Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

NIMF 27
ANEXO 7

ESP

PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

PD 7: *Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata)*

Producido por la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en enero de 2015.
Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27
Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 7: *Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata)*

Adoptado en 2015; publicado en 2017

Índice

1. Información sobre la plaga 2
2. Información taxonómica 3
3. Detección 3
3.1 Muestreo 5
3.2 Detección biológica 5
3.3 Detección molecular 6
3.3.1 Preparación de las muestras 6
3.3.2 Extracción del ácido nucleico 7
3.3.3 Métodos moleculares genéricos para la detección de pospiviroides 9
3.3.3.1 R-PAGE 9
3.3.3.2 Hibridación con una sonda de ARNc marcada con digoxigenina 9
3.3.3.3 RT-PCR convencional con los cebadores de Verhoeven *et al.* (2004) 10
3.3.3.4 Análisis GenPospi basado en la RT-PCR en tiempo real (Botermans *et al.*, 2013) 10
3.3.4 Métodos moleculares de mayor especificidad para la detección del PSTVd 12
3.3.4.1 RT-PCR convencional con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997) 12
3.3.4.2 RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham *et al.* (2004) 12
3.3.4.3 RT-PCR en tiempo real (kit de Plant Print Diagnòstics) 13
3.4 Controles para las pruebas moleculares 14
3.5 Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real 15
3.5.1 RT-PCR convencional 15
3.5.2 RT-PCR en tiempo real 15
4. Identificación 16
4.1 Secuenciación y análisis de las secuencias 16
5. Registros 17
6. Puntos de contacto para información adicional 18
7. Agradecimientos 18
8. Referencias 19

1. Información sobre la plaga

Los viroides son moléculas de cadena simple de ARN monocatenario circulares cerradas covalentemente de entre 239 y 401 nucleótidos de longitud, no encapsuladas , que son replicadas por enzimas del hospedante (Hammond y Owens, 2006). El viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata) (*potato spindle tuber viroid*, PSTVd; género *Pospiviroid*) por lo general tiene una longitud de 359 nucleótidos, pero se han descrito aislamientos del PSTVd de entre 341 y 364 nucleótidos (Wassenegger *et al.*, 1994; Shamloul et al., 1997; Jeffries, 1998). Se han descrito cepas con efectos leves o graves, según los síntomas que ocasionan en cultivares susceptibles de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), por ejemplo, en el cv. 'Rutgers'., (Fernow, 1967).

El rango de hospedantes naturales del PSTVd es relativamente reducido. Sus hospedantes naturales primarios son especies de *Solanum* que forman estolones y tubérculos, como *Solanum tuberosum* L. (papa) y *S. lycopersicum* (tomate), aunque también se ha encontrado en *Capsicum annuum, Persea americana* y *S. muricatum*. El PSTVd se ha detectado en especies de plantas ornamentales de la familia Solanaceae de propagación principalmente vegetativa (concretamente en *Brugmansia* spp., *Cestrum* spp., *Datura* sp., *Lycianthes rantonetti, Petunia* spp., *Physalis peruviana, Solanum* spp. y *Streptosolen jamesonii*), pero también en *Chrysanthemum* sp. y en *Dahlia* × *hybrida*, de la familia Asteraceae (para más detalles sobre los hospedantes naturales, véase CABI (s. f.)). El rango de hospedantes experimentales es amplio e incluye especies de la familia Solanaceae y también algunas especies de al menos otras nueve familias. La mayoría de los hospedantes presentan pocos o ningún síntoma de enfermedad (Singh, 1973; Singh *et al.*, 2003).

Se han detectado infecciones de *S. tuberosum* por el PSTVd en algunos países o estados de África, Asia, Europa Oriental, América del Norte (EPPO/CABI, 1997), América Central (Badilla *et al.*, 1999), América del Sur y el Oriente Medio (Hadidi *et al.*, 2003). Sin embargo, su distribución geográfica es más amplia en las especies de plantas ornamentales y en otros hospedantes (véase CABI (s. f.) para la distribución geográfica).

En *Solanum tuberosum* el principal medio de dispersión del PSTVd es la propagación vegetativa, aunque también se disemina por contacto, sobre todo por la maquinaria empleada en el campo y por el corte de tubérculos de papa para semilla (Hammond y Owens, 2006). El PSTVd se transmite por la semilla verdadera de papa — podrá estar infectado hasta el 100% de la semilla (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970)— y también por el polen (Grasmick y Slack, 1985; Singh *et al.*, 1992). De Bokx y Pirone (1981) reportaron una tasa de transmisión baja del PSTVd por el áfido *Macrosiphum euphorbiae*, pero no por los áfidos *Myzus persicae* ni *Aulacorthum solani*. Sin embargo, se ha descrito la transmisión y la adquisición experimentales del PSTVd por *M. persicae* a partir de plantas infectadas a la vez por el PSTVd y el virus del enrollado de la hoja de la papa (*potato leafroll virus*, PLRV) (Salazar *et al.*, 1995; Singh y Kurz, 1997). Posteriormente se demostró que el PSTVd estaba encapsulado de manera heteróloga dentro de partículas del PLRV (Querci *et al.*, 1997), un fenómeno que podrá tener repercusiones importantes en la epidemiología y la dispersión del PSTVd en condiciones de campo.

En *Solanum lycopersicum*, el PSTVd se dispersa fácilmente por contacto y se ha comprobado que se transmite por el polen y las semillas (Kryczynski *et al.*, 1988; Singh, 1970). Se ha demostrado que la transmisión mediante semillas de tomate contribuye a la dispersión internacional del PSTVd (van Brunschot *et al.*, 2014) y es posible que el PSTVd también se disperse en semillas de chile (*Capsicum*) infectadas (Lebas *et al.*, 2005).

Las especies de plantas ornamentales infectadas podrán actuar como fuente de inóculo si se manipulan antes de tocar otras plantas susceptibles y se ha comprobado que son una vía para la dispersión internacional del PSTVd (Navarro *et al.*, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010). Se comprobó que no había transmisión del PSTVd por *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Frankliniella occidentalis* ni *Thrips tabaci* (Nielsen *et al.*, 2012).

El PSTVd es el único viroide que se sabe que infecta naturalmente a especies cultivadas de *Solanum*, aunque el viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd) infecta a la especie silvestre *S. cardiophyllum* (Martinez-Soriano *et al.*, 1996). Otras especies de viroides del género *Pospiviroid* infectan experimentalmente a *S. tuberosum* (Verhoeven *et al.*, 2004).

Además del PSTVd, se han detectado otros pospiviroides que infectan a *S. lycopersicum* de manera natural, como el viroide de la exocortis de los cítricos (*citrus exocortis viroid*, CEVd; Mishra *et al.*, 1991), el viroide latente de *Columnea* (*Columnea latent viroid*, CLVd; Verhoeven *et al.*, 2004), el viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd; Ling y Bledsoe, 2009), el viroide del achatamiento del fruto del pimiento (*pepper chat fruit viroid*, PCFVd; Reanwarakorn *et al.*, 2011), el viroide del enanismo apical del tomate (*tomato apical stunt viroid*, TASVd; Walter, 1987), el viroide del enanismo clorótico del tomate (*tomato chlorotic dwarf viroid*, TCDVd; Singh *et al.*, 1999) y el viroide de la planta macho del tomate (*tomato planta macho viroid*, TPMVd; Galindo *et al.*, 1982).

2. Información taxonómica

Nombre: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)

Sinónimos: potato spindle tuber virus, potato gothic virus, tomato bunchy top virus

Posición taxonómica: Pospiviroidae, *Pospiviroid*

Nombres comunes: viroide del tubérculo fusiforme de la papa (también "virus" o "enfermedad" del tubérculo fusiforme de la papa o simplemente "tubérculo fusiforme de la papa"), viriode/virus/enfermedad del tubérculo ahusado de la papa

3. Detección

La apariencia y la gravedad de los síntomas varían en función de la cepa de PSTVd, del cultivar y del medio ambiente. En *S. tuberosum*, la infección podrá ser asintomática o producir síntomas de leves a severos (disminución del tamaño de la planta, crecimiento erecto y filotaxis dextrógira del follaje en vista superior; hojas de color verde oscuro y rugosas). Los tubérculos pueden ser de tamaño reducido, deformes, fusiformes o con forma de mancuerna (alargados con un estrechamiento central), con ojos prominentes manifiestos distribuidos uniformemente (EPPO, 2004). En *S. lycopersicum* los síntomas incluyen retraso del crecimiento, epinastia; rugosidad y torsión lateral de los foliolos nuevos; clorosis, enrojecimiento, fragilidad y necrosis de las hojas; frutos de tamaño reducido y que no maduran completamente (Mackie *et al.*, 2002; Hailstones *et al.*, 2003; Lebas *et al.*, 2005). En *C. annuum* los síntomas son sutiles: márgenes ondulados de las hojas cercanas a la parte superior de la planta (Lebas *et al.*, 2005). Ninguna de las especies de plantas ornamentales investigadas hasta la fecha muestra síntomas (Verhoeven, 2010).

Dado que las infecciones por el PSTVd podrán ser asintomáticas, es necesario realizar pruebas para la detección e identificación del viroide. El PSTVd se puede detectar mediante las pruebas biológicas y moleculares que se muestran como opciones en la Figura 1, pero para la identificación es necesario secuenciar el producto de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR, por sus siglas en inglés), dado que las pruebas no son específicas para el PSTVd y detectarán también otros viroides. La secuenciación también servirá para evitar la notificación de falsos positivos. Si se considera que la patogenicidad es importante se podrá realizar la indexación biológica. Si la identificación del PSTVd constituye la primera detección en un país, se podrá solicitar la confirmación del diagnóstico a otro laboratorio.

Deberían incluirse en todas las pruebas los controles apropiados para minimizar el riesgo de resultados falsos positivos o falsos negativos.

