

DIRECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

Coordinación de Biología Molecular

**Estandarización de la técnica de qPCR para la identificación del
gusano de la mazorca *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808**

Elaboró

Laboratorio de Biología Molecular

Tecámac, Estado de México diciembre 2022

Antecedentes

El gusano de la mazorca *Helicoverpa armigera*, es una de las plagas agrícolas más importantes del mundo. El diagnóstico morfológico de esta especie es difícil a partir de especies similares como *H. assulta*, *H. punctigera* y *H. zea*, ya que los adultos se identifican en función de la morfología de los genitales, la identificación de las larvas es limitada debido a los caracteres morfológicos compartidos.

Se propone una técnica molecular basada en la amplificación del DNA para la detección de larvas, adultos y ejemplares incompletos. Este reporte de estandarización surge de la necesidad de usar de manera racional y óptima los reactivos para la técnica qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés), así como contar con un método de identificación robusto y confiable. Se procedió a realizar la estandarización del método en el laboratorio de Biología Molecular del CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria).

Durante el periodo de abril a junio de 2022, se realizaron ensayos previos con los iniciadores específicos propuestos por Guilligan *et al.* (2015), sin embargo, no mostraron especificidad en la detección de *Helicoverpa armigera*, por lo que se descartó esta propuesta como parte del protocolo de detección (Informe: Evaluación de iniciadores para detección por qPCR propuestos por Guilligan *et al.*, 2022).

Con este antecedente, se reafirma que es importante contar con un protocolo estandarizado que nos de fiabilidad en los resultados emitidos, ya que diversas fuentes pueden proponer buenas propuestas, pero es hasta que se realicen los ensayos correspondientes donde se decide si se pueden usar o no esas recomendaciones.

Resumen

En el 2022, Thomas *et al.* propusieron una metodología para la detección de *H. armigera* mediante qPCR, en ella usan la región ITS2 para realizar una detección específica, en el mismo trabajo se menciona la amplificación del gen endógeno usando iniciadores diseñados en la región 18S por Barr *et al.* (2011), estos juegos de iniciadores fueron la base para la estandarización de este protocolo de detección.

Thomas *et al.* (2022) proponen la utilización de 6 iniciadores diferentes en combinación con 2 sondas para la detección por qPCR de *H. armigera*, para lo cual primeramente se evaluaron en laboratorio estas combinaciones para determinar la especificidad de cada una de ellas (Anexo 10A y Anexo 10B). Se determinó el usar la combinación de iniciadores ARMF1/ARMP2/568R para la detección específica junto con los iniciadores 18SF2/18SP2/18SR2 para la amplificación de un gen endógeno, lo cual da fiabilidad en la detección del gusano de la mazorca.

En las diferentes etapas del proceso de estandarización, se usó DNA genómico de 1 ejemplar proporcionado por el laboratorio de Entomología agrícola del CNRF, el cual fue donado por la Dra. Julieta Brambila (USDA-APHIS-PPQ) en el 2016 y provenía de Marruecos.

El DNA utilizado fue confirmado por secuenciación en el laboratorio de Biología Molecular usando los iniciadores del citocromo oxidasa subunidad I (COI) del DNA mitocondrial.

Respecto a la estandarización se analizaron concentraciones diferentes de cada componente de la PCR, gradiente de temperatura de anillamiento, intervalo de trabajo, límite de detección, efecto matriz, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad.

Se obtuvieron las concentraciones óptimas y el programa de termociclaje adecuado, para el uso de iniciadores/sondas del gen específico y endógeno para la identificación molecular del gusano de la mazorca.

Los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad muestran que el protocolo cumple estos requisitos para ser transferido a los diferentes laboratorios aprobados.

Los parámetros de la estandarización aquí reportados serán incluidos en el documento: Protocolo de Diagnóstico: *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 (Gusano de la mazorca) en su versión 1.0.

1. Objetivo

Determinar las concentraciones de reactivos óptimos, programa de termociclaje, intervalo de trabajo, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad para la detección de *H. armigera*.

2. Muestras biológicas

Las muestras utilizadas fueron previamente determinadas por PCR punto final y secuenciadas mediante la amplificación de una región del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI). (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Muestras utilizadas en la estandarización de *H. armigera*

