

Apoyado por:



MANUAL DE CAMPO Y LABORATORIO

PROTOCOLOS DE IMPLEMENTACIÓN DE TOMA DE MUESTRAS EN CAMPO Y ANÁLISIS DE qPCR EN LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN EFICIENTE DE VIRUS EN PRUNUS

La presente publicación entrega protocolos desarrollados en el marco del proyecto "Desarrollo de qPCR Múltiple e Innovador Sistema de Toma de Muestras para Detección Eficiente y de Bajo Costo de Virus en Prunus" PYT-2022-0377, que cuenta con el apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

TABLA DE CONTENIDO

MANUAL

PROTOCOLOS DE IMPLEMENTACIÓN DE TOMA DE MUESTRAS EN CAMPO Y ANÁLISIS DE qPCR EN LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN EFICIENTE DE VIRUS EN *PRUNUS*

Versión 1 – 02-06-2025

1. OBJETIVO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. USUARIOS
6. CONTEXTO TEÓRICO
7. PROCEDIMIENTOS
 - 7.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES CON TARJETAS FTA
 - 7.1.1. Consideraciones generales
 - 7.1.2. Materiales necesarios
 - 7.1.3. Procedimiento 1: Presión directa sobre la hoja
 - 7.1.4. Procedimiento 2: Tejido de planta homogenizado
 - 7.1.5. Criterios de aceptación y rechazo
 - 7.2. RECUPERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE TARJETAS FTA
 - 7.2.1. Consideraciones generales
 - 7.2.2. Materiales necesarios
 - 7.2.3. Procedimiento
 - 7.2.4. Criterios de aceptación y rechazo
 - 7.3. DETECCIÓN DE VIRUS MEDIANTE ONE STEP RT-qPCR ASOCIADO A SONDAS
 - 7.3.1. Consideraciones generales
 - 7.3.2. Materiales necesarios
 - 7.3.3. Procedimiento
 - 7.3.4. Criterios de aceptación y rechazo
8. CONTROL DE CALIDAD
9. REGISTROS Y REPORTES
10. CONTROL DE CAMBIOS
11. ANEXOS
 - 11.1. Preparación de Buffer PBS 1X
 - 11.2. Preparación de buffer de extracción FTA
 - 11.3. Primers y sondas utilizados en Onestep – RTqPCR

1. OBJETIVO

Este manual tiene por objetivo indicar los protocolos y procedimientos para la obtención de muestras en campo, recuperación de ácidos nucleicos y detección de virus en Prunus, conforme a los procedimientos generados en el proyecto FIA PYT-2022-0377.

2. ALCANCE

Este manual cubre los procedimientos utilizados en el laboratorio para la obtención de ácidos nucleicos en campo, su recuperación desde tarjetas FTA y la detección de virus mediante RT-qPCR.

3. REFERENCIAS

- A. Zamorano, M. Chiumenti, C. Fernández, N. Quiroga, A. M. Pino, K. Sagredo, P. Saldarelli, and N. Fiore. 2017. First Report of Cherry virus A and Plum bark necrosis stem pitting-associated virus in Cherry in Chile. *Plant Disease* 101:9, 1685-1685 <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0533-PDN>
- Diaz-Lara, A.; Stevens, K.; Klaassen, V.; Golino, D.; Al Rwahnih, M. 2020. Comprehensive Real-Time RT-PCR Assays for the Detection of Fifteen Viruses Infecting Prunus spp. *Plants* 9: 273. <https://doi.org/10.3390/plants9020273>
- N. Fiore, C. Fernández, N. Quiroga, A. M. Pino, L. Rivera, K. Sagredo, and A. Zamorano. 2018. First Report of Little cherry virus 1 in Chile. *Plant Disease* 102:3, 689. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1407-PDN>
- Grund, E., Darissa, O. and Adam, G. 2010. Application of FTA®Cards to Sample Microbial Plant Pathogens for PCR and RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 158: 750-757. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01695.x>
- Lin, L., Li, R., Bateman, M. et al. 2013. Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *Eur J Plant Pathol* 137, 797-804. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0289-1>
- MacKenzie DJ, McLean MA, Mukerji S, Green M. 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* Feb;81(2):222-226. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.2.222
- Pallás, V., A., J., & James, D. 2018. Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. *Frontiers in Microbiology*, 9, 400508. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087>

4. DEFINICIONES

- 1. Ácidos nucleicos ó material genético:** Moléculas fundamentales que contienen la información genética de los organismos. En este manual, se hace referencia exclusivamente al RNA (ácido ribonucleico).
- 2. Ct:** Número de ciclos en una reacción de RT-qPCR en el cual la señal de fluorescencia supera un umbral establecido, indicando la detección del material genético de interés.
- 3. Master mix:** Solución premezclada que contiene los componentes esenciales para llevar a cabo una reacción de PCR o RT-qPCR, como enzimas, nucleótidos, tampones y cofactores. Su uso permite reducir la variabilidad entre muestras y optimizar la eficiencia de la reacción al minimizar los errores de pipeteo.
- 4. Parafilm:** Película plástica elástica utilizada en laboratorio para sellar recipientes y evitar contaminación o evaporación.
- 5. Pellet:** Sedimento compacto de material biológico obtenido tras la centrifugación de una muestra.
- 6. RT-qPCR multiplex:** Técnica de biología molecular que permite la detección simultánea de múltiples secuencias genéticas en una misma reacción de PCR en tiempo real.
- 7. Tarjeta FTA:** Tarjetas diseñadas para la recolección, transporte y preservación de material genético sin necesidad de refrigeración.

5. USUARIOS

Personal técnico y profesional de campo y laboratorio, responsables de los análisis de virus en *Prunus*.

6. CONTEXTO TEÓRICO

En la actualidad y en relación con la detección de virus en plantas, el transporte de muestras al laboratorio, la extracción convencional de ácidos nucleicos para ensayos de biología molecular o el uso de técnicas tradicionales como los ensayos de ELISA, presentan varios desafíos logísticos y operativos. El transporte de muestras biológicas al laboratorio requiere condiciones de cadena de frío estrictas para mantener la viabilidad del RNA de las muestras, lo cual puede ser costoso y complicado. Además, los ensayos de ELISA, aunque útiles para la detección de proteínas virales, carecen de la sensibilidad y especificidad necesarias para detectar niveles bajos de patógenos o su material genético.

Frente a las limitaciones de los métodos tradicionales, es que a través del proyecto FIA 2022-0377 se han desarrollado metodologías que ofrecen soluciones a estos desafíos, generando un transporte económico y estable del material genético a través de tarjetas FTA y el uso de la técnica RT-qPCR multiplex para la detección de material genético viral. Las tarjetas FTA permiten que cualquier operario de campo pueda realizar la recolección, almacenamiento y transporte de muestras biológicas de manera segura y estable a temperatura ambiente, eliminando la necesidad de refrigeración y reduciendo los costos asociados. Por otro lado, la técnica de RT-qPCR multiplex proporciona una alta sensibilidad y especificidad para la detección y cuantificación de varios virus simultáneamente, permitiendo resultados rápidos, precisos y abundantes.

En este manual se detallan los protocolos de muestreo de material genético en campo a partir del material vegetal, transporte de las tarjetas FTA, recuperación de dicho material en laboratorio y los protocolos de RT-qPCR multiplex para la detección de un set de virus comunes en Prunus. La finalidad es que, mediante el uso de tarjetas FTA y RT-qPCR, se optimicen los diagnósticos siendo más sensibles y eficaces para la investigación y diagnóstico de virus mediante biología molecular.

7. PROCEDIMIENTOS

7.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES CON TARJETAS FTA

7.1.1. Consideraciones generales

El proceso de toma de muestras con tarjetas FTA se puede realizar de dos formas distintas: presión directa sobre la hoja (sección 7.1.3) o con tejido de planta homogeneizado (sección 7.1.4). Por las características del ambiente y muestreo, en terreno se recomienda utilizar la primera metodología de presión directa en la hoja. Por otro lado, se recomienda el uso de la segunda metodología de tejido de planta homogeneizado en laboratorio.

7.1.2. Materiales necesarios

- Bolsa hermética sellable tipo ziploc
- Buffer de PBS 1X (Anexo 11.1)
- Film de laboratorio tipo Parafilm
- Pistilo, martillo u otro material cilindrico contundente
- Tarjetas FTA

7.1.3. Procedimiento 1: Presión directa sobre la hoja

- Ubicar la hoja directamente sobre la tarjeta FTA. Sobreponer una capa de Parafilm sobre la hoja (Figura 1A).
- Aplicar golpes/presión moderada a la hoja con un martillo o pistilo (Figura 1B), asegurando la molienda de la hoja.
- Cuando se observa el extracto en la parte trasera de la tarjeta FTA, (color verde y humedad) el proceso de recolección esta completo y finalizado (Figura 1C).
- Dejar en un lugar seco, a temperatura ambiente y sin sol directo por un período mínimo de 1 hora.

Nota: No se debe aplicar calor a la tarjeta. El proceso de secado debe ser a temperatura ambiente para mantener la estabilidad del material genético.

- Almacenar a temperatura ambiente para su envío o procesamiento posterior.



Figura 1: Procesamiento de muestra de hoja en tarjeta FTA mediante el Procedimiento 1

7.1.4. Procedimiento 2: Tejido de planta homogeneizado

- i) Seleccionar entre 2 a 3 hojas por árbol para análisis y colocarlas en una bolsa hermética (Figura 2A).
- ii) Golpear con un martillo hasta que el tejido de la planta esté macerado y homogeneizado, procurando que no alcance la consistencia fluida (Figura 2B).
- iii) Agregar buffer PBS 1X dentro de la bolsa con tejido vegetal utilizando una pipeta plástica de 5 mL. Llenar la pipeta plástica completamente de buffer 2 veces y agregarlo a la bolsa hermética (Figura 2C).
- iv) Cerrar la bolsa y agitar para mezclar el buffer con el tejido vegetal. Luego, con la misma pipeta plástica, tomar del homogeneizado y aplicar una gota en cada círculo de la tarjeta FTA (Figura 2D).
- v) Dejar en un lugar seco, a temperatura ambiente y sin sol directo por 1 hora mínimo.

Nota: No se debe aplicar calor a la tarjeta. El proceso de secado debe ser a temperatura ambiente para mantener la estabilidad del material genético.

- vi) Almacenar las tarjetas FTA a temperatura ambiente y protegidas del sol directo para su posterior envío a laboratorio y procesamiento.



Figura 2: Procesamiento de muestra de hojas en tarjeta FTA bajo el procedimiento 2

7.1.5. Criterios de aceptación y rechazo

- Para tejido vegetal: Se da por aceptada una muestra para su uso en tarjeta FTA si no presenta alguna(s) de las siguientes características: hojas secas o deshidratadas, hojas con daño por maceración, hojas con daño por congelación, tejidos vegetales con evidente crecimiento de mohos y/o pudriciones, tejido vegetal que ha estado refrigerado.
- Para tarjetas FTA: si se observa una mancha verde al reverso de la tarjeta FTA luego de la aplicación de la muestra y su secado, generada por la aplicación de la muestra y sus pigmentos, el procedimiento se considera correctamente realizado. En contraparte, el procedimiento se considera mal ejecutado y se rechaza.

7.2. RECUPERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DESDE TARJETAS FTA

7.2.1. Consideraciones generales

Una de las características de las tarjetas FTA es que pueden generar una buena estabilidad y mantenimiento del material genético obtenido. Sin embargo, para utilizar ese material genético en aplicaciones de laboratorio posteriores es necesario recuperarlo y purificarlo desde la matriz de las tarjetas. El siguiente protocolo muestra los pasos necesarios para obtener un RNA de calidad óptima para pasos posteriores, como el análisis de RT-qPCR multiplex u otros pasos necesarios.

7.2.2. Materiales necesarios

- Acetato de sodio 3M
- Buffer de extracción FTA (Anexo 11.2)
- Dithiothreitol (DTT) 1M
- Centrífuga de tubos eppendorf refrigerada a 4°C
- Etanol 70% en agua DEPC
- Inhibidor de RNAsa
- Isopropanol (2-propanol) frío
- Sacabocado de 2 mm
- Tarjetas FTA cargadas con muestra vegetal
- Termobloque, baño termostático o equipo similar a 65°C
- Tubos eppendorf de 2 mL

7.2.3. Procedimiento

- Encender la centrifuga y ajustar su temperatura en 4°C. Además, encender un termobloque y ajustarlo a 65°C.
- Perforar 4 discos desde la tarjeta FTA, específicamente del centro de la mancha seca de tejido utilizando un sacabocado de 2 mm. Traspasar el bocado de papel perforado a un tubo eppendorf de 2mL.
- Añadir 400 µL de buffer de extracción al tubo eppendorf conteniendo los trozos de tarjeta FTA. Además, agregar 2 µL de DTT 1M a cada tubo. Aplicar vortex.
- Agregar 0,5 Unidades de inhibidor de RNAsa y aplicar vortex.
- Incubar las muestras a 65°C por 5 min. Vortexear brevemente e incubar a 65°C por 5 minutos adicionales.
- Tomar los tubos del termobloque y transferir con una micropipeta el sobrenadante, sin discos, a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL.
- Añadir al sobrenadante 40 µL de Acetato de sodio 3M y 400 µL de isopropanol frío. Mezclar por inversión más de 5 veces hasta que ninguna partícula sea visible.

Nota: No se debe utilizar vortex en este paso.

viii) Centrifugar cada tubo eppendorf a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

ix) Retirar los tubos de la centrifuga, descartar el sobrenadante y dejar el tubo seco en un papel absorbente boca abajo para su secado.

Nota: El pellet contiene el material genético de interés, por lo que debe manipularse con especial precaución para evitar su pérdida. Como en este caso se trata de RNA, se recomienda extremar los cuidados, ya que este tipo de pellet puede desprenderse fácilmente del fondo del tubo y perderse durante la manipulación.

x) Una vez secos los tubos eppendorf, añadir 1mL de etanol 70% frío al pellet y mezclar por inversión 5 veces.

xi) Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C.

xii) Retirar los tubos de la centrifuga, nuevamente eliminar el sobrenadante y voltear el tubo en papel absorbente.

Nota: Nuevamente tener la precaución de no eliminar el pellet si se extrae RNA.

xiii) Secar el pellet en termobloque a 65°C por 7 minutos con los tubos abiertos, los cuales deben ser cubiertos con papel absorbente durante la incubación.

xiv) Chequear visualmente si el pellet se secó completamente.

xv) Agregar 30 µL de agua DEPC al tubo en el termobloque, incubar 3 minutos a 65°C y otros 5 minutos a temperatura ambiente.

Nota: La resuspensión del pellet se puede apoyar transfiriendo las muestras al vortex por 1 minuto y temperatura ambiente si fuera necesario.

xvi) Continuar con los procesos necesarios, o almacenar a -20°C para corto plazo o -80°C para largo plazo.

7.2.4. Criterios de aceptación y rechazo

- Si se observa un pellet en el paso ix y se resuspende correctamente en el paso xv, el procedimiento se considera correctamente realizado.
- Si no se observa pellet luego del paso ix, el procedimiento no se puede considerar aceptado ni rechazado, ya que pudo haberse extraído RNA en bajas cantidades. Solo un paso posterior como el RT-qPCR puede confirmar la presencia del material genético.

7.3. DETECCIÓN DE VIRUS MEDIANTE ONE STEP RT-qPCR ASOCIADO A SONDAS

7.3.1. Consideraciones generales

La detección de virus mediante qPCR ofrece una ventaja en sensibilidad y tiempo en comparación con otras técnicas como la PCR convencional o ELISA. Además, la estandarización del transporte de material genético mediante tarjetas FTA y la implementación de qPCR en el marco del proyecto buscan combinar dicha sensibilidad con una metodología rápida y sencilla de transporte.

Además, el uso de la técnica "one step", que consiste en la integración de la transcripción reversa con qPCR para utilizar RNA como templado, permite una menor manipulación del RNA, lo que aumenta la sensibilidad de la técnica. Por último, aprovechando la capacidad de multiplexación de la qPCR, se han diseñado reacciones que permiten evaluar varios virus en una sola reacción, aumentando las posibilidades de diagnóstico al revisar múltiples virus en un menor número de reacciones posibles. Con esto, se busca profundizar el diagnóstico y aprovechar al máximo las oportunidades que las herramientas de biología molecular pueden aportar a la sanidad y productividad de los cerezos.

7.3.2. Materiales necesarios

- Agua DEPC
- Controles positivos de plásmido con secuencia viral conocida
- Inhibidor de RNAsa
- One-Step RT-PCR Kit
- Primers específicos de virus y controles (Anexo 12.3)
- Sonda específica asociada a primers específicos (Anexo 12.3)
- Termociclador de qPCR
- Tubos de qPCR

7.3.3. Procedimiento

i) Preparar el Master mix de PCR según lo indicado en la siguiente tabla y tomando las consideraciones de las notas:

Reactivo	Volumen por reacción		Concentración final
2x One-Step Mix		5 µL	1 x
Virus 1	Forward Primer (20 µM)	0,24 µL	0,4 µM
	Reverse Primer (20 µM)	0,42 µL	0,4 µM
	Sonda (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
Virus 2	Forward Primer (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
	Reverse Primer (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM M
	Sonda (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
Virus 3	Forward Primer (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
	Reverse Primer (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM M
	Sonda (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
Control de extracción TUA (Solo reacción 1, Anexo 11.4)	TUA-F (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
	TUA-R (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM M
	TUA-Sonda (20 µM)	0,2 µL	0,4 µM
Reverse transcriptase		0,1 µL	--
RiboSafe RNase Inhibitor		0,2 µL	--
Agua DEPC		hasta completar 9 µL	--
Volumen final	9 µL		--

Nota 1: El mix de PCR siempre se debe realizar pensando en el número de reacciones a realizar + control positivo + control negativo + una muestra adicional. Por ejemplo, si son 6 muestras para evaluar, se deben considerar las 6 muestras + control positivo + control negativo + muestra adicional. En total se debe realizar un mix para 9 muestras. Siempre deben considerarse los controles y una muestra adicional para tener un exceso de mix en caso de pérdida por pipeteo.

Nota 2: En la primera tanda de reacciones, uno de los tres sets virales debe ser reemplazado por el set de primers y sonda "Control de extracción Prunus α -tubulina (TUA)" el cual es un housekeeping vegetal y actúa como control interno de calidad del ARN. Este control es obligatorio para todas las muestras.

Si no se detecta amplificación del gen TUA, la muestra debe ser considerada inválida y descartada, ya que no garantiza una correcta calidad de ARN ni confiabilidad en la detección de virus.

ii) Añadir 9 μ L del mastermix en cada tubo de PCR y agregar 1 μ L de templado obtenido desde FTA en cada tubo. Luego, colocar los tubos en el termociclador.

iii) Configurar el termociclador según las recomendaciones del fabricante, considerando el siguiente programa:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Descripción
1	45 °C	20 min	Transcripción reversa
1	95 °C	1 min	Inactivación de transcriptasa-activación de polimerasa
40	95 °C	10 seg	Denaturación
	60 °C	10 seg	Alineamiento-extensión-lectura

iv) Configurar la lectura de la fluorescencia en los canales amarillo, naranja, rojo y verde según las reacciones del análisis multiplex que se realizará (Anexo 11.4)

v) Iniciar la reacción de Onestep RT-qPCR

vi) Una vez finalizada la reacción, considerar como positivos todas las muestras que muestren un Ct menor a 35.

7.3.4. Criterios de aceptación y rechazo

- Si en la primera tanda de reacciones se observa amplificación del Control de extracción Prunus α -tubulina (TUA), se asume que la extracción e integridad de la muestra de RNA analizada es la correcta y que se pueden seguir analizando los siguientes virus con ella. Si no se observa amplificación, se asume que la muestra de RNA no se extrajo correctamente o está degradada, con lo cual se descarta y se debe extraer una nueva muestra de RNA.

- Si en cada reacción se observa amplificación de los controles positivos, el procedimiento se da por aceptado para el virus el cual amplificó el control positivo. Si no se observa amplificación de un control positivo de virus, se rechaza el procedimiento para dicho virus y se recomienda repetir toda la reacción.

8. CONTROL DE CALIDAD

- El protocolo 7.3 requiere controles positivos para su ejecución
- El protocolo 7.3 utiliza controles internos que aseguran una buena muestra

9. REGISTROS Y REPORTE

- Se deben registrar las muestras que fueron procesadas en cada uno de los protocolos establecidos

10. CONTROL DE CAMBIOS

- No hay cambios a la fecha

11. ANEXOS

11.1. Preparación de Buffer PBS 1X

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0,2 g
Fosfato disodio (Na ₂ HPO ₄)	1,44 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0,245 g
Agua DEPC	Hasta completar 1 L

11.2. Preparación de buffer de extracción FTA

Reactivo	5 mL	10 mL	50 mL
Tris HCl, pH 8,0	50 µL	100 µL	500 µL
EDTA 0,5M pH 8,0	1 µL	2 µL	10 µL
Glicogeno 5 mg/mL	20 µL	40 µL	200 µL
PVP-40	0,1 g	0,2 g	1 g
Agua grado biol. molecular	4,649 mL	9,298 mL	46,490 mL

**Este buffer puede ser almacenado a 4°C hasta por un año*

11.3. Primers y sondas utilizadas en Onestep – RTqPCR

Virus	Primers/Sonda	Secuencia
Control de extracción Prunus α -tubulina (TUA)	TUA-F	TGCCAGAGGACACTACACAG
	TUA-R	CCACCACCAACAGCGTTAAA
	TUA-Sonda	ATGCCTTGACAGGGTGAGAAAATTAGCTG
Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	PNR-F	GTTTTTACAACACGCTGGT
	PNR-R	AGGGAATTTGTTTCGTATCACCA
	PNR-Sonda	CTGCTAGTCTRCAGGAGCTGA
Cherry virus A (CVA)	CVA-F	CCGAGACCAGTGATAGAGAA
	CVA-R	CTTCTGCACCAACCACACC
	CVA-Sonda	TCAGGAGGCTTRACTGCACAT
Cherry necrotic rusty mottle virus (CNRMV)	CNR-F	AATCCCACCTCAAGTCCTAGC
	CNR-R	CAATTGCTTTAACTGTGTCATCA
	CNR-Sonda	CCTACAACCCTCAACATTGCAT
Cherry green ring mottle virus (CGRMV)	CGR-F	ACTTAGTTTTCTRTTGTGTGC
	CGR-R	AAAAGTTTGGGCGTAAAAGTC
	CGR-Sonda	CTGGTTGCGGGAAATCAACTC

Virus	Primers/Sonda	Secuencia
Plum bark necrosis stem-pitting associated virus (PBNSPaV)	PBN-F	TGTTCTCCGAACAGATAAAGCA
	PBN-R	CCGGGCAAGAAATGTGTGAA
	PBN-Sonda	TGCGCTGAAAACCAGAGAACC
Prunus virus F (PVF)	PVF-F	CGTTCCTTCAAATGCAAGATGG
	PVF-R	ATGTTCAAGGCCTTTCGTCG
	PVF-Son	GAAAGTTTTGTGGGGCAGTTGC
Nectarine stem-pitting associated virus (NSPaV)	NSP-F	GTGATCGATACTACACCCCGA
	NSP-R	GTTGTTGTGCGATTGGTGGT
	NSP-Sonda	GCTTGAGCACCTGACTAAGTCTT
Apricot vein clearing associated virus (AVCaV)	AVC-F	GATGACTGGGAGACGAAGCT
	AVC-R	AGGATGAGCTTGCAATTTGGA
	AVC-Sonda	TCAGCTCTTGAACACTGCTCTGT
Little Cherry virus 1 (LChV-1)	LChV1-F2	TGATAAAATGGAGGACTTGA
	LChV1-R2	ACTCCGTCTAATATAAACAATAATC
	LChV1-Son2	AGGAATGAAATTGGAGACTTTCGT
Plum pox virus (PPV)	PPV-F2	TATCCAATAAAGCCATTGTTGG
	PPV-R2	TCAGGTTGCCGCTGAATT
	PPV-Son	GACAAATTATGGCACATTTTCAGTAACG
Prune dwarf virus (PDV)	PDV-F	TCCAGGAATGATATGTTTCTCC
	PDV-R	AGCATATACCGTATCAGCAGGA
	PDV-Son	AAACAAACAGTTACATACCGAAATCC
Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)	ACL-F	AARGTGGACGCMGATCTGAA
	ACL-R	TGTTGCGAAGATGGMCTCC
	ACL-Son	GACCCCTTCATGGAAAGACAG

11.4. Reacciones de análisis multiplex

FAM - VERDE

Reacción	Detección	Sonda	Canales
1	ACLSV	ACL-Son	Cy – ROJO
	CVA	CVA-Son	CAL Fluor- NARANJA
	PNRSV	PNR-Son	HEX – AMARILLO
	TUA	TUA-Son	FAM - VERDE
2	LChV-1	LChV1-Son2	Cy – ROJO
	PVF	PVF-Son	FAM - VERDE
	PBNSPaV	PBN-Son	HEX – AMARILLO
3	AVCaV	AVC-Son	Cy – ROJO
	NSPaV	NSP-Son	HEX – AMARILLO
	PPV	PPV-Son	FAM - VERDE
4	CGRMV	CGR-Son	FAM - VERDE
	CNRMV	CNR-Son	Cy – ROJO
	PDV	PDV-Son	HEX – AMARILLO

11.5. Lista de chequeo para toma de muestra en campo

Proceso: Recolección de Muestras Vegetales con Tarjetas FTA

- **Preparación**

- ¿Se cuenta con todos los materiales necesarios? (Tarjetas FTA, Parafilm, bolsas herméticas, buffer PBS 1X, martillo/pistilo, pipeta plástica)
- ¿El equipo de campo ha recibido instrucciones sobre el procedimiento a seguir?
- ¿Se ha identificado correctamente la planta de muestreo?

- **Si realizará el procedimiento 1: Presión Directa sobre la Hoja**

- ¿Se ha colocado la hoja correctamente sobre la tarjeta FTA?
- ¿Se ha cubierto con Parafilm antes de aplicar presión?
- ¿Se ha aplicado presión moderada con el martillo o pistilo hasta observar la transferencia del material en la tarjeta?
- ¿Se ha dejado secar la tarjeta al menos una hora a temperatura ambiente y sin sol directo?
- ¿Se ha almacenado adecuadamente la tarjeta para su posterior envío o procesamiento?

- **Si realizará el procedimiento 2: Tejido Homogeneizado**

- ¿Se han recolectado de 2 a 3 hojas y colocado en bolsa hermética?
- ¿Se ha homogeneizado correctamente el tejido sin hacerlo fluido?
- ¿Se ha agregado buffer PBS 1X a la muestra y mezclado correctamente?
- ¿Se ha transferido una gota homogénea de muestra a la tarjeta FTA?
- ¿Se ha dejado secar la tarjeta al menos una hora a temperatura ambiente y sin sol directo?

- **Criterios de Aceptación y Rechazo**

- ¿El tejido vegetal cumple con los criterios mínimos de integridad y calidad? (Sin signos de deshidratación, pudrición, hongos, daño por congelación o maceración, y sin haber sido refrigerado?)
- ¿Se observa la mancha en el reverso de la tarjeta FTA indicando una correcta transferencia de material?

11.6. Lista de chequeo para extracción de material genético en laboratorio

Proceso: Recuperación de Ácidos Nucleicos y RT-qPCR

- **Preparación**

- ¿Se cuenta con todos los materiales y reactivos requeridos? (Tarjetas FTA con muestras, buffer de extracción, acetato de sodio 3M, isopropanol frío, inhibidor de RNAsa, etc.)
- ¿Los equipos están encendidos y calibrados? (Centrífuga a 4°C, termobloque a 65°C, termociclador de qPCR)

- **Recuperación de Ácidos Nucleicos**

- ¿Se han perforado los discos de tarjeta FTA desde la zona de mancha?
- ¿Se han transferido los discos a tubos Eppendorf correctamente?
- ¿Se ha añadido el buffer de extracción y DTT, mezclando por vortex?
- ¿Se ha incubado a 65°C por los tiempos establecidos?
- ¿Se ha realizado la transferencia del sobrenadante sin arrastrar los discos?
-

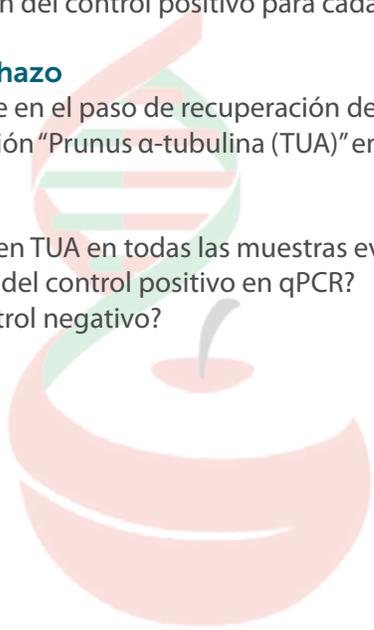
- ¿Se ha agregado acetato de sodio 3M e isopropanol, mezclando por inversión?
- ¿Se ha centrifugado correctamente y observado la formación del pellet?
- ¿Se ha eliminado correctamente el sobrenadante sin perder el pellet?
- ¿Se ha realizado el lavado con etanol 70% y secado del pellet a 65°C?
- ¿Se ha resuspendido correctamente el material genético en agua DEPC?

- **Detección por One Step RT-qPCR (para cada reacción)**

- ¿Se ha preparado correctamente el Master Mix de PCR según la tabla indicada?
- ¿Se han añadido los controles positivo y negativo?
- ¿Se han cargado correctamente las muestras en el termociclador?
- ¿Se ha configurado el termociclador según el protocolo?
- ¿Se ha verificado la amplificación del control positivo para cada virus analizado?

- **Criterios de Aceptación y Rechazo**

- ¿Se ha obtenido un pellet visible en el paso de recuperación de ácidos nucleicos?
- ¿Se incluyó el control de extracción "Prunus α -tubulina (TUA)" en la primera tanda de reacciones como parte del mix multiplex?
- ¿Se observó amplificación del gen TUA en todas las muestras evaluadas?
- ¿Se ha observado amplificación del control positivo en qPCR?
- ¿No hay amplificación en el control negativo?



Diagnofruit



MANUAL DE CAMPO Y LABORATORIO

Apoyado por:

