



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

FICHA TÉCNICA PARA
EL DIAGNÓSTICO DE:
Cherry leaf roll virus
(CLRv)

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Cherry leaf roll virus
(CLRv)





GOBIERNO DE
MÉXICO

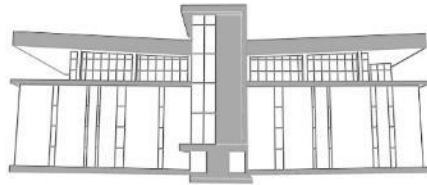
AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Cherry leaf roll virus (CLRV)



Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

2022

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


Todos los derechos reservados.

Imagen de anteportada: *Nicotiana tabacum* 'White Burley' infectado con CLRV, Tomado de Lebas *et al.*, 2016.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades.....	1
Información taxonómica.....	2
SÍNTOMAS.....	2
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	6
Ensayo para la detección específica de CLRV.....	6
Reacción de RT-PCR en un paso.....	6
Electroforesis.....	7
Controles para las pruebas moleculares.....	8



Interpretación de resultados.....	8
Identificación de plaga	10
Corroboración de resultados.....	10
Criterios para el análisis de secuencias Sanger	10
REGISTROS.....	11
REFERENCIAS.....	12
AVISO.....	13

INTRODUCCIÓN

Generalidades

El *Cherry leaf roll virus* (CLRV), es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo, con partículas isométricas de 28 nm de diámetro de silueta angular (Figura 1). Los viriones se encuentran en el citoplasma de células de hojas, raíces, tubos polínicos, óvulos y semillas. Sus hospedantes son el nogal (*Juglans regia*), olmo (*Ulmus minor*), Cerezo (*Prunus* spp.), Olivo (*Olea* spp.), Abedul (*Betula* spp.), Zarzamora (*Rubus* spp.) (Desvignes, 1999), también se reporta en Kiwi (*Actinidia chinensis*), Hortencia (*Hydrangea macrophylla*), Manzano (*Malus domestica*), Llantén mayor (*Plantago major*), Grosellero (*Ribes rubrum*), Frambuesa (*Rubus idaeus*) y Romaza (*Rumex* spp.), recolectados en Nueva Zelanda entre 2005 y 2012 (Lebas et al., 2016). Esta distribuido en América del Norte, Europa, Cuenca del Mediterráneo, Norte de Asia, Australia y Nueva Zelanda. Se transmite por nematodos del género *Xiphinema*, por injerto y se ha descrito transmisión por semilla y polen. Experimentalmente se ha reportado transmisión por inoculación mecánica (Bertolini et al., 2003).

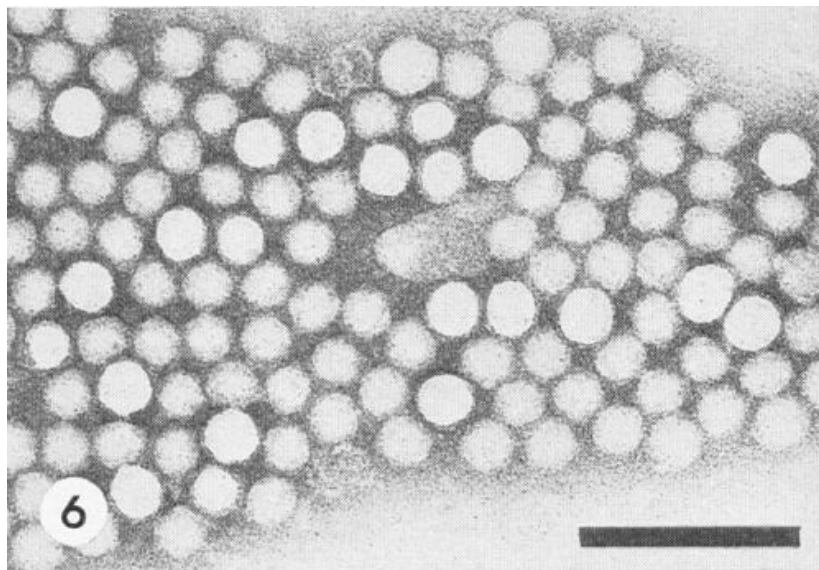


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra partículas isométricas de CLRV teñidas con ácido fosfotúngstico. La barra representa una escala de 100 nm. Tomado de Jones, 1985.

Información taxonómica

Posición taxonómica: Dominio: Riboviria, Reino: Orthonavirae, Filo: Pisuviricota, Clase: Pisoniviricetes, Orden: Picornvirales, Familia: Secoviridae, Subfamilia: Comovirinae, Género: Nepovirus, Especie: *Cherry leaf roll virus* (ICTV, 2022).

Nombres comunes: hoja enrollada de la cereza de la cereza (leaf roll of cherry).

