



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO:

Tomato brown rugose fruit virus
(ToBRFV)

(Virus del fruto rugoso café del
tomate)

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO:

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)
(Virus del fruto rugoso café del tomate)



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

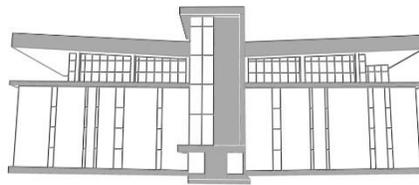
AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO:

**(Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)
(Virus del fruto rugoso café del tomate)**



Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

2022

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA),
[2022]

Todos los derechos reservados.

ÍNDICE

Pág.

1	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	1
1.1	Extracción de ácidos nucleicos	2
1.2	Detección de ToBRFV	2
2	CONDICIONES DE REACCIÓN	4
2.1	Ensayo del Gen endógeno (Zamboni <i>et al.</i> , 2008)	4
2.2	Protocolos para la detección de ToBRFV	7
2.2.1	RT-PCR punto final (Rodríguez <i>et al.</i> , 2019)	7
2.2.2	RT-PCR punto final (Alkowni <i>et al.</i> , 2019)	9
2.2.3	RT-qPCR (Menzel y Winter, 2021)	11
2.2.4	RT-qPCR múltiplex (<i>International Seed Federation</i> , 2020)	13
3	REFERENCIAS	15

1 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

En los últimos años, la producción de tomate se ha visto afectada debido a la presencia de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), un virus emergente de gran importancia que es capaz de infectar variedades resistentes de tomate. En México, la detección de ToBRFV se lleva a cabo siguiendo el protocolo de diagnóstico elaborado por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, el cual contempla la identificación molecular del patógeno mediante RT-PCR punto final con ayuda del par de *primers* ToBRFV-F/ToBRFV-R (Rodríguez *et al.*, 2019).

Debido a la incertidumbre sobre la presencia de la plaga a nivel mundial y la propagación debida a la comercialización de productos contaminados, la Unión Europea emitió el Reglamento de Ejecución 2020/1191, en el que establece las medidas para evitar la introducción y propagación de ToBRFV en territorio europeo. En dicho documento, se especifican los métodos de análisis para detectar e identificar la plaga a partir de semillas y muestras vegetales para plantación (**Cuadro 1**).

Con el objetivo de cumplir con lo solicitado por la Unión Europea, el CNRF realizó la actualización de los procedimientos de diagnóstico para la detección molecular de ToBRFV mediante RT-PCR punto final, RT-qPCR y RT-qPCR múltiplex. Las técnicas descritas en el presente documento se han utilizado en tejido vegetal de Solanáceas (tomate y chile), tanto en muestras de follaje como semillas.

Para el caso de muestras de tejido foliar, el diagnóstico se realiza a partir de las nervaduras centrales de las hojas. Cuando la muestra está formada por semillas, estas se deben acondicionar para su germinación, o bien, pueden analizarse directamente sin germinar cuando se utilice un método de detección más sensible (RT-qPCR). La toma de decisión de la metodología a emplear dependerá del producto y reglamentación vigente, según corresponda.

El diagnóstico de ToBRFV debe basarse en un método integrado confiable, por lo que la emisión de un resultado positivo debe estar sustentada en, al menos, dos técnicas incluidas en este documento.

Cuadro 1. Métodos de detección de ToBRFV solicitados por la Unión Europea.

Tejido	Método de Detección	Autor
Semillas	RT-qPCR	<i>International Seed Federation</i> (2020)
		Menzel y Winter (2021)
Vegetales para plantación	RT-PCR convencional	Rodríguez <i>et al.</i> (2019)
		Alkowni <i>et al.</i> (2019)
	RT-qPCR	<i>International Seed Federation</i> (2020)
		Menzel y Winter (2021)

1.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realiza a partir de 0.1 gramos de tejido de la muestra, siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante del kit de extracción empleado (Cuadro 2).

Al finalizar el proceso de extracción, es importante verificar la pureza y cantidad del RNA obtenido. La pureza óptima del RNA está dada por la relación de absorbancia $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$ y $A_{260}/A_{230}=2.0-2.2$. Para corroborar que el RNA obtenido no presenta contaminantes que inhiban la amplificación por PCR, se debe realizarse un ensayo de control de gen endógeno.

