



EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE IC-RT-PCR EN LA DETERMINACIÓN DE Grapevine leafroll associated virus-3 (GLRaV-3) EN TEJIDO DE VID

**CRISTIAN DIEGO MENDOZA SILVA
INGENIERO AGRÓNOMO**

RESUMEN

Grapevine leafroll associated virus (GLRaV) es considerada una de las enfermedades con mayor importancia a nivel mundial, ya que produce diversas sintomatologías en plantas que van desde la disminución de la productividad hasta la muerte del hospedero. Debido a que el control de esta enfermedad es principalmente preventivo, se evaluó la implementación de dos protocolos de Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa asociado a Inmuncaptura, (IC-PCR) para la detección de GLRaV-3 para un diagnóstico más simple y asertivo de la enfermedad sin necesidad de purificar el virus y extraer el RNA previamente.

Se muestrearon 8 viñedos de la VII región en los que se colectaron 387 muestras con sintomatología posible de asociar a enfermedades de naturaleza viral, las que se analizaron mediante serología (DAS-ELISA) en una primera etapa para definir aquellas que presentaban el patógeno. Luego las muestras positivas fueron analizadas por diferentes protocolos de IC-RT-PCR sin resultados favorables probablemente debido a diversos factores como distribución des-uniforme del virus en el tejido leñoso, época de muestreo, o falta de puesta a punto de algunos pasos dentro de los protocolos evaluados.

Este resultado deja de manifiesto que factores como la presencia de sustancias contaminantes que estarían presentes en los tejidos vegetales al momento de la extracción de los ácidos ribonucleicos (ARN) como polisacáridos y compuestos fenólicos, tienen un efecto directo sobre la viabilidad del ARN y la acción de la enzima ADN polimerasa (Taq) durante la realización de la PCR. Teniendo además en cuenta la

distribución irregular y la baja concentración del virus en las muestras de tejido de vid es posible explicar los resultados negativos de los ensayos. En vista de lo anterior es imprescindible tener en cuenta al momento de reformular los protocolos evaluados, los aspectos ya mencionados para una correcta realización de la técnica molecular IC-RT-PCR, al igual que considerar el utilizar tejido verde obtenido en una época de muestreo diferente.

ABSTRACT

Grapevine leafroll associated virus (GLRaV) is considered one of the most important diseases worldwide, because of the several symptoms that produces in infected plants, ranging from the decline in productivity until the death of the host. Considering that the control of this disease is mainly preventive, the implementation of protocols of Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction associated with immunocapture (IC-PCR) for the detection GLRaV-3 seems important for a simple and assertive diagnosis without purification of the virus and RNA extraction. A total of 168 samples were taken from 8 vineyards located at the Seventh Region in Chile. These initially were analyzed through serology (DAS - ELISA) to determine the presence of the virus. Then, the positive samples were analyzed by different protocols of IC-RT-PCR, without positive results. This can be explain by different factors such as random distribution of the virus in the woody sample, sampling date, or errors in the implementation of some of the extraction procedures.

This result makes it clear that factors such as non-removal of some compounds present in the ribonucleic acid extraction like polysaccharides and phenolic compounds have direct effect on the viability of the RNA and the performance of the enzyme DNA polymerase (Taq) in the PCR. Also if we have in mind the uneven distribution of the virus in the tissue samples we can explain the negative results obtained. According to this it seems important in the future to include in new IC-RT-PCR protocols these observations, and a different sampling date using vegetative tissue.