Sinónimos: Cherry leafroll nepovirus, Cherry leafroll virus, Golden elderberry virus

Acrónimo en virus: CLRV

SÍNTOMAS

Los síntomas de CLRV dependen del hospedante, en el caso de Cerezo (*Prunus* spp.), se presenta el enrollamiento de hojas, disminución de tamaño, formación de rosetas (agrupamiento de hojas debido a entrenudos acortados), enación y en algunos casos hasta la muerte (Lutes y Pscheidt, 2018). En nogal (*Juglans regia*) se observa decaimiento, sobre *J. nigra*, *J. hindsii* y sus híbridos se presenta una línea de necrosis en la zona de injerto. En frambuesa (*Rubus* spp.) se reporta clorosis, mientras que en olmo (*Ulmus minor*) se reporta mosaico foliar. En olivo (*Olea* spp.) es asintomático (Bertolini et al., 1998).

En abedul (*Betula pubescens*), los síntomas de CLRV, aparecen después de la expansión completa de las primeras hojas y después de los brotes primarios en las puntas de las ramas (Figura 2) (Jalkanen et al., 2007).

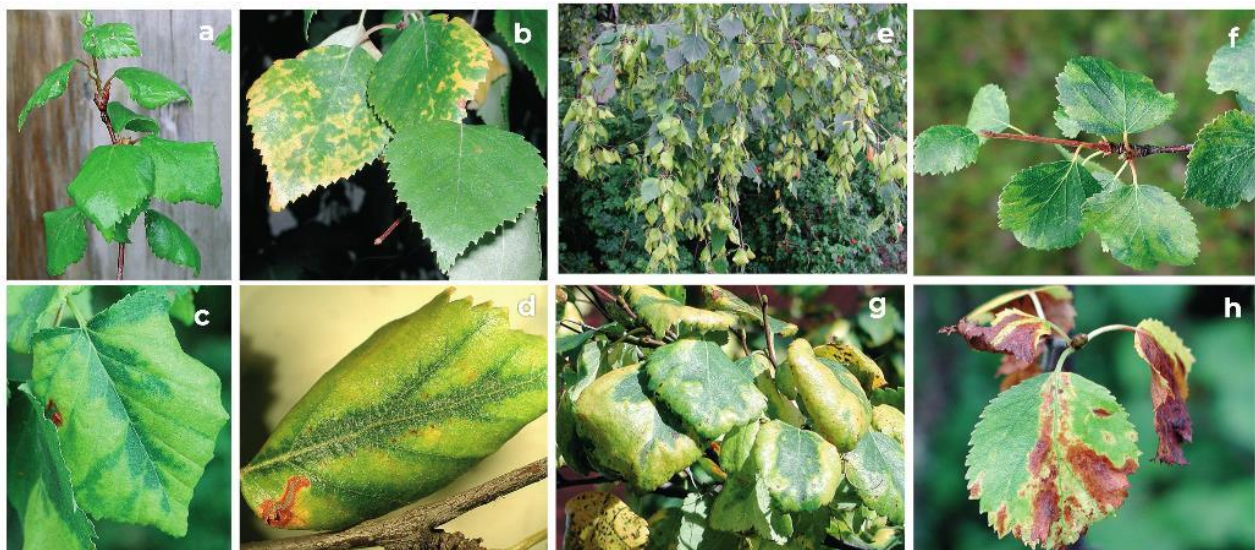


Figura 2. Síntomas del virus del enrollamiento de la hoja del cerezo, CLRV en *Betula pubescens*, a) Síntomas del enrollamiento de las hojas y clorosis que comienza poco después del brote, b) mosaico patrón, c) bandas típicas de venas cloróticas, patrón de líneas y enrollamiento de hojas, d) síntomas de enrollamiento de hojas junto con patrón de líneas, e) clorosis con distribución asimétrica en hojas de *B. pendula*, f) amarillamiento en un brote de *B. pubescens* var. *Czerepanovii*, g) crecimiento foliar hipertrófico, h) lesiones necróticas en hojas. Tomado de Jalkanen *et al.*, 2007.

Por otro lado, arboles infectados de Olivo var. Frantoio y Ascolana, producen menor rendimiento en la producción de aceite aceitunas (Godena *et al.*, 2012).

Lutes y Pscheidt (2018), mencionan que el CLRV provoca un retraso en la floración de cerezo. La infección por el virus, produce una falta de sincronización en tiempo en la maduración produciendo frutos pequeños y de color claro, que a menudo no son comercializables. En algunas especies, como el ruibarbo, la enfermedad es asintomática.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

Debido a que CLRV 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.

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% 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 amplificación 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 *et al.*, 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 CLRV y gen endógeno 18S mediante RT-PCR.

