



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## **Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial**

**Título del Proyecto:** Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial.

**Contrato de Prestación de Servicios Independiente Número:** 612649

**Contratista:** I.A. Walther Turizo Álvarez  
C.C. 13.565.659 De Barrancabermeja  
Investigador Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular, ICA - Seccional Cundinamarca, C.I. Tibaitatá.

**Interventor:** Ph.D Jorge Evelio Ángel Díaz  
Coordinador Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular, ICA - Seccional Cundinamarca, C.I. Tibaitatá.

**Entidad:** Instituto Colombiano Agropecuario - ICA

**Dependencia:** Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular, ICA - Seccional Cundinamarca, C.I. Tibaitatá.



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### Informe Final de Actividades - ICA

Dentro del marco del proyecto; “Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial” se planteó como objetivo principal, generar una plataforma de diagnóstico y certificación de cítricos libres de los virus; *Citrus Tristeza Virus-CTV*, *Citrus Leprosis Virus-CiLV*, *Citrus Psorosis Virus-CPsV*, y el viroide; *Citrus Exocortis Viroid-CEVd*, para lo cual se proyectó crear una red de laboratorios en el país.

En concordancia con el método científico se deben cumplir ciertas etapas previas antes de llegar a la estructuración de una red nacional para certificación fitosanitaria de cítricos. Por lo tanto el primer paso o fase para llegar a la materialización de ostentoso objetivo fue la estandarización y normalización de un grupo de técnicas que permitan el diagnóstico de las enfermedades virales de cítricos presentes en el país y sus correspondientes agentes causales.

De acuerdo a lo anterior en el transcurso del presente proyecto se cumplieron un grupo de etapas indispensables para alcanzar el objetivo general de la investigación, el cual fue; estandarizar y desarrollar un conjunto de metodologías para la detección de los agentes virales CTV, CiLV, (CPsV aún se encuentra en estudio) y el viroide CEVd, con miras a generar una sistema de diagnóstico y certificación de cítricos libres de agentes virales. Las actividades realizadas se describen a continuación:

**1. Revisión del estado del arte de las enfermedades virales en cítricos y sus respectivos agentes causales; CTV, CPsV, CiLV y del viroide CEVd.** Se consultaron bases de datos tales como; SpringerLink, ScienceDirect, PubMed, Blackwell Synergy, Annual Reviews, AGRIS - CARIS, AGORA, CAB Direct, HINARI - Health InterNetwork, APS, entre otras. Mencionada revisión bibliográfica fue necesaria para soportar académicamente el proyecto y encontrar una fuente de protocolos de diagnóstico avalados internacionalmente que permitieran el desarrollo idóneo de las metodologías de detección, mediante el ajuste y homologación de dichas técnicas. De igual forma se creó una base de información o artículos relacionados con la temática de trabajo e investigación, mediante el programa EndNote® X.



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**2. Realización de los contactos en las seccionales regionales del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, para la participación en el proyecto.** Antes de la reestructuración del instituto a finales del año 2008, Se realizaron algunos contactos en las seccionales regionales del ICA, con el fin de ubicar los puntos claves (viveros más importantes y plantaciones comerciales con expresión de sintomatología viral) para la realización de los monitoreos dentro del marco del proyecto. Las seccionales y los profesionales a cargo de dicha labor fueron:

- ICA - Seccional Córdoba; *José Antonio Madroño*.  
Teléfono: (0\_4) 894 12 66.  
E-mail: [jamadro@yahoo.com](mailto:jamadro@yahoo.com)
- ICA - Seccional Meta; *Haimer Germán Becerra Campiño*.  
Teléfono: (0\_8) 670 48 48/40.  
E-mail: [haimergerman@gmail.com](mailto:haimergerman@gmail.com) – [haimergerman@hotmail.com](mailto:haimergerman@hotmail.com)
- ICA - Seccional Santander; *Alfonso Díaz*.  
Teléfono: (0\_7) 635 27 32.  
E-mail: [alfondifo@yahoo.com](mailto:alfondifo@yahoo.com)
- ICA - Seccional Casanare; *Jorge Armando Solano*.  
Teléfono: (0\_8) 635 79 32.  
E-mail: [joarsopu@yahoo.es](mailto:joarsopu@yahoo.es)
- ICA - Seccional Cesar; *Wilman Álvarez*.  
Teléfono: (0\_5) 570 27 22 – 571 37 94 – 574 25 92.  
E-mail: [direccion.cesar@ica.gov.co](mailto:direccion.cesar@ica.gov.co)
- ICA - Seccional Tolima; *William King*.  
Teléfono: (0\_982) 643 066 – 645 447.  
E-mail: [direccion.tolima@ica.gov.co](mailto:direccion.tolima@ica.gov.co)
- ICA - Seccional Magdalena; *Alberto Páez*.  
Teléfono: (0\_95) 421 62 56.  
E-mail: [direccion.magdalena@ica.gov.co](mailto:direccion.magdalena@ica.gov.co)



## **Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial**

Los profesionales participantes de cada una de la seccionales se encontraban al tanto de la finalidad del proyecto y se encargaron de suministrar información acerca de; viveros existentes, ubicación de plantaciones con patologías de posibles enfermedades de origen viral, entre otra información que en la etapa inicial del proyecto fue muy importante para definir algunos criterios relevantes en las posteriores etapas de la investigación.

La participación y objetivo de los profesionales contactados era la ubicación de los puntos (viveros de cítricos o plantaciones) donde se manifestaran enfermedades de tipo viral, para llevar a cabo los respectivos monitoreos y de esta forma obtener controles positivos para la estandarización de las técnicas de detección de los agentes virales causales estudiados.

Debido a la ubicación del Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular-LANDFAM, ICA - Seccional Cundinamarca, C.I. Tibaitatá, se decidió seleccionar inicialmente los departamentos de Meta y Casanare. En estas zonas se determinó trabajar sobre plantaciones comerciales de cítricos para la estandarización de las metodologías, dado que no se encontró un registro claro de viveros completamente estructurados y/o disponibles para los fines del proyecto en ambos departamentos. Por lo tanto para el proceso de estandarización de las metodologías de diagnóstico se trabajó con tejidos (folíolos, ejes caulinares y frutos) provenientes de plantas sintomáticas y que hacían parte de cultivos comerciales en las zonas determinadas.