Cuadro 2. Métodos de extracción sugeridos por tipo de tejido.

Tejido	Método de Extracción
Follaje vegetal	SV Total RNA Isolation System (Promega, catálogo Z3105).
Plántulas	
Semillas sin germinar	RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, catálogo 74904).

1.2 Detección de ToBRFV

La detección de ToBRFV puede realizarse mediante RT-PCR, RT-PCR múltiplex o RT-qPCR, dependiendo de la disponibilidad de reactivos, el tipo de muestra, así como el origen y/o destino de las mismas. Las secuencias de todos los *primers* utilizados para la detección molecular de ToBRFV se muestran en el Cuadro 3.

Los productos de amplificación obtenidos mediante reacciones punto final se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, empleando un voltaje de 90-95 V durante el tiempo requerido para asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de tamaño molecular. Al finalizar, los geles se tiñen en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

Cuadro 3. *Primers* empleados para la detección de ToBRFV mediante RT-PCR y sus variantes.

Nombre	Secuencia	Región blanco	Tamaño del amplicón	Ensayo
ToBRFV-F	AACCAGAGTCTTCCTATACTCGGAA	RdRp	475 pb	RT-PCR punto final ⁽¹⁾
ToBRFV-R	CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT			
ToBRF-F-Alk	AATGTCCATGTTTGTTACGCC	RdRp	560 pb	RT-PCR punto final ⁽²⁾
ToBRF-R-Alk	CGAATGTGATTTAAACTGTGAAT			
ToBRFVqs1	CAATCAGAGCACATTTGAAAGTGCA	CP	96 pb	RT-qPCR ⁽³⁾
ToBRFVp1	FAM - ACAATGGTCCTCTGCACCTG - BHQ1			
ToBRFVqas2	CAGACACAATCTGTTATTTAAGCATC			
CaTa28-Fw	GGTGGTGCAGTGCTGTTT	MP	140 pb	RT-qPCR múltiplex ⁽⁴⁾
CaTa28-Pr	FAM - AGAGAATGGAGAGAGCGGACGAGG - BHQ1			
CaTa28-Rv	GCGTCCTTGGTAGTGATGTT			
CSPI3251 Fw	CATTTGAAAGTGCATCCGGTTT	CP	101 pb	RT-qPCR múltiplex ⁽⁴⁾
CSPI325 Pr	HEX-ATGGTCCTCTGCACCTGCATCTTGAGA - BHQ1			
CSPI325 Rv	GTACCACGTGTGTTTGCAGACA			

NOTA: 1) Rodríguez *et al.*, 2019. 2) Alkowni *et al.*, 2019. 3) Menzel y Winter, 2021. 4) International Seed Federation (ISF), 2020.

2 CONDICIONES DE REACCIÓN

2.1 Ensayo del Gen endógeno (Zamboni *et al.*, 2008)

El ensayo de gen endógeno consiste en la amplificación, mediante RT-PCR, de un fragmento del gen 18S ribosomal del hospedante para descartar falsos negativos debidos a inhibidores en la muestra de RNA. El ensayo se realiza en dos pasos: 1) síntesis de cDNA mediante retrotranscripción (RT) de una hebra molde de RNA y 2) amplificación del cDNA mediante PCR.

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
18S Fw	5'- ACGGATCGCACGGCCTTCGTG -3'	300 pb
18S Rv	5'- ACCAGACTTGCCCTCCAATGG -3'	

Síntesis de cDNA

a) Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)
Buffer de PCR	10 X	2
MgCl ₂	50 mM	2
dNTPs	10 mM	2
Random Hexamers	50 μM	0.5
Transcriptasa reversa M-MLV	200 U/ μL	0.25
RNase OUT	40 U/ μL	0.5
RNA	100 ng/ μL	5
Agua grado Biología Molecular	----	7.75
Volumen total		20

b) Condiciones de reacción

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (minutos)	Ciclos
42	30	1
99	5	1
12	∞	1

Amplificación mediante PCR

a) Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)
Buffer PCR	10 x	2.5
MgCl ₂	50 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.5
18S Fw	10 μM	1
18S Rv	10 μM	1
Taq DNA Pol	5 U/ μL	0.25
cDNA	---	1
Agua grado Biología Molecular	---	18
Volumen total		25

b) Condiciones de amplificación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	90 segundos	1
Desnaturalización	94°C	40 segundos	30
Alineamiento	55°C	40 segundos	
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	3 minutos	1

