

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

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Virología**

**Protocolo de Diagnóstico:
*Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)***

Tecámac, Estado de México, enero 2019



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DCNRF), 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 del virus *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). 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

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Información sobre la plaga	1
2.2. Información taxonómica	2
2.3. Flujo de trabajo.....	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1. Identificación molecular	4
3.1.1. Extracción de RNA.....	4
3.1.2. Cuantificación y verificación de la calidad del RNA total.....	5
3.1.3. RT-PCR punto final	5
3.1.3.1. Síntesis de cDNA	5
3.1.3.2. PCR punto final.....	6
3.1.3.2.1. Ensayo para control endógeno	6
3.1.3.2.2. Ensayo para ToBRFV	7
3.1.3.3. Controles para las pruebas moleculares.....	8
3.1.4. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final.....	8
3.2. Identificación de la plaga.....	9
4. REGISTROS	10
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	10
6. RECONOCIMIENTO.....	10
7. REFERENCIAS	10
8. ANEXOS.....	12
8.1. Síntomas de ToBRFV.....	12
8.2. Medidas de seguridad para el manejo de muestras vegetales infectadas	13
8.3. Toma de muestra	14
8.4. Acondicionamiento para la germinación de semillas.	14
8.5. Ensayo de PCR para <i>Tobamovirus</i>	16

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de gen endógeno 18S.	8
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de ToBRFV.....	9
Figura 3. Síntomas de ToBRFV en cultivo de tomate.	12
Figura 4. Toma de muestra de tomate.	14
Figura 5. Acondicionamiento en cámara húmeda para la germinación de semillas.....	14
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de <i>Tobamovirus</i> (TOBF-3666/TOBR-4718).	18
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de <i>Tobamovirus</i> (TOBCP-Fw/TOBCP-Rv).....	18

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA.....	5
Cuadro 2. Incubación de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA.....	5



Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de control endógeno 18S y ToBRFV.....	6
Cuadro 4. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno 18S.....	6
Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección del control endógeno 18S.....	6
Cuadro 6. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final para ToBRFV.....	7
Cuadro 7. Programa del termociclador para la detección del ToBRFV.....	7
Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección del ToBRFV.....	16
Cuadro 9. Mezcla de reacción para los ensayos de PCR punto final para <i>Tobamovirus</i>	16
Cuadro 10. Programa del termociclador para la detección del <i>Tobamovirus</i> (TOBF-3666/TOBR-4718).....	16
Cuadro 11. Programa del termociclador para la detección del <i>Tobamovirus</i> (TOBCP-Fw/TOBCP-Rv).....	17



1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Tomato brown rugose fruit virus* mediante RT-PCR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Información sobre la plaga

Los *Tobamovirus* representan la amenaza más grave para los cultivos agrícolas (principalmente para los hortícolas y ornamentales) a nivel mundial (Salem et al., 2015). Aunque, *in vitro* el género se ha caracterizado por tener un rango de moderado a amplio de hospederos; en la naturaleza el rango es más estrecho, una vez infectada la planta, éste se puede localizar en cualquier parte de ella (ICTV, 2018).

La gravedad de los *Tobamovirus* es que su vía de transmisión es mecánica (no hay reportes de algún vector): de planta a planta, mediante herramientas, máquina y ropa de trabajo contaminada, o a través del agua circulante en cultivos hidropónicos. Los reservorios de inóculo son los restos de plantas y suelo contaminado. Se transmiten a larga distancia a través del material propagativo infectado como semillas y plántulas (Broadbent, 1976; ICTV, 2018).

En el 2015, se reportó un *Tobamovirus* infectando cultivos de tomate en invernaderos de Jordania; este nuevo virus se aleja filogenéticamente de las especies más cercanas dentro del género, por lo que fue considerado una nueva especie nombrada *Tomato brown rugose fruit virus* (Salem et al., 2015). Por esa misma región, en Israel, se reportaron los resultados del análisis de muestras de tomate infectadas, recolectadas de un brote en 2014; concluyendo mediante una caracterización molecular, serológica y de microscopía electrónica que el agente infeccioso era el *Tomato brown rugose fruit virus* previamente encontrado en Jordania (Luria et al., 2017).