Nombre de los <i>primers</i>	Secuencia (5´ - 3´)	Amplicó n	Ensayo
18S Fw	ACGGATCGCACGGCCTTCGTG	300 pb	gen
18S Rv	ACCAGACTTGCCCTCCAATGG		endógeno
CLRV-3	TGGCGACCGTGTAACGGCA	416 pb	CLRV
CLRV-5	GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG		

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 ₂	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 libre de nucleasas	---	---	7.45
Volumen final			20

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

Cuadro 3. Programa de térmico para la síntesis de cDNA

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

3) Al finalizar el tiempo de incubación, almacenar las muestras a 4 °C.

PCR punto final

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	Concentración	Volumen 1X (μ L)
	Inicial	final	
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP´s	10 mM	0.20 mM	0.5
18S Fw	10 μ M	0.4 μ M	1.0
18S Rv	10 μ M	0.4 μ M	1.0
Taq polimerasa	5 U/ μ L	1.25 U/Rxn	0.25
cDNA	---	---	1.0
Agua libre de nucleasas	---	---	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 18S.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94 °C	90 s	1
Desnaturalización	94 °C	40 s	30
Hibridación	55 °C	40 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	3 min	1

Ensayo para la detección específica de CLRV

Reacción de RT-PCR en un paso

Para la detección del virus CLRV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en un paso, se utilizan los *primers* (CLR-3/ CLR-5) diseñados por Werner *et al.*, 1997. 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 CLRV

Reactivos	Concentración		Volumen (μL)
	Inicial	final	
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.0
DTT	100 mM	5 mM	1.0
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.6
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4
CLRV-3	10 μM	0.5 μM	1
CLRV-5	10 μM	0.5 μM	1
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 libre de nucleasas	---	---	12.65
Volumen final			20

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

Cuadro 7. Programa de termociclaje para la detección de CLRV

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Retrotranscripción	50 °C	30 min	1
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 s	35
Hibridación	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	10 min	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, deben incluir los siguientes controles, por duplicado:

- **Control positivo:** asegura la funcionalidad de los reactivos de RT-PCR y provee una referencia con la cual comparar los resultados positivos. Se trata de DNA plásmidico o RNA genómico de la plaga de interés, los cuales deben estar confirmados mediante secuenciación.
- **Control negativo de reactivos:** se trata de la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

De manera adicional, y en caso de contar con él, se puede incluir un **Control negativo de matriz**, que corresponde a un extracto del tejido del hospedante (matriz) libre del virus. El uso de este control asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

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 3).
- En el ensayo para la detección de CLRv, los controles negativos de reactivos y matriz no deben presentar producto amplificado. El control positivo debe mostrar un fragmento de 416 pb, aproximadamente (Figura 4).

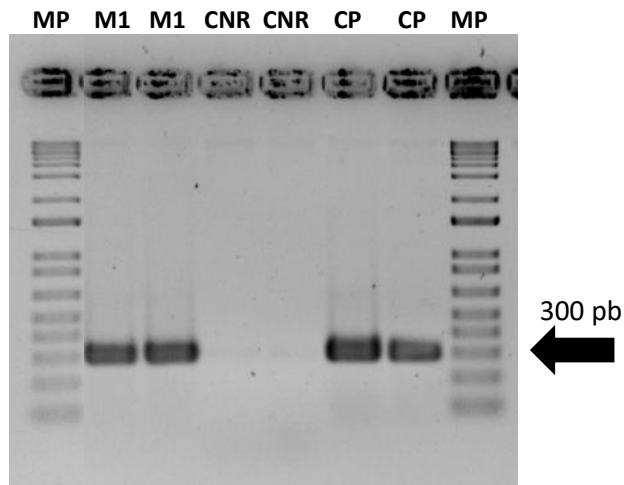


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno. Las muestras presentan un fragmento de 300 pb, correspondientes al amplicón positivo a *18S*. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-2: muestras problema; CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

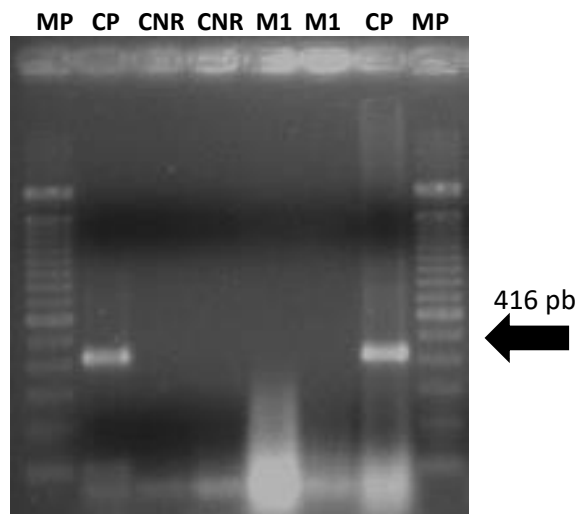


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo de CLRV. El control positivo presenta un fragmento de aproximadamente 416 pb, correspondientes al amplicón positivo a CLRV. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); M1: muestra problema; CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 416 pb con los *primers* específicos CLRV-3/CLR-5.

