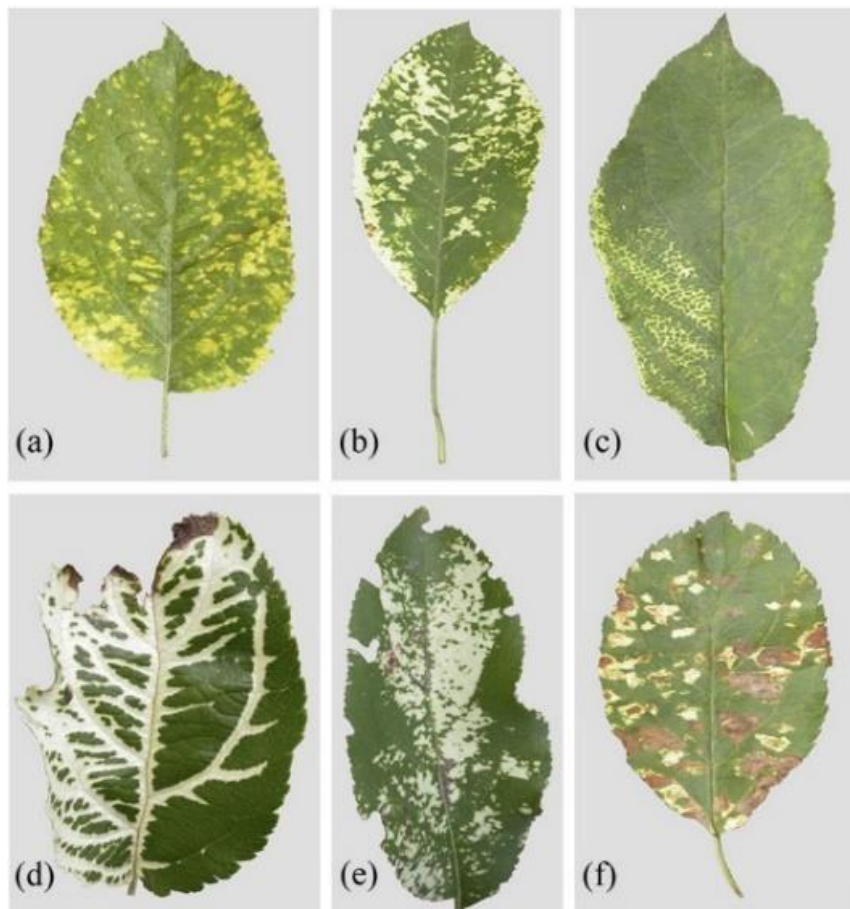


FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Apple mosaic virus (ApMV)



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 con la infección por ApMV (Grimová *et al.*, 2016)

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Acrónimo en virus	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS.....	2
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
Técnicas moleculares.....	4
Toma de muestra y Extracción de RNA.....	4
Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría.....	4
Ensayo de Gen Endógeno.....	5
Síntesis de cDNA con <i>primers</i> específicos.....	5
PCR punto final	6
Ensayo para la detección específica de ApMV	7
Reacción de RT-PCR en un paso	7
Electroforesis.....	8
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados	8
Identificación de plaga	10
REGISTROS	10
REFERENCIAS	11
AVISO.....	12

Apple mosaic virus (ApMV)

GENERALIDADES

El virus asociado a la enfermedad del mosaico de la manzana (ApMV) es miembro del género *Ilarvirus* (familia *Bromoviridae*), partícula isométrica baciliforme entre 26 nm y 29 nm de diámetro. Tienen una organización del genoma de ARN tripartito monocatenario de sentido positivo compuesta de ARN1, ARN2 y ARN3 (Bujarski *et al.*, 2012). ApMV infecta una amplia variedad de huéspedes herbáceos y leñosos (Manzano y otras especies de *Malus*, *Prunus*, avellano, frutales de hueso como albaricoquero, almendro, ciruelo, cerezo y melocotonero, rosal, frambueso y otras rosáceas y lúpulo), causando enfermedades de importancia económica. ApMV es transmisible por injerto y persisten en el material propagado vegetativamente de los árboles infectados (Kinoti *et al.*, 2018). Se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, sobre todo en aquellos lugares donde se cultivan manzanos (Grimová *et al.*, 2016). La infección por este virus causa una reducción significativa del rendimiento de los cultivos de hasta un 25 % en algunas especies comerciales de *Prunus* (Martelli y Savino, 1997).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Apple mosaic virus

Acrónimo en virus

ApMV

Nombres comunes

Apple infectious variegation virus, Rose infectious chlorosis virus, Rose mosaic virus, European plum line pattern virus, Hop virus A, Birch line pattern virus, Horse chesnut yellow mosaic virus (inglés)