**3. Monitoreo de Cítricos en los departamentos de Meta y Casanare (Llanos Orientales de Colombia).** Se hicieron visitas en el transcurso del proyecto a cultivos comerciales para la obtención de controles positivos, tales puntos monitoreados fueron; Centro de Investigación Corpoica la Libertad-Meta (Kilómetro 21 vía Villavicencio-Puerto López), Guamal-Meta, Lejanías-Meta y fincas pertenecientes a veredas aledañas al municipio de Yopal-Casanare, con la finalidad de buscar controles positivos de los agentes virales estudiados, haciendo especial énfasis en CiLV, CPsV y CEVd.

En las figuras uno a la 11 se visualiza las patologías ocasionadas por; CPsV, CEVd, CiLV y CTV, en plantaciones cítricas de los departamentos de Meta y Casanare. Las fotografías registradas a continuación fueron tomadas en los sitios monitoreados.



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Figuras 1 y 2.** Sintomatología ocasionada por CPsV sobre tallos en Tangelo Mineola, afectando el injerto o yema a nivel basal.



**Fuente:** LANDFAM – **Origen:** Centro de Investigación Corpoica la Libertad

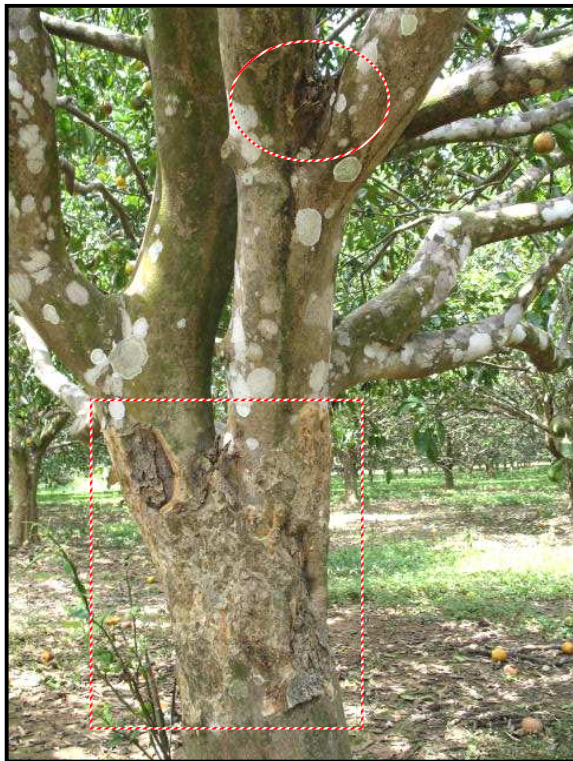


Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Figuras 3 y 4.** Sintomatología ocasionada por CPsV sobre tallos en Tangelo Mineola, afectando el injerto o yema a nivel basal, el tercio medio y la región distal o apical.



**Fuente:** LANDFAM – **Origen:** Centro de Investigación Corpoica la Libertad



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Figuras 5 y 6.** Sintomatología ocasionada por CEVd sobre tallos en Citrumelo, afectando el portainjerto o patrón.



**Fuente:** LANDFAM – **Origen:** Centro de Investigación Corpoica la Libertad

**Figuras 7 y 8.** Sintomatología ocasionada por CiLV afectando folíolos en Naranja Valencia.



**Fuente:** LANDFAM – **Origen:** Municipio-Yopal; Vereda-La Vega; Finca-La Parcela

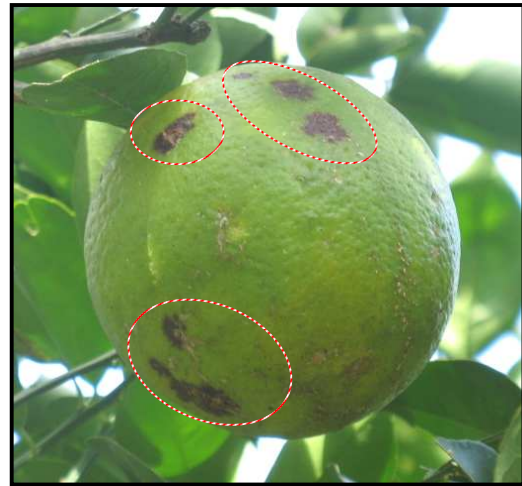


Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Figuras 9 y 10.** Sintomatología ocasionada por CiLV afectando ramas y frutos, respectivamente, en Naranja Valencia.



**Fuente:** LANDFAM—**Origen:** Municipio-Yopal; Vereda - Santa Fé de Morichal; Finca - El Diamante

**Figuras 10 y 11.** Sintomatología ocasionada por CTV afectando toda la planta (defoliación y secamiento de ramas) y clorosis en folíolos.



**Fuente:** LANDFAM – **Origen:** Centro de Investigación Corpoica la Libertad



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

En la tabla 1 se consigna la información correspondiente al monitoreo realizado en el departamento de Casanare.

**Tabla 1.** Información del Monitoreo en el departamento de Casanare.

<b>Monitoreo de CiLV en Yopal (Casanare)</b>					
<b>Datos</b>	M-1,1 • M-1,6	M-2,7 • M-2,8	M-3,1 • M-3,6	M-4	M-5,1 • M-5,15
Municipio	Yopal	Yopal	Yopal	Yopal	Yopal
Vereda	Santa Fe De Morichal	Siribaná	La Reserva	Guayaque	La Vega
Finca	El Diamante	La Talanquera	El Recuerdo	La Berija	La Parcela
Agricultor	Argemiro Silva	José Beltrán Reyes	Martín Silva	Pedro Nel Calderon	Alicia Merchán
Variedad	Naranja Valencia	Naranja Valencia	Naranja Valencia	Naranja Valencia	Naranja Valencia
Extensión	6 Ha	4 Ha	6 Ha	5 Ha	6 Ha
Edad	6 años	7 años	2 años	6 años	6 años
<b>Coordenadas</b>	<b>Georeferenciación</b>				
Norte	0.5° 13' 115"	5° 21' 57.4"	05° 26' 17.4"	05° 22' 14.1"	05°39' 049"
Oeste	72° 23' 44.4"	72° 18' 24.3"	072° 16'58.5"	072° 20'22.5"	072° 42'719"
Altitud	251M.S.N.M.	265 M.S.N.M.	247 M.S.N.M.	276 M.S.N.M.	385 M.S.N.M.

