

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Biología Molecular**

**Protocolo de Diagnóstico:**  
*Potato spindle tuber viroid (PSTVd)*  
(Tubérculo fusiforme de la papa)

**Tecámac, Estado de México, Octubre 2018**

**SENASICA nos protege a todos**

**SAGARPA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA

### **Aviso**

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). La metodología descrita, 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 protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

## I. ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA .....	1
2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA .....	2
2.3 FLUJO DE TRABAJO .....	3
<b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....</b>	<b>4</b>
3.1 TÉCNICAS MOLECULARES .....	4
3.1.1 Extracción de la plaga .....	4
3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría .....	5
3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa .....	5
3.1.4 RT-PCR en uno y dos pasos .....	6
3.1.4.1 Síntesis de cDNA .....	6
3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final .....	8
3.1.5 Controles para las pruebas moleculares .....	9
3.1.6 Interpretación de resultados .....	9
3.1.6.1 RT-PCR punto final .....	9
3.1.7 Identificación de plaga .....	10
<b>4. REGISTROS .....</b>	<b>10</b>
<b>5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL .....</b>	<b>10</b>
<b>6. RECONOCIMIENTO .....</b>	<b>10</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>10</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>13</b>
8.1 SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR PSTVd .....	13
8.2 ALINEAMIENTO CON LA HERRAMIENTA BLASTn A PARTIR DE LA SECUENCIA DE PSTVd .....	13
8.3 MUESTRAS .....	14
8.3.1 Envío de muestras .....	14
8.3.2 Almacenamiento de las muestras .....	14
8.4 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES .....	14
8.4.1 Buffer de carga 6X .....	14
8.4.2 PBS 1X .....	14
8.4.3 TAE 10X .....	15

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarosa al 2% con muestras a diagnosticar de PSTVd .....	9
Figura 2. Síntomas producidos por PSTVd .....	13
Figura 3. Resultados del alineamiento mediante BLASTn .....	13

## III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de PSTVd .....	6
--	---

Cuadro 2. Mezcla de RNA con los primers específicos.....	6
Cuadro 3. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de la mezcla RNA/primers .....	6
Cuadro 4. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA en dos pasos y tiempo de incubación .....	7
Cuadro 5. Condiciones para la desnaturalización del RNA .....	7
Cuadro 6. Condiciones para la síntesis de cDNA en un paso .....	7
Cuadro 7. Programa del termociclador para la detección de PSTVd en un paso .....	8
Cuadro 8. Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR punto final.....	8
Cuadro 9. Programa del termociclador para la detección de PSTVd en dos pasos .....	8

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) por RT-PCR en uno y dos pasos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Información sobre la plaga

*Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) principalmente es un problema en la producción de la semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.), afectando el mantenimiento de los bancos de germoplasma, las colecciones y los programas de crianza de papa. Se ha detectado en Norte América, Sudamérica, Europa y China; sin embargo, las nuevas tecnologías de detección han permitido que se erradique o se reduzca significativamente su propagación (Qiu et al., 2016). Molecularmente PSTVd es una molécula no encapsulada y cerrada covalentemente de 359 nucleótidos, se han descrito variantes que consisten entre 356 y 360 nucleótidos (Gross et al., 1978; Puchta, H. et al., 1990).

La sintomatología varía de media a severa dependiendo de la variante de PSTVd. Los síntomas comunes son cambios de color en el follaje, hojas pequeñas y elongación del tubérculo como huso (Loebenstein & Gaba, 2012); en la variante severa existe un retraso en el crecimiento, epinastia y rugosidad del follaje (Anexo 8.1). La expresión de los síntomas está influenciada por la especie hospedante, las condiciones ambientales y el método de inoculación (O'Brien & Raymer, 1964; Harris & Browning, 1980; Pfannenstiel & Slack, 1980). Otros hospedantes naturales son: berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*Solanum muricatum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Lebas et al., 2005).