Nombre	Clave	Estado	[DNA] ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}	Método de extracción	Observaciones
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIARD	Adulto	8.7	1.79	2.61	CTAB	Estandarización de reactivos, gradiente de temperatura, intervalo de trabajo, control positivo
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIARB	Adulto	9.2	2.03	1.24	CTAB	Estandarización de reactivos, gradiente de temperatura, intervalo de trabajo, control positivo
18S	TABI8S-1	-	118.2	1.97	2.29	Kit Qiagen	Repetibilidad y efecto matriz
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELICLON1	-	10.3	1.56	0.79	Kit Qiagen	Repetibilidad y efecto matriz
<i>Helicoverpa sp</i>	HELISP-6	Larva	77.3	1.61	1.98	Reagent	Repetibilidad y efecto matriz
<i>Helicoverpa sp</i>	HELISP-7	Larva	591.3	1.70	2.17	Reagent	Repetibilidad y efecto matriz
<i>Sinose capsana</i>	SCAP1	Adulto	19.5	1.93	2.08	Kit E.Z.N.A	Especificidad
<i>Sinose capsana</i>	SCAP2	Adulto	7.4	1.80	1.44	Kit E.Z.N.A	Especificidad
<i>Helicoverpa zea</i>	HELIZE4	Larva	1079.8	1.68	2.52	CTAB	Especificidad
<i>Helicoverpa zea</i>	HELIZE3	Larva	1045.4	1.67	2.51	CTAB	Especificidad
<i>Helicoverpa zea</i>	HELIZE-A	Adulto	23.5	1.86	2.15	CTAB	Especificidad

3. Equipo y reactivos

3.1 Equipos y materiales

- Micropipetas de diferentes volúmenes calibradas
- Puntas estériles para micropipetas
- Vórtex
- Microtubos estériles de 1.5 mL, 2.0 mL y 0.2 mL
- Microcentrífuga con rotor para microtubos de 1.5 mL, 2.0 mL y 0.2 mL
- Termociclador CFX96™

3.2 Reactivos

- Taq Platinum Invitrogen
- dNTP Invitrogen
- Reactivos (*Buffer*, MgCl₂, *primers*, etc.)
- Agua grado biología molecular

4. Metodología

4.1 Puntos importantes antes de comenzar

• Buenas prácticas al momento de realizar el mix de qPCR

- Se esterilizó la campana de flujo laminar con UV durante 20 minutos, posteriormente, se limpió con etanol al 70 % pasando un papel absorbente en una sola dirección.
- Se descongelaron los reactivos en hielo por 20 min antes de comenzar.
- Se mezclaron en un vórtex el MgCl₂, el *buffer* 10X, los iniciadores y la sonda durante 5 s.
- Se mezclaron en un vórtex los dNTP durante 3 s.
- Se dio un paso de centrifuga a todos los reactivos por 3 s.
- Se realizaron los mixes manteniendo los reactivos en un cooler (0-4 °C).

4.2 Preparación de iniciadores

Los iniciadores utilizados en la estandarización corresponden a los citados por Thomas et al. (2022) en el cual se describe la detección de *H. armigera* por qPCR los cuales se señalan en el **Cuadro 2**.

Para preparar los iniciadores se agregó agua grado biología molecular para preparar los *stocks* a 100 µM, posteriormente se prepararon alícuotas a 5µM.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación específica de *H. armigera* y de su gen endógeno

Nombre	Gen	Secuencia (5' - 3')	Tm	pb	Autor
ARM-F1	ITS2	TCTTGTGTCGTCCTTAGC	57.5		Thomas et
568R	ITS2	CGTCGATGCGCTCTTCGG	65.3	108	al., 2022
ARM-P2	ITS2	FAM/CAACGACCAATCAGTAGGCGGACTC/3BHQ1	60.8		
RT-18S-F2	18S	ACCGCCCTAGTTCTAACCCTAAA	62.9		Barret et
RT-18S-R2	18S	CCGCCGAGCCATTGTAGTAA	60.5	68	al., 2011
RT-18S-P2	18S	Cy5-TGTCATCTA/TAO/GCGATCCGCCGA-3IAbrQSp-2	63.2		

4.3 Programa de amplificación inicial

El programa de amplificación se llevó acabo en un termociclador modelo CFX96™.

Cuadro 3. Programa de termociclaje

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	15 s	
Anillamiento (Lectura)	60	60 s	35
Conservación	12	∞	

4.4 Electroforesis capilar-QIAxcel Advanced System

Se contempló realizar electroforesis para clonar los fragmentos obtenidos para lo cual cada muestra se analizó después de la reacción de qPCR utilizando el *kit QIAxcel DNA High Resolution*, el método de ejecución usado fue el OM500-10s, con un tiempo de inyección de 12 s. Se utilizaron marcadores de alineación QX de 15 pb a 3 kb y marcador de tamaño QX de 100 pb a 2,5 kb (30 ng/μL, diluidos en el *buffer* de dilución incluido en el *kit*). Los productos de PCR fueron visualizados con el software QIAxcel ScreenGel 1.6.0.10. Para considerar una muestra positiva, se tomó en cuenta la presencia de la banda en un tamaño aproximado de 108 pb y 68 pb respectivamente.

