robles Yerena <b>Técnico del Laboratorio de Virología</b>	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](http://gob.mx/agricultura)

[gob.mx/senasica](http://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”