PSTVd se dispersa fácilmente a través de semilla y el polen de tomate y de papa (Benson & Singh, 1964; Hunter, Darling & Beale, 1969; Singh, 1970). También existe transmisión mecánica, ésta ocurre cuando la savia contaminada se encuentra presente en las cuchillas de corte utilizadas para la propagación del tubérculo, las cuales contaminan los brotes de tubérculos jóvenes.

Este viroide es de importancia comercial porque en su condición leve reduce el 24% de la producción del tubérculo; mientras que, en su variante severa la producción se reduce en un 64%, lo que genera un aumento en costos de protección y de mantenimiento del cultivo (Soliman et al., 2010).

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre:** *Potato spindle tuber viroid*

**Sinónimos:** Potato gothic virus

Potato spindle viroid

Potato spindle tuber pospiviroid

Potato spindle tuber virus

Tomato bunchy top viroid

**Nombres comunes:** Spindle tuber of potato (inglés)

Bunchy top of tomato (inglés)

Spindelknollenkrankheit (alemán)

Вириод веретенovidности клубней картофеля (ruso)

**Acrónimo en virus y viroides:** PSTVd

**Posición taxonómica:**

**Dominio:** Virus

**Grupo:** Viroids

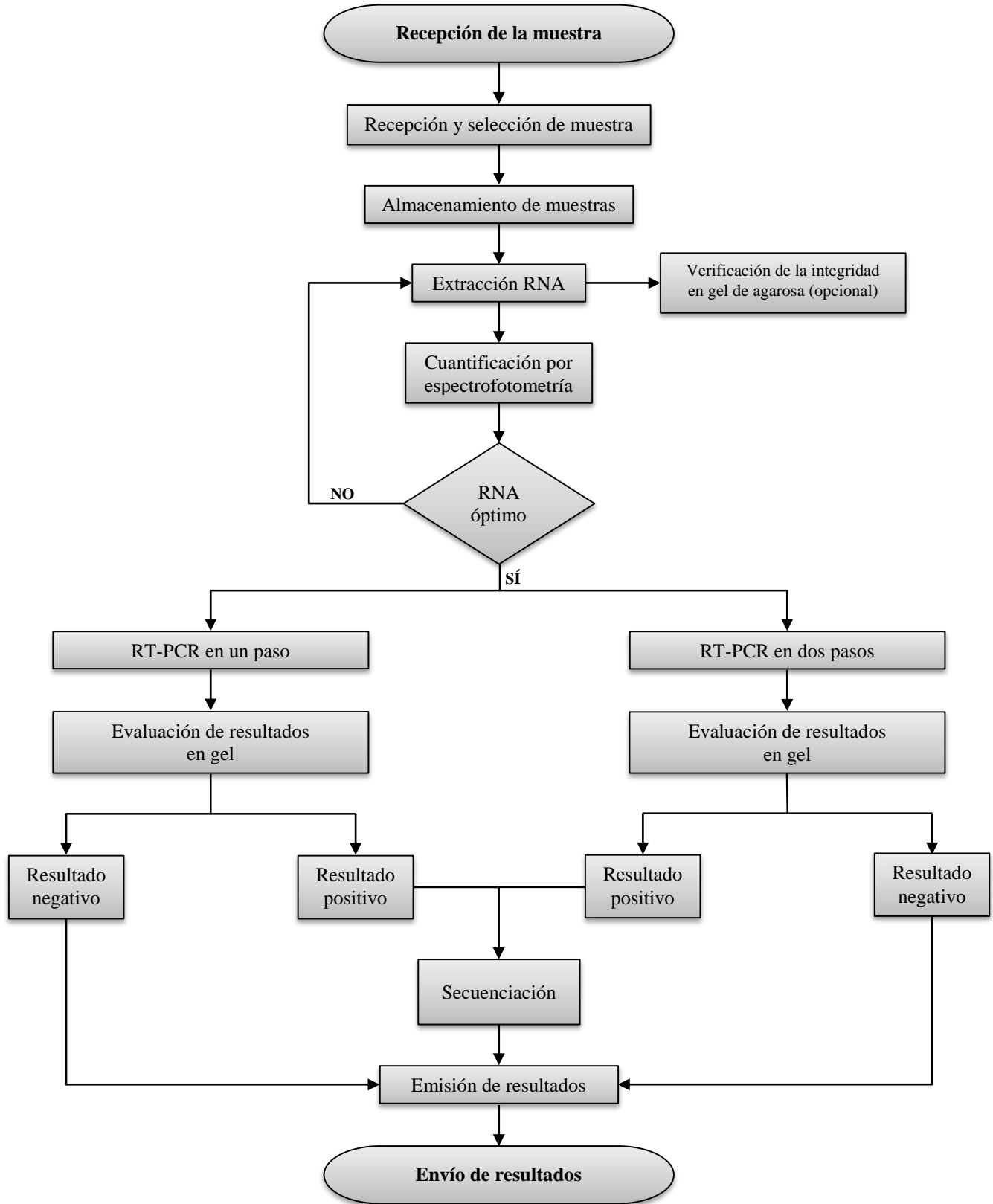
**Familia:** *Pospoviroidae*

**Género:** *Pospiviroid*

**Especie:** *Potato spindle tuber viroid*

(CABI, 2018; EPPO, 2018)

## 2.3 Flujo de trabajo



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

#### 3.1 Técnicas moleculares

La técnica de biología molecular para el diagnóstico preciso para PSTVd es RT-PCR, conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa punto final; con ella se detecta el viroide en tubérculos de papa, hojas y polen, así como sus variantes (Behjatnia et al., 1996; Shamloul et al., 1997, Querci et al., 1995). RT-PCR usa una hebra de RNA y con la acción de una retrotranscriptasa