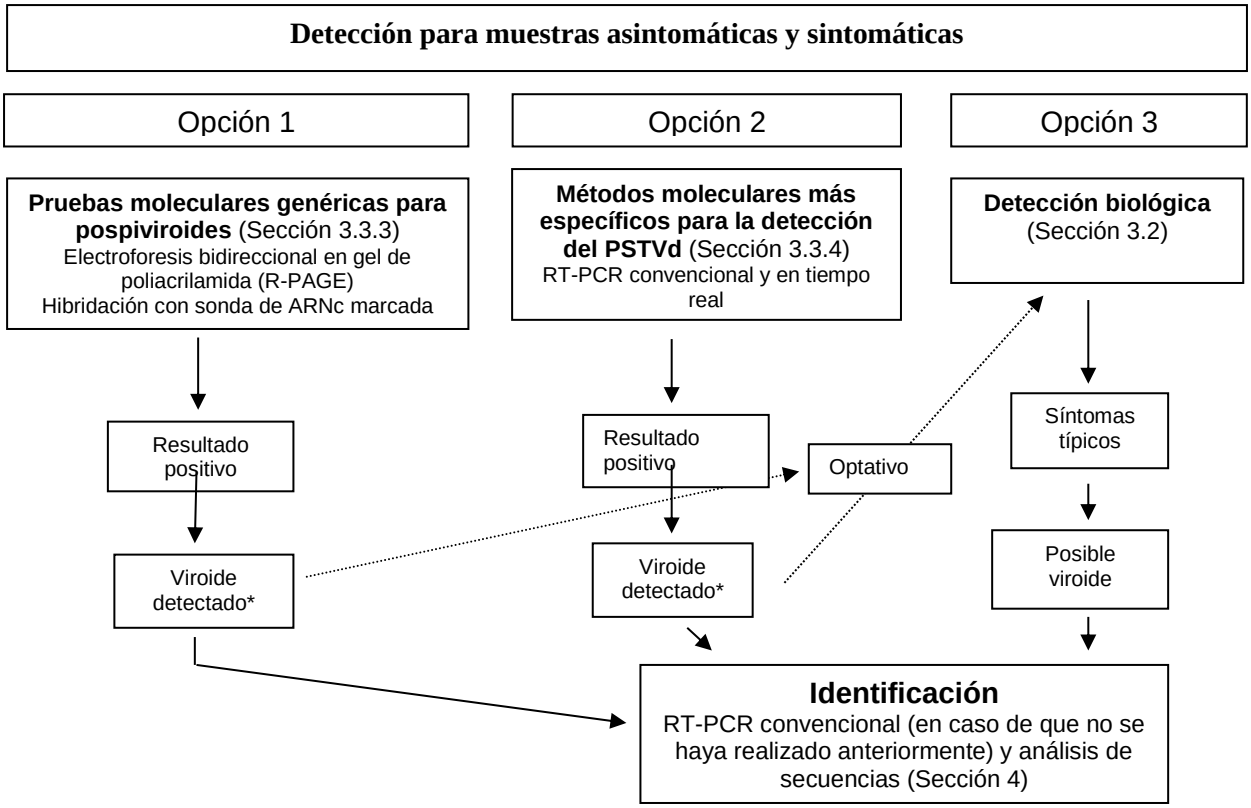

Figura 1. Requisitos mínimos para la detección e identificación del viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)

* La identificación podrá no ser necesaria en el caso de todas las muestras que den positivo para viroides en determinadas circunstancias, por ejemplo, si se está afrontando un brote del PSTVd.

Nota: Si se sospecha la presencia de un viroide en una muestra (p. ej., por la presencia de síntomas característicos) pero se obtiene un resultado negativo en una prueba, debería realizarse otra prueba distinta para confirmar el resultado.

El presente anexo se ocupa de la detección del PSTVd; no se ha elaborado para la detección e identificación de otras especies de pospiviroides. No obstante, para elegir un método de detección e identificación debe tenerse en cuenta la posible presencia de otros viroides. Por lo tanto, en este anexo se describen métodos de detección inespecíficos que detectarán todos los viroides conocidos, incluidos los pospiviroides como el PSTVd. Para la identificación se deberá secuenciar el producto de la PCR.

Se describen protocolos para la detección del PSTVd en hojas, tubérculos y tejido de semilla botánica (verdadera), aunque la detección fiable en el tejido de semilla es especialmente difícil.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se define el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas. En EPPO (2014) se proporcionan recomendaciones relativas a la validación de métodos de.

El rendimiento de una prueba molecular está determinado tanto por la matriz que se va a analizar como por la posterior elección de los métodos de preparación de la muestra, de extracción del ácido nucleico y de detección e identificación. En el Cuadro 1 se ofrece una visión general de los datos de validación disponibles para diferentes matrices y combinaciones de métodos. Los detalles de estos métodos se describen en los párrafos correspondientes o en las referencias indicadas.

3.1 Muestreo

La NIMF 31 (*Metodologías para muestreo de envíos*) brinda orientación general sobre las metodologías de muestreo.

Microplantas de *S. tuberosum* y plantas de *S. tuberosum* cultivadas en invernadero. En el caso de las microplantas, debería utilizarse como muestra la planta completa o deberían tomarse como muestra las dos terceras partes superiores de la planta, en condiciones asépticas para permitir que el resto de la planta continúe creciendo. Las microplantas deberían tener entre cuatro y seis semanas, tallos de aproximadamente 5 cm de longitud y hojas bien formadas. En el caso de las plantas cultivadas en invernadero se debería utilizar un foliolo completamente expandido de cada planta. La concentración de viroides es menor a temperatura baja y con bajos niveles de iluminación, por lo que las plantas se deberían cultivar a una temperatura de al menos 18 °C y con un fotoperíodo de al menos 14 h. Las microplantas o las hojas podrán agruparse; la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Plantas de *S. tuberosum* cultivadas en el campo. Debería usarse un foliolo terminal no senescente completamente expandido del extremo superior de cada planta. Las hojas podrán agruparse para los análisis; la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Tubérculos de *S. tuberosum*. El PSTVd se distribuye de manera sistémica en los tubérculos de *S. tuberosum* infectados (Shamloul *et al.*, 1997) y está también presente, en casi la misma proporción, en distintas partes de los tubérculos infectados tanto de manera primaria como secundaria (Roenhorst *et al.*, 2006). La mayor concentración se detecta inmediatamente después de la cosecha. En los tubérculos almacenados a 4 °C la concentración no disminuye significativamente durante un período de hasta tres meses, pero después de seis meses de almacenamiento puede reducirse más de 10^4 veces. Se puede usar como muestra un único trozo central de cualquier parte del tubérculo, que podrá agruparse; la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Hojas de otros cultivos y de especies de plantas ornamentales. Se utilizan hojas jóvenes completamente expandidas. Las hojas podrán agruparse para los análisis; la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado. Téngase en cuenta que la concentración de viroides se ve afectada por la edad/madurez de las plantas y que a menudo se producen fluctuaciones estacionales. Además, algunas especies contienen sustancias bioquímicas que podrán inhibir la transmisión a las plantas objeto de análisis (p. ej. *Brugmansia* spp.) o inhibir la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (p. ej. *Calibrachoa* spp., *Solanum jasminoides* y *S. jamesonii*).

Semilla. La concentración del viroide podrá variar en gran medida entre distintas semillas y el nivel de infección podrá variar desde menos del 1 % hasta el 100 %. Esto dificulta mucho la recomendación de un tamaño muestral y una tasa de agrupamiento (EUPHRESCO, 2010). Para *S. lycopersicum* se han empleado tasas de agrupamiento de entre 100 y 1000 para una única prueba. La tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Las semillas de papa se podrán sembrar en un medio de crecimiento (p. ej., compost) en bandejas y las plántulas o plantas se podrán analizar de manera no destructiva utilizando el mismo procedimiento descrito para las plantas cultivadas en invernadero (EPPO, 2006).

3.2 Detección biológica

La inoculación de plantas de *S. lycopersicum* (cultivares 'Rutgers', 'Moneymaker' o 'Sheyenne') permitirá la detección de muchos viroides, pero no de todos —p. ej., el tomate no es un hospedante del pospiviroide *Iresine viroid 1* (IrVd-1; Spieker, 1996; Verhoeven *et al.*, 2010)— y aportará evidencia visual de la patogenicidad. Sin embargo, algunas formas del viroide podrán no ser detectadas debido a la ausencia de síntomas y, además, los síntomas podrán no ser diagnósticos para el PSTVd. La indexación biológica podrá requerir una gran cantidad de espacio de invernadero, exige mucho trabajo y podrán necesitarse al menos varias semanas para completar la prueba. No se han realizado

investigaciones para comparar la sensibilidad de este método con la de otros métodos descritos en el presente protocolo. Si es menos sensible que los métodos moleculares, podría ser menos adecuado para el análisis de semilla. Sin embargo, en la indexación biológica el viroide podrá amplificarse hasta un nivel que permita la detección por otros métodos.

Se trituran aproximadamente 200 mg a 500 mg de tejidos de hoja, raíz o tubérculo en una pequeña cantidad de tampón fosfato 0,1 M (una dilución 1:1 es adecuada) de inoculación, que contiene carborundo (de grano 400). El tampón fosfato (pH 7,4) se prepara combinando 80,2 ml de K_2HPO_4 1 M con 19,8 ml de KH_2PO_4 1 M y ajustando el volumen hasta 1 litro con agua destilada.

Se inoculan plantas de tomate jóvenes con una o dos hojas completamente expandidas: tras frotar suavemente la superficie de la hoja con un dedo enguantado, una torunda o un hisopo de algodón inmerso previamente en el inóculo, las hojas se enjuagan inmediatamente con agua hasta eliminar el carborundo. Las plantas se cultivan con una fluctuación diurna de temperatura de 24 °C a 39 °C y un fotoperíodo de 14 h complementado con iluminación de vapor de sodio de aproximadamente 650 $\mu E/m^2/s$ (Grassmick y Slack, 1985). Temperaturas más bajas y una menor iluminación podrán reducir la sensibilidad del análisis. Las plantas se inspeccionan semanalmente, en busca de síntomas, por un período máximo de seis semanas después de la inoculación. Los síntomas de infección por el PSTVd incluyen retraso del crecimiento, epinastia; rugosidad y torsión lateral de los foliolos nuevos; clorosis, enrojecimiento, fragilidad y necrosis de las hojas.

Un bioensayo en el tomate permitirá detectar muchos pospiviroides (excepto el IrVd-1, véase más arriba); por tanto, se debería realizar la RT-PCR al ácido nucleico extraído de plantas indicadoras sintomáticas y el producto de la PCR se debería secuenciar a efectos de la identificación.

