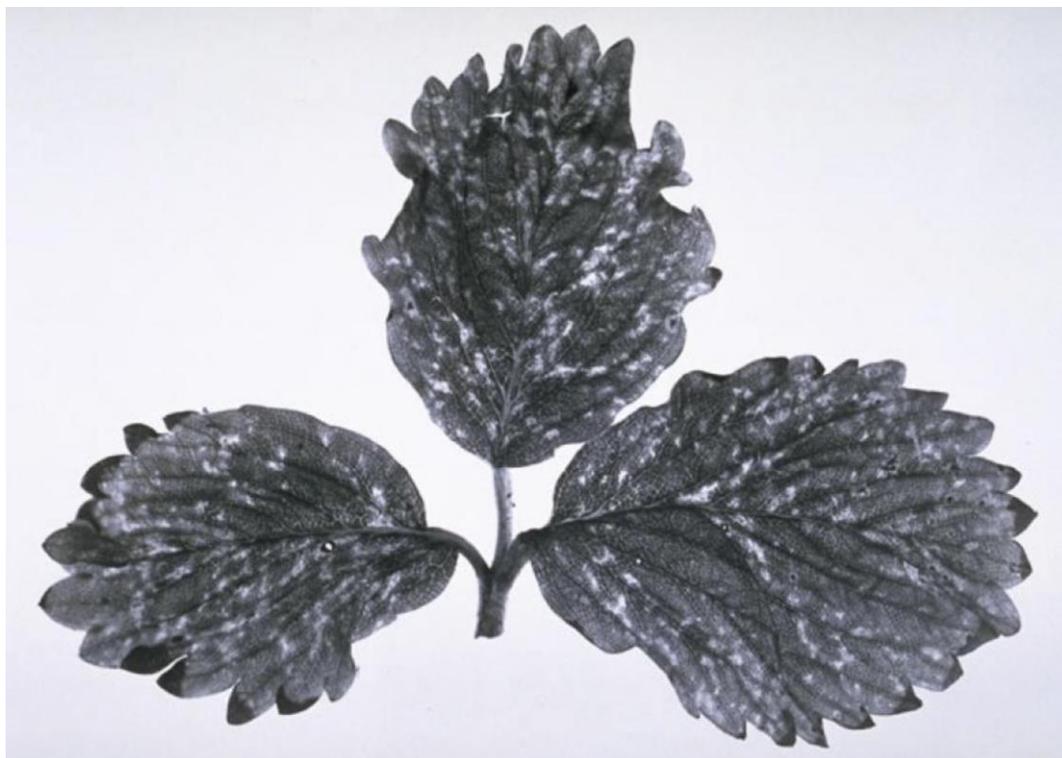


# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

*Raspberry ringspot virus (RpRSV)*



**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: Scottish Crop Research Institute (SCRI), Dundee. EPPO Global Database (s/f). Raspberry ringspot virus. <https://gd.eppo.int/taxon/RPRSVO/photos>

# 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 .....	4
Síntesis de cDNA con <i>primers</i> específicos.....	4
PCR punto final.....	5
Ensayo para la detección específica de R <sub>p</sub> RSV .....	5
Reacción de RT-PCR en dos pasos .....	5
Síntesis de cDNA.....	6
PCR punto final.....	7
Electroforesis .....	7
Controles para las pruebas moleculares .....	8
Interpretación de resultados .....	8
Identificación de plaga .....	9
REGISTROS .....	10
REFERENCIAS .....	11
AVISO .....	12



# Raspberry ringspot virus (RpRSV)

## GENERALIDADES

El virus asociado a la enfermedad de la mancha anular de la frambuesa, se descubrió por primera vez en Escocia en *Rubus idaeus* (Cadman et al., 1956). El virus pertenece al género *Nepovirus*, la partícula del virus es isométrica, de unos 30 nm de diámetro, con un ángulo de cinco o seis lados, se ha reportado en frambuesa, grosella, cerezo, vid y plantas herbáceas como fresa, narciso, anémona, pamplina y varias plantas silvestres. El virus se transmite por semilla y mecánicamente a varias plantas herbáceas; en algunos hospedantes, más del 50 % de las plántulas de la progenie están infectadas, la infección de la semilla, especialmente en las malezas, proporciona un medio importante de supervivencia de RpRSV en suelo. El RpRSV es transmitido por dos especies de nematodos del género *Longidorus* y son específicos para formas serológicamente distintivas de RpRSV (Harrison, 1964); por lo tanto, las cepas escocesas y holandesas se transmiten de manera más eficiente por *L. elongatus* (Taylor, 1962), mientras que la forma inglesa es transmitida por *L. macrosoma* (Debrot, 1964). Otras especies de nematodos (incluido *Xiphinema diversicaudatum* y otras especies de *Longidorus*) han sido sospechosos de transmitir cepas de RpRSV (EPPO, s.f.).