Los síntomas reportados de la cepa de Israel son: mosaico de ligero a severo en hojas (ocasionalmente se puede presentar alargamiento de las mismas); en fruto se observa rugosidad café con punteado amarillo (Anexo 8.1); sin embargo, los síntomas pueden variar dependiendo del cultivar o si se desarrolla una infección mixta (Luria et al., 2017).

Dado que para los virus fitopatógenos no existe un producto químico para su erradicación, las medidas fitosanitarias preventivas como usar material propagativo certificado libre de virus, tienen un papel relevante en su control. Por lo tanto, es esencial realizar un diagnóstico oportuno y confiable en material vegetal susceptible a infecciones víricas (González-Garza, 2017).



2.2. Información taxonómica

Nombre científico: *Tomato brown rugose fruit virus*

Tomato brown rugose fruit tobamovirus

Abreviación: ToBRFV

Nombres comunes: Se encuentra en revisión la propuesta en español del nombre común para la enfermedad viral.

Posición taxonómica:

Clasificación de Baltimore: Virus de RNA de cadena sencilla de sentido positivo [ssRNA (+)]

Dominio: Virus

Orden: Sin asignar

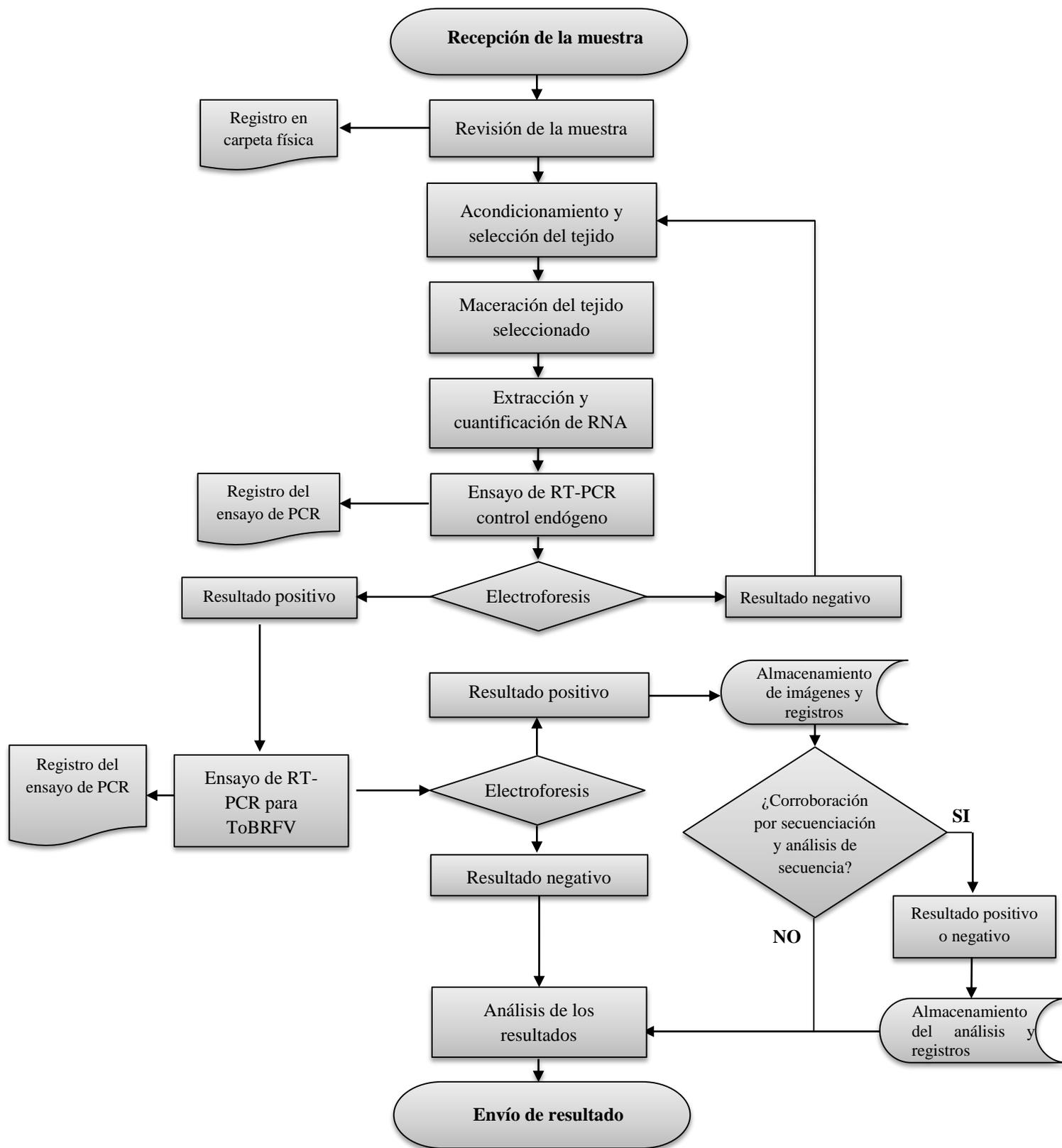
Familia: *Virgaviridae*

Género: *Tobamovirus*

Especie: *Tomato brown rugose fruit virus*

(ICTV, 2018)

2.3. Flujo de trabajo





3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

El diagnóstico de ToBRFV se basa en un ensayo de RT-PCR.

El protocolo se ha utilizado en tejido vegetal de Solanáceas (tomate, chile y berenjena), en estado vegetativo, ya sea de muestras con producto vegetal o semillas, estas últimas se acondicionan para su germinación. Si la muestra se compone de más de una variedad o lote, es necesario que se señale en la hoja de remisión y cada elemento debe venir bien identificado y separado. A cada variedad o lote se le hace un diagnóstico por separado.

El tejido a emplear para la detección e identificación debe estar fresco. Debido a la naturaleza de los virus, se puede o no presentar una sintomatología. La toma de muestra debe ser representativa, teniendo en cuenta la distribución asimétrica de la infección de los virus en las plantas (Hull, 2014).