4.5 Estandarización de componentes de qPCR

a) Mix unifactorial

Se utilizaron las siguientes propuestas de concentraciones para preparar los mixes, tomando como referencia los trabajos de Debode *et al.*, 2017, Thomas *et al.*, 2022, Heininger *et al.*, 2003, Kranzfelder *et al.*, 2016 y los presentados por Moreau en 2014 donde reportan las cantidades necesarias para la amplificación de ácidos nucleicos por la técnica de qPCR (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Recomendaciones de reactivos (L1, L2 y L3) para la amplificación de organismos por qPCR

Componente	Conc. Stock	Unidades	No. Lote	Marca	L1 (base)	L2 (menor)	L3 (mayor)
Buffer	10	X	2467140	Invitrogen	2	2	2
MgCl ₂	50	mM	2467140	Invitrogen	2.4	2	2.8
dNTP	10	mM	2428639	Invitrogen	0.6	0.4	0.8
Primer F-específico	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
Primer R-específico	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
Primer F-endógeno	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
Primer R-endógeno	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
Sonda-específico	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
Sonda-endógeno	5	μM	-	IDT	1	0.5	1.5
DNA	-	ng/μL	-	-	2	2	2
Taq Platinum	5	U/μL	2467140	Invitrogen	0.25	0.25	0.25
H ₂ O	-	-	2177624	Sigma	6.75	10.35	3.15
Volumen final	-	-	-	-	20	20	20

Procedimiento de estandarización de reactivos

- Con el mix unifactorial, descrito anteriormente, se comenzó con la estandarización del MgCl₂, se analizaron los gráficos obtenidos en la reacción de qPCR, se eligió la cantidad óptima del MgCl₂ para ser utilizada con el siguiente reactivo.
- Se procedió a realizar la estandarización de dNTP, se verificaron los gráficos obtenidos. Se eligió la cantidad óptima de dNTP a ser utilizada con el siguiente reactivo.
- Se procedió a realizar la estandarización de los iniciadores y sondas, se verificaron los gráficos obtenidos. Se eligió la cantidad óptima.

b) Gradiente de temperatura

Se evaluaron las temperaturas en un intervalo 10 °C, el cual abarcó de 56 °C a 66 °C, en un intervalo de 2 °C. En el termociclador se eligieron (**56.0 °C, 58.0 °C, 60.0 °C, 62.4 °C, 64.3 °C y 66 °C**).

c) Intervalo de trabajo y Límite de detección

Se utilizaron 2 viales de DNA genómico positivos a *H. armigera*, 2 viales de DNA plasmídico del gen específico y 1 vial de DNA plasmídico del gen endógeno, posteriormente se realizaron diluciones seriadas para determinar los intervalos de trabajo.

d) Repetibilidad

Se utilizaron 2 viales de DNA de *H. armigera* extraídos de ejemplares en estado adulto y 2 viales de DNA extraídos de ejemplares en estado larval, se incluyeron viales de DNA plasmídico del gen endógeno y específico clonados en el vector pGEM®-T (**Cuadro 1**).

e) Especificidad

Se utilizaron controles negativos distintos a *H. armigera*, estos se confirmaron previamente por morfología (Laboratorio de Entomología, CNRF) y secuenciación (Biología Molecular, CNRF).

Ejemplares usados

- *Sinoe capsana* (Gelechiidae)
- *Helicoverpa zea* (Noctuidae)

f) Efecto matriz

Se utilizaron materiales positivos a *H. armigera* en sus etapas de larva y adulto.

g) Reproducibilidad

Se utilizó DNA genómico y plasmídico de *H. armigera*, *H. zea* y *Sinoe capsana*. Se procedió a realizar el mismo ensayo por 3 técnicos del laboratorio de Biología Molecular y 1 técnico del laboratorio de Entomología agrícola.

5. Resultados

Los resultados se muestran en los siguientes anexos, las concentraciones óptimas están **marcadas en naranja** en cada uno de los anexos.

a) Estandarización de los componentes de la qPCR

- Anexo 1. Ensayo de estandarización por qPCR de MgCl₂ para la detección de *H. armigera*
- Anexo 2. Ensayo de estandarización por qPCR de dNTP para la detección de *H. armigera*
- Anexo 3A. Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-ensayo dúplex

- Anexo 3B. Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-optimización gen endógeno

b) Ensayos de gradiente de temperatura

- Anexo 4. Ensayo de gradiente de temperatura para la detección por qPCR de *H. armigera*

c) Ensayos de intervalo de trabajo y límite de detección

- Anexo 5. Ensayo Intervalo de trabajo y límite de detección por qPCR de *H. armigera*

d) Repetibilidad

- Anexo 6. Ensayo de repetibilidad para la detección por qPCR de *H. armigera*

e) Especificidad

- Anexo 7. Ensayo de especificidad para la detección por qPCR de *H. armigera*

f) Efecto matriz

- Anexo 8. Ensayo de Efecto matriz para la detección por qPCR de *H. armigera*

g) Reproducibilidad

- Anexo 9. Ensayo de reproducibilidad para la detección por qPCR de *H. armigera*

h) Evaluación de iniciadores del trabajo de Thomas et al. (2022)