\*M: Muestra (tejido foliar, ejes caulinares y frutos).

Las anteriores fueron las muestras georeferenciadas en Yopal y veredas aledañas. Por inconvenientes logísticos, la georeferenciación de las muestras tomadas en el departamento de Meta se encuentran pendientes.



## **Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial**

### **4. Estandarización de las metodologías de detección molecular de; *Citrus Exocortis Viroid-CEVd*, *Citrus Leprosis Virus-CiLV* y *Citrus Tristeza Virus-CTV*, mediante Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa, RT-PCR).**

Para la extracción de RNA total a partir de tejidos vegetales se utilizó un único protocolo, el cual se describe a continuación:

#### **Protocolo de Extracción de RNA Total - TRIzol Reagent® (Invitrogen®)**

##### **1. Homogenización (Tejido Vegetal).**

Homogenizar (mediante vortex suave) las muestras de tejido vegetal, previamente maceradas en nitrógeno líquido, en un mililitro (1000 µL) de TRIzol Reagent®, se adicionan aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado (El volumen de la muestra no debe exceder el 10% del volumen de TRIzol Reagent® utilizado para la homogenización).

##### **2. Fase de Separación.**

Incubar las muestras homogenizadas por 15 minutos en un rango de temperatura de 15 a 30°C. Luego se adicionan 0,2 mL (200 µL) de Cloroformo por cada mL (1000 µL) de TRIzol Reagent®. El vial o tubo se agita vigorosamente con la mano durante 15 segundos. Después del anterior paso se incuba por cinco minutos de 15 a 30°C.

Al pasar dicha incubación se centrifugan las muestras a 11.700 g (gravidades) por 15 minutos a una temperatura de 4°C, después de la centrifugación, la mezcla se separa en tres fases; una fase roja de Fenol Cloroformo, una inter-fase y una fase acuosa superior translúcida o de menos color, la fase acuosa obtenida es más o menos 600 µL, sin embargo se deben tomar de esta fase acuosa aproximadamente 450 µL.

##### **3. Precipitación del RNA.**

Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo (aproximadamente 450 µL). Luego se adicionan 0,5 mL (500 µL) de Alcohol Isopropílico, por un mililitro de TRIzol Reagent®. Incubar las muestras durante 30 minutos de 15 a 30°C. Luego del paso de incubación se centrifuga a 11.700 g por 10 minutos a una temperatura de 4°C.



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### 4. **Lavado del RNA.**

Se remueve el sobrenadante resultado de la centrifugación (en la parte final-lateral del vial debe quedar un pellet transparente o blanco). Mencionado pellet se lava con un mililitro de Alcohol (etanol) al 75% (el pellet se disuelve suavemente). Centrifugar a 7.300 g durante cinco minutos a una temperatura de 4°C.

### 5. **Resuspensión del RNA.**

Al final del procedimiento se seca el pellet (temperatura ambiente, preferiblemente en cabina de flujo laminar) y se resuspende en 30 µL de agua grado molecular. Por último se adicionan 0,7 µL de RNaseOUT™ y se almacena a -20°C.

#### 4.1. **Metodología de RT-PCR para detección de Citrus Exocortis Viroid-CEVd.**

**Síntesis de DNA complementario (cDNA) por Transcripción Reversa (RT) para la detección del viroide CEVd.**

Síntesis de cDNA utilizando el GSP (Iniciador específico, descrito en la tabla 2) y la enzima; SuperScript™ III First-Strand Síntesis System for RT-PCR, Cat.No: 18080-051.

**Tabla 2.** Iniciador utilizado en la RT.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Polaridad
(CEVd-RT)	CTTCCTCCAGGTTTCCCCGGGGATCCC	Antisentido

Fuente: Olmos *et al.*

Mezclar y centrifugar cuidadosamente cada uno de los componentes usados.

1- Preparar la mezcla iniciador/RNA, dNTPs y agua pura tratada con DEPC en un tubo estéril de 0,2 – 0,5 mL. Como se describe en la tabla 3.

## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Tabla 3.** Primera mezcla de reactivos para la RT usando GSP.

Componente	Muestra	Control (-)	Control RNA (+)
RNA total	7 $\mu$ L	n $\mu$ L	-
Control RNA (50 ng)	-	-	1 $\mu$ L
10 mM dNTPS mezcla	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M GSP	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L	-
Agua tratada con DEPC	7,5 $\mu$ L	Llevar a 10 $\mu$ L	Llevar a 10 $\mu$ L

2- Incubar cada muestra a 95 °C por cinco minutos y pasar a hielo por un minuto.

3- Preparar la siguiente mezcla de reactivos para ser adicionada a cada mezcla de iniciador/RNA + un Control negativo RT (-) + un Control positivo RNA (+) y preparar la mezcla para el número de reacciones necesarias (al Control Negativo RT (-) no se le adiciona la enzima RT III), la segunda mezcla se observa en la tabla 4.

**Tabla 4.** Segunda mezcla de reactivos para la RT (GSP).

Componente	Una (Rxn) Muestra
Buffer RT (10X)	2 $\mu$ L
25 mM (MgCl <sub>2</sub> )	4 $\mu$ L
DTT (0,1 M)	2 $\mu$ L
RNAseOUT	1 $\mu$ L
SuperScript <sup>TM</sup> III	1,5 $\mu$ L

4- Adicionar 10,5  $\mu$ L a cada mezcla, RNA/Iniciador, etc. y mezclar suavemente.