se obtiene el cDNA, posteriormente éste se amplifica por PCR tradicional. Es una técnica sensible que detecta un número muy bajo de copias de RNA; sin embargo, los inhibidores potenciales de la reacción pueden estar presentes en ciertos tejidos diana y para confirmar la presencia de PSTVd es necesario secuenciar.

##### 3.1.1 Extracción de la plaga

- a. Pesar en una balanza analítica entre 50-100 mg de tejido vegetal (nervadura central), colocar el tejido en un tubo con matriz cerámica. Agregar 500 µL de PBS 1X (Anexo 8.4) y triturar el tejido en un disruptor mecánico. En caso de no contar con el equipo, colocar el tejido en un mortero previamente estéril y usar nitrógeno líquido, triturar el tejido hasta hacerlo polvo y colocar el producto en un tubo de 2.0 mL, previamente etiquetado con la muestra a diagnosticar.

**Nota:** cuando se use el disruptor, usar una velocidad baja por 30 s, además, mantener la muestra en frío entre cada aplicación. En caso de no contar con nitrógeno líquido, enfriar el mortero y la muestra en el ultracongelador para facilitar el procedimiento.

- b. Usar uno de los siguientes kits de acuerdo a la disponibilidad y seguir las indicaciones del proveedor:
  - FastPure™ RNA kit de Takara (No. de catálogo 9190).
  - SV Total RNA Isolation System de Promega (No. de catálogo Z3100).
  - AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep kit de Axygen (No. de catálogo AP-MN-MS-RNA).

A continuación, se explica la extracción de RNA usando el reactivo Plant RNA Purification Reagent de Invitrogen™ (No. de catálogo 12322-012).

- 1) Agregar 500 µL del reactivo Plant RNA Purification Reagent, agitar en vortex, a velocidad media, por 30 s hasta que el macerado este totalmente suspendido.
- 2) Incubar por 5 min sobre hielo (poner horizontalmente para maximizar el área durante la extracción).