Antes de comenzar el procesamiento de las muestras, es necesario conocer las medidas de seguridad al manipular material infectado con algún *Tobamovirus* (Anexo 8.2). Para el caso de muestras con producto vegetal, el diagnóstico se realiza a partir de tejido vascular, en particular de las nervaduras centrales de las hojas. La nervadura central se corta longitudinalmente con un ancho de 0.5 cm aproximadamente (Anexo 8.3), después se mezclan los cortes para formar una muestra compuesta, de la cual se toman dos submuestras. En el caso de muestras con producto de semillas, estas se deben acondicionar para su germinación en una cámara húmeda bajo condiciones estériles e incubar a 25°C (Anexo 8.4), una vez que se tengan plántulas de 7 a 10 días después de la germinación, tomar el tejido vegetal, cortar y mezclar para formar una muestra compuesta, de la cual se toman dos submuestras.

Para la prueba de RT-PCR, se toma como mínimo 0.1 g de la muestra compuesta por repetición y se congelan a -70 ° C hasta su procesamiento.

3.1. Identificación molecular

El diagnóstico molecular de ToBRFV se basa en el método de la retrotranscripción (o transcripción reversa) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction en inglés). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones específicas del genoma del virus, mediante una copia de cDNA (DNA complementario) a partir de una región del genoma de RNA del virus, y una reacción subsecuente de PCR.

3.1.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realiza a partir de nervaduras centrales de hojas. Se sugiere el uso del kit comercial SV Total RNA Isolation System Promega®.

Nota: Los pasos de extracción son los indicados en la guía del fabricante (No. catálogo Z3105).

3.1.2. Cuantificación y verificación de la calidad del RNA total

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del RNA obtenido; para ello se utiliza un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del RNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$. Para corroborar que el RNA obtenido es apto para ser amplificado debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, las absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidas solamente cuando amplifique exitosamente el control endógeno.