6- Se incuba 55 °C durante 60 minutos.

7- Terminar la reacción a 85 °C por cinco minutos. Colocar en hielo.

8- Adicionar un microlitro de *E. Coli* RNase H (dos Units/ $\mu$ L) a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37 °C.



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### Desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para CEVd.

Para la estandarización de la PCR se emplearon los iniciadores consignados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Pareja de Oligonucleótidos específicos para la detección de CEVd.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Polaridad	Amplicón
(CEVd-F1)	GGAAACCTGGAGGAAGTCG	Sentido	371 pb
(CEVd-R1)	CCGGGGATCCCTGAAGGA	Antisentido	

Fuente: Olmos *et al.*

En la tabla 6 se muestran las concentraciones de los reactivos/enzima para la Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR de CEVd.

**Tabla 6.** Concentración de los reactivos para la PCR (CEVd).

Reactivos para la PCR	Concentración Stock	Concentración Final
cDNA	> 0,1000 µg/µL	2 µL de cDNA*
Buffer de PCR	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM
dNTPs	10 mM	0,12 mM
Oligonucleótido Delantero	10 µM	0,5 µM
Oligonucleótido Reverso	10 µM	0,5 µM
Taq-Polimerasa	5 U/µL	1 U/25 µL

\* La concentración de cDNA a utilizar es relativa, es aconsejable trabajar con una concentración mayor de > 0,1000 µg/µL de RNA total, que posea una buena relación de absorbancias 260/280 y 260/230.

En la tabla 7 se visualiza el programa de termociclado empleado para la detección de CEVd.

**Tabla 7.** Programa de Termociclado (PCR) de CEVd.

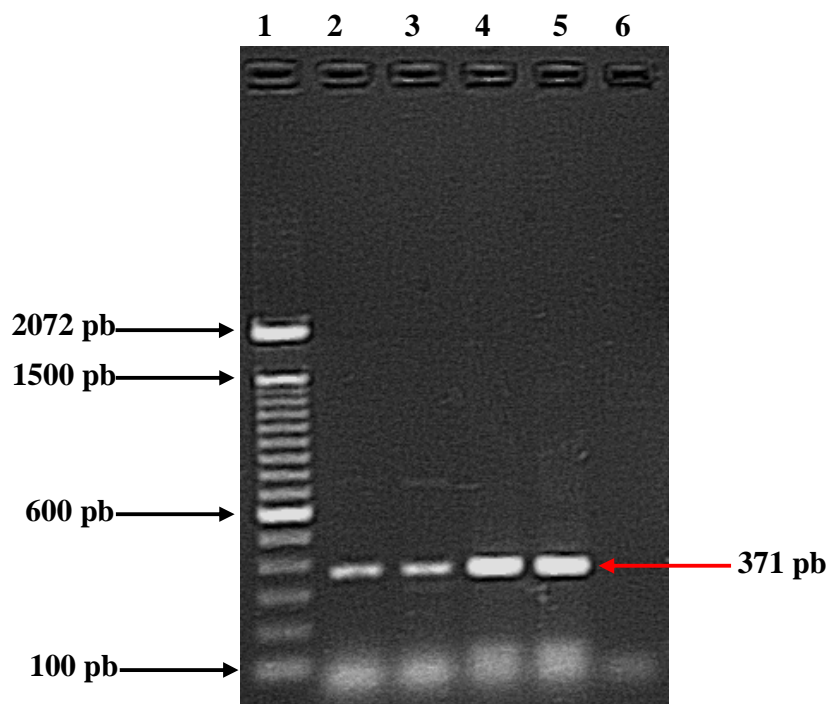
Pasos de la PCR, utilizando los Iniciadores CEVd-F1 y CEVd-R1	Temperaturas, Tiempo y Número de Ciclos
Primera Denaturación	1= 94,0 °C por cinco minutos
Segunda Denaturación	2= 94,0 °C por 30 segundos
Temperatura de Anillamiento	3= 60,0 °C por 30 segundos
Temperatura de Extensión	4= 72,0 °C por un minuto
Ir a	5= Ir del segundo al cuarto paso 35 ciclos
Temperatura de Extensión final	6= 72 °C por cinco minutos
Pre-Finalización	7= 4,0 °C Indefinido
Fin de la Reacción	8= Fin

## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### 4.1.1. Resultados para detección de CEVd.

En la figura 12 se visualiza un amplicón de 371 pb que corresponde al genoma de CEVd, las muestras (tejido foliar) fueron enviadas del eje cafetero colombiano, por el CIAT, con código de acceso interno - LANDFAM, No. 001 y No. 002.

**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa para la visualización del amplicón de CEVd (genoma completo).



**Carril 1-** Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®); **Carril 2-** Muestra No. 001; **Carril 3-** Duplicado; **Carril 4-** Muestra No. 002; **Carril 5-** Duplicado; **Carril 6-** Blanco de la reacción. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1,7%, a 80 V, 70 mA, 1:05:00 minutos (1 Hora y cinco minutos), en buffer TAE 1X y teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL adicionado al gel.



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

De las anteriores muestras de CEVd visualizadas en la figura 12, se envió secuenciar la muestra con código de acceso interno; LANDFAM - No. 002. Dicho amplicón fue enviado a La Universidad de OIWA – The University of Iowa, por medio del Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT.

Los resultados de la secuenciación se evidencian a continuación:

### Secuencia de nucleótidos de CEVd (353 nt), LANDFAM - No. 002.

```
AGGTCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTTCGCCGCGGNTCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA
GCTCGACTCCTTCCTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCCCCCTC
GCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACTGAAGCTTCAACCCCAAACCGCTTT
TCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCTC
GGGATCTTTCTTGAGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAAAGAGG
CGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGA
```

En la figura 13 se observa un alineamiento, en el cual se analiza la similitud (identidad) de la muestra CEVd LANDFAM - No. 002, en relación a todas las secuencias reportadas en el GenBank – NCBI, para CEVd, utilizando la herramienta; *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN).

Figura 13. Nucleotide Blast.