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

Nota: este documento describe el procedimiento para la detección de *Cherry leaf roll virus* (CLR), mediante RT-PCR en un paso, asegura su aplicación siempre y cuando los ítems extraídos cumplan exitosamente con la prueba del gen endógeno.

Corroboración de resultados


Las muestras con resultado positivo deben someterse a corroboración para asegurar que los fragmentos amplificados corresponden al genoma de CLR. Para ello, es necesario llevar a cabo la Secuenciación Sanger de alguno de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR punto final, cuando se presente alguno de los siguientes casos:

- Se requiere un método confirmatorio de mayor soporte que dé sustento al resultado.
- Primeras detecciones del virus en un nuevo hospedante, producto, clave de combinación, laboratorio aprobado y/o signatario.
- Cuando el área de Laboratorios Aprobados lo solicite, como parte del proceso de supervisión, control y evaluación del desempeño de los laboratorios aprobados (Circular n° 40).

De igual manera, en caso de que el área de Laboratorios Aprobados así lo solicite, los datos de secuenciación originales (en formato .ab1) deberán enviarse y ser canalizados al laboratorio de Virología del CNRF para su análisis y corroboración.

Criterios para el análisis de secuencias Sanger

Las secuencias genéticas obtenidas deben ser revisadas con ayuda de algún programa de edición de secuencias para eliminar las regiones iniciales y/o finales que presenten baja calidad en las lecturas y generar una secuencia consenso que contenga la mayor información posible. Las secuencias consenso deben analizarse mediante un



alineamiento por comparación con la herramienta BLASTn (NCBI, 2022), para determinar su identidad.

Para considerar que una secuencia corresponde al genoma del patógeno de interés, el alineamiento debe generar, al menos, el 95 % de identidad y 95 % de cobertura con alguna de las secuencias de referencia, así como presentar un *E value* igual o menor a cero.

REGISTROS

Mantener los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de CLRV, 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

- Bertolini, E., Fadda, Z., García, F., Celada, B., Olmos, A., Gorris, M.T., Del Río, C., Caballero, J., Durán-Vila, N. y Cambra, M. (1998). Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma España* 102: 191-193.
- Bertolini, E., Olmos, A., López, M.M. and Cambra, M. (2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93: 286-292.
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). (2022). [En línea]. <https://ictv.global/taxonomy> Consultado el 18/11/2022
- Desvignes, J.C. (1999). Virus diseases of fruit trees. CTIFL. Paris. (ISBN: 2-87911-122-6). 202 pp.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Godena S., Bendini A., Giambanelli E., Cerretani L., Dermic D. and Dermic E. 2012. *Cherry leafroll virus*: Impact on olive fruit and virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114: 535–541.
- Jalkanen, R., Büttner, C. & von Barga, S. (2007). Cherry leaf roll virus abundant on *Betula pubescens* in Finland. *Silva Fennica* 41(4): 755–762.
- Jones A. T. (1985) Descriptions of Plant Viruses. Cherry leaf roll virus. Ed Murrant, A.F and Harrison, B.D. Set 19, no 196-309. [En línea]. <https://www.dpwweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=80>
- Lutes L.A y Pscheidt J.W. (2018). Primer informe del virus del enrollamiento de la hoja de la cereza en Sweet Cherry en Oregon. *Enfermedades de las plantas* 102:691. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1168-PDN>
- Lebas, B.S.M, Veerakone, S., Liefting, L.W., Tang, J., Perez-Egusquiza, Z. Von B. S. and Ward, L. (2016). Comparison of diagnostic techniques for the detection and differentiation of *Cherry leaf roll virus* strains for quarantine purpose. *Journal of virological methods* 234:142-151 DOI: - 10.1016/j.jviromet.2016.04.015.
- Zamboni, A., Pierantoni L. and De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other Woody-plants. *iForest Biogeosciences and Forestry*, 1:122-125.
- Werner, R., Mühlbach, H. P. and Büttner, C. 1997. Detection of Cherry leafroll nepovirus (CLRNV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest pathology* 27:309-318

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de CLRV, 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. 2022. Ficha Técnica de Diagnóstico de: *Cherry leaf roll virus* (CLRV). Tecámac, México: Autor.

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

Dr. Angel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa de Departamento de Fitopatología	Revisó
M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna Coordinadora del Laboratorio de Virología	Revisó y elaboró
Dra. Leticia Robles Yerena Técnico del Laboratorio de Virología	Elaboró

CONTACTO

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 gob.mx/senasica

