



INFORME FINAL TECNICO Y DE DIFUSIÓN

I. ANTECEDENTES GENERALES

CODIGO: BID-PI-C-2001-1-A-013

NOMBRE DEL PROYECTO:

Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan la vid.

REGIONES DE EJECUCIÓN: IV, V, VI, VII y Región Metropolitana

AGENTE EJECUTOR: Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Agronómicas

AGENTES ASOCIADOS: Viña Santa Rita S.A.
Viñedos Emiliana S.A.
Univiveros

COORDINADOR DEL PROYECTO:  Jaimé R. Montecalegre A.

PERIODO DE EJECUCIÓN: Desde 15 de diciembre de 2001
Hasta 30 de noviembre de 2007

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCIÓN	



II. RESUMEN

De acuerdo a los objetivos planteados y a la metodología utilizada se ha logrado desarrollar todas las actividades contempladas en el proyecto.

Ha sido posible poner a punto las técnicas de detección de virus (ELISA y RT-PCR) y fitoplasmas (Nested-PCR) en vid, malezas e insectos; lo que significa disponer de herramientas muy valiosas a utilizar en apoyo al desarrollo del sector vitivinícola en Chile.

La prospección realizada en viñedos y parrones de la IV, V, VI, VII y Región Metropolitana, ha evidenciado que la presencia de virus y fitoplasmas en las vides chilenas es importante. Además se han caracterizado insectos *Auchenorrhyncha* probable vectores de fitoplasmas en vid y encontrado malezas asociadas a viñedos que funcionarían como reservorio de esto mismos patógenos.

Con los trabajos realizados se ha contribuido al mayor conocimiento, en Chile, de las enfermedades producidas por virus y fitoplasmas en la vid, además se ha dado respuestas a algunos de los problemas que el cultivo presenta y que son causa de preocupación para los productores.

El desarrollo de este proyecto, ha permitido la interacción con la comunidad involucrada en la producción de vides y en el ámbito exportador, además participar en varios congresos nacionales e internacionales dando a conocer los avances y logros alcanzados a lo largo del proyecto y con ello realizar trabajos en conjunto con investigadores de diferentes instituciones nacionales y extranjeras.

Creemos que los resultados del proyecto contribuirán al desarrollo del “Sistema de certificación de la vid” en Chile.

III. INFORME TÉCNICO

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo General

Desarrollar un sistema basado en técnicas moleculares (serología y amplificación génica) orientado al diagnóstico y caracterización de los principales virus y fitoplasmas que afectan la vid y determinar presencia de fitoplasmas en insectos y plantas reservorio.

Objetivos Específicos

1. Recolectar suelo y material vegetal procedentes de vides de las Regiones VII, VI, IV, V y Metropolitana, para establecer la situación fitosanitaria actual de la vid en Chile.
2. Desarrollar un sistema de diagnóstico confiable y rápido para vid, utilizando técnicas moleculares (serología y amplificación génica) para detectar virus y fitoplasmas.
3. Caracterizar genéticamente tres patógenos (virus y/o fitoplasmas) más importantes encontrados en vides chilenas.
4. Establecer un protocolo sensible y específico para los cuatro patógenos (virus y fitoplasmas) más importantes detectados en el presente estudio, evaluado técnica y económicamente, orientado a la detección en plantas asintomáticas.
5. Determinar langostinos infectados por fitoplasmas.
6. Determinar plantas infectadas por fitoplasmas asociadas al cultivo de la vid.
7. Difundir los resultados obtenidos en el proyecto.

Todos los objetivos específicos planteados en el proyecto se han cumplido plenamente, permitiendo así el logro del objetivo general.

En el siguiente cuadro 1, se cuantifican los resultados obtenidos por objetivo específico y por actividad.

Cuadro 1

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Resultados programados	Resultados obtenidos	Fecha Término
1	1.1	Recolección de material vegetal IV Región	135 muestras de planta	63 muestras de planta	30.09.03
1	1.2	Recolección de material vegetal V y Región Metropolitana	135 muestras de planta	215 muestras de plantas	30.09.03
1	1.3	Recolección de material vegetal VI y VII Regiones	135 muestras de planta	152 muestras de planta	30.09.03
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	270 plantas	270 plantas	15.12.05
1	1.5	Determinación de poblaciones de nemátodos fitófagos vectores de virus <i>Xiphinema index</i> y <i>X. americanum</i> en los suelos recolectados.	135 muestras de suelo	135 muestras de suelo	31.12.03
2	2.1	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV	10 virus	10 virus	31.12.02
2	2.2	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en nemátodos: GFLV, ToRSV	2 virus	2 virus	30.04.04
2	2.3	Desarrollo protocolo de PCR para virus y fitoplasmas, en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV), y Fitoplasmas del amarillamiento de la vid	11 virus y fitoplasmas	12 virus y fitoplasmas	30.07.04
3	3.1	Amplificación génica de patógenos de vid.	12	12	30.09.05
3	3.2	Secuenciación génica	12	12	30.09.05
3	3.3	Comparación de secuencias	2 virus y 1 fitoplasmas	2 virus y 4 fitoplasmas	30.09.05
3	3.4	Bloque de plantas infectadas con patógenos caracterizados	2 virus y 1 fitoplasmas	2 virus y 2 fitoplasmas	31.10.05
4	4.1	Determinación de costo, sensibilidad, especificidad de cada técnica y mejor época de muestreo para el diagnóstico de los 4 patógenos más importantes detectados en el estudio.	Un estudio realizado	Un estudio realizado	30.09.05
5	5.1	Recolección de langostinos.	450 insectos	509 insectos	30.11.07
5	5.2	Separación de langostinos según característica morfológicas.	14 grupos	18 grupos	30.09.07
5	5.3	Análisis para fitoplasmas en langostinos.	400 análisis	438 análisis	30.11.07
5	5.4	Caracterización de langostinos y fitoplasmas encontrados en ellos.	-Langostinos: 3 familias y 3 subfamilias; -Fitoplasmas: 4 especies.	-Langostinos: 3 familias y 5 subfamilias; -Fitoplasmas: 5 especies.	30.11.07

6	6.1	Recolección de plantas asociadas a las vides.	70 plantas	89 plantas	31.08.07
6	6.2	Separación de plantas asociadas a las vides, según características morfológicas.	18 grupos	26 grupos	30.09.07
6	6.3	Análisis para fitoplasmas en plantas asociadas a las vides.	70 análisis	89 análisis	31.10.07
6	6.4	Caracterización de plantas asociadas a vides y fitoplasmas encontrados en ellas.	-Plantas: 18 especies; -Fitoplasmas: 3 especies.	-Plantas: 19 especies; -Fitoplasmas: 3 especies.	30.11.07
7	7.1	Charlas técnicas	3 charlas	3 charlas	07.05.04
7	7.2	Día de Campo	2 días de campo	2 días de campo	27.01.04
7	7.3	Seminario Internacional	1 seminario	1 seminario	06.04.05
7	7.4	Participación a congresos nacionales e internacionales con presentación de trabajos	12 trabajos	19 trabajos	17.11.05
7	7.5	Presentación de trabajos para publicaciones en revistas internacionales	5 trabajos	8 trabajos	30.11.05
7	7.6	Presentación de trabajos para publicaciones en revistas nacionales	2 trabajos	2 trabajos más 6 resúmenes de presentaciones a congresos	30.04.05

2. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Para la realización de las actividades 1.1, 1.2, 1.3 y 1.5

Recolección de material vegetal

Se recolectaron muestras de plantas de vides de variedades de uva de vino y de mesa y se guardaron en bolsas de polietileno rotulándolas con el mismo número asignado a la planta de origen. Las bolsas se pusieron en un refrigerador portátil para el transportarlas a refrigeración. Una vez en el laboratorio las bolsas y fueron almacenadas a 4° C. Las plantas se marcaron utilizando una etiqueta plastificada que indica el número de muestra.

La metodología de muestreo consistió en recolectar todos los sectores de la planta. Para la detección de virus se recolectaron sarmientos lignificados de aproximadamente 50 cm de largo. Para los fitoplasmas se recolectaron preferencialmente las hojas.

Recolección de suelo

Se realizó utilizando un barreno de 2,5 cm de diámetro o una pala, extrayendo suelo más raicillas de la temporada o de la temporada anterior, las cuales se mezclaron obteniendo finalmente una muestra compuesta de 1-3 kg de suelo.

El suelo se mantuvo una semana a temperatura ambiente en el Laboratorio, luego de lo cual se realizó el proceso de extracción. Para ello se utilizó el método de tamizado de suelos seguido por un período de 48 horas en un embudo Baermann. La extracción se realizó en forma diferenciada, utilizando tamices de 120 mallas/pulgada para la separación de los nemátodos de mayor tamaño, como los del género *Xiphinema*.

Para la realización de la actividad 1.4

Después de 25 días en frío se procedió al enraizamiento de las estacas lignificadas de vid. Para aumentar el área de potencial crecimiento de raíces, se realizó un rayado de la corteza de las estacas. Luego se sumergieron en una solución de ácido indol butírico a una concentración de 1.750 ppm, para luego depositarlas en vasos plásticos con 200 ml de sustrato de perlita y turba en relación 2:1. Estos vasos plásticos se pusieron en “cama caliente” a 20°C. La humedad del sustrato se mantuvo mediante riegos con agua potable dos veces por semana.

En estas condiciones el material fue mantenido alrededor de 20 días, momento en el cual las estacas enraizadas fueron trasladadas a bolsas plásticas de 500 ml de capacidad que contenían un sustrato formado por suelo agrícola, tierra de hoja y arena en relación 1:1:1.

Para la realización de la actividad 1.5

La identificación se realizó usando una lupa estereoscópica, contando los nemátodos *Xiphinema index* y *X. americanum* s.l. extraídos de 250 ml de suelo.

Para la realización de la actividad 2.1

Se desarrollaron los protocolos propuestos por la empresa Agritest Italia, que se anexaron en el Informe de Avance Técnico N° 1.

Para la realización de la actividad 2.2

Se utilizaron muestras de nemátodos extraídos de suelos donde se desarrollaban plantas que resultaron positivas a GFLV y ToRSV. En este último caso, no habiendo encontrado vides infectadas con el virus, para realizar el trabajo se utilizaron nemátodos obtenidos desde suelo con ciruelos positivos a ToRSV.

La extracción del virus desde nemátodos se efectuó moliéndolos en el mismo tampón de extracción ELISA utilizado para el tejido vegetal. Los pasos siguientes correspondieron a los mismos seguidos para el protocolo de DAS-ELISA aplicado a tejido vegetal.

Para la realización de la actividad 2.3

Los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y para la ejecución de RT-PCR para la detección de virus y de Nested-PCR para los fitoplasmas se adjuntaron en el anexo del Informe de Avance Técnico N° 2.

Para la realización de las actividades 3.1, 3.2 y 3.3

Para la purificación de amplificadores de virus y fitoplasmas se utiliza el sistema comercial de Gibco-BRL (Cat. 11458). Este describe la adición al fragmento de DNA en solución acuosa, de una solución compuesta por hidrocloreto de guanidina concentrada, EDTA, Tris-HCl e isopropanol, con las concentraciones protegidas, la mezcla es centrifugada sobre un tubo con filtro a 12.000 x g por un minuto. Sobre este filtro es agregada una segunda solución compuesta por NaCl, EDTA, y Tris-HCl y es vuelto a centrifugar bajo las mismas condiciones. Después el DNA es disuelto en 30 a 50 µl H₂O a 60 °C por 1 minuto sobre el centro del filtro y centrifugado por 2 min a 12.000 g.

El eluido obtenido se liga al vector comercial pGEM-T, usándose 50 ng de vector (1 ml), 3 unidades de T4 DNA ligasa, adicionando tampón a concentraciones finales de 30 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP (1 ml), completando la reacción con el producto de PCR a un volumen final de 10 ml. La reacción se incubó a 16 °C por 16 horas.

Para la clonación se procede a la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α , por electroporación, usando el Electroporador BIO-RAD modelo Gene Pulsertm en las siguientes condiciones: 200 Ω de resistencia, 2,5 kV de caída de potencial y 25 μ F de conductancia; usando cubetas especiales de la misma marca mantenidas a 4 °C con la mezcla de 1 μ l de ligación, y 40 μ l de bacteria electro-competente preparadas con antelación y mantenidas a -80 °C. Luego de ser sometidas a la carga eléctrica las células son vueltas a 4 °C por aproximadamente 1 minuto y posteriormente estabilizadas en 1ml de medio de crecimiento SOC (triptona 20g/l, levadura 5 g/l NaCl 0,5 g/l, glucosa 3,6g/l, KCl 180 mg/l y MgCl₂ 0,95g/l) a 37 °C con una agitación de 225 rpm durante 1 hora en tubos de 50 ml. Pasado este tiempo se siembran entre 50-250 μ l de este medio en placas de Petri con LB agar IPTG Xgal más antibiótico Carbenicilina a 100 μ g/ml, para la selección de los clones positivos por medio de antibiótico y coloración de colonias. Las placas se incuban a 37 °C entre 12 y 18 horas.

A las colonias blancas obtenidas se les realizan pruebas de PCR directo, para ello se pica las colonias con una punta estéril o un mondadientes de forma individual, la punta es lavada en 10 μ l de H₂O estéril, y vuelta a lavar en 1 ml de medio de crecimiento Luria-Bertani (LB), para usarlo como respaldo de la línea celular. La mezcla de reacción esta compuesta por: 1-2 unidades Taq-DNA polimerasa, 2,5 mM de MgCl₂, 5 pmol M13FOR y 5 pmol M13REV, 1 mM de dNTPs, 50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl (pH 8,4) hasta un volumen final de 30 μ l, incluyendo los 10 μ l de bacteria. El perfil térmico aplicado fue de 5 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 1 min., "annealing" a 55 °C por 1 min. y elongación por 1 min. a 72 °C, finalmente se aplicó un escalón de 7 min. a 72 °C, quedando las reacciones de amplificación listas para su análisis por electroforesis, en gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio.

A los clones positivos se les realiza una mini preparación plasmidial, se parte de bacterias frescas crecidas hasta O.D. 1 (600 nm), aproximado, en su defecto un cultivo crecido por toda la noche. Se precipitan entre 1 ml y 5 ml de cultivo por 5 minutos en una centrifuga de sobremesa a 10.000 rpm, se desecha el sobrenadante y el sedimento es resuspendido en 100 μ l de una solución compuesta por 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl y 10 mM EDTA a pH 8,0 preferentemente a 4 °C, se homogeneiza la solución tras lo cual se procede a lisar las células con 200 μ l de una solución básica compuesta por 0,2 N NaOH y 1 % SDS preparada en el momento, se mezclan suavemente la solución hasta que esta sea transparente, posteriormente se agrega 150 μ l de una tercera solución compuesta de 60 % v/v 5M acetato de potasio, 11,5 % v/v de ácido acético glacial, se mezcla suavemente hasta que se forma un precipitado blanco. La mezcla final es centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante es traspasado a un tubo limpio, en donde se le agrega un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:23:1) (450 μ l aproximado), la solución es vuelta a centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm, y se toma con una micropipeta la fase acuosa superior (esta etapa se repite en dos oportunidades para el caso del *Agrobacterium tumefaciens*), la que es traspasada a otro tubo estéril en el que se le agregan un décimo de una solución de Acetato de Amonio 10 M (40 μ l), seguido de dos volúmenes de etanol 100 % a -20 °C (880 μ l), la mezcla es dejada por 30 minutos a -20 °C tras lo cual es precipitada por 15 min. a 15.000 rpm a 4 °C, el sedimento se seca con mucho cuidado y se le agregan 1 ml de etanol 70 % a -20 °C y es vuelto a centrifugar por 5 minutos a 15.000rpm, el sedimento final es secado y posteriormente resuspendido en 50 μ l de H₂O

estéril con 0,1 mg/ml de RNAsa. Y posteriormente observado en un gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio.

Una vez comprobada la integridad del plasmidio se procede a realizar una digestión con la enzima de restricción *EcoR* I bajo las condiciones indicadas por el fabricante, para observar el tamaño del amplificado clonado. Finalmente las muestras se envían a secuenciar por secuenciación automática.

Las secuencias obtenidas a partir de los productos de amplificación de los aislados presentes en Chile han sido alineadas en GenBank para poder determinar el porcentaje de similitud con aquellas presentes en el banco de datos. El resultado de la alineación entrega informaciones sobre eventuales diferencias genéticas existentes entre los aislados de virus y fitoplasmas caracterizados en diferentes países.

Para la realización de la actividad 3.4

Se enraizaron y almacenaron, según la metodología anteriormente detallada, las muestras desde la cual se obtuvieron los patógenos que han sido caracterizados genéticamente.

Para la realización de la actividad 4.1

Costo de las técnicas de detección

Para cada técnica se consideraron los siguientes ítems de costos: reactivos, personal técnico, uso de infraestructuras (que incluye gastos básicos y mantenimiento equipos), gastos de administración.

Este ejercicio se hizo para las técnicas ELISA y RT-PCR (detección de virus) y Nested-PCR (detección de fitoplasmas), que se desarrollaron en el marco del presente proyecto.