3.3 Detección molecular

3.3.1 Preparación de las muestras

Microplantas, material foliar y de raíces. Para moler el material se han utilizado satisfactoriamente tanto morteros como homogeneizadores (p. ej., el Homex 6 (Bioreba)) con bolsas de extracción (Bioreba). La adición de una pequeña cantidad de agua o de tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico) o la congelación de la muestra (p. ej., en nitrógeno líquido) podrá facilitar la homogeneización.

El procedimiento siguiente ha sido validado (véase el Cuadro 1) en combinación con la extracción de ácido nucleico utilizando el método 2 de extracción con partículas magnéticas y el análisis para la detección del género Pospiviroid mediante RT-PCR en tiempo real (en adelante "análisis GenPospi") descrito en el presente anexo. Se homogeneiza aproximadamente 1 g de tejido en una bolsa de extracción mediante un homogeneizador Homex 6 o manual (Bioreba) con 3,5 ml (rango 1:2-1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus (compuesto por 6 M de clorhidrato de guanidina; 0,2 M de acetato de sodio, pH 5,2; 25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 2,5% de polivinilpirrolidona (PVP)-10). A continuación se incuban las muestras durante 10 min a 65°C y a 850 rpm en un termomezclador (o bien se agitan —invirtiendo el tubo 3 veces— y luego se centrifugan durante 2 min a 16 000 *g*) antes de la extracción del ácido nucleico.

Tubérculos de *S. tuberosum*. Los trozos centrales extraídos del tubérculo se homogeneizan bien en agua o en tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico; 1 ml por g de trozo central de tubérculo). Se ha utilizado satisfactoriamente un molinillo Homex 6 con bolsas de extracción. La congelación de los trozos centrales (p. ej. a –20 °C) antes de añadir el agua o el tampón de lisis facilita la homogeneización.

Semillas. Para cantidades pequeñas de semillas (< 100), podrá utilizarse un lisador de tejidos (p. ej., el Retsch TissueLyser (Qiagen). Para cantidades mayores de semillas podrá utilizarse un mezclador de palas (p. ej., el MiniMix (Interscience)) o un homogeneizador (p.ej., el Homex 6) con una cantidad mínima de tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico). Las semillas también se podrán aplastar con un martillo (Bertolini *et al.*, 2014b) o

utilizando un mortero. Este último método podrá no ser práctico para un uso rutinario porque tal vez resulte difícil evitar la contaminación cruzada. Otra opción podrá ser congelar la muestra con nitrógeno líquido y triturarla después en un molino para la desintegración celular (este método también se puede utilizar con otros tipos de tejido).

El procedimiento siguiente ha sido validado (véase el Cuadro 1) en combinación con la extracción de ácido nucleico utilizando el método 2 de extracción con partículas magnéticas y la prueba de RT-PCR en tiempo real de Boonham *et al.* (2004) descrita en el presente anexo. Cada una de tres submuestras de 1 000 semillas se remoja durante 30-60 min a temperatura ambiente en 20 ml de tampón de lisis GH plus en una bolsa de homogeneización BagPage (Interscience) de 100 ml; se homogeneiza durante 90 s en un homogeneizador BagMixer (Interscience) y se incuba (o se agita y se centrifuga según el procedimiento descrito para las microplantas, el material foliar y las raíces) antes de la extracción del ácido nucleico.

Impresión o frotis por aplastamiento de los tejidos. Los peciolos de las hojas o los vástagos desprendidos se presionan sobre membranas de nailon. Según Bertolini *et al.* (2008, 2014a), en una membrana de nailon de aproximadamente 0,5 cm^2 se podrán realizar varias impresiones o frotis por aplastamiento parcialmente superpuestos de distintas hojas o vástagos desprendidos. La membrana que contiene la muestra inmovilizada se corta y se inserta en un microtubo; la muestra inmovilizada se debería manejar con unas pinzas limpias. Las muestras obtenidas por impresión o frotis por aplastamiento se pueden almacenar a temperatura ambiente en un lugar seco y protegido de la luz durante al menos tres meses. Para la extracción del ARN diana de las membranas, a cada microtubo que contiene una muestra inmovilizada se añaden 100 µl de tampón de glicina, luego se mezcla en vórtex y se conserva sobre hielo hasta la amplificación mediante PCR.

3.3.2 Extracción del ácido nucleico

Se podrá utilizar una gran variedad de métodos de extracción de ácido nucleico, desde kits comerciales hasta métodos publicados en revistas científicas. Los siguientes kits de extracción de ácido nucleico, tampones y procedimientos se han utilizado satisfactoriamente para la detección del PSTVd.

Kits comerciales. Se podrán utilizar kits de extracción comerciales, como RNeasy (Qiagen), MasterPure (Epicentre) y Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics), siguiendo las instrucciones del fabricante. RNeasy fue evaluado para la extracción de ARN del PSTVd de diferentes matrices como parte del proyecto de detección y epidemiología de pospiviroides (Detection and Epidemiology of Pospiviroids, DEP) de EUPHRESCO (EUPHRESCO, 2010).

Método descrito por Mackenzie *et al.* (1997). El tejido vegetal se homogeneiza (1:10 p/v) en tampón de lisis (4 M de isotiocianato de guanidina, 0,2 M de acetato de sodio, 25 mM de EDTA, 2,5 % de PVP-40 (p/v) y 1 % de 2-mercaptoetanol (v/v) añadido justo antes de su uso). A continuación se mezcla un mililitro de homogeneizado con 100 µl de N-lauroilsarcosinato de sodio al 20 % (p/v) y se incuba durante 10 min a 70 °C en un termomezclador con agitación a 1 200 rpm. Este método se puede utilizar para extraer ARN de calidad de una amplia gama de especies de plantas.

Método con tampón de EDTA. El tejido vegetal podrá homogeneizarse (1:4 p/v) en un tampón de lisis sencillo (50 mM de NaOH, 2,5 mM de EDTA) y a continuación incubarse (durante 15 min a aproximadamente 25 ºC) o centrifugarse (durante 15 min a 4 °C a 12 000 *g*). A continuación, en función del nivel de sensibilidad requerido, el sobrenadante puede bien utilizarse directamente para la RT-PCR (menos sensible) o puede impregnarse en una membrana de nitrocelulosa y eluirse con agua destilada estéril (más sensible) (Singh *et al.*, 2006). Aunque la concentración del viroide es menor en el método del EDTA que en los otros métodos de extracción descritos, esto no debería ser un factor limitante cuando el método se utilice con la RT-PCR o con la sonda marcada con digoxigenina (DIG). El método se ha utilizado con *S. lycopersicum* y *S. tuberosum*, así como con diversas especies de plantas ornamentales.

Extracción con fenol-cloroformo y extracción con polietilenglicol (PEG) en dos etapas. Se homogeneiza el tejido vegetal y se extrae el ácido nucleico según se describe en EPPO (2004). Este método se ha utilizado, en combinación con la electroforesis bidireccional en gel de poliacrilamida (R-PAGE), la sonda de ARN marcada con digoxigenina y los métodos de RT-PCR convencionales descritos en este protocolo de diagnóstico, para una gran variedad de especies de plantas y tipos de tejidos (p. ej., hojas y tubérculos de papa).

Extracción con CTAB. Se homogeneiza el tejido vegetal y se extrae el ácido nucleico según se describe en EPPO(2004). El método de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se ha utilizado con la RT-PCR en tiempo real para una gran variedad de especies de plantas y tipos de tejidos (p. ej., hojas y semillas de tomate; EUPHRESCO, 2010).

Método 1 de extracción con partículas magnéticas. En el siguiente procedimiento automatizado se utiliza el procesador de partículas magnéticas KingFisher mL (Thermo Scientific). Con los ajustes pertinentes de los volúmenes se podrán utilizar otros modelos de KingFisher.

Se maceran al menos 200 mg de tejido de hoja o de tubérculo o hasta 100 semillas de cada muestra, e inmediatamente se añade tampón de extracción en una proporción de 10 ml por cada g de tejido de hoja o tubérculo y de 20 ml por cada g de semilla. Se continúa macerando hasta obtener un lisado celular transparente con un residuo mínimo de tejido intacto. El tampón de extracción está compuesto por 200 µl de solución de pirofosfato tetrasódico (TNaPP) al 8,39 % p/v (pH 10,0–10,9) y 100 µl de emulsión antiespumante (Antifoam B Emulsion[Sigma]) añadidos a 9,8 ml de tampón de lisis de guanidina. El tampón de lisis de guanidina está compuesto por: 764,2 g de clorhidrato de guanidina; 7,4 g de EDTA disódico dihidratado; 30,0 g de PVP-10; 5,25 g de ácido cítrico monohidratado; 0,3 g de citrato trisódico; 5 ml de Triton X-100; 250 ml de etanol puro y 750 ml de agua.

Se decantan aproximadamente 2 ml de lisado en un tubo de microcentrifugadora nuevo y se centrifuga durante 1 min a aproximadamente 5 000 *g*. Se retira un mililitro de sobrenadante y se coloca en el primer tubo (A) del soporte de tubos de ensayo del procesador KingFisher mL, al cual se añaden 50 µl de partículas magnéticas (MAP Solution A, [Invitek]) mezcladas en vórtex. Al tubo B se añade 1 ml de tampón de lisis de guanidina; a los tubos C y D, 1 ml de etanol al 70 %, y al tubo E, 200 µl de agua o de tampón Tris-EDTA 1×.

Se coloca la tira de tubos en el procesador KingFisher mL y se ejecuta el programa (véase la Figura 2). Transcurridos 20 min, la máquina hará una pausa para permitir una fase de calentamiento. La tira de tubos se transfiere a un horno durante 5 min a 65–70 °C; a continuación, se vuelve a introducir en el procesador KingFisher mL y se reanuda el programa. Otros modelos podrán tener incorporada la capacidad de realizar una etapa de calentamiento o pausa para la evaporación. Una vez terminado el proceso, los ácidos nucleicos eluidos se transfieren a un nuevo tubo de microcentrifugadora.

Este método se ha utilizado para una gran variedad de especies de plantas, así como para tubérculos de papa y semillas de tomate, y se ha utilizado con dos de los análisis mediante RT-PCR en tiempo real descritos en este anexo (véanse las secciones 3.3.3.4 y 3.3.4.2). Con el método 1 de extracción con partículas magnéticas se podrán esperar valores de ciclo umbral (Ct) de varios ciclos más que con los de otros métodos de extracción descritos en el presente anexo, pero es un método de extracción valioso debido a su mayor capacidad de procesamiento de muestras (Roenhorst *et al.*, 2005).