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

*Raspberry ringspot virus*

### Acrónimo en virus

RpRSV

### Nombres comunes

Manchas anulares del frambueso, Virus de la mancha anular de frambuesa (español)

Ringspot diseases of raspberry, strawberry and flowering currant, Lloyd George raspberry yellow blotch disease (inglés)

Taches annulaires du framboisier (francés)

Pfeffinger Krankheit (alemán)

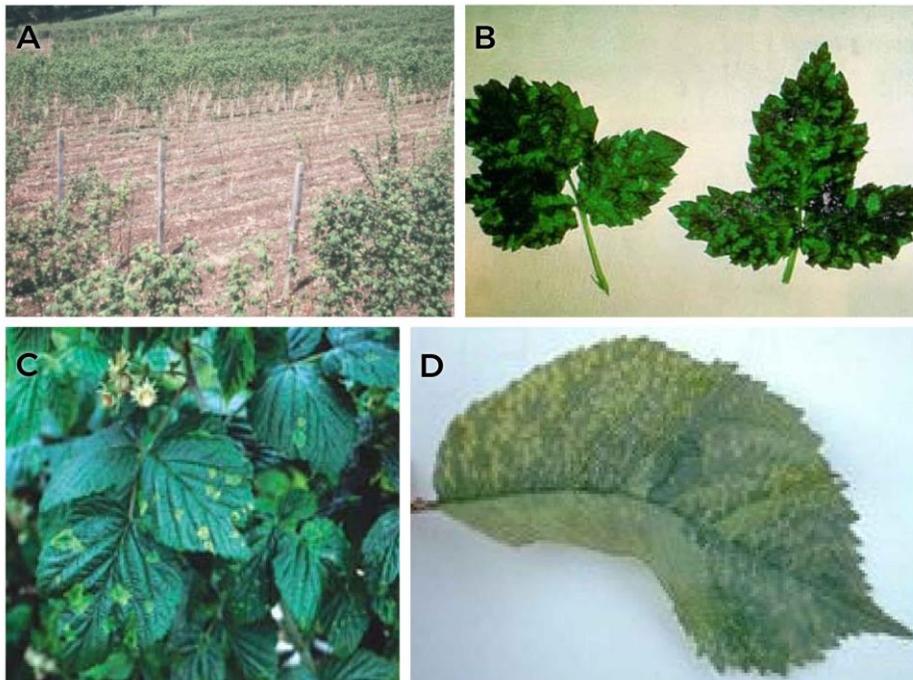
### Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales*, Familia: *Secoviridae*, Subfamilia: *Comovirinae*, Género: *Nepovirus*, **Especie:** *Raspberry ringspot virus*

(ICTV, 2021)

## SÍNTOMAS

Este virus afecta principalmente a frambuesa y fresa. Se observaron síntomas como enrollamiento de la hoja, mancha clorótica y enanismo, (Nisio *et al.*, 1981). Las hojas de *Rubus* spp. presentan manchas en anillo y un rizado evidente hacia el envés. Los tallos son quebradizos y de pequeño tamaño. Los cultivares susceptibles a menudo mueren a los dos años tras presentar los primeros síntomas. En *Fragaria* spp. se han observado síntomas de moteado, similares a los producidos por *Arabid mosaic virus* (ArMV). En frambuesa se ha observado en hojas colores, formas y patrones anormales, frutos con forma anormal, planta entera con enanismo y toda la planta puede estar muerta o en muerte regresiva (Figura 1).



**Figura 1.** Síntomas causados por *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) A) Efecto del ataque en *Rubus idaeus* (frambueso), B) Moteado en *Fragaria* sp (fresa). Fuente: Scottish Horticultural Research Institute , C) En hoja de frambueso y D) Daños en *Prunus avium* (cerezo) Fuente: [www.ext.vt.edu](http://www.ext.vt.edu)

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular que se emplea para el diagnóstico preciso de RpRSV es: 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  $A_{260}/280$  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 %. 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 RpRSV y gen endógeno 18S mediante RT-PCR

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5´- 3´)	Tamaño del amplicón	Ensayo
18S Fw	ACGGATCGCACGGCCTTCGTG	300 pb	Gen Endógeno
18S Rv	ACCAGACTTGCCCTCCAATGG		
RpRSV-F1	TGTGTCTGGCTTTTGATGCT	385 pb	RpRSV
RpRSV-R1	GAGTCCGATAGGGGCTGTT		

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 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
18S Fw	10 µM	0.2 µM	0.4
18S 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 RpRSV

### Reacción de RT-PCR en dos pasos

Para la detección del virus RpRSV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en dos pasos, se utilizarán los *primers* (RpRSV -F1/ RpRSV -R1) diseñados por Ochoa *et al.*, 2005. Los cuales se hibridan a una región del RNA que codifican para el gen de la cápside (Cuadro 1).