Especificidad y sensibilidad de las técnicas de detección

Se determinó la sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISA y RT-PCR para la detección de seis virus: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA) y *Grapevine fleck virus* (GFkV).

El ensayo de especificidad se realizó para probar que las técnicas ELISA y RT-PCR no desarrollan reacciones cruzadas entre diferentes virus, generando así resultados “falsos positivos”. Tanto con ELISA como con RT-PCR, se utilizó floema de sarmientos lignificados de plantas de vid cuyo código es especificado en el cuadro 2. Los kits ELISA utilizados son de la empresa Agritest, Italia y los protocolos de análisis se presentaron en el informe N° 1. Para la RT-PCR se utilizaron los partidores y protocolos de análisis presentados en los informes N° 2 (para GLRaV-2 y GVA), 3 (para GFkV), 4 (para GFLV y GLRaV-3) y 5 (para GLRaV-1).

Debido a la dificultad de poder encontrar muestras a infección simple se utilizaron en mayoría aquellas con infección mixta.

En cada ensayo, con el cual se evaluó la especificidad de ambas técnicas de detección para un determinado virus, se utilizaron de una a cinco distintas muestras (repeticiones) infectadas con cada uno de los otros 5 virus (Cuadro 3). Se utilizaron siempre tres controles negativos (tampón de extracción, tejido fresco y liofilizado de vides sanas) y dos positivos (tejido fresco y liofilizado de vides infectadas).

Las muestras usadas para los ensayos antes descritos, se analizaron previamente para confirmar el estado sanitario.

Cuadro 2. Muestras utilizadas para los ensayos de especificidad.

Código muestra	Virus presentes en la muestra
70	GFLV
203	GLRaV-1, GVA, GFkV
205	GLRaV-1, GVA, GFLV
206	GLRaV-1, GVA, GFkV
257	GLRaV-1, GVA
289	GLRaV-3
308	GLRaV-1, GVA, GFLV
341	GLRaV-3
368	GVA, GFkV, GFLV
374	GLRaV-3
1118	GLRaV-1, GLRaV-2
1157	GLRaV-2, GFkV
1517	GFLV
2280	GLRaV-2, GLRaV-3, GFkV
2300	GLRaV-2, GLRaV-3, GVA
2303	GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV
2336	GFLV
2339	GFkV
2340	GLRaV-2, GLRaV-3

Cuadro 3. Virus objetos de los ensayos de especificidad y muestras utilizadas para la realización de los mismos.

Virus objeto del ensayo	Código de las muestras utilizadas en cada ensayo (muestras no infectadas con el virus objeto del ensayo)
GFLV	203, 206, 257, 289, 1118, 2280, 2300, 2340
GLRaV-1	70, 368, 1157, 1517, 2280, 2300, 2303, 2340
GLRaV-2	203, 205, 289, 308, 341, 368, 374, 2336, 2339
GLRaV-3	70, 203, 205, 206, 1118, 1157, 2336
GVA	70, 289, 341, 1118, 1157, 1517, 2280, 2336, 2339, 2340
GFkV	205, 257, 289, 308, 2280, 2303, 2340

La finalidad del ensayo de sensibilidad ha sido determinar el umbral de detección de las técnicas ELISA y RT-PCR, para los mismos seis virus mencionados anteriormente. El tipo de material vegetal, kits ELISA, partidores y protocolos son los mismos que se utilizaron para el ensayo de especificidad.

Tanto en ELISA como en RT-PCR se utilizaron las mismas tres muestras para cada virus considerado (Cuadro 4). Solo para los ensayos con ELISA se utilizó además una muestra de tejido liofilizado infectado.

Se disminuyó la concentración del antígeno viral presente en el extracto de material vegetal infectado, utilizando el extracto de una muestra sana. De esta forma se prepararon las siguientes diluciones (cantidades de partes de infectado/cantidades de partes total) utilizadas en los ensayos: 1/1 (solo tejido infectado), 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/40 y 1/50. Solo para RT-PCR se utilizaron también las diluciones 1/100, 1/200, 1/300 y 1/500.

Previamente, con el fin de decidir como realizar las diluciones, se comparó la modalidad de dilución de los extractos (como explicado anteriormente) con una dilución realizada mediante mezcla de floema infectado con sano.

Cuadro 4. Virus objetos de los ensayos de sensibilidad y muestras utilizadas para la realización de los mismos.

Virus objeto del ensayo	Código de las muestras utilizadas en cada ensayo (muestras infectadas con el virus objeto del ensayo)
GFLV	2336, 2337, 2359
GLRaV-1	203, 206, 2357
GLRaV-2	2356, 2476, 2484
GLRaV-3	2360, 2483, 2482
GVA	203, 2361, 2482
GFkV	203, 2482, 2484

Mejor época de muestreo

Este ensayo partió en septiembre de 2003 y terminó en agosto de 2004. Los análisis se realizaron mensualmente sobre material vegetal recolectado en la última semana de cada mes.

Los órganos de las plantas analizados difirieron según la época de muestreo. Se recolectaron y analizaron en cada mes todos los órganos presentes en las plantas consideradas para la prueba. En particular se han analizados brotes, pecíolos de hojas, hojas y floema de sarmientos lignificados, siendo este último el único material vegetal disponible desde mayo hasta agosto.

Para el ensayo se consideraron los siguientes virus: GFLV, GLRaV-3, GVA y GFkV, utilizando para la detección las técnicas ELISA y RT-PCR en tres repeticiones (tres plantas) por cada virus.

Las mayoría de las muestras utilizadas presenta una infección viral mixta, por lo tanto previamente se determinó la especificidad tanto de ELISA como de RT-PCR para descartar

la posibilidad de reacciones cruzadas y la generación de resultados “falsos positivos” con ambas técnicas.

Las muestras se recolectaron de plantas que se encuentran en viñedos y parrones de la Región Metropolitana.

Para la realización de la actividad 5.1

La recolección de insectos se realizó en predios de diferentes localidades de la V, VI, VII y Región Metropolitana.

Para la captura se utilizó principalmente la red entomológica, se separaron los insectos en tubos de ensayo y se trasladaron al laboratorio en hielo. Algunos insectos han sido capturados utilizando trampas entomológicas con pegamento.

La mayoría de estos insectos han sido fotografiados con lupa y sucesivamente puestos en alcohol absoluto para su caracterización y análisis fitoplasmológicos.

Para la realización de la actividad 5.2

Los insectos se fotografiaron con lupa y se separaron en grupos según las características morfológicas observadas. Dentro de cada grupo, se separaron las hembras de los machos, enviando algunos de estos últimos al entomólogo Alberto Alma de la Universidad de Turín en Italia, para realizar la clasificación. Los individuos de cada grupo que quedaron en Chile se analizaron para detectar la presencia de fitoplasmas.

Se caracterizaron solamente aquellos insectos que han dado resultados positivos a los análisis para fitoplasmas.

Para la realización de la actividad 5.3

Para la detección de fitoplasmas, el método de extracción de DNA desde insectos que se ha desarrollado es similar al que se utiliza para material vegetal (véase informe N° 2). Aunque en este caso se tuvo que reducir proporcionalmente las cantidades de reactivos y tampones para poder realizar el trabajo en microtubos de 2,2 ml.

Para análisis de fitoplasmas se utilizó la técnica de Nested-PCR, según el protocolo que se informó anteriormente.

Para la realización de la actividad 5.4

Caracterización de langostinos

Se realiza a través de la observación de los órganos genitales de los insectos machos a través de una clave de identificación simplificada relativa a los hemípteros *Auchenorrhyncha*, que ha sido elaborada por el Dr. Alberto Alma.

Caracterización de fitoplasmas encontrados en langostinos

Para la caracterización de los fitoplasmas se utilizaron la técnica de restricción enzimática (RFLP) y, en algunos casos, el análisis de las secuencias nucleotídicas, cuyos protocolos han sido informados anteriormente.

Para la realización de la actividad 6.1

La recolección de plantas asociadas a viñedos y/o alrededor de los mismos, se realizó en predios de diferentes localidades de la V, VI, VII y Región Metropolitana. Las herbáceas fueron exclusivamente malezas y han sido recolectadas por entero. Mientras de las leñosas se han recolectado estacas con hojas.

Para la realización de la actividad 6.2

Las plantas asociadas a viñedos y/o alrededor de los mismos, han sido fotografiadas y separadas en grupos según características morfológicas observadas.

Para la realización de la actividad 6.3

Para la detección de fitoplasmas, el método de extracción de DNA desde plantas asociadas a viñedos es idéntico al que se usa para la vid (véase informe N° 2).

Para análisis de fitoplasmas se utilizó la técnica de Nested-PCR, según el protocolo que se informó anteriormente.

Para la realización de la actividad 6.4

Caracterización de malezas

Las malezas encontradas en los viñedos se han clasificado con la ayuda de los siguientes manuales:

Viggiani P. y Angelini R. 1998 Erbe spontanee e infestanti: tecniche di riconoscimento di graminacee. Edagricole, Italia;

Viggiani P. 1998 Erbe spontanee e infestanti: tecniche di riconoscimento di dicotiledoni. Edagricole, Italia.

Juan Ormeño Núñez (2005) Malezas de huertos frutales y vides: biología y control. Colección de libros INIA, N° 17.

Para la definitiva caracterización de las malezas, ha sido muy importante el apoyo brindado, en estos últimos meses de proyecto, por la profesora Verónica Díaz de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, experta en reconocimiento y control de malezas asociadas a cultivo agrario.

Caracterización de fitoplasmas encontrados en plantas asociadas a viñedos

Para la caracterización de los fitoplasmas se utilizaron la técnica de restricción enzimática (RFLP) y, en algunos casos, el análisis de las secuencias nucleotídicas, cuyos protocolos han sido informados anteriormente.

3. ACTIVIDADES DEL PROYECTO

Las actividades del proyecto se detallaron en el cuadro 1. En el mismo cuadro aparece también una cuantificación de los resultados obtenidos sobre los programados, donde aparece claro que no hay discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.

4. RESULTADOS DEL PROYECTO

Actividades 1.1, 1.2, 1.3 y 1.5

Recolección de material vegetal

Se marcaron 63 plantas en la IV región, 142 en la V, 118 en la VI, 34 en la VII y 73 en la región metropolitana (RM), por un total de 430.

El cuadro con los detalles de este muestreo se encuentra en el Informe Técnico de Avance N° 4.

Recolección de suelo

Se recolectó suelo principalmente desde los predios donde se detectó GFLV para averiguar la correlación con el vector *Xiphinema index*.

En la IV región se recolectaron 34 muestras de suelo, 39 en la V, 9 en VI, 16 en la VII y 37 en la RM, por un total de 135.

Los detalles se encuentran en los Informe Técnicos de Avance N° 1, 2, 3, 4 y 5.

Actividad 1.4

Se almacenaron y mantuvieron en condiciones controladas 270 plantas de las 430 marcadas. En general se trató de mantener aquellas que resultaron positivas para virus y fitoplasmas de modo de poder disponer de una colección de plantas infectadas.

Actividad 1.5

En el cuadro 5 se detallan los resultados nematológicos obtenidos de las 135 muestras de suelo recolectadas.

Cuadro 5. Resultados análisis suelos

Predio (Variedad – Región)	Resultado ELISA en plantas		Cantidad de nematodo en 250 cm ³ de suelo	
	GFLV	ToRSV	<i>Xiphinema</i> Index	<i>Xiphinema.</i> <i>Americanum</i> s.l.
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	175
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	400
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	1500
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	45	0
Thompson – V	Neg.	Neg.	50	75
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	15	46
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	5	30
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	10	198
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	100	70
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	8	25
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	10	40
Sauvignon B.- V	Neg.	Neg.	0	18
Chardonnay – V	Pos.	Neg.	0	55
C.Sauvignon -RM	Pos.	Neg.	0	45
Carmenere –RM	Pos.	Neg.	0	30
Carmenere –RM	Pos.	Neg.	10	85
Thompson –V	Pos.	Neg.	10	5
Thompson –V	Pos.	Neg.	90	85
Crimson –IV	Pos.	Neg.	220	35
Pisquera –IV	Pos.	Neg.	90	75
Red Globe –IV	Pos.	Neg.	290	45
Flame –IV	Pos.	Neg.	115	35
Thompson –IV	Pos.	Neg.	210	145
Merlot –VII	Neg.	Neg.	0	35

Thompson –VI	Pos.	Neg.	55	80
Pinot Noir -V	Pos.	Neg.	0	45
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	90	0
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	40	0
Carmenere.- RM	Pos.	Neg.	90	0
Carmenere – RM	Pos.	Neg.	20	0
Thompson - V	Pos.	Neg.	120	10
Crimson – V	Pos.	Neg.	80	10
Thompson – V	Pos.	Neg.	105	30
Thompson –V	Pos.	Neg.	45	15
Merlot –VII	Neg.	Neg.	0	10
Syrah – VII	Neg.	Neg.	20	120
Syrah – VII	Pos.	Neg.	0	0
Thompson –VI	Pos.	Neg.	40	0
Petit Syrah – RM	Pos.	Neg.	0	35
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	30	10
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	90	35
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	900	10
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	35	0
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	10	0
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	60	0
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	10	0
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	65
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	95
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	120
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	30
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	75
Chardonnay – V	Neg.	Neg.	0	200
Thompson – V	Neg.	Neg.	80	0
Petit Syrah – RM	Neg.	Neg.	0	0
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	40	5
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	0	0
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – RM	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson – V	Pos.	Neg.	230	0
Petit Syrah – RM	Neg.	Neg.	0	0
Chardonnay – RM	Neg.	Neg.	120	0
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	25	0
Chardonnay – RM	Neg.	Neg.	30	0
Merlot – RM	Neg.	Neg.	0	50
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	170	0
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	280	0

C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	450	0
Thompson – RM	Neg.	Neg.	10	0
Red Globe – RM	Neg.	Neg.	15	0
C.Sauvignon – VI	Neg.	Neg.	15	35
Carmenere – VI	Neg.	Neg.	10	20
Carmenere – VI	Neg.	Neg.	0	30
Thompson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Red Globe – IV	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Red Globe – IV	Neg.	Neg.	0	0
Petit Syrah – RM	Neg.	Neg.	40	0
Petit Syrah – RM	Pos.	Neg.	35	0
Merlot – VI	Neg.	Neg.	0	45
C. Sauvignon - VI	Neg.	Neg.	0	25
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	0	0
3309 – VI	Neg.	Neg.	0	0
Merlot – VI	Neg.	Neg.	0	0
Merlot– VII	Neg.	Neg.	0	60
Syrah – VII	Neg.	Neg.	0	45
Autumn Royal – V	Pos.	Neg.	130	0
Autumn Royal - V	Pos.	Neg.	210	0
Serna – V	Neg.	Neg.	15	0
Carmenere - V	Neg.	Neg.	0	15
Carmenere – V	Neg.	Neg.	0	85
Merlot – V	Neg.	Neg.	0	220
Merlot – V	Neg.	Neg.	0	25
Sauvignon Blanc – V	Neg.	Neg.	0	145
Sauvignon Blanc – V	Neg.	Neg.	0	25
Sauvignon Blanc – V	Neg.	Neg.	0	40
Pinot Noir – V	Neg.	Neg.	10	140
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	0	15
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	0	50
Thompson – IV	Neg.	Neg.	35	20
Thompson – IV	Neg.	Neg.	40	10
Thompson – IV	Neg.	Neg.	110	15
Thompson – IV	Neg.	Neg.	45	0
Thompson – IV	Neg.	Neg.	80	75
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	40	55
Crimson – IV	Neg.	Neg.	155	0
Red Globe –IV	Neg.	Neg.	105	40
Moscatel – IV	Neg.	Neg.	240	0
Red Globe – IV	Neg.	Neg.	150	30

Crimson – IV	Neg.	Neg.	115	0
Thompson – IV	Neg.	Neg.	0	20
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	0	105
Thompson – IV	Neg.	Neg.	195	45
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	75	40
Thompson – IV	Neg.	Neg.	550	100
Flame – IV	Neg.	Neg.	240	55
Thompson – IV	Neg.	Neg.	420	110
Thompson – IV	Neg.	Neg.	335	25
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	20
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	30
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	15
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	30
Syrah – VII	Neg.	Neg.	0	10
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	130
Syrah – VII	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – V	Neg.	Neg.	0	10
Thompson – V	Neg.	Neg.	10	5
Thompson – IV	Neg.	Neg.	10	25
Syrah – IV	Neg.	Neg.	0	110
Syrah – IV	Neg.	Neg.	0	75
Merlot – VII	Neg.	Neg.	0	30
C. Sauvignon - VII	Neg.	Neg.	0	80
Carmenere - VII	Neg.	Neg.	0	0

De los 135 suelos analizados en 88 se encontró *Xiphinema americanum* s.l. (vector de ToRSV), mientras en 72 se detectó la presencia de *Xiphinema index* (vector de GFLV).

Como se observa en el cuadro anterior, no siempre hay correspondencia entre la presencia de infección por GFLV y su vector específico en el suelo. Como ya se dijo anteriormente en ningún caso hemos encontrado vides infectadas por ToRSV, pero sí hay abundancia de suelos con *X. americanum* s.l. Este grupo de nemátodos incluye un gran número de especie, o probables especies, todavía pocos conocidas. Por lo tanto, tampoco son claras las relaciones de especificidad con los diferentes nepovirus.