3.1.3. RT-PCR punto final

3.1.3.1. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, utilizar el kit Random Hexamers (Invitrogen, No. cat. N8080127), que consiste en una mezcla de hexámeros con diferente secuencia de nucleótidos; los cuales se unen a diferentes regiones de los múltiples RNA que se obtienen de la extracción.

1) Realizar la mezcla de reacción de acuerdo con el Cuadro 1:

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)
Buffer de PCR	10 X	2
MgCl ₂	50 mM	2
dNTPs	10 mM	2
Random Hexamers Invitrogen	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 ° PCR		7.75
	Volumen total	20

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

Cuadro 2. Incubación de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA.

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

Nota: El cDNA que se obtiene de la reacción se utiliza para todas las reacciones de PCR subsecuentes.



3.1.3.2. PCR punto final

En la reacción de PCR utilizar los siguientes pares de primers: para el ensayo de control endógeno se utilizan los primers propuestos por Zamboni, Pierantoni y De Franceschi (2008), que amplifican una región del gen que codifica para el RNA 18S del hospedero; mientras que para la detección de ToBRFV se diseñaron primers que amplifican una región dentro de la subunidad pequeña de la replicasa. La secuencia de los primers se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de control endógeno 18S y ToBRFV.

Nombre de los primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Ensayo
18S Fw	5'- ACGGATCGCACGGCCTTCGTG -3'	300	Control endógeno 18S
18S Rv	5'- ACCAGACTTGCCCTCCAATGG -3'		
ToBRFV-F*	5'- AACCAGAGTCTTCTATACTCGGAA-3'	475	ToBRFV
ToBRFV-R*	5'- CTCWCCATCTCTTAATAATCTCCT-3'		

*Los primers específicos para ToBRFV fueron diseñados por el Área de Validación de Protocolos.

3.1.3.2.1. Ensayo para control endógeno

En el ensayo de control endógeno utilizar los primers mencionados en el Cuadro 3.

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno 18S.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	
Buffer PCR	10 X	2.5	
MgCl₂	50 mM	0.75	
dNTPs	10 mM	0.5	
Primer 18S Fw	10 µM	1	
Primer 18S Rv	10 µM	1	
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.25	
cDNA		1	
Agua °PCR	-	18	
		Volumen total	25

2) A continuación, programar el termociclador con las condiciones del Cuadro 5.

Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección del control endógeno 18S.

Etapas	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
Pausa	12°C	∞	



Correr los productos de PCR a 100 V en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (hasta asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de peso molecular de DNA), u otro método adaptable que permita interpretar los resultados. Si se corre en gel de agarosa, teñir en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

3.1.3.2.2. Ensayo para ToBRFV

En el ensayo de detección de ToBRFV utilizar los primers mencionados en el Cuadro 3.

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final para ToBRFV.

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 °PCR	-	3.0
	Volumen total	25

- 2) A continuación, programar el termociclador con las condiciones del Cuadro 7 para ToBRFV.

Cuadro 7. Programa del termociclador para la detección del ToBRFV.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	90 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	35
Alineamiento	55°C	20 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1
Pausa	12°C	∞	

Correr los productos de PCR a 100 V en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (hasta asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de peso molecular de DNA), u otro método adaptable que permita interpretar los resultados. Si se corre en gel de agarosa, teñir en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

3.1.3.3. Controles para las pruebas moleculares

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

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser RNA genómico o el fragmento clonado del amplicón; éste deberá estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: 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: es la mezcla de reacción sin molde. Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

3.1.4. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo de control endógeno, el control positivo y cada una de las muestras debe generar una banda de tamaño de 300 pb; el control negativo de reactivos no debe de generar bandas (Figura 1).
- El control negativo de reactivos y el control negativo de matriz no deben generar bandas en el ensayo de PCR de ToBRFV (Figura 2).
- El control positivo para el ensayo de PCR de ToBRFV con el par de primers debe generar una banda de tamaño de 475 pb (Figura 2).