- 3) Clarificar la solución por centrifugación a 12 000 g a 4 °C por 2 min y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.
- 4) Adicionar 100 µL de NaCl 5M para clarificar el extracto y mezclar por inversión 6 veces.
- 5) Adicionar 300 µL de cloroformo y mezclar por inversión 10 veces.
- 6) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min y transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.
- 7) Precipitar el RNA del sobrenadante con un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C), mezclar por inversión e incubar por 10 min sobre hielo.
- 8) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min.
- 9) Decantar el sobrenadante, cuidar no perder el pellet (pastilla).
- 10) Lavar la pastilla con 1 mL de etanol grado biología molecular al 70% a 4 °C y centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 5 min.
- 11) Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla en una campana de flujo laminar o en un equipo al vacío (MiVac) durante 30 min a 37 °C.
- 12) Suspender la pastilla en 50 µL de agua estéril libre de nucleasas y proceder a la verificación de la integridad, calidad y cantidad del RNA.
- 13) Almacenar a -20 °C hasta su uso.

### **3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría**

La verificación de la calidad y la cantidad de RNA en la muestra, se hace por medio de espectrofotometría (NanoDrop™). Se coloca de 1 a 2 µL de RNA en el espectrofotómetro. Se verifica que el RNA presente una calidad entre 1.8-2.0 en la relación 260/280 (Lehninger, 1975) y 1.8-2 en la relación 260/230 (Von Ahlfen & Schlumpberger, 2010; The Quality Control Platform of Saint Louis, 2009).

### **3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa**

La verificación de la integridad del RNA, se hace por medio de un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE al 1X (Anexo 8.4), teñido con bromuro de etidio o gel red, se carga 3 µL de RNA mezclado con 1.5 µL de buffer de carga. El tiempo de corrida es de 5 min a 80 V, seguido de

25 min a 90 V. Se usa un transiluminador de luz ultravioleta (UV) para ver el gel y se toma la foto con un analizador de imágenes.

### 3.1.4 RT-PCR en uno y dos pasos

#### 3.1.4.1 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, utilizar los primers que se usaran en la reacción de PCR (Cuadro 1); estos dirigen la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad. Estos fueron obtenidos de Güner et al., 2011.

**Cuadro 1.** Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de PSTVd

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	PSTVd Sense	5'- ACTCGTGGTTCCTGTGGTTC -3'	264
Antisentido	PSTVd Antisense	5'- TGTTTCCACCGGGTAGTAGC -3'	

#### a. Síntesis de cDNA en dos pasos:

1) Realizar la mezcla de reacción de acuerdo al Cuadro 2:

**Cuadro 2.** Mezcla de RNA con los primers específicos

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
RNA	50-100 ng/μL	35.71-71.42 ng/μL	5
PSTVd Sense	10 pmol/μL	1.43 pmol/μL	1
PSTVd Antisense	10 pmol/μL	1.43 pmol/μL	1
Volumen final			7

**Nota:** realizar la mezcla de reacción del Cuadro 4 previo a la incubación. Usar el control positivo desde este paso.

2) Incubar la mezcla de acuerdo al Cuadro 3:

**Cuadro 3.** Condiciones para la desnaturalización e hibridación de la mezcla RNA/primers

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
80	5 min	1
37	15 min	1
4		∞

3) Al finalizar el tiempo de incubación, colocar la muestra en hielo por 2 min y adicionar la mezcla de reacción de acuerdo al Cuadro 4:

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA en dos pasos y tiempo de incubación

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)		Incubación Temp./tiempo
Buffer 5x first strand	5 X	1.54 X	4		42 °C / 60 min
dNTP's	10 mM	1.54 mM	2		
Inhibidor de RNA (RNaseOUT™)	40 U/µL	1.54 U/µL	0.5		
Transcriptasa reversa	200 U/µL	7.69 U/µL	0.5		
DTT	0.1 M	0.02 M	2		
Agua ° PCR	---	---	4		
			Volumen final	13	

