



800.271
B-271
2007

INFORME TÉCNICO FINAL

PROYECTO FONTEC 204-4060

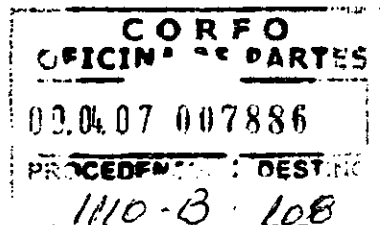
**“Detección genética por PCR de 23
patógenos virales en vides, carozos y
pomáceas”**

Santiago, Enero 2007





Santiago, 9 de abril de 2007.



Señor:

Andrés Benavides Yates
Subdirector Innovación Empresarial
INNOVA Chile

Referencia: Comentarios adicionales a Informe Técnico Final Proyecto INNOVA Chile N° 204-4060.

Presente

Estimado señor Benavides:

Adjuntamos comentarios adicionales a dos puntos incluidos parcialmente en el informe Técnico Final del proyecto "Detección Genética por PCR de 23 Patógenos en Vides; Carozos y Pomáceas", a solicitud del ejecutivo técnico a cargo de la revisión del proyecto señor Miguel Soto:

1. Evaluación de nuevo kit de extracción de ARN.

Con el fin de disminuir costos de operación del diagnóstico se evaluó un nuevo kit de extracción de ARN llamado Plant Total RNA Mini Kit for Woody Plants, de la empresa taiwanesa Favorgen. Para la evaluación de este nuevo kit, se eligieron muestras que habían sido extraídas con el kit RNA Easy de Qiagen y que habían dado positivo para algunos virus. Estas muestras se extrajeron en paralelo con ambos kits y se les sometió a reacciones de transcripción reversa y PCR bajo las mismas condiciones, de manera de hacer comparable el análisis. Esto se realizó para vides, carozos y pomáceas, tanto para tejido foliar como para tejido enriquecido en floema. El resultado de la amplificación de los virus (intensidad de la banda observada) es similar al utilizar ARN proveniente de ambas extracciones, lo que indicó que se puede utilizar el nuevo kit sin perder la calidad ni la integridad del ARN.



Una ventaja del kit Favorgen frente al Qiagen es su bajo costo. El utilizar este kit permitió cumplir una de las ideas iniciales del proyecto, que era obtener un ARN de calidad utilizando un sistema de extracción económico.

2. Integridad del ARN.

Inicialmente, se había decidido probar la integridad del ARN antes de realizar una reacción de transcripción reversa. Con el análisis de distintas muestras nos dimos cuenta que la amplificación de un control interno (fragmento de un gen de la planta) era suficiente para comprobar que el ARN estaba íntegro, en una cantidad suficiente y con la pureza necesaria para permitir la detección de virus. Considerando esto, no fue necesario hacer geles que permitieran determinar la integridad del ARN, antes de realizar la transcripción reversa, lo que permitió obtener resultados en menor tiempo.

Atentamente,



Roberto Valladares P.
Gerente General
Bioscan S.A.



INFORME TÉCNICO FINAL PROYECTO FONTEC 204-4060

A) ÍNDICE

	Pág.
A. ÍNDICE	2
B. RESUMEN EJECUTIVO	4
C. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA	6
D. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	8
D.1 Virus detectados	8
D.2 Lugares y variedades muestreadas	9
D.3 Descripción de las Actividades Desarrolladas	9
D.3.1 Determinación de las secuencias genómicas de los patógenos a investigar	9
D.3.2 Diseño de partidores	9
D.3.3 Desarrollo de protocolos para toma de muestras	10
D.3.4 Determinación del método de extracción de ARN	10
D.3.5 Verificación experimental de la eficiencia de los partidores	10
D.3.6 Evaluación de muestras de campo	10
D. 4 Carta Gantt	11
E. RESULTADOS OBTENIDOS	11
E.1 Elección de las secuencias genómicas de los patógenos a investigar y diseño de partidores	11
E.2 Eficiencia de los partidores: Controles positivos y muestras de campo	11
E.3 Determinación del método de extracción de ARN	13
E.4 Determinación de las condiciones óptimas de recolección de muestras y selección de las mejores épocas y tejidos para el análisis	14
E.5 Implementación comercial del servicio de diagnóstico viral	15
F. CONCLUSIONES	16
G. IMPACTOS DEL PROYECTO	17
GLOSARIO	20
ANEXOS	
<u>Tablas</u>	
Tabla 1: Comparación de los resultados del análisis viral de plantas de vides, utilizando el método de extracción de ARN de sílice y el Kit comercial Quiagen	22

Figuras

Figura 1: Representación esquemática de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Figura 2: Esquema de la detección de virus de plantas por RT-PCR	23
Figura 3: Resultados representativos obtenidos con la técnica de Transcripción Reversa seguida de PCR (RT-PCR) en la detección de 15 virus de vides utilizando distintas muestras de campo	24
Figura 4: Distribución heterogénea de los virus en la planta	25
Figura 5: Esquema organizacional de Bioscan e Investigadores del área vegetal	26
Detección de virus en plantas (folleto divulgativo)	27
Instructivo para toma de muestras de vid	29
Instructivo para toma de muestras de carozos y pomáceas	33
REFERENCIAS	37

B) RESUMEN EJECUTIVO

Bioscan fue una de las primeras empresas biotecnológica en Chile y Latinoamérica en desarrollar la técnica molecular llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa, comúnmente conocida como PCR (Polimerase chain reaction), aplicándola en medicina humana y especializándose en la detección de patógenos peridontales, ginecológicos y respiratorios.

Los primeros trabajos realizados en Bioscan se remontan a los años 1995 y 1996, donde se diseñaron partidores y se desarrolló un método de detección para 12 patógenos humanos implicados en la infección de las encías o peridontitis. Esto representó una gran ventaja, ya que la peridontitis es una enfermedad producida por bacterias que en su mayoría son anaeróbicas estrictas, de difícil crecimiento en cultivos. Entre los años 1996 y 1999 el departamento de investigación de Bioscan se abocó al desarrollo de métodos de detección de patógenos involucrados en las infecciones gineco-obstétricas, implementando la técnica para detectar 23 patógenos en ADN genómico de virus, bacterias, hongos y protozoos. En el 2005 la empresa desarrolló la tecnología basada en el PCR para la detección de 7 patógenos respiratorios. Actualmente, en el área de salud humana, Bioscan detecta por PCR alrededor de 50 patógenos, trabajando para los principales médicos y clínicas del país, realizando más de 160.000 detecciones.

A partir del año 2004, la empresa comienza a ampliar el ámbito de su cobertura al área agrícola, adjudicándose el presente proyecto FONTEC 204-4060 para trabajar en la detección de 23 virus que afectan frutales como vides, carozos y pomáceas, mediante una variante de la técnica de PCR, denominada RT-PCR (Reverse Transcription PCR). Se eligió esta técnica por ser más sensible, específica y rápida que los otros dos métodos existentes para detectar la presencia de patógenos virales en plantas (indexaje y ELISA). En comparación con ELISA, el PCR es 100 a 1000 veces más sensible, siendo esto especialmente importante para poder detectar infecciones en etapa iniciales, cuando el título del virus es bajo (Weber, 2002).

La idea de contar con un sistema de diagnóstico viral para especies frutales de alta importancia económica se basa principalmente en tres puntos. Primero, los virus son patógenos que afectan la productividad de los huertos y la calidad de la fruta obtenida, disminuyendo los retornos de los productores. Segundo, los síntomas ocasionados por los virus no constituyen una herramienta confiable para la identificación de la enfermedad. Tercero, actualmente a nivel de campo no existen tratamientos que eliminen los virus de las plantas, basándose su control en medidas preventivas. En consecuencia y de acuerdo con el programa de certificación de especies frutales del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), existe una imperiosa necesidad de generar capacidades y tecnologías para la detección precisa y rápida del estado fitosanitario de los viveros y los huertos productores de frutas.

Durante el proyecto se analizaron 200 plantas sintomáticas y asintomáticas colectadas en parronales, viñas y huertos frutales ubicados entre la V y VII región del país. Para optimizar el método de diagnóstico, un grupo de estas plantas fue monitoreado en

diferentes épocas del año (primavera, verano y otoño-invierno), recolectándose material vegetal proveniente de distintas partes de la planta, y procesándose mediante distintos métodos de extracción de ARN, discos de hojas, nervaduras, pecíolos, sarmientos verdes, sarmientos lignificados, estacas herbáceas, estacas leñosas y yemas. Independiente de la especie, tejido y época analizada, el mejor método de extracción resultó ser el Kit comercial Quiagen, el que nos permitió realizar detección durante todo el año. Esto es importante pues una de las desventajas del PCR, en plantas, es la presencia de inhibidores (polifenoles y polisacáridos) que pueden inhibir la reacción, originando falsos negativos y limitando el período de análisis a épocas en las que su contenido sea bajo. Se logró superar este problema al utilizar un método de extracción de RNA que elimina estos compuestos, con estas condiciones de trabajo logramos detectar virus eficientemente durante todo el año con una mayor sensibilidad que las obtenidas por ELISA.

En **vides**, los mejores resultados se obtuvieron en otoño-invierno utilizando floema de sarmientos lignificados, con un nivel de detección viral del 91%. Los mejores niveles de detección anual se lograron con los virus GFkV (90%), GLRaVs (84%) y GRSLaV (80%). En **carozos**, la mejor época de diagnóstico fue primavera utilizando pecíolos de hojas o floema de estacas herbáceas, logrando niveles de sensibilidad superiores al 80%. En **pomáceas**, la mejor época de diagnóstico fue otoño-invierno utilizando floema de estacas leñosas, con un nivel de sensibilidad del 91%. El virus ACLSV presentó el mejor nivel de detección anual con un valor de 100%.

La ejecución del presente proyecto permitió implementar la técnica de RT-PCR para la detección comercial de los virus más relevantes que infectan vides, carozos y pomáceas. Como resultado de esto, se puso a disposición de los viveristas y productores de fruta un laboratorio de excelencia que realiza un diagnóstico viral de alta precisión mediante un método moderno, de manera rápida y a un costo competitivo. El acceso a este tipo de análisis ofrece a los agricultores la posibilidad de verificar el estado fitosanitario de las plantas, ya sea para realizar una mejor selección del material vegetal a comprar o propagar, así como también para certificar la calidad de las mismas. Ir seleccionando material sano contribuye a disminuir los costos de producción y a aumentar la producción y calidad de la fruta.

C) EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA

EL proyecto FONTEC 204-4060 "Detección genética por PCR de 23 patógenos virales en vides, carozos y pomáceas" buscó participar en la mejora del patrimonio fitosanitario chileno, ofreciendo a los viveristas y productores frutícolas la posibilidad de diagnosticar con precisión y rapidez el estado fitosanitario de vides, carozos y pomáceas, mediante un método moderno, implementado en el país con alta tecnología y bajo costo.

En Chile, existen 119.950 ha de uva vinífera (incluyendo variedades destinadas a producción de vino blanco, vino tinto y pisco), 48.500 ha de uva de mesa, 7.200 ha de cerezos, 14.460 de ciruelos, 2.400 ha de damascos, 13.168 ha de duraznos, 6.900 ha de nectarines, 6.200 ha de almendros, 36.095 ha de manzanos, 7.920 ha de perales, ocupando nuestro país la primera posición entre los exportadores de vides, pomáceas y carozos del hemisferio sur (Herrera, 2001; ODEPA, 2005). En un mercado que muestra un marcado incremento en la competitividad, mantener esta posición implica bajar los costos de producción y mejorar la calidad de los productos comercializados. En la obtención de plantas de alta calidad, factores como las condiciones agronómicas, la identidad varietal y la ausencia de enfermedades adquieren una importancia vital. Dentro de las enfermedades, los virus constituyen un grupo importante, debido a que **no existen métodos para eliminarlos de las plantas y, como viven a expensas de éstas, su presencia afecta la productividad y calidad de los frutos.**

Los principales problemas que presentan las plantas infectadas con virus son una disminución en el crecimiento, decaimiento del frutal e incompatibilidades a nivel de injertos. A nivel de los frutos se observa un retardo en la madurez, un aumento de acidez, una disminución de los niveles de sólidos solubles (azúcares), falta de color, deformaciones, manchas y caída de frutos. En vides es frecuente tener pérdidas de productividad del orden del 10% por concepto de virus. Estas pérdidas pueden llegar a ser más altas, como es el caso de aquellas causadas por Grapevine fanleaf virus (GFLV) que alcanzan hasta un 80% o Grapevine leafroll associated virus (GLRaV) con niveles de un 10 a un 70%. En manzanos, a nivel mundial, se genera un 30% de pérdidas debido al virus Apple Mosaic Virus (ApMV) y hasta un 80% de disminución de la producción en el caso del virus Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV), cuando se utilizan patrones sensibles. En carozos, estudios realizados en EE.UU., indican que las pérdidas anuales causadas por Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) llegan a 3,5 ton/ha. Además, las pérdidas ocasionadas por estos patógenos se acentúan cuando existen asociadas varias virosis (Triolo y Materazzi, 1987; Senft, 1996; Martelli, 2000; Herrera 2001; Kuniyuki y otros, 2002; Weber, 2002; Gurgeli, 2003; Martelli, 2003; www.agf.gov.bc.ca/cropprot/grapeipm/virus.htm; www.fao.org/docrep/T0675E/T0675E07.htm).