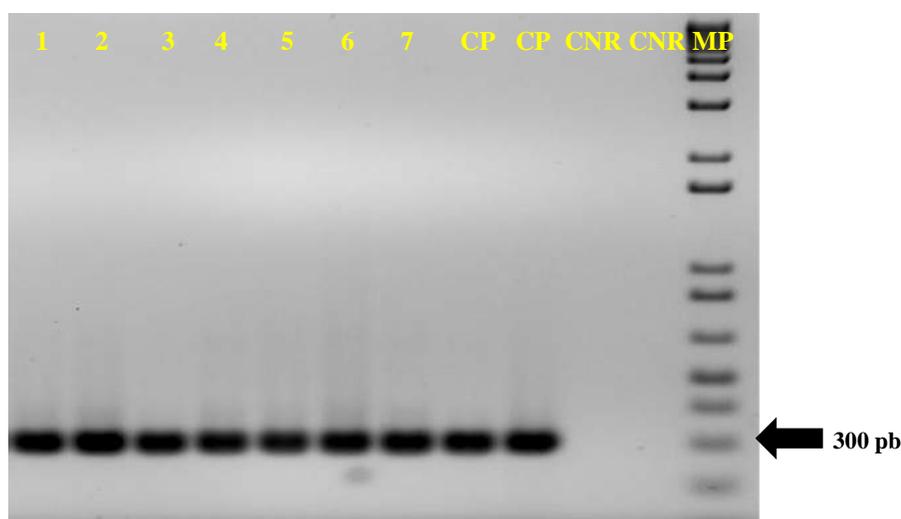


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de gen endógeno 18s. MP: marcador de peso 1 KB plus; 1-7: muestra; CP: control positivo; CNR: control negativo de reactivos.

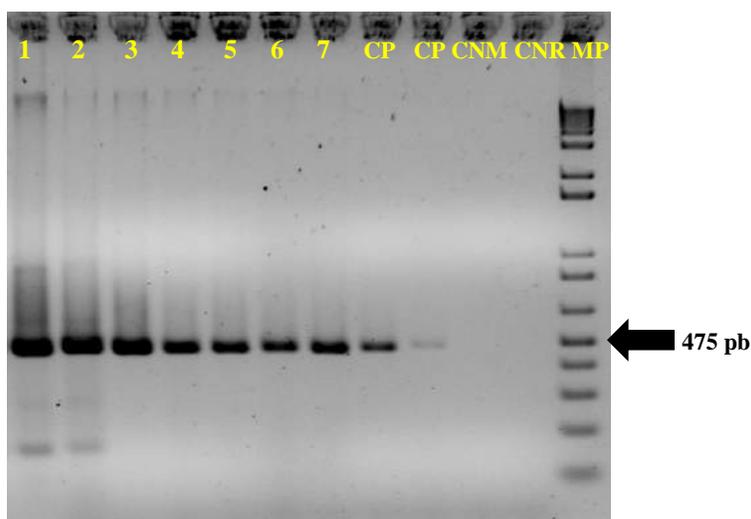


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de ToBRFV. MP: marcador de peso 1 KB plus; 1-7: muestra; CP: control positivo; CNM: control negativo de matriz; CNR: control negativo de reactivos.

3.2. Identificación de la plaga

Se considera como resultado positivo a ToBRFV aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 475 pb con los primers específicos (ToBRFVF/ToBRFVR).

El resultado es negativo si hay amplificación del control endógeno, pero no del fragmento que resulta de la PCR con juegos de primers antes mencionados.

Como prueba de corroboración, se debe de secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final con los primers (ToBRFVF/ToBRFVR). Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

Los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Virología del CNRF para su análisis.

En caso de haber inconsistencias en el diagnóstico de ToBRFV (muestras con síntomas de virosis pero negativas al ensayo de PCR ToBRFV), correr los ensayos de PCR para *Tobamovirus* (Anexo 8.4); si hay amplificación de la banda esperada, enviar a secuenciar. Si el resultado del análisis de secuencia es negativo, se reporta negativo para *Tobamovirus*.



4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de ToBRFV. Concluido el diagnóstico, considerar lo siguiente:

Muestras positivas: almacenar el tejido vegetal a -20 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de tres meses para contar con el material en caso de ser necesaria una corroboración. Posteriormente, de no ser requerido el material, esterilizar en autoclave a 15 psi por 20 minutos, antes de ser desechada.

