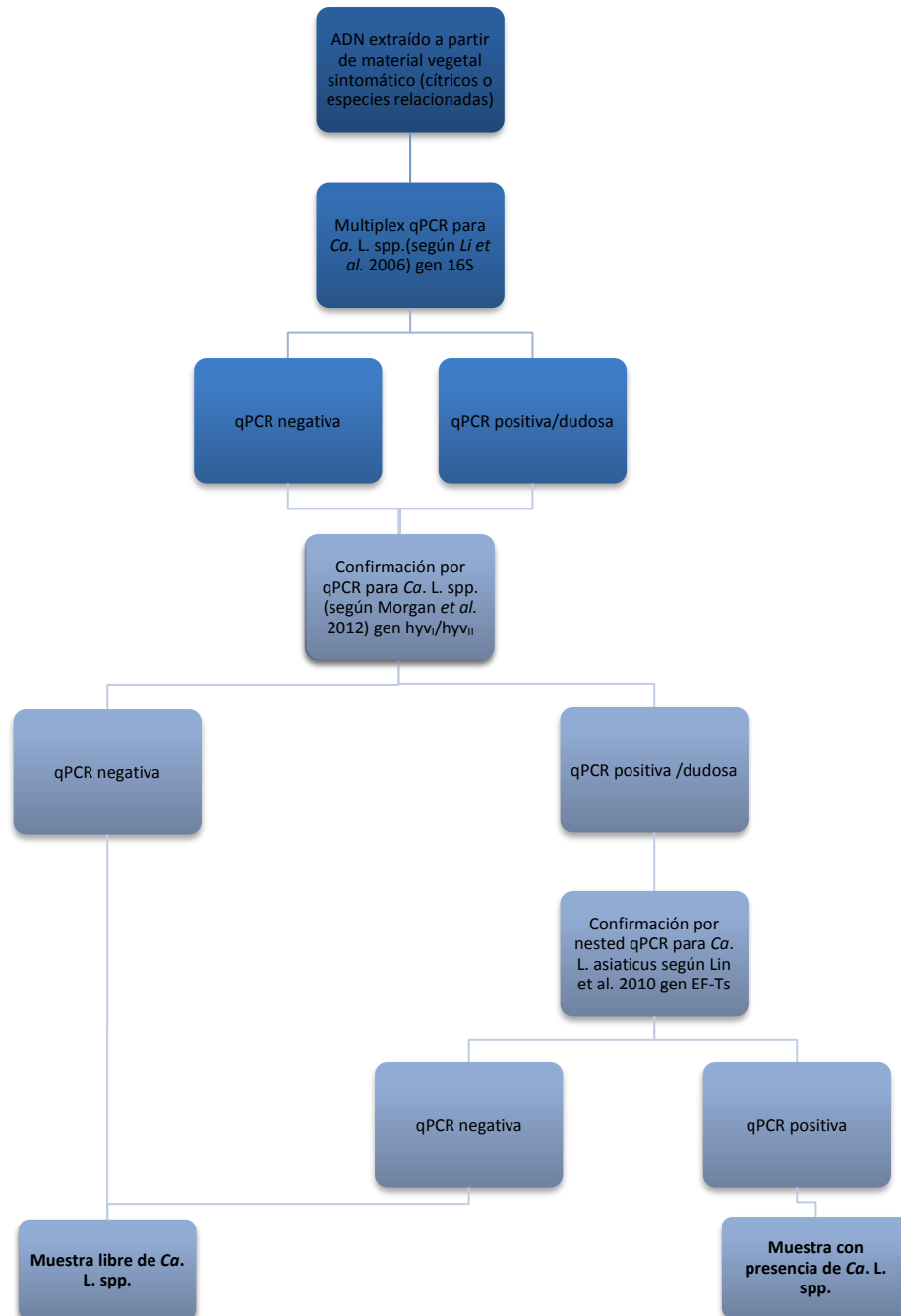


**Diagnóstico de HLB por qPCR a partir de material vegetal**

**La extracción de ADN desde material vegetal se realiza según adaptado de Murray & Thompson, 1980.**

1. Extraer las nervaduras y pecíolos a mano o con la ayuda de un bisturí.
2. Pesarse 0,5 gr del material vegetal (conservar el resto de la muestra en heladera).
3. Cortar las nervaduras en pequeños trozos de 1 cm aproximadamente.
4. Colocar el material vegetal dentro de las bolsas de extracción. Las nervaduras pueden congelarse a -20°C hasta su procesamiento.
5. Moler el material vegetal utilizando el homogeneizador tipo Homex con 3 ml de buffer de extracción CTAB con 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
6. Transferir al menos 1 ml de la parte líquida del macerado a un microtubo de 2 ml.
7. Incubar como mínimo TREINTA (30) minutos en baño maría a 65°C. Agitar por inversión cada QUINCE (15) minutos.
8. Centrifugar CINCO (5) minutos a 14.000 g a temperatura ambiente.
9. Recuperar 0,9 ml del sobrenadante y colocarlo en un nuevo microtubo de 2 ml, con igual volumen de mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar ambas fases hasta obtener una emulsión.
10. Centrifugar CINCO (5) minutos a 14000 g.
11. Recuperar 0,8 ml de la fase acuosa en un microtubo de 1,5 ml, y agregar 0,6 volúmenes de isopropanol frío (480  $\mu$ l). Agitar manualmente hasta homogeneizar.
12. Dejar al menos TREINTA (30) minutos en freezer a -20°C (se puede incubar toda la noche a -20°C o 10 minutos a -80°C).
13. Centrifugar a 4°C, DIEZ (10) minutos a 14.000 g.
14. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 1000  $\mu$ l de etanol SETENTA POR CIENTO (70%).
15. Centrifugar DIEZ (10) minutos a 14.000 g.
16. Repetir los pasos CATORCE (14) y QUINCE (15).
17. Secar las muestras en flujo laminar hasta que no se vean residuos de etanol.
18. Resuspender en 0,1 ml de agua libre de nucleasas. Si es necesario usar el ADN inmediatamente, colocar TREINTA (30) minutos a 65°C en baño seco, de lo contrario, dejar en heladera toda la noche.

## ANEXO IV

### Detección de *Ca. L. spp.* por qPCR según Li *et al.* (2006)

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
HLBas (syn.CIT295)	TCGAGCGCGTATGCAATACG	16S rDNA	<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>