## b. Síntesis de cDNA en un paso:

1) Realizar la mezcla de reacción de acuerdo al Cuadro 5:

**Cuadro 5.** Condiciones para la desnaturalización del RNA

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)		Incubación Temp./tiempo
RNA	50-100 ng/µL	50-100 ng/µL	3		70 °C / 5 min
			Volumen final	3	

**Nota:** realizar la mezcla de reacción del Cuadro 6 previo a la incubación. Usar el control positivo desde este paso.

2) Al finalizar el tiempo de incubación, colocar la muestra en hielo por 2 min y adicionar la mezcla de reacción de acuerdo con el Cuadro 6:

**Cuadro 6.** Condiciones para la síntesis de cDNA en un paso

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)	
Buffer de PCR	10 X	1.14 X	2.5	
DTT	0.1 M	0.01 M	2.5	
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.84 mM	1.25	
dNTP's	10 mM	0.28 mM	0.625	
PSTVd Sense	10 pmol/µL	0.91 pmol/µL	2	
PSTVd Antisense	10 pmol/µL	0.91 pmol/µL	2	
Taq Polimerasa	5 U/µL	0.11 U/µL	0.5	
Transcriptasa reversa	200 U/µL	4.55 U/µL	0.5	
Inhibidor de RNA (RNaseOUT™)	40 U/µL	0.91 U/µL	0.5	
Agua ° PCR	---	---	9.625	
			Volumen final	22

3) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Programa del termociclador para la detección de PSTVd en un paso

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
42	50 min	1
94	5 min	1
94	30 s	35
62	30 s	
72	30 s	
72	7 min	1
4		∞

### 3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final

Para la detección de *Potato spindle tuber viroid* mediante la técnica de RT-PCR, utilizar los primers del Cuadro 1.

1) Preparar la reacción de RT-PCR de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR punto final

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (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
PSTVd Sense	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
PSTVd Antisense	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
Taq polimerasa	5 U/ µL	0.05 U/ µL	0.25
cDNA	---	---	5
Agua ° PCR	---	---	14
			Volumen final
			25

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 9:

**Cuadro 9.** Programa del termociclador para la detección de PSTVd en dos pasos

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
92	2 min	1
94	1 min	40
65	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4		∞

### 3.1.5 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de RT-PCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

**Control positivo:** asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene (DNA/RNA/clona) o es la plaga de interés y deberá estar confirmado mediante secuenciación.

**Control negativo de matriz:** este control corresponde a un extracto de matriz sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

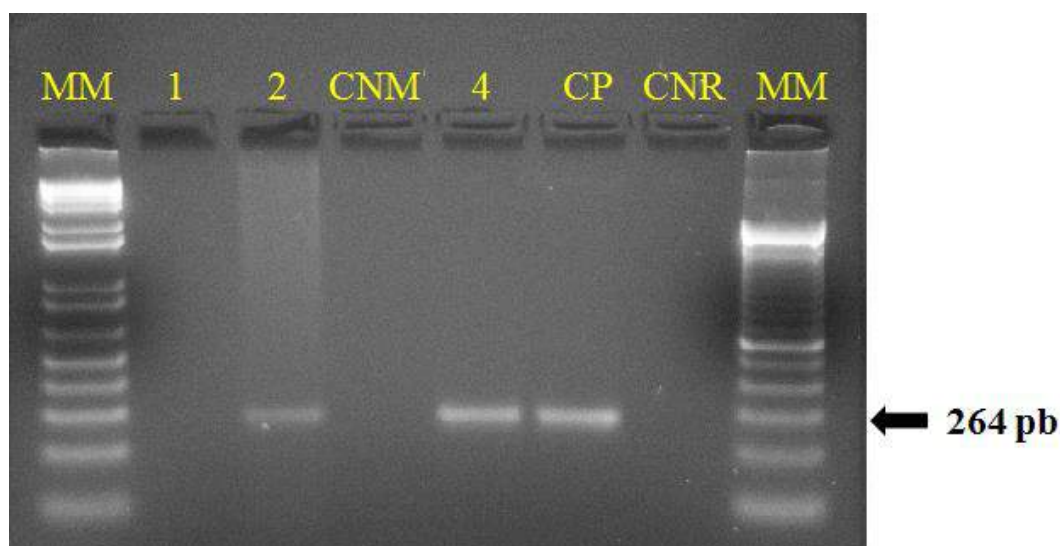
**Control negativo de reactivos:** es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