Muestras negativas: almacenar el tejido vegetal a 4 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de un mes, para contar con el material en caso de ser necesaria una corroboración. Posteriormente, esterilizar el material en autoclave a 15 psi por 20 minutos, antes de ser desechada.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.virologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 011 (52) 55 59 05 1000 Ext. 51379

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Virología (M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna) revisado por el Área de Validación de Protocolos (Ing. Karina Araujo Ruiz y M. en C. Johan Rodríguez Mendoza) y Departamento de Fitopatología (M. en C. María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Israel David Rivas Avilés).

7. REFERENCIAS

- Broadbent, L. (1976). Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annual Review of Phytopathology*. (14), 75-96.
- De la Torre-Almaraz, R., Salazar-Segura, M. & Ruiz-Medrano, R. (2007). Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchasanulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencias*. 41, 763.773.
- González-Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35(3): 591-610.
- Hull, Robert. (2014). Chapter 10: Movement of viruses within plants. Christine Minihane & Catherine Mullane (Eds), *Plant Virology*. (531-603).Oxford, Reino Unido Elsevier Science
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2018). *ICTV reports. ICTV report: Positive-sense RNA viruses. Virgaviridae. Tobamovirus*. (2018). Recuperado el 19 de



septiembre del 2018 de https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus.

- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O. & Dombrovsky, A. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. PLoS ONE, 12(1), e0170429.
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W. & Turina, M. (2015). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*. 161 (2), 503-506.
- 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.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Virus del fruto marrón rugoso del tomate) [Versión 2.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1. Síntomas de ToBRFV



Figura 3. Síntomas de ToBRFV en cultivo de tomate. a-c) mosaico en hoja. c) alargamiento de la hoja. d) pedúnculos y cálizos secos. e) necrosis en cálizos, pedúnculo y pecíolos. f-g) manchas amarillas en frutos. h) síntoma de infección mixta con ToBRFV y TSWV. i) rugosidad en fruto. (Fuente: Luria et al., 2017).



8.2. Medidas de seguridad para el manejo de muestras vegetales infectadas

Durante el manejo de la muestra para el diagnóstico, es importante tomar medidas de seguridad, ya que la partícula viral de ToBRFV es muy estable en el medio ambiente y se transmite mecánicamente (quedando en herramientas y superficies). Las medidas preventivas encaminadas para evitar la contaminación de sus áreas de trabajo son de vital importancia.

- Restringir el acceso del personal en las áreas donde se lleva a cabo la toma de muestra.
- Usar zapatones o implementar tapetes sanitarios.
- Usar bata desechable sobre la bata de algodón.
- Usar guantes de nitrilo y cambiar éstos para cada toma de muestra entre diferentes lotes o variedades.
- Utilizar soluciones desinfectantes como detergentes o hipoclorito de sodio (3%-5%) para el material, equipo, herramientas y superficies que estén en contacto con la muestra durante todo el proceso de diagnóstico.
- Inactivar el papel absorbente, zapatones, bata desechable y desechos vegetales en autoclave a 15 psi por 20 minutos antes de ser eliminados.

8.3. Toma de muestra



Figura 4. Toma de muestra de tomate. Cortes de 0.5 cm de la nervadura central de hojas.

8.4. Acondicionamiento para la germinación de semillas.

La metodología empleada para semillas de Solanáceas es la siguiente:

- 1.- Se realiza una inspección visual de la semilla para verificar que se encuentra en óptimas condiciones para su proceso de germinación.
- 2.- Se toma el 50 % de la muestra de semilla.

Nota: Esto debido a que la cantidad de semilla que llega para su análisis es variable y pequeña. Se recomienda contemplar el otro 50 % para una posible corroboración de ser necesario. Cabe señalar que el CNRF establece un **tamaño de muestra mínimo** de 1000 semillas equivalente a 3 gramos aproximadamente, sin embargo, el estándar de la Federación Internacional de semillas es de 3000 semillas, en submuestras de 250 para el análisis de *Tobamovirus*.