Resultados

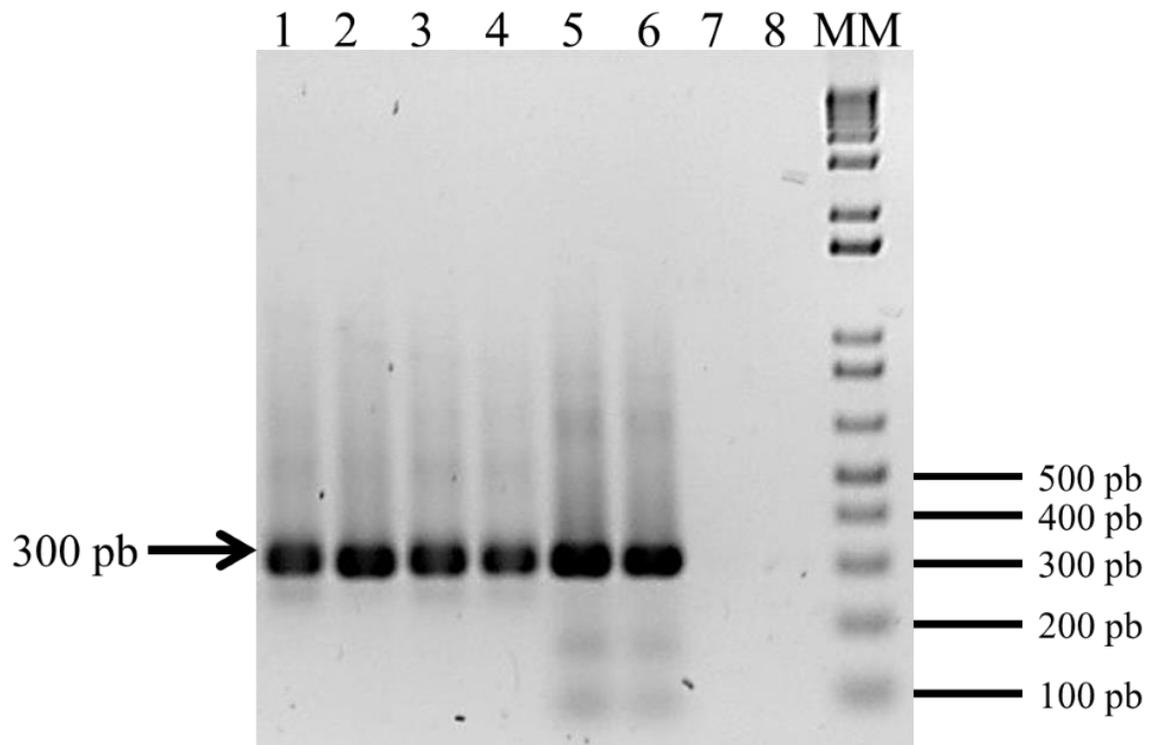


Figura 1. Resultados del ensayo del gen endógeno 18S. 1-4) muestras con amplificación positiva; 5-6) control positivo para 18S; 7-8) control negativo de reactivos; MM) marcador de tamaño molecular 1 kb plus (Invitrogen).

2.2 Protocolos para la detección de ToBRFV

2.2.1 RT-PCR punto final (Rodríguez et al., 2019)

La reacción de RT-PCR se realiza en dos pasos; para ello, se utiliza el cDNA generado durante el ensayo de gen endógeno (Sección 2.1), el cual debe haber sido almacenado a 4°C hasta su uso.

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
ToBRFV-F	AACCAGAGTCTTCCTATACTCGGAA	475 pb
ToBRFV-R	CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT	

Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix	2X	12.5
ToBRFV-F	10 µM	1.25
ToBRFV-R	10 µM	1.25
SuperFi™ GC Enhancer	5X	5.0
cDNA	---	2.0
Agua grado Biología Molecular	---	3.0
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	90 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	
Alineamiento	55°C	20 segundos	35
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Resultados

