

# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

*Tomato ringspot virus (ToRSV)*



**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: Mosaicos cloróticos en hojas infectadas con ToRSV. Tomado de: Martin *et al.*, (2012)

# ÍNDICE

**Pág.**

GENERALIDADES .....	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Nombres comunes:.....	1
SÍNTOMAS.....	1
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....	3
Técnicas moleculares.....	3
Toma de muestra y Extracción de RNA.....	3
Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría.....	4
Ensayo de Gen Endógeno .....	4
Síntesis de cDNA con <i>primers</i> específicos.....	4
PCR punto final .....	5
Ensayo para la detección específica de ToRSV .....	6
Reacción de RT-PCR en dos pasos .....	6
Electroforesis.....	7
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados.....	8
Identificación de plaga .....	10
REFERENCIAS .....	10
AVISO.....	12



# Tomato ringspot virus (ToRSV)

## GENERALIDADES

*Tomato ringspot virus* (ToRSV) es un miembro del género *Nepovirus*. Es un virus de RNA de cadena sencilla compuesto por dos partículas virales encapsuladas en una partícula isométrica de 28 nm de diámetro (Rivera, *et al.*, 2016). Es un virus endémico de América del Norte, donde se encuentra ampliamente distribuido debido a que el clima de la región favorece la presencia de nematodos vectores (Stace-Smith, 1984; Wintermantel, 2017). Se cuenta con reportes de la presencia del virus en otras partes del mundo, incluyendo Europa, Asia y América Latina (Salem *et al.*, 2005; González *et al.*, 2017; EPPO, 2015). Se ha reportado la presencia del virus en frambuesas, moras, uvas, durazno, cereza y otras especies de los géneros *Prunus*, *Pelargonium* y *Rubus* (Virus-Host, 2019).

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Posición taxonómica, Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales*, Familia: *Secoviridae*, Subfamilia: *Comovirinae*, Género: *Nepovirus*, Especie: *Tomato ringspot virus* (ICTV, 2020).

### Nombres comunes:

Virus de la mancha anular del tomate (español)

