

# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

*Tobacco ringspot virus (TRSV)*



**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: Síntomas asociados a la presencia de TRSV (Kundu *et al.*, 2015)

# ÍNDICE

**Pág.**

GENERALIDADES .....	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Nombres comunes:.....	1
SÍNTOMAS.....	1
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 TRSV.....	6
Reacción de RT-PCR anidada .....	6
Ensayo para la detección específica de TRSV (PCR anidada)...	7
Electroforesis.....	8
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados.....	8
Identificación de plaga .....	9
REFERENCIAS .....	10
AVISO.....	11



# Tobacco ringspot virus (TRSV)

## GENERALIDADES

El virus asociado a la enfermedad de la mancha anular del tabaco (TRSV) se reportó en tabaco, en Virginia en la década de 1920. TRSV es el miembro tipo del género *Nepovirus* dentro de la familia *Secoviridae*. Su genoma es ssRNA es bipartito y encapsulado en partículas de aproximadamente 28 nm (Tolin, 2008). Se transmite en la naturaleza por el vector nematodo *Xiphinema americanum* y especies de *Xiphinema* estrechamente relacionadas, adicionalmente, el virus se transmite por semilla, polen y por inoculación mecánica. Los cultivos más afectados por el TRSV son la soya (*Glycine max*), vid (*Vitis vinifera*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) y, en menor medida, tabaco (*Nicotiana tabacum*), varias plantas ornamentales y Cucurbitáceas. Sin embargo, presenta un riesgo significativo para *Vaccinium* y *Vitis*. Se ha reportado la presencia de TRSV en muchas partes del mundo. El virus se ha reportado en plantas ornamentales, pero la mayoría de estos informes se asociaron con el movimiento de material y se caracteriza por numerosas cepas e infecta un gran número de plantas hospedantes en al menos 30 familias botánicas (EPPO, 2017).

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Posición taxonómica, Dominio: *Riboviria*, Orden: *Picornavirales*, Familia: *Secoviridae*, Género: *sin designer*, **Especie:** *Tobacco ringspot virus* (ICTV 2021).

### Nombres comunes:

Virus de la mancha anular del tabaco, virus de la necrosis de anémona, virus de la mancha anular necrótica del arándano (español).

**Acrónimo en virus:** TRSV

## SÍNTOMAS

La mancha anular del tabaco describe la enfermedad porque se producen anillos cloróticos o necróticos en la hoja, a menudo formando un patrón de "hoja de roble". Las plantas de tabaco expresan síntomas en tres o cuatro hojas que se desarrollaron después de la inoculación, pero no en las hojas que se desarrollaron más tarde (Figura 1) (Kundu *et al.*, 2015). En campo, las plantas de arándano infectadas pueden aparecer solas o agrupadas. La mancha anular puede ocurrir en las hojas y se puede observar retardo en

la brotación y/o floración, reducción de tamaño, brotes en forma de roseta con la presencia de entrenudos cortos, presencia de ramas o plantas secas (en este caso muestrear las plantas con follaje verde más cercanas), en hojas jóvenes pueden presentarse distintos grados de mosaicos, ser alargadas, deformes con lesiones necróticas de 2 mm de diámetro (Figura 2) (Fuchs *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Síntomas asociados a la presencia de TRSV. A) Anillos y patrones cloróticos en hojas de *Impatiens walleriana*, C) lesiones cloróticas concéntricas locales, anillos necróticos posteriores y sistémicos deformación de la hoja y enanismo en *Nicotiana bentham* (Kundu *et al.*, 2015)



**Figura 2.** Síntomas foliares del virus TRSV en arándano cv. Patriota. A) Muerte regresiva apical y defoliación de rama en comparación con (B) Una planta asintomática (Fuchs *et al.*, 2010).

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular que se emplea para el diagnóstico preciso de TRSV 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 % 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

### 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 TRSV 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		
RT primer	GTGTTGGACAAACACGACAC		
1st PCR F	GGAAGCTGTATAAACTCAGC	338 pb	TRSV
1st PCR R	GTGTTGGACAAACACGACAC		
2ndPCR F	GGTTATCCAGCCTTAAGCAAG	257 pb	
2ndPCRR	GAACAGTGGGCTCAAACAAC		

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		Volumen 1X (µL)
	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
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 TRSV

### Reacción de RT-PCR anidada

Para la detección del virus TRSV mediante la técnica de RT-PCR anidada, para enriquecer el cDNA, se utilizará el *primer* (RT primer) posteriormente, para la primera PCR se emplearán los *primers* (1st PCR F/1st PCR R), mientras que para la segunda PCR, los *primers* (2nd PCR F/ 2nd PCR R) diseñados por Martin, 2009. 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 síntesis de cDNA enriquecido para TRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
RNA	100-10 ng/μL	25-2.5 ng/μL	5
RT primer	10 μM	0.625 μM	1
Volumen subtotal			6

