



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### 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, PNRSV, CMV y CLRV.**

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 1:10 (0,3 µg/ml)	2 ul
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	16.75 ul
cDNA	2.5 ul



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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 302 bp
ArMV-3A		CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	
SLRSV-F	50	CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT	Postman y colab., 2004 497 bp
SLRSV-R		AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	
ToRSV-U1	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach y colab., 1995 449 bp
ToRSV-D1		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	
ApMV-f	50	CGT GAG GAA GTT TAG GTT G	Sánchez-Navarro et al., 2005 417 bp
ApMV-r		GCC TCC TAA TCG GGG CAT CAA	
RBDV-f	55	AAAGACKYSCAGAAATCCGTTA	K. Keller, no publicados. 427 bp
RBDV-r		TGAWARGAAGTTDGCCCATTT	

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
BRLV-f *	55	GGGATCGATTGGTTAGGACCGTCAT	Tzanetakis et al 2004 823 bp
BRLV-r		ATTATTCTTAATGTGAGGCAACTCG	
BSSV-f	52	CCC TCA ATC AGA TTG GCT C	Yanagisawa H. et al. 2016 526 bp
BSSV-r		GTG TCT CGG AGC AAC TC	
TSV-f	50	ACGAGTATTAAGTGGATGAATTCT	Tzanetakis IE, Mackey IC, Martin RR (2004) 872 bp
TSV-r		ACTTACAATACGTCGAGGTGTG	
BIMaV-f	56	GGT TGA TGG ATG CTT ACG AA	Thekke-Veetil1 et al., 2016 1370 bp
BlmaV-r		CTT CAC TTA CCA CAT TAT ACA TCT C	
PNRSV-f	50	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G	Sánchez-Navarro et al., 2005 346 bp
PNRSV-r		GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC	
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAACGGCA	Werner y colab., 1997 416 bp
CLRV (r)		GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	
CMV-CPN5	54	ACTCTTAACCACCCAACCTT 280	Lumia et al. 2001 280 bp
CMV-CPN3		AACATAGCAGAGATGGCGG	

\*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.**



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Primer Paso: Síntesis de cDNA.

##### Mix Denaturación

Random Primer 0,3 µg/µl	1,0 µl
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	2,0 µl
Primer F. 10µM	0.5 µl
Primer R. 10µM	0.5 µl
Taq 5U/uL	0.25 µl
H <sub>2</sub> 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.	
94°C	45 seg.	} 39 ciclos.
T <sup>°</sup> A	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	7 min.	
4°C	∞	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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)+	55	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)+	50	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)+	59	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)	55	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	50	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 *Prunus* spp.

Amplificación por RT-PCR en dos etapas para: ACLSV, ASGV, PNRSV, PDV, ToRSV, ApMV, PBNSPaV, CLRV y HSVd.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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	2 µl
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	2.0 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	16.25ul
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.

D-ATR-AAT-072 - versión 02

Entrada en vigencia: 15-11-2024

Pág. 6 de 33



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

94°C	30 seg.	39 ciclos.
X°C	30 seg.	
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 <sub>2</sub> 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.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Segundo paso: Amplificación por PCR.

##### Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	0.5 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H <sub>2</sub> 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	30 seg.	
T°A	30 seg.	
72°C	45 min.	
72°C	7 min.	
4°C	∞	

#### Amplificación por RT-PCR en dos etapas, protocolo para: **CVA, CGRMV, CNRMV y HSVd.**

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 <sub>2</sub> 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.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Síntesis cDNA

Buffer 5x	4,0 ul
M-MLV 200 U/ $\mu$ l	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 10 mM	0.5 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 $\mu$ M	0.5 ul
Primer R. 10 $\mu$ M	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H <sub>2</sub> 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 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	$\infty$	

#### Amplificación por RT-PCR en dos etapas para **LCV-1, SLRSV y ArMV.**

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



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Primer Paso: Síntesis de cDNA.

##### Mix Denaturación

Random Primer 0,3 ug/ul	1,0 µl
H <sub>2</sub> 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 10 mM	1.0 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	1.0 ul
Primer R. 10µM	1.0 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	15.25 ul
cDNA	2.5 ul



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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 viroides, 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
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

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (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	56	GCG CAA ACG GAC CCT AAG	Lee, S.Y. et al., 2014
CGRMV-R		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
PBN-CP-F	55	GAG GCA ATG GAT GAG GAA	Zamorano A. y colab. 2017
PBN-CP-R		TCT TCC ACC GGA CTG ATT A	301 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



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	secuencia	Referencia / tamaño esperado (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
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAAACGGCA	Werner y colab., 1997
CLRV (r)		GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	416 bp
HSVd (f)	55	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	Sano et al., (1988) 269 bp
HSVd (r)		CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	

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 para: ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, TRSV, ToRSV, GRSPaV, GFKV, TSV, SLRSV y CLRV.

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mix Denaturación

Random Primer 0,3 µg/µl	1 µl
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	4.1 µl
Volumen final	20 µl



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	0.5 ul
Primer R. 10µM	0.5 ul
Taq 5U/uL	0.25 ul
H <sub>2</sub> 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.		
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	

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
GLRa3V (f)	52	CGC TCA TGG TGA AAG CAG ACG	Turturo et Al 2005
GLRa3V (r)		CTT AGA ACA AAA ATA TGG AGC AG	546 bp
GVA (f)	52	GAC AAA TGG CAC ACT ACG	Minafra et Al 1997
GVA (r)		AAG CCT GAC CTA GTC ATC TTG G	430 bp
GVB(f)	52	GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C	Minafra and Hadidi 1994
GVB(r)		ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G	460 bp
GFLV(f)	52	TCG GGT GAG ACT GCG CAA CTT CCT A	MacKenzie et Al, 1997
GFLV(r)		GAT GGT AAC GCT CCC GCT GCT CTT	312 bp
ToRSV (f)	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach 1995
ToRSV (r)		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)		CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	320 bp
SLRSV (f)	55	CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC	Faggioli et al 2002
SLRSV (r)		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
GRSPaV (f)	52	AGCTGGGATTATAAGGGAGGT	Nolasco et al 2000
GRSPaV (r)		CCAGCCGTTCCACCACTAAT	512 bp
GFKV-U279	55	TGG TCC TCG GCC CAG TGA AAA AGT A	Sabanadzovic et al 2001
GFKV-L630		GGC CAG GTT GTA GTC GGT GTT GTC	352 bp
TSV-f	50	ACGAGTATTAAGTGGATGAATTCT	Tzanetakis IE, Mackey IC, Martin RR (2004)
TSV-r		ACTTACAATACGTCGAGGTGTG	872 bp



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
GLRa4V (f)	52	GAGAGTGACAAGCACCAGGTGC	Martelli, G.P. et Al, 2006. 492bp
GLRa4V (r)		TCACCTCCTGTTGCCCA	
GLRa7V (f)	55	TATATCCCAACGGAGATGGC	Engel et al 2008 502 bp
GLRa7V (r)		ATGTTCTCCACCAAATCG	
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAACGGCA	Werner y colab., 1997 416 bp
CLRV (r)		GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	

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 <sub>2</sub> 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.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Síntesis cDNA

Buffer 5x	5 ul
M-MLV 200 U/ $\mu$ l	1 ul
dNTPs 10 mM	1,25 ul
DTT 0.1 mM	1,20 ul
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 $\mu$ M	1 ul
Primer R. 10 $\mu$ M	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> 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	$\infty$	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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	TGGCGACCGTGTAAACGGCA	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.

#### 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 <sub>2</sub> 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.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Síntesis cDNA

Buffer 5x	5 ul
M-MLV 200 U/ $\mu$ l	1 ul
dNTPs 10 mM	1,25 ul
DTT 0.1 mM	1,20 ul
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 $\mu$ M	1 ul
Primer R. 10 $\mu$ M	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> 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	1 min.	
72°C	5 min.	
4°C	$\infty$	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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)	56	ACA AAG AAA TTC CCT GCA AGG G	Rooy A, Fayad A, Barthe G, Brlansky RH. (2005) 411 bp
CPsV(r)	56	AAG TTT CTA TCA TTC TGA AAC CC	
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).

Este protocolo, se aplica a los siguientes virus: **FCILV, SCrV, SLRSV, SMYEV, SMoV, ArMV, ToRSV, TSV, BRLV 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 <sub>2</sub> O	18 ul
RNA (1/10)	10 ul



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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/ $\mu$ l	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 $\mu$ M	1 ul
Primer R. 10 $\mu$ M	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	15.75 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	$\infty$	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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

<b>Virus</b>	<b>T° de Annealing (T° A)</b>	<b>Secuencia de los partidores (5' -3')</b>	<b>Referencia / tamaño esperado (bP)</b>
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
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
BRLV-f *	55	GGGATCGATTGGTTAGGACCGTCAT	Tzanetakis et al 2004
BRLV-r		ATTATTCTTAATGTGAGGCAACTCG	823 bp



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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

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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	14.1 ul
Volumen final	30 ul



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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 mix y programa de amplificación indicado a continuación:

#### Mix PCR

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	1 ul
Primer R. 10µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	15.75 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 <sup>°</sup> A	45 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	
4°C	∞	

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

Virus	T <sup>°</sup> de Annealing (T <sup>°</sup> 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)		CAA CGT AGG AAG TTC ACA G	Sánchez-Navarro et al., 2005



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
PDV (r)	55	GCA TCC CTT AAA GGG GCA TC	517 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

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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	14.1 ul
Volumen final	30 ul



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 10 mM	0.5 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10µM	1 ul
Primer R. 10µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	15.75 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	∞	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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)
CLRV (f)	55	TGGCGACCGTGTAAACGGCA	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.

#### 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 <sub>2</sub> 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.



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

#### Síntesis cDNA

Buffer 5x	10 ul
M-MLV 200 U/ $\mu$ l	1 ul
dNTPs 10 mM	2.5 ul
DTT 0.1 mM	2.4 ul
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer F. 10 $\mu$ M	1 ul
Primer R. 10 $\mu$ M	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	15.75 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	$\infty$	



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

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

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

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

#### 11. Protocolo para detección de fitoplasmas.

Dada las especies vegetales consideradas dentro del alcance de este Instructivo, se requieren analizar la presencia de los siguientes fitoplasmas:

<b>Hospedante</b>	<b>Fitoplasmas y/o Enfermedad asociada</b>
<b>Rubus spp.</b>	Rubus stunt Phytoplasma
	<i>Candidatus phytoplasma fraxini</i>
	<i>Candidatus phytoplasma pyri</i>
<b>Malus spp.</b> <b>Cydonia spp.</b> <b>Pyrus spp.</b>	Apple rubbery wood phytoplasma (ARW)
	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>
<b>Vitis spp.</b>	Grapevine yellows ( <i>Candidatus phytoplasma asteris</i> subgrupo 16SrI-B y 16SrI-C)
	Grapevine yellows ( <i>Candidatus phytoplasma fraxini</i> , subgrupo 16RsVII-A)
	Stolbur group (Stolbur subgrupo 16SrXII-A)
	Virginia grapevine yellows phytoplasma
	VK grapevine yellows phytoplasma en vides
<b>Vaccinium spp.</b>	<i>Candidatus phytoplasma asteris</i>
	<i>Candidatus phytoplasma solani</i>
<b>Prunus spp.</b>	<i>Candidatus phytoplasma fraxini</i>
	<i>Candidatus phytoplasma pyri</i>



## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Este diagnóstico, se realiza a través de un PCR anidado o nested-PCR que consiste en:

#### PCR directo

Diluya la muestra de ADN extraída en una proporción 1:20  
Se prepara el siguiente Mix de PCR.

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	2 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer P1 10 µM	1 ul
Primer P7 10 µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	14.25 ul
DNA (1/20)	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente, se agrega el ADN y se da inicio al programa de PCR que consiste en:

#### Programa PCR

94°C	4 min.	
94°C	1 min.	}
55°C	1 min.	
72°C	1,5 min.	
		39
72°C	10 min.	
4° C	∞	

#### PCR Anidado.

Se diluye el producto del PCR anterior en una proporción 1:20.

Se prepara el siguiente Mix de PCR.

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	2 ul
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	1.5 ul
Primer R16 F2n 10 µM	1 ul
Primer R16 R2 10 µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H <sub>2</sub> O	14.25 ul
Primer producto de PCR (1/20)	2.5 ul

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos. Posteriormente, se agrega el primer producto de PCR y se inicia el programa de PCR indicado anteriormente.

Los partidores utilizados en este PCR, se indican en la tabla siguiente:

PCR Fitoplasma	Partidor	Secuencia de los partidores (5' -3')	T° de Annealing (T° A)	Referencia / tamaño esperado (bp)
PCR Directo	P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	55	Deng e Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995
	P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	55	~1800 bp
PCR Nested	R16F2n	ACG ACT GCT AAG ACT GG	55	Lee et al., 1995
	R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	55	~1250 pb

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

#### 12. Control de calidad interno para el tamaño esperado.

Género / Especie	Virus o fitoplasmas	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
<i>Ribes</i> spp. <i>Rubus</i> spp. y <i>Vaccinium</i> spp.	ArMV	302
	ToRSV	449
	TRSV	320
	SLRSV	497
	ApMV	417
	RBDV	427
	BRLV (Sinonimia con SNSV)	800
	BSSV	526
	TSV	872
	BIMaV	1.370
	PNRSV	346
	CLRV	416
	CMV	280
	Ca. Phytoplasma pyri	~1.200
	Ca. Phytoplasma asteris	~1.200
	Ca. Phytoplasma franxini	~1.200
	Ca phytoplasma solani	~1.200
Rubus sutnt Phytoplasma	~1.200	

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Género / Especie	Virus o fitoplasmas	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
<i>Malus spp., Cydonia oblonga y Pyrus spp.</i>	ApMV	417
	ASGV	499
	TRSV	320
	ToRSV	449
	ACLSV	632
	Apple rubbery wood phytoplasma	~1.200
	Candidatus phytoplasma pyri	~1.200
<i>Prunus spp.</i>	ArMV	302
	ToRSV	449
	TRSV	320
	SLRSV	497
	ACLSV	632
	PPV	243
	PNRSV	346
	PDV	517
	PLMVd	337
	LCV-1	623
	CGRMV	650
	CNRMV	210
	<i>Prunus spp.</i>	ASGV
ApMV		417
PBNPaV		301
CLRv		416
Ca. Phytoplasma franxini		~1.200
HSVd		269
CVA		652
Ca. Phytoplasma pyri		~1.200
<i>Vitis spp.</i>	GLRaV-1	150
	GLRaV-2	589
	GLRaV-3	546
	GLRaV-4	492
	GLRaV-7	502
	GfKV	352
	GFLV	290
	TSV	872

## DOCUMENTO GENERAL

### Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.

Género / Especie	Virus o fitoplasmas	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
	GVA	430
	GVB	469
	ArMV	302
	GRSPaV	512
	SLRSV	293
	TRSV	449
	ToRSV	320
	Grapevine yellows	~1.200
	Stolbur group	~1.200
	Virginia grapevine yellows phytoplasma	~1.200
	VK grapevine yellows phytoplasma	~1.200
<i>Olea europaea</i>	CLRV	416
	SLRSV	293
	ArMV	302
<i>Citrus</i> spp. e híbridos inter-especies <i>Fortunella</i> spp. y <i>Poncirus</i> spp.	CTV	672
	CPsV	411
	CEVd	371
	HSVd	269
<i>Fragaria</i> spp.	FCILV	300
	SCrV	345
	SLRSV	497
	SMYEV	271
	SVBV	472
	SMoV	384
	ArMV	302
	ToRSV	449
	PNRSV	346
<i>Corylus</i> spp.	PDV	517
	ApMV	417
<i>Juglans</i> spp.	CLRV	416
	PPV	243
<i>Persea americana</i>	TSV	872