Virus del mosaico del manzano, el mosaico de manzana, el mosaico de rosas, el patrón de líneas de ciruela y abedul, el mosaico amarillo castaño de indias y el mosaico de avellana (español)

Posición taxonómica

Dominio: *Riboviria*, Orden: *Martellivirales*, Familia: *Bromoviridae*, Género: *Ilarvirus*, Especie: *Apple mosaic virus*

(ICTV, 2020)

SÍNTOMAS

La expresión de los síntomas es variable y depende de la cepa del virus, la especie del hospedante, pueden a su vez, verse afectada por factores ambientales, especialmente temperaturas más altas que pueden enmascarar los síntomas (Figura 1-3). La infección por ApMV en muchos árboles de *Prunus* se caracteriza por decoloraciones amarillas, patrones de líneas o de hojas de roble y bandas cloróticas de las hojas, pero también puede estar latente (Kinoti *et al.*, 2018). En primavera temprana, las hojas desplegadas de los *Prunus* presentaron áreas amarillo pálido a crema. Las áreas con mosaico pueden ser irregulares o en bandas a lo largo de la nervadura principal y se vuelven amarillo cromado o blancas a medida que progresa la estación. Puede aparecer clorosis de las nervaduras (Grimová *et al.*, 2016).

En ataques severos las hojas se necrosan, caen prematuramente y los brotes tienen aspecto arrosado (Grimová *et al.*, 2016). En damasco, cerezo, ciruelo japonés y durazno presenta síntomas semejantes al *line pattern* del ciruelo, causa manchas foliares cloróticas bien delimitadas de contorno irregular o anguloso, nerviaciones amarillas y clorosis lineal. En algunos cultivares de almendro se produce necrosis de yemas. En hojas de frambueso y otras rosáceas produce manchas necróticas. El ApMV es un virus latente, es decir, infecta a la planta hospedera sin causar desarrollo de síntomas visibles, en algunos casos se relaciona con condiciones ambientales (Agrios, 2005).

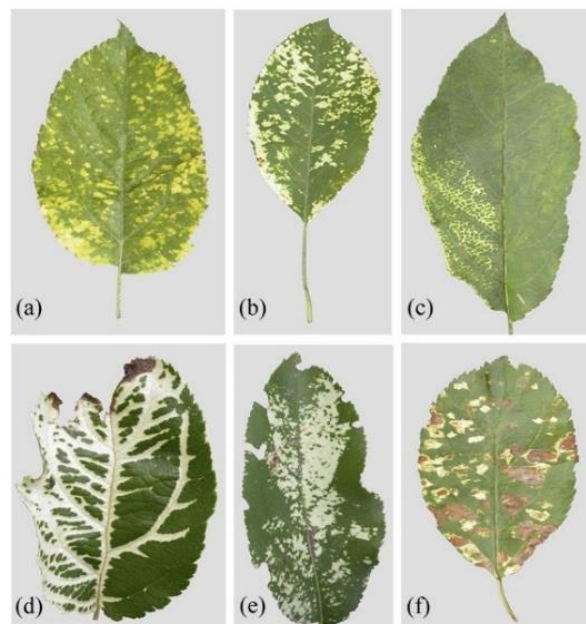


Figura 1. Síntomas asociados con la infección por ApMV en forma de patrones de líneas y/ o anillos en hojas de manzano a-f (Grimová *et al.*, 2016)

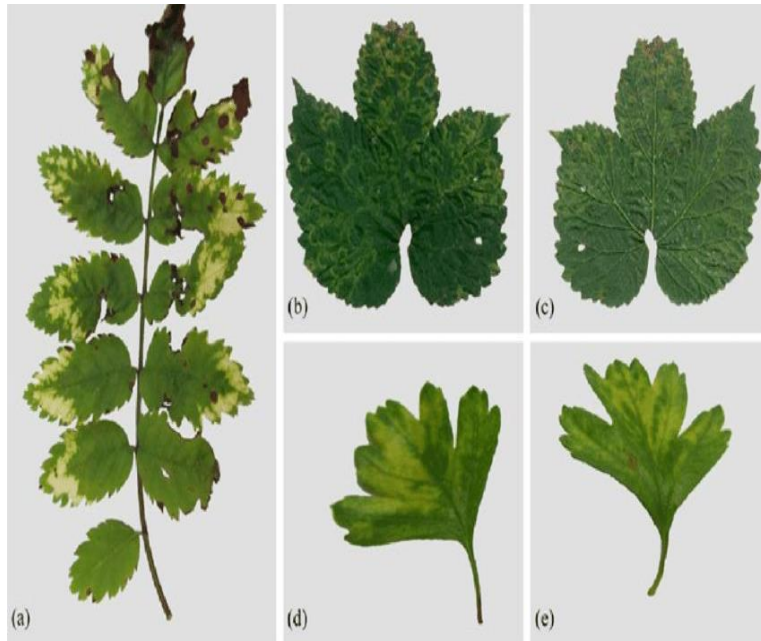


Figura 2. Síntomas asociados con la infección por ApMV en forma de patrones de líneas en hojas de fresno de montaña europeo (a), lúpulo (b y c) y espino (d y e). Fotos (b y c) proporcionadas por el Dr. Petr Svoboda de Hop Research Institute República Checa) (Grimová *et al.*, 2016)