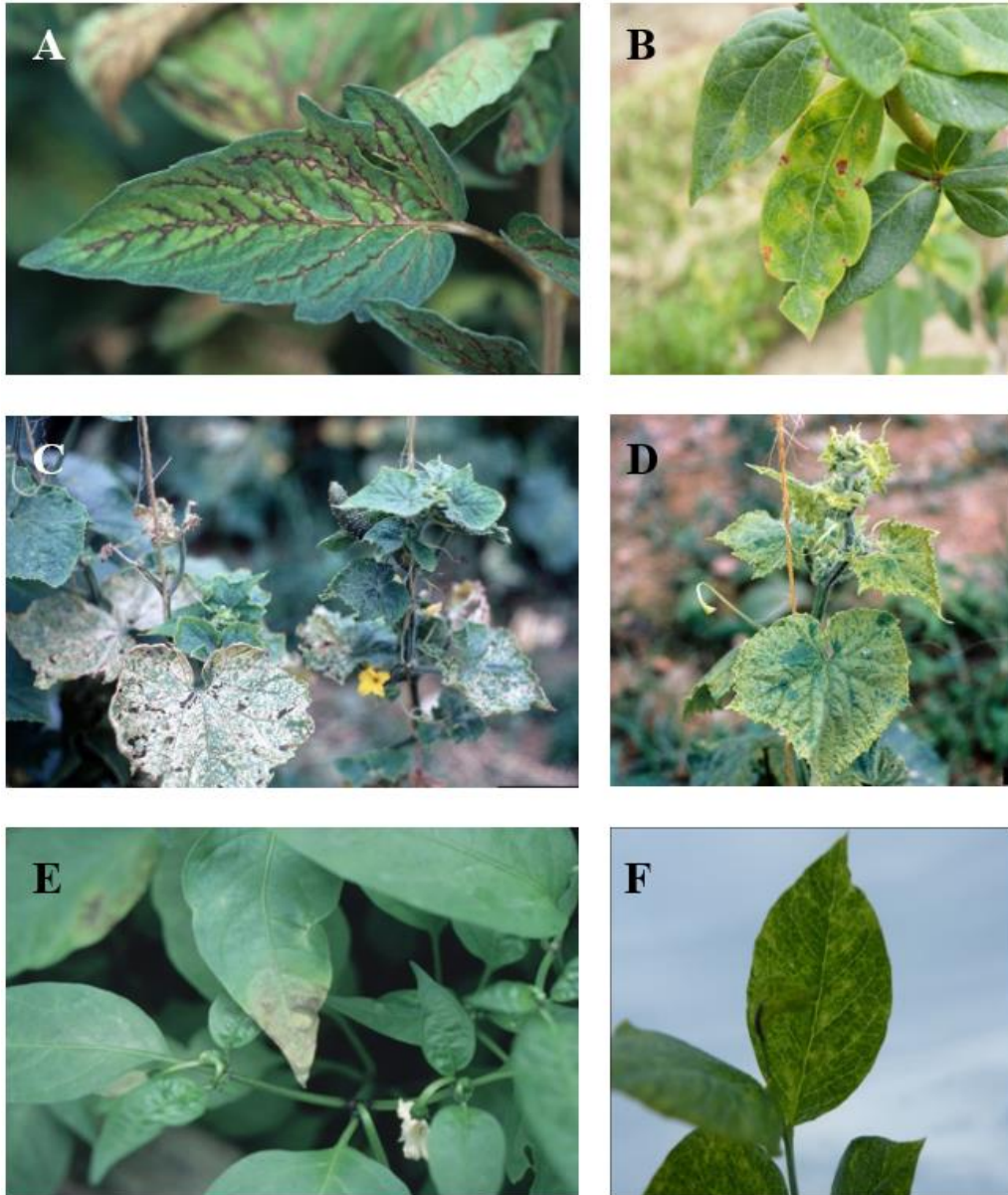
**Acrónimo en virus:** ToRSV

## SÍNTOMAS

Los síntomas de ToRSV varían dependiendo del hospedante. Entre los síntomas característicos se encuentran los mosaicos amarillos, manchas cloróticas y anillos necróticos en nervaduras centrales de hojas, en tallos y frutos. Los brotes producen rosetas de hojas pequeñas con moteados o amarillamientos. Los frutos presentan crecimiento disminuido y malformaciones (Wintermantel, 2017). Las plantas con infecciones crónicas de ToRSV no presenta síntomas obvios, pero si, un declive general y disminución de la producción. En el caso del tomate, se observan ondulaciones y necrosis en las hojas y brotes. La base de las hojas jóvenes desarrolla anillos necróticos y líneas marrones, al igual de los peciolo y tallos adyacentes a las hojas necróticas (EPPO, 2005) (**Figura 1**).

ToRSV se transmite fácilmente por medios mecánicos, injertos o polen, pero el principal medio de transmisión son los nematodos vectores del género *Xiphinema* (Pinkerton, *et*

*al.*, 2008). Adicionalmente, se ha reportado que este virus puede ser transmitido por trips, escarabajos, áfidos, ácaros y otros artrópodos (Jaramillo, 2012).



**Figura 1.** Síntomas característicos de ToRSV. A) Hojas de tomate con manchas en nervaduras. B) Hojas de moras mostrando anillos necróticos y distorsión de hojas. C) Manchas cloróticas en hojas de pepino. D) Rosetas con hojas pequeñas y amarillas. E) Síntomas en hojas de pimiento F) Mosaicos cloróticos en hojas infectadas con ToRSV. Tomado de: A, C, D y E) Forestry Images, 2018; B y F) Martin *et al.*, (2012).

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Técnicas moleculares

Debido a que ToRSV es un virus de RNA de cadena positiva, el diagnóstico molecular de este patógeno se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (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 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 ToRSV y Gen endógeno *18S* mediante RT-PCR. Zamboni, 2008

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5' - 3')	Amplicón	Ensayo
<i>18S</i> Fw	ACGGATCGCACGGCCTTCGTG	300 pb	Gen
<i>18S</i> Rv	ACCAGACTTGCCCTCCAATGG		Endógeno
ToRSV_U1	GACGAAGTTATCAATGGCAGC	449 pb	ToRSV
ToRSV_D1	TCCGTCCAATCACGCGAATA		

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



**Cuadro 2.** Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración		Volumen 1X ( $\mu$ L)
	Inicial	final	
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
78S Fw	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.4
78S Rv	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.4
Inhibidor de RNA	40 U/ $\mu$ L	20 U/Rxn	0.5
RT M-MLV	200 U/ $\mu$ L	50 U/Rxn	0.25
RNA	100-10 ng/ $\mu$ L	25 - 2.5 ng/ $\mu$ L	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	$\infty$	

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 78S.

Reactivos	Concentración		Volumen 1X ( $\mu$ L)
	Inicial	final	
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
78S Fw	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0
78S Rv	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ L	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua ° PCR	---	---	18
Volumen final			25

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

**Cuadro 5.** Programa de termociclaje para la detección del gen endógeno 78S.

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 ToRSV

### Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus ToRSV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en un paso, utilizando los *primers* (ToRSV\_U1/ ToRSV\_D1) diseñados por Griesbach (1995). Los cuales se 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 RT-PCR de ToRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1X
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.0
DTT	100 mM	5 mM	1.0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.6
dNTP's	10 mM	0.25 mM	0.5
ToRSV-U1	10 µM	0.4 µM	0.8
ToRSV-D1	10 µM	0.4 µM	0.8
Taq polimerasa	5 U/µL	0.5 U/Rxn	0.1
RT M-MLV	200 U/µL	20 U/Rxn	0.1
Inhibidor de RNA	40 U/µL	6 U/Rxn	0.15
RNA	100-10 ng/ µL	5 - 0.5 ng/ µL	1.0
Agua ° PCR	---	---	12.95
Volumen final			20

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

**Cuadro 7.** Programa de termociclaje para la detección de ToRSV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Retrotranscripción	50 °C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	35
Alineamiento	55 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	45 segundos	
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 tamaño 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.

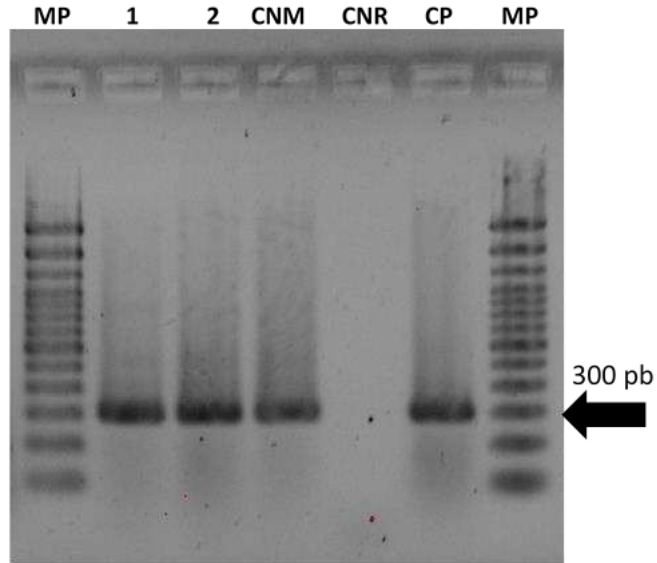
**Control negativo de matriz (CNM):** este control corresponde a un extracto de matriz sin el virus (hospedero). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**Control negativo de reactivos (CNR):** es la mezcla de reacción sin molde. Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

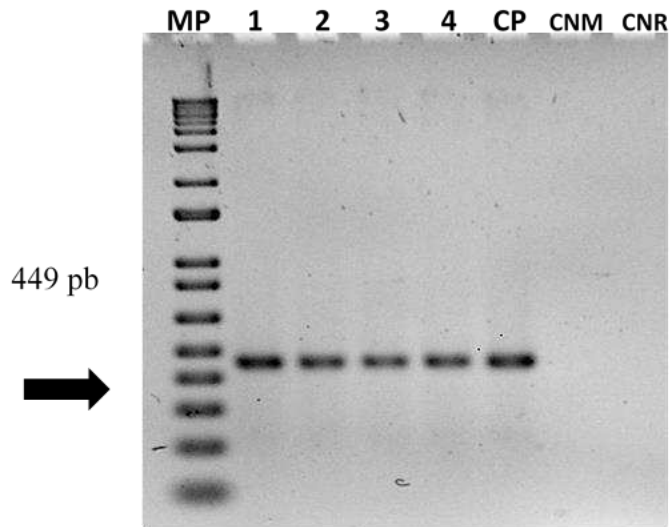
## Interpretación de resultados

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 ToRSV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 449 pb, aproximadamente (**Figura 3**).