### 3.1.6 Interpretación de resultados

#### 3.1.6.1 RT-PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo genera una banda de 264 pb con primers plaga-específicos (Figura 1). El control negativo de reactivos no debe de generar bandas.



**Figura 1. Gel de agarosa al 2% con muestras a diagnosticar de PSTVd.** MM: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-2: muestras sometidas a diagnóstico; CNM: control negativo de muestra; 4: DNA plasmídico de PSTVd desde la RT; CP: control positivo (material de referencia); CNR: control negativo de reactivos; MM: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen™).

### 3.1.7 Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Potato spindle tuber viroid*, es que el ensayo RT-PCR debe ser positivo, con sus controles correspondientes. En primeras detecciones se debe realizar un ensayo de PCR punto final para secuenciar el amplicón (Anexo 8.2); en estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

## 4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de PSTVd conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad.

En caso de un resultado positivo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ , debidamente identificadas por tres meses.
- Esterilizar el material en la autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

En caso de un resultado negativo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a  $4^{\circ}\text{C}$ , debidamente identificadas por una semana.
- Esterilizar el material en la autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

## 5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.biolmolecular@senasica.gob.mx

**Teléfono y extensión:** 01 (52) 55 5905 1000 Ext. 51367 y 51369

## 6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado, complementado, revisado y editado por el Laboratorio de Biología Molecular (Israel Morales González, Sonia Monroy Martínez) y el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata, Sandra Valeria Soto Cárdenas).

## 7. REFERENCIAS

- Behjatnia, S. A. A., Dry, I. B., Krake, L. R., Condé, B. D., Connelly, M. I., Randles, J. W. & Rezaian, M. A. (1996). New Potato Spindle Tuber Viroid and Tomato Leaf Curl Geminivirus Strains from a Wild *Solanum* sp. *Phytopathology*, 86 (8), 880-886.
- Benson, A. P. & Singh, R. P. (1964). Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato. *American Potato Journal*, 41, 294.

- DNA/RNA Extraction & Qualification. (2009). The Quality Control Platform (QC PF) of Saint-Louis. Recuperado el 17 de octubre de 2018 de [http://cit.ligue-cancer.net/CIT\\_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf](http://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf)
- Gross, H. J, Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. & Sanger, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 273, 203-208.
- Guner, ., Sipahioğlu, H. M. & Usta, M. (2011). Incidence and genetic stability of Potato spindle tuber pospiviroid in potato in Turkey. *Turk J Agric For*, 36, 353-363.
- Harris, P. S. & Browning, I. A. (1980). The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of potato spindle tuber viroid. *Potato Research*, 23 (1), 85-93.
- Hunter, D. E., Darling, H. M. & Beale, W. L. (1969). Seed transmission of potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 46 (7), 247-250.
- Lebas, B. S. M., Clover, G. R. G., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, Z. & Alexander B. J. R. (2005). Distribution of Potato spindle tuber viroid in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australasian Plant Pathology*, 34, 129-133.
- Lehninger, A. A. (1975). *Biochemistry* (2<sup>nd</sup> ed.). NY: Worth Publishers, Inc.
- Loebenstein, G. & Gaba, V. (2012). Viruses of Potato. En C. Malmstrom (Eds.), *Advances in VIRUS RESEARCH*. (pp. 209-246). Elsevier.
- O'Brien, M & Raymer, WB. (1964). Symptomless hosts of the potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 54, 1045-1047.
- Owens, R. A & Verhoeven, J. Th. J. (2009). Potato spindle tuber. *The Plant Health Instructor*, doi: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01.
- Pfannenstiel, M. A. & Slack, S. A. (1980). Response of Potato Cultivars to Infection by the Potato Spindle Tuber Viroid. *Phytopathology*, 70 (9), 922-926.
- Potato spindle tuber viroid (spindle tuber of potato). (2018). CABI. Recuperado el 23 de agosto de 2018 de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/43659>
- Potato spindle tuber viroid (PSTVD0). (2018). EPPO. Recuperado el 24 de agosto de 2018 de <https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0>
- Puchta, H., Herold, T., Verhoeven, K., Roenhorst, A, Ramm, K, Schmidt-Puchta, W & Sanger. H. L. (1990). A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15 (3), 509-511.
- Querci, M., Owens, R. A., Vargas, C. & Salazar, L. F. (1995). Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease*, 79 (2), 196-202.
- Shamloul, A. M., Hadidi, A., Zhu, S. F., Singh, R. P. & Sagredo, B. (1997). Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, 89-96.