En Chile, INIA ha determinado a través de sus estudios que los porcentajes promedios de infecciones virosas en carozos son del orden de un 29,7% en almendros, 23,1% en damascos, 10,4% en durazneros, 8,8% en nectarines, 7,1% en cerezos y 6,9% en ciruelos. En huertos de pomáceas los porcentajes promedios de infecciones virales alcanzan un 22%. En una prospección realizada en viñedos y parronales se determinó que el 84% de los predios presentaban infecciones virosas. (Herrera, 2001).

La detección de enfermedades virales en el campo es bastante difícil ya que a diferencia de otros agentes infecciosos como hongos y bacterias, los virus muchas veces no presentan síntomas destacados, por lo que pueden pasar inadvertidos y/o confundirse con otros factores que afectan a las plantas. Además, los síntomas observados raramente son únicos de una enfermedad particular, en varios casos sólo se presentan durante ciertas épocas del año y muchas plantas infectadas con virus no presentan síntomas evidentes. En base a estos inconvenientes, el realizar análisis de laboratorio se presenta como la mejor estrategia para conocer el estado fitosanitario de las plantas.

El avance en el ámbito de la biología molecular ha permitido diseñar métodos altamente efectivos para la detección patógenos. La técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocida como PCR, permite identificar virus de manera altamente eficiente, específica y confiable (Weber, 2002; Nolasco, 2003). Este método está reconocido y aprobado a nivel internacional como sistema de detección y es sometido a constantes evaluaciones (Aburkhes y cols., 1992; Roy, 1998; Thompson, 1998, Kummert y cols. 2000; Martin cols. 2000; Candresse y cols., 2000 y Candresse, 2001). El PCR, al simular la forma en la que el ADN se replica de modo natural en la célula, permite copiar millones de veces los segmentos de ADN del genoma de cualquier organismo. Para realizar esta amplificación se requiere de un genoma que sirva de molde; dos segmentos cortos de ADN de simple hebra (partidores de PCR), que sean complementarios a los extremos del fragmento a amplificar; nucleótidos y una enzima denominada ADN polimerasa resistente a la temperatura, que en general es la ADN polimerasa de la bacteria termofílica llamada *Thermophilus aquaticus* o Taq ADN polimerasa (ver esquema en **Figura 1**). La reacción de amplificación se logra realizando múltiples ciclos de amplificación (30 a 40 ciclos) en un *Termociclador*. Al ser colocado en un gel de agarosa y teñido, el fragmento amplificado, puede ser fácilmente visualizado mediante electroforesis. Comparando el fragmento con un estándar se puede reconocer el genoma de origen del segmento amplificado. Como el genoma de la mayoría de los virus que infectan plantas está compuesto de ARN (ácido ribonucleico) en lugar de ADN, el análisis genético por reacción de PCR no es factible directamente y se requiere de un paso previo. Este proceso de reacción se conoce como RT- PCR, Transcripción reversa seguida de PCR. En la **Figura 2** se representa esquemáticamente los pasos necesarios para la detección de virus en plantas mediante RT- PCR.

OBJETIVOS

Objetivo General

Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección rápida, sensible y versátil de 23 virus que afectan vides, carozos y pomáceas.

Objetivos Específicos

1. Diseñar los partidores específicos para la detección de cada uno de los virus seleccionados.
2. Determinar y optimizar el método de extracción de ARN para cada especie frutal.
3. Determinar épocas y tejidos óptimos para el análisis.
4. Desarrollar protocolos para toma de muestras.

En base a estos objetivos se pretende obtener un sistema de diagnóstico viral altamente eficiente, reproducible y versátil, que permita al usuario la utilización de diferentes tejidos vegetales según su disponibilidad en las estaciones del año. Bioscan se transformará en la primera empresa privada de biotecnología en ofrecer el servicio comercial de análisis virales, mediante la técnica de PCR, en frutales como vides, carozos y pomáceas. El uso de esta técnica permitirá que los análisis tengan una alta sensibilidad y que la empresa entregue resultados con rapidez a un costo competitivo.

D) METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

D.1) Virus detectados

Durante el proyecto se detectaron 17 virus que infectan vides, 2 virus que infectan pomáceas y 6 virus que infectan carozos.

Virus de Vides

Grapevine fanleaf virus (GFLV)
Arabis mosaic virus (ArMV)
Tomato ringspot virus (ToRSV)
Tobacco ringspot virus (TRSV)
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)
Grapevine leafroll associated virus 1-7 (GLRaV 1-7)
Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV)
Grapevine vitivirus A (GVA)
Grapevine vitivirus B (GVB)
Grapevine fleck virus (GFkV)
Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV)

Virus de Pomáceas

Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV)
Apple Mosaic Virus (ApMV)

Virus de Carozos

Plum pox virus (PPV)

Prune Dwarf Virus (PDV)

Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV)

Cherry Leafroll Virus (CLRV)

Tomato Ringspot Virus (ToRSV)

Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV)

Apple Mosaic Virus (ApMV)

D.2) Lugares y variedades muestreadas

Para la estandarización de cada uno de los virus en estudio se analizaron plantas sintomáticas y asintomáticas colectadas en parronales, viñas y huertos frutales ubicados entre la V y VII región del país.

En la especie *Vitis vinifera* se muestreó material vegetal proveniente de plantas de vides de variedades destinadas tanto a la producción de uva de mesa como a vinificación. Se trabajó con 9 variedades de mesa y 13 variedades de vino.

En los frutales de carozo se incluyeron especies como durazneros (14 variedades), nectarines (7 variedades), damascos (3 variedades), ciruelos (9 variedades), cerezos (13 variedades) y almendros (2 variedades).

En pomáceas se recolectó material vegetal proveniente de 8 variedades distintas de perales y de 12 variedades distintas de manzanos.

D.3) Descripción de las Actividades Desarrolladas

A continuación se detallan las actividades realizadas durante los dos años de duración del proyecto.

D.3.1) Determinación de las secuencias genómicas de los patógenos a investigar

Se recopiló literatura y se buscó en las distintas bases de datos disponibles en Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.ebi.ac.uk) las secuencias nucleotídicas de los 17 patógenos virales de vid, los 7 patógenos virales de carozos y los 3 patógenos virales de pomáceas. A partir de la información revisada, se seleccionaron las secuencias más adecuadas para ser utilizadas en el diseño de los partidores.

D.3.2) Diseño de partidores

Mediante programas computacionales de uso libre (PC GENE, OLIGO y CLUSTAL X) y la experiencia del diseñador, se diseñaron los partidores más apropiados para detectar en forma específica cada uno de los patógenos en estudio. Los partidores seleccionados fueron aquellos que cumplieron con los requisitos de eficiencia y especificidad mencionados en los puntos D.3.5 y D.3.6.

D.3.3) Desarrollo de protocolos para toma de muestras

Para cumplir este objetivo se realizaron dos estrategias: revisión de literatura pertinente y visitas a terreno. Mediante la revisión de literatura (Weber, 2002) se pudo tener una aproximación de la manera como se ha realizado la recolección de material vegetal en otros lugares, y la experiencia adquirida en las visitas a terreno permitió adaptar estos antecedentes a nuestras condiciones experimentales.

En las visitas a terreno se seleccionaron 200 plantas de distintas edades y variedades, para verificar la factibilidad y los problemas técnicos que se pudiesen presentar durante la detección viral. Del mismo modo, se muestrearon plantas en diferentes épocas del año (primavera, verano, otoño e invierno) y se recolectó material vegetal proveniente de distintas partes de la planta, procesándose discos de hojas, nervaduras, pecíolos, sarmientos verdes, sarmientos lignificados, estacas herbáceas, estacas leñosas y yemas. Para el seguimiento estacional se monitorearon 11 plantas de vid, incluyendo 4 variedades distintas; 13 plantas de pomáceas, incluyendo 6 variedades de perales y 6 variedades de manzanos, y 16 plantas de carozos, incluyendo 2 variedades de almendros, 5 variedades de cerezos, 4 variedades de ciruelos, 2 variedades de damascos, 2 variedades de durazneros y una de nectarín.

Se probaron diversas formas de almacenar y transportar el material recolectado para definir la forma más adecuada de hacerlo.

Con la información recopilada se diseñó un instructivo que especifica los protocolos para la recolección y transporte de las muestras.

D.3.4) Determinación del método de extracción de ARN

Para determinar el sistema de extracción de ARN más eficiente, se realizó una revisión de los distintos protocolos utilizados en plantas leñosas (Chang y cols., 1993; MacKenzie y cols., 1997; Malinowski, 1997; Geuna y cols., 1998; Salzman y cols., 1999; Wang y cols., 2000; Chun y cols., 2002; Zeng y Yang, 2002) y se seleccionaron 3 métodos para realizar pruebas de laboratorio. Los criterios de evaluación consideraron cantidad, calidad e integridad del ARN, factibilidad de amplificación por PCR, reproducibilidad de los resultados, tiempo de procesamiento, etc.

D.3.5) Verificación experimental de la eficiencia de los partidores

Para verificar la eficiencia de cada partidador en la reacción de PCR se realizaron pruebas utilizando controles positivos, ya sea provenientes de liofilizados de controles positivos de ELISA o de plantas infectadas con virus puros. El funcionamiento de los partidores se probó por medio de reacciones de RT-PCR realizando ensayos donde se cambiaron las condiciones de tiempo, temperatura, concentraciones de reactivos y cantidad inicial de muestra, hasta obtener una reacción que detectara al patógeno lo más claramente posible. Además, se realizaron reacciones cruzadas para evaluar la especificidad de cada partidador.

En el caso de cuatro virus de vid que no tenían controles positivos comercialmente disponibles, las pruebas se realizaron directamente en muestras de campo.

D.3.6) Evaluación de muestras de campo



Una vez establecidas las condiciones experimentales del uso de cada partidador en los controles positivos, se realizaron pruebas con el material vegetal recolectado en los

predios de la V a la VII región. En las muestras de campo se re-evaluaron los parámetros establecidos y se corrigieron según fuese necesario:

En las muestras en las que se amplificó el fragmento del tamaño esperado, se realizó la secuenciación de éste, para verificar que la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado correspondiese con la del patógeno buscado.

D. 4) Carta Gantt

ACTIVIDAD	TIEMPO (MESES)																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DEL PATÓGENO A INVESTIGAR	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK																
2 DISEÑO DE PARTIDORES		OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK							
3 VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL DE LA EFICIENCIA DE LOS PARTIDORES (controles +)		OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
5 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ARN		OK	OK	OK														OK	OK	OK				
6 EVALUACIÓN DE PARTIDORES EN MUESTRAS DE CAMPO		OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
7 DESARROLLO DE PROTOCOLOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS	OK	OK	OK	OK	OK	OK							OK	OK	OK		OK	OK	OK					
ENTREGA PROTOCOLO TOMA DE MUESTRA							OK																	OK
8 REVISIONES Y COMENTARIOS																OK	OK							OK

En  se indican las actividades realizadas en vid.
 En  se indican las actividades realizadas en carozos y pomáceas.

E) RESULTADOS OBTENIDOS

E.1) Elección de las secuencias genómicas de los patógenos a investigar y diseño de partidores

Para cada uno de los virus estandarizados se recopilaban todas las secuencias nucleotídicas disponibles, con el fin de incluir todas las variantes o razas del virus. Estas secuencias se alinearon y utilizando programas computacionales se identificó en cada caso regiones que fueran conservadas. Dentro de estas regiones se seleccionaron las secuencias más adecuadas para ser utilizadas en el diseño de los partidores. Posteriormente, utilizando el programa Blast, se verificó que tanto las secuencias de los partidores como la secuencia del fragmento a amplificar sólo correspondiesen al virus seleccionado y no se encontrasen en otro organismo. Este punto es importante, ya que evita que existan reacciones cruzadas y da cuenta de la especificidad teórica de los partidores. En la mayoría de los virus se diseñaron al menos 2 combinaciones de partidores, para poder evaluar posteriormente su sensibilidad.

E.2) Eficiencia de los partidores: Controles positivos y muestras de campo

Se consideró que una combinación de partidores era eficiente cuando éstos fueron específicos, es decir, amplificaron el fragmento del tamaño esperado, la secuenciación de éste correspondió al virus en estudio y no se obtuvieron

amplificaciones en reacciones cruzadas (cuando se usa como molde un genoma que contiene otro virus). Un criterio adicional fue la **sensibilidad** (los partidores logran amplificar cantidades bajas de virus) que se determinó realizando diluciones seriadas de las muestras previo al PCR. Si los partidores no cumplían los criterios mencionados, se diseñaba una nueva combinación de ellos.