Sequences producing significant alignments: (Click headers to sort columns)							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">DQ431991.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-ZK Guangdong-YC, complete genome	616	616	99%	3e-173	98%	
<a href="#">DQ431995.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-YZ Guangdong-YC, complete genome	608	608	99%	5e-171	97%	
<a href="#">DQ431993.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-XY Guangdong-YC, complete genome	608	608	99%	5e-171	97%	
<a href="#">DQ431996.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-ZGS-ZK China, complete genome	603	603	99%	2e-169	97%	
<a href="#">EU382204.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Severe clone 3, complete genome	595	595	99%	4e-167	97%	
<a href="#">EU382203.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Severe clone 2, complete genome	595	595	99%	4e-167	97%	
<a href="#">EU382202.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Severe clone 1, complete genome	595	595	99%	4e-167	97%	
<a href="#">DQ431992.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-HJ Guangdong-YC, complete genome	586	586	99%	3e-164	96%	
<a href="#">DQ431994.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-Italy-BL China, complete genome	569	569	99%	3e-159	95%	
<a href="#">AY372393.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate 89002600, complete genome	534	534	99%	9e-149	93%	
<a href="#">GQ246194.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate S2, complete genome	468	643	99%	9e-129	99%	
<a href="#">EU564171.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate TL3, complete genome	468	648	99%	9e-129	100%	
<a href="#">EU564170.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate TL2, complete genome	468	643	99%	9e-129	99%	
<a href="#">AB054595.1</a>	Citrus exocortis viroid variant E127 genomic RNA, complete sequence	468	648	99%	9e-129	100%	
<a href="#">GQ260197.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate A13, complete genome	462	643	99%	4e-127	100%	
<a href="#">FJ904295.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Ci-8, complete genome	462	633	99%	4e-127	99%	
<a href="#">FJ904293.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Ci-2, complete genome	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">FJ904292.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate Ci-1, complete genome	462	643	99%	4e-127	100%	
<a href="#">FJ773254.1</a>	Citrus exocortis viroid clone A2-C-2, complete genome	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">EU564185.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate soWn3, complete genome	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">EF488066.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-3, complete genome	462	628	99%	4e-127	99%	
<a href="#">EF488064.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-5, complete genome	462	643	99%	4e-127	100%	
<a href="#">EF488062.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-7, complete genome	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">EF488061.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-8, complete genome	462	643	99%	4e-127	100%	
<a href="#">EF488057.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-12, complete genome	462	631	99%	4e-127	99%	
<a href="#">AY517496.1</a>	Citrus exocortis viroid isolate 9669-FI-1, complete genome	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">AJ564802.1</a>	Citrus exocortis viroid complete genome, isolate E117, haplotype V8	462	637	99%	4e-127	99%	
<a href="#">AJ564799.1</a>	Citrus exocortis viroid complete genome, isolate E117, haplotype V5	462	637	99%	4e-127	99%	



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

Un ejemplo más detallado de la similitud de la muestra o amplicón secuenciado (CEVd LANDFAM - No. 002), en relación a lo que se encuentra reportado o indexado en el GenBank-NCBI, se evidencia en la figura 14.

**Figura 14.** Una de más de 100 secuencias reportadas, la cual produjo alineamiento significativo con la muestra; CEVd LANDFAM - No. 002.

**Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-ZK Guangdong-YC, complete genome**

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS DQ431991 371 bp RNA circular VRL 27-MAR-2006  
 DEFINITION Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-ZK Guangdong-YC, complete genome.  
 ACCESSION DQ431991  
 VERSION DQ431991.1 GI:90200422  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Citrus exocortis viroid  
 ORGANISM [Citrus exocortis viroid](#)  
 Viroids; Pospiviroidae; Pospiviroid.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 371)  
 AUTHORS Ding,F., Wang,G. and Yi,G.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (05-MAR-2006) Plant Science and Technology Academy, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

FEATURES  
 Location/Qualifiers  
 source 1..371  
 /organism="Citrus exocortis viroid"  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="CEVd-XNM-ZK Guangdong-YC"  
 /db\_xref="taxon:12890"

ORIGIN  
 1 ggaaacctgg aggaagtcga ggtcgggggg gaacagctgc ttcggtcgcc gggatcact  
 61 ggcgtccagg ggagaacag gagctcgtct ccttcctttc gctgtggct ccacatccga  
 121 tegtctgta agcgccacgc ccctcgcgcc ggagttctc tctggctact acccggtgga  
 181 tacaactgaa gtttcaaccc caaacggctt ttcttgaatc ttcaactgctc tccgggctgag  
 241 ggtgaaggcc ctggaaaccc tagattgggt ccctcgggat ctttcttgag gttcctgtgg  
 301 tgctcactg accctgcagg caggaaga aaaaaggagc ggcggggaag aagtccttca  
 361 gggatcccca a

---

```

>gb|DQ431991.1| Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-ZK Guangdong-YC, complete genome
Length=371
Score = 616 bits (333), Expect = 3e-173
Identities = 345/351 (98%), Gaps = 2/351 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 AGGTCgggggggTACAGCTGCTTCGGTCCGCCGGGNTCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACA 60
Sbjct 20 AGGTCGGGGGGGAACAGCTGCTTCGGTCCGCCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACA 79
Query 61 GGAGCTCGACTCCTTCTTCTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCCGCTGAAAGCGCCACG 120
Sbjct 80 GGAGCTCGTCTCTTCTTCTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCCGCTGAAAGCGCCACG 139
Query 121 CCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACC 180
Sbjct 140 CCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACC 199
Query 181 CCAAACCGCTTTTCTT-ATATCTTCACTGCTCTCCGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC 239
Sbjct 200 CCAAACCGCTTTTCTTGA-ATCTTCACTGCTCTCCGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC 258
Query 240 CCTAGATTGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAAGTTCTCTGGTGTCTCACCTGACCCCTGCA 299
Sbjct 259 CCTAGATTGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAAGTTCTCTGGTGTCTCACCTGACCCCTGCA 318
Query 300 GGCAGGAAAAGAAAAAGAGGGCGCGGGGAAGAAGTCTTTCAGGGATCCCC 350
Sbjct 319 GGCAGGAAAAGAAAAAGAGGGCGCGGGGAAGAAGTCTTTCAGGGATCCCC 369
    
```

Fuente: GenBank: DQ431991.1



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### 4.2. Metodología de RT-PCR para detección de Citrus Leprosis Virus-CiLV.