- Singh, R. P. (1970) Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47 (6), 225-227.
- Soliman, T., Mourits, M. C. M., Oude Lansink, A. G. J. M. & Van der Werf, W. (2010). Economic impact assessment in pest risk analysis. *Crop Protection*, 29, 517-524.
- Qiu, C-l, Zhang, Z-x, Li, S-f, Bai, Y-j, Liu, S-w, Fan, G-q, Gao, Y-l, Zhang, W, Zhang, S, Lü, W-h & Lü, D-q. (2016). Occurrence and molecular characterization of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) isolates from potato plants in North China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15 (2), 349-363.
- Von Ahlfen, S. & Schlumpberger, M. (2010). Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.

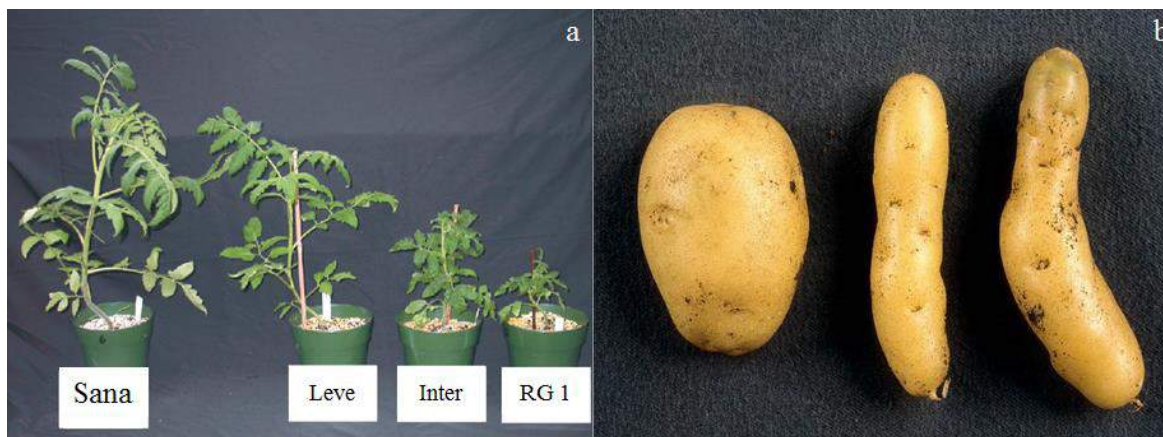
**Forma recomendada de citar:**

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Tubérculo fusiforme de la papa) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.