La cantidad de predios positivos a GFLV es de 33, de los cuales 27 también presentan a *X. index*. Por otro lado hay 45 predios con el nematodo sin que se hayan detectado infecciones del virus en las plantas. En este caso es probable que los vectores no sean infectivos por no haber nunca adquirido el virus y así poderlo transmitir a las plantas. En el caso de ausencia del vector en el suelo y presencia de plantas positivas, se presume que estas llegaron al predio ya infectadas.

La situación es sin duda alarmante, en cuanto la abundante presencia de nematodos vectores de virus en los suelo, es una amenaza para la viticultura del país. Es importante trabajar firmes para bajar la presión de los vectores, preocupándose al mismo tiempo de

propagar plantas libres de nepovirus, para que los nemátodos no los adquieran. Lamentablemente se ha visto como es difícil interrumpir el ciclo de la enfermedad, sobretodo en el caso de GFLV, en presencia de *X. index* infectivos.

Actividad 2.1

Se han desarrollado los protocolos ELISA para los siguientes virus: Grapevine fanleaf (GFLV), Tomato ringspot (ToRSV), Arabis mosaic (ArMV), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine leafroll associated virus-1, 2, 3 (GLRaV-1, 2, 3), Strawberry latent ringspot (SLRSV) y Grapevine fleck (GFkV). Esto ha permitido realizar a la brevedad la prospección en las regiones de interés para el proyecto.

Se detectó por primera vez en Chile la presencia de virus de importancia económica como GFkV y GVB. Además aunque existen informaciones sobre la presencia de GLRaVs en Chile, en este proyecto se planteó distinguir las tres especie más difundidas (GLRaV-1, 2 y 3) de las nueve reportadas a escala mundial. Estos resultados han sido confirmados posteriormente a través de la técnica de RT-PCR.

En las muestras que presentaban antecedentes sintomatológicos, tales como decaimiento de plantas, atraso en la brotación y falta de color, disminución de la concentración de azúcar en bayas de variedades rojas, se detectaron a través de ELISA principalmente los GLRaVs acompañados en algunos casos por GFkV, GVA y GVB. En el caso de infección múltiple, los síntomas resultaron ser más acentuados.

También en muestras de plantas que presentaban síntomas de amarilleces y mosaicos de las hojas se detectó GFLV.

Actividad 2.2

Como indicado en el Informe de Avance Técnico N° 5, con la técnica ELISA se ha logrado detectar solo GFLV en una muestra de 100 nematodos. Mientras en ningún caso ha sido posible detectar ToRSV en nematodos cuando se utilizaron en número de 50 como de 100. Estos resultados confirman que no es fácil la detección de los virus antes mencionados directamente en los nematodos vectores, porque al parecer el nivel de infección es muy bajo, debido al bajo número de nematodos infectados y/o porque los que resultan infectados poseen una baja carga viral.

Esto ha obligado a probar con otra técnica de diagnóstico, en específico con RT-PCR para los dos virus, logrando detectar solo GFLV en muestras de 100 nematodos. Mientras en ningún caso ha sido posible detectar ToRSV en nematodos extraídos de suelo con vides, cuando se utilizaron en número de 50 como de 100.

La imposibilidad de encontrar muestras de vid positivas a ToRSV, y por consecuencia, *Xiphinema americanum* s.l. positivos a ToRSV nos ha obligado a utilizar nematodos

extraídos de suelos con ciruelos positivos a ToRSV. En este caso se ha logrado detectar ToRSV solo en muestras de 100 *Xiphinema americanum* s.l..

Actividad 2.3

En el Informe de Avance Técnico N° 2 se detallan los protocolos de extracción de ácidos nucleicos para la detección de virus y de fitoplasmas. Además se detallan los protocolos para realizar la RT-PCR para GLRaV-2, GVA, GVB, GRSPaV y GLRaV-2 Red Globe – RG- (nueva denominación de Grapevine rootstock stem lesion-associated virus - GRSPaV). En el Informe de Avance Técnico N° 3 se encuentran los protocolos de RT-PCR para GFkV y de Nested-PCR para la detección de fitoplasmas en vid. En el Informe de Avance Técnico N° 4 se incluyeron los protocolos de RT-PCR para GFLV y GLRaV-3. En el Informe de Avance Técnico N° 5 se detallan los protocolos de RT-PCR para GLRaV-1 y ToRSV. En el Informe de Avance Técnico N° 6 se anexaron los protocolos de RT-PCR para ArMV y SLRV.

Resultados en virus

Se ha podido averiguar en forma preliminar y con algunas muestras infectadas con GLRaV-2, que RT-PCR es más sensible con respecto a ELISA.

Mediante RT-PCR se pudo confirmar los resultados obtenidos con ELISA, especialmente en relación a GVB que no había aun sido encontrado en Chile. Además se detectó GRSPaV y GLRaV-2 RG (antes GRSLaV), también nunca antes encontrado en Chile. Estos últimos dos virus solo se pueden diagnosticar mediante RT-PCR no existiendo anticuerpos para poder detectarlos a través de ELISA.

GLRaV-2 RG es un virus asociado a fenómenos de incompatibilidad en la variedad de uva de mesa Red Globe injertada.

También se observa que aquellas muestras de la variedad Red Globe positivas a GLRaV-2 a través de ELISA, resultan negativas a este mismo virus cuando se efectúa un análisis a través de la técnica de RT-PCR. Sin embargo, las mismas son positivas para GLRaV-2 RG, indicando con eso que existe una reacción cruzada de los anticuerpos de GLRaV-2 utilizados en ELISA con el virus GLRaV-2 RG. Esto tiene su justificación en el hecho que los dos virus comparten casi el 75% de su genoma.

En el caso de algunas muestras de vid resultadas positivas a ToRSV al inicio del proyecto, no ha sido posible confirmar el diagnóstico con RT-PCR. Sin embargo la técnica de RT-PCR montada para ToRSV funciona adecuadamente, en cuanto ha sido probada sobre material vegetal procedente de ciruelo positivo a ToRSV.

A raíz de los resultados obtenidos en vid con RT-PCR para ToRSV, hemos repetidos los análisis utilizando otro kit ELISA en las muestras de vid que el primer año de proyecto nos dieron un resultados positivo (todas estas muestras produjeron valores de absorbancia de

poco superiores al doble del control negativo). Los chequeos se realizaron tanto en noviembre como en abril, respectivamente sobre material vegetal verde y lignificado. En ambos casos los resultados han sido negativos, confirmando así el de RT-PCR. Con esto se concluye que utilizando la técnica ELISA en vid es muy importante la elección del kit de anticuerpo, porque es probable obtener falsos positivos. Así también se explica porque nunca ha sido posible detectar ToRSV, tanto con ELISA como con RT-PCR realizados en nematodos extraídos de los suelos con las vides supuestamente positivas al virus.

Resultados en fitoplasmas

El protocolo de extracción desde nervaduras de vides, ha dado como resultados la obtención de DNA de buena calidad que ha sido utilizado para Nested-PCR.

Se ha podido detectar y caracterizar a través de digestión enzimática los aislamientos de fitoplasmas encontrados en Chile, estableciendo que pertenecen al los grupos 16SrI-B (Michigan aster yellow), 16SrI-C (Clover phyllody), 16SrVII-A (Ash yellow), 16SrIII-J (Western X-disease group), 16SrXII-A (Bois noir). A tal propósito, muy valiosa ha sido la colaboración con el laboratorio de Fitoplasmología (a cargo de la Dra. Assunta Bertaccini) del Instituto de Patología Vegetal de la Universidad de Bologna.

Los antecedentes recopilados constituyen el primer informe sobre caracterización de fitoplasmas que infectan la vid en Chile.

Actividades 3.1, 3.2 y 3.3

Se realizó la caracterización genética, a través de análisis de secuencias, de 2 aislados virales y 4 de fitoplasmas.

Comparación de secuencias de los productos de amplificación de aislados chilenos de GLRaV-2 y GLRaV-2 RG con aquellas presentes en GenBank.

El largo de las porciones secuenciadas obtenidas a partir de los amplificados de GLRaV-2 y de GLRaV-2 RG ha sido respectivamente de 332 bp y 266 bp.

GLRaV-2 ha sido alineado con dos secuencias presentes en GenBank:

[gi|3123909|gb|AF039204.1|AF039204](#)  Grapevine leafroll-associated virus 2 methyltransferase/helicase
polyprotein gene, partial cds; and RNA-dependent RNA
polymerase, putative transmembrane small hydrophobic
protein, 65 kDa chaperone protein, 63 kDa protein, 25 kDa

diverged coat protein, >
Length = 15000

Score = 611 bits (308), Expect = e-172
Identities = 326/332 (98%)
Strand = Plus / Minus

Query: 121 gccctccgcgcaactaatgacagccttaataaagagagctatcaacccccggcagatgagc
180

|||||
Sbjct: 9467 gccctccgcgcaactaatgacagccttaataaagagagctatcaaccctggcagatgagc
9408

Query: 181 ctcagacttaacagtgccccgaagtttccaattgaaacagtttcgttcaagccagggcc
240

|||||
Sbjct: 9407 ctcagacttaacagtgccccgaagtttccaattgaaacagtttcgttcaagccagagcc
9348

Query: 241 gatcttaaccaagcggaccgggtaatgaggttttaaacgggtcaaggtacgcgtcgaggtt
300

|||||
Sbjct: 9347 gatcttaaccaagcggaccgagtaatgaggttttaaacgggtcaaggtacgcgtcgaggtt
9288

Query: 301 actcgaatcgcaacccacccaacgttttaaatctctataaaaacgaacctttaactttcaa
360

|||||
Sbjct: 9287 actcgaatcgcaacccacccaacgttttaaatctctataaaaacgaacctttaactttcag
9228

Query: 361 attactcatcagtgattcggcctcataacccaaaagtcatgtggttagaatcggagaagag
420

|||||
Sbjct: 9227 attactcatcagtgattcggcctcgtaacccaaaagtcatgtggttagaatcggagaagag
9168

Query: 421 atagagataagtggggatgtacgccgaattat 452

|||||
Sbjct: 9167 atagaggttaagtggggatgtacgccgaattat 9136

gi|2765391|emb|Y14131.1|GLAV4131 Grapevine leafroll-associated virus 2
genes encoding RNA polymerase
and coat protein, hsp70, hsp90 gene and ORF2, ORF7 and
ORF8
Length = 8590

Score = 611 bits (308), Expect = e-172
Identities = 326/332 (98%)

Strand = Plus / Minus

Query: 121 gccctccgcgcaactaatgacagccttaataaagagagctatcaaccccggcagatgagc
180
|||||
Sbjct: 3093 gccctccgcgcaactaatgacagccttaataaagagagctatcaaccctggcagatgagc
3034

Query: 181 ctcagacttaacagtgccccgaagtttccaattgaaacagtttcggttcaagccagggcc
240
|||||
Sbjct: 3033 ctcagacttaacagtgccccgaagtttccaattgaaacagtttcggttcaagccagagcc
2974

Query: 241 gatcttaaccaagcggaccgggtaatgaggttttaaacggtcaaggtacgcgtcgaggtt
300
|||||
Sbjct: 2973 gatcttaaccaagcggaccgagtaatgaggttttaaacggtcaaggtacgcgtcgaggtt
2914

Query: 301 actcgaatcgcaacccacccaacgttttaaatctctataaaacgaacctttaactttcaa
360
|||||
Sbjct: 2913 actcgaatcgcaacccacccaacgttttaaatctctataaaacgaacctttaactttcag
2854

Query: 361 attactcatcagtgattcggcctcataaccaaaagtcatgtggttagaatcggagaagag
420
|||||
Sbjct: 2853 attactcatcagtgattcggcctcgtaaccaaaagtcatgtggttagaatcggagaagag
2794

Query: 421 atagagataagtggggatgtacgccgaattat 452
|||||
Sbjct: 2793 atagaggtaagtggggatgtacgccgaattat 2762

GRSLaV ha sido alineado con una secuencia presente en GenBank:

gi|24636914|gb|AF314061.1| Grapevine rootstock stem lesion associated
virus (ahora denominado como GLRaV-2 RG)
methyltransferase/helicase polyprotein, RNA-dependent RNA
polymerase, p6, HSP70-like protein, HSP90-like protein,
coat protein duplicate, coat protein, p19, and p24 genes,
complete cds
Length = 16527

Score = 337 bits (170), Expect = 8e-90
Identities = 254/266 (95%), Gaps = 12/266 (4%)
Strand = Plus / Plus

Query: 101
gcgactccagcaacttttagtngactacttttagatncgcctngaagccacactatngcngg160
|||||
Sbjct: 10778
gcgactccagcaacttttagt-gactacttt-gat-cgcct-gaagccacactat-gc-gg 10831

Query: 161
ttcgcccgnataaaataggtactaggtctagaatgatactgggtgattataggaaactac220
|||||
Sbjct: 10832
ttcgcccgt-ataaaataggtact-ggtct-gaatgatac-ggtgattataggaaactac 10887

Query: 221
nggggggtaccgttcgttccgaagtgcatttgccaggactaatagcttcctttatcaaggc280
|||||
Sbjct: 10888
-nggggggtaccgttcgttccgaagtgcatttgccaggactaatagcttcctttatcaaggc 10946

Query: 281
gatggttagttgtgccgagaatgctttttcttgacttgacacgggagtgatattgttcagt340
|||||
Sbjct: 10947 gatggttagttgtgccgagaatgctttttcttgacttgacacgggagtgatattgttcagt
11006

Query: 341 gccagcngaattatgacagtgttcag 366
|||||
Sbjct: 11007 gccagc-gaattatgacagtgttcag 11031

Comparación de secuencias de los productos de amplificación de aislados chilenos de fitoplasmas de aproximadamente 1200 bp (Chile I y VII) y de aislados de aproximadamente 1500 bp (Chile a y b) con aquellas presentes en GenBank.

El largo de las porciones secuenciadas obtenidas a partir del amplificado de Chile I ha sido de 1141 bp.

Resultado de la alineación de Chile I con una secuencia presente en GenBank:

gi|56785865|gb|AY734453.1| Barley deformation phytoplasma 16S ribosomal
RNA gene, partial
sequence; 16S-23S rRNA intergenic spacer and tRNA-Ile gene,
complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1830
Score = 2181 bits (1100), Expect = 0.0
Identities = 1136/1141 (99%), Gaps = 0/1141 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query1 ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGG 60
|||||
Sbjct239 ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGG 298

Query61 TTGAACGGCCATATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 120
|||||
Sbjct299 TTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 358

Query121 AATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTC 180
|||||
Sbjct359 AATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTC 418

Query181 GGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTAC 240
|||||
Sbjct419 GGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTAC 478

Query241 CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGGCAAG 300
|||||
Sbjct479 CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGGCAAG 538

Query301 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTCTA 360
|||||
Sbjct539 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTCTA 598

Query361 AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCA 420
|||||
Sbjct599 AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCA 658

Query421 AGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAA 480
|||||
Sbjct659 AGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAA 718

Query481 GGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGGGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT 540
|||||
Sbjct719 GGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT 778

Query541 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAGCGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGT 600
|||||
Sbjct779 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAGCGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGT 838

Query601 TGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTCAAAG 660
|||||
Sbjct839 TGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAG 898

Query661 GAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGTACCCGAAA 720
|||||
Sbjct899 GAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGTACCCGAAA 958

Query721 AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAG 780
|||||
Sbjct959 AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAG1018

Query781 TTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG 840


```

|||||
Sbjct1019TTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG1078

Query841 CAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGAC 900
|||||
Sbjct1079CAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGAC1138

Query901 TGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACC 960
|||||
Sbjct1139TGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACC1198

Query961 TGGGCTACAAACGTGGTACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGC1020
|||||
Sbjct1199TGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGC1258

Query1021GAATCTCnnnnnnnnCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG1080
|||||
Sbjct1259GAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG1318

Query1081GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACAC1140
|||||
Sbjct1319GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACAC1378

Query 1141 A 1141
|
Sbjct 1379 A 1379

```

La secuencia de Chile I se incluyó en el GenBank con el Código AY741532:

```

LOCUS      AY741532                1141 bp    DNA      linear    BCT 17-
OCT-2004
DEFINITION Aster yellows phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION  AY741532
VERSION    AY741532.1  GI:54072621
KEYWORDS   .
SOURCE     Aster yellows phytoplasma
  ORGANISM Aster yellows phytoplasma
            Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
            Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; Candidatus
Phytoplasma
            asteris.
REFERENCE  1  (bases 1 to 1141)
  AUTHORS  Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and
            Bertaccini,A.F.
  TITLE    Identification of phytoplasmas infecting grapevines with
yellows
            symptoms in Chile
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2  (bases 1 to 1141)
  AUTHORS  Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and
            Bertaccini,A.F.
  TITLE    Direct Submission

```

JOURNAL Submitted (03-SEP-2004) DiSTA, University of Bologna, viale Fanin,

42, Bologna 40127, Italy

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1141

/organism="Aster yellows phytoplasma"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="grapevine"

/db_xref="taxon:35779"