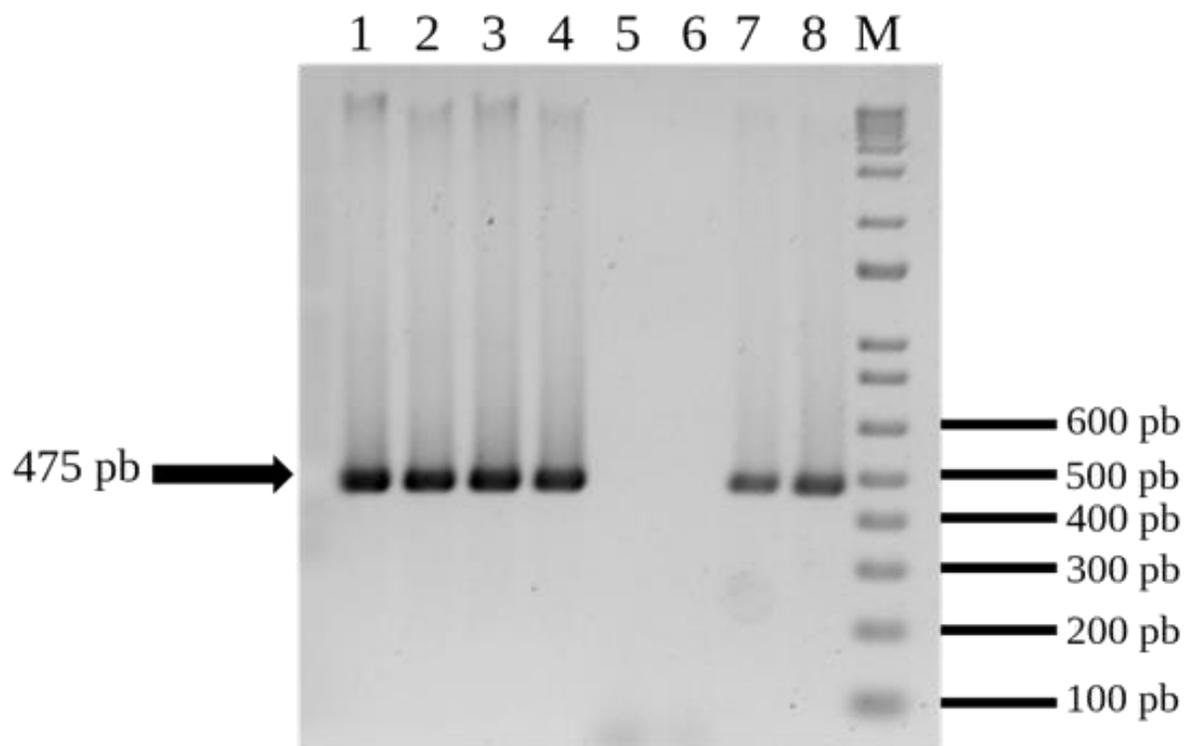


Figura 2. Resultados de la detección de ToBRFV mediante RT-PCR con *primers* ToBRFV-F/ToBRFV-R. 1-4) muestras con amplificación positiva; 5) control negativo de matriz; 6) control negativo de reactivos 7-8) control positivo para ToBRFV (clona); M) marcador de tamaño molecular 1 kb plus (Invitrogen).

2.2.2 RT-PCR punto final (Alkowni *et al.*, 2019)

La reacción de RT-PCR se realiza en dos pasos; para ello, se utiliza el cDNA generado durante el ensayo de gen endógeno (Sección 2.1), el cual debe haber sido almacenado a 4°C hasta su uso.

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
ToBRF-F-Alk	AATGTCCATGTTTGTACGCC	560 pb
ToBRF-R-Alk	CGAATGTGATTTAAACTGTGAAT	

Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 x	2.5
MgCl ₂	50 mM	0.5
dNTPs	10 mM	0.75
ToBRF-F-Alk	10 µM	0.5
ToBRF-R-Alk	10 µM	0.5
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.2
cDNA	---	2.5
Agua grado Biología Molecular	---	17.55
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Alineamiento	58°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