## 8. ANEXOS

### 8.1 Síntomas producidos por PSTVd



**Figura 2. Síntomas producidos por PSTVd.** a) Plantas de tomate cv. Rutgers infectadas con PSTVd, para observar su efecto leve, intermedio y RG1 (severo) (Owens & Verhoeven, 2009) b) Alargamiento de la papa cv. Nicola con síntoma de PSTVd (Créditos: CABI, 2018).

### 8.2 Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de PSTVd

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">JQ889853.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain YuAL-79_10, complete genome	662	662	100%	0.0	100%	
<a href="#">JQ889846.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain VNIKH-08-94B, complete genome	651	651	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ889845.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain VNIKH-94-2_08_09, complete genome	651	651	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU879922.1</a>	Potato spindle tuber viroid isolate VIZR-06/6L2-08, complete genome	647	647	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ889849.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain WS_Sedov-10-233m, complete genome	645	645	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ889848.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain WS_Bor-10-232m, complete genome	645	645	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ889843.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain VIZR_06-6L_10, complete genome	645	645	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU879921.1</a>	Potato spindle tuber viroid isolate VNIKH-07/42M, complete genome	645	645	100%	0.0	99%	
<a href="#">EF044303.1</a>	Potato spindle tuber viroid strain Buarv-97, complete genome	645	645	100%	0.0	99%	

**Figura 3. Resultados del alineamiento mediante BLASTn.** Al realizar el alineamiento a partir de la secuencia de un amplicón positivo a PSTVd, se observa que la muestra sometida tiene un 100% de identidad con PSTVd.

## 8.3 Muestras

### 8.3.1 Envío de muestras

Las muestras que se envíen, deben presentar las siguientes características:

- Tejido fresco, sin presentar necrosis, hongos o estar deshidratadas.
- Incluir: nervadura central, tallo y tubérculo.
- Envolver las muestras en papel absorbente, en periódico o bolsas de papel.
- Cada muestra debe enviarse por separado dentro de bolsas de polietileno con cierre.
- Etiquetar las muestras con los datos suficientes para su identificación.
- Transportar las muestras en hieleras a una temperatura menor de 15 °C, no colocar hielo directamente a las muestras.

### 8.3.2 Almacenamiento de las muestras

El material vegetal se almacena en un refrigerador a una temperatura de 4 °C.

## 8.4 Preparación de reactivos y soluciones

### 8.4.1 Buffer de carga 6X

#### Ingredientes:

Orange G	40 mg
Sucrosa	4 g
Agua ultrapura	10 mL

#### Materiales:

1 vaso de precipitado de 20 mL  
Balanza analítica

#### Preparación:

- 1) Pesar 40 mg de Orange G y 4 g de sucrosa en un vaso de precipitado de 20 mL.
- 2) Disolver en 5 mL de agua ultrapura.
- 3) Aforar a 10 mL con agua ultrapura.
- 4) Almacenar a 4°C.

### 8.4.2 PBS 1X

#### Ingredientes:

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	1.15g

Fosfato de potasio, monobásico (anhidro)	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Tween 20	0.5 g/mL
Agua destilada	1 L

**Materiales:**

Frasco de 1L  
Balanza analítica  
Potenciómetro

**Preparación:**

- 1) Disolver en 1 L de agua destilada, todos los ingredientes.
- 2) Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.02).
- 3) Almacenar a temperatura ambiente.

**8.4.3 TAE 10X**

**Ingredientes:**

Tris (Base)	48.4 g
EDTA	3.7 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
Agua ultrapura	1 L

**Materiales:**

Balanza analítica  
Matraz Erlenmeyer 1L  
Potenciómetro

**Preparación:**

- 1) Pesar y disolver 48.4 g de Tris (Base), 3.7 g de EDTA y 11.4 mL de ácido acético glacial en 800 mL de agua ultrapura.
- 2) Adicionar una barra magnética y colocar el matraz sobre el agitador magnético, dejar agitando hasta que la solución no presente grumos.
- 3) Aforar a 1 L y ajustar a pH 8.0.
- 4) Almacenar a temperatura ambiente.