/country="Chile"

rRNA <1..>1141

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 attagttagt tgggtgggta aaggcctacc aagactatga tgtgtagccg
ggctgagagg
61 ttgaacggcc atattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggg
agcagtaggg
121 aattttcggc aatggaggaa actctgaccg agcaacgccg cgtgaacgat
gaagtatttc
181 ggtacgtaaa gttcttttat tagggaagaa taaatgatgg aaaaatcatt
ctgacggtac
241 ctaatgaata agccccggct aactatgtgc cagcagccgc ggtaatacat
agggggcaag
301 cgttatccgg aattattggg cgtaaagggt gcgtaggcgg ttaaataagt
ttatggtcta
361 agtgcaatgc tcaacattgt gatgctataa aaactgttta gctagagtaa
gatagaggca
421 agtggaattc catgtgtagt ggtaaaatgc gtaaataatat ggaggaacac
cagtagcgaa
481 ggcggcttgc tgggtcttta ctgacgctgg ggcacgaaag cgtggggagc
aaacaggatt
541 agataccctg gtagtccacg ccgtaagcga tgagtactaa acgttgggta
aaaccagtgt
601 tgaagttaac acattaagta ctccgcctga gtagtacgta cgcaagtatg
aaactcaaag
661 gaattgacgg gactccgcac aagcgggtgga tcatgttggt taattcgaag
gtacccgaaa
721 aacctcacca ggtcttgaca tgcttctgca aagctgtaga aacacagtgg
aggttatcag
781 ttgcacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
ttaagtcccc
841 caacgagcgc aacccttatt gttagttacc agcacgtaat ggtggggact
ttagcaagac
901 tgccagtgat aaattggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc
ccttatgacc
961 tgggctacaa acgtggtaca atggctgtta caaagggtag ctgaagcgca
agtttttggc
1021 gaatctcaaa aaaacagtct cagttcggat tgaagtctgc aactcgactt
catgaagttg
1081 gaatcgctag taatcgcgaa tcagcatgtc gcggtgaata cgttctcggg
gtttgtacac
1141 a
```


El largo de las porciones secuenciadas obtenidas a partir del amplificado de Chile VII ha sido de 1232 bp.

Resultado de la alineación de Chile VII con una secuencia presente en GenBank:

gi|3860033|gb|AF092209.1|AF092209 Ash yellows phytoplasma 16S ribosomal
RNA gene, 16S-23S ribosomal
RNA intergenic spacer region, and tRNA-Ile gene, complete
sequence
Length=1722

Score = 2403 bits (1212), Expect = 0.0
Identities = 1227/1232 (99%), Gaps = 0/1232 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query1   TGCTAAGACTGGATAGGAAATAAAAAGGCATCTTTTTATTTTAAAAGACCTTTTTCGGA 60
|||||
Sbjct115 TGCTAAGACTGGATAGGAAATAAAAAGGCATCTTTTTATTTTAAAAGACCTTTTTCGAA 174

Query61  AGGTATGCTTAAAGATGAGCTTGCGCCACATTAGTTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCA 120
|||||
Sbjct175 AGGTATGCTTAAAGATGAGCTTGCGCCACATTAGTTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCA 234

Query121 AGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTCGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGC 180
|||||
Sbjct235 AGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTCGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGC 294

Query181 CCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGA 240
|||||
Sbjct295 CCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGA 354

Query241 GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAA 300
|||||
Sbjct355 GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAA 414

Query301 AAATAGTGGA AAAA ACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCC 360
|||||
Sbjct415 AAATAGTGGA AAAA ACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCC 474

Query361 AGCAGCCGCGGTAAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTG 420
|||||
Sbjct475 AGCAGCCGCGGTAAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTG 534

Query421 CGTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGA 480
|||||
Sbjct535 CGTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGA 594

Query481 AACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGT 540
|||||
Sbjct595 AACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGT 654

Query541 GTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGA 600
```

Sbjct655 ||||| GTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGA 714
 Query601 GGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA 660
 Sbjct715 ||||| GGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA 774
 Query661 TGAGTACTAAGTGTCTGGGATAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCT 720
 Sbjct775 ||||| TGAGTACTAAGTGTCTGGGATAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCT 834
 Query721 GAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTG 780
 Sbjct835 ||||| GAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTG 894
 Query781 GATCGTGTGTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGC 840
 Sbjct895 ||||| GATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGC 954
 Query841 AAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG 900
 Sbjct955 ||||| AAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG1014
 Query901 TTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAGTTAC 960
 Sbjct1015 ||||| TTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAGTTAC1074
 Query961 CAGCACGTAATGGTGGGCACTTTAACGAGACCGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTGAGG1020
 Sbjct1075 ||||| CAGCACGTAATGGTGGGCACTTTAACGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTGAGG1134

 Query1021 ATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTT1080
 Sbjct1135 ||||| ATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTT1194
 Query1081 ACAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGA1140
 Sbjct1195 ||||| ACAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGA1254
 Query1141 TTGAAGTCTGTAACCTGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGT1200
 Sbjct1255 ||||| TTGAAGTCTGTAACCTGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGT1314
 Query1201 CGCGGTGAATACGTTTACGGGGTTTGTACACA 1232
 Sbjct1315 ||||| CGCGGTGAATACGTTTCTCGGGGTTTGTACACA 1346

La secuencia de Chile VII se incluyó en el GenBank con el Código AY741531:

LOCUS AY741531 1232 bp DNA linear BCT 17-OCT-2004

DEFINITION Candidatus Phytoplasma fraxini 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AY741531

VERSION AY741531.1 GI:54072620

KEYWORDS .

SOURCE Candidatus Phytoplasma fraxini

ORGANISM Candidatus Phytoplasma fraxini
Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales; Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; 16SrVII (Ash yellows group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1232)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and Bertaccini,A.F.

TITLE Identification of phytoplasmas infecting grapevines with yellows symptoms in Chile

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1232)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and Bertaccini,A.F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-SEP-2004) DiSTA, University of Bologna, viale Fanin, 42, Bologna 40127, Italy

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..1232

/organism="Candidatus Phytoplasma fraxini"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="grapevine"

/db_xref="taxon:35780"

/country="Chile"

rRNA <1..>1232

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tgctaagact ggataggaaa taaaaaggca tctttttatt tttaaaagac

ctttttcgga

61 aggtatgctt aaagatgagc ttgcgccaca ttagtttggt ggtggggtaa

tggcctacca

121 agacgatgat gtgtagctgg actgagaggt cgaacagcca cattgggact

gagacacggc

181 ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcggca atggaggaaa

ctctgaccga

241 gcaacgccgc gtgaacgatg aagtatttcg gtatgtaaag ttcttttatt

gaagaagaaa

301 aaatagtgga aaaactatct tgacgttatt caatgaataa gccccggcta

actatgtgcc

361 agcagccgcg gtaagacata gggggcgagc gttatccgga attattgggc

gtaaagggtg

```

421 cgtaggcggg taggaaagtc tataatttaa tttcagtgtc taacgctgtc
ttgttataga
481 aactaccttg actagagtta gatagaggca agcgggaattc catgtgtagc
ggtaaaatgt
541 gtaaataatat ggaggaacac cagaagcgta ggcggcttgc tgggtcttga
ctgacgctga
601 ggcacgaaaag cgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg
ccgtaaacga
661 tgagtactaa gtgtcgggat aaaactcggg actgaagtta acacattaag
tactccgcct
721 gagtagtacg tacgcaagta tgaaacttaa aggaattgac gggactccgc
acaagcggtg
781 gatcgtgttg ttttaattcga agatacacga aaaatcttac caggtcttga
catgctctgc
841 aaagctatag aaatatagtg gaggttatca gggacacagg tgggtcatgg
ttgtcgtcag
901 ttcgtgtcgt gagatgtag gttaagtcct aaaacgagcg caacccttgt
cgtagttac
961 cagcacgtaa tgggtggcac tttaacgaga ccgccaatta aacattggag
gaaggtgagg
1021 attacgtcaa atcatcatgc cccttatgat ctgggctaca aacgtgatac
aatggctgtt
1081 acaaagagta gctgaagcgc gagtttttag ccaatctcaa aaaagcagtc
tcagttcggg
1141 ttgaagtctg taactcgact tcatgaagtt ggaatcgcta gtaatcgca
atcagcatgt
1201 cgcggtgaat acgttcacgg ggtttgtaga ca

```

El largo de las porciones secuenciadas obtenidas a partir del amplificado de Chile a ha sido de 1542 bp.

Resultado de la alineación de Chile a con una secuencia presente en GenBank:

gi|62750872|emb|AJ964960.1| Candidatus Phytoplasma solani 16S rRNA gene,
partial 16S-23S

IGS and tRNA-Ile gene, isolate 2642BN
Length=1684

Score = 2642 bits (1333), Expect = 0.0
Identities = 1381/1396 (98%), Gaps = 1/1396 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query1   AGGCATCTTCTATTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTC   60
|||||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct172 AGGCATCTTTTATTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTC 231

Query61  ACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGGTGATGTGTAGCCGGGCTGAGA 120
|||||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct232 ACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGA 291

Query121 GGTCGAACGGCCACATTGGGGCTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAA 180
|||||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct292 GGTCGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTNCTACGGGAGGCAGCAGTAA 351

```


Query181 GGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGTATT 240
 ||
 Sbjct352 GGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGTATT 411

 Query241 TCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGT 300
 ||
 Sbjct412 TCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGT 471

 Query301 ACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCA 360
 ||
 Sbjct472 ACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCA 531

 Query361 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTC 420
 ||
 Sbjct532 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTC 591

 Query421 TAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAGAGG 480
 ||
 Sbjct592 TAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAGAGG 651

 Query481 CAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCG 540
 ||
 Sbjct652 CAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCG 711

 Query541 AAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 600
 ||
 Sbjct712 AAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA 771

 Query601 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGT 660
 ||
 Sbjct772 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGT 831

 Query661 GTTGAAGTTAACACATTAAATACTCCGCCTGAGTGGTACGTACGCAAGTATGAACTTAA 720
 ||
 Sbjct832 GTTGAAGTTAACACATTAAATACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAA 891

 Query721 AGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCTGAAGGTGCCCCA 780
 ||
 Sbjct892 AGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCTGAAGGTACCCGA 951

 Query781 AAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCCGTAGAAATACAGTGGAGGTTATC 840
 ||
 Sbjct952 AAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAGGTTATC1011

 Query841 AGAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC 900
 | ||
 Sbjct1012AAAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC1071

 Query901 CGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGAC 960
 ||
 Sbjct1072CGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGAC1131

 Query961 TGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC-AATCATCATGCCCCCTTATGACC1019
 ||

Sbjct1132TGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACC1191

Query1020CGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGCTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGC1079
 |||

Sbjct1192TGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGC1251

Query1080GAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG1139
 |||

Sbjct1252GAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG1311

Query1140GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTCTGTACAC1199
 |||

Sbjct1312GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACAC1371

Query1200ACCGCCCGTCAAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAGCTGGTGGCCTAACTTGAGCAAT1259
 |||

Sbjct1372ACCGCCCGTCAAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAGCCGGTGGCCTAACTTGAGCAAT1431

Query1260CAAGAAGGAGCCGTCTAAGGTAGGGTTGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCC1319
 |||

Sbjct1432CAAGAAGGAGCCGTCTAAGGTAGGGTTGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCC1491

Query1320CACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAAGTTATCATCTTCAGTTT1379
 |||

Sbjct1492TACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAAGTTATCATCTTCAGTTT1551

Query1380GAGAGACTTAAGAAAG 1395
 |||

Sbjct1552GAGAGACTTAAGAAAG 1567

Score = 192 bits (97), Expect = 2e-45
 Identities = 102/104 (98%), Gaps = 0/104 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query1409AAGATTTCGGGCCTATAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCCTGATAAGTGTGAGGTCGGTG1468
 |||

Sbjct1581AAGATTTCGGGCCTATAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCCTGATAAGCGNGAGGTCGGTG1640

Query1469GTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAAAATAGGTCACATCTTAAAA 1512
 |||

Sbjct1641GTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAAAATAGGTCACATCTTAAAA 1684

La secuencia de Chile a se incluyó en el GenBank con el Código AY739654:

LOCUS	AY739654	1541 bp	DNA	linear	BCT 03-
OCT-2004					
DEFINITION	Stolbur phytoplasma clone a 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S				
	ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-Ile				
	gene, complete sequence.				
ACCESSION	AY739654				
VERSION	AY739654.1 GI:52789116				

KEYWORDS .

SOURCE Candidatus Phytoplasma solani

ORGANISM Candidatus Phytoplasma solani
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
 Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; 16SrXII (Stolbur
 group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1541)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and
 Bertaccini,A.F.

TITLE Identification of phytoplasmas infecting grapevine with
 yellow in
 Chile

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1541)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and
 Bertaccini,A.F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-SEP-2004) DiSTA, University of Bologna, viale
 Fanin,
 42, Bologna 40127, Italy

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1541
 /organism="Candidatus Phytoplasma solani"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="Chilean grapevine with Stolbur
 disease"
 /db_xref="taxon:69896"
 /clone="a"

rRNA <1..1350
 /product="16S ribosomal RNA"

misc RNA 1351..>1541
 /product="16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer"

tRNA 1417..1492
 /product="tRNA-Ile"

ORIGIN

1 aggcattctt ttatttttaa aagacctagc aataggtatg cttagggaag
 agcttgcgtc

61 acattagtta gttggtggg taatggccta ccaagacggt gatgtgtagc
 cgggctgaga

121 ggtcgaacgg ccacattggg gctgagacac ggcccaaact cctacgggag
 gcagcagtaa

181 ggaattttcg gcaatggagg aaactctgac cgagcaatgc cgcgtgaacg
 atgaagtatt

241 tcggtacgta aagttctttt attagggaag aaaagatggt ggaaaaacca
 ttatgacggt

301 acctaataa taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggtataac
 atagggggca

361 agcggtatcc ggaattattg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggttaaataa
 gtttatggtc

421 taagtgaac gctcaacggt gtgatgctat aaaaactgtt tagctagagt
 tggatagagg

481 caagtggaat tccgtgtgta gtggtaaaat gcgtaaatat acggaggaac
 accagaagcg

541 aaggcggctt gctgggtctt aactgacgct gaggcacgaa agcgtgggga
 gcaaacagga

601 ttagataccc tggtagtcca cgccctaaac gatgagtact aaacgttgga
 taaaaccagt

```

661 gttgaagtta acacattaaa tactccgcct gagtgggtacg tacgcaagta
tgaaacttaa
721 aggaattgac gggactccgc acaagcgggtg gatcatgttg ttttaattcga
aggtgcccga
781 aaaacctcac cagggtcttga catgcttttg caaagccgta gaaatacagt
ggaggttatc
841 agaagcacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg
ggttaagtcc
901 cgcaacgagc gcaacccttg ttgttaattg ccatcattaa gttggggact
ttagcaagac
961 tgccaatgat aaattggagg aaggtgggga cgacgtcaat catcatgccc
cttatgaccc
1021 gggctacaaa cgtgatacaa tggctgctac aaagggtagc taaagcgtaa
gcttctggcg
1081 aatctcaaaa aagcagtctc agttcggatt gaagtctgca actcgacttc
atgaagttgg
1141 aatcgctagt aatcggaat cagcatgtcg cgggaatac gttctcgggg
tctgtacaca
1201 ccgcccgtca aaccacgaaa gttggcaata cccaaagctg gtggcctaac
ttgagcaatc
1261 aagaaggagc cgtctaaggt agggttgatg attgggggta agtcgtaaca
aggtatcccc
1321 accggaaggt ggggatggat cacctccttt ctaaggataa agttatcatc
ttcagttttg
1381 agagacttaa gaaagttttt cattttttta gattcgggcc tatagctcag
ctggttagag
1441 cacacgcctg ataagtgtga ggtcgggtgt tcaagtccat ttaggccac
caaaataggt
1501 cacatcttaa aaaagctctt tgaaaggtag ataaacaaag g

```

El largo de las porciones secuenciadas obtenidas a partir del amplificado de Chile b ha sido de 1544 bp.

Resultado de la alineación de Chile b con una secuencia presente en GenBank:

gi|13649444|gb|AF248959.1|AF248959 Stolbur phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, complete sequence;

tRNA-Ile gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1783

Score = 2922 bits (1474), Expect = 0.0

Identities = 1530/1546 (98%), Gaps = 2/1546 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query1      AAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTG  60
|||||
Sbjct173    AAGAAGGCATCTTTTATTTTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTG  232

Query61     CGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGACGGTGATGTGTAGCCGGGCT  120
|||||
Sbjct233    CGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCT  292

```


Query121 GAGAGGTGGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA 180
 |||||
 Sbjct293 GAGAGGTGGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA 352

 Query181 GTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAG 240
 |||||
 Sbjct353 GTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAG 412

 Query241 TATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAACCAACATTATGA 300
 |||||
 Sbjct413 TATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAACCAACATTATGA 472

 Query301 CGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACATATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGG 360
 |||||
 Sbjct473 CGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACATATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGG 532

 Query361 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTAT 420
 |||||
 Sbjct533 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTAT 592

 Query421 GGTCTAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATA 480
 |||||
 Sbjct593 GGTCTAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATA 652

