



NAPPO

North American Plant Protection Organization
Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

Informe sobre conferencia telefónica de la NAPPO

Grupo de expertos:	Semillas -ToBRFV	
Lugar:	Videoconferencia (plataforma en Zoom)	
Fecha:	9 de noviembre del 2021	
Presidenta	Beatriz Xoconostle (CINVESTAV, MX)	
Participantes:		
Jennifer Nickerson (ACIA)	Ed Podleckis (APHIS – PPQ)	Nancy Osterbauer (APHIS – PPQ)
Vessela Mavrodieva (APHIS - PPQ)	Geoffrey Dennis (APHIS – PPQ)	Kevin Ong (TAMU)
José Manuel Cambrón Crisantos (SENASICA)	Jessica Berenice Valencia Luna (SENASICA)	Ángel Ramírez Suárez (SENASICA)
Eduardo Garrido (INIFAP)	Samantha Thomas (industria de EE. UU.)	Stephanie Dubon (APHIS – PPQ)
Rick Dunkle (industria de EE. UU.)	Stephanie Bloem (NAPPO)	Maribel Hurtado (NAPPO)
Nedelka Marín-Martínez (NAPPO)	Alonso Suazo (NAPPO)	

Resumen

Proyecto:	<i>Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV)</i>
Comentarios generales:	<ul style="list-style-type: none">• Introducción breve y comentarios de bienvenida proporcionados por la Secretaría de la NAPPO.• El DT tomará las notas y redactará el informe de la videoconferencia.• Los miembros del GE autorizaron la grabación de la videoconferencia para fines del informe.
Asunto 1	Decisión en cuanto al material de referencia para este proyecto y la propuesta presentada por el CENAM
Decisiones:	<p>La DE de la NAPPO informó que se envió una carta a los miembros del GE de México con respecto a la decisión de considerar la propuesta del CENAM de preparar el material de referencia para el proyecto. La carta se envió posteriormente a los miembros del GE de Canadá y Estados Unidos.</p> <p>La presidenta del subgrupo (SG) brindó detalles adicionales y agradeció al CENAM por su presentación y la información que brindaron al GE.</p>
Asunto 2:	Solicitud de la industria en cuanto a la protección de propiedad intelectual de las variedades de semillas

Decisiones:	<p>La presidenta del SG propuso utilizar un documento, firmado por la NAPPO de parte de los laboratorios participantes, en el cual se indicaba que las semillas que se utilicen para este proyecto solo serán para fines de investigación. Se presentó un documento de muestra.</p> <p>La presidenta del SG compartirá una copia de este documento con el GE</p>
Asunto 3	Retroalimentación acerca de los protocolos compartidos con los miembros del GE
Decisiones:	<p>La presidenta del SG indicó que se aplicaron los siguientes criterios cuando se consideraron los protocolos que se han de utilizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Especificidad (evaluar con ToMV, un virus estrechamente emparentado) • reproducibilidad (detección en 10 laboratorios diferentes) • repetitividad (detección en 2 o 3 réplicas) • sensibilidad (dos concentraciones virales: alta y baja) y • estabilidad de los primers y las sondas <p>Retroalimentación acerca de los protocolos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • un paso necesario para los protocolos del APHIS-PPQ y la ACIA (uno múltiple) y dos pasos para el protocolo del SENASICA (dos sencillos) • en el segundo ensayo del protocolo del SENASICA, se utiliza la transcripción 18S como control endógeno para ensayar la calidad y cantidad del ARN • el segundo ensayo en el protocolo del SENASICA no estaba tomando en cuenta el diseño de los paneles • EE. UU. preguntó acerca del uso de controles internos que se utilizan actualmente en los protocolos del APHIS-PPQ y la ACIA (nad5) como alternativa al 18S (que se utiliza en el protocolo del SENASICA) para determinar la calidad del ARN. • México indicó que: <ul style="list-style-type: none"> ○ su protocolo está optimizado con el uso de 18S y preferiría que el grupo utilizara el control 18S. El cambio al nad5 como alternativa del 18S necesitaría la revalidación del protocolo del SENASICA ○ el primer paso es utilizar el control 18S para verificar la calidad del ácido nucleico y la segunda amplificación sería para la detección del virus • Los protocolos, reactivos y la configuración del panel necesitarán modificarse (ajustarse) si el grupo está de acuerdo utilizar el control 18S para el protocolo del SENASICA y el control nad5 para los otros protocolos. • El protocolo de ISHI-Veg es un protocolo múltiple el cual utiliza el protocolo del virus del mosaico de la calabaza (SqMV) como control con virus añadido que también