- 3.- En un vaso de precipitado estéril se coloca la semilla con agua destilada estéril, hasta que la cubra.
- 4.- Se coloca en agitación orbital por 20 minutos para su lavado. Concluido el tiempo se decanta el agua. Se repite el lavado (1x).

Nota: Esto con el objetivo de retirar los tratamientos biológicos o ingredientes químicos de la superficie de la semilla. Como se conoce, las partículas virales de los *Tobamovirus* están en la testa de la semilla, por lo que, también se corre el riesgo de tener pérdidas de partículas virales durante este proceso. Sin embargo, durante la experiencia de diagnóstico de este virus empleando este procedimiento, se han detectado positivos en tejido de plántula.

5.- Terminando los lavados, se coloca la muestra de semillas sobre una sanita estéril, dentro de una cabina de flujo laminar. Si no se cuenta con ella se puede trabajar cercas de una lámpara de alcohol.

6.- Se prepara una cámara húmeda, en un frasco de vidrio con tapa o cajas Petri. Recordando que todo el material debe estar esterilizado.

7.- Una vez que a la semilla se le retiro el exceso de agua, se coloca en la cámara húmeda, acomodándola a manera que quede distribuida y se sella con parafilm.

8.- La cámara húmeda debidamente etiquetada con la muestra se coloca en una incubadora a 25 °C para su germinación.

Nota: El periodo promedio para la toma del tejido vegetal de plántula es de 7-10 días después de la germinación (Figura 5).



Figura. 5 Acondicionamiento en cámara húmeda para la germinación de semillas.

8.5. Ensayo de PCR para *Tobamovirus*

Los primers a utilizar para la detección del género *Tobamovirus* son los propuestos por Luria y colaboradores (2017) y por De la Torre-Almaraz, Salazar-Segura y Ruiz-Medrano (2007); ambos amplifican, respectivamente, una región dentro del gen que codifica para la proteína de la cápside.

Cuadro 8. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de *Tobamovirus*.

Nombre de los primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Referencia
TOBF-3666	5'- ATGGTACGAACGGCGGCAG -3'	1052	Luria et al.
TOBR-4718	5'-CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC- 3'		
TOBCP-Fw	5'-GCIYTIGGIAAYCARTTYCARACICARCA- 3'	250	De la Torre-Almaraz et al.
TOBCP-Rv	5'-IGCRTCIARIGTYTCIGCIGTIGTIGRRTT- 3'		

En el ensayo de detección de *Tobamovirus* utilizar los primers mencionados en el Cuadro 8, y el cDNA previamente sintetizado en el punto 3.1.3.1.

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Mezcla de reacción para los ensayos de PCR punto final para *Tobamovirus*.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	
Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix	2X	12.5	
Primer forward*	10 µM	1.25	
Primer reverse*	10 µM	1.25	
SuperFi™ GC Enhancer	5X	5.0	
cDNA	-	2.0	
Agua °PCR	-	3.0	
*Emplear cualquier par de primers del Cuadro 8	Volumen total		25

- 2) A continuación, programar el termociclador con las condiciones del Cuadro 10 para *Tobamovirus* (TOBF-3666/TOBR-4718).

Cuadro 10. Programa del termociclador para la detección del *Tobamovirus* (TOBF-3666/TOBR-4718).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	5 minutos	1
Desnaturalización	98°C	1 minuto	25
Alineamiento	62°C	3 minutos	
Extensión	72°C	3 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1
Pausa	12°C	∞	



3) A continuación, programar el termociclador con las condiciones del Cuadro 11 para *Tobamovirus* (TOBCP-Fw/TOBCP-Rv).

Cuadro 11. Programa del termociclador para la detección del *Tobamovirus* (TOBCP-Fw/TOBCP-Rv).