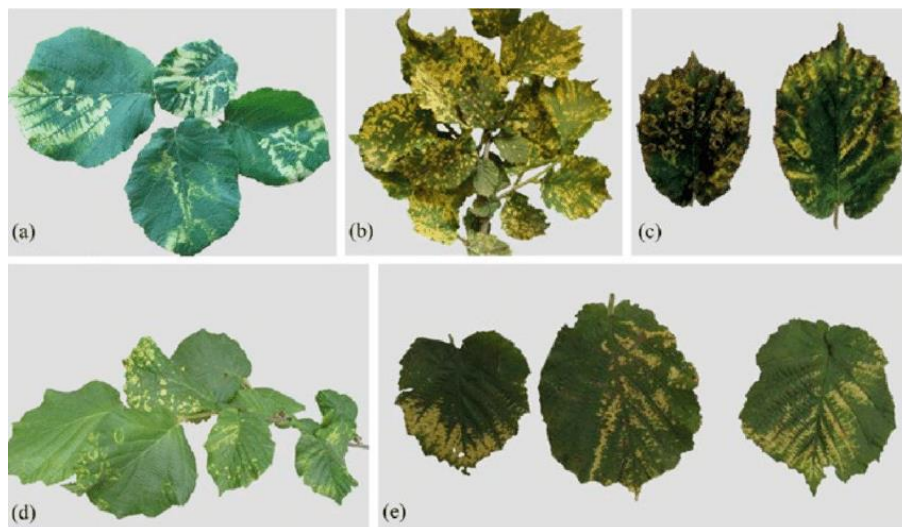


Figura 3. Síntomas asociados con la infección por ApMV en forma de patrones de líneas y / o anillos cloróticos en hojas de avellana. Fotos (a y d) proporcionadas por la Dra. Mercè Rovira del IRTA (Constantí, Turquía) y (b, c y e) proporcionadas por la Dra. Miray Sokmen de la Universidad Ondokuz Mayıs (Samsun, Turquía) (Grimová *et al.*, 2016)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular que se emplea para el diagnóstico preciso de ApMV 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 ApMV 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		
ApMV F	ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA	262 pb	ApMV
ApMVR	GTAACACTCGTTATCACGTACAA		

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 ° PCR	---	---	7.45
Volumen final			20

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

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen IX (µL)
<i>Buffer</i> 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 µM	0.4 µM	1.0
18S Rv	10 µM	0.4 µM	1.0
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/µL	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 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 ApMV

Reacción de RT-PCR en un paso

Para la detección del virus ApMV mediante la técnica de RT-PCR, se realiza en un paso, para enriquecer el cDNA, para ello se utilizarán los *primers* (ApMVF / ApMVR) diseñados por Menzel *et al.*, 2002. Los cuales se pegan 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 Cuadro 6:

Cuadro 6. Mezcla de reacción para ApMV

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2
DTT	100 mM	5.0 mM	1
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.6
dNTP's	10 Mm	0.2 mM	0.4
ApMVF	10 µM	0.5 µM	1
ApMVR	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
Agua ° PCR			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 ApMV

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Retrotranscripción	50 °C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	35
Alineamiento	62 °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 peso 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 deberán generar un fragmento de 300 pb. El control negativo de reactivos (CNR) no debe presentar ningún fragmento (Figura 4).
- En el ensayo para la detección de ApMV, los controles negativos de reactivos y matriz no deberán presentar amplicones. El control positivo debe mostrar un producto de 262 pb, aproximadamente (Figura 5).