- Anexo 10A. Ensayo de evaluación de los iniciadores/sondas propuestos por Thomas et al. (2022) para la detección por qPCR de *H. armigera*-sonda ARMP1
- Anexo 10B. Ensayo de evaluación de los iniciadores/sondas propuestos por Thomas et al. (2022) para la detección por qPCR de *H. armigera*-sonda ARMP2

6. Conclusiones

- Los iniciadores ARMF1/ARMP2/568R propuestos por Thomas et al. (2022) son específicos para la detección de *H. armigera*.
- Los iniciadores 18F2/18SP2/18/SR2 son útiles para la amplificación del gen endógeno del género *Helicoverpa*.
- Se estandarizaron las concentraciones de la mezcla de reacción, para obtener una mezcla optimizada junto con sus condiciones de amplificación para generar gráficos por qPCR para el gen específico y gen endógeno, respectivamente (**Cuadro 5** y **Cuadro 6**).
- Se estableció que el intervalo de trabajo para la detección del gen específico para *H. armigera* mediante la técnica de qPCR es de **50 ng/μL a 2 ng/μL**, con un límite de detección de **0.2 ng/uL** utilizando **DNA total**.
- Se generaron materiales de referencia positivos de DNA plasmídico para ser usados para su posterior transferencia a los laboratorios aprobados.

Cuadro 5. Mezcla de reactivos optimizada para la detección específica y amplificación del gen endógeno de *H. armigera*

Componente	Marca	Conc. Stock	Conc. Final	Volumen 1X (µL)
Buffer	Invitrogen	10X	1X	2
MgCl ₂	Invitrogen	50 mM	6 mM	2.4
dNTP	Invitrogen	10 mM	0.3 mM	0.6
Taq platinum	Invitrogen	5 U/µL	0.0625 U/µL	0.25
ARMF1	IDT	5 µM	0.25 µM	1.0
568R	IDT	5 µM	0.25 µM	1.0
ARMP2 (sonda)	IDT	5 µM	0.25 µM	1.0
RT-18S-F2	IDT	5 µM	0.25 µM	1.0
RT-18S-R2	IDT	5 µM	0.25 µM	1.0
RT-18S-P2 (sonda)	IDT	5 µM	0.5 µM	2.0
DNA	--	2 a 50 ng/µL	0.2 a 5 ng/µL	2.0
H ₂ O	Invitrogen	---		5.75
Volumen final				20

Cuadro 6. Programa de termociclaje para la detección de *H. armigera*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	15 s	35
Anillamiento (Lectura)	60	60 s	
Conservación	12	∞	

7. Consideraciones finales

Los parámetros de la estandarización aquí reportados serán incluidos en el documento: Protocolo de Diagnóstico: *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 (Gusano de la mazorca) en su versión 1.0.

8. Referencias

- Barr, N. B., Ledezma, L. A., Farris, R. E., Epstein, M. E., & Gilligan, T. M. (2011). A Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay to Diagnose *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(5), 1706–1719. doi:10.1603/ec11093
- Debode, F., Marien, A., Gérard, A., Francis, F., Fumière, O., & Berben, G. (2017). Development of real-time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(8), 1421-1426.
- Gilligan, T. M., Tembrock, L. R., Farris, R. E., Barr, N. B., van der Straten, M. J., van de Vossenberg, B. T. L. H., & Metz-Verschure, E. (2015). A Multiplex Real-Time PCR Assay to Diagnose and Separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. *PLOS ONE*, 10(11), e0142912. doi:10.1371/journal.pone.0142912
- Heininger, A., Binder, M., Ellinger, A., Botzenhart, K., Unertl, K., & Döring, G. (2003). DNase pretreatment of master mix reagents improves the validity of universal 16S rRNA gene PCR results. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1763-1765.

- Kranzfelder, P., Ekrem, T., & Stur, E. (2016). Trace DNA from insect skins: a comparison of five extraction protocols and direct PCR on chironomid pupal exuviae. *Molecular ecology resources*, 16(1), 353-363.
- Moreau, C. (2014). A practical guide to DNA extraction, PCR, and gene-based DNA sequencing in insects. *Halteres* 5:32-42.
- Thomas, A., Li, D., Gunawardana, D., & Flynn, A. (2022). A Real-time PCR assay for rapid identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from closely related species. *Journal of Applied Entomology*, 146, 217-228. <https://doi.org/10.1111/jen.12947>

BORRADOR

Anexo 1. Ensayo de estandarización por qPCR de MgCl₂ para la detección de *H. armigera*

Objetivo: Estandarizar el parámetro **MgCl₂** para la detección específica por qPCR de *Helicoverpa armigera*, iniciadores ARMF1/ARMP2/568R e iniciadores del gen endógeno 18SF2/18SP2/18SR2.

