



DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOSOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

1. Protocolo para virus en *Rubus spp.*, *Ribes spp.*, y *Vaccinium spp.*

Amplificación por RT-PCR en dos etapas.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR control positivo, control negativo y un control de agua (control de mezcla).

Este protocolo, se aplica a los siguientes virus: **ArMV, SLRSV, ToRSV, TRSV, ApMV, RBDV, BRLV, BSSV, TSV, BIMaV y PNRSV.**

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10 (0,3 µg/ml)	2 ul
H ₂ O	18 ul
RNA (1:10)	10 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 20 µl de mezcla de síntesis.

Mix Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/µl	0.5 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H ₂ O	4.1 ul
Volumen final	20 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación, se realiza de acuerdo al siguiente mix y programa de amplificación, indicados más abajo.

Mix PCR.

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq	0.25 ul

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

H ₂ O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente, se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos
94°C	45 seg.	
T° A	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	
4°C	∞	

Para la amplificación de los virus, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas a continuación:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
ArMV-5A	50	TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ArMV-3A		CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp
SLRSV-F	50	CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT	Postman y colab., 2004
SLRSV-R		AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	497 bp
ToRSV-U1	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach y colab., 1995
ToRSV-D1		TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	449 bp
TRSV-f	50	CAG GGG CGT GAG TGG GGG CTC	Fuchs y colab., 2010
TRSV-r	50	CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	320 bp
ApMV-f	50	CGT GAG GAA GTT TAG GTT G	Sánchez-Navarro et al., 2005
ApMV-r		GCC TCC TAA TCG GGG CAT CAA	417 bp

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
RBDV-f	55	AAAGACKYSCAGAAATCCGTTA	K. Keller, no publicados.
RBDV-r		TGWAWARGAAGTTDGCCCATTT	427 bp
BRLV-f *	55	GGGATCGATTGGTTAGGACCGTCAT	Tzanetakis et al 2004
BRLV-r		ATTATTCTTAATGTGAGGCAACTCG	823 bp
BSSV-f	52	CCC TCA ATC AGA TTG GCT C	Yanagisawa H. et al. 2016
BSSV-r		GTG TCT CGG AGC AAC TC	526 bp
TSV-f	50	ACGAGTATTAAGTGGATGAATTCT	Tzanetakis IE, Mackey IC, Martin RR (2004)
TSV-r		ACTTACAATACGTCGAGGTGTG	872 bp
BIMaV-f	56	GGT TGA TGG ATG CTT ACG AA	Thekke-Veetil1 et al., 2016
BlmaV-r		CTT CAC TTA CCA CAT TAT ACA TCT C	1370 bp
PNRSV-f	50	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PNRSV-r		GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC	346 bp

*Actualmente, se sabe que BRLV corresponde en realidad a Strawberry necrotic shock virus por lo cual en su detección se utilizan partidores diseñados para la detección de este último.

2. Protocolo para virus en Pomáceas.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Este protocolo, se aplica a los siguientes virus: **ACLSV, ApMV, ToRSV, ASGV y TRSV**

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 µg/µl	1,0 µl
-------------------------	--------



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

H ₂ O	6,5 µl
RNA	5,0 µl
Volumen final	12,5 µl

Incubar a 95°C por 5 min., poner en hielo por 3 min, realizar spin y agregar 7,5 µl de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	4,0 µl
M-MLV 200 U/µl	1,0 µl
dNTPs 10 mM	2,0 µl
DTT 0.1 mM	0,5 µl
Volumen final	7,5 µl

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.5 µl
MgCL ₂ 25 mM	2,0 µl
Primer F. 10µM	0.5 µl
Primer R. 10µM	0.5 µl
Taq 5U/uL	0.25 µl
H ₂ O	16.25 µl
cDNA	2.5 µl

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente, se agrega el cDNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
T°A	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	7 min.	
4°C	∞	

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Para la amplificación de los distintos virus, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (bP)
ACLSV (f)	55	CCA TCT TCG CGA ACA TAG C	Sánchez-Navarro et al., 2005
ACLSV (r)+		GTC TAC AGG CTA TTT ATT ATA AG	632 bp
ApMV (f)+	50	CGT GAG GAA GTT TAG GTT G	Sánchez-Navarro et al., 2005
ApMV (r)+		GCC TCC TAA TCG GGG CAT CAA	417 bp
ToRSV (f)+	59	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach y colab., 1995
ToRSV (r)+		TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	449 bp
ASGV(f)	55	CCC GCT GTT GGA TTT GAT ACA CCT C	James., 1999
ASGV(r)		GGA ATT TCA CAC GAC TCC TAA CCC TCC	499 bp
TRSV-f	50	CAG GGG CGT GAG TGG GGG CTC	Fuchs y colab., 2010
TRSV-r		CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	320 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

3. Protocolo para virus en Carozos.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **ACLSV, ASGV, PNRSV, PDV y ToRSV.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	2 µl
H ₂ O	18 µl
RNA	10 µl
Volumen final	30 µl

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 20 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/µl	1 ul
dNTPs 10 mM	2,5 ul
DTT 0.1 mM	2,4 ul
H ₂ O	4,1 ul
Volumen final	20 ul

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	2.0 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H ₂ O	16.25 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alcuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	30 seg.	
X°C	30 seg.	



DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

72°C 45 min.

72°C 5 min.

4°C ∞

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para TRSV, PPV y PLMVd.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1,0 µl
H ₂ O	6,5 µl
RNA	5,0 µl
Volumen final	12,5 µl

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 7,5 µl de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	4,0 ul
M-MLV 200 U/µl	1 ul
dNTPs 10 mM	2,0 ul
DTT 0.1 mM	0,5 ul
Volumen final	7,5 ul

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H ₂ O	14.25 ul
cDNA	5.0 ul



DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	}	39 ciclos.
94°C	30 seg.		
T [°] A	30 seg.		
72°C	45 min.		
72°C	7 min.		
4°C	∞		

Amplificación por RT-PCR en dos etapas Este protocolo para: **CVA, CGRMV y CNRMV**. Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1,0 µl
H ₂ O	6,5 µl
RNA	5,0 µl
Volumen final	12,5 µl

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 7,5 µl de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	4,0 ul
M-MLV 200 U/µl	1 ul
dNTPs 10 mM	2,0 ul
DTT 0.1 mM	0,5 ul
Volumen final	7,5 ul

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H ₂ O	14.25 ul
cDNA	5.0 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
53°C	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	10 min.	
4°C	∞	

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **SLRSV y ArMV.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1,0 µl
H ₂ O	6,5 µl
RNA	5,0 µl
Volumen final	12,5 µl

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 7,5 µl de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	4,0 ul
M-MLV 200 U/µl	1 ul



DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

dNTPs 10 mM	2,0 ul
DTT 0.1 mM	0,5 ul
Volumen final	7,5 ul

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	1.0 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	1.0 ul
Primer R. 10µM	1.0 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H ₂ O	15.25 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
x°C	45 seg.	
72°C	45 seg.	
72°C	7 min.	
4°C	∞	

Para la amplificación de los distintos virus y viroide, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (bP)
ACLSV (f)		CCA TCT TCG CGA ACA TAG C	Sánchez-Navarro et al., 2005

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (bp)
ACLSV (r)	55	GTC TAC AGG CTA TTT ATT ATA AG	632 bp
PDV (f)	55	CAA CGT AGG AAG TTC ACA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PDV (r)		GCA TCC CTT AAA GGG GCA TC	517 bp
PNRSV (f)	55	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PNRSV (r)		GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC	346 bp
PPV (f)	58	ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC	Wetzel et al., 1991
PPV (r)		CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA	243 bp
ToRSV (f)	59	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach y colab., 1995
ToRSV (r)		TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	449 bp
PLMVd (f)	60	CCC GAT AGA AAG GCT AAG CAC CTC G	Hadidi y colab., 1997
PLMVd (r)		AAC TGC AGT GCT CCG T	337 bp
ArMV (f)	50	TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ArMV (r)		CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp
CNRMV-F	56	CTT TGA TCC CAA AAA TCC CA	Lee, S.Y. et al., 2014
CNRMV(r)		TGG TYT TGT CAC TTG AAC TGT T	210 bp
CGRMV-F		GCG CAA ACG GAC CCT AAG	Lee, S.Y. et al., 2014

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (bP)
CGRMV-R	56	CGC CAG TCA CTT CAG TCA TT	650 bp
CVA (f)	56	GCT TGT TTG TGG AGG GAG AC	Zong et al., 2015
CVA (r)		ATG CTT CGC AGG TGA CGA TA	652 bp
ASGV(f)	55	CCC GCT GTT GGA TTT GAT ACA CCT C	James., 1999
ASGV(r)		GGA ATT TCA CAC GAC TCC TAA CCC TCC	499 bp
SLRSV (f)	55	CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC	Faggioli y colab., 2002
SLRSV (r)	55	AGG CTC AAG AAA ACA CAC	293 bp
TRSV-f	50	CAG GGG CGT GAG TGG GGG CTC	Fuchs y colab., 2010
TRSV-r		CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	320 bp
LCV-1-f	55	GAA CCC TCT GCTGCT GCT AT	Fiori N. y colab. 2018
LCV-1-r		CCA ACA TCT AAC AAR TGT GAA	623 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

4. Protocolo para virus en Vid.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Random Primer 0,3 µg/µl	1 µl
H ₂ O	19 µl
RNA	10 µl

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 20 µl de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 µl
M-MLV 200 U/µl	1.0 µl
dNTPs 10 mM	2.5 µl
DTT 0.1 mM	2.4 µl
H ₂ O	4.1 µl
Volumen final	20 µl

Luego incubar a 42°C por 60 min., el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H ₂ O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	30 seg.	
X°C	30 seg.	
72°C	45 min.	



DOCUMENTO GENERAL
PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR
ESPECIE HOSPEDANTE

72°C 5 min.
 4°C ∞

La temperatura de annealing (T°A) dependerá de cada par de partidores utilizados en la PCR para cada virus luego:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
GLRa1V (f)	55	CGT TCG CGT TAC CCA CGC TGC CTA	Good and Monis 2001. 150 bp
GLRa1V (r)		GCT GGC AAA CCT GGT GGA CCT TAC ATC	
GLRa2V (f)	55	ACG GTG TGC TAT AGT GCG TG	Bertazzon and Angelini 2004 589 bp
GLRa2V (r)		GCA GCT AAG TAC GAA TCT TC	
GLRa3V (f)	52	CGC TCA TGG TGA AAG CAG ACG	Turturo et Al 2005 546 bp
GLRa3V (r)		CTT AGA ACA AAA ATA TGG AGC AG	
GVA (f)	52	GAC AAA TGG CAC ACT ACG	Minafra et Al 1997 430 bp
GVA (r)		AAG CCT GAC CTA GTC ATC TTG G	
GVB(f)	52	GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C	Minafra and Hadidi 1994 460 bp
GVB(r)		ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G	
GFLV(f)	52	TCG GGT GAG ACT GCG CAA CTT CCT A	MacKenzie et Al, 1997 312 bp
GFLV(r)		GAT GGT AAC GCT CCC GCT GCT CTT	
ToRSV (f)	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach 1995 449 bp
ToRSV (r)		TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	
TRSV (f)	50	CAG GGG CGT GAG TGG GGG CTC	Fuchs y colab., 2010 320 bp
TRSV (r)		CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	
SLRSV (f)		CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC	Faggioli et al 2002

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

SLRSV (r)	55	AGG CTC AAG AAA ACA CAC	293 bp
ARMV-5A		TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ARMV-3A	55	CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp
GRSPaV (f)		AGCTGGGATTATAAGGGAGGT	Nolasco et al 2000
GRSPaV (r)	52	CCAGCCGTTCCACCACTAAT	512 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

5. Protocolo para virus en Olivo.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **CLRV, SLRSV y ArMV.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1 ul
H ₂ O	9 ul
RNA	5 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 10 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	5 ul
M-MLV 200 U/μl	1 ul
dNTPs 10 mM	1,25 ul
DTT 0.1 mM	1,20 ul
H ₂ O	1,55 ul
Volumen final	10 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	1.0 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10μM	1 ul
Primer R. 10μM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.25 ul
cDNA	1.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
X°C	45 seg.	
72°C	45 seg.	
72°C	5 min.	
4°C	∞	

Para la amplificación de los distintos virus se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAACGGCA	Werner y colab., 1997
CLRV (r)	55	GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	416 bp
SLRSV (f)	55	CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC	Faggioli y colab., 2002
SLRSV (r)	55	AGG CTC AAG AAA ACA CAC	293 bp
ArMV-5A	55	TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ArMV-3A		CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

6. Protocolo para virus y viroides en Cítricos.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para CTV, CPsV, HSVd y CEVd.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1 ul
H ₂ O	9 ul
RNA	5 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 10 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	5 ul
M-MLV 200 U/μl	1 ul
dNTPs 10 mM	1,25 ul
DTT 0.1 mM	1,20 ul
H ₂ O	1,55 ul
Volumen final	10 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	1.0 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10μM	1 ul
Primer R. 10μM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.25 ul
cDNA	1.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Programa PCR

94°C	5 min.	}	39 ciclos.
94°C	45 seg.		
X°C	45 seg.		
72°C	1 min.		
72°C	5 min.		
4°C	∞		

Para la amplificación de los virus y viroides, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' - 3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
CTV(f)	55	ATG GAC GAC GAA ACA AAG AAA T	Hilf et al. (2005) 672 bp
CTV(r)	55	TCA ACG TGT GTT GAA TTT CCC A	
CPsV (f)	50	GCT TCC TGG AAA AGC TGA TG	Barthe et al. (1998) 600 bp
CPsV(r)	50	TCT GTT TTT GTC AAC ACA CTC C	
CEVd (f)	55	GGA AAC CTG GAG GAA GTC GAG	Gross et al. (1982) 371 bp
CEVd (r)	55	CCG GGG ATC CCT GAA GGA CTT	
HSVd (f)	55	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	Sano et al., (1988) 269 bp
HSVd (r)	55	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla anterior y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado.

7. Protocolo para virus en Frutilla.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo para virus a analizar y un control de agua (control de mezcla).



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Este protocolo, se aplica a los siguientes virus: **FCLV, SCrV, SLRSV, SMYEV, SMoV, ArMV, ToRSV y PNRSV**. Para la detección de **SVBV**, no se requiere síntesis de cDNA y se amplifica directamente.

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10	2 ul
H ₂ O	18 ul
RNA (1/10)	10 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/ μ l	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H ₂ O	14.1 ul
Volumen final	30 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación, se realiza de acuerdo al siguiente mix y programa de amplificación, indicados más abajo.

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCl ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 μ M	1 ul
Primer R. 10 μ M	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul

DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	}	39 ciclos.
94°C	45 seg.		
X°C	45 seg.		
72°C	1 min.		
72°C	5 min.		
4°C	∞		

La temperatura de anealing (T°A) dependerá de cada par de partidores utilizados en la PCR para cada virus luego:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
FCILV	55	ACC ACT TCA CCA CCA GAT CG	Tzanetakis and Martin, 2005
FCILV		CAA GCC AAC TCA CCA TGA CC	330 bp
SMoV	55	GTA GTT TAG TGA CAA TCC AAG CGG A	Thompson and Jelkmann, 2003
SMoV		ACA TCT CCA/G AAC AGT TTA TA/TG TCA/G TGT/A TGG AC	384 bp
SCrV	58	CAT TGG TGG CAG ACC CAT CA	Thompson et al., 2003
SCrV		TTC AGG ACC TAT TTG ATG ACA	345 bp
SMYEV	50	GTG TGC TCAATC CAG CCA G	Chang et al., 2007
SMYEV		CAT GGC ACT CAT TGG AGC TGG G	271 bp
SVBV	50	TGA ACG CAA AAA ATC CTA TC	Thompson et al., 2003
SVBV		TGT TCT GAA CAG ATT GAA TC	472 bp
SLRSV	50	CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT	Postman et al., 2004
SLRSV		AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	497 bp

DOCUMENTO GENERAL
PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR
ESPECIE HOSPEDANTE

ARMV-5A	55	TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ARMV-3A		CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp
ToRSV	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach 1995
ToRSV		TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	449 bp
PNRSV (f)	55	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PNRSV (r)		GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC	346 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

8. Protocolo para virus en Avellano.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **PNRSV, PDV y ApMV.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo para virus a analizar y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10	2 ul
H ₂ O	18 ul
RNA (1/10)	10 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/μl	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H ₂ O	14.1 ul
Volumen final	30 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación, se realiza de acuerdo al mix y programa de amplificación indicado a continuación:

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	1 ul
Primer R. 10µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alcuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
T°A	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	
4°C	∞	

La temperatura de annealing (T°A) dependerá de cada par de partidores utilizados en la PCR para cada virus luego:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
PNRSV (f)	55	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PNRSV (r)		GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC	346 bp
PDV (f)	55	CAA CGT AGG AAG TTC ACA G	Sánchez-Navarro et al., 2005
PDV (r)+		GCA TCC CTT AAA GGG GCA TC	517 bp



DOCUMENTO GENERAL
PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR
ESPECIE HOSPEDANTE

ApMV (f)+	50	CGT GAG GAA GTT TAG GTT G	Sánchez-Navarro et al., 2005
ApMV (r)+		GCC TCC TAA TCG GGG CAT CAA	417 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

9. Protocolo para virus en Nogal.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **CLRV y PPV.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo para virus a analizar y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10	2 ul
H ₂ O	18 ul
RNA (1/10)	10 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/μl	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H ₂ O	14.1 ul
Volumen final	30 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación, se realiza de acuerdo al siguiente mix y programa de amplificación:

Mix PCR

DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10μM	1 ul
Primer R. 10μM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	} 39 ciclos.
94°C	45 seg.	
X°C	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	
4°C	∞	

La temperatura de annealing (T°A) dependerá de cada par de partidores utilizados en la PCR para cada virus luego:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAACGGCA	Werner y colab., 1997
CLRV (r)		GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	416 bp
PPV (f)	58	ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC	Wetzel et al., 1991
PPV (r)		CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA	243 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.



DOCUMENTO GENERAL

PROTOSCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

10. Protocolo para virus en Palto.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas de TSV.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo para TSV y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10	2 ul
H ₂ O	18 ul
RNA (1/10)	10 ul

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/μl	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H ₂ O	14.1 ul
Volumen final	30 ul

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación de TSV, se realiza de acuerdo al siguiente mix y programa de amplificación:

Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10μM	1 ul
Primer R. 10μM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	16.75 ul



DOCUMENTO GENERAL

PROTOCOLOS RT-PCR EN DOS ETAPAS POR ESPECIE HOSPEDANTE

cDNA	2.5 ul
------	--------

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el cDNA o DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

Programa PCR

94°C	5 min.	}	39 ciclos.
94°C	45 seg.		
X°C	45 seg.		
72°C	1 min.		
72°C	5 min.		
4°C	∞		

La temperatura de anealing (X°C) dependerá de cada par de partidores utilizados en la PCR para cada virus luego:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
TSV (f)	50	ACGAGTATTAAGTGGATGAATTCT	Tzanetakis IE, Mackey IC, Martin RR (2004)
TSV (r)		ACTTACAATACGTTCGAGGTGTG	872 bp

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.