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); **C**: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various);
D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); **E**: volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. ELUTION Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

Figura 2. Programa (en inglés) del Procesador de partículas magnéticas KingFisher mL (Thermo Scientific)

Método 2 de extracción con partículas magnéticas. Para este procedimiento automatizado se utiliza el kit Sbeadex maxi plant (LGC Genomics) con el sistema KingFisher 96 (Thermo Scientific). Se deberían seguir las instrucciones del fabricante, pero se utiliza el tampón de lisis GH plus en lugar del tampón de lisis PN incluido en el kit.

3.3.3 Métodos moleculares genéricos para la detección de pospiviroides

3.3.3.1 R-PAGE

La R-PAGE se ha recomendado como método de detección del PSTVd en hojas infectadas de *S. tuberosum* (EPPO, 2004) pero se determinó que su sensibilidad (límite de detección de 87 893 pg del PSTVd) es menor que la de otros métodos (con límites de detección de al menos 17 pg del PSTVd) evaluados en una prueba interlaboratorios: la sonda de ARNc marcada con digoxigenina; la RT-PCR convencional en dos pasos con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997) y el método en tiempo real de Boonham *et al.* (2004) (Jeffries y James, 2005; véase también el Cuadro 1).

Este método también se ha utilizado satisfactoriamente para otras plantas hospedantes, por ejemplo *C. annuum, S. tuberosum* (tubérculos) y *S. lycopersicum*. Dada su baja sensibilidad, tendría que validarse el agrupamiento de las muestras.

La R-PAGE detectará todos los pospiviroides conocidos; por lo tanto, para la identificación del PSTVd se debe realizar la RT-PCR del ácido nucleico y luego secuenciar el producto de la PCR.

3.3.3.2 Hibridación con una sonda de ARNc marcada con digoxigenina

Este método se ha recomendado para la detección del PSTVd en hojas infectadas de *S. tuberosum* (EPPO, 2004). Se ha determinado una sensibilidad para la detección del PSTVd en hojas de *S. tuberosum* de al menos 17 pg del PSTVd (Jeffries y James, 2005). El método también se ha usado satisfactoriamente en otros hospedantes, como *Petunia* spp., *S. jasminoides, S. lycopersicum* y *S. tuberosum* (tubérculos).

La sonda empleada se basa en un monómero completo del PSTVd elaborado por Agdia, Inc[9]. (número de catálogo: DLP 08000/0001). Dicha sonda se debería utilizar siguiendo las instrucciones del fabricante o consultando los detalles del método descrito por EPPO (2004). Además del tampón de Ames (EPPO, 2004), para la extracción del ácido nucleico podrán utilizarse tampón de polietilenglicol (PEG) y otros tampones de extracción.

El método de la sonda de ARNc marcada con digoxigenina detectará todos los pospiviroides conocidos; por lo tanto, para la identificación del PSTVd se debe realizar la RT-PCR del ácido nucleico y luego secuenciar el producto de la PCR.

3.3.3.3 RT-PCR convencional con los cebadores de Verhoeven *et al.* (2004)

En este análisis se utilizan los cebadores Pospi1 y Vid de Verhoeven *et al.* (2004). Los cebadores Pospi1 detectarán el CEVd, el viroide del enanismo del crisantemo (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), el IrVd-1, el MPVd, el PCFVd, el PSTVd, el TASVd, el TCDVd y el TPMVd. Los cebadores Vid detectarán el PSTVd, el TCDVd y, además, el CLVd. La utilización de los cebadores Pospi1 y Vid en dos reacciones independientes permitirá detectar todos los pospiviroides. No obstante, un apareamiento erróneo en posiciones críticas del sitio diana del cebador podrá impedir la detección de algunos aislamientos de pospiviroides (p. ej., con estos cebadores no se detectó una forma del CLVd; Steyer *et al.*, 2010) y se necesitarán cebadores adicionales para detectar estas cepas de pospiviroides. Se ha comprobado, en estudios *in silico* que las siguientes formas del PSTVd podrán no ser detectadas debido a un apareamiento erróneo del cebador con su secuencia complementaria en posiciones críticas; con los cebadores Pospi1: EU879925, EU273604, EF459697, AJ007489, AY372398, AY372394, FM998551, DQ308555 y E00278; con los cebadores Vid: EU273604[2]. Los cebadores Pospi1 son mucho más sensibles que los cebadores Vid para la detección del PSTVd.

Cebadores

Pospi1-FW (directo): 5´-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3´ (nucleótidos (nt) 86–102)

Pospi1-RE (inverso): 5´-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3´ (nt 283–261)

Vid-FW (directo): 5´-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3´ (nt 355–16)

Vid-RE (inverso): 5´-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3´ (nt 354–336)

Condiciones de la reacción

Se ha comprobado la fiabilidad del kit One-Step RT-PCR (Qiagen) para la detección del PSTVd, el CEVd, el CLVd, el CSVd, el TASVd y el TCDVd en muestras individuales (EUPHRESCO, 2010) y otros pospiviroides enumerados al comienzo de esta sección. No es necesario utilizar la solución Q descrita en EUPHRESCO (2010). Aunque podrán emplearse diversos kits de RT-PCR y condiciones de reacción, estos deberían ser validados para comprobar que son idóneos para el propósito previsto y se detectan todos los pospiviroides pertinentes.

Se añaden dos microlitros del molde a 23 µl de mezcla maestra compuesta por 1,0 µl de cada cebador directo e inverso (10 µM), 5 µl del tampón One-Step RT-PCR 5×, 1,0 µl de la mezcla enzimática One-Step RT-PCR, 1,0 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM de cada uno) y 14 µl de agua. El programa de termociclado es: 30 min a 50 °C; 15 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 62 °C y 60 s a 72 °C; y una etapa de extensión final de 7 min a 72 °C.

Electroforesis en gel

Después de la RT-PCR, los productos de la PCR (de aproximadamente 197 pb y 359 pb para los cebadores Pospi1 y Vid, respectivamente) se deberían analizar mediante electroforesis en gel (gel de agarosa al 2 %) y los amplicones de la PCR del tamaño correcto se deberían secuenciar para identificar la especie de viroide. En la práctica, la secuenciación del producto de 197 pb siempre ha resultado en la misma identificación que la secuenciación del genoma completo del viroide.

3.3.3.4 Análisis GenPospi basado en la RT-PCR en tiempo real (Botermans *et al.*, 2013)

En el análisis GenPospi se utiliza la RT-PCR en tiempo real con la sonda TaqMan para detectar todas las especies conocidas del género *Pospiviroid*. Consiste en la realización de dos reacciones en paralelo: la primera (mezcla de reacción 1) tiene como objetivo todos los pospiviroides excepto el CLVd (Botermans *et al.*, 2013); la segunda (mezcla de reacción 2) tiene como objetivo el CLVd específicamente (Monger *et al.*, 2010). Se incluye, a efectos del seguimiento de la extracción del ARN, un cebador de control interno *nad5* basado en los cebadores desarrollados por Menzel *et al.* (2002) para

amplificar el ARNm de mitocondrias vegetales (gen mitocondrial de la NADH deshidrogenasa). La validación del método (véase el Cuadro 1) en hojas de tomate mostró que el análisis GenPospi permitía detectar cepas aisladas de todas las especies de pospiviroides conocidas hasta una tasa de infección relativa del 0,13 % (equivalente a una dilución 1:770). El análisis era específico, dado que no se observó reactividad cruzada con otros viroides, con virus o con los ácidos nucleicos de las plantas hospedantes. En una comparación entre laboratorios se constató que la repetibilidad y la reproductibilidad eran del 100% y que el análisis era robusto. El análisis GenPospi ha demostrado ser un instrumento adecuado para el examen sistemático de especies de pospiviroides a gran escala. Deberá validarse para matrices distintas de las hojas de tomate.

Cebadores

TCR-F 1-1: 5´-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F 1-3: 5´-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F 1-4: 5´-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F PCFVd: 5´-TGG TGC CTC CCC CGA A-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F IrVd: 5´-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R1: 5´-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R CEVd: 5´-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R6: 5´-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

CLVd-F: 5´-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3´ (Monger *et al*., 2010)

CLVd-F2: 5´-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3´ (Monger *et al*., 2010)

CLVd-R: 5´-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3´ (Monger *et al*., 2010)

nad5-F: 5´-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3´ (Menzel *et al*., 2002)

nad5-R: 5´-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3´ (Menzel *et al*., 2002)

Sondas

pUCCR: 6FAM-5´-CCG GGG AAA CCT GGA-3´-MGB (Botermans *et al*., 2013)

CLVd-P: 6FAM-5´-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3´-BHQ1 (Monger *et al*., 2010)

nad5-P: VICr-5´-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3´-BHQ1 (Botermans *et al*., 2013)

Las dos mezclas de reacción están basadas en el kit TaqMan RNA to Ct 1-Step (Applied Biosystems).

Mezcla de reacción 1 (todos los pospiviroides excepto el CLVd + nad5)

La mezcla de reacción está compuesta por 12,5 µl de mezcla TaqMan RT-PCR 2×, 0,6 µl de mezcla enzimática TaqMan RT 1×, 0,75 µl (10 µM) de cebadores directos (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd y *nad5*-F) y cebadores inversos (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 y *nad5*-R) (concentración final 0,3 µM cada uno), 0,25 µl (10 µM) de la sonda TaqMan pUCCR (concentración final 0,1 µM) y 0,5 µl (10 µM) de la sonda TaqMan *nad5*-P (concentración final 0,2 µM). Se añade agua de grado molecular y 2 µl de molde de ARN hasta completar un volumen final de 25 µl.