La primera prueba de eficiencia de cada partidor en la reacción de PCR se realizó utilizando **controles positivos**, que correspondieron a liofilizados de controles positivos de ELISA o a plantas infectadas con virus puros. Se hicieron reacciones de RT-PCR utilizando un protocolo estándar y se seleccionaron aquellas combinaciones de partidores que amplificaron el fragmento del tamaño esperado. Posteriormente, se optimizó la reacción realizando ensayos donde se cambiaron distintas condiciones hasta obtener una reacción que detectara al patógeno de la manera más eficiente.

Los partidores seleccionados en esta primera etapa se probaron con **muestras de campo**, siguiendo los mismos criterios anteriores e incorporando nuevas variables que dependen de las plantas seleccionadas; estas son **variedad, edad, tejido vegetal**, etc. Estas nuevas variables modificaron en algunos casos la elección del partidor y/o las condiciones del PCR, ya que varían la composición y concentración de ciertos compuestos endógenos de la planta que actúan como inhibidores de la reacción de PCR. Una vez estandarizadas todas estas condiciones pudimos obtener amplificaciones como las que se muestran en la **Figura 3**.

Debemos mencionar además que se establecieron normas y **controles de calidad internos**, que fiscalizan la preparación de reactivos y el análisis de las muestras. En el caso de la **preparación de reactivos**, cada vez que se prepara una nueva mezcla para PCR, antes de probarla con nuevas muestras, se verifica que amplifique una muestra positiva (control positivo) y no amplifique al agregar agua (control negativo). Durante el **análisis de las muestras** siempre se incluye la amplificación de un gen endógeno de la planta, como el que codifica para actina o malato deshidrogenasa, de manera de verificar alguna inhibición en la reacción de PCR (control interno); una reacción que no incluye muestra, sino agua (control negativo) y una reacción con el virus que se quiere detectar, para verificar que la amplificación está funcionando eficientemente (control positivo). De esta manera se evita obtener falsos negativos, falsos positivos y se pueden detectar problemas de contaminación.

Si bien para cada virus se requiere una combinación de partidores (2 partidores), en varios casos fue necesario diseñar varias combinaciones antes de lograr una detección exitosa, por ejemplo, en vides se diseñaron 45 combinaciones. Los principales inconvenientes fueron que el tamaño del fragmento amplificado no correspondía al esperado, que aparecían bandas inespecíficas que dificultaban la lectura del gel o que el fragmento amplificado no se pudo secuenciar. Que el partidor diseñado no fuese capaz de amplificar el fragmento esperado, podría deberse a que la región seleccionada estuviese en una zona del genoma de difícil acceso por tener muchas estructuras secundarias. Sin embargo, después de realizar varias pruebas comprobamos que el principal problema fue el cambio en el proveedor que sintetizaba los óligos, comprobando que esto alteró la calidad, eficiencia y especificidad de éstos, así como

también dificultó la secuenciación de los fragmentos amplificados. Por lo anterior, el tiempo y recursos invertidos en el diseño de partidores y la evaluación de su funcionalidad fueron más de lo presupuestado. La repetición de esta estrategia implicó, además del gasto en la síntesis del nuevo partidador, realizar nuevas extracciones de ARN (uso de reactivos), sintetizar más cDNA (uso de transcriptasa reversa), hacer nuevos PCR (Taq DNA polimerasa) y realizar muchas secuenciaciones.

Durante el desarrollo del proyecto se analizaron 200 plantas, se procesaron más de 300 muestras y se analizaron 2.307 virus, esto sin incluir las repeticiones. Se estandarizaron eficientemente todos los virus que infectan carozos y pomáceas, y 15 de los 17 virus que infectan vides. Según nuestro criterio de evaluación consideramos que las amplificaciones logradas para los virus GLRaV6, GLRaV7 y SLRSV aún no son satisfactorias. Y pese a que se diseñaron 5, 4 y 2 combinaciones de partidores respectivamente, pretendemos continuar trabajando en su optimización.

En el caso del virus PPV, si bien estandarizamos los partidores diseñados por Bioscan, estamos trabajando en la estandarización de partidores que el SAG define como reglamentarios para realizar estos análisis, ya que pretendemos acreditarlos como laboratorio de certificación.

E.3) Determinación del método de extracción de ARN

(Verificar todos de extracción?)

Después de revisar distintos protocolos utilizados en plantas leñosas y considerando la experiencia previa de la asesora, se seleccionaron 3 métodos para realizar pruebas de laboratorio. Como Bioscan es un laboratorio orientado a diagnósticos comerciales, un criterio importante para la selección fue el tiempo que demoraba el procesamiento de las muestras y la cantidad de tejido requerida.

(¿debería ser otro el enfoque?)

Se evaluó la extracción de ARN mediante el Kit Quiagen (MacKenzie y otros, 1997), extracción mediante partículas de sílice (Malinowski, 1997) y el Kit V-Gene, procesando muestras de hojas y estacas. Lo primero que se evaluó fue la cantidad, calidad e integridad del ARN, realizando cuantificaciones y observando el ARN en geles de agarosa. Como el PCR no requiere grandes cantidades material genético, los puntos más importantes fueron calidad e integridad. Con los dos primeros métodos de extracción se obtuvo ARN, por lo que se siguió trabajando con ellos. El ARN obtenido a partir de la extracción mediante partículas de sílice estaba más contaminado con ADN, por lo que fue necesario tratarlo con ADNasa. Posteriormente, se evaluó la factibilidad de amplificación por PCR y la reproducibilidad de los resultados. Como se observa en la Tabla 1, la muestra 97 resultó ser positiva para el virus ArMV y GLRaV3, cuando la extracción del ARN se realizó con el kit Quiagen, sin embargo, cuando la extracción se hizo mediante partículas de sílice, se observó un chorreo en el gel que no permitió dar un resultado. De manera similar, la muestra 109 resultó ser positiva para el virus GLRaV3 cuando la extracción del ARN se realizó con el kit Quiagen y negativa cuando la extracción se hizo mediante partículas de sílice. En cuanto a la reproducibilidad, vemos que tanto la muestra 23 como la 30 aparecen siempre positivas para el virus ArMV cuando en la extracción se utilizó Quiagen, en cambio, con sílice este resultado fue variable, apareciendo algunas veces positivo y otras negativo. Por lo tanto, la

Se usó para verificar la integridad

extracción mediante el Kit Quiagen fue la única que resultó ser reproducible para todos los tejidos y épocas analizadas, siendo éste el método seleccionado.

La elección del método de extracción de ARN resultó ser un punto crítico durante la ejecución del proyecto. Si bien la idea original era utilizar el método más económico, fue indispensable usar el Kit Quiagen. Las plantas presentan un alto contenido de polifenoles y polisacáridos, por lo tanto, durante el proceso de extracción del material genético pueden quedar ciertas cantidades de estos compuestos que pueden interferir con la detección posterior del patógeno, favoreciendo la degradación del ARN o inhibiendo la reacción de RT-PCR. Además, el contenido de polifenoles y polisacáridos varía según el tejido y la época del año. Por tanto, el protocolo de extracción para purificar ARN debe eliminar estos compuestos en cualquier tejido o época, para tener así resultados comparables. El método del Kit Quiagen al producir un ARN más "limpio" que los otros protocolos, fue el único sistema que permitió tener resultados reproducibles en todos los casos analizados. Esto es de vital importancia para entregar al cliente una información confiable.

Tejidos
Actualmente, estamos evaluando un nuevo Kit de extracción de ARN de plantas que permitirá bajar los costos del procesamiento de las muestras. Se hicieron pruebas preliminares en carozos y funcionó de manera similar a Quiagen. Falta probarlo en los otros frutales, pero aparentemente es bastante promisorio.
*34
Retos*

E.4) Determinación de las condiciones óptimas de recolección de muestras y selección de las mejores épocas y tejidos para el análisis.

Durante las distintas épocas del año, primavera, verano y otoño-invierno, se recolectó material vegetal proveniente de distintas partes de cada una de las plantas seleccionadas para el monitoreo.

En vides, los mejores resultados se obtuvieron al extraer ARN de una mezcla que incluye parte de las nervaduras basales de la hoja y del pecíolo, y al realizar extracciones en sarmientos lignificados, a partir de tejido enriquecido en floema, presentando este último tejido la mayor capacidad de detección viral. Estos resultados concuerdan con el hecho que los virus se mueven a través del tejido vascular de la planta y que en invierno el contenido de inhibidores del PCR disminuye. La utilización de sarmientos verdes funcionó de manera similar o levemente inferior que la mezcla de nervadura y pecíolo; sin embargo, el procesamiento de este tipo de tejido es bastante engorroso y por eso no lo recomendamos en nuestro protocolo.

Si bien existe un tejido óptimo, que coincide con una época del año, el utilizar el método de extracción del kit Quiagen nos permitió tener buenos niveles de detección durante todo el año, alcanzando un nivel promedio de sensibilidad cercano al 80%, esto considerando los 14 virus de vides. Los niveles de detección viral durante el año fueron de un 91% en otoño-invierno, un 71% en primavera y un 74% en verano, época en que el contenido de polifenoles y polisacáridos es más elevado. Si consideramos cada virus individualmente, tenemos que los mejores niveles de detección anual se obtuvieron con GFkV (90%), GLRaVs (84%) y GRSLaV (80%).

En **carozos** y **pomáceas**, los mejores tejidos para realizar diagnósticos virales fueron la mezcla de nervadura-pecíolo y tejido enriquecido en floema de estacas leñosas. La excepción la constituyeron los perales y los cerezos, donde las extracciones utilizando partes de la hoja no funcionaron, por lo que fue necesario utilizar tejido enriquecido en floema de estacas herbáceas.

De manera similar a lo comentado en vides, se obtuvo buenos niveles de detección durante todo el año, excepto para **carozos** donde la mejor época fue claramente primavera, ya que en verano y otoño los promedios de sensibilidad no fueron superiores al 60%. En **pomáceas**, considerando los 3 virus en estudio, los niveles de detección viral alcanzaron un 73% en verano, un 91% en otoño-invierno y un 82% en primavera. El virus ACLSV presentó el mejor nivel de detección anual con un valor de 100%.

Durante los distintos muestreos se corroboró que la distribución de los virus en la planta no es homogénea, situación que se ejemplifica en la **Figura 5**. Por esta razón en cada planta se deben tomar muestras de cada punto cardinal y procesarlas en conjunto durante la extracción de ARN previa al análisis.

Se determinó que durante la recolección y transporte del material vegetal, éste se debe mantener a una temperatura cercana a los +4°C. Para mantener esta temperatura fue suficiente utilizar un "cooler" y/o "packs" de hielo gel. El transporte de las muestras al laboratorio se debe hacer en un plazo de 24 h.

Con la información recopilada se diseñó un instructivo que le permitirá al cliente contar con la información necesaria para realizar correctamente la recolección del material vegetal en las distintas épocas del año y conservar las muestras en las condiciones adecuadas para tener un diagnóstico exitoso (ver **instructivos para toma de muestra** en anexo).

E.5) Implementación comercial del servicio de análisis viral

El servicio de diagnóstico viral implementado en Bioscan se presenta como un producto único en Chile, por la cantidad de patógenos detectables en una sola muestra y en un único lugar. El servicio con las características que se ha definido no posee competidores directos. Si bien algunas Universidades realizan detecciones por PCR, éstas tienen como prioridad fines de investigación, por lo que se demoran en entregar los resultados del análisis y les cuesta adaptarse a modificaciones que puedan demandar los clientes. Bioscan, al orientar sus servicios en el ámbito comercial, está capacitado para procesar un gran número de muestras, entregar resultados en un plazo de 3 a 7 días, diseñar partidores para cualquier patógeno requerido y ofrecer precios competitivos, ya que conseguimos descuentos por comprar grandes cantidades de reactivos y/o importarlos directamente.

Si bien el mercado de diagnóstico viral no es un mercado establecido, se puede considerar como un mercado en formación. Es así como durante el desarrollo de este proyecto realizamos exitosamente 350 diagnósticos virales de manera comercial. Con esto, logramos poner a prueba nuestro instructivo de toma de muestras en cuanto a la

Je da en entendido

recolección y envío del material vegetal, así como también el material entregado para realizar estos procesos. Se estableció un protocolo para el ingreso de las muestras, que incluye asignación de un código e ingreso de éste en una planilla Excel. El tejido vegetal se puede almacenar a +4 °C o -20 °C, dependiendo del tiempo que se quieran mantener las muestras en el laboratorio (días o meses) Sin embargo, para fines comerciales se decidió mantener congelado el ARN vegetal durante 6 meses, tiempo durante el cual el cliente podría solicitar nuevos análisis sin necesidad de incurrir en costos de extracción, pagando sólo la reacción de PCR. Se definió un formato para la entrega del resultado del análisis viral, el cual es firmado por el bioquímico o el agrónomo especialista. Este informe se les entregó tanto a los productores que facilitaron plantas para la estandarización de los virus en estudio como a los clientes que enviaron muestras comerciales, siendo esta información confidencial.

Externo
Bioscan cuenta con un equipo de bioquímicos y laboratoristas de planta para el procesamiento de muestras vegetales y con un grupo de bioquímicos capacitados a los cuales recurre cuando es necesario procesar un número importante de muestras, lo que permite mantener los plazos de entrega de resultados.

Durante el proyecto pudimos comprobar que el problema de infecciones virales se encuentra bastante generalizado. Muchas veces los dueños de las plantas desconocen esta situación y le asignan los problemas productivos a otros factores, gastando recursos innecesariamente. Un aporte importante de este proyecto fue educar a los productores que participaron en el proceso de estandarización, respecto de los síntomas y efectos productivos de los virus en frutales, los distintos métodos de diagnóstico que se utilizan para detectar estos patógenos y la manera correcta de recolectar muestras para un análisis viral. Todas estas actividades sirvieron para introducir el servicio al mercado.

Finalmente, es importante mencionar que aquellos productores o viveristas que realizan continuamente exámenes y monitoreos a sus plantas presentan menores porcentajes de infecciones virales, teniendo muchas plantas libres de virus.

F) CONCLUSIONES

- Se diseñaron partidores y se estandarizó la técnica de RT-PCR para detectar eficientemente 23 virus que infectan vides, carozos y pomáceas.
- El mejor método de extracción de ARN para especies frutales leñosas fue el Kit comercial Quiagen, siendo este sistema más sensible y reproducible que sílice.
- En vides y pomáceas fue factible realizar detecciones virales durante todo el año, con un nivel promedio de sensibilidad superior al 80%.
- En carozos, se recomienda realizar detecciones virales en primavera, cuando los niveles de sensibilidad son superiores al 80%.

Quiagen SA

- En vid, los niveles de detección viral alcanzaron un 74% en verano, un 91% en otoño-invierno y un 71% en primavera. Los mejores niveles de detección anual se lograron con los virus GFkV (90%), GLRaVs (84%) y GRSLaV (80%).
- En pomáceas, los niveles de detección viral alcanzaron un 73% en verano, un 91% en otoño-invierno y un 82% en primavera. El mejor nivel de detección anual se logró con el virus ACLSV con un valor de 100%.
- En vides y pomáceas la mejor época de diagnóstico fue otoño-invierno, en floema de estacas leñosas.
- En carozos la mejor época de diagnóstico fue primavera, en pecíolos de hojas o floema de estacas herbáceas.
- El realizar monitoreos de presencia de virus permite seleccionar material con pocos virus e ir disminuyendo gradualmente los porcentajes de infecciones virales.

G) IMPACTOS DEL PROYECTO

Bioscan implementó un servicio de diagnóstico viral para especies frutales que está regulado por estrictas medidas de seguridad y controles de calidad, adaptándose a las exigencias del SAG. Para evitar posibles contaminaciones, se cuenta con piezas separadas para preparar reactivos, procesar muestras, realizar la reacción de RT-PCR y electroforesis. Para tener resultados confiables, en cada reacción de PCR se incluyen controles negativos y positivos. Este servicio se somete regularmente a evaluaciones de reproducibilidad y sensibilidad, cada 20 muestras se repite una. Constantemente se está revisando la información pertinente para incorporar datos nuevos o volver a diseñar partidores.

2,

A futuro se continuará trabajando para disminuir los costos del procesamiento y análisis de las muestras. Para esto se están evaluando nuevos métodos de extracción de ARN y realizando contactos internacionales para importar directamente y/o ser representantes de diversos servicios y reactivos de uso frecuente en biología molecular.

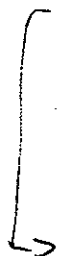
Es necesario continuar potenciando el área comercial del servicio de diagnóstico viral vegetal, realizar actividades de difusión y mantener el servicio de capacitación y asesoramiento técnico, ya que constituyen un elemento diferenciador en el mercado. La asesoría técnica es importante para orientar la selección de plantas sintomáticas en primavera o verano, las que se dejarán marcadas para recolectar estacas que se utilizarán en los análisis virales de otoño-invierno.

A continuación se exponen los puntos más relevantes derivados de la aplicación de los resultados del proyecto.

Como llevar a aplicaciones + simples } - (100) en tecnología
 } - (50) en uso

- Implementación de un laboratorio de excelencia que realiza un diagnóstico viral de alta precisión mediante un método moderno, RT-PCR, de manera rápida y a un bajo costo.
- Realización de actividades comerciales de diagnóstico viral. A la fecha se han efectuado más de 350 análisis, la mayoría de cuales se hicieron en vid. Esto da cuenta de la eficiente implementación de los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto.
- Elaboración y entrega de Manuales de Toma de Muestras; implementación de servicios de capacitación y actividades de difusión que incluyen seminarios, folletos, información en la página WEB de Bioscan, visitas a terreno, etc. (ver Anexos). Dentro de las principales actividades desarrolladas están diversas charlas realizadas a las principales viñas del país, donde se explicó la importancia económica y productiva de las enfermedades virales y los métodos de diagnóstico que permiten detectar a estos patógenos. Se destaca la presentación oral del trabajo "Método para la detección de virus en vid y su monitoreo a través del año", de los autores **Uquillas, C., Lizama, L., Vergara, E. y Guajardo, V.**, en el XVI Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, realizado en La Serena entre el 14 y el 17 de noviembre de 2006. Esta instancia permitió dar a conocer el trabajo que Bioscan está realizando en el ámbito agrícola, ya que anteriormente la empresa sólo era conocida en el área de salud humana.
- Formación de un equipo profesional experto en virología, dispuesto a resolver consultas en el ámbito práctico y teórico.
- Acreditación de Bioscan como laboratorio de análisis viral de Plum Pox Virus (PPV). Actualmente, se encuentra en curso la tramitación de la acreditación por parte del SAG, de Bioscan como laboratorio de certificación de plantas de carozos libres del virus PPV.
- ~~Ofrecer un método preventivo que permita realizar una mejor selección del material vegetal a comprar o propagar, favoreciendo que existan menores costos de producción, mayor producción y calidad de la fruta.~~
- Ofrecer a los viveristas y productores de frutas la posibilidad de verificar el estado fitosanitario de las plantas, ya sea, para optimizar la productividad de los huertos o certificar la calidad de las mismas.
- Ayudar a disminuir las aplicaciones innecesarias de químicos o fertilizantes. La capacitación de profesionales en diagnóstico viral y los análisis de laboratorio, permiten conocer que un determinado problema productivo se debe a la presencia de virus, y evitar gastar recursos en otros factores, pudiendo disminuir los residuos químicos en los frutos.

- Presentación de un Proyecto INNOVA de apoyo a negocios tecnológicos denominado: "Comercialización de servicios de detección de patógenos y análisis varietales, por técnicas moleculares, para la industria frutícola y vitivinícola". La finalidad es contar con recursos que permitan diseñar e implementar la estrategia comercial para introducir al mercado los servicios de análisis y detección de patógenos virales en vides, carozos y pomáceas mediante la técnica de PCR, así como también la identificación varietal de vides.
- A futuro pretendemos traspasar la tecnología de PCR convencional a PCR tiempo real, para poder elaborar kits de diagnóstico viral. Estos kits podrían ser utilizados para masificar el diagnóstico molecular en el sector agrícola e incluso para iniciar exportaciones de estos kits de diagnóstico. Como beneficios adicionales esto nos permitiría tener la plataforma de conocimientos para realizar desarrollos equivalentes en otros patógenos.



Algunos trabajos hoy en curso

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico, contiene la información genética. Está constituido por cadenas de nucleótidos, compuestos de un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada.

ADNasa: Enzima que degrada el ADN.

ARN: Ácido ribonucleico. Está constituido por cadenas de nucleótidos, compuestos de un azúcar (ribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. En general el ARN se forma a partir del ADN (transcripción), y se traduce en proteínas. Este tipo de ácidos nucleicos incluyen el m-ARN, t-ARN, r-ARN y el genoma de algunos virus.

Base nitrogenada: Molécula orgánica cíclica que contiene nitrógeno, y que forma los mononucleótidos. Hay bases púricas (Adenina y Guanina) con dos ciclos, y pirimídicas (Citosina, Timina y Uracilo) con un ciclo.

Electroforesis: Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla de moléculas cargadas (proteínas, ADNs, ARNs); requiere de un campo eléctrico y de un soporte, el que generalmente es un gel. La separación se logra por el movimiento de las moléculas cargadas en el campo eléctrico.

Floema: tejido vascular que conduce azúcares y otros nutrientes.

Gen: Unidad hereditaria que se transfiere de los progenitores a los descendientes y cuya información afecta la aparición de un rasgo biológico (estructural y funcional). Es un fragmento lineal de la molécula de ADN que contiene la información para producir una cadena proteica.

Genoma: La totalidad de la información genética de un organismo en particular.

Gel de agarosa: Polímero coloidal que al gelificar genera una macrorretícula que permite el paso de moléculas de diferentes tamaños, utilizándose para visualizar fragmentos de ADN o ARN.

Parásito: Organismo que vive a costa de otro causándole perjuicio.

Partidor: Secuencia corta de ADN a partir de la cual se puede iniciar la replicación del ARN o ADN.

Patógeno: Microorganismos que originan y desarrollan las enfermedades, como por ejemplo, hongos, bacterias y virus.

PCR: Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es una técnica de biología molecular que utiliza una enzima denominada ADN polimerasa que copia cadenas de ADN en un proceso que simula la forma en la que el ADN se replica de modo natural en la célula y permite copiar millones de veces (amplificación), en

pocas horas, segmentos de ADN, desde el genoma de una bacteria, hongo, virus, célula animal o vegetal. Para la replicación se requieren **partidores**, los cuales dependiendo de su secuencia y tamaño determinan la especificidad de la reacción. El método amplifica específicamente segmentos de ADN, mediante ciclos de desnaturación del templado (permiten abrir la doble hebra de ADN), adición de los partidores, unión de partidores al templado y replicación usando la enzima **ADN polimerasa** que es termoestable. El grado de amplificación logrado alcanza un máximo de 2^N , donde N es el número de ciclos de amplificación. Además de los partidores y la ADN polimerasa, la reacción de PCR debe contener el **ADN templado** (ADN que será amplificado) y los "bloques con que se arma el ADN", que son los **deoxinucleótidos trifosfato** (dNTPs, que incluyen dATP, dTTP, dGTP y dCTP).

Pecíolo: Parte de la hoja que une la lámina al tallo.

RT- PCR: Reacción de cadena reversa de la polimerasa. Es una variación de la técnica de PCR en la cual el cADN se hace a partir del RNA mediante una transcripción inversa. Posteriormente el cADN se amplifica usando protocolos estándares de PCR.

Secuenciación: Proceso mediante el cual se determina el orden de las bases nitrogenadas de un ácido nucleico.

Transcripción: Proceso por el cual se sintetiza una molécula de ARN a partir de una cadena de ADN que actúa como molde.

Transcripción inversa: Proceso por el que se sintetiza ADN a partir de ARN que actúa como molde. El ADN sintetizado se denomina cADN.

Virus: Agente infeccioso o patogénico, constituido por una proteína que encapsula a un ácido nucleico, que en el caso de plantas es principalmente ácido ribonucleico o ARN.

ANEXOS

TABLAS

Tabla 1: Comparación de los resultados del análisis viral de plantas de vides, utilizando el método de extracción de ARN de sílice y el Kit comercial Quiagen.

ID	Fecha	Lugar	Var	TM	GFLV	ToRSV	ArMV	GVA	GVB	GLRaV3	actina	Extracción
97	10.5.05	Santa Cruz	Syrha	Est Est	N N	N N	P Ch	P P	N N	P Ch	P P	Quiagen Sílice
109	10.5.05	Rapel	Crimson	Est Est	N N	N N	N Ch	P P	N N	P N	P P	Quiagen Sílice
23	18.1.05	Los Andes	Flame	Hoj Hoj	N *	N *	P (3/3, 16/3, 15/4) N (7/3)	N *	N *	P *	P P	Quiagen Sílice
30	18.1.05	Los Andes	Flame	Hoj Hoj	N *	N *	P (7/3, 16/3) N 3/3, 15/4)	N *	N *	P *	P P	Quiagen Sílice

ID = Número de muestra

Var = Variedad

TM = Tipo de muestra analizada, se incluyen estacas (Est) y hojas (Hoj)

GFLV = Grapevine fanleaf virus

ToRSV = Tomato ringspot virus

ArMV = Arabis mosaic virus

GVA = Grapevine vitivirus A

GVB = Grapevine vitivirus B

GLRaV3 = Grapevine leafroll associated virus 3

P = positivo, detectado

N = negativo, no detectado

Ch = chorreo

FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

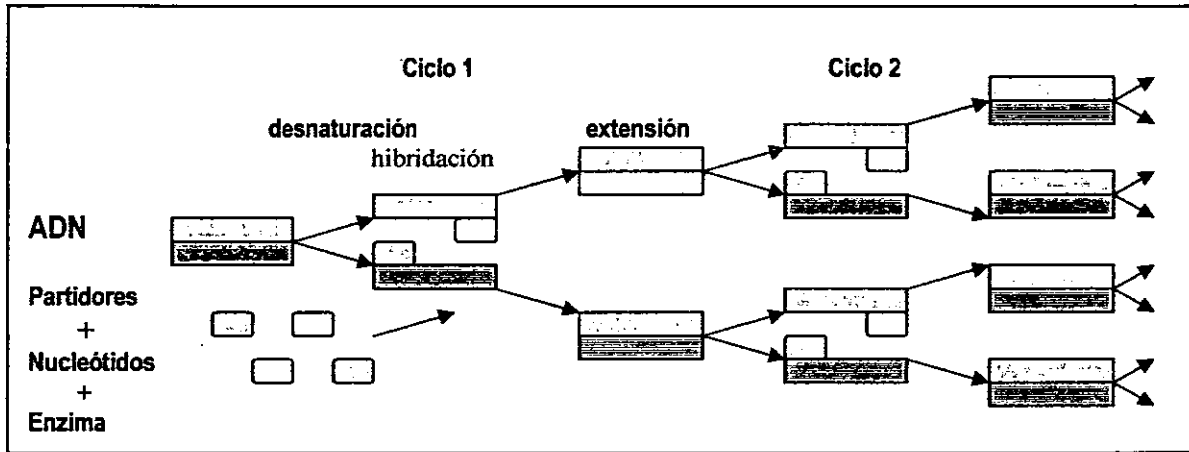


Figura 2: Esquema de la detección de virus de plantas por RT-PCR.

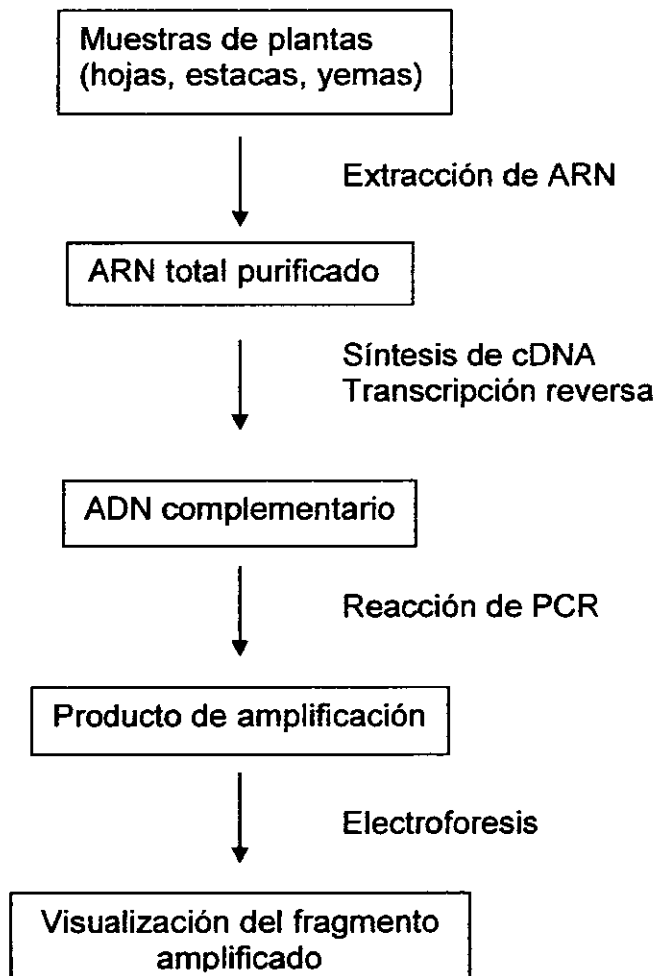


Figura 3: Resultados representativos obtenidos con la técnica de Transcripción Reversa seguida de PCR (RT-PCR) en la detección de 15 virus de vides utilizando distintas muestras de campo. Se seleccionaron 15 plantas de vides infectadas con distintos virus, se extrajo ARN, se realizó la transcripción reversa con partidores al azar y un PCR con los partidores específicos de cada virus. Los fragmentos amplificados se observaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Las líneas 1 y 17 representan el estándar de peso molecular que incluye fragmentos entre 100 y 1000 pares de bases (pb). Las líneas 2 a 16 indican el virus analizado en cada muestra, donde la línea 2 corresponde a Arabis mosaic virus (ArMV), línea 3 a Grapevine fleck virus (GFkV), línea 4 a Grapevine leafroll associated virus 8 (GLRaV 8), línea 5 a GLRaV 4, línea 6 a Grapevine vitivirus A (GVA), línea 7 a Tobacco ringspot virus (TRSV), línea 8 a GLRaV 3, línea 9 a GLRaV 2, línea 10 a GLRaV 5, línea 11 a Tomato ringspot virus (ToRSV), línea 12 a Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV), línea 13 a Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV), línea 14 a Grapevine vitivirus B (GVB), línea 16 a GLRaV 1 y línea 17 a Grapevine fanleaf virus (GFLV).

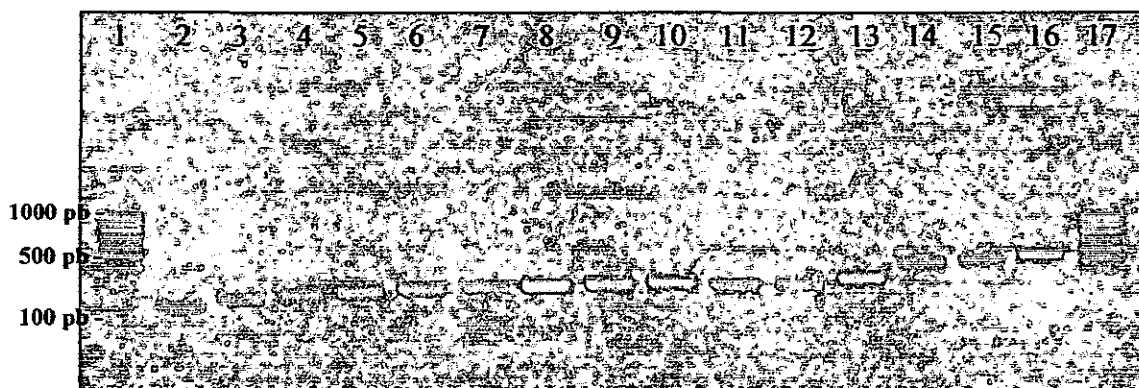


Figura 4: Distribución heterogénea de los virus en la planta. A modo de ejemplo de lo observado habitualmente en el campo, se indica el resultado del diagnóstico viral de una vid vinífera de variedad Syrah, analizando por separado los dos brazos principales de la planta. En rojo se destacan las diferencias encontradas.

Fecha	Lugar	Variedad	TM	Ubicación campo	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	RSPaV
18-1-06	Lolol	Syrah	Hoj	lado mar	P	P	P	P
18-1-06	Lolol	Syrah	Hoj	lado cordillera	P	P	N*	P

TM = Tipo de muestra analizada

Hoj = hojas

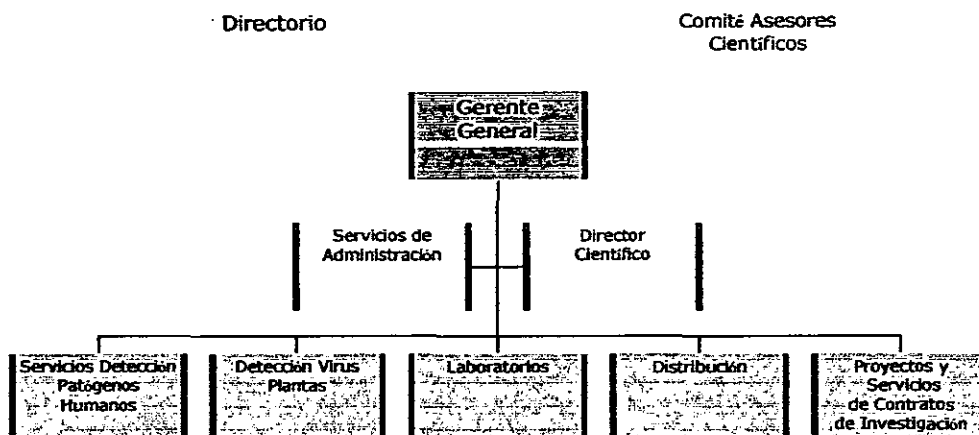
GLRaV = Grapevine leafroll associated virus (1, 2 y 3)

RSPaV = Rupestris stem pitting-associated virus

P = positivo, detectado

N = negativo, no detectado

Figura 5: Esquema organizacional de Bioscan e Investigadores del área vegetal



INVESTIGADORES ÁREA VEGETAL

- Asesor Científico: Dr. Patricio Arce (Biólogo, Ph.D. Biología Molecular)
- Asesor Jefe de Proyecto: Dra. Carolina Uquillas (Ing. Agrónomo Ph.D. Biología Celular y Molecular)
- Bioquímicos
 - Jefe de Laboratorio: Exequiel Vergara
 - Análisis de muestras: Verónica Guajardo
 - Análisis bioinformáticos: Luis Lizama

DETECCIÓN DE VIRUS EN PLANTAS

La detección de un virus específico, incluso en plantas asintomáticas, es posible mediante la técnica de biología molecular PCR, utilizada desde hace 10 años por Bioscan en Chile.

El método PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la identificación sensible y específica de un determinado microorganismo (bacteria, virus u otro) mediante la amplificación en millones de veces de un segmento de su DNA.

Actualmente, PCR es el único capaz de detectar los virus Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV) y Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV), responsables de las enfermedades conocidas como "virus de la Redglobe" y "puntuaciones en la madera" en vid.

VENTAJAS DEL MÉTODO PCR

Este método supera a otros sistemas de detección de microorganismos, principalmente, por las siguientes cualidades:

1. Resultados en pocas horas

Técnicas alternativas utilizadas para detectar patógenos vegetales requieren de días e incluso años, para obtener resultados.

2. Detección de cantidades muy pequeñas del patógeno

Esta técnica utiliza como blanco el DNA del patógeno, del cual selecciona un fragmento muy pequeño que luego amplifica para su observación.

3. Detección sin reacciones cruzadas

Los partidores utilizados para amplificar los fragmentos son diseñados de manera que se unan a secuencias de DNA que son únicas del patógeno buscado, por lo tanto, se evita la unión al DNA de otros organismos que estén presentes en la muestra.

4. El método por PCR no entrega falsos positivos y el número de falsos negativos es muy bajo.

5. No es necesario que los patógenos estén vivos. La toma de muestra y su transporte no requieren condiciones especiales.

6. El PCR es capaz de identificar microorganismos difíciles o imposibles de cultivar.

7. Una sola muestra sirve para detectar variados patógenos y hacer nuevos análisis en muestras ya procesadas (BIOSCAN mantiene congeladas durante seis meses todas las muestras recibidas).

RESPALDO BIOSCAN

BIOSCAN ha desarrollado los partidores necesarios para la detección de más de 50 patógenos humanos, entre los que se incluyen virus, bacterias, hongos y protozoos. En 2004 amplió su cobertura a la detección de virus en frutales. Desde entonces, ha estandarizado la técnica para detectar 12 patógenos vegetales. (Ver lista al reverso)

El equipo científico de BIOSCAN está conformado por; doctores en Biología Molecular, ingenieros agrónomos, bioquímicos y técnicos especializados. La empresa cuenta con **infraestructura y equipamiento de última generación**, que permiten realizar diagnósticos con alta confiabilidad, bajo estrictas normas de seguridad.



VIRUS DETECTADOS POR BIOSCAN

Virus	Vides	Pomáceas	Carozos
Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV1)	O		
Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV2)	O		
Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV3)	O		
Grapevine leafroll associated virus 4 (GLRaV4)	O		
Grapevine leafroll associated virus 5 (GLRaV5)	O		
Grapevine leafroll associated virus 6 (GLRaV6)	O		
Grapevine leafroll associated virus 7 (GLRaV7)	O		
Grapevine fanleaf virus (GFLV)	O		
Grapevine fleck virus (GFkV)	O		
Grapevine vitivirus A (GVA)	O		
Grapevine vitivirus B (GVB)	O		
Arabis mosaic (ArMV)	O		
Tomato ringspot virus (ToRSV)	O	O	O
Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV)	O		
Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV)	O		
Tobacco ringspot virus (TRSV)	O		
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	O		
Apple chlorotic leafspot virus (ApCLSV)		O	O
Apple mosaic virus (ApMV)		O	O
Plum pox virus (PPV)			O
Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)			O
Prune dwarf virus (PDV)			O
Cherry leafroll virus (CHLRV)			O

TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS VEGETALES

Para facilitar la recolección y envío del material vegetal BIOSCAN ha desarrollado un Instructivo de Toma de Muestra, que se encuentra disponible en nuestra página web (www.bioscan.cl), y que indica de manera simple e ilustrada los pasos a seguir y las condiciones que aseguran un diagnóstico exitoso.

BIOSCAN proporciona además un "kit" que incluye todo el material necesario para la toma de la muestra.

Dr. Carlos Charfín 1486, Providencia
C.P. 7500508 Santiago, Chile
Fono: (56-2) 3740884 Fax: (56-2) 3740887
www.bioscan.cl



INSTRUCTIVO PARA TOMA DE MUESTRAS DE VID

Un exitoso diagnóstico viral depende en gran medida de la forma en que se recolectan las muestras, por eso es necesario seguir los siguientes pasos:

1. ¿QUÉ MUESTREAR?

Se puede recolectar material vegetal a partir de **plantas establecidas en terreno** o a partir de **plantas jóvenes de vivero**. En el caso de plantas establecidas, se recolectan hojas o sarmientos (ver sección 3.1). Si se trata de plantas de vivero muy pequeñas, se seleccionan plantas completas.

La elección de las plantas depende del objetivo deseado. Si quiere determinar la naturaleza de algún problema productivo y verificar si éste se debe a la presencia de virus, seleccione aquellas plantas que tengan **síntomas sospechosos**. Si desea conocer la presencia insipiente de virus, seleccione al azar plantas **asintomáticas**. En ambos casos, usted debe **marcar las plantas escogidas** utilizando un rotulador permanente.

2. MATERIALES REQUERIDOS

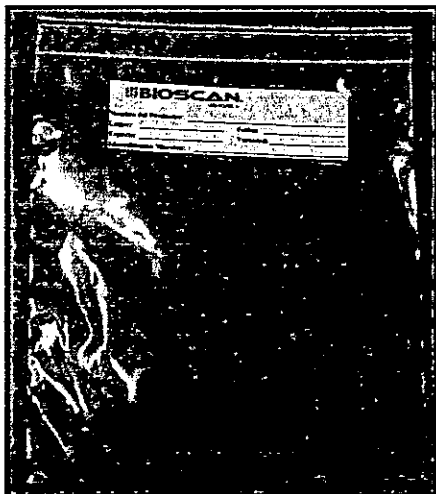
2.1. KIT de toma de muestra BIOSCAN

El KIT incluye:

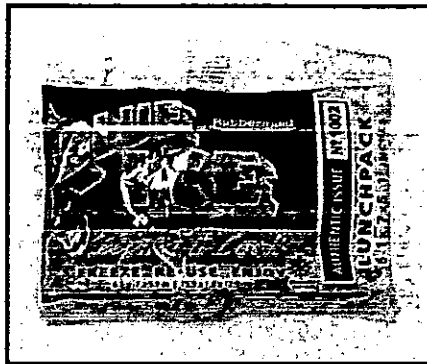
- a) 4 bolsas para la recolección de hojas
- b) 4 bolsas para la recolección de sarmientos
- c) 1 paquete de hielo-gel
- d) 1 caja de plumavit

a) Bolsa para recolección de hojas
(Bolsa tipo Ziploc de 18X22 cm.)

b) Bolsa para recolección de sarmientos
(Bolsa tipo Ziploc de 23X5 cm.)

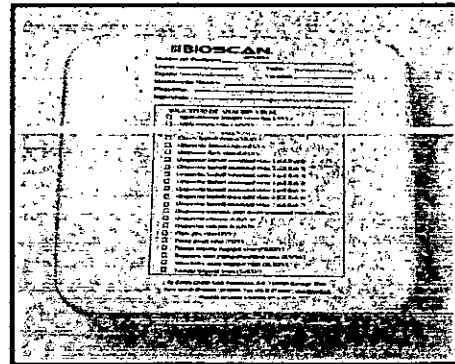


c) Paquete de hielo gel para mantener temperatura adecuada



Nota: guardar en el congelador

d) Caja de plumavit para el envío del material



2.2. Tijeras de podar

2.3. Desinfectantes

Antes de realizar cualquier corte debe desinfectar la tijera de podar. Para desinfectarla utilice etanol 95% o hipoclorito de sodio al 10%.

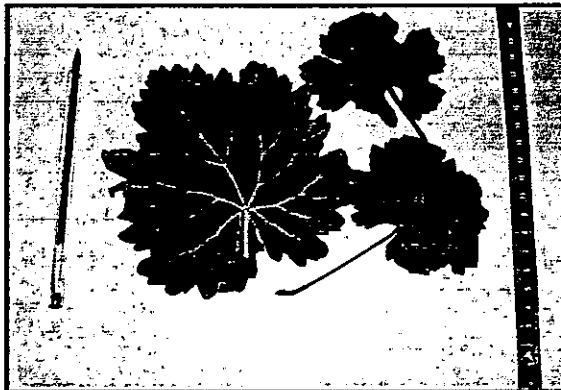
- Etanol 95%: disponible en cualquier farmacia.
- Hipoclorito de sodio al 10%: 100 ml. de cloro en 1 lt. de agua.

2.4. Lápiz rotulador permanente

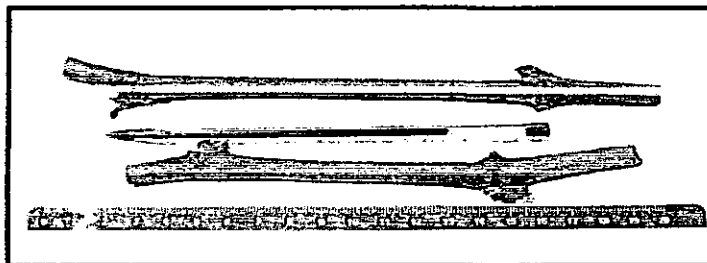
3. ¿CUÁNDO Y CÓMO HACERLO?

3.1. Obtención del material vegetal.

Primavera: Mientras la parra esté brotando tome 3 hojas con pecíolos de la parte media no lignificada de brotes jóvenes, de cada una de las cuatro orientaciones de la cepa si se trata de uva de mesa (12 hojas en total), o de cada una de las dos orientaciones si es uva vinífera (6 en total).



Otoño-invierno: Tomar 2 sarmientos lignificados (del crecimiento de la temporada) de unos 10-20 cm. de largo y de unos 0,5-1 cm. de diámetro, de cada una de las cuatro orientaciones de la planta si es uva de mesa (8 en total), o de cada una de las dos orientaciones si es uva vinífera (4 en total).



3.2. Introduzca el tejido recolectado en una bolsa plástica (tipo Ziploc), usando una bolsa por cada orientación de la planta. Evite tener condensaciones de agua en el interior de las bolsas.

3.3. Complete la información solicitada en la etiqueta de cada bolsa: nombre del productor, lugar, fecha, especie frutal, variedad e identificación de la muestra (esto lo determina cada productor, Ej. Cuartel 2 hilera 3 planta 5).

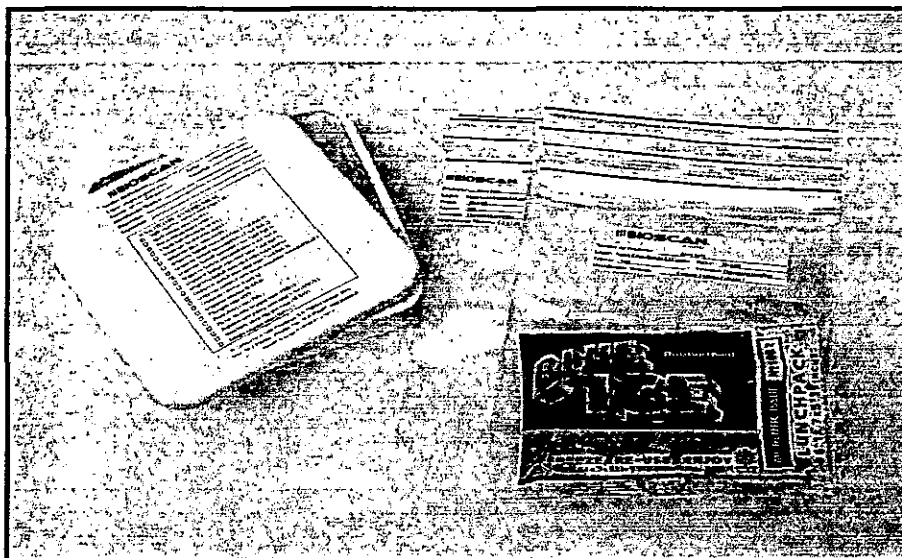


3.4. Desinfecte la tijera de podar. Para la desinfección utilice los productos indicados en la sección 2.3 y posteriormente enjuague la tijera con agua. Repita esta operación entre planta y planta.

3.5. Para evitar la deshidratación del material, guarde lo más rápido posible las bolsas con las muestras a 4 °C. Mientras esté en el campo puede utilizar un "cooler" (no ponga las bolsas directamente sobre hielo) y posteriormente puede guardarlas en el refrigerador (en la parte de las verduras). Mantenga las bolsas en estas condiciones durante todas las horas previas al envío. **Evitar la deshidratación del material vegetal es fundamental para un diagnóstico exitoso.**

4. ENVÍO DE LA MUESTRA

Para enviar las muestras utilice el **KIT de toma de muestra** que entrega **BIOSCAN**.



- 4.1. Use un envase de plumavit por planta (un KIT).
- 4.2. Introduzca las bolsas con sarmientos u hojas en la caja de plumavit. Ponga el paquete de hielo-gel, previamente congelado, entremedio de las bolsas.
- 4.3. Complete la información solicitada en la planilla incluida en la caja. Si lo considera necesario incluya una breve descripción de los síntomas observados y si éstos se presentan aislados.
- 4.4. Selle la caja con cinta adhesiva e introdúzcala en un sobre o envuélvala con papel.
- 4.5. Envíe las muestras al laboratorio de BIOSCAN en un plazo no superior a 24 hr. desde su recolección. Para un óptimo diagnóstico viral mediante la técnica de PCR, recomendamos enviar las muestras el mismo día de la recolección. En épocas muy calurosas prefiera realizar el envío a través de un transporte nocturno.

Carolina Uquillas H.
Ingeniero Agrónomo.
Ph. D. Biología Celular y Molecular

INSTRUCTIVO PARA TOMA DE MUESTRAS DE CAROZOS Y POMÁCEAS

Un exitoso diagnóstico viral depende en gran medida de la forma en que se recolectan las muestras, por eso es necesario seguir los siguientes pasos:

5. ¿QUÉ MUESTREAR?

Se puede recolectar material vegetal a partir de **plantas establecidas en terreno** o a partir de **plantas jóvenes de vivero**. En el caso de plantas establecidas, se recolectan ramillas con hojas o estacas leñosas (ver sección 3.1). Si se trata de plantas de vivero muy pequeñas, se seleccionan plantas completas.

La elección de las plantas depende del objetivo deseado. Si quiere determinar la naturaleza de algún problema productivo y verificar si éste se debe a la presencia de virus, seleccione aquellas plantas que tengan síntomas sospechosos. Si desea conocer la presencia insipiente de virus, seleccione al azar plantas **asintomáticas**. En ambos casos, usted debe **marcar las plantas escogidas** utilizando un rotulador permanente.

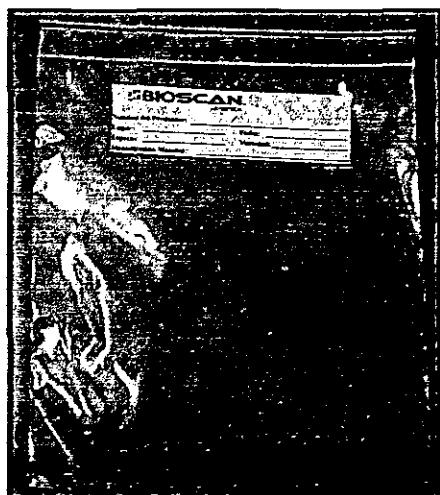
6. MATERIALES REQUERIDOS

2.1. KIT de toma de muestra BIOSCAN

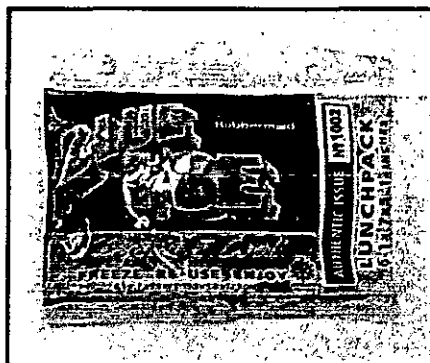
- El KIT incluye:
- a) 4 bolsas para la recolección de ramillas con hojas
 - b) 4 bolsas para la recolección de estacas leñosas
 - c) 1 paquete de hielo-gel
 - d) 1 caja de plumavit

a) Bolsa para recolección de ramillas
(Bolsa tipo Ziploc de 18X22 cm.)

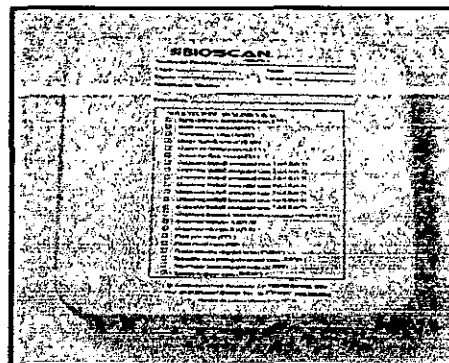
b) Bolsa para recolección de estacas
(Bolsa tipo Ziploc de 23X5 cm.)



c) Paquete de hielo gel para mantener temperatura adecuada



d) Caja de plumavit para el envío del material



Nota: guardar en el congelador

2.2. Tijeras de podar

2.3. Desinfectantes

Antes de realizar cualquier corte debe desinfectar la tijera de podar. Para desinfectarla utilice etanol 95% o hipoclorito de sodio al 10%.

- Etanol 95%: disponible en cualquier farmacia.

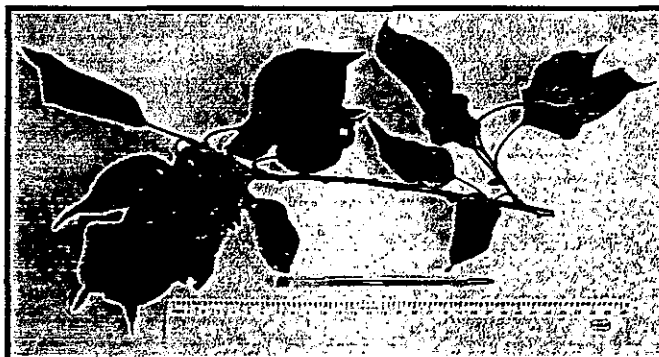
- Hipoclorito de sodio al 10%: 100 ml. de cloro en 1 lt. de agua.

2.4. Lápiz rotulador permanente

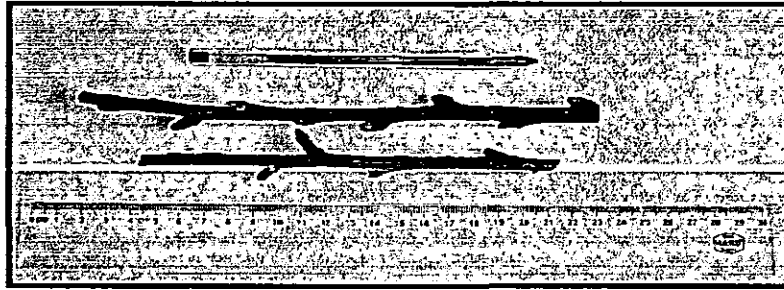
7. ¿CUÁNDO Y CÓMO HACERLO?

3.1. Obtención del material vegetal.

Primavera: De la parte media del árbol y de cada punto cardinal tome 1 ramilla de 10–20 cm de largo, con hojas. (4 ramillas en total).



Otoño-invierno: De la parte media del árbol y de cada punto cardinal tome 2 estacas leñosas de 10–20 cm de largo y de 0,5-1 cm. de diámetro (8 en total).



3.2. Introduzca el tejido recolectado en una bolsa plástica (tipo Ziploc), usando una bolsa por cada orientación de la planta. Evite tener condensaciones de agua en el interior de las bolsas.

3.3. Complete la información solicitada en la etiqueta de cada bolsa: nombre del productor, lugar, fecha, especie frutal, variedad e identificación de la muestra (esto lo determina cada productor, Ej. Cuartel 2 hilera 3 planta 5).

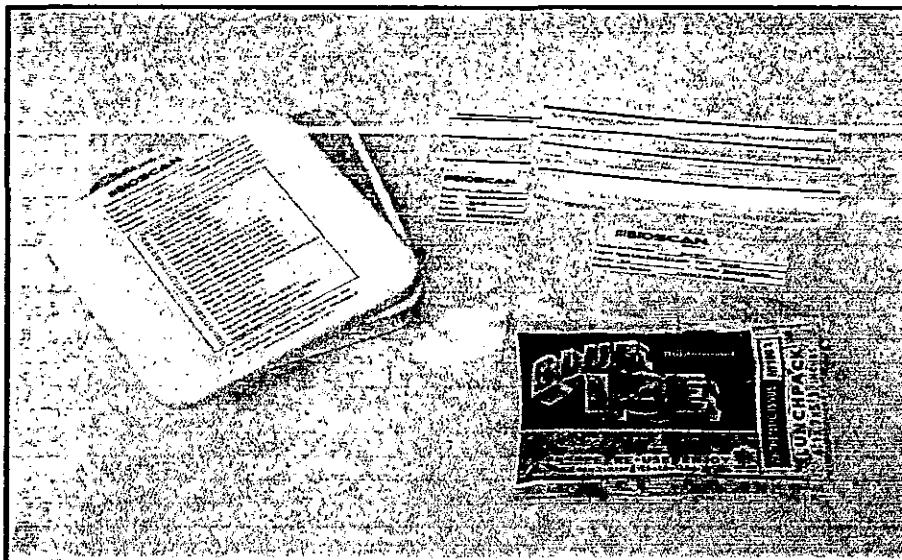


3.4. Desinfecte la tijera de podar. Para la desinfección utilice los productos indicados en la sección 2.3 y posteriormente enjuague la tijera con agua. Repita esta operación entre planta y planta.

3.5. Para evitar la deshidratación del material, guarde lo más rápido posible las bolsas con las muestras a 4 °C. Mientras esté en el campo puede utilizar un “cooler” (no ponga las bolsas directamente sobre hielo) y posteriormente puede guardarlas en el refrigerador (en la parte de las verduras). Mantenga las bolsas en estas condiciones durante todas las horas previas al envío. Evitar la deshidratación del material vegetal es fundamental para un diagnóstico exitoso.

8. ENVÍO DE LA MUESTRA

Para enviar las muestras utilice el **KIT de toma de muestra** que entrega **BIOSCAN**.



- 4.1. Use un envase de plumavit por planta (un KIT).
- 4.2. Introduzca las bolsas con ramillas y hojas o con estacas leñosas en la caja de plumavit. Ponga el paquete de hielo-gel, previamente congelado, entremedio de las bolsas.
- 4.3. Complete la información solicitada en la planilla incluida en la caja. Si lo considera necesario incluya una breve descripción de los síntomas observados y si éstos se presentan aislados.
- 4.4. Selle la caja con cinta adhesiva e introdúzcala en un sobre o envuélvala con papel.
- 4.5. Envíe las muestras al laboratorio de BIOSCAN en un plazo no superior a 24 hr. desde su recolección. Para un óptimo diagnóstico viral mediante la técnica de PCR, recomendamos enviar las muestras el mismo día de la recolección. En épocas muy calurosas prefiera realizar el envío a través de un transporte nocturno.

Carolina Uquillas H.
Ingeniero Agrónomo.
Ph. D. Biología Celular y Molecular

REFERENCIAS

Aburkhes, M.M., El Ghawawi, H. y Ben Taher, A.M. 1992. Sanitary program for pome and stone fruit in Libya. *Acta Hort. (ISHS)* 309:403-420.

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. y Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Kofalvi, S. y Macquaire, G., 2000. PCR-based techniques for the detection of plant viruses and viroids. *Acta Hort.* 530: 61-67

Candresse, T. 2001. Advances in the methods of pathogen detection-introductory remarks. *Acta Hort. (ISHS)* 550:33-36.

Chang, S., Puryear, J. y Cairney, J. 1993. A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.

Chun, G.H., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T. y Moriguchi, T. 2002. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 69a-69g.

European Bioinformatics Institute (EBI).
<http://www.ebi.ac.uk>

Geuna, F., Hartings, H. y Scienza, A. 1998. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissue of grapevine. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 61-67.

Gugerli P. 2003. Grapevine leafroll and related viruses. In: Meeting of the 14th International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Extended abstract. Locorotondo (Italy), pp. 25-31.

Herrera, G. 2001. Enfermedades de frutales causadas por virus en Chile. *Boletín INIA* N° 52, 65 pág.

Institute of Applied Microbiology IAM, University of Agricultural Science, Viena, Austria.
<http://www.boku.ac.at/IAM/pbiotech/det.html>.

Kuniyuki, H., Rezende, J.A.M., Yukv, V.A. y Betti J.A. 2002. Identificação sorológica do vírus do mosaico das nervuras da videira no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 635-638.

Kummert J., Vendrame M., Steyer S. y Lepoivre P. 2000. Development of routine RT-PCR tests for certification of fruit tree multiplication material. EPPO Conference on Diagnostic Techniques for Plant Pests (Wageningen, NL - 2000-02-1/4) Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 30.

Nolasco, G. 2003. Diagnosis: Recent development and routine implementation. In: Meeting of the 14th International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Extended Abstracts. Locorotondo (Italy), pp. 184 - 187.

MacKenzie, D.J., Mclean, M.A., Mukerji, S. y Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.

Malinowski, T. 1997. Silica capture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): Application for detection of several plant viruses. Pages 445-448 in: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*. H. W. Dehne, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Martelli, G.P. (eds.) 1993. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/T0675E/T0675E07.htm>

Martelli, G.P. Grapevine Virology Highlights 1997-2000. 2000. In: Meeting of the 13th International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Extended Abstracts. Adelaide, (South Australia), pp.1-5.

Martelli, G.P. Grapevine Virology Highlights 2000-2003. 2003. In: Meeting of the 14th International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Extended Abstracts. Locorotondo (Italy), pp.3-10.

Martin, R.R., James, D. y Lévesque, C.A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38: 207-239.

Ministry of Agriculture and Lands. Governmente of British Columbia. 2006. Pest Management.

<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/grapeipm/virus.htm>

<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/ppv.htm>

<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/tfipm/virus.htm>

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRÁRIAS (ODEPA). 2005. Panorama de la Agricultura Chilena. 84 pág.

Roy, A.S. 1998. Role of EPPO in controlling plant viruses in temperate fruit crops. *Acta Hort. (ISHS)* 472:751-794.

Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 11-17.

Senft, D. 1996. Protecting fruit trees, helping a rural economy. Agricultural Research. Pp. 20-21.

Thompson, D.A. 1998. The role of NAPPO in fruit crop virus-testing and certification. Acta Hort. (ISHS) 472:747-750

Triolo, E. y Materazzi, A. 1987. La "maculatura infettiva" della vite: influenza di isolati diversi sull'attitudine alla propagazione vegetativa di *Vitis rupestris* "St. George". La Recherche Agronomique in Suisse 26:320-324.

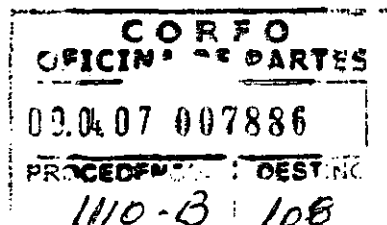
Wang, S.X., Hunter, W. y Plant, A. 2000. Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of sitka and white spruce. BioTechniques. 28: 292-296.

Weber, Ed. 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. Practical Winery & Vineyard. FPMS Universidad de California.
<http://fpms.ucdavis.edu/>

Zeng Y., Yang, T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. Plant Mol. Biol. Rep. 20: 417a-417e.

BIOSCAN.

Santiago, 9 de abril de 2007.



Señor:

Andrés Benavides Yates
Subdirector Innovación Empresarial
INNOVA Chile

Referencia: Comentarios adicionales a Informe Técnico Final Proyecto INNOVA
Chile N° 204-4060.

Presente

Estimado señor Benavides:

Adjuntamos comentarios adicionales a dos puntos incluidos parcialmente en el informe Técnico Final del proyecto "Detección Genética por PCR de 23 Patógenos en Vides; Carozos y Pomáceas", a solicitud del ejecutivo técnico a cargo de la revisión del proyecto señor Miguel Soto:

1. Evaluación de nuevo kit de extracción de ARN.

Con el fin de disminuir costos de operación del diagnóstico se evaluó un nuevo kit de extracción de ARN llamado Plant Total RNA Mini Kit for Woody Plants, de la empresa taiwanesa Favorgen. Para la evaluación de este nuevo kit, se eligieron muestras que habían sido extraídas con el kit RNA Easy de Qiagen y que habían dado positivo para algunos virus. Estas muestras se extrajeron en paralelo con ambos kits y se les sometió a reacciones de transcripción reversa y PCR bajo las mismas condiciones, de manera de hacer comparable el análisis. Esto se realizó para vides, carozos y pomáceas, tanto para tejido foliar como para tejido enriquecido en floema. El resultado de la amplificación de los virus (intensidad de la banda observada) es similar al utilizar ARN proveniente de ambas extracciones, lo que indicó que se puede utilizar el nuevo kit sin perder la calidad ni la integridad del ARN.

BIOSCAN.

Una ventaja del kit Favorgen frente al Qiagen es su bajo costo. El utilizar este kit permitió cumplir una de las ideas iniciales del proyecto, que era obtener un ARN de calidad utilizando un sistema de extracción económico.

2. Integridad del ARN.

Inicialmente, se había decidido probar la integridad del ARN antes de realizar una reacción de transcripción reversa. Con el análisis de distintas muestras nos dimos cuenta que la amplificación de un control interno (fragmento de un gen de la planta) era suficiente para comprobar que el ARN estaba íntegro, en una cantidad suficiente y con la pureza necesaria para permitir la detección de virus. Considerando esto, no fue necesario hacer geles que permitieran determinar la integridad del ARN, antes de realizar la transcripción reversa, lo que permitió obtener resultados en menor tiempo.

Atentamente,



Roberto Valladares P.
Gerente General
Bioscan S.A.



INSTRUCTIVO PARA TOMA DE MUESTRAS DE VID

Un exitoso diagnóstico viral depende en gran medida de la forma en que se recolectan las muestras, por eso es necesario seguir los siguientes pasos:

1. ¿QUÉ MUESTREAR?

Se puede recolectar material vegetal a partir de **plantas establecidas en terreno** o a partir de **plantas jóvenes de vivero**. En el caso de plantas establecidas, se recolectan hojas o sarmientos (ver sección 3.1). Si se trata de plantas de vivero muy pequeñas, se seleccionan plantas completas.

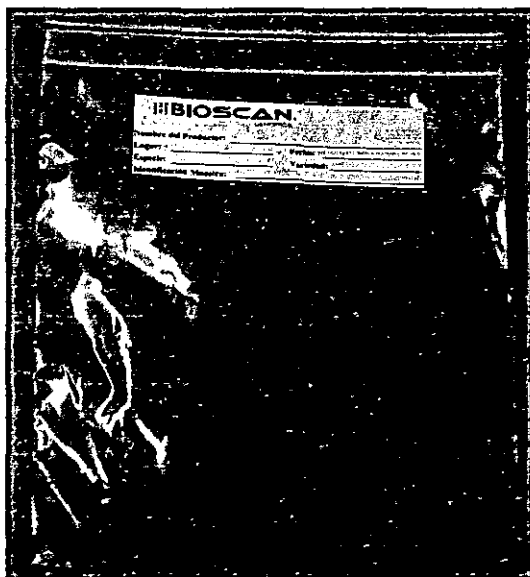
La elección de las plantas depende del objetivo deseado. Si quiere determinar la naturaleza de algún problema productivo y verificar si éste se debe a la presencia de virus, seleccione aquellas plantas que tengan **síntomas** sospechosos. Si desea conocer la presencia insipiente de virus, seleccione al azar plantas **asintomáticas**. En ambos casos, usted debe **marcar las plantas escogidas** utilizando un rotulador permanente.

2. MATERIALES REQUERIDOS

2.1. KIT de toma de muestra BIOSCAN

- El KIT incluye:
- a) 4 bolsas para la recolección de hojas
 - b) 4 bolsas para la recolección de sarmientos
 - c) 1 paquete de hielo-gel
 - d) 1 caja de plumavit

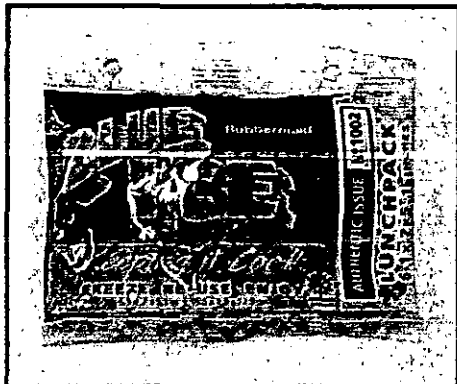
a) Bolsa para recolección de hojas
(Bolsa tipo Ziploc de 18X22 cm.)



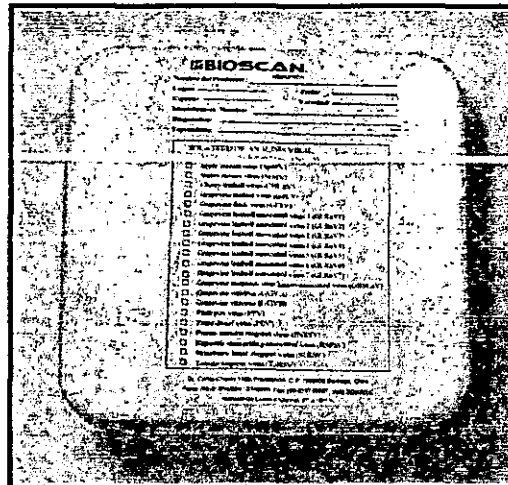
b) Bolsa para recolección de sarmientos
(Bolsa tipo Ziploc de 23X5 cm.)



- c) Paquete de hielo gel para mantener temperatura adecuada d) Caja de plumavit para el envío del material



Nota: guardar en el congelador



2.2. Tijeras de podar

2.3. Desinfectantes

Antes de realizar cualquier corte debe desinfectar la tijera de podar. Para desinfectarla utilice etanol 95% o hipoclorito de sodio al 10%.

- Etanol 95%: disponible en cualquier farmacia.
- Hipoclorito de sodio al 10%: 100 ml. de cloro en 1 lt. de agua.

2.4. Lápiz rotulador permanente

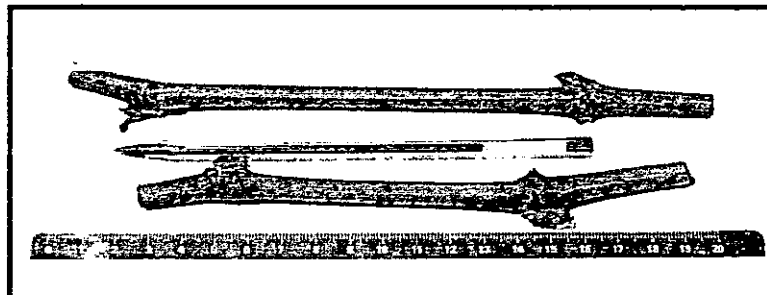
3. ¿CUÁNDO Y CÓMO HACERLO?

3.1. Obtención del material vegetal.

Primavera: Mientras la parra esté brotando tome 3 hojas con pecíolos de la parte media no lignificada de brotes jóvenes, de cada una de las cuatro orientaciones de la cepa si se trata de uva de mesa (12 hojas en total), o de cada una de las dos orientaciones si es uva vinífera (6 en total).

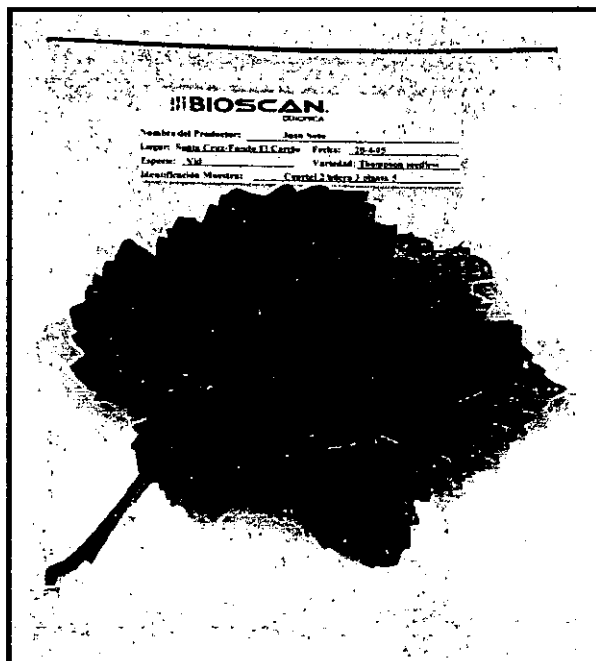


Otoño-invierno: Tomar 2 sarmientos lignificados (del crecimiento de la temporada) de unos 10-20 cm. de largo y de unos 0,5-1 cm. de diámetro, de cada una de las cuatro orientaciones de la planta si es uva de mesa (8 en total), o de cada una de las dos orientaciones si es uva vinífera (4 en total).



3.2. Introduzca el tejido recolectado en una bolsa plástica (tipo Ziploc), usando una bolsa por cada orientación de la planta. Evite tener condensaciones de agua en el interior de las bolsas.

3.3. Complete la información solicitada en la etiqueta de cada bolsa: nombre del productor, lugar, fecha, especie frutal, variedad e identificación de la muestra (esto lo determina cada productor, Ej. Cuartel 2 hilera 3 planta 5).

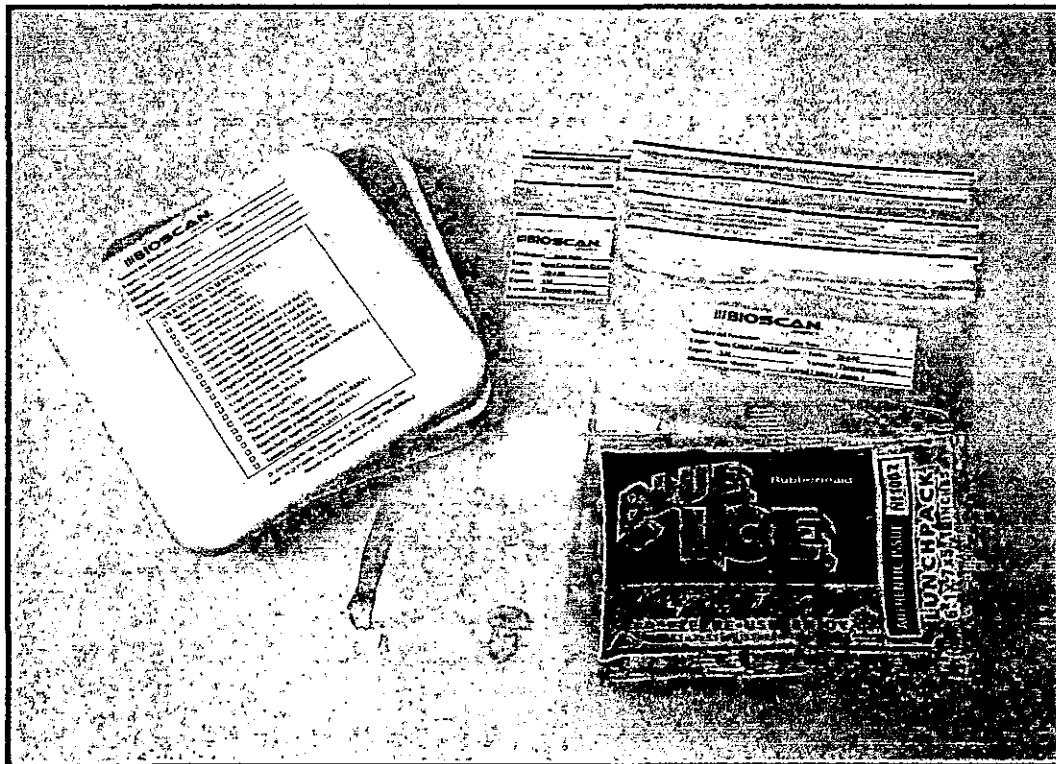


3.4. Desinfecte la tijera de podar. Para la desinfección utilice los productos indicados en la sección 2.3 y posteriormente enjuague la tijera con agua. Repita esta operación entre planta y planta.

3.5. Para evitar la deshidratación del material, guarde lo más rápido posible las bolsas con las muestras a 4 °C. Mientras esté en el campo puede utilizar un "cooler" (no ponga las bolsas directamente sobre hielo) y posteriormente puede guardarlas en el refrigerador (en la parte de las verduras). Mantenga las bolsas en estas condiciones durante todas las horas previas al envío. **Evitar la deshidratación del material vegetal es fundamental para un diagnóstico exitoso.**

4. ENVÍO DE LA MUESTRA

Para enviar las muestras utilice el **KIT de toma de muestra** que entrega BIOSCAN.



- 4.1. Use un envase de plumavit por planta (un KIT).
- 4.2. Introduzca las bolsas con samientos u hojas en la caja de plumavit. Ponga el paquete de hielo-gel, previamente congelado, entremedio de las bolsas.
- 4.3. Complete la información solicitada en la planilla incluida en la caja. Si lo considera necesario incluya una breve descripción de los síntomas observados y si éstos se presentan aislados.
- 4.4. Selle la caja con cinta adhesiva e introdúzcala en un sobre o envuélvala con papel.
- 4.5. Envíe las muestras al laboratorio de BIOSCAN en un plazo no superior a 24 hr. desde su recolección. Para un óptimo diagnóstico viral mediante la técnica de PCR, recomendamos enviar las muestras el mismo día de la recolección. En épocas muy calurosas prefiera realizar el envío a través de un transporte nocturno.

Carolina Uquillas H.
Ing. Agrónomo.
Ph. D. Biología Celular y Molecular