**Síntesis de DNA complementario (cDNA) por Transcripción Reversa (RT) para la detección de CiLV.**

En la tabla 8 se ilustra la primera mezcla de reactivos para la fase inicial de la transcripción reversa de CiLV.

**Tabla 8.** Primera Mezcla RT.

Reactivo	Volumen
RNA Total	7 µL
Random Hexamers	3 µL
dNTP's	1,5 µL
H <sub>2</sub> O	7,5 µL

Se transfiere al termociclador a un programa de 95°C durante cinco minutos. Luego de este ciclo se pasa inmediatamente a hielo como mínimo un minuto y se le adicionan 10,5 µL a cada tubo de la mezcla descrita en la tabla 9.

**Tabla 9.** Segunda Mezcla RT.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen por Reacción
Buffer RT	10X	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 µL
DTT	0,1 M	2 µL
RNaseOUT™	40 U/µL	1 µL
SuperScript III RT™	200 U/µL	1,7 µL

Posteriormente se lleva al termociclador y se corre en el programa consignado en la tabla 10.

**Tabla 10.** Programa de Termociclado (Síntesis de cDNA).

Temperatura	Tiempo
25°C	10 minutos
50°C	90 minutos
85°C	cinco minutos*

\* Fin de la reacción (síntesis de cDNA)



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

Al finalizar el programa de termociclado descrito en la tabla 10, se adiciona un microlitro de RNase H (dos U/ $\mu$ L) y se transfiere al termociclador a un programa de 37 °C durante 20 minutos.

### Desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para CiLV.

En la tabla 11 se describen las concentraciones de reactivos para detección de CiLV mediante PCR.

**Tabla 11.** Condiciones de PCR – CiLV (25  $\mu$ L Volumen Final)

Reactivos	[ ] Inicial	[ ] Final	Volumen x Reacción
cDNA	---	---	2 $\mu$ L -3 $\mu$ L
Buffer PCR	10X	1X	2,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,4 mM – 3 mM	1,2 $\mu$ L – 1,5 $\mu$ L
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,5 $\mu$ L
MP-F	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M – 0,4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L – 1 $\mu$ L
MP-R	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M – 0,4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L – 1 $\mu$ L
Taq-DNA Poly	5 U/ $\mu$ L	1,75 U – 2,5 U	0,35 $\mu$ L – 0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	---	---	17,45 $\mu$ L - 15 $\mu$ L

En la tabla 12 se encuentran consignadas las secuencias de los iniciadores específicos empleados en la amplificación de un fragmento que codifica para la proteína de movimiento de CiLV.

**Tabla 12.** Iniciadores Específicos (MP) para el Virus de la Leprosis de los Cítricos (CiLV).

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Polaridad
MP-F	GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC	Sentido
MP-R	TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT	Antisentido

Fuente: Locali, E. *et al.*, 2003



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

En la tabla 13 se observa el programa de termociclado (PCR) empleado para detección de CiLV.

**Tabla 13.** Condiciones de Termociclado – CiLV

Pasos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	cinco minutos
2	94°C	30 segundos
3	56°C	30 segundos
4	72°C	un minuto
5	Ir del segundo al cuarto paso 32 Tiempos	---
6	72°C	cinco minutos

### 4.2.1. Resultados para detección de CiLV.

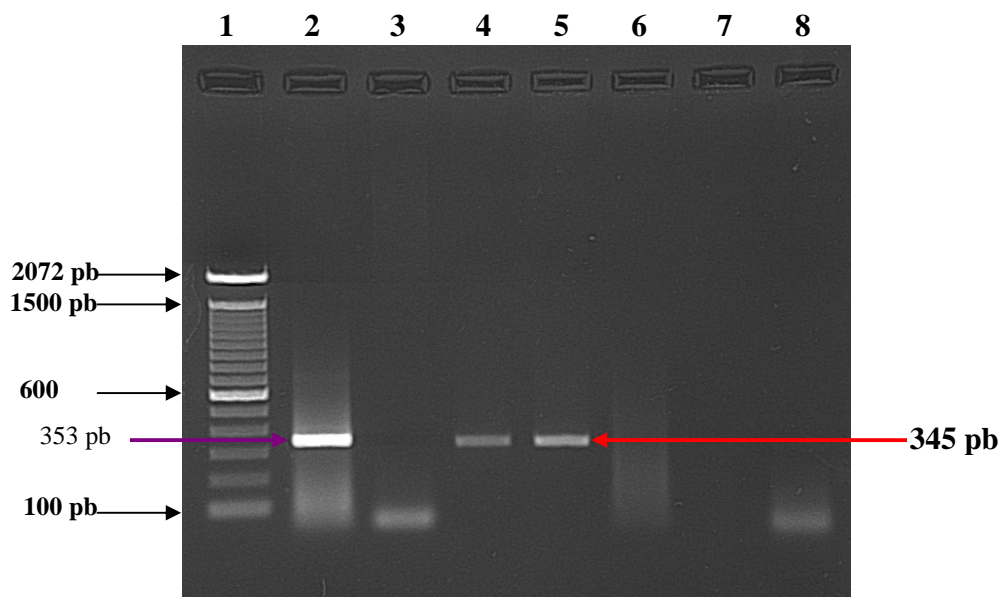
Se produjo un amplicón de 345 pb que corresponde una región que codifica para la proteína de movimiento de CiLV, las muestras utilizadas en el presente ensayo fueron recolectadas en el departamento de Casanare, con códigos de acceso interno - LANDFAM, Casanare No. 002 y Casanare No. 006.