Mezcla de reacción 2 (CLVd + nad5)

La mezcla de reacción está compuesta por 12,5 µl de mezcla TaqMan RT-PCR 2×, 0,6 µl de mezcla enzimática TaqMan RT 1×, 0,75 µl (10 µM) de cebadores directos (CLVd-F, CLVd-F2 y *nad5*-F) y cebadores inversos (CLVd-R y *nad5*-R) (concentración final 0,3 µM cada uno), 0,25 µl (10 µM) de la sonda TaqMan CLVd-P (concentración final 0,1 µM) y 0,5 µl (10 µM) de la sonda TaqMan *nad5*-P (concentración final 0,2 µM). Se añade agua de grado molecular y 2 µl de molde de ARN hasta completar un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de termociclado para ambas mezclas de reacción son 15 min a 48 ºC, 10 min a 95 ºC, seguidos de 40 ciclos de (15 s a 95 ºC y 1 min a 60 ºC).

Para este método, Botermans *et al.* (2013) interpretaron los valores del ciclo umbral (Ct) <32 como positivos; los valores entre 32 y 37 como no concluyentes, que requieren confirmación, y los valores ≥37 como negativos. Sin embargo, estos valores podrán excluir niveles bajos de infección en algunos tejidos y deberán definirse en cada laboratorio.

3.3.4 Métodos moleculares de mayor especificidad para la detección del PSTVd

3.3.4.1 RT-PCR convencional con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997)

En este análisis se utilizan los cebadores de RT-PCR de Shamloul *et al.* (1997), también descritos por Weidemann y Buchta (1998). Estos cebadores detectarán el MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd. Se ha comprobado, en estudios *in silico*, que las siguientes cepas del PSTVd podrán no ser detectads debido a un apareamiento erróneo del cebador con su secuencia complementaria en posiciones críticas: AY372394, DQ308555, EF459698 para el cebador inverso. Si el ARN no se amplifica con estos cebadores, se podrán utilizar los cebadores Vid.

Cebadores

3H1-F: 5´-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3´ (nt 89–113)

2H1-R: 5´-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3´ (nt 88–69)

Método 1 *(SuperScript One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen))*

Para cada reacción se añade 1 µl de molde de ARN a 24 µl de mezcla maestra compuesta por 1,7 µl de cada cebador, directo e inverso (15 µM), 12,5 µl de tampón de reacción 2×, 0,5 µl de RT/Platinum Taq y 7,6 µl de agua. El programa de termociclado es el siguiente: 30 min a 43 °C, 2 min a 94 °C, a continuación 10 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 68 °C y 45 s a 72 °C, seguidos de 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 64 °C y 45 s a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C y 1 min a 20 °C.

Método 2 *(RT-PCR en dos pasos)*

Si se emplea la RT-PCR en dos pasos, la sensibilidad para la detección del PSTVd en *S. tuberosum* es de al menos 17 pg del PSTVd, la menor concentración analizada, pero la sensibilidad conseguida varía entre laboratorios y la mayoría detectan al menos 89 pg del PSTVd (Jeffries y James, 2005). Véase la descripción del método 2 en EPPO (2004).

Después de la RT-PCR, los productos de la PCR (de aproximadamente 360 pb) se analizan mediante electroforesis en gel según el procedimiento descrito y los amplicones de la PCR del tamaño correcto se secuencian para identificar la especie de viroide.

Con este método se ha utilizado un análisis de control interno con cebadores *nad5* (Menzel *et al.*, 2002) en una reacción simple (independiente) (Seigner *et al.*, 2008). Los cebadores se utilizaron en una concentración final de 0,2 µM. El amplicón tiene 181 pb.

nad5 efector: 5´-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3´ (nt 968–987 y 1836–1838)

nad5 antisentido: 5´-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3´ (nt 1973–1995)

3.3.4.2 RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham *et al.* (2004)

Los cebadores y la sonda empleados en este análisis son los descritos por Boonham *et al.* (2004). Sin embargo, ni en este análisis ni en ninguno de los análisis en tiempo real publicados se identificará específicamente el PSTVd. Si se obtiene un positivo con la RT-PCR en tiempo real, la identidad del viroide se deberá determinar mediante RT-PCR convencional y secuenciación.

En el análisis se detectará el PSTVd, el MPVd, el TCDVd y el TPMVd. Se ha determinado una sensibilidad para la detección del PSTVd en *S. tuberosum* con el método de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) de al menos 17 pg del PSTVd, la menor concentración analizada (Jeffries y James, 2005). Analizando variantes del PSTVd y oligonucleótidos sintéticos se ha comprobado que con este análisis se detectan todas las variantes de secuencias conocidas. Estos se identificaron a partir de estudios *in silico* como posibles incoherencias entre las secuencias de viroides publicadas y las de

los cebadores que podrían comprometer la detección (Boonham *et al.*, 2005). Sin embargo, los aislamientos divergentes VIR-06/7L y VIR-06/10L descritos recientemente por Owens *et al.* (2009) podrán no ser detectados debido a la inserción de una o varias bases adicionales en el sitio de unión de la sonda (W. Monger, comunicación personal, 2011)[1].

Cebadores

PSTV-231-F: 5´-GCC CCC TTT GCGCTG T-3´ (nt 232–247)

PSTV-296-R: 5´-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3´ (nt 297–279)

PSTV-251T: FAM-5´-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3´ TAMRA (nt 278–252)

Los cebadores COX de control interno amplifican el gen *citocromo oxidasa 1* presente en las mitocondrias vegetales (Weller *et al.*, 2000).

COX-F: 5´-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3´

COX-R: 5´-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3´

COXsol-1511T: VIC-5´-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3´ TAMRA

La mezcla de reacción es para una placa de 96 pocillos y es una modificación del método de la OEPP (EPPO, 2004) dado que incorpora una reacción doble para la detección del PSTVd y el COX, y una reacción simple para la detección del PSTVd (Roenhorst *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción está compuesta por 13,75 µl de agua, 25 µl de 2× Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 µl de 40× MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1,5 µl de cada uno de los cebadores PSTV-231-F y PSTV-296-R (10 µM) y 1,0 µl de la sonda PSTV-251T (5 µM). Esta mezcla de reacción se divide en dos volúmenes iguales de 22 µl, A y B. A la parte A se añaden dos microlitros de agua y a la B se añaden 0,75 µl de cada cebador COX (10 µM) y 0,5 µl de la sonda COXsol-1511T (5 µM). Se añade a cada una de las partes, A y B, 1 µl de ARN diana hasta completar un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl en cada pocillo de la placa de reacción. Con la mezcla de reacción A se detectará el PSTVd y con la mezcla de reacción B se detectarán el PSTVd y el COX en una reacción doble.

Las condiciones de termociclado son 30 min a 48 ºC, 2 min a 95 ºC y 40 ciclos de (15 s a 95 ºC y 1 min a 60 ºC).

3.3.4.3 RT-PCR en tiempo real (kit de Plant Print Diagnòstics)

Los cebadores y la sonda empleados en este análisis son los descritos por Bertolini *et al*. (2010) y forman parte de un kit que comercializa Plant Print Diagnòstics (Ref. PSTVd/100). El análisis detectará el CLVd, el PSTVd y el TCDVd. Se deberían detectar las 327 cepas aisladas del PSTVd presentes en GenBank, dado que los estudios *in silico* demostraron que todos los apareamientos erróneos del cebador con su secuencia complementaria se daban en posiciones que no eran críticas (N. Duran-Vila, comunicación personal, 2014).

En el Cuadro 1 se ofrecen los datos de validación.

Cebadores

PSTVd-F: 5’-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3’ (nt 339–357)

PSTVd-R: 5’-TTT CCC CGG GGA TCC C-3’ (nt 87–102)

PSTVdP: FAM-5’-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3’ TAMRA (nt 19–45)

La mezcla de la PCR contiene los cebadores y la sonda liofilizados (suministrados en el kit) a los cuales se puede añadir cualquier mezcla maestra comercial de RT-PCR. Para cada reacción se añaden 3 µl de molde de ARN a 9 µl de mezcla de PCR compuesta por 6 µl de tampón comercial 2× para RT-PCR,

[1] A 1 de marzo de 2010 (W. Monger, comunicación personal, 2011).

0,6 µl de cada cebador, directo e inverso (10 µM), 0,36 µl de la sonda TaqMan (5 µM), 0,5 µl de mezcla enzimática 25× para RT-PCR y 0,94 µl de agua hasta completar un volumen de reacción final de 12 µl.

Las condiciones de termociclado son 10 min a 48 ºC, 10 min a 95 ºC y 40 ciclos de (15 s a 95 ºC y 1 min a 60 ºC).

Con este método, una muestra se considera positiva cuando da como resultado un valor de Ct <40 y los controles negativos son negativos (no hay amplificación). Una muestra se considera negativa cuando da como resultado un valor de Ct ≥40 y en los controles positivos hay amplificación.

3.4 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fiable el resultado de la prueba, en cada serie de aislamiento de ácido nucleico y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo o del ácido nucleico diana se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre requerido. Para la RT-PCR, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control interno y un control negativo de amplificación (control sin molde).

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para monitorizar la eficiencia del análisis (además de la extracción). Se podrá utilizar ácido nucleico previamente preparado (almacenado) del viroide, el ADN genómico completo amplificado o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado) generado utilizando el mismo par de cebadores que el empleado para la detección. También se podrá utilizar un control del límite de detección (aunque no es obligatorio).

Control interno. Debería incorporarse al protocolo de la RT-PCR convencional y en tiempo real un gen de mantenimiento vegetal, por ejemplo el COX o el NAD, a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos debido a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o a la presencia de inhibidores de la PCR. Preferentemente, los cebadores de control interno se deberían utilizar en una reacción doble con los cebadores del pospiviroide/PSTVd. Sin embargo, como esto podrá ser difícil de conseguir sin que se reduzca la sensibilidad de la prueba para el viroide, se recomienda, cuando sea posible, realizar una reacción doble de los cebadores del pospiviroide o el PSTVd con los cebadores de mantenimiento vegetal y, además, una reacción simple solamente con los cebadores del pospiviroide/PSTVd.

Se ha demostrado que el fragmento del gen mitocondrial *nad5* de la *NADH deshidrogenasa 5* es un indicador fiable del rendimiento del procedimiento de extracción y de la etapa de la transcripción inversa (RT) en la RT-PCR convencional (Menzel *et al.*, 2002). Se ha probado en muchas especies de plantas, entre las que pueden citarse: *S. tuberosum* y otras especies de *Solanum* (*S. bonariensis*, *S. dulcamara*, *S. jasminoides*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. rantonnetii* y *S. sisymbrifolium*), *Acnistus arborescens*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia* spp., *Capsicum* spp., *Cestrum* spp., *Lochroma cyanea*, *Nicotiana* spp. y *Physalis* spp. (Seigner *et al.*, 2008). Los cebadores *nad5* contienen un intrón y, por tanto, no amplificarán a partir de ADN. El ARN se amplifica una vez eliminado el intrón.