Resultados

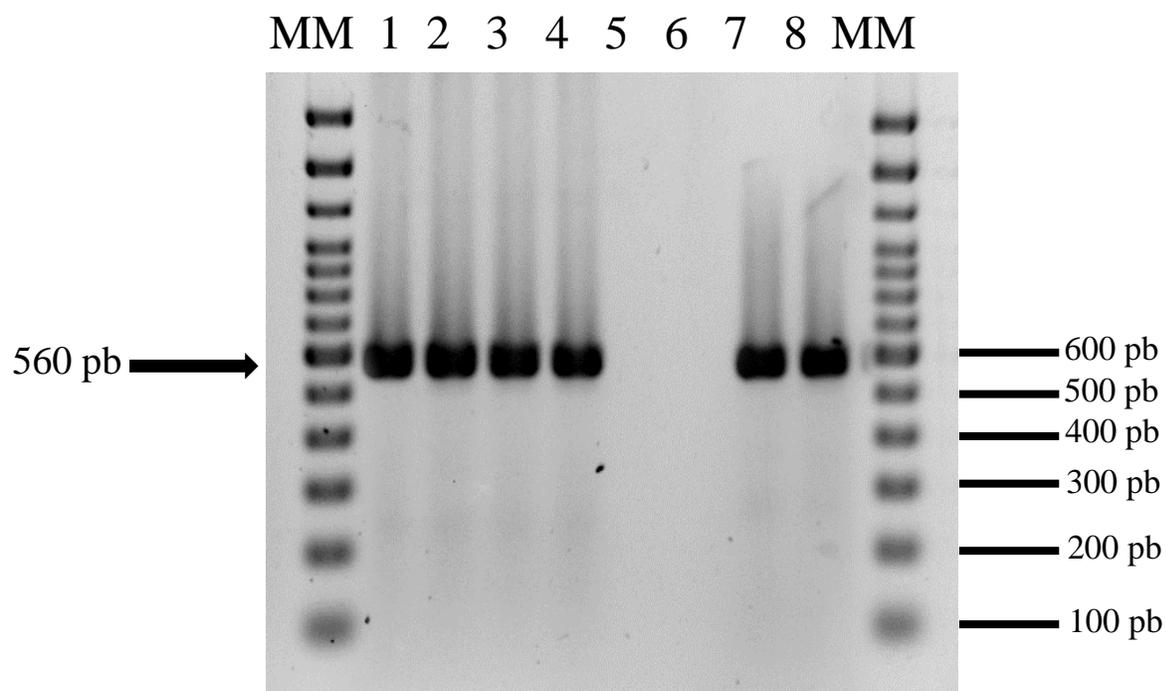


Figura 3. Resultados de la detección de ToBRFV mediante RT-PCR con *primers* toBRF-F-AIk/ToBRF-R-AIk. 1-4) muestras con amplificación positiva; 5) control negativo de matriz; 6) control negativo de reactivos 7-8) control positivo para ToBRFV (clona); MM) marcador de tamaño molecular 100 pb (Invitrogen).

2.2.3 RT-qPCR (Menzel y Winter, 2021)

La reacción de RT-qPCR se realiza en un solo paso, a partir de RNA que haya cumplido con el ensayo de gen endógeno (Sección 2.1).

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
ToBRFVqs1	CAATCAGAGCACATTTGAAAGTGCA	
ToBRFVp1	FAM - ACAATGGTCCTCTGCACCTG - BHQ1	96 pb
ToBRFVqas2	CAGACACAATCTGTTATTTAAGCATC	

Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Reaction Mix Buffer	2X	12.5
SuperScript™ III RT/Platinum <i>Taq</i>	25X	1.0
ToBRFVqs1	10 µM	0.75
ToBRFVqas2	10 µM	0.75
ToBRFVp1	10 µM	0.6
RNA	100 ng/µL	5
Agua grado Biología Molecular	---	4.4
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	52 °C	10 minutos	1
Desnaturalización inicial	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Alineamiento/Extensión	60 °C	60 segundos	