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

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

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95 °C	5 minutos	1

- 3) Realizar la siguiente mezcla señalada en el siguiente Cuadro 8 y complementar con la mezcla de reacción anterior,

**Cuadro 8.** Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA enriquecido para TRSV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
Buffer de 5x	5 X	0.5 X	2
dNTP's	10 mM	1.0 mM	2
Inhibidor de RNA	40 U/μL	20 U/Rxn	0.5
RT M-MLV	200 U/μL	100 U/Rxn	0.5
DTT	100 mM	10 mM	2
Agua ° PCR			7
Volumen subtotal			14

**Nota:** el volumen final de la RT es de 20 μL

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

**Cuadro 9.** Programa térmico para la detección de TRSV

Temperatura	Tiempo	Ciclo
37 °C	90 minutos	1

### Ensayo para la detección específica de TRSV (PCR anidada)

En el ensayo de detección de TRSV utilizar los primers mencionados en el Cuadro 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 TRSV.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1 reacción
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
1st PCR F	10 µM	0.4 µM	1
1st PCR R	10 µM	0.4 µM	1
Taq polimerasa	5 U/µL	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA			2.5
Agua ° PCR			16.5
Volumen final			<b>25</b>

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

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

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94 °C	2 minutos	1
94 °C	40 segundos	40
56 °C	40 segundos	
72 °C	1 minutos	
72 °C	4 minutos	1

Para llevar a cabo la segunda PCR se emplea la misma condición de mezcla y termociclaje, señalados en el cuadro 10 y 11, solo se realizan los siguientes ajustes: utilizar los *primers* (2ndPCR/ 2ndPCRR), adicionar 1 µL del producto de PCR obtenido con los *primers* (1st PCR/1st PCRR), ajustar el volumen de Agua ° PCR a 18 µL para una reacción de 25 µL.

## 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.

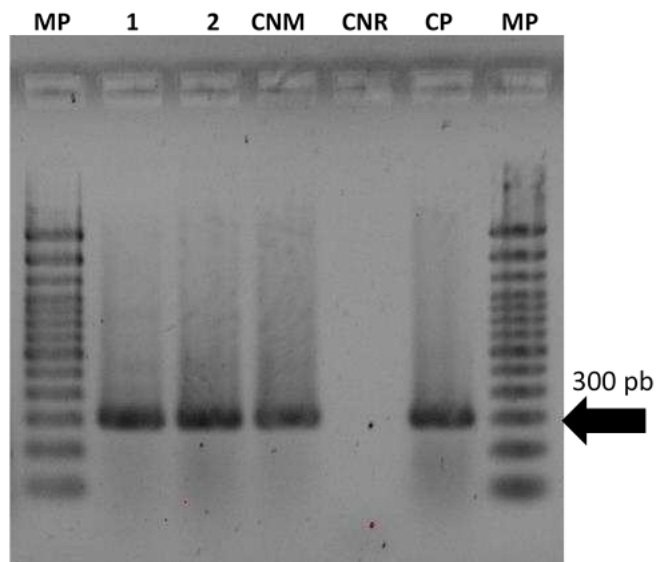
**Control negativo de reactivos (CNR):** es la mezcla de reacción sin molde. Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

## 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 amplicón (Figura 3).

En el ensayo para la detección de TRSV, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un producto de 257 pb, aproximadamente (Martin, 2009).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno. Las muestras presentan un producto de 300 pb, correspondientes al amplicón positivo a 18S. MP: Marcador de peso 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 257 pb con los *primers* específicos (RT primer, 1st PCRF/1st PCRR, 2ndPCRF/ 2ndPCRR).

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

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 *Tobacco ringspot virus* (TRSV), 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 TRSV, 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). 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*: 13-15
- Fuchs M, Abawi GS, Marsella-Herrick P, Cox R, Cox KD, Carroll JE *et al.* 2010. Occurrence of Tomato ringspot virus and Tobacco ringspot virus in highbush blueberry in New York State. *Journal of Plant Pathology* 922: 451-459.
- EPPO, 2017. European and Mediterranean Plant Protection Organization /Organisation Europe enne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. Diagnostics PM 7/2 (2) *Tobacco ringspot virus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 47, 135-145.
- Kundu JK, Gadiou S, Schlesingerova G, Dziakova M and Cermak V. 2015. Emergence of quarantine Tobacco ringspot virus in *Impatiens walleriana* in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 51: 115- 122.
- Martin, R.R., Pinkerton, J.N., Kraus, J. 2009. The use of collagenase to improve the detection of plant viruses in vector nematodes by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 155: 91-95.
- Tolin, S. A. 2008. Virus del tabaco. *Enciclopedia de Virología (Tercera Edición)*,
- 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 TRSV, 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: *Tobacco ringspot virus* (TRSV). 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”