Aunque el COX se ha utilizado como control interno en este protocolo, los cebadores COX amplificarán el ARN y el ADN. Por lo tanto, solamente proporciona una indicación de la calidad del ADN amplificable, en lugar de únicamente del ARN, y no constituye un control de la etapa de la transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés).

Cuando en la descripción de un método de PCR no se mencione el control interno COX o el *nad5* el laboratorio debería elegir un control interno y validarlo.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la RT-PCR convencional y en tiempo real a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control positivo de extracción. Este control se utiliza para velar por que el ácido nucleico del viroide objetivo se haya extraído en una cantidad y con una calidad suficientes para realizar la RT-PCR y que

el viroide objetivo sea detectable. El ácido nucleico del viroide se extrae de tejido infectado del hospedante o de tejido vegetal sano al que se ha añadido el viroide.

En el control positivo debe utilizarse aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ARN. Si se agrupan las muestras, se deberá ajustar de manera acorde la cantidad de control positivo (p. ej., 10 lotes de muestras de 20 mg agrupadas para la extracción de ARN, 2 mg de hoja infectada + 198 mg de tejido de papa sano). Si no hay detección, debería repetirse la prueba o reducirse la tasa de agrupamiento hasta lograr una detección fiable.

Para la RT-PCR, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas. El control positivo empleado en el laboratorio debería secuenciarse a fin de que esta secuencia se pueda comparar fácilmente con la secuencia obtenida de los amplicones de la PCR del tamaño correcto. Otra opción es elaborar controles positivos sintéticos que contengan una secuencia conocida que, de nuevo, se puede comparar con los amplicones de la PCR del tamaño correcto.

Control negativo de extracción. Este control se utiliza para monitorizar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. El control comprende ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se analicen muchas muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

3.5 Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real

3.5.1 RT-PCR convencional

La PCR específica del viroide solo se considerará válida si:

- el control positivo de ácido nucleico genera un producto del tamaño correcto para el viroide, y
- no se producen amplicones del tamaño correcto para el viroide en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

Si también se usan cebadores COX o *nad5* de control interno, entonces el control negativo (tejido vegetal sano), si se utiliza, el control positivo de ácido nucleico y cada una de las muestras analizadas deben producir una banda de 181 pb (*nad5*). Si no se logra la amplificación de las muestras con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción del ácido nucleico, que no se incluyó el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que ha fallado la etapa de la transcripción inversa (RT), que el extracto de ácido nucleico contiene compuestos inhibidores de la PCR o que el ácido nucleico se ha degradado.

Una muestra se considerará positiva si produce un amplicón del tamaño correcto. Para identificar la especie de viroide se debe secuenciar el producto de la PCR.

3.5.2 RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real solo se considerará válida si:

- el control positivo de ácido nucleico produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del viroide, y
- no se observa ninguna curva de amplificación (esto es, el valor de Ct es 40 u otro valor de Ct definido por el laboratorio después de haber sido validado) con el control negativo de extracción ni con el control negativo de amplificación.

Si también se usan cebadores COX y *nad5* de control interno, entonces el control negativo (si se utiliza), el control positivo de ácido nucleico y cada una de las muestras del análisis deben producir una curva de amplificación. Si las muestras no producen una curva de amplificación con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción del ácido nucleico, que no se incluyó el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que el extracto de ácido nucleico contiene compuestos inhibidores de la PCR o que el ácido nucleico se ha degradado.

Una muestra se considerará positiva si produce una curva de amplificación típica. En las secciones 3.3.3.4 y 3.3.4.3 se proporciona información específica sobre el de Ct para dos métodos.

4. Identificación

El PSTVd se debería identificar secuenciando el producto obtenido mediante los métodos de RT-PCR convencionales empleando los cebadores de Shamloul o Vid descritos en las secciones 3.3.4.1 y 3.3.3.3, respectivamente, y buscando una coincidencia de la secuencia en las bases de datos públicas de secuencias genéticas. Para la identificación se podrá necesitar la ayuda de especialistas en el análisis de secuencias. Si la amplificación del producto de la PCR es escasa o si la muestra está infectada por más de un pospiviroide, la clonación del producto de la PCR podrá permitir que se obtenga una secuencia.

En caso de que se necesite confirmar un resultado positivo obtenido en una muestra mediante la RT-PCR en tiempo real, la muestra se debería volver a analizar mediante RT-PCR convencional para poder secuenciar e identificar el producto obtenido. La secuenciación directa del producto de la PCR en tiempo real proporcionará una información sobre la secuencia que no permite una identificación fiable. Permitirá determinar que el producto de la PCR es un viroide, pero no permitirá identificar la especie ni diferenciarlo del control positivo empleado. Sin embargo, dada la mayor sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real, es posible que con la RT-PCR convencional no se obtenga ningún producto. En el caso de las muestras agrupadas, la repetición del análisis con submuestras más pequeñas podría mejorar la fiabilidad de la amplificación mediante la RT-PCR convencional. Otra opción podrá ser inocular las muestras en plantas de tomate para aumentar la concentración del viroide hasta niveles que sean detectables mediante la RT-PCR convencional. No obstante, este enfoque no ha sido evaluado y si los resultados no son concluyentes podrá ser necesario repetir el muestreo y la prueba.

4.1 Secuenciación y análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias solo debería realizarlo una persona con experiencia. Si no se dispone de instalaciones para realizar la secuenciación internamente, lo debería realizar una empresa comercial. La empresa especificará sus requisitos para la secuenciación de los productos de la PCR. Se envían a la empresa, para la secuenciación, el producto purificado (y los cebadores directo e inverso, si se han solicitado). Algunas empresas también podrán purificar el producto si es necesario.

Si la secuenciación se realiza internamente, se deberían establecer los métodos y aplicarlos. Se debería secuenciar cada cadena del producto de la PCR, utilizando los cebadores de la PCR como cebadores de secuenciación. Las dos cadenas de ADN secuenciadas independientemente (utilizando los cebadores directo e inverso) se deberían ensamblar en un único cóntigo, confirmando la lectura (identidad) de nucleótidos en todas las posiciones. Es preferible utilizar ensambladores (p. ej., los *software* Geneious, CLC Genomics Workbench o Lasergene) que analizan la información de los electroferogramas (archivos de registro de secuencias). Las discrepancias entre las dos cadenas se deberían codificar como bases ambiguas en la secuencia corregida. La secuencia de consenso corregida (determinada comparando las dos cadenas) puede entonces compararse con las secuencias de pospiviroides que figuren en una base de datos pertinente. En el caso de una infección mixta, el cromatograma podrá no ser legible y se debería clonar y secuenciar el producto de la PCR.

En los pospiviroides se requiere una alineación cuidadosa, ya que puede haber diferencias de unos pocos nucleótidos que sean cruciales para identificar el viroide como una plaga reglamentada o no reglamentada. Para la identificación inicial del PSTVd, podrán mantenerse en la secuencia de consenso las secuencias de los cebadores (cebadores Shamloul o Vid), dado que esos cebadores están situados en las regiones más conservadas del genoma del viroide y no es probable que influyan en la identificación.

Si se observan adeninas sobresalientes incorporadas por la polimerasa durante la elongación, deben ser eliminadas. Para la identificación, se aconseja utilizar una secuencia de consenso corregida que comience en la posición 1 del genoma del viroide para compararla con una de las bases de datos exhaustivas de nucleótidos. La búsqueda se debería realizar en la base de datos GenBank de registros de nucleótidos no redundantes del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) o en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) del sitio web del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) utilizando el programa de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Además, la identificación debería basarse en la agrupación específica en un árbol filogenético (método neighbour joining) de las coincidencias detectadas por el programa BLAST.

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el criterio principal para la identificación de una especie es una identidad de secuencias de más del 90 % (Owens *et al.*, 2011). Sin embargo, si la secuencia obtenida muestra una identidad cercana al 90 % deberían incluirse otros parámetros, como las propiedades biológicas. El Grupo para el estudio de los viroides del ICTV está debatiendo actualmente la clasificación de los viroides y los criterios para la delimitación de las especies.

Cuando se requiere una exactitud del 100 % en la secuencia, por ejemplo, cuando se va a registrar una secuencia en una base de datos o cuando se sospecha la existencia de una nueva especie de viroide, es necesario realizar una segunda PCR en la cual se incluirá la región de las secuencias del cebador utilizado en la primera PCR, así como las bases ambiguas de la primera PCR. A tal efecto, podrá ser necesario diseñar un nuevo conjunto de cebadores a partir de la secuencia inicial, aunque el uso de los pares de cebadores de Shamloul y Vid podrá ser suficiente.

5. Registros

Los registros y las evidencias deberían conservarse según lo descrito en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En las situaciones en que los resultados del diagnóstico puedan afectar a otras partes contratantes, en particular en casos de incumplimiento o en áreas donde se detecte el PSTVd por primera vez, se debería conservar también el siguiente material adicional de un modo que garantice su plena rastreabilidad:

- la muestra original (si aún está disponible) debería conservarse congelada a −80 °C o liofilizarse y conservarse a temperatura ambiente;
- cuando proceda, las extracciones de ARN deberían conservarse a −80 °C;
- cuando proceda, los productos de la amplificación mediante RT-PCR deberían conservarse a entre −20 °C y −80 °C;
- los archivos de registro de las secuencias de ADN utilizados a fin de generar la secuencia de consenso para la identificación de las muestras.

Si se comprueba que el aislamiento estudiado posee características moleculares o biológicas diferentes de las de otros aislamientos registrados anteriormente, se debería ofrecer a una colección o repositorio de plagas vegetales reconocido, (p. ej., el Q-bank (base de datos exhaustiva de plagas cuarentenarias y enfermedades de las plantas), o la DSMZ (colección alemana de microorganismos y cultivos celulares del Instituto Leibniz).

Si hay evidencia de que alguno de las pruebas descritas no detectan un aislamiento del PSTVd, se deberían enviar los detalles del aislamiento (preferiblemente el número de acceso del GenBank) a la Secretaría de la CIPF.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Escocia (Reino Unido) (Dr. C.J. Jeffries, correo electrónico: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (Países Bajos) (Dr. J.W. Roenhorst, correo electrónico: j.w.roenhorst@nvwa.nl; Dr. J.Th.J. Verhoeven, correo electrónico: j.th.j.verhoeven@nvwa.nl).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083 (Australia) (Dr. B. Rodoni, correo electrónico: brendan.rodoni@depi.vic.gov.au).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1 (Canadá) (Dr. H. Xu, correo electrónico: huimin.xu@inspection.gc.ca).

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología (IVIA), 46113 Moncada, Valencia (España) (Dr. N. Duran-Vila, correo electrónico: duran_nur@gva.es).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705 (Estados Unidos) (Dr. J.A. Abad, correo electrónico: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo (Uruguay) (Dr. A. Etchevers, correo electrónico: anitaetchevers@hotmail.com).

Podrán presentar solicitudes de revisión de los protocolos de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF), por conducto de la Secretaría de la CIPF (ippc@fao.org), que las remitirá al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto de este protocolo fue redactado por C. J. Jeffries (SASA, Reino Unido), J. W. Roenhorst (organización nacional de protección fitosanitaria de los Países Bajos), B. Rodoni (Department of Environment and Primary Industries, Australia), H. Xu (CFIA, Canadá), N. Duran-Vila (IVIA, España), A. Etchevers (Laboratorios Biológicos, Uruguay) y J.A. Abad (Servicio de Inspección Zoosanitaria y Fitosanitaria (APHIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Estados Unidos) (véase la Sección 6 para más información). Asimismo, J.Th.J. Verhoeven (organización nacional de protección fitosanitaria de los Países Bajos) colaboró de forma destacada en la elaboración del presente protocolo.

Debe agradecerse a S.L. Nielsen (Dinamarca); L. Seigner, S. Winter y M. Wassenegger (Alemania); H. Koenraadt (Países Bajos) y A. Fox, T. James, W. Monger y V. Mulholland (Reino Unido) las muy útiles observaciones formuladas durante la elaboración de este protocolo.

8. Referencias

En la presente norma se hace también referencia a otras normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms.

Badilla, R., Hammond, R. y Rivera, C, 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83, pág. 1072.

Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J. 2010. *Procedimiento directo de detección específica de los viroides* Potato spindle tuber viroid *y* Citrus exocortis viroid *mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección.* Patente española n.º 2.387.172.

Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. y Cambra, M. 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of '*Candidatus* Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. y Cambra, M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120, págs. 177-188.

Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. y Cambra, M. 2014b. Transmission of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.

Boonham, N., Fisher, T. y Mumford, R.A. 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: págs. 30-35.

Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. y Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: págs. 139-146.

Botermans, M., van de Vossenberg, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. y Meekes, E.T.M. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187, págs. 43-50.

CABI. Sin fecha Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Wallingford (Reino Unido), CABI. Disponible en http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659, (consultado el 18 de agosto de 2014).

De Bokx, J.A. y Pirone, P.G. 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87, págs. 31-34.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33 Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin* 34, págs. 443-454.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 44, págs. 117-147.

EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott y M. Holderness, eds). 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2.ª edición. Wallingford (Reino Unido), CABI. 1425 págs.

EUPHRESCO. 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)* EUPHRESCO Final Report. York (Reino Unido), EUPHRESCO. Disponible en: http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=536 (consultado el 15 de mayo de 2013).

Fernow, K.H. 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57, págs. 1347-1352.

Fernow, K.H., Peterson, L.C. y Plaisted, R.L. 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47, págs. 75-80.

Galindo, J., Smith, D.R. y Diener, T.O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72, págs. 49-54.

Grasmick, M.E. y Slack, S.A. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69, págs. 49-51.

Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. y Bar-Joseph, M. 2003. Viroids in the Middle East. En *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles y J. Semancik, eds.), págs. 275-278. Melbourne (Australia), CSIRO Publishing. 392 págs.

Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. y Dephoff, C. 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. Australasian Plant Pathology, 32, págs. 317-318.

Hammond, R.W. y Owens, R.A. 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN (Estados Unidos), American Phytopathological Society (APS). Disponible en: http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx (consultado el 20 de diciembre de 2012).

Jeffries, C. 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm.* N.º 19. *Potato*. Roma (Italia), FAO/IPGRI. 177 págs.

Jeffries, C. y James, C. 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid. EPPO Bulletin*, 35: págs. 125-132.

Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. y Skrzeczkowski, L.J. 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121, págs. 51-57.

Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. y Alexander, B.J.R. 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australasian Plant Pathology*, 34, págs. 129-133.

Ling, K.S. y Bledsoe, M.E. 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93, pág. 839.

Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. y Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, págs. 222-226.

Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. y Kumar, S. 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. Australasian Plant Pathology, 31, págs. 311-312.

Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. y Diener, T.O. 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, págs. 9397-9401.

Menzel, W., Jelkmann, W. y Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, págs. 81-92.

Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. y Diener, T.O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72, págs. 1781–1785.

Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. y Papayiannis, L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169, págs. 207-210.

Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. y Duran-Vila, N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. En *Molecular and Cellular Probes*, 23, págs. 95-102.

NAK (Servicio holandés para la inspección de semillas y patatas de siembra). 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR.* Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

Naktuinbouw. 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

Naktuinbouw. 2012b. Potato spindle tuber viroid: *Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

Naktuinbouw. 2012c. Potato spindle tuber viroid: *Detection of* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. y Di Serio, F. 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91, págs. 723-726.

Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. y Gottsberger, R.A. 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: págs. 505-509.

NPPO-NL (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013a. Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Pospi1-FW/Pospi1-RE. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

NPPO-NL (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013b. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven *et al.* 2004). Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

NPPO-NL (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013c. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul *et al.* (1997). Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

NPPO-NL (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids.* Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (consultado el 18 de agosto de 2014).

Owens, R.A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J.W., Sano, T. y Vidalakis, G. 2011. Viroids. En *Virus Taxonomy* (A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens y E.J. Lefkowitz, eds.). Noveno informe del International Committee on Taxonomy of Viruses, págs. 1221-1234. Londres (Reino Unido), Elsevier Academic Press. 1259 págs.

Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. y Kastalyeva, T.B. 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93, págs. 752-759.

Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. y Salazar, L.F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78, págs. 1207-1211.

Reanwarakorn, K, Klinkong, S. y Porsoongnurn, J. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: pág. 6.

Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. y Van den Bovenkamp, G.W. 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37, págs. 198–203 (en neerlandés).

Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. y Mumford, R.A. 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin* 35, págs. 133-140.

Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. y Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30, págs. 56-58.

Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. y Köhler, D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, págs. 97-101.

Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. y 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, págs. 89-96.

Singh, R.P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47, págs. 225-227.

Singh, R.P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50, págs. 111-123.

Singh, R.P., Boucher, A. y Somerville, T.H. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76, págs. 951-953.

Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. y Babcock, K.M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132, págs. 204-211.

Singh, R.P. y Kurz, J. 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, págs. 418-424.

Singh, R.P., Nie, X. y Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80, págs. 2823-2828.

Singh, R.P., Ready, K.F.M. y Nie, X. 2003. Viroids on solanaceous species. En A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, págs. 125–133. Melbourne (Australia), CSIRO Publishing. 392 págs.

Spieker, R.L. 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141, págs. 1823-1832.

Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. y Hobden, E. 2010. *Columnea latent viroid* (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59, pág. 794.

van Brunschot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. y Thomas, J.E. 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.

Verhoeven, J.Th.J. 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids.* Universidad de Wageningen, Wageningen (Países Bajos). (Tesis). Disponible en: http://edepot.wur.nl/137571 (consultada el 20 de diciembre de 2012).

Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. y Roenhorst, J.W. 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128, págs. 417-421.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. y Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, págs. 823-831.

Walter, B. 1987. Tomato apical stunt. En *The viroids* (T.O. Diener, ed.), págs. 321–328. Nueva York (Estados Unidos), Plenum Press. 365 págs.

Wassenegger, M., Heimes, S. y Sänger, H. L. 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO Journal*, 13, págs. 6172-6177.

Weidemann, H.L. y Buchta, U. 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41, págs. 1-8.

Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., y Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, págs. 2853-2858.

Cuadro 1. Descripción general y datos de validación de los protocolos utilizados para la detección del viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) en distintos tipos de material hospedante.

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6 (Bioreba)	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) o Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) con el sistema KingFisher 96 (Thermo Scientific)	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR): análisis GenPospi, Botermans *et al.* (2013)	***Límite de detección*:** detección de todas las especies de pospiviroides hasta una tasa de infección relativa[1] del 0,13 % (equivalente a una dilución de 1:770) con una certeza del 99,7 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. ***Especificidad analítica*:** muy específico para las especies de pospiviroides. ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas de tomate ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (Naktuinbouw, 2012a; Botermans *et al.*, 2013; NPPO-NL, 2013d)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR en tiempo real: Boonham *et al.* (2004)	***Límite de detección*:** detección de una dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano de hasta 1:10 000. ***Especificidad analítica*:** detección del viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd), el viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), el viroide del enanismo clorótico del tomate (*Tomato chlorotic dwarf viroid*, TCDVd) y el viroide de la planta macho del tomate (*Tomato planta macho viroid*, TPMVd) (algunas cepas). ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas de tomate. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (Naktuinbouw, 2012b)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: cebadores Pospi1-FW y Pospi1-RE de Verhoeven *et al.* (2004)	***Límite de detección*:** detección de todas las especies de pospiviroides (excepto el viroide latente de *Columnea* (*Columnea latent viroid*, CLVd)) hasta al menos una tasa de infección relativa del 2,5 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. ***Especificidad analítica*:** detección del viroide latente del lúpulo (*Hop latent viroid*, HpLVd, género *Cocadviroid*) y el PSTVd. ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas de tomate ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (NPPO-NL, 2013a)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: cebadores Vid-FW y Vid-RE de Verhoeven *et al.* (2004)	***Límite de detección*:** detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd hasta al menos una tasa de infección relativa del 100 % (el 10 % para el CLVd*) para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. * Cebadores diseñados originalmente para detectar el CLVd complementario a los cebadores Pospi1-FW y Pospi1-RE para la RT-PCR (Verhoeven *et al.*, 2004) ***Especificidad analítica*:** detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd. ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas de tomate ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (NPPO-NL, 2013b)

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul *et al.* (1997)	***Límite de detección*:** detección hasta una tasa de infección relativa de al menos el 10 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. ***Especificidad analítica*:** detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd (algunas cepas). ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas de tomate ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (NPPO-NL, 2013c)
Semillas de tomate	3 000 semillas (analizadas en tres submuestras de 1 000)	20 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con BagMixer (Interscience)	Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: Boonham *et al.* (2004)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. La probabilidad de detección de una semilla infectada en una muestra de 1 000 semillas es > 95% cuando se analizan tres submuestras de 1 000 semillas cada una. Debido a la rápida contaminación cruzada del PSTVd de frutas infectadas a semillas sanas durante el procesamiento de las semillas (usando tratamiento con pectinasa y fermentación) hay una probabilidad alta de que haya más semillas contaminadas en una muestra (Naktuinbouw, 2012c).
Hojas de papa (cultivada en semillero) y plantas de papa *in vitro*	200 mg	20 µL de dodecil sulfato sódico al 10 %, 180 µl de tampón de extracción LiCl, 400 µl de fenol-cloroformo con un mortero	Extracción con fenol-cloroformo y extracción con polietilenglicol (PEG) en dos etapas	Electroforesis bidireccional en gel de poliacrilamida (R-PAGE)[2]	***Límite de detección:*** 2 465 pg del PSTVd; este fue el menos sensible de los métodos moleculares estudiados en una prueba interlaboratorios internacional. ***Especificidad analítica*:** detección de todos los pospiviroides conocidos. ***Selectividad*:** sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas *in vitro*. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** reproducibilidad del 51 % para 87 893 pg del PSTVd (la concentración más alta del PSTVd analizada) y del 42 % en el límite de detección.
Hojas de papa (cultivada en sala de crecimiento) y plantas de papa *in vitro*	200 mg	1:1,5 p/v en tampón de Ames (EPPO, 2004) con un mortero	Inmovilización en membrana (Agdia, Inc.), extracción con fenol cloroformo y PEG en dos etapas	Sonda marcada con digoxigenina[2]	***Límite de detección:*** al menos 17 pg del PSTVd (la menor concentración analizada). ***Especificidad analítica:*** detección de todos los pospiviroides conocidos. ***Selectividad*:** sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas *in vitro*. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** reproductibilidad del 100 % para 87 893 pg del PSTVd y del 23 % para 17 pg del PSTVd.
Hojas de papa (cultivada en semillero) y plantas de papa *in vitro*	50 mg–500 mg	1:9 p/v tampón RH (Qiagen) con tubo de microcentrifugadora y micropistilo u Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR convencional en dos pasos[2] con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997)	***Límite de detección:*** al menos 17 pg del PSTVd. ***Especificidad analítica*:** detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd. ***Selectividad*:** sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas *in vitro*. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** reproductibilidad del 78 % para 87 893 pg del PSTVd (la concentración más alta del PSTVd analizada) y del 44 % para 17 pg del PSTVd.

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de papa (cultivada en semillero) y plantas de papa *in vitro*	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: análisis GenPospi, Botermans *et al*. (2013)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. ***Especificidad analítica*:** sin reacción cruzada con los virus comúnmente presentes en la papa. ***Selectividad:*** sin influencia de las hojas de papa ni las plantas *in vitro*. Validado para tasas de agrupamiento de hasta 100 (100 % de detección en muestras compuestas por 1 hoja infectada y 99 sanas; NAK, 2011).
Hojas de papa (cultivada en sala de crecimiento) y plantas y tubérculos de papa *in vitro*	1,5 g de hojas o 5 g de tubérculos	Aproximadamente 600 µl de tampón para las hojas o aproximadamente 3 ml de tampón para los tubérculos (la elección del tampón depende el método de extracción utilizado)	RNeasy Plant Mini Kit, extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o con el kit de aislamiento de ARN Purescript (Gentra Systems; téngase en cuenta que este kit ya no se encuentra disponible)	RT-PCR en tiempo real: Boonham *et al.* (2004)	***Límite de detección:*** detección de una dilución de hasta 1:10 000 de tejido infectado en tejido sano. ***Especificidad analítica*:** detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd, el TPMVd (algunas cepas); sin reacción cruzada con los virus comúnmente presentes en la papa. ***Selectividad*:** sin influencia del uso de hojas de papa o de plantas y tubérculos *in vitro*. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (prueba interlaboratorios en cuatro laboratorios). Validado para tasas de agrupamiento de hasta 100 (100 % de detección en muestras compuestas por 1 hoja infectada y 99 sanas; Roenhorst *et al*., 2005, 2006).
Especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit o Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: análisis GenPospi, Botermans *et al*. (2013)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. ***Sensibilidad analítica:*** la concentración de pospiviroides y la selectividad (componentes inhibidores) en la savia de las hojas depende de la especie de planta. Validado para tasas de agrupamiento de hasta 25 para *Brugmansia*, *Calibrachoa*, *Cestrum*, *Dahlia*, *Nematanthus*, *Petunia*, *Solanum jasminoides* y *Streptosolen jamesonii*. Téngase en cuenta que para *Calibrachoa*, *S. jasminoides* y *S. jamesonii* se han observado efectos de la matriz en diluciones de más de 100. En algunos cultivos, como *Dahlia*, parece que solo el período de verano es adecuado para la realización de análisis (fiables) (Naktuinbouw, 2012a).
Especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit o Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: Boonham *et al.* (2004)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. ***Sensibilidad analítica*:** la concentración de pospiviroides y la selectividad (componentes inhibidores) en la savia de las hojas depende de la especie de planta. Validado para tasas de agrupamiento de hasta 25 para *Brugmansia*, *Calibrachoa*, *Dahlia*, *Petunia*, *S. jasminoides* y *S. jamesonii*. Téngase en cuenta que para *Calibrachoa*, *S. jasminoides* y *S. jamesonii* se han observado efectos de la matriz en diluciones de más de 100. En algunos cultivos, como *Dahlia*, parece que solo el período de verano es adecuado para la realización de análisis (fiables) (Naktuinbouw, 2012b).

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate; hojas, tubérculos y semillas de papa, y especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g de hojas, de tubérculos de papa o de impresiones de hoja sobre membranas de nailon	10 ml (1:10 p/v) de solución salina con tampón fosfato (PBS) con Homex 6	Métodos directos (impresión de tejidos), RNeasy Plant Mini Kit o PowerPlant RNA Isolation Kit (Mo Bio)	RT-PCR en tiempo real: Bertolini *et al.* (2010)	***Límite de detección:*** detección de una dilución de hasta 1:10 000 de hojas de *S. jasminoides* infectadas en hojas de *S. jasminoides* y tomate sanas. ***Especificidad analítica*:** detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd. ***Selectividad*:** sin influencia de las hojas o tubérculos de papa o de semillas de tomate. ***Repetibilidad y reproductibilidad*:** 100 % (prueba interlaboratorios en tres laboratorios). La sensibilidad diagnóstica fue del 100 %, la especificidad diagnóstica del 100 % y la exactitud relativa comparada con un método de hibridación molecular (Murcia *et al.*, 2009) fue del 100 %. La validación de la prueba se realizó con 208 muestras de campo de *S. jasminoides*, *Brugmansia* spp., *Datura* spp., *Petunia* spp., *Dendrathema* spp., papa y tomate. De las 208 muestras, 43 fueron verdaderos positivos y 150 verdaderos negativos con ambas técnicas. Quince muestras dieron falsos positivos mediante hibridación, detectándose el viroide del enanismo apical del tomate (*Tomato apical stunt viroid*, TASVd) y el viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd). Ninguna muestra dio un falso negativo.

[1] Debido a que se desconoce la concentración del viroide en el material original analizado, en algunos de los análisis el límite de detección (sensibilidad) se expresa como valor relativo. La savia de hoja infectada sin diluir se considera infectada al 100 % (en una proporción de 1 g de material foliar en 3 ml de tampón). El límite de detección relativo se determinó analizando ocho diluciones sucesivas de savia de hoja infectada en savia de hoja sana. El límite de detección relativo se define como el promedio de la tasa de infección relativa más baja que aún podía detectarse de cada aislamiento (ciclo umbral (Ct) <32), y se añadieron tres desviaciones típicas para proporcionar un valor conservador, con una certeza del 99,7 % (Botermans *et al.*, 2013).

[2] Los tres métodos —R-PAGE, sonda marcada con digoxigenina y RT-PCR convencional en dos pasos con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997)— fueron comparados en una prueba interlaboratorios internacional (Jeffries y James, 2005).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2007-03: En la segunda reunión de la CMF se añadió el tema al programa de trabajo (2006-002).

2012-11: El GTPD revisó el proyecto de protocolo.

2013-03: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, presentar el texto para consulta a los miembros (2013_eSC_May_10).

2013-07: Consulta a los miembros.

2014-07: El GTPD examinó el proyecto de protocolo.

2014-09: Aprobado por el GTPD por vía electrónica y remitido al CN para que apruebe su adopción (2014_eTPDP_September_01).

2014-11: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, el período de notificación del PD (2014_eSC_Nov_13).

2014-12: Período de notificación

2015-01: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 7. *Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata)* (2016). Roma, CIPF, FAO.

2015-07: La Secretaría de la CIPF incorporó enmiendas editoriales y modificó el formato de las normas de acuerdo con el procedimiento de revocación de normas aprobado en la CMF-10 (2015).

2016-05: El CN aprobó la revisión técnica de este PD en relación con la secuencia del cebador COX-F de control interno, de conformidad con la referencia bibliográfica ofrecida (Weller *et al.*, 2000) (sección 3.3.4.2, “RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham *et al.* [2004]”) (2016_eSC_May_15). El GTPD señaló que ambas secuencias (la de la versión anterior del PD y la actual secuencia conforme a Weller *et al*., 2000) funcionaban.

2017-04: La CMF-12 ha tomado nota de los cambios editoriales efectuados en español por el grupo de examen de los idiomas.

Última modificación de la historia de la publicación: 2017-04.

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia
Tel. +39 06 5705 4812 - Fax: +39 06 5705 4819
Correo electrónico: ippc@fao.org - Web: www.ippc.int