Resultados

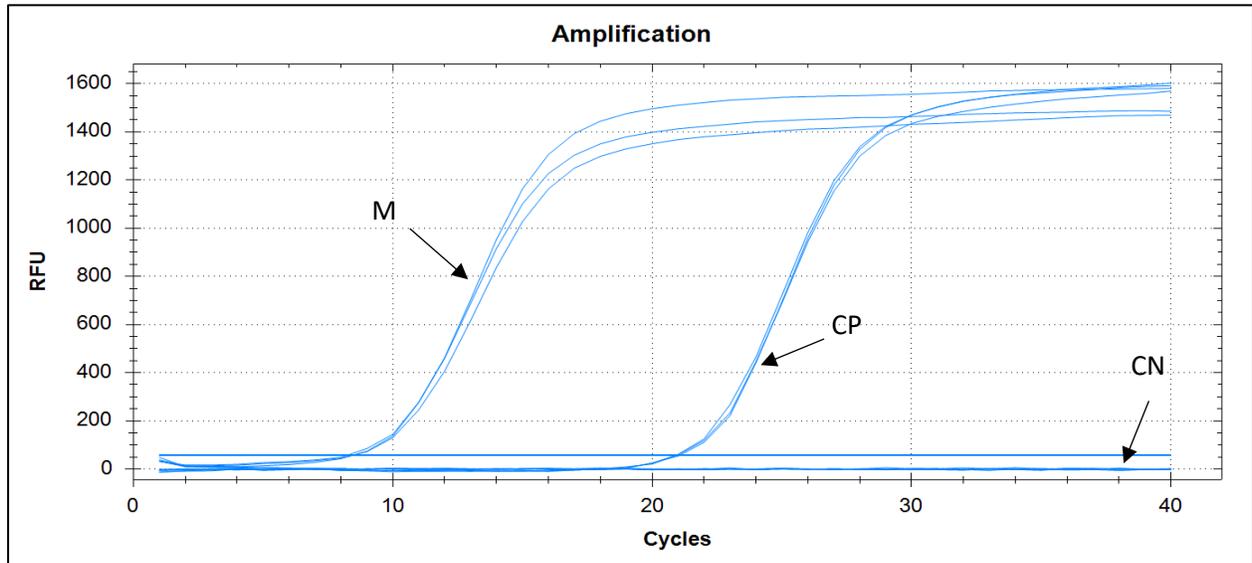


Figura 5. Curvas de amplificación para la detección de ToBRFV mediante RT-qPCR con *primers* ToBRFVqs1/ToBRFVqs2. M) Muestras problema; CP) Control positivo (clona); CN) Controles negativos.

2.2.4 RT-qPCR múltiplex (*International Seed Federation, 2020*)

La reacción de RT-qPCR múltiplex se realiza en un solo paso y permite la identificación de ToBRFV mediante el uso de dos pares de *primers* distintos. La amplificación se lleva a cabo a partir de RNA que haya cumplido con el ensayo de gen endógeno (**Sección 2.1**).

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón
CaTa28-Fw	GGTGGTGTCTAGTGTCTGTTT	
CaTa28-Pr	FAM - AGAGAATGGAGAGAGCGGACGAGG - BHQ1	140 pb
CaTa28-Rv	GCGTCCTTGGTAGTGATGTT	
CSP1325 Fw	CATTTGAAAGTGCATCCGGTTT	
CSP1325 Pr	HEX-ATGGTCCTCTGCACCTGCATCTTGAGA - BHQ1	101 pb
CSP1325 Rv	GTACCACGTGTGTTTGCAGACA	

Reactivos

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)
Reaction Mix Buffer	2X	12.5
SuperScript™ III RT/Platinum <i>Taq</i>	25X	1.0
CaTa28 Fw	10 μM	0.75
CaTa28 Rv	10 μM	0.75
CaTa28 Pr	10 μM	0.5
CSP1325 Fw	10 μM	0.75
CSP1325 Rv	10 μM	0.75
CSP1325 Pr	10 μM	0.5
RNA	100 ng/μL	5
Agua grado Biología Molecular	---	2.5
Volumen total		25

Condiciones de amplificación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	50 °C	15 minutos	1
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	10 segundos	
Alineamiento/Extensión	60 °C	60 segundos	40