Se utilizaron los controles (negativo y positivo) proporcionados por el Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Cat. No. 18080-051, del laboratorio o casa comercial Invitrogen®, siguiendo el protocolo de dicha empresa. El control positivo del kit arrojó un peso de 353 pb, amplicón similar al producido para CiLV.

En la figura 15 se observa la foto que evidencia la detección de CiLV con sus respectivos controles.

## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa para visualización de un fragmento amplificado de CiLV.



**Carril 1-** Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®); **Carril 2-** Control positivo del Kit (RT III) 353 pb; **Carril 3-** Control negativo del Kit (RT III); **Carril 4-** Muestra Casanare No. 002; **Carril 5-** Muestra Casanare No. 006; **Carril 6-** Control negativo para CiLV-Cítrico; **Carril 7-** Sin muestra; **Carril 8-** Blanco de la reacción. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al; 1,5% a 120 V, 90 mA, 30 minutos, en buffer TAE 1X y teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL adicionado al gel.

La metodología de detección de CiLV-C y por ende el diagnóstico de la enfermedad de la Leprosis de los Cítricos Tipo Citoplasmático en Colombia (realizada por el Instituto Colombiano Agropecuario-ICA), aún se encuentra en fase de prueba, dado que es necesario e indispensable corroborar vía secuenciación y desarrollar todos los respectivos ensayos de reproducibilidad, especificidad, sensibilidad, entre otros, con la pareja de iniciadores reportados para amplificar un fragmento de la región que codifica para la proteína de movimiento de CiLV-C (Locali *et al.*, 2003), siendo estos oligonucleótidos la herramienta más utilizada a nivel internacional por los grupos de investigación para llegar a la detección del agente causal de la enfermedad en cuestión.



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

### 4.3. Metodología de RT-PCR para detección de Citrus Tristeza Virus-CTV.

#### Síntesis de DNA complementario (cDNA) por Transcripción Reversa (RT).

Se realizó la Transcripción Reversa, utilizando el estuche comercial SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Cat No. 11904-018, de la casa comercial Invitrogen®, donde se siguen las recomendaciones de la casa comercial.

La reacción RT depende de la ruta que se vaya a elegir, es decir, si se van a emplear Random Hexamers, Oligo (dT), el GSP (iniciador específico) o dependiendo de la enzima RT que se vaya a utilizar, dado que las condiciones de termociclado y procedimientos varían.

Según el protocolo del estuche comercial, SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Cat No. 11904-018, de la casa comercial Invitrogen, la reacción se realiza de la siguiente forma:

Síntesis de cDNA usando Oligo (dT) o GSP:

- 1- Mezclar y centrifugar cuidadosamente cada uno de los componentes usados.
- 2- Preparar la mezcla Iniciador/RNA en un tubo estéril de 0,2 – 0,5 mL. Como se describe en la tabla 14.

**Tabla 14.** Primera mezcla de reactivos para la RT usando Oligo (dT) o GSP.

Componente	Muestra	Control (-)	Control RNA (+)
Hasta 5 µg RNA total	n µL	n µL	-
Control RNA (50 ng)	-	-	1 µL
10 mM dNTPS mezcla	1 µL	1 µL	1 µL
Oligo dT (0.5 µg/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
O			
2 µM GSP	1 µL	1 µL	-
Agua tratada con DEPC	Llevar a 10 µL		

Fuente: Invitrogen. 2005

- 3- Incubar cada muestra a 65 °C por cinco minutos, pasar a hielo por un minuto.



Grupo Laboratorio Nacional de  
Diagnóstico Fitosanitario y Análisis  
Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

4- Preparar la siguiente mezcla de reactivos para ser adicionada a cada mezcla de Iniciador/RNA + un Control Negativo RT (-) + un Control Positivo RNA (+) y preparar la mezcla para el número de reacciones necesarias como se observa en la tabla 15.

**Tabla 15.** Segunda mezcla de reactivos para la RT usando Oligo (dT) o GSP.

Componente	Una Muestra
Buffer RT (10X)	2 $\mu$ L
25 mM (MgCl <sub>2</sub> )	4 $\mu$ L
DTT (0,1 M)	2 $\mu$ L
RNAsaOUT	1 $\mu$ L

Fuente: Invitrogen. 2005

5- Adicionar nueve microlitros a cada mezcla, RNA/Iniciador, etc. y mezclar suavemente.

6- Incubar a 42 °C durante dos minutos.

7- Adicionar un microlitro de SuperScript II RT (50 Units/ $\mu$ L) a cada tubo, excepto a el Control Negativo RT (-), mezclar e incubar a 42 ° C por 50 minutos.

8- Terminar la reacción a 70 °C por 15 minutos. Colocar en hielo.

9- Adicionar un microlitro de *E. Coli* RNase H (dos Units/ $\mu$ L) a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37 °C.

Síntesis de cDNA usando Random Hexamers:

1- Mezclar y centrifugar cuidadosamente cada uno de los componentes.

2- Preparar la mezcla Iniciador/RNA en un tubo estéril (libre de ribonucleasas) de 0,2-0,5 mL, como se describe en la tabla 16.

**Tabla 16.** Primera mezcla de reactivos para la RT usando Random Hexamers.

Componente	Muestra	Control (-)	Control RNA (+)
Hasta 5 $\mu$ g RNA total	n $\mu$ L	n $\mu$ L	-
Control RNA (50 ng)	-	-	1 $\mu$ L
10 mM dNTPS mezcla	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Random Hexamers (50ng)	1 $\mu$ L - 5 $\mu$ L	1 $\mu$ L - 5 $\mu$ L	1 $\mu$ L - 5 $\mu$ L
Agua tratada con DEPC	Llevar a 10 $\mu$ L		

Fuente: Invitrogen. 2005



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

- 3- Incubar cada muestra a 65 °C durante cinco minutos pasar a hielo por un minuto.
- 4- Preparar la siguiente mezcla de reactivos para ser adicionada a cada mezcla de Iniciador/RNA + un Control Negativo RT (-) + un Control Positivo RNA (+) y preparar la mezcla para el número de reacciones necesarias de la misma manera que se indicó en la tabla 15.
- 5- Adicionar nueve microlitros a cada mezcla RNA/Iniciador, etc. y mezclar suavemente.
- 6- Incubar a 25 °C durante dos minutos.
- 7- Adicionar un microlitro de SuperScript II RT (50 Units/μL) a cada tubo excepto al Control Negativo RT (-), mezclar e incubar a 25 °C por 10 minutos.
- 8- Transferir los tubos a 42 °C e incubar por 50 minutos.
- 9- Terminar la reacción a 70 °C por 15 minutos, al finalizar se coloca en hielo.
- 10- Adicionar un microlitro de *E. Coli* RNase H (dos Units/μL) a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37° C.