 Query481 GAGGCAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGA 540
 |||||
 Sbjct653 GAGGCAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGA 712

 Query541 AGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGCGGAGCAAAC 600
 |||||
 Sbjct713 AGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGCGGAGCAAAC 772

 Query601 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAAC 660
 |||||
 Sbjct773 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAAC 832

 Query661 CAGTGTTGAAGTTAACACATTAAATACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAAC 720
 |||||
 Sbjct833 CAGTGTTGAAGTTAACACATTAAATACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAAC 892

 Query721 TTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGTAC 780
 |||||
 Sbjct893 TTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGTAC 952

 Query781 CCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGAGGT 840
 |||||
 Sbjct953 CCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGAGGT 1012

 Query841 TATCAGACGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA 900
 |||||
 Sbjct1013 TATCAGACGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA 1072

 Query901 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCA 960
 |||||
 Sbjct1073 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCA 1132

 Query961 AGACTGCCAATGATAAATTGGAGG-AGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1019


```

|||||
Sbjct1133AGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT1192

Query1020GACCCGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTC1079
|||||
Sbjct1193GACCTGGGCTACAAATGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTC1252

Query1080TGGCGAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA1139
|||||
Sbjct1253TGGCGAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA1312

Query1140GTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT1199
|||||
Sbjct1313GTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT1372

Query1200ACGCACCGCCCGTCAAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAGCTGGTGGCCTAAGTTGAG1259
||
Sbjct1373ACACACCGCCCGTCAAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAGCCGGTGGCCTAAGTTGAG1432

Query1260CAATCAAGAAGGAGCCGTCTAAGGTAGGGTTGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTA1319
|||||
Sbjct1433CAATCAAGAAGGAGCCGTCTAAGGTAGGGTTGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTA1492

Query1320TCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAAGTTATCATCTTCAG1379
|||||
Sbjct1493TCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAAGTTATCATCTTCAG1552

Query1380TTTTGAGAGACTTAAGAAAGTTTTTCA-TTTTTAAGATTTCGGGCCTATAGCTCAGCTGGT1438
|||||
Sbjct1553TTTTGAGAGACTTAAGAAAGTTTTTCATTTTTTAAGATTTCGGGCCTATAGCTCAGCTGGT1612

Query1439TAGAGCACACGCCTGATAAGTGTGAGGTCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAAAA1498
|||||
Sbjct1613TAGAGCACACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAAAA1672

Query1499TAGGTCACATCTTAAAAAAGCTCTTTGAAAGGTAGATAAAACAAAGG 1544
|||||
Sbjct1673TAGGTCACATCTTAAAAAAGCTCTTTGAAAGGTAGATAAAACAAAGG 1718

```

La secuencia de Chile b se incluyó en el GenBank con el Código AY739653:

```

LOCUS      AY739653      1544 bp      DNA      linear      BCT 03-
OCT-2004
DEFINITION  Stolbur phytoplasma clone b 16S ribosomal RNA gene and 16S-
23S
            ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-
Ile
            gene, complete sequence.
ACCESSION  AY739653
VERSION    AY739653.1  GI:52789115
KEYWORDS    .
SOURCE      Candidatus Phytoplasma solani
ORGANISM    Candidatus Phytoplasma solani
            Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;

```


Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; 16SrXII (Stolbur group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 1544)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and Bertaccini,A.F.

TITLE Identification of phytoplasmas infecting grapevine with yellow in

Chile

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1544)

AUTHORS Botti,S., Fiore,N., Gajardo,A., Montealegre,J.R. and Bertaccini,A.F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-SEP-2004) DiSTA, University of Bologna, viale Fanin,

42, Bologna 40127, Italy

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1544

/organism="Candidatus Phytoplasma solani"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="Chilean grapevine with Stolbur disease"

/db_xref="taxon:69896"

/clone="b"

rRNA <1..1354

/product="16S ribosomal RNA"

misc RNA 1355..>1544

/product="16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer"

tRNA 1420..1495

/product="tRNA-Ile"

ORIGIN

1 aagaaggcat cttcttattt ttaaaagacc tagcaatagg tatgcttagg
gaagagcttg

61 cgtcacatta gttagtgttg ggggtaacgg cctaccaaga cggatgatgtg
tagccgggct

121 gagaggctga acggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg
ggaggcagca

181 gtaaggaatt ttcggaatg gaggaaactc tgaccgagca atgccgcgtg
aacgatgaag

241 tatttcggta cgtaaagtgc ttttattagg gaagaaaaga tgggtgaaaa
accattatga

301 cggtacctaa tgaataagcc ccggctaact atgtgccagc agccgcggta
atacataggg

361 ggcaagcggt atccggaatt attgggcgta aagggtgcgt aggcgggttaa
ataagtttat

421 ggtctaagtg caacgctcaa cgttgtgatg ctataaaaac tgttttagcta
gagttggata

481 gaggcaagtg gaattccgtg tgtagtggtg aaatgcgtaa atatacggag
gaacaccaga

541 agcgaaggcg gcttgctggg tcttaactga cgctgaggca cgaaagcggtg
gggagcaaac

601 aggattagat accctggtag tccacgccct aaacgatgag tactaaacgt
tggataaaac

661 cagtgttgaa gttaacacat taaatactcc gcctgagtag tacgtacgca
agtatgaaac

```

721 ttaaaggaat tgacgggact cgcacaagc ggtggatcat gttgtttaat
tcgaaggtac
781 ccgaaaaacc tcaccaggtc ttgacatgct tttgcaaagc tgtagaaata
cagtggaggt
841 tatcagacgc acagggtggtg catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat
gttgggttaa
901 gtcccgaac gagcgcaacc cttgttgta attgccatca ttaagttggg
gacttttagca
961 agactgcaa tgataaattg gaggaggtgg ggacgacgac aaatcatcat
gccccttatg
1021 acccgggcta caaacgtgat acaatggctg ttacaaagg tagctaaagc
gtaagcttct
1081 ggcgaatctc aaaaaagcag tctcagttcg gattgaagtc tgcaactcga
cttcatgaag
1141 ttggaatcgc tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttctc
ggggtttgta
1201 cgcaccgccc gtcaaaccac gaaagttggc aatacccaa gctggtggcc
taacttgagc
1261 aatcaagaag gagccgtcta aggtagggtt gatgattggg gttaagtcgt
aacaaggtat
1321 ccctaccgga aggtggggat ggatcacctc ctttctaagg ataaagttat
catcttcagt
1381 tttgagagac ttaagaaagt ttttcatttt taagattcgg gcctatagct
cagctgggta
1441 gagcacacgc ctgataagtg tgaggtcggt ggttcaagtc catttaggcc
caccaaaata
1501 ggtcacatct taaaaaagct ctttgaaagg tagataaaca aagg

```

Actividad 3.4

Se estableció en invernadero un bloque de plantas infectadas con los aislados virales y de fitoplasmas secuenciados en las actividades anteriores. Se mantendrán en colección para poder tener fácil acceso a estos patógenos para eventuales futuros trabajos.

Actividad 4.1

Costo de las técnicas de detección

Los valores que se expresan a continuación se refieren al costo por muestra y por un patógeno.

Técnica ELISA (detección virus)

Item de costo	Costo en \$
Reactivos	3.310
Personal	590
Gasto de administración	952
Uso de infraestructura, mantenimiento equipos, gastos básicos	230
TOTAL	5.082

Técnica RT-PCR (detección virus)

Item de costo	Costo en \$
Reactivos	7.427
Personal	6.875
Gasto de administración	4.930
Uso de infraestructura, mantenimiento equipos, gastos básicos	1.342
TOTAL	20.574

Técnica Nested-PCR (detección fitoplasmas)

Item de costo	Costo en \$
Reactivos	7.067
Personal	6.875
Gasto de administración	7.140
Uso de infraestructura, mantenimiento equipos, gastos básicos	1.342
TOTAL	22.424

Especificidad y sensibilidad de las técnicas de detección

Especificidad

En todos los ensayos realizados, tanto para la técnica ELISA como para RT-PCR no se han observado reacciones cruzadas.

Sensibilidad

1. Resultados ensayos con la técnica ELISA

Figura 1. Ensayo de sensibilidad para GFLV

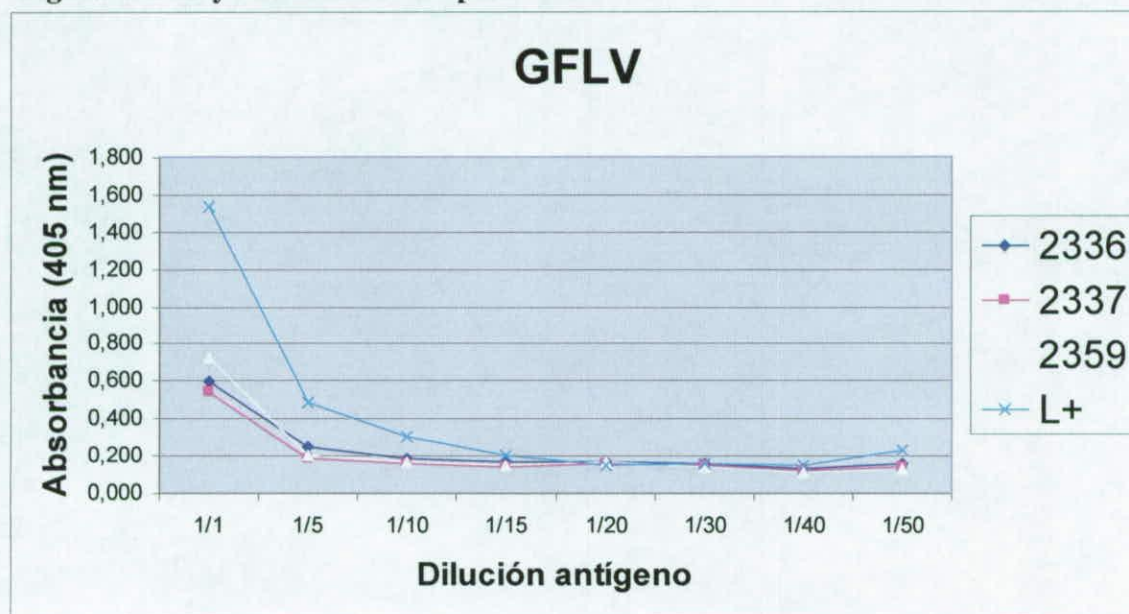


Figura 2. Ensayo de sensibilidad para GLRaV-1

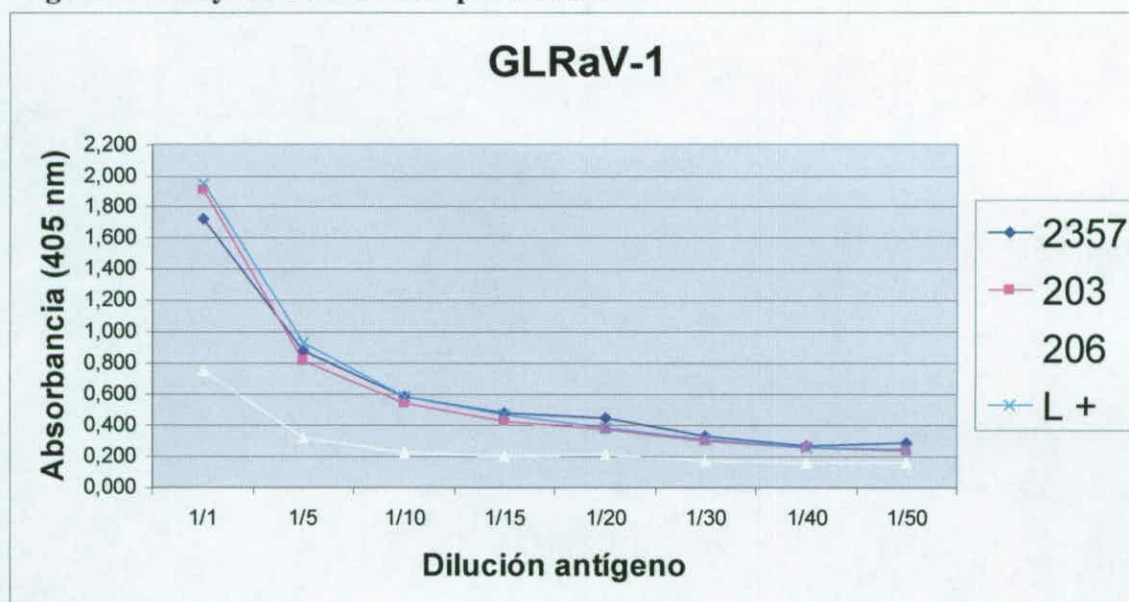


Figura 3. Ensayo de sensibilidad para GLRaV-2

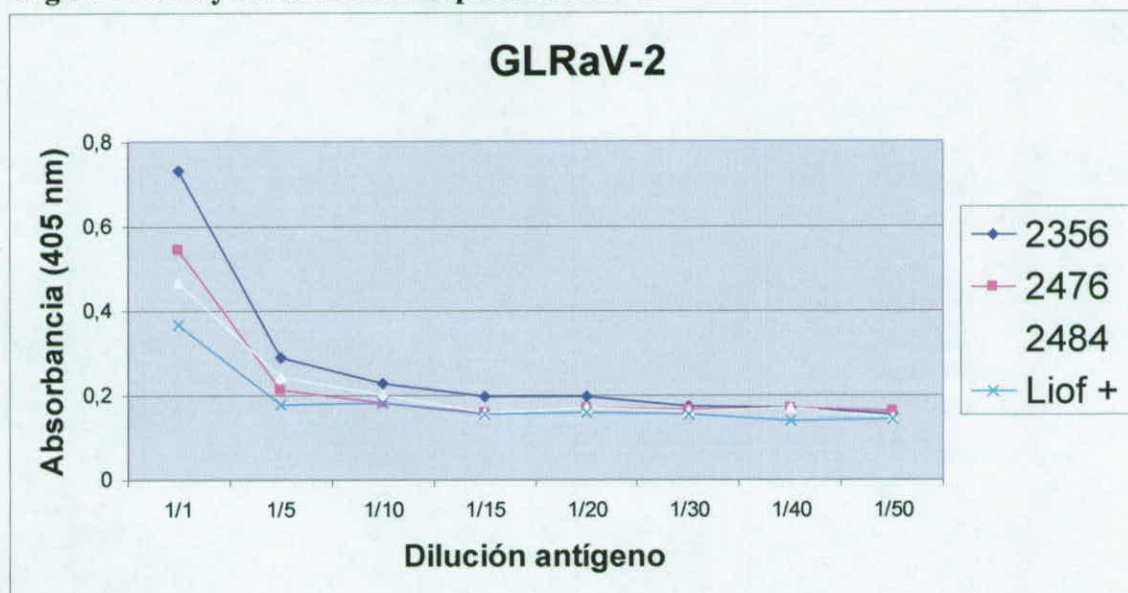


Figura 4. Ensayo de sensibilidad para GLRaV-3

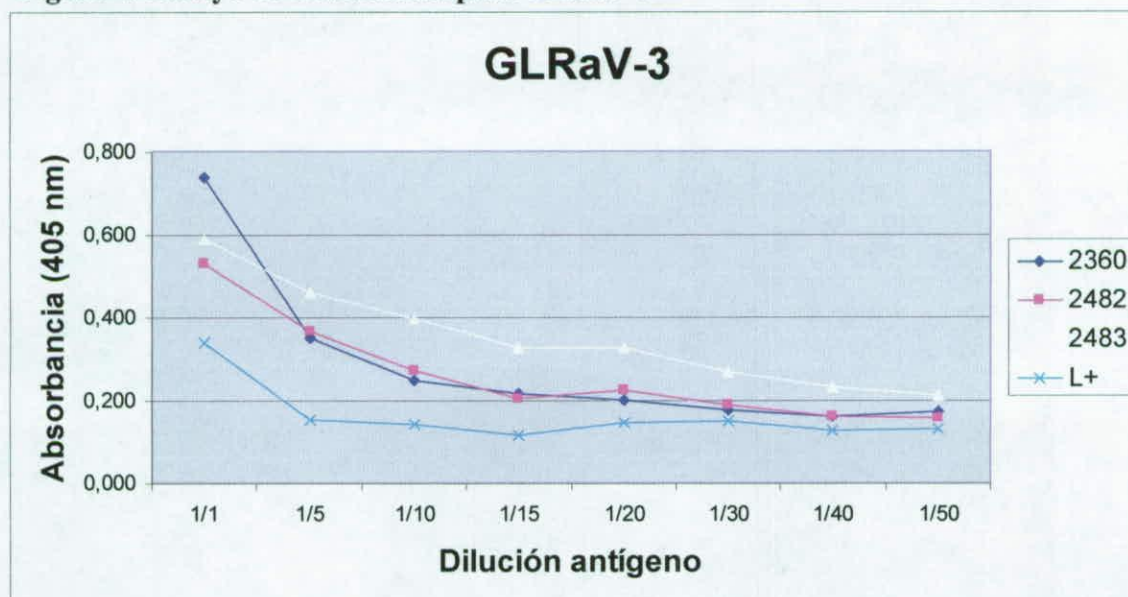


Figura 5. Ensayo de sensibilidad para GVA

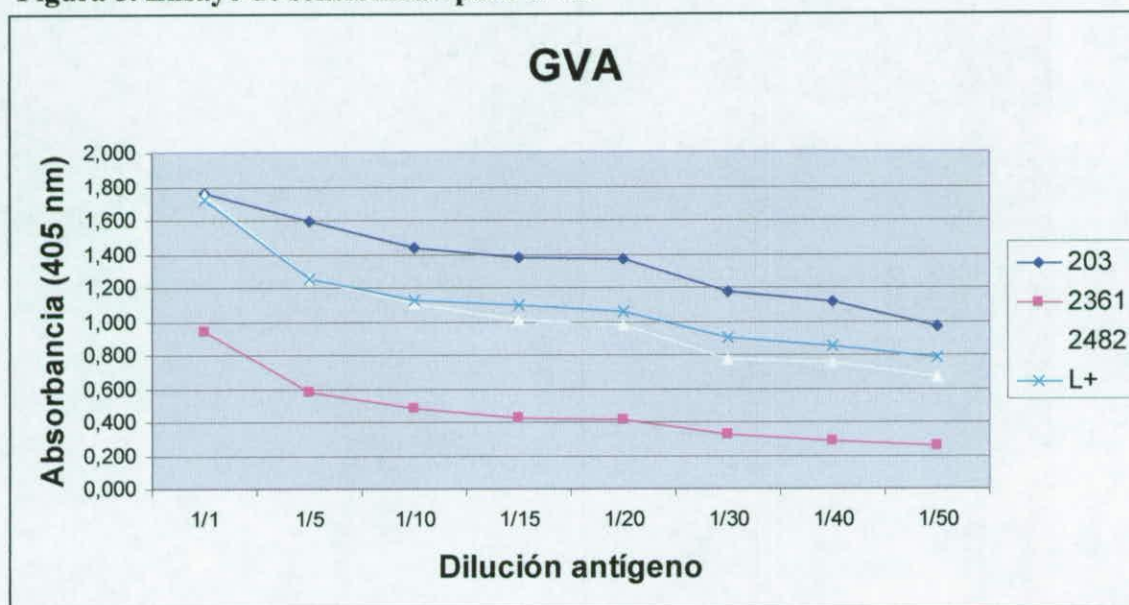
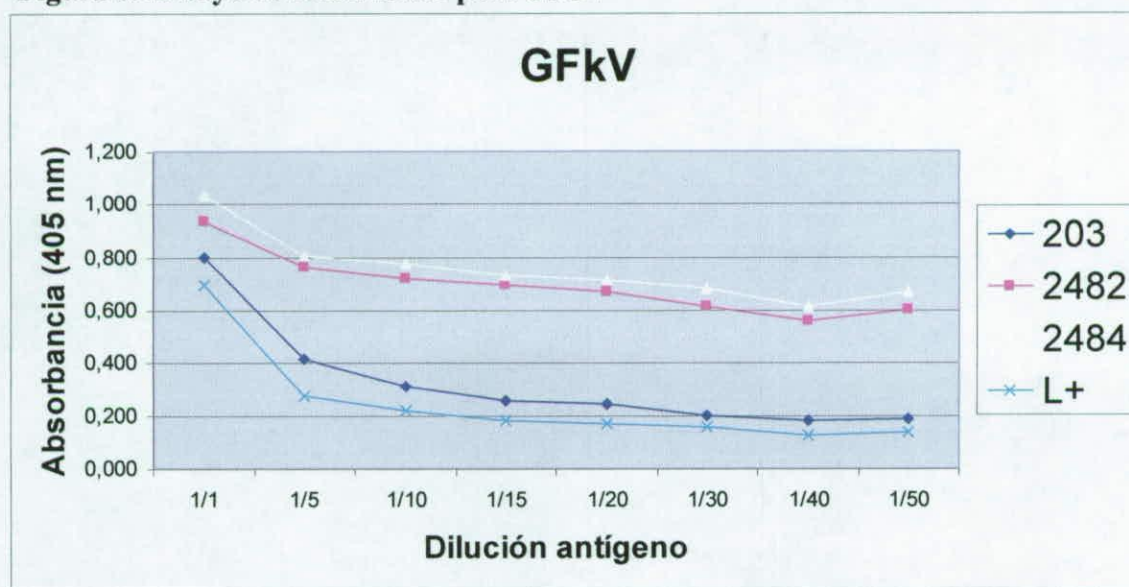


Figura 6. Ensayo de sensibilidad para GFkV



L+ corresponde a tejido vegetal liofilizado infectado.

Los datos de absorbancia corresponden a la lectura de las placas a tres horas de haber agregado el sustrato para la fosfatasa alcalina.

En todos los anteriores ensayos la absorbancia de los controles negativos no supera en promedio el valor de 0,100 nm.

Los valores de absorbancia observados en las diferentes muestras de un mismo ensayo dependen de la concentración del virus en cada muestra utilizada. Donde hay más partículas virales, los valores de absorbancia son más altos.

En el caso de figura 1 y figura 3 los valores de absorbancia de las muestras 2359 y 2337 (GFLV) y 2476 (GLRaV-2) a la dilución de 1/5 no logran el doble del control negativo. Por lo tanto el umbral de detección es de 1/1. Con GLRaV-1 (figura 2) lo anterior ocurre con la muestra 206 a la dilución 1/10, por lo tanto el umbral de detección es de 1/5. Con GLRaV-3 (figura 4) y GVA (figura 5) las respectivas muestras 2482 y 2361 no alcanzan el valor doble de absorbancia del control negativo, y de consecuencia el umbral de detección de 1/10. GFkV es el kit que presenta el mejor umbral de detección que corresponde a la dilución 1/20 (figura 6).

2. Resultados ensayos con la técnica RT-PCR

Cuadro 6. Ensayo de sensibilidad para los diferentes virus

GFLV	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
2336	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2337	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2359	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GLRaV-2	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
2356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2476	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2484	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GVA	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2361	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2482	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GLRaV-1	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
206	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2357	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GLRaV-3	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
2360	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2483	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2482	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFkV	1/1	1/5	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2482	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2484	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tomando en consideración el peor resultado en cada ensayo, se puede definir el umbral de detección para cada virus. Esto corresponde a 1/100 para GFLV, GLRAV-1, GLRAV-2, GVA y GFkV. Solo para GLRaV-3 corresponde a 1/200.

Para ambas técnicas (ELISA y RT-PCR) no hubo diferencia de resultado cuando se realizaron las diluciones mezclando floema infectado con sano en lugar de diluir los extractos.

Mejor época de muestreo

Los resultados se detallan en los cuadros 7, 8 y 9 presentes en anexo.

Actividad 5.1

Se capturaron insectos tanto en vid como en plantas de especies diferentes (generalmente malezas) presentes en los viñedos o alrededor de ellos. En el cuadro 10 se detalla la cantidad de insectos recolectados durante los dos años de duración del proyecto de alargue.

Cuadro 10. Número de insectos que se capturaron en las regiones de muestreo.

Región	Número de insectos
V	174
VI	50
VII	94
RM	191
Total	509

Actividad 5.2

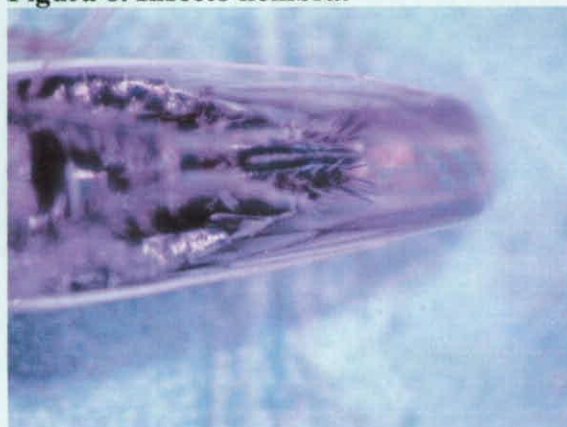
La observación a la lupa de los insectos capturados, ha permitido separarlos en 18 grupos morfológicos, sobre la base de conformación y dibujos presentes en la superficie del cuerpo del insecto. Al interior de cada grupo se han podido separar los machos de las hembras en cuanto estas últimas poseen, al final del abdomen (último urite) las espadas ó térebras que sirven para la ovodeposición en los tejidos vegetales (Figura 7 y 8).

Los insectos recolectados con trampas se han dañados de forma tal que no ha sido posible realizar una caracterización de los mismos. Para obviar a este problema se prefirió utilizar las redes entomológicas.

Figura 7. Insecto macho.



Figura 8. Insecto hembra.



Actividad 5.3

El número de insectos analizados para fitoplasmas es inferior a aquellos capturados, en cuanto varios se enviaron a Italia para la caracterización.

El nested-PCR ha funcionado bien también para análisis en insectos. No ha habido ningún problema también con los insectos capturados con las trampas.

Detalles se encuentran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados análisis nested-PCR en langostinos por región

Región	Número de insectos analizados	Número de insectos positivos	Porcentaje de positivos
V	141	16	11,3%
VI	42	6	14,3%
VII	87	10	11,5%
RM	168	9	5,4 %
Total	438 insectos	41 insectos	9,4%

Actividad 5.4

Caracterización de langostinos asociados a viñedos

Utilizando la clave de identificación simplificada de los hemípteros *Auchenorrhyncha* que ha sido elaborada por el Dr. Alberto Alma, ha sido posible agrupar algunos insectos en la Familia *Cicadellidae*, Subfamilias *Deltocephalinae*, *Agallinae*, *Cicadellinae*, *Dorycephalinae* y *Typhlocybinae*. Otros insectos han sido identificados como pertenecientes a las Familias *Delphacidae* y *Cixiidae*.

Para los *Deltocephalinae* y *Agallinae* ha sido posible aclarar el género y especie de algunos insectos capturados. El Dr. Alberto Alma está realizando la determinación de la especie de los insectos recolectados.

Otros insectos han sido capturados utilizando trampas pegajosa que han dañado los insectos y por lo tanto con ellos se ha podido realizar solamente el análisis para fitoplasmas sin poderlos caracterizar.

En el cuadro 12 se especifica lugar de recolección y agrupación de los insectos capturados.

Cuadro 12. Clasificación de los insectos y región de captura.

Insectos	Número de insectos capturados por región				Total
	VII	VI	V	RM	
1) Familia Cicadellidae					
a) Subfamilia Deltocephalinae					
-clasificación incompleta	45	29	47	60	181
-ninfas	1	2	3	-	6
-Género y especie					
<i>Euscelis</i> ó <i>Euscelidius</i> sp.		1		1	2
<i>Circulifer</i> sp.	-	-	1	-	1
<i>Amplipcephalus</i> sp.	1	-	-	2	3
<i>Amplipcephalus curtulus</i>	25	17	37	15	94
b) Subfamilia Agallinae					
-ninfas	3	-	1	-	4
-Género y especie					
<i>Anaceratagallia laevis</i>	5		4	11	20
c) Subfamilia Typhlocybinae					
-ninfas clasificación incompleta	-	-	15	-	15
-adultos clasificación incompleta	-	-	49	1	50
d) Subfamilia Cicadellinae					
-adultos clasificación incompleta	-	-	1	-	1
e) Subfamilia Dorycephalinae					
-adultos clasificación incompleta	1		2		3
2) Familia Delphacidae					
-ninfas clasificación incompleta	-	1	-	-	1
-adultos clasificación incompleta	2	-	3	3	8
3) Familia Cixiidae					
-adultos clasificación incompleta	-	-	1	-	1
4) Insectos no clasificados desde trampas	8	-	5	91	104
5) Ninfas no clasificadas	3	-	5	7	15
Total	94	50	174	191	509

Caracterización de fitoplasmas encontrados en langostinos asociados a viñedos

De los langostinos que han sido analizados en Chile (véase tabla 11) 41 han dado resultado positivo para fitoplasmas. Para algunos de estos se realizó la restricción enzimática (RFLP) y se secuenció el producto de amplificación con el fin de determinar a cual grupo y subgrupo de fitoplasmas pertenecen. De los insectos *Deltocephalinae*, por los cuales se está todavía realizando la caracterización para conocer género y especie, seis resultaron infectados por el subgrupo ribosomal 16SrIII-J, tres por el 16SrVII-A, uno por el 16SrXII-A y otro por el grupo 16SrII. Con el *Amplicephalus curtulus*, también perteneciente a la subfamilia *Deltocephalinae*, se han encontrado cinco individuos infectados por el fitoplasma 16SrI-B, otros cinco por el 16SrXII-A y uno con infección mixta con los dos fitoplasmas mencionados. Finalmente el Cixiidae resultó positivo al 16SrI-B y la ninfa de *Anaceratagallia laevis* al 16SrIII-J (ver cuadro 13).

Se adjuntan fotos de los insectos encontrados que estimamos potenciales vectores de fitoplasmas (Figuras 9, 10, 11 y 12).

Cuadro 13. Fitoplasmas encontrados en insectos.

Código insecto	Clasificación	Región de recolección	Resultado RFLP	Resultado secuencia	Tipo de fitoplasma
52	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	n.d.	n.d.	n.d.
53	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	n.d.	n.d.	n.d.
57	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	n.d.	n.d.	n.d.
60	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	16SrIII-J	16SIII	X-disease group
61	<i>Amplicephalus curtulus</i>	VII	n.d.	n.d.	n.d.
67	<i>Amplicephalus</i> sp.	VII	n.d.	n.d.	n.d.
68	<i>Amplicephalus curtulus</i>	VII	n.d.	n.d.	n.d.
78	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	16SrII	n.d.	Peanut witches' broom group
100	<i>Deltoccephalinae</i>	VII	16SrIII-J	n.d.	X-disease group
121	<i>Deltoccephalinae</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
132	<i>Deltoccephalinae</i>	V	16SrIII-J	n.d.	X-disease group
175	<i>Deltoccephalinae</i>	V	16SrIII-J	n.d.	X-disease group
179	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
185	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	n.d.	n.d.	n.d.
202	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
209	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
211	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A y 16SrI-B	n.d.	Stolbur group y Aster yellows groups
213	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	n.d.	n.d.	n.d.
216	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
219	<i>Cixiidae</i>	V	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
220	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
223	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
224	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	n.d.	n.d.	n.d.
226	<i>Amplicephalus curtulus</i>	V	16SrXII-A	n.d.	Stolbur group
264	<i>Amplicephalus curtulus</i>	RM	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
265	<i>Amplicephalus curtulus</i>	RM	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
266	<i>Amplicephalus curtulus</i>	RM	16SrI-B	n.d.	Aster yellows group
284	<i>Delphacidae</i>	RM	n.d.	n.d.	n.d.
324	<i>Deltoccephalinae</i>	RM	n.d.	n.d.	n.d.
325	<i>Deltoccephalinae</i>	RM	n.d.	n.d.	n.d.
329	<i>Deltoccephalinae</i>	RM	n.d.	n.d.	n.d.
379	<i>Deltoccephalinae</i>	V	n.d.	n.d.	n.d.
399	Ninfa de <i>Anaceratagallia laevis</i>	VII	n.d.	16SrIII	X-disease group
499	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	n.d.	n.d.	n.d.
500	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	16SrVII-A	16SrVII	Ash yellows group
504	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	n.d.	16SrVII	Ash yellows group
507	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	16SrIII-J	16SrIII	X-disease group
510	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	16SrIII-J	16SrIII	X-disease group
514	<i>Deltoccephalinae</i>	VI	n.d.	16SrVII	Ash yellows group
543	No clasificado	RM	n.d.	n.d.	n.d.
544	No clasificado	RM	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no determinado

Figura 9. Adulto de *Amplicephalus curtulus*



Figura 10. Adulto de *Anaceratagallia laevis*



Figura 11. Adulto de *Deltocephalinae*



Figura 12. Adulto de *Cixiidae*



Actividad 6.1

Se recolectaron plantas de especies diferentes (generalmente malezas) presentes en los viñedos o alrededor de ellos. En el cuadro 14 se detalla la cantidad de plantas recolectadas durante los dos años de duración del proyecto de alargue.

Cuadro 14. Número de plantas recolectadas en las regiones de muestreo.

Región	Número de plantas recolectadas en cada región
V	36
VI	6
VII	21
RM	26
Total	89

Actividad 6.2

La observación de las plantas recolectadas, ha permitido separarlas en 26 grupos morfológicos, de los cuales solo 19 han sido caracterizadas como especie (véase el cuadro número 16).

Actividad 6.3

El total de plantas asociadas a viñedos, positivas a fitoplasmas se encuentra en el cuadro 15, y en el cuadro 17 se detallan las especies infectadas. Las que resultaron positivas a fitoplasmas son: doce *Convolvulus arvensis* L., dos *Polygonum aviculare* L., una *Galega officinalis* L. y una maleza no caracterizada.

Cuadro 15. Resultados análisis nested-PCR en plantas asociadas a viñedos.

Región	Número de plantas analizadas	Número de plantas positivas	Porcentaje de positivos
V	36	9	25%
VI	6	2	33%
VII	21	0	0%
RM	26	5	19%
Total	89	16	18%

Actividad 6.4

Caracterización de plantas asociadas a viñedos

Utilizando los manuales de reconocimiento de malezas indicados anteriormente y con la asesoría de la profesora Verónica Días, ha sido posible reconocer las especies más comunes asociadas a los viñedos visitados. Además se ha recolectado muestras de Espino con “Escoba de bruja” para analizar y definir si los síntomas observados se deben a presencia de fitoplasmas.

Cuadro 16. Nombre de las especies de plantas y región de recolección.

Especie		Número de plantas recolectadas por región				Total
Nombre botánico	Nombre común	VII	VI	V	RM	
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Correhuela	6	3	13	7	29
<i>Polygonum aviculare</i> L.	Sanguinaria ó pasto del pollo	3	1	6	6	16
<i>Galega officinalis</i> L.	Galega	-	-	-	1	1
<i>Brassica rapa</i> L.	Yuyo	-	-	2	3	5
<i>Malva nicaensis</i> All.	Malva	3	-	1	3	7
<i>Taraxacum officinale</i> Weber	Diente de león ó lechuguilla	3	-	-	-	3
<i>Trifolium repens</i> L.	Trebol blanco	1	1	-	-	2
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Verdolaga	1	-	-	-	1
<i>Galium aparine</i> L.	Lengua de gato	-	-	1	-	1
<i>Erodium cicutarium</i> L.	Alfilerillo	-	-	4	1	5
<i>Senecio vulgaris</i> L.	Senecio	-	-	-	1	1
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Fumaria ó Hierba de la culebra	-	-	-	2	2
<i>Baccharis pingraea</i> DC.	Chilquilla	-	-	1	-	1
<i>Cerastium arvensis</i> (L.) Scop.	Cerastium	-	-	1	-	1
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Quilloi-quilloi	-	-	1	-	1
<i>Modiola caroliniana</i> (L.) G. Don	Falsa frutilla	2	-	-	-	2
<i>Medicago sativa</i> L.	Alfalfa	-	1	-	-	1
<i>Madia sativa</i> Mol.	Melosa	-	-	-	1	1
<i>Acacia caven</i> (Mol.) Mol.	Espino	-	-	2	1	3
No clasificadas		2	-	4	-	6
Total		21	6	36	26	89

Caracterización de fitoplasmas encontrados en plantas asociadas a viñedos

De las plantas analizadas, 16 han dado resultado positivo para fitoplasmas. Para algunos de estos positivos se realizó la restricción enzimática (RFLP) y se secuenció el producto de amplificación con el fin de determinar a cual grupo y subgrupo de fitoplasmas pertenecen.

De los *Convolvulus arvensis* L., uno resultó positivo al fitoplasma 16SrVII-A y otro al 16SrIII-J. En un *Polygonum aviculare* L. se determinó la presencia de una infección mixta con 16SrI-B y 16SrVII-A. La *Galega officinalis* L. resultó estar infectada por el 16SrVII-A y finalmente la maleza no clasificada es positiva al 16SrIII-J (ver cuadro 17).

Se adjuntan fotos de las tres malezas que pueden ser reservorio de fitoplasmas en los viñedos (Figuras 13, 14 y 15).

Cuadro 17. Fitoplasmas encontrados en plantas asociadas a viñedos.

Código maleza	Especie botánica	Región de recolección	Resultado RFLP	Resultado secuencia	Tipo de fitoplasma
119	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
123	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
153	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	VI	n.d.	n.d.	n.d.
154	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	VI	n.d.	n.d.	n.d.
155	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
158	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
159	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	RM	n.d.	16SrVII	Ash yellows group
160	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	RM	n.d.	n.d.	n.d.
161	<i>Galega officinalis</i> L.	RM	16SrVII-A	16SrVII	Ash yellows group
162	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	RM	n.d.	n.d.	n.d.
163	<i>Polygonum aviculare</i> L.	RM	16SrI-B y VII-A	16Sr-VII	Aster y Ash yellows groups
234	No clasificada	V	n.d.	16SrIII	X-disease group
235	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	16SrIII	X-disease group
259	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
261	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.
262	<i>Polygonum aviculare</i> L.	V	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no disponible

Figura 13. *Convolvulus arvensis* L.



Figura 14. *Polygonum aviculare* L.

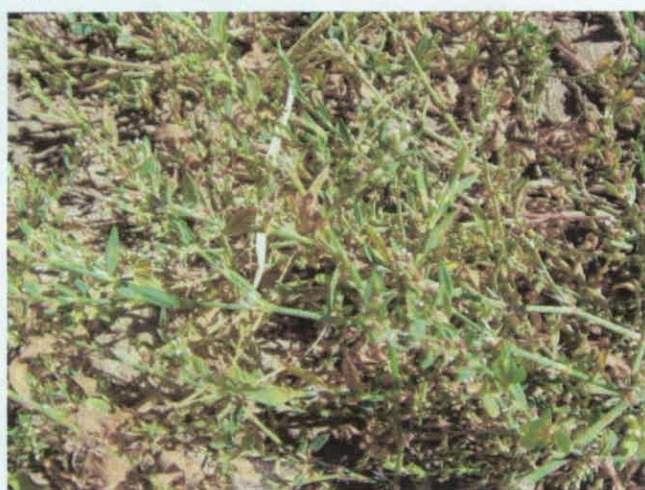


Figura 15. *Galega officinalis* L.



5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Véase cuadro 18 y supuesto del análisis económico en anexo.

6. IMPACTOS Y LOGROS DEL PROYECTO

El proyecto ha sido de gran interés para los productores de uva vinífera y de mesa en todos los lugares muestreados, porque se contribuyó a clarificar la etiología de ciertos desordenes (ej: falta de color en producción de uva de mesa y amarilleces del follaje). Además ha demostrado que los langostinos, a pesar de no ser causa de daño directo para las vides, están abundantemente presentes en los viñedos y representan, junto con las malezas, un importante medio de diseminación de fitoplasmas.

El éxito obtenido con las Charlas Técnicas, los Días de Campo y el Seminario Internacional demuestra el interés sobre las actividades desarrolladas y resultados obtenidos en el marco del proyecto.

El haber desarrollado las técnicas de diagnóstico con el presente proyecto, ha permitido al grupo de trabajo poder participar en la postulación y adjudicación de un proyecto financiado por el Fondo de Desarrollo e Innovación INNOVA CORFO en la III región del país. Se trata del proyecto "Incremento de la productividad en parronales de la tercera región a través de un mejoramiento sanitario del sistema radical y de la prevención de infecciones por virus y fitoplasmas", código 05CR11IAT-07. Esto permitirá derivar los beneficios generados por el presente proyecto también a la tercera región.

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE EL PROYECTO

En general se ha logrado desarrollar con éxito las actividades programadas.

Sin embargo no ha sido posible encontrar nematodos positivos a ToRSV en suelos plantados con vides. Además, según las últimas investigaciones realizadas, tampoco se encontraron vides positivas al virus antes mencionado.

A pesar de esto se pudo poner a punto la técnica de diagnóstico para el ToRSV, utilizando material vegetal infectado de ciruelo y nematodos (*X.americanum* s.l.) extraídos desde suelos con ciruelos positivos al virus.

Tampoco ha sido posible encontrar plantas de vid positivas a SLRV. También para este caso se pudo poner a punto la técnica de RT-PCR, utilizando material vegetal infectado de durazno positivo al virus.

La caracterización de los insectos no ha sido simple, en cuanto no se dispone de suficiente información sobre los langostinos presentes en Sudamérica y en especial en Chile. Esto ha significado un atraso en la clasificación, que todavía no está completa. De toda manera el Dr. Alberto Alma sigue en su labor de clasificación aunque los resultados completos se obtendrán más allá de la duración del proyecto y serán disponibles para un eventual trabajo de investigación que se entregará a FIA una vez publicado.

8 OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

Se entregaron personalmente los resultados de los análisis realizados en vides a los administradores y/o gerentes de los principales predios muestreados, haciéndose los comentarios pertinentes para cada situación.

Se incluyó el desarrollo de la técnica de detección de GLRaV-2 RG (nueva denominación del virus conocido con el acrónimo: GRSLaV) por la importancia que ha tenido en especial manera para la variedad de uva de mesa Red Globe.

Nuestro grupo de trabajo ha adquirido una notable experiencia en la detección y caracterización de fitoplasmas, tanto en vid y malezas asociadas, como en insectos. Esto nos permitirá averiguar las condiciones fitosanitaria y aclarar algunos aspectos epidemiológicos relacionados con fitoplasmas, también en otras especies vegetales.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el desarrollo de la técnica ELISA se ha logrado establecer la condición sanitaria de las plantas de los predios muestreados con respecto a los virus investigados.

Se ha determinado la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA y GVB.

En ningún caso se ha encontrado SLRV, ToRSV. ArMV ha sido detectado por ELISA en algunas muestras, presentando una señal muy débil. Así que en este caso se ha realizado un análisis confirmatorio con RT-PCR, cuyo resultado ha sido negativo. Por lo tanto, se puede concluir que SLRV, ToRSV y ArMV no son de importancia para la vid en Chile.

Ha sido posible distinguir dentro de los "leafroll" la presencia de las especies 1, 2 y 3.

Han sido detectados por primera vez en Chile los virus GFkV y GVB.

Con el desarrollo de la técnica RT-PCR ha sido posible confirmar los resultados obtenidos con ELISA y además se han podido encontrar los virus GRSPaV y GLRaV-2 RG (antes denominado GRSLaV) por primera vez en las vides chilenas.

El kit ELISA utilizado para GLRaV-2 reacciona también con la cepa RG. Para determinar de cuales de los dos virus está infectada la planta analizada, se debe recurrir a la técnica de RT-PCR.

Aplicando la técnica ELISA para la detección de GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, GLRaV-1, 2, 3, GFkV en material vegetal recolectado al azar, se han obtenidos resultados que indican presencia de algunos de estos virus con porcentajes de infección preocupantes. Esto indica que hay una importante presencia de virus en viñas y parronales chilenos que indudablemente afectan los niveles de producción en cuanto a cantidad y calidad.

Preocupa la abundante presencia de nematodos ectoparásitos vectores de virus *Xiphinema index* y *X. americanum* s.l. en los diferentes suelos analizados. Sabemos también que no es infrecuente encontrar plantas infectadas por GFLV. Esto genera una situación de máxima alerta por los daños que se pueden producir en la viticultura chilena, ya que están dadas las condiciones para iniciar y mantener por largo tiempo el ciclo de la enfermedad viral. Es importante que los nemátodos no adquieran el virus y para eso es oportuno introducir, en estas condiciones de suelos, plantas libres de GFLV.

Se ha desarrollado la técnica ELISA y RT-PCR en nematodos para detectar GFLV y ToRSV. Más sensible ha resultado la RT-PCR con respecto a ELISA. Para GFLV ambas técnicas han funcionado. Mientras para ToRSV solo ha sido posible la detección con RT-PCR.

Las pruebas para ToRSV se han realizados utilizando nematodos extraídos desde suelo con ciruelos positivos al virus, no encontrándose vides infectadas con ToRSV.

Esta herramienta permite establecer si los nematodos presentes en el suelo son infectivos, ayudando así a completar las informaciones para una mejor toma de decisión.

Los resultados de los análisis de fitoplasmas ponen en evidencia una situación preocupante. Se observan porcentajes de infección altos, a pesar de la dificultad de detectar estos patógenos en plantas debido a su baja concentración. En su mayoría las que se analizaron fueron plantas sintomáticas, por lo tanto los datos obtenidos no definen la incidencia de los fitoplasmas en los viñedos y parronales de Chile. Si embargo en algunos sitios muestreados las plantas positivas a fitoplasmas han sido más del 50%, lo que indica una situación de epidemia.

Ha sido posible determinar la presencia de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16srI subgrupos B y C en algunas de las vides analizadas, siendo este el primer informe sobre la caracterización de estos fitopatógenos en *Vitis vinifera* L. en Chile.

La información relativa a la identificación del subgrupo de fitoplasmas ha sido posible gracias a la colaboración con la Doctora Assunta Bertaccini de la Universidad de Bologna, Italia.

Cabe destacar que también se encontró el fitoplasma asociado a la enfermedad epidémica llamada “madera negra” (Bois noir), subgrupo ribosomal 16SrXII-A; el subgrupo 16SrIII-J y se identificó por primera vez en vid a nivel mundial el subgrupo 16SrVII-A.

Estos antecedentes son de gran importancia para empezar a entender el origen de algunas sintomatologías -observadas en viñas y parronales chilenos- de las cuales no se conocen los factores desencadenantes.

El trabajo de caracterización y análisis de fitoplasmas para insectos *Auchenorrhyncha* y malezas presentes en viñedos, ha dado valiosas informaciones sobre la modalidad de diseminación de estos patógenos. El insecto *Aplicephalus curtulus* es muy común en los viñedos chilenos y probablemente se definirá como un nuevo vector de los fitoplasmas pertenecientes a los grupos Stolbur (16SrXII-A) y Aster yellows (16SrI-B y C). Una vez caracterizadas las otras *Deltocephalinae*, será posible determinar cuales especies serían las más comunes en Chile como vectores de fitoplasmas pertenecientes a los grupos Ash yellows (16SrVII-A) y X-disease (16SrIII-J).

Sin embargo, es importante establecer la eficiencia de transmisión de los langostinos positivos a fitoplasmas, a través de ensayos de invernadero. Pero para esto es imprescindible disponer de ulteriores financiamientos.

Parecen ser un importante reservorio de fitoplasmas las malezas Correhuela (*Convolvulus arvensis* L.), Sanguinaria ó pasto del pollo (*Polygonum aviculare* L.) y Galega (*Galega officinalis* L.). Las primeras dos muy comunes en viñedos chilenos.

Se determinó la mejor época de muestreo para la detección de cuatro virus. Los resultados obtenidos con este ensayo permitieron poder elegir el mejor tejido vegetal a muestrear en relación al virus y al período del año en que se necesite realizar los análisis. Para la detección de todos los virus, desde brotación hasta que estén disponibles los sarmientos verdes, es aconsejable realizar los análisis utilizando la RT-PCR tanto en brotes como en hojas no completamente desarrolladas. En períodos sucesivos se puede realizar una ELISA utilizando los sarmientos verdes y lignificados.

La RT-PCR confirmó ser la técnica más sensible respecto a ELISA cuando la carga viral es baja (durante brotación), sin embargo su eficiencia disminuye en la medida que aumentan en la planta los azúcares y polifenoles, inhibidores de la enzima polimerasa.

Para todos los virus, el tejido más reactivo (100% de resultados positivos), tanto con ELISA como con RT-PCR, es el floema procedente de sarmientos lignificados.

Con la técnica ELISA se obtienen buenos resultados también con los sarmientos verdes. De toda manera en los meses en que se encuentran contemporáneamente en la planta sarmientos verdes y lignificados, estos últimos resultan ser los más sensible. Además, los sarmientos lignificados están disponibles para el muestreo por un mayor número de meses durante el año incluyendo julio y agosto.

Los protocolos de análisis utilizados en nuestro laboratorio para realizar este ensayo permitieron la detección de GFLV y GFkV con ELISA durante los 12 meses con un éxito del 96 y 97% respectivamente, mientras el valor más alto obtenido con RT-PCR correspondió a GVA con el 91%.

Se ha podido constatar que las diferentes enzimas utilizadas para la realización de la PCR hacen que los costos totales de los reactivos aumenten considerablemente con esta técnica. Además, para la realización de la PCR se necesita de más espacio en el laboratorio y un mayor número de equipos cuyo mantenimiento es caro.

Los costos del personal y de administración resultan más altos con la PCR porque es menor el número de muestras que se pueden procesar en una unidad de tiempo. Por ejemplo, en el caso del personal de laboratorio, si se consideran tres personas trabajando jornada completa, es posible procesar 400 muestras al mes con ELISA y 240 con PCR, en este último caso tanto para la detección de virus como para fitoplasmas.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de especificidad de demuestran que los kits de ELISA y los protocolos de RT-PCR utilizados son virus específicos, por lo tanto de alta confiabilidad para su uso en forma rutinaria.

Se ha podido comprobar que con ELISA, la sensibilidad de la técnica baja rápidamente. Esto nos confirma la necesidad de evitar analizar muestras compuestas (juntar material vegetal de diferentes plantas a formar una muestra), en cuanto es muy alta la probabilidad de obtener resultados falsos negativos, cuando la carga viral en la planta es baja.

Se subraya la buena calidad del kit para la detección de GFkV, que presenta una sensibilidad mucho más alta con respecto a los otros.

Se confirma la mayor sensibilidad de RT-PCR con respecto a ELISA. Es de tomar en cuenta este dato cuando se quiera aconsejar una técnica de detección en los programas de selección sanitaria y certificación.

Se obtuvo la secuencia del amplicon de GLRaV-2 (tamaño de 332 bp) y de GLRaV-2 RG (tamaño de 266 bp). Sucesivamente se alinearon estas secuencias con las presentes en el GenBank para la comparación. El GLRaV-2 se alineó con dos secuencias del GenBank presentando una similitud del 98% en ambos casos. GLRaV-2 RG se alineó con la única secuencia presente en GenBank con una similitud del 95%. Estos resultados confirman que los dos aislados chilenos corresponden a los virus antes mencionados. La mayor variabilidad del GLRaV-2 RG depende en larga parte por los errores ocurridos en fase de secuencias y que corresponden al 4% del fragmento secuenciado.

Se obtuvieron también las secuencias de los amplicones de los fitoplasmas denominados Chile I (tamaño de 1141 bp), Chile VII (1232 bp), Chile a (1542 bp) y Chile b (1544 bp). Se realizó el alineamiento de estas con aquellas secuencias presentes en el GenBank.

Chile I se alineó con diferentes secuencias del GenBank presentando en todos los casos una similitud del 99%. Estos resultados confirman que el aislado chileno de fitoplasma es un "aster yellows", grupo I, subgrupo B (16SrI-B).

Chile VII se alineó con diferentes secuencias presentando alta similitud con aislados de ash yellows (grupo VII). Con la secuencia AY034608 (fitoplasma 16SrVII-B) presentó una similitud de 98%, mientras con la secuencia AF092209 (fitoplasma 16SrVII-A) presentó una similitud de 99%. Esto significa que el aislado chileno es un "ash yellows" y corresponde al grupo VII, subgrupo A.

Chile "a" se alineó con diferentes secuencias presentando alta similitud con aislados de "stolbur" (grupo XII). Con la secuencia AJ964960 (fitoplasma 16SrXII-A) presentó una similitud del 98%, sin embargo al aislado chileno faltan 14 bp en la región intergénica, esto permite colocarlo en el grupo XII, sin pero poder asignarle a un subgrupo. Ulteriores estudios son necesarios para establecer si se trata de un nuevo subgrupo.

Chile "b" se alineó con diferentes secuencias presentando alta similitud (98%) con AF248959 (fitoplasma 16SrXII-A). A diferencia de Chile "a", en este caso no faltan los 14 bp de la región intergénica, por lo tanto se puede concluir que Chile "b" pertenece al grupo XII (stolbur) subgrupo A. Esto significa que el aislado chileno es el fitoplasma de la "madera negra" ó "bois noir".

Las actividades de difusión se han traducido en una eficaz promoción del proyecto, con gran beneficio para el desarrollo de las actividades.

Tanto el seminario internacional, las charlas técnicas, los día de campo, como también la participación a los congresos nacionales e internacionales y las publicaciones, han permitido dar a conocer el trabajo realizado en el marco del proyecto FIA. Además han

permitido consolidar, tanto a nivel nacional como internacional, el grupo de trabajo en enfermedades producidas por virus y fitoplasmas en vid de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

La presencia de virus y fitoplasmas en las vides chilenas representa una seria amenaza para el cultivo. Además, en los mismos viñedos hemos también encontrado malezas y langostinos infectados por fitoplasmas, aumentado así el riesgo de diseminación de estos patógenos.

La detección es el primer paso para tomar conciencia de la situación y así evitar futuros problemas. Se recuerda que en el caso de virus y fitoplasmas la prevención es la única medida de control a tomar.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

Se hace referencia a las actividades 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6

Organización de tres Charlas Técnicas

Junto con el informe N° 4 se entregó la información y el material relativos a la realización de la primera charla técnica, en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Junto con el informe N° 6 se entregó la información y el material relativos a la realización de la segunda charla técnica, en el Campus Limarí de la Universidad de La Serena.

La tercera “Charla Técnica” se organizó en conjunto con el segundo “Día de Campo”. Esto permitió realizar un evento en el cual se unieron aspectos teóricos y demostrativos relativos las actividades desarrolladas a lo largo del proyecto de alarque.

El título del evento fue: “Fitoplasmas en vid: aspectos epidemiológicos”. Se realizó con fecha 30 de mayo de 2007 en la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Salón Video Conferencia Campus Sur de la biblioteca Ruy Barbosa y laboratorios de Certificación Frutal y Fitovirología (véase en anexo “Actividades de Difusión” el programa de la actividad y copia de las presentaciones).

La finalidad del evento era informar a productores, viveristas, investigadores y técnicos del rubro vitivinícola de los avances del proyecto de alarque.

Los asistentes al evento fueron 33 (véase hojas de firmas en anexo “Actividades de Difusión” y algunas fotos del evento).

La actividad ha sido exitosa cumpliendo plenamente con el objetivo planteado.

Organización de un Seminario Internacional

Junto con el informe N° 7 se entregó la información y el material relativos a la realización del Seminario Internacional del proyecto, cuyo título fue: “Situación actual de la vid en relación a virus, viroides y fitoplasmas”. El evento se celebró en el centro de extensión Los Almendros, Camino La Pirámide 5625, Huechuraba, Santiago, el 5 y 6 de abril 2005.

El evento se cofinanció a través del Programa de Captura y Difusión Tecnológica de FIA. Mayores detalles sobre el Seminario Internacional se encuentran en el informe técnico final del Programa de Captura y Difusión Tecnológica (código FIA-CD-V-2005-1-A-004) que se presentó a FIA.

Organización de un Día de Campo

Junto con el informe N° 5 se entregó la información y el material relativos a la realización del Día de Campo, en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Como explicado anteriormente, el segundo “Día de Campo” se realizó en conjunto con la tercera “Charla Técnica”.

Participación a Congresos Nacionales

Junto con el informe N° 3 se entregó la información y el material relativos a la presentación de cuatro trabajos. Tres de ellos se presentaron al XII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT) y uno al 53° Congreso Agronómico de Chile.

Junto con el informe N° 5 se entregó la información y el material relativos a la presentación de un trabajo al XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).

Junto con el informe N° 7 se entregó la información y el material relativos a la presentación de dos trabajos al XIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).

Junto con el informe N° 8 se entregó la información y el material relativos a la presentación de un trabajo al XV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).

El 5 y 6 de noviembre 2007 se participó en la II Reunión de Biología Vegetal, congreso celebrado en Santiago, en la Casa Central de la Universidad Católica de Chile.

Se presentó el siguiente trabajo: “Grapevines yellows in Chile”.

Autores: Angela Gajardo, Simona Prodan, Samanta Paltrinieri, Simona Botti, Ana Maria Pino, Jaime Montealegre, Alan Zamorano, Assunta Bertaccini, Nicola Fiore.

(Presentación formato Poster).

Copias del resumen del trabajo antes mencionado y del póster se encuentran en el anexo “Actividades de Difusión”.

Desde el 28 hasta el 30 de noviembre 2007 se participó en XVII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT), celebrado en Concepción, en la Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología.

Se presentó el siguiente trabajo: "Aspectos epidemiológicos de los fitoplasmas que afectan la vid (*vitis* spp.) en Chile".

Autores: Alan Zamorano, Ana Maria Pino, Samanta Paltrinieri, Alberto Calari, Assunta Bertaccini, Alberto Alma, Jaime Montealegre, Jaime Araya, Nicola Fiore.

(Ponencia realizada por Nicola Fiore).

Copias del resumen del trabajo antes mencionado y de la presentación se encuentran en el anexo "Actividades de Difusión".

Participación a Congresos Internacionales

En el informe N° 4 se entregó la información y el material relativos a la presentación de tres trabajos al 14th Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine (ICVG), celebrado en Locorotondo (Bari), Italia.

En el informe N° 5 se entregó la información y el material relativos a la presentación de un trabajo al IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, celebrado en Santiago, Chile.

En el informe N° 7 se entregó la información y el material relativos a la presentación de un trabajo al XII Congreso Latinoamericano de Fitopatología (ALF)/III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, celebrado en Vila Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

En el informe N° 9 se entregó la información y el material relativos a la presentación de tres trabajos al 15th Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine (ICVG), celebrado en Stellenbosch, Sudáfrica, del 3 hasta el 7 de abril del 2006.

Desde el 12 hasta el 15 de noviembre 2007 se participó en el "First International Phytoplasma Working Group Meeting (IPWG)", celebrado en Bologna (Italia), en la Università di Bologna.

Se presentó el siguiente trabajo: "Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines".

Autores: Nicola Fiore, Simona Prodan, Samanta Paltrinieri, Angela Gajardo, Simona Botti, Ana Maria Pino, Jaime Montealegre, Assunta Bertaccini.

(Ponencia realizada por Nicola Fiore).

Copias del resumen del trabajo antes mencionado y de la presentación se encuentran en el anexo "Actividades de Difusión".

Publicaciones internacionales

- 1) S. Prodan, J. Montealegre and N. Fiore (2003). Aetiology of decline in Thompson Seedless grafted plants. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 142-143.
- 2) A. Gajardo, S. Botti, J. Montealegre, N. Fiore and A. Bertaccini (2003). Survey on Phytoplasmas identified in chilean grapevines. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 85-86.
- 3) S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, P. Fernández, R. Reyes and N. Fiore (2003). Report of new viral disease in chilean grapevines. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 145

Las informaciones sobre estas tres publicaciones se han entregado en el informe N° 4

- 4) A. Bertaccini, S. Paltrinieri, S. Botti, B. Duduk, N. Fiore, M. Kolber, D. Skoric, E. Torres, M. Conti (2006). Diversity of 16SrXII phytoplasmas detected in grapevine growing areas worldwide. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 88-89.
- 5) E. Engel, V. Arredondo, C. Girardi, A. Gonzalez, P. Escobar, N. Fiore, P. Arce and P.D.T. Valenzuela (2006). Grapevine viruses in Chile: genomics and detection based on immunocapture and microarray technologies. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 118-119.
- 6) M. Digiario, N. Fiore, L. Tarricone, S. Prodan and T. Elbeaino (2006). Influence of viruses on the performance and quality of cv. Crimson Seedless. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 186-188.

Las informaciones sobre estas tres publicaciones se han entregado en el informe N° 9

- 7) N. Fiore, S. Prodan, S. Paltrinieri, A. Gajardo, S. Botti, A.M. P., J. Montealegre, A. Bertaccini (2007). Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Extended Abstract*. *Bulletin of Insectology*, Vol. LX (2): 331-332.

Copia del trabajo se encuentra en el anexo "Actividades de Difusión".

- 8) N. Fiore, S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, and A. Zamorano (2008). Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology* (en prensa).

El artículo ha sido recibido por el editor el 11 de septiembre de 2007 y aceptado para publicación el 18 de octubre 2007.

Copia de la versión aceptada por el editor se encuentra en el anexo "Actividades de Difusión". Cuando se publique se enviará copia a FIA.

Publicaciones nacionales

Resúmenes

En la revista Aconex N° 78 de Enero, Febrero y Marzo 2003, se publicó el resumen de un trabajo presentado al XII Congreso de la SOCHIFIT:

Fiore N., Botti S., Montealegre J., Bertaccini, A. (2003). Reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI en vides chilenas. *Aconex* N° 78: 8.

Se adjunta copia en anexo “Actividades de difusión” en informe N° 4.

En la revista Simiente N° 72 de Julio-Diciembre 2002, se publicó el resumen del trabajo presentado en 53° Congreso Agronómico de Chile:

Fiore N., Montealegre J., Aballay E., Prodan S., Fernández P., Reyes R. Botti S., Bertaccini A. y Pino, A. (2002). Nuevos reportes de enfermedades producidas por virus y fitoplasmas en vides chilenas. *Simiente* 72 (3-4): 97.

Se adjunta copia en informe N° 4.

Fiore N., Montealegre J., Aballay E., Prodan S., Fernández P., Reyes R. y Pino, A. (2003). Nuevos reportes de enfermedades virales en vides chilenas. *Fitopatología* Vol.38, N°2: 93.

Se adjunta copia en informe N° 5.

Fiore N., Botti S., Montealegre J., Bertaccini, A. (2003). Reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI en vides chilenas. *Fitopatología* Vol.38, N°2: 93-94.

Se adjunta copia en informe N° 5.

Fiore N., Montealegre J., Prieto, H., Prodan S. (2003). Resultados preliminares sobre la etiología del decaimiento en plantas de uva de mesa injertadas. *Fitopatología* Vol.38, N°2: 101-102.

Se adjunta copia en informe N° 5.

Gajardo A., Botti S., Montealegre J., Bertaccini A. y Fiore N. (2004). Caracterización enzimática de fitoplasmas aislados de vides chilenas. *Fitopatología* Vol.39, N°1: 19-20.

Se adjunta copia en informe N° 6.

Artículos

En la Revista del Campo N° 1406 de *El Mercurio* del 23 de junio de 2003, se publicó un artículo sobre el decaimiento de plantas de uva de mesa injertadas:

N. Fiore y J. Montealegre (2003). Decaimiento en vides: Un mal sin nombre. *Revista del Campo – EL MERCURIO* N° 1406: A14-15.

Se adjunta copia en anexo “Actividades de difusión” en informe N° 4.

En la Revista del Campo, del diario El Mercurio, del 2 de agosto de 2004, N° 1464 ha sido publicado un artículo sobre parte de los resultados obtenidos con el presente proyecto. En particular en el artículo se presenta la situación actual sobre los fitoplasmas que afectan a la vid en Chile.

Se adjunta copia en informe N° 6.

V. ANEXOS

CUADROS

Resultados de los análisis realizados con el fin de determinar la mejor época de muestreo de la vid para la detección de cuatro virus.

Cuadro N° 7

Resultados obtenidos con ELISA en los meses de muestreo y respecto al material vegetal utilizado para los análisis (+/t)																									
Virus	Sep.			Oct.			Nov.			Dic.			En.			Feb.			Mar.			Abr.			Jun.
	B	H*		PH	H*	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	SL
GFL	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
LR-3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
GVA	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
GFK	3/3	n.d	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Total																									
N.	6/12	3/9	4/12	6/12	12/12	12/12	12/12	9/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	9/9	11/12	12/12	9/9	11/12	11/12	12/12	12/12	9/12	12/12	12/12
%	50	33	33	50	100	100	100	75	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	92	92	100	100	75	100	100

Cuadro N° 8

Resultados obtenidos con RT-PCR en los meses de muestreo y respecto al material vegetal utilizado para los análisis (+/t)																									
Virus	Sep.			Oct.			Nov.			Dic.			En.			Feb.			Mar.			Abr.			Jun.
	B	H*		PH	H*	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	PH	H	SV	SL
GFL	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	3/3	0/3	1/3	1/3	1/3	n.d.	2/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
LR-3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3	2/3	3/3	2/3	0/3	n.d.	0/3	2/3	1/3	2/3	3/3	2/3	2/3	3/3	0/3	2/3	3/3	3/3
GVA	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	n.d.	2/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
GFK	3/3	n.d	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	1/3	2/3	1/3	0/3	n.d.	0/3	1/3	0/3	1/3	1/3	2/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
Total																									
N.	12/12	9/9	11/12	12/12	8/12	11/12	10/12	9/12	11/12	8/12	4/12	3/3	2/12	7/12	4/12	9/9	5/12	6/12	6/9	9/12	11/12	12/12	6/12	9/12	12/12
%	100	100	92	100	67	92	83	75	92	75	67	33	100	17	58	33	42	50	67	75	92	100	50	75	100

GFL: Grapevine fanleaf virus; LR-3: Grapevine leafroll associated-virus 3; GVA: Grapevine virus A; GFK: Grapevine fleck virus; B: brotes; H*: hojas no completamente desarrollada; PH: peciolo de hoja; H: hoja completamente desarrollada; SV: floema de sarmiento verde; SL: floema de sarmiento lignificado; n.d.: material vegetal no disponible al momento del muestreo; (+/t): muestras positivas / total de muestras analizadas. En rojo las mejores prestaciones.

Cuadro N° 9

Resultados obtenidos con ambas técnicas de detección para establecer: el mejor tejido vegetal a muestrear para todos los virus y el porcentaje de detección de cada virus en los diez meses considerados (+/t)																		
Virus	ELISA									RT-PCR								
	B	H*	PH	H	SV	SL	Total N.	%	B	H*	PH	H	SV	SL	Total N.	%		
GFL	3/3	6/6	19/21	17/18	12/12	21/21	78/81	96	3/3	6/6	11/21	11/18	9/12	21/21	61/81	75		
LR-3	0/3	0/6	18/21	18/18	15/15	18/18	69/81	85	3/3	6/6	12/21	12/18	6/15	18/18	57/81	70		
GVA	0/3	0/6	18/21	12/18	15/15	18/18	63/81	78	3/3	6/6	18/21	17/18	12/15	18/18	74/81	91		
GFK	3/3	3/3	19/21	18/18	15/15	15/15	73/75	97	3/3	3/3	12/21	11/18	4/15	15/15	48/75	64		
Total N.	6/12	9/21	74/84	65/72	57/57	72/72	283/318	89	12/12	21/21	53/84	51/72	31/57	72/72	240/318	75		
%	50	43	88	90	100	100			100	100	63	71	54	100				

Cuadro 8: Evaluación económica

2012

IN (M)	IN (M)
435566.76	435566.76
5,554,845,198	5,554,845,198
VAN (12%) (miles de \$)	VAN (12%) (miles de \$)

\$502/US\$	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
superficie pl vm ha	52 366	52 685	53 426	53 426	53 426	53 426	50 755	48 084	45 413	42 742	40 071
prod cajas /ha	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
\$/ej (10 dol/cj)	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020	5 020
prod cajas	104 732,076	105 370 000	106 852 000	106 852 000	106 852 000	106 852 000	101 510 000	96 188 000	90 826 000	85 484 000	80 142 000
ingresos por cj vm	525 754 640 000	528