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 minuto	1
Desnaturalización	95°C	2 minutos	31
Alineamiento	56°C	2 minutos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1
Pausa	12°C	∞	

Correr los productos de PCR a 100 V en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (hasta asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de peso molecular de DNA), u otro método adaptable que permita interpretar los resultados. Si se corre en gel de agarosa, teñir en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

Los controles moleculares son los mismos que se mencionan en la sección 3.1.3.3. Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- Para el ensayo de control endógeno se toman los criterios mencionados en la sección 3.1.4.
- El control negativo de reactivos y el control negativo de matriz no deben generar bandas en ningún ensayo de PCR de *Tobamovirus* (Figura 6 y 7).
- El control positivo para el ensayo de PCR de *Tomabovirus* con el par de primers TOBF-3666/TOBF-4718 debe generar una banda de tamaño de 1052 pb (Figura 6).
- El control positivo para el ensayo de PCR de *Tomabovirus* con el par de primers TOBCP-Fw/TOBCP-RV debe generar una banda de tamaño de 250 pb (Figura 7).

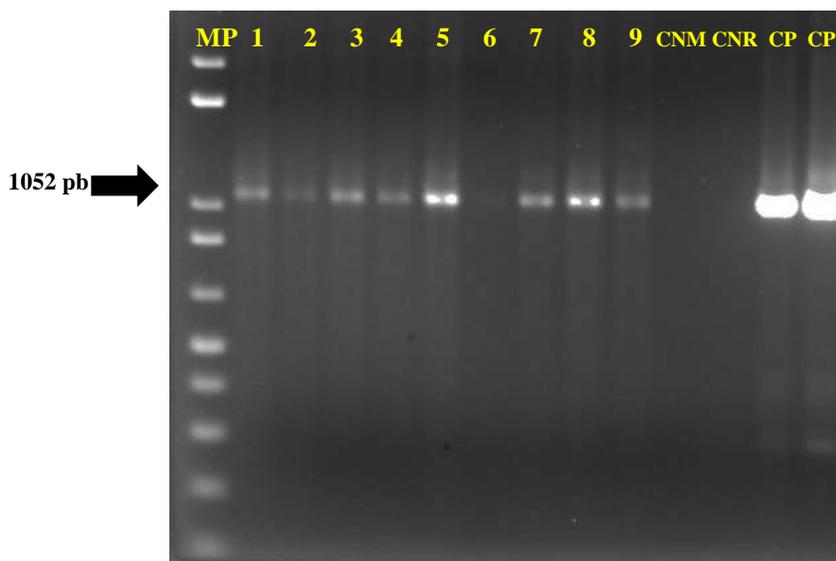


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de *Tobamovirus* (TOBF-3666/TOBR-4718). MP: marcador de peso 1 KB plus; 1-9: muestra; CNM: control negativo de matriz; CNR: control negativo de reactivos; CP: control positivo.

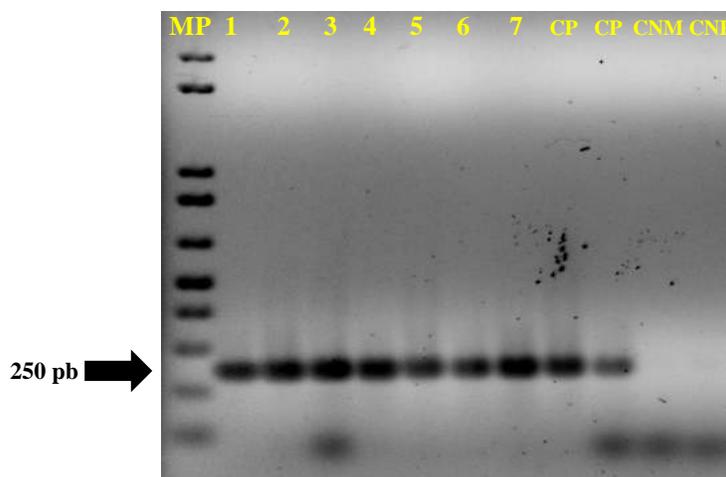


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de *Tobamovirus* (TOBCP-Fw/TOBCP-Rv). MP: marcador de peso 1 KB plus; 1-7: muestra; CP: control positivo; CNM: control negativo de matriz; CNR: control negativo de reactivos.