Resultados

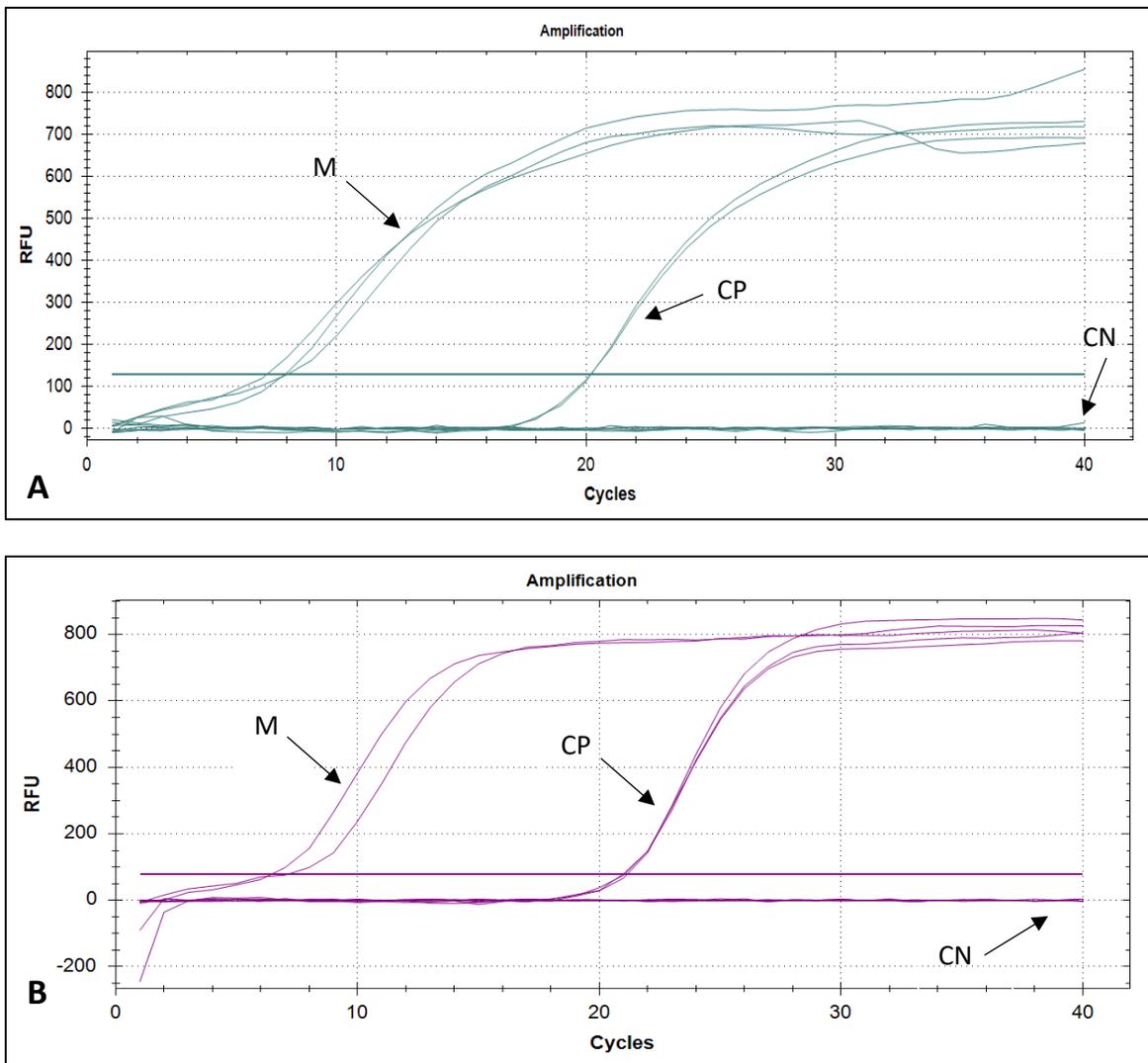


Figura 6. Curvas de amplificación para la detección de ToBRFV mediante RT-qPCR con *primers* CaTa 28 (A) y CSP1325 (B). M) Muestras problema; CP) Control positivo (clona); CN) Controles negativos.

3 REFERENCIAS

- Alkowni, R., Alabdallah, O., Fadda, Z. (2019). Molecular identification of tomato Brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101: 719-723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- International Seed Federation (2020). Detection of infectious Tomato Brown rugose fruit virus (ToBRFV) in tomato and pepper seed. ISHI-Ved.
- Menzel, W. y Winter, S. (2021). Identification of novel and known Tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. *Acta Horticulturae*. DOI: [10.17660/ActaHortic.2021.1316.20](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1316.20)
- Rodríguez-Mendoza, J., García-Ávila, C.J., López-Buenfil, J. A., Araujo-Ruíz, K., Quezada-Salinas, A., Cambrón-Crisantos, J. M. (2019). Identification of Tomato brown rugose fruit virus by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1902-6>.
- 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.

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**