Muestra utilizada

Nombre	Clave	Estado	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Método de extracción	Observaciones
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIAR_B	Adulto	9.4	2.15	1.38	CTAB	DNA genómico

Preparación del master mix para qPCR

L1			L2 (MENOR)			L3 (MAYOR)		
Componente	1x	6	Componente	1x	6	Componente	1x	6
Buffer	2	12	Buffer	2	12	Buffer	2	12
MgCl ₂	2.4	14.4	MgCl ₂	2	12	MgCl ₂	2.8	16.8
dNTP	0.6	3.6	dNTP	0.6	3.6	dNTP	0.6	3.6
Taq platinum	0.25	1.5	Taq platinum	0.25	1.5	Taq platinum	0.25	1.5
ARMF1	1	6	ARMF1	1	6	ARMF1	1	6
568R	1	6	568R	1	6	568R	1	6
ARMP2 (sonda)	1	6	ARMP2 (sonda)	1	6	ARMP2 (sonda)	1	6
RT-18S-F2	1	6	RT-18S-F2	1	6	RT-18S-F2	1	6
RT-18S-R2	1	6	RT-18S-R2	1	6	RT-18S-R2	1	6
RT-18S-P2 (sonda)	1	6	RT-18S-P2 (sonda)	1	6	RT-18S-P2 (sonda)	1	6
DNA	2	12	DNA	2	12	DNA	2	12
H ₂ O	6.75	40.5	H ₂ O	7.15	42.9	H ₂ O	6.35	38.1
Volumen final	20	120	Volumen final	20	120	Volumen final	20	120

Programa de amplificación

El programa de amplificación se llevará a cabo en el termociclador CFX96™.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Anillamiento (Lectura)	60	60 s	
Conservación	12	∞	

Resultados ensayo de estandarización por qPCR de MgCl₂ para la detección de *H. armigera*

Visualización	MgCl ₂ L1				MgCl ₂ L2			
Muestras	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq
	A02	FAM	HELIAR_B-R1	20.15	A04	FAM	HELIAR_B-R1	20.43
	B02	FAM	HELIAR_B-R2	20.14	B04	FAM	HELIAR_B-R2	20.47
	C02	FAM	HELIAR_B-R3	20.21	C04	FAM	HELIAR_B-R3	20.38
	A03	FAM	Negativo	N/A	A05	FAM	Negativo	N/A
	B03	FAM	NTC	N/A	B05	FAM	NTC	N/A
	A02	Cy5	HELIAR_B-R1	26.43	A04	Cy5	HELIAR_B-R1	25.87
	B02	Cy5	HELIAR_B-R2	26.29	B04	Cy5	HELIAR_B-R2	25.99
	C02	Cy5	HELIAR_B-R3	26.54	C04	Cy5	HELIAR_B-R3	25.63
	A03	Cy5	Negativo	N/A	D05	Cy5	Negativo	N/A
	B03	Cy5	NTC	N/A	E05	Cy5	NTC	N/A
	Gráficos qPCR-Normal							

Visualización	MgCl ₂ L3			
Muestras	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq
	A06	FAM	HELIAR_B-R1	20.25
	B06	FAM	HELIAR_B-R2	20.1
	C06	FAM	HELIAR_B-R3	20.26
	D07	FAM	Negativo	N/A
	E07	FAM	NTC	N/A
	A06	Cy5	HELIAR_B-R1	26.81
	B06	Cy5	HELIAR_B-R2	26.52
	C06	Cy5	HELIAR_B-R3	26.55
	D07	Cy5	Negativo	N/A
E07	Cy5	NTC	N/A	
Gráficos qPCR-Normal				
Gráficos qPCR-Log				

Observaciones/ anotaciones:

De acuerdo a los Cq, RFU y forma del gráfico se elige la concentración indicada en el mix L1 para el factor MgCl₂

Anexo 2. Ensayo de estandarización por qPCR de dNTP para la detección de *H. armigera*

Objetivo: Estandarizar el parámetro **dNTP** para la detección específica por qPCR de *Helicoverpa armigera*, iniciadores ARMF1/ARMP2/568R e iniciadores del gen endógeno 18SF2/18SP2/18SR2.

Muestra utilizada

Nombre	Clave	Estado	[DNA] ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}	Método de extracción	Observaciones
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIAR_B	Adulto	9.4	2.15	1.38	CTAB	DNA genómico

Preparación del master mix para qPCR

dNTP

L1

Componente	1x	6
Buffer	2	12
MgCl ₂	2.4	14.4
dNTP	0.6	3.6
Taq platinum	0.25	1.5
ARMF1	1	6
568R	1	6
ARMP2 (sonda)	1	6
RT-18S-F2	1	6
RT-18S-R2	1	6
RT-18S-P2 (sonda)	1	6
DNA	2	12
H ₂ O	6.75	40.5
Volumen final	20	120

L2 (MENOR)

Componente	1x	6
Buffer	2	12
MgCl ₂	2.4	14.4
dNTP	0.4	2.4
Taq platinum	0.25	1.5
ARMF1	1	6
568R	1	6
ARMP2 (sonda)	1	6
RT-18S-F2	1	6
RT-18S-R2	1	6
RT-18S-P2 (sonda)	1	6
DNA	2	12
H ₂ O	6.95	41.7
Volumen final	20	120

L3 (MAYOR)

Componente	1x	6
Buffer	2	12
MgCl ₂	2.4	14.4
dNTP	0.8	4.8
Taq platinum	0.25	1.5
ARMF1	1	6
568R	1	6
ARMP2 (sonda)	1	6
RT-18S-F2	1	6
RT-18S-R2	1	6
RT-18S-P2 (sonda)	1	6
DNA	2	12
H ₂ O	6.55	39.3
Volumen final	20	120

Programa de amplificación

El programa de amplificación se llevará a cabo en el termociclador CFX96™.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Anillamiento (Lectura)	60	60 s	
Conservación	12	∞	

Resultados ensayo de estandarización por qPCR de dNTP para la detección de *H. armigera*

Visualización	dNTP L1				dNTP L2			
Muestras	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq
	A03	FAM	Unkn	20.46	A05	FAM	Unkn	20.13
	B03	FAM	Unkn	20.19	B05	FAM	Unkn	20.05
	C03	FAM	Unkn	20.27	C05	FAM	Unkn	20.18
	E03	FAM	Neg Ctrl	N/A	E05	FAM	Neg Ctrl	N/A
	F03	FAM	NTC	N/A	F05	FAM	NTC	N/A
	A03	Cy5	Unkn	27.29	A05	Cy5	Unkn	27.53
	B03	Cy5	Unkn	26.85	B05	Cy5	Unkn	27.69
	C03	Cy5	Unkn	27.13	C05	Cy5	Unkn	27.42
	E03	Cy5	Neg Ctrl	39.88	E05	Cy5	Neg Ctrl	38.03
F03	Cy5	NTC	N/A	F05	Cy5	NTC	38.43	
Gráficos qPCR-Normal								

Visualización	dNTP L3			
Muestras	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq
	A07	FAM	Unkn	20.34
	B07	FAM	Unkn	20.24
	C07	FAM	Unkn	20.41
	E07	FAM	Neg Ctrl	N/A
	F07	FAM	NTC	39.12
	A07	Cy5	Unkn	27.03
	B07	Cy5	Unkn	26.88
	C07	Cy5	Unkn	26.91
	E07	Cy5	Neg Ctrl	38.53
F07	Cy5	NTC	39.31	
Gráficos qPCR-Normal				
Gráficos qPCR-Log				

Observaciones/ anotaciones:

De acuerdo a los Cq, RFU y forma del grafico se elige la concentración indicada en el mix L1 para el dNTP

Anexo 3A. Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-ensayo dúplex

Objetivo: Estandarizar el parámetro **INICIADORES/SONDAS** para la detección específica por qPCR de *Helicoverpa armigera*, iniciadores ARMF1/ARMP2/568R e iniciadores del gen endógeno 18SF2/18SP2/18SR2.

Muestra utilizada

Nombre	Clave	Estado	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Método de extracción	Observaciones
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIAR_B	Adulto	9.4	2.15	1.38	CTAB	DNA genómico

Preparación del master mix para qPCR

L1			L2 (MENOR)			L3 (MAYOR)		
Componente	1x	6	Componente	1x	6	Componente	1x	6
Buffer	2	12	Buffer	2	12	Buffer	2	12
MgCl ₂	2.4	14.4	MgCl ₂	2.4	14.4	MgCl ₂	2.4	14.4
dNTP	0.6	3.6	dNTP	0.6	3.6	dNTP	0.6	3.6
Taq platinum	0.25	1.5	Taq platinum	0.25	1.5	Taq platinum	0.25	1.5
ARMF1	1	6	ARMF1	0.5	3	ARMF1	1.5	9
568R	1	6	568R	0.5	3	568R	1.5	9
ARMP2 (sonda)	1	6	ARMP2 (sonda)	0.5	3	ARMP2 (sonda)	1.5	9
RT-18S-F2	1	6	RT-18S-F2	0.5	3	RT-18S-F2	1.5	9
RT-18S-R2	1	6	RT-18S-R2	0.5	3	RT-18S-R2	1.5	9
RT-18S-P2 (sonda)	1	6	RT-18S-P2 (sonda)	0.5	3	RT-18S-P2 (sonda)	1.5	9
DNA	2	12	DNA	2	12	DNA	2	12
H ₂ O	6.75	40.5	H ₂ O	9.75	58.5	H ₂ O	3.75	22.5
Volumen final	20	120	Volumen final	20	120	Volumen final	20	120

Programa de amplificación

El programa de amplificación se llevará a cabo en el termociclador CFX96™.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Anillamiento (Lectura)	60	60 s	
Conservación	12	∞	

Resultados ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-ensayo dúplex

MIX	Muestras				Gráficos
L1	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq	
	A06	FAM	HELIAR_B	20.32	
	B06	FAM	HELIAR_B	20.4	
	C06	FAM	HELIAR_B	20.33	
	D06	FAM	Neg Ctrl	N/A	
	E06	FAM	NTC	N/A	
	A06	Cy5	HELIAR_B	27.87	
	B06	Cy5	HELIAR_B	27.66	
	C06	Cy5	HELIAR_B	27.65	
	D06	Cy5	Neg Ctrl	37.06	
E06	Cy5	NTC	36.45		
L2	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq	
	A08	FAM	HELIAR_B	20.44	
	B08	FAM	HELIAR_B	20.59	
	C08	FAM	HELIAR_B	20.59	
	D08	FAM	Neg Ctrl	N/A	
	E08	FAM	NTC	N/A	
	A08	Cy5	Unkn	30.33	
	B08	Cy5	Unkn	30.84	
	C08	Cy5	Unkn	30.31	
	D08	Cy5	Neg Ctrl	39.87	
E08	Cy5	NTC	38.63		
L3	Pozo	Fluoróforo	Muestra	Cq	
	A10	FAM	HELIAR_B	20.24	
	B10	FAM	HELIAR_B	20.12	
	C10	FAM	HELIAR_B	20.29	
	D10	FAM	Neg Ctrl	N/A	
	E10	FAM	NTC	N/A	
	A10	Cy5	Unkn	26.54	
	B10	Cy5	Unkn	26.49	
	C10	Cy5	Unkn	26.69	
	D10	Cy5	Neg Ctrl	39.27	
E10	Cy5	NTC	38.94		

Anexo 3B. Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-optimización gen endógeno

Objetivo: Estandarización del parámetro **INICIADORES/SONDAS** para la detección específica por qPCR de *Helicoverpa armigera*, iniciadores ARMF1/ARMP2/568R e iniciadores del gen endógeno 18SF2/18SP2/18SR2. Optimizar los iniciadores y sondas del gen endógeno.

Muestra utilizada

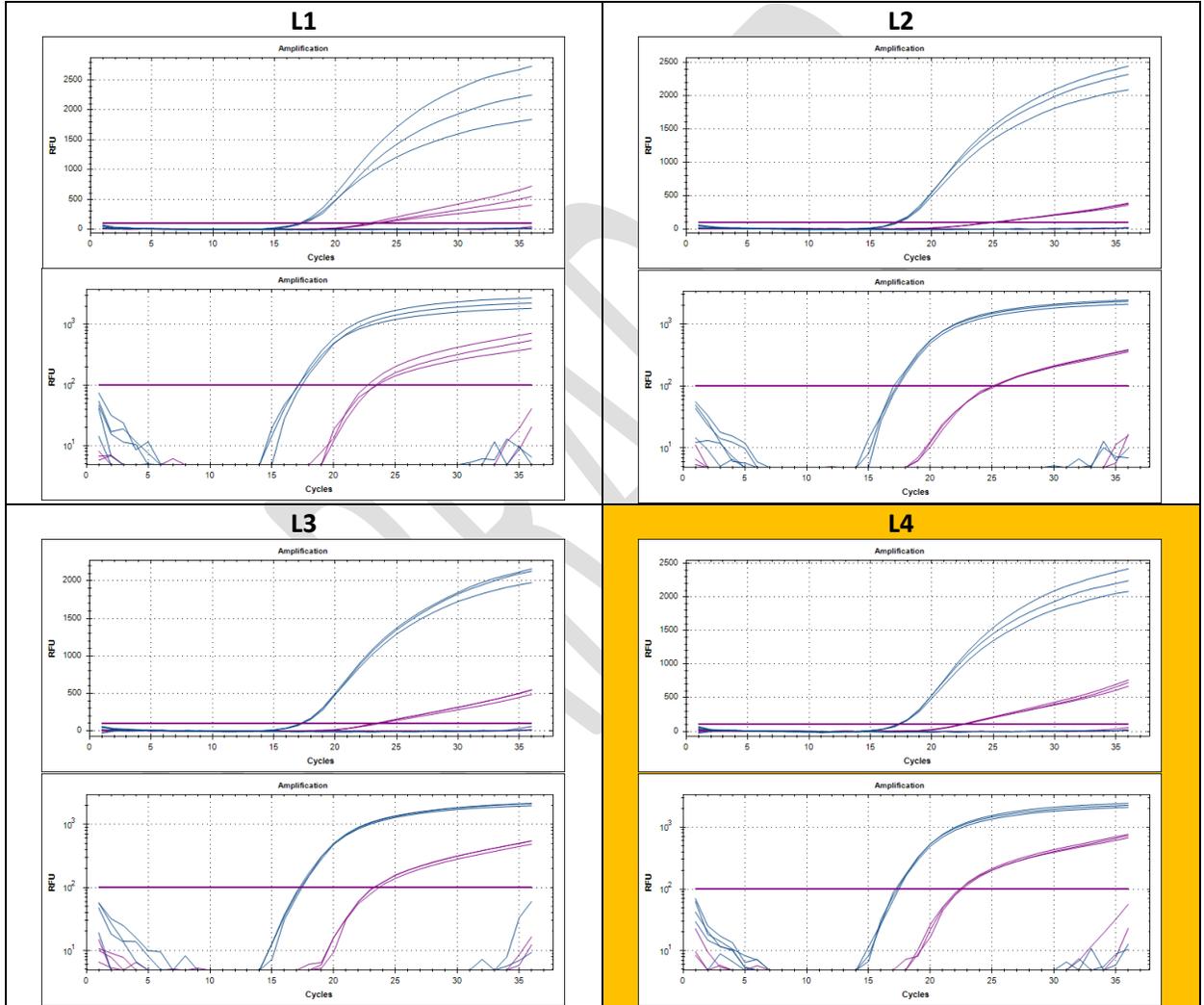
Nombre	Clave	Estado	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Método de extracción	Observaciones
<i>Helicoverpa armigera</i>	HELIAR_C	Adulto	16.3	1.91	1.89	CTAB	DNA genómico
TabS+18S	TABS18S	-	101.2	1.96	2.26	Kit Qiagen	Clona 18s

Preparación del master mix para qPCR

L1			L2		
Componente	1x	12	Componente	1x	12
Buffer	2	24	Buffer	2	24
MgCl ₂	2.4	28.8	MgCl ₂	2.4	28.8
dNTP	0.6	7.2	dNTP	0.6	7.2
Taq platinum	0.25	3	Taq platinum	0.25	3
ARMF1	1	12	ARMF1	1	12
568R	1	12	568R	1	12
ARMP2 (sonda)	1	12	ARMP2 (sonda)	1	12
RT-18S-F2	1	12	RT-18S-F2	0.5	6
RT-18S-R2	1	12	RT-18S-R2	0.5	6
RT-18S-P2 (sonda)	1	12	RT-18S-P2 (sonda)	1	12
DNA	2	24	DNA	2	24
H ₂ O	6.75	81	H ₂ O	7.75	93
Volumen final	20	240	Volumen final	20	240
L3			L4		
Componente	1x	12	Componente	1x	12
Buffer	2	24	Buffer	2	24
MgCl ₂	2.4	28.8	MgCl ₂	2.4	28.8
dNTP	0.6	7.2	dNTP	0.6	7.2
Taq platinum	0.25	3	Taq platinum	0.25	3
ARMF1	1	12	ARMF1	1	12
568R	1	12	568R	1	12
ARMP2 (sonda)	1	12	ARMP2 (sonda)	1	12
RT-18S-F2	0.8	9.6	RT-18S-F2	1	12
RT-18S-R2	0.8	9.6	RT-18S-R2	1	12
RT-18S-P2 (sonda)	1.6	19.2	RT-18S-P2 (sonda)	2	24
DNA	2	24	DNA	2	24
H ₂ O	6.55	78.6	H ₂ O	5.75	69
Volumen final	20	240	Volumen final	20	240

Resultados Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-optimización gen endógeno DNA genómico

Fluoróforo	Muestra	Cq-L1	Cq-L2	Cq-L3	Cq-L4
FAM	HELIAR_C	17.09	17.33	17.27	17.35
FAM	HELIAR_C	17.11	17.02	17.17	17.14
FAM	HELIAR_C	17.35	17.21	17.35	17.25
FAM	Neg Ctrl	N/A	N/A	N/A	N/A
FAM	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A
Cy5	HELIAR_C	23.48	25.01	23.27	22.55
Cy5	HELIAR_C	22.69	25.28	23.19	22.37
Cy5	HELIAR_C	23.34	25.05	23.63	22.41
Cy5	Neg Ctrl	N/A	N/A	N/A	N/A
Cy5	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A



Resultados Ensayo de estandarización por qPCR de iniciadores y sondas para la detección de *H. armigera*-optimización gen endógeno DNA plasmídico.

Fluoróforo	Muestra	Cq-L1	Cq-L2	Cq-L3	Cq-L4
FAM	TABS18S	35.38	N/A	N/A	N/A
FAM	TABS18S	N/A	N/A	N/A	N/A
FAM	TABS18S	N/A	N/A	N/A	35.46
FAM	Neg Ctrl	N/A	N/A	N/A	N/A
FAM	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A
Cy5	TABS18S	15.2	16.34	14.51	13.99
Cy5	TABS18S	14.94	15.97	14.34	14.29
Cy5	TABS18S	15.44	15.6	14.18	14.03
Cy5	Neg Ctrl	N/A	N/A	N/A	N/A
Cy5	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A