HLBr (syn.CIT 298) <sup>1</sup>	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG		<i>Ca. Liberibacter spp.</i>
HLBam (syn.CIT297)	GAGCGAGTACGCAAGTACTAG		<i>Ca. Liberibacter americanus</i>
COXf	GTATGCCACGTCGCATTCCAGA	COX	Citocromo oxidasa vegetal
COXr	GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC		
Sondas	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
HLBp(syn. CIT 409) <sup>2</sup>	[6-FAM]AGACGGGTGAGTAACGCG <sub>[BHQ-1a~Q]</sub>	16S rDNA	<i>Ca. Liberibacter spp.</i>
COXp	[5TET]ATCCAGATGCTTACGCTGG <sub>[BHQ1a~Q]</sub>	COX	Citocromo oxidasa vegetal

Etapas	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura °C
1	1	20 s	95
2	40	1 s	95
		40 s	58

### Detección de *Ca. L. asiaticus* por qPCR según Morgan *et al.* (2012)

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
LJ900f	GCCGTTTTAACACAAAA GATGAATATC	hyvI /hyvII	<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>
LJ900r	ATAAATCAATTTGTTCTA GTTTACGAC		
LJ900p	[6-FAM] ACATCTTTGTTGAGT AGCTAGATCATTGA <sub>[BHQ1a ~Q]</sub>		

Etapas	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura °C
1	1	15 min	95
2	40	3 s	95
		30 s	62

**Detección de *Ca. L. asiaticus* por nested-qPCR según Lin *et al.* (2010) modificado por EEAOC (2014)**

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
Las O-F	CGGTGAATGTATTAAGCTGAGGCGTTCC	EF-Ts	<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>
Las O-R	TACCCACAACAAAATGAGATACACCAACAACCTTC		
Las I -F	CGATTGGTGTCTTGTAGCG		
Las I -R	AACAATAGAAGGATCAAGCATCT		
Sonda Las-P	[6-FAM] AATCACCGAAGGAGAAGCCAGCATTACA <sub>[BHQ1a-Q]</sub>		

Etapas	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura °C
1	1	2 min	50
2	1	10 min	95
		30 s	95
3	20	45 s	67
		45 s	72
		30 s	95
4	35	45 s	57
		45 s	72
		45 s	72

**REFERENCIAS:**

- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19):4321-5. doi: 10.1093/nar/8.19.4321.
- Lin, H.; Chen, C.; Doddapaneni, H.; Duan, Y.; Ciberolo E. L.; Bai, X. and Zhao, X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing, *Journal of Microbiological Methods* 81:17-25. doi: 10.1016/j.mimet.2010.01.014.
- Morgan, J.K.; Zhou, L.; Li, W.; Shatters, R.G.; Keremane, M.; Duan, Y. (2012). Improved real-time PCR detection of "*Candidatus liberibacter asiaticus*" from citrus and psyllids hosts by targeting the intra genic tandem-repeat of ITS prophage genes. *Mol Cell Probes.* 26(2):90-8. doi: 10.1016/j.mcp.2011.12.001.