## Síntesis de cDNA

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 RpRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
RNA	100-50 ng/ μL	20-10 ng/ μL	2
Buffer de 5x	5X	1X	2
Inhibidor de RNA	40 U/μL	20 U/Rxn	0.5
RpRSV R1	10 μM	2 μM	2
Agua ° PCR			1.5
Volumen subtotal			<b>8</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
70 °C	10 minutos	1

3) Realizar la mezclara de reacción del Cuadro 8 y complementar con la mezcla de reacción anterior:

**Cuadro 8.** Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para RpRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
DTT	100 mM	10 mM	1
Inhibidor de RNA	40 U/μL	10 U/Rxn	0.25
dNTP's	10 mM	0.5 mM	0.5
RT M-MLV	200 U/μL	50 U/Rxn	0.25
Volumen subtotal			<b>2</b>

Nota: el volumen final de la RT queda de 10 uL.

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

**Cuadro 9.** Programa térmico para la síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	60 minutos	1

## PCR punto final

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 10:

**Cuadro 10.** Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final para RpRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1 reacción
Buffer de PCR	10X	1X	2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5mM	0.6
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4
RpRSV F1 µM	10 µM	0.5 µM	1
RpRSV R1 µM	10 µM	0.5 µM	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.5 U/Rxn	0.1
cDNA			2
Agua ° PCR			12.9
Volumen final			<b>20</b>

2) Incubar la mezcla de reacción con las siguientes temperaturas (Cuadro 11):

**Cuadro 11.** Programa de termociclaje para la detección de RpRSV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	35
Alineamiento	61 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 minutos	
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 90-100 V 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 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.

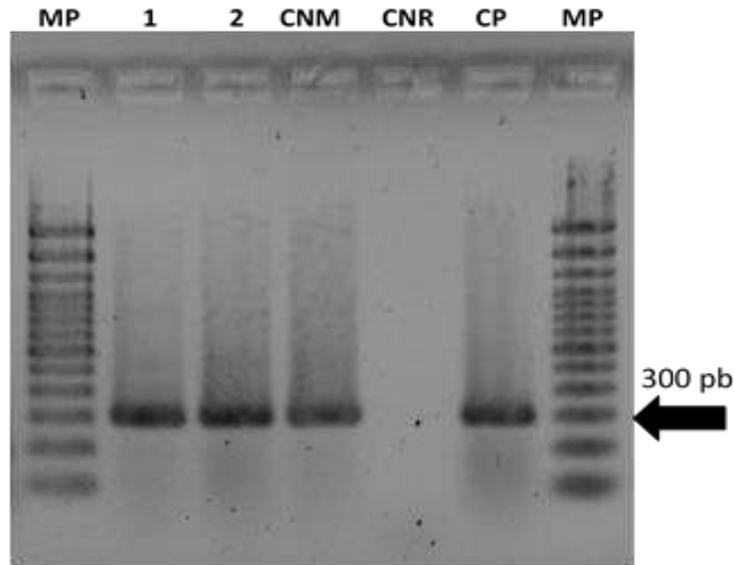
**Control negativo de matriz (CNM):** este control corresponde a un extracto de matriz sin el virus (hospedero). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**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 amplicón (Figura 2).
- En el ensayo para la detección de RpvRSV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un amplicón de 385 pb, aproximadamente (Ochoa *et al.*, 2005).



**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.

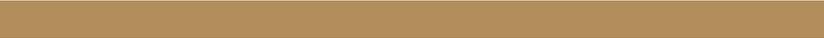
## Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 385 pb con los *primers* específicos RpRSV -F1/ RpRSV -R1.

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

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 *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), 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 RpRSV, 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

- Cadman, C.H. 1956. Studies on the etiology and mode of spread of Scottish raspberry leaf curl disease. *Journal of Horticultural Science* 31, 111.
- 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).
- Ochoa-Corona, F. M, Lebas, B. S. M., Tang, J., Bootten, T. J., Stewart, F. J., Elliott, D. R. and Alexander, B. J. R. 2005. Diagnosis and strain typing of Pepino mosaic virus and *Raspberry ringspot virus* by RT-PCR and SSCP. The 15th biennial Australasian plant pathology society conference handbook; p 259.
- Debrot, E.A. 1964. Studies on a strain of *Raspberry ringspot virus* occurring in England. *Annals of Applied Biology* 54: 183-191.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- EPPO (s.f.). *Raspberry ringspot nepovirus*. Data Sheets on Quarantine Pests. Disponible en línea con actualizaciones en [https://gd.eppo.int/download/doc/232\\_datasheet\\_RPRSV0.pdf](https://gd.eppo.int/download/doc/232_datasheet_RPRSV0.pdf). (revisado el 18/01/2021).
- Harrison, B.D. 1964. Specific nematode vectors for serologically distinctive forms of raspberry ringspot and tomato black ring viruses. *Virology* 22: 554-550.
- Nishio, K., A. Kawai. and T. Kobayashi. 1981. Raspberry ringspot virus detected in anemone imported from Holland. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 17: 35-42.
- Taylor, C. E. 1962. Transmission of raspberry ringspot virus by *Longidorus elongatus* (de Man) (Nematoda : Dorylaimidae). *Virology* 17: 493-494.
- Zamboni A, Pierantoni L, and 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 RpRSV, 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: *Raspberry ringspot virus* (RpRSV). 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 (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”