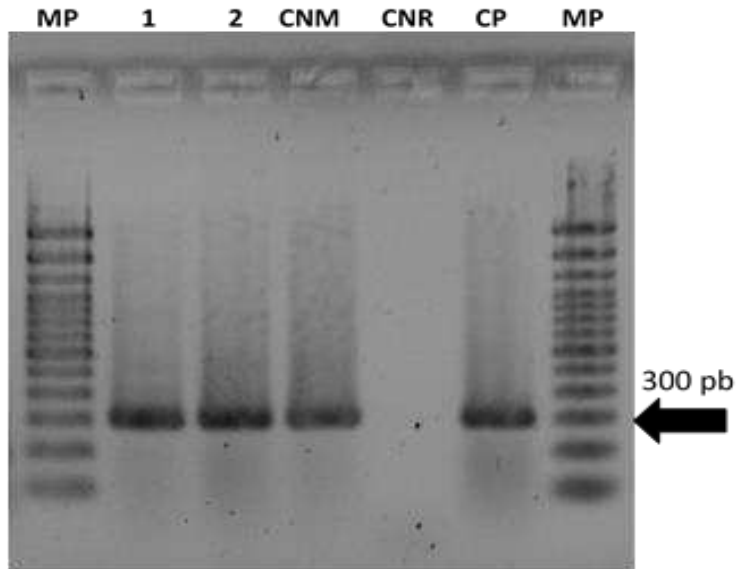


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo del gen endógeno. Las muestras presentan un fragmento de 300 pb, correspondientes al amplicón positivo a 18S. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-2: muestras problema; CNM: control negativo de matriz, CNR: control negativo de reactivos, CP: control positivo.

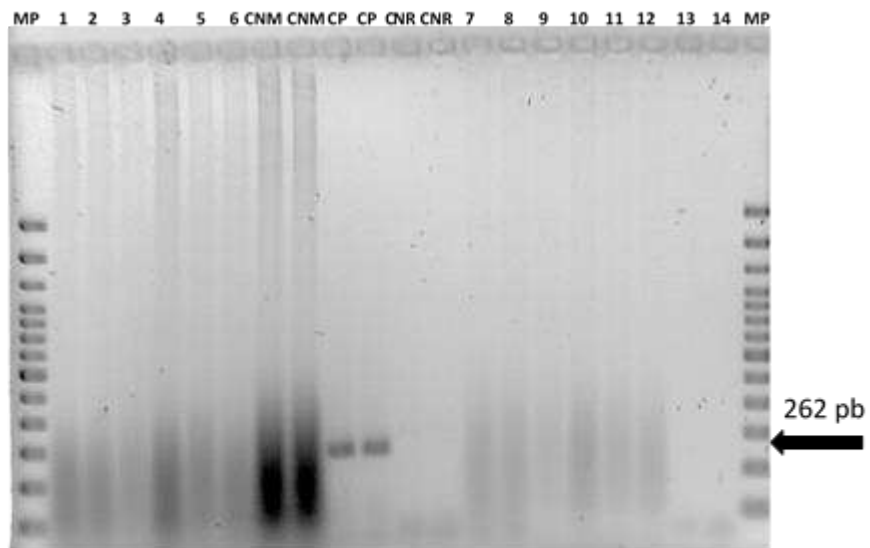


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo de ApMV. El control positivo presenta un fragmento de aproximadamente 262 pb, correspondientes al amplicón positivo a ApMV. MP: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-6: muestras problema; CP: control positivo; CNM: control negativo matriz; CNR: control negativo de reactivos.

Identificación de plaga

Se considerarán positivas aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 262 pb con los *primers* específicos ApMV F/ApMV R.

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

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 *Apple mosaic virus* (ApMV), 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 ApMV, 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

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. USA.
- Bujarski J., Figlerowicz M., Gallitelli D., Roossinck M., Scott S. 2012. Familia bromoviridae. En: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editores. Taxonomía de virus, Noveno informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus. Volumen 9. Prensa Elsevier-Academic; Amsterdam, Países Bajos: págs. 965-976. (Google Académico).
- Codoner F.M, Elena S.F. 2008. La promiscua historia evolutiva de la familia bromoviridae. J. Gen. Virol. 89: 1739-1747. doi: 10.1099 / vir.0.2008 / 000166-0. (Google Académico).
- 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(1): 13-15
- Grimová, L., Winkowska, L., Konrady, M. and Ryšánek, P. 2016. *Apple mosaic virus*. Phytopathologia Mediterranea 55: 1-19. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-16295
- Kinoti W. M., Constable F. E., Nancarrow N. Plummer K. M. y Rodoni B. 2018. Incidencia y diversidad genética del virus del mosaico de la manzana (ApMV) y del virus del enano de la ciruela pasa (PDV) en especies de *Prunus* en Australia. Virus. 10 (3): 136. Doi: 10.3390 / v10030136
- Martelli G., Savino V. 1997. Enfermedades infecciosas de la almendra con especial referencia al área mediterránea 1. Bula. OEPP. 27: 525-534. doi: 10.1111 / j.1365-2338.1997.tb00679.x. (Google Académico).
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99:81-92
- 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 ApMV, 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: *Apple mosaic virus* (ApMV). Tecámac, México: Autor.

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

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa del 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 (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

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”