Se estandarizaron las concentraciones de los reactivos y condiciones para la RT de acuerdo a las recomendaciones establecidas por la casa comercial, haciendo algunas modificaciones. Los ciclos de temperatura y tiempo de termociclado para la reacción fueron realizados en un termociclador PTC-200 MJ Research.

### Desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para CTV.

Para la estandarización de la PCR se emplearon los iniciadores consignados en la tabla 17.

**Tabla 17.** Pareja de Oligonucleótidos específicos para la detección de CTV.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Polaridad
AFu	GGCGGAATTCGACGACGAAACAAAGAAA	Sentido
AFd	GAAGATCTTCAACGTGTGTTGAATTTCC	Antisentido

Fuente: Brlansky *et al.* 1997



Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular



## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

En la tabla 18 se muestran las concentraciones de los reactivos/enzima para la Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR de CTV.

**Tabla 18.** Concentración de los reactivos para la PCR (CTV).

Reactivos para la PCR	Concentración Stock	Concentración Final
cDNA	> 0,1000 µg/µL	2 µL de cDNA*
Buffer de PCR	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM
dNTPs	10 mM	0,12 mM
Oligonucleótido Delantero	10 µM	0,25 µM
Oligonucleótido Reverso	10 µM	0,25 µM
Taq-Polimerasa	5 U/µL	1-2 U/25 µL

\* La concentración de cDNA a utilizar es relativa, es aconsejable trabajar con una concentración mayor de > 0,1000 µg/µL de RNA total, que posea una buena relación de absorbancias 260/280 y 260/230.

En la tabla 19 se visualiza el programa de termociclado (PCR) empleado para detección de CTV.

**Tabla 19.** Programa de Termociclado de CTV.

Pasos de la PCR, utilizando los Iniciadores AFu y AFd	Temperaturas, Tiempo y Número de Ciclos
Primera Denaturación	1= 94,0 °C por tres minutos
Segunda Denaturación	2= 94,0 °C por cinco segundos
Temperatura de Anillamiento	3= 50,0 °C por 10 segundos
Temperatura de Extensión	4= 72,0 °C por 10 segundos
Ir a	5= Ir del segundo al cuarto paso 35 ciclos
Temperatura de Extensión final	6= 72 °C por dos minutos
Pre-Finalización	7= 4,0 °C Indefinido
Fin de la Reacción	8= Fin

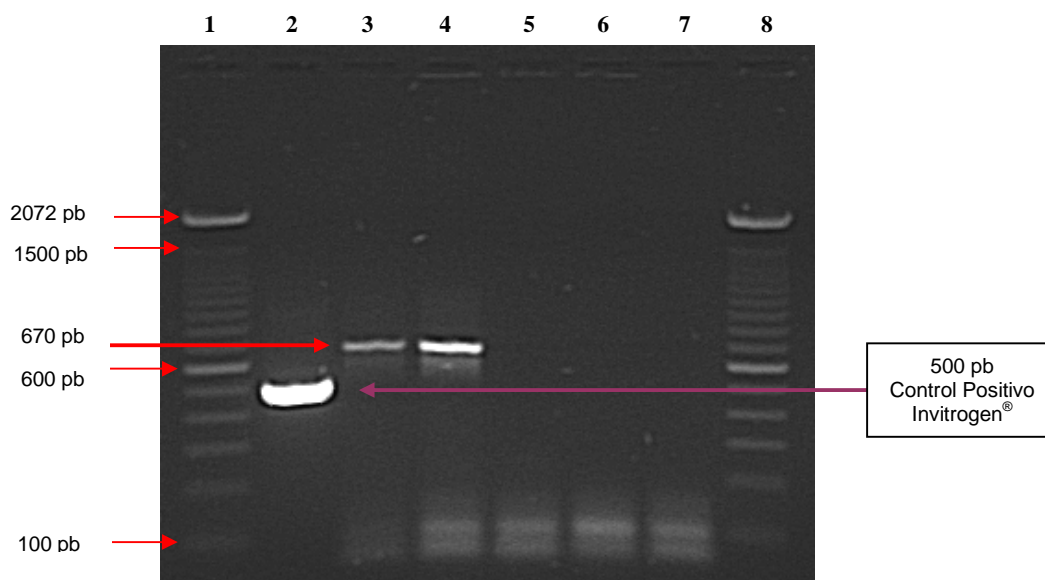
### 4.3.1. Resultados para la detección de CTV.

Se realizó la detección de CTV por medio de RT-PCR, con el fin de obtener los controles positivos y corroborar que los métodos de detección se estén utilizando de la mejor forma para la idónea detección del virus.

## Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial

Para dicho diagnóstico se están utilizando los iniciadores descritos en la tabla 17, que generan un amplicón de 670 pb. Los resultados de la RT-PCR se aprecian en la figura 16.

**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa para la visualización de una amplificación (fragmento de la cubierta proteica) de CTV.



**Carril 1-**Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®); **Carril 2-**Control Positivo Kit Invitrogen®; **Carril 3-**Planta Positiva para CTV (ICA, Seccional Cundinamarca); **Carril 4-**Muestra analizada para CTV (Santander); **Carril 5 y 6-** Materiales de papa (Negativos-Controles externos); **Carril 7-** Control negativo del kit; **Carril 8-** Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1,5%, a 80 V, 70 mA, 1:00:00 minutos (una hora), en buffer TAE 1X y teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL adicionado al gel.