**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 18S. 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.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa del ensayo para identificar ToRSV. Las muestras y el control positivo presentan un fragmento de aproximadamente 449 pb, correspondientes al amplicón positivo a ToRSV. MP: Marcador de tamaño molecular (1 Kb plus, Invitrogen™); 1-4: muestras problema; CP: control positivo; CNM: control negativo matriz; CNR: control negativo de reactivos.

## Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 449 pb con los *primers* específicos ToRSV-U1/ ToRSV-D1.

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

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 *Tomato ringspot virus* (ToRSV), 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 ToRSV, 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). 2020. [En línea]. Disponible en línea con actualizaciones en <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (revisado el 18/01/2020).

Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15

- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), 2005. Tomato ringspot nepovirus, Bulletin 35, 313-318
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), 2015. Reporting Service no. 10-2015. Num. Article: 2015/194
- González, G. R., Concha, C. M., Valenzuela, M. A., Cordero, L. C., Pico, J. N., Cáceres, P. A., García, R. 2017. Distribución y frecuencia de Tomato ringspot virus (ToRSV) en diferentes variedades de *Rubus idaeus* en la Región del Maule, Chile. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCOYO, 49: 143-156
- Griesbach, J. A. 1995. Detection of Tomato Ringspot Virus by Polymerase Chain reaction. Plant Disease, 79: 1054-1056
- Jaramillo, M. M., Álvarez, J. A., Montoya, M. M. 2012. Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. Revista Lasallista de Investigación, 9: 115-127
- Martin, R. R., Polashock, J. J., Tzanetakis, I. E. 2012. New and Emerging Virus of Blueberry and Cranberry. Viruses, 4: 2831-2852
- Pinkerton, J. N., Kraus, J., Martin, R. R., Schreiner, R. P. 2008. Epidemiology of *Xiphinema americanum* and Tomato ringspot virus on Red Raspberry, *Rubus idaeus*. Plant Disease, 92: 364-371
- Rivera, L., Zamorano, A., Fiore, N. 2016. Genetic divergence of tomato ringspot virus. Archives of Virology 161: 1395-1399
- Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A. 2005. Viruses of pome fruit trees in Jordania. Journal of Plant Pathology 87: 123-126
- Stace-Smith R. 1984. Tomato ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 290. AAB, Wellesbourne (GB).
- Wintermantel, W. M. 2017. Tomato ringspot virus. In: Keinath, A. P., Wintermantel, W. M., Zitter, T. A., editors. Compendium of Cucurbit Diseases and Pests. 2nd edition. St. Paul, MN: APS Press. pp. 152-153.
- Zamboni, A., Pierantoni L. y De Franceschi, P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other Woody-plants. iForest - Biogeosciences and Forestry, 1: 122-125.
- Forestry Images. Recuperado el 27 de marzo de 2019 en <https://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=11249>
- Genus: Nepovirus. 2019. ICTV. Recuperado el 28 de febrero de 2019 de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/secoviridae/591/genus-nepovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/secoviridae/591/genus-nepovirus)
- Tomato ringspot virus (ToRSVO). 2019. EPPO. Recuperado el 28 de febrero de 2019 de <https://gd.eppo.int/taxon/TORSVO>
- Virus-Host DB. Recuperado el 27 de marzo de 2019 de [https://www.genome.jp/virushostdb/view/?virus\\_scientific\\_name=tomato+ringspot+virus](https://www.genome.jp/virushostdb/view/?virus_scientific_name=tomato+ringspot+virus)

## AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de ToRSV, 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: *Tomato ringspot virus* (ToRSV). 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](mailto:lab.virologia@senasica.gob.mx)

Teléfono y extensión (01 (52) 55 5905 1000, 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”