	<p>brinda información en cuanto a la calidad y cantidad del ARN (eficacia de la extracción). El grupo necesita decidir si se utilizará el nad5 como control para este protocolo, en cuyo caso los primers y procedimientos están disponibles o si se utilizará el SqMV como control adicional con virus añadido en cuyo caso se necesitarán primers nuevos. La decisión de incluir o no el SqMV como control con virus añadido también afectará la organización de la recolección de datos en el portal el cual ya estableció el APHIS PPQ, el cual está programado para aceptar dos valores por muestra .</p> <ul style="list-style-type: none"> • En cuanto al protocolo de ISHI-Veg, el GE necesita llegar a un acuerdo de si la reacción triple o doble se utilizarán con el fin de realizar los ajustes necesarios en el sistema de recolección de datos. El portal ya se estableció para el uso en la reacción doble. EE. UU. propone preparar un archivo con todos los primers y las opciones y solicitó retroalimentación del GE. • Se solicitó información adicional acerca del procedimiento de síntesis del cDNA en el protocolo del SENASICA para brindar información más detallada en cuanto al uso de los reactivos. Los miembros del GE del SENASICA acordaron brindar la información solicitada. <p>Decisiones y tareas necesarias para el GE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • uso del SqMV como control con virus añadido • retroalimentación del SENASICA en cuanto a la adición que sugiere para el proceso de la síntesis del cDNA. • Cómo va a utilizar el grupo el protocolo del ISHI-Veg: doble o triple.
Asunto 4:	Documento de los protocolos
Decisiones:	<p>La presidenta del subgrupo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indicó que los protocolos se han colocado en el mismo formato en el documento • observó que hacen falta las referencias para algunos protocolos • indicó que las adiciones que se propusieron al protocolo del SENASICA se incluirán en el documento, en espera de la aprobación y la retroalimentación que se recibirá de ellos • sugirió que un diagrama de flujo que preparó Canadá se incluirá al inicio del documento con el fin de brindar una representación visual del contenido del documento • sugirió agregar una introducción breve para explicar el proceso de las prueba del anillo • sugirió incluir una lista de materiales que no se proporcionarán a los laboratorios participantes, incluidas las puntas de pipetas, los tubos de ensayo, etc. • sugirió incluir instrucciones precisas para cada laboratorio

	(cuáles materiales y reactivos se proporcionarán, cuáles protocolos ellos utilizarán, los resultados que se esperan y las directrices e instrucciones para introducir los datos al sistema de recolección de datos).
Asunto 5:	Información del panel, laboratorio de referencia y laboratorios participantes
Decisiones:	<p>PPQ presentó un cuadro resumido con la información sobre lo que ensayarían los laboratorios participantes, lo que proporcionarán los laboratorios de referencia y la composición de los paneles. Los aspectos pertinentes en este cuadro incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • las muestras de panel «a ciegas» (tres muestras de semillas y dos muestras analíticas) se indican como A, B, C, D y E. • las muestras analíticas son construcciones que se están preparando • se incluyen cuatro muestras de control (semillas infestadas) y un calibrador • también se incluye un control sin plantilla en cada laboratorio (agua de grado de biología molecular). • para la semilla de tomate positiva (muestra B): <ul style="list-style-type: none"> ○ cada laboratorio participante recibirá dos bolsas que contendrán cada una 1000 semillas, de las cuales habrá dos extracciones de ARN ○ se prepararán cinco diluciones de cada extracción de ARN ○ el número de reacciones de PCR en el cuadro es por ensayo y no por muestra ○ el número de réplicas para cada ensayo es información adicional la cual se incluirá en un cuadro distinto. PPQ compartirá con el GE un segundo cuadro revisado el cual incluye el número de réplicas. • PPQ indicó que el laboratorio en Maryland ha estado preparando paneles de pruebas de rendimiento por más de 15 años y se ofrecerá una presentación al GE durante la próxima videoconferencia telefónica. En esta presentación, se describirán los procesos para la preparación del panel y los métodos para la validación y determinación de la estabilidad de la muestra.
Asunto 6:	Plataforma para la recolección de datos
Decisiones:	PPQ indicó que el trabajo se está realizando para corregir los problemas con el sistema de recolección de datos. Geoffrey Dennis indicó que él podría otorgar acceso a todos los miembros del GE que estén interesados en explorar el sistema. Aquellos que estén interesados deberían enviar a Geoff su nombre, dirección electrónica y afiliación.
Asunto 7:	Controles positivos

Decisiones:	<p>La presidenta del subgrupo brindó los detalles de los controles positivos que se han de utilizar para las pruebas del anillo, incluso:</p> <ul style="list-style-type: none"> • los diseños del primer para los blancos que se utilicen para la detección del virus • el vector que se utilice para clonar los blancos • las secuencias de los plásmidos recombinantes • los resultados de las transcripción <i>in vitro</i> con plásmido lineal después de la digestión por la enzima de la restricción con <i>Bam</i>HI y la digestión con DNase. • el material enviado al laboratorio de Maryland para evaluación • los primers y las sondas que fueron ensayados y amplificados, tal como se prevé. <p>La presidenta compartirá las secuencias de las transcripciones.</p>
-------------	---

Asunto 8:	Próximos pasos
-----------	----------------

Decisiones:	<p>El GE trabajará en lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • lista y cantidades de reactivos necesarios según modificaciones tal como se determine en estas discusiones (Vessela Mavrodieva se ofreció como voluntaria para realizar esta tarea). • preparación de las alícuotas de los reactivos. Se enviará a la Secretaría de la NAPPO la lista de reactivos para su compra. La información de la compra y el envío se enviará a la NAPPO. • Los reactivos se distribuirán con la bolsa de semillas y otros materiales.
-------------	---

Próximos pasos

Responsable	Acciones	Fecha
Beatriz Xoconostle	Compartir copia del documento legal para abordar el valor de la propiedad intelectual de las semillas que se utilicen para el proyecto	Enviado a la NAPPO
Vessela Mavrodieva	Compartir el archivo con información acerca del número de réplicas que se han de utilizar para los ensayos.	Enviado a la NAPPO
Beatriz Xoconostle	Compartir la secuencia de las transcripciones con Geoffrey Dennis.	Enviado a la Geoff
Vessela Mavrodieva	Coordinar con el gerente del laboratorio de Maryland una presentación para el GE para brindar las perspectivas de los métodos de validación que se utilizan y la preparación del panel.	Por determinar

Para discutirlo y llegar a un consenso en la próxima videoconferencia telefónica

1	Uso del SqMV como control con virus añadido
2	Protocolo ISHI-Veg: ¿utilizará el grupo una reacción doble o múltiple?
3	