- Diagnóstico de HLB por PCR cuantitativo (qPCR) con sonda TaqMan; Versión 2. Laboratorio de la Sección Fitopatología-EEAOC.
- Determinación de la curva de calibración para diagnóstico de HLB. M. E. Acosta, V. Martínez y G. Fogliata. 2010.
- Protocolo para la detección de *Candidatus Liberibacter* spp. en Rutaceas y *Diaphorina citri* por PCR Convencional y PCR cuantitativa (TaqMan), armonizado entre INTA (IPAVE, Yuto, Concordia, Montecarlo y Bella Vista), INASE, EEAOC y SENASA.-Plant Protection and Quarantine New Pest Response Guidelines.
- Citrus Greening Disease. United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service. February 02, 2012.
- Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. Wenbin Li, John S. Hartung , Laurene Levy. 2006.
- CFX96™ and CFX384™ Real-Time PCR Detection System. Instruction Manual Biorad. 2010.
- EPPO PM 7/121 (1) '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Bulletin 44, 376-389, 2014.
- Procedimiento técnico: Diagnóstico de HLB por nested PCR cuantitativo (n-qPCR). Revisión 01. Laboratorio de la Sección Fitopatología-EEAOC.

### Diagnóstico de HLB por qPCR a partir de insectos

#### **Extracción de ADN desde psílidos (adaptado de Murray & Thompson, 1980)**

1. Colocar de UNO (1) a DIEZ (10) insectos en un tubo de 1.5 ml conteniendo bolitas para moler.
2. Adicionar 400 µl de buffer de extracción CTAB con 0,2% de β-mercaptoetanol.
3. Moler en el homogeneizador de tejidos utilizando el programa de DOS (2) ciclos de 20 “a 6000 rpm con pausas de 15”.
4. Incubar como mínimo TREINTA (30) minutos en baño maría a 65°C. Agitar por inversión cada QUINCE (15) minutos.
5. Centrifugar CINCO (5) minutos a 14.000 g a temperatura ambiente.
6. Recuperar 300 µl ml del sobrenadante y colocarlo en un nuevo microtubo de 1.5 ml, con igual volumen de mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar ambas fases hasta obtener una emulsión.

7. Centrifugar CINCO (5) minutos a 14000 g.
8. Recuperar 250 µl ml de la fase acuosa en un microtubo de 1,5 ml, y agregar 0,6 volúmenes de isopropanol frío (150 µl). Agitar manualmente hasta homogeneizar.
9. Dejar al menos TREINTA (30) minutos en freezer a -20°C (se puede incubar toda la noche a -20°C o 10 minutos a -80°C).
10. Centrifugar a 4°C, DIEZ (10) minutos a 14.000 g.
11. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol SETENTA POR CIENTO (70%).
12. Centrifugar DIEZ (10) minutos a 14.000 g.
13. Repetir los pasos ONCE (11) y DOCE (12).
14. Secar las muestras en flujo laminar hasta que no se vean residuos de etanol.
15. Resuspender en 30µl de agua libre de nucleasas. Si es necesario usar el ADN inmediatamente, colocar TREINTA (30) minutos a 65°C en baño seco, de lo contrario, dejar en heladera toda la noche.

#### Detección de *Ca. L. spp.* por qPCR según Li *et al.* (2006)

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
HLBas (syn.CIT295)	TCGAGCGCGTATGCAATACG	16S rDNA	<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>
HLBr (syn.CIT 298) <sup>1</sup>	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG		<i>Ca. Liberibacter spp.</i>
HLBam (syn.CIT297)	GAGCGAGTACGCAAGTACTAG		<i>Ca. Liberibacter americanus</i>
Wgf (syn. Cit418DcWG)	GCTCTCAAAGATCGGTTTGAC GG	Gen <i>wg</i>	<i>Diaphorina citri</i>
Wgr (syn. Cit419DcWG)	GCTGCCACG AACGTT ACCTTC		
Sondas	Secuencia 5' → 3'	Gen de origen	Específico para
HLBp (syn. CIT 409) <sup>2</sup>	[6-FAM]AGACGGGTGAGTAACGCG[BHQ-1a-Q]	16S rDNA	<i>Ca. Liberibacter spp.</i>
Wgp HEXCit420DcWG) (syn.	[5-HEX]TTACTGACCATCACTCTGGACGC[BHQ-1a-Q]	Gen <i>wg</i>	<i>Diaphorina citri</i>

Etapas	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura °C
1	1	20 s	95
2	40	1 s	95
		30 s	60

**REFERENCIAS:**

- Diagnóstico de HLB por PCR cuantitativo (qPCR) con sonda TaqMan; Versión 2. Laboratorio de la Sección Fitopatología.
- Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. Wenbin Li, John S. Hartung, Laurene Levy. 2006.
- Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. MG Murray and WF Thompson. Nucleic acid research, 1980 Oct 10; 8(19): 4321–4325.
- USDA, APHIS, PPQ, CPHST. 2007. Real-time PCR for Diagnostic Detection of Citrus Greening or HLB (*Huanglongbing*) from Psyllid Samples. Work Instruction Document Number WI-B-T-D-1.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Anexo**

**Número:**

**Referencia:** Anexo IV EX-2023-35593550-APN-DA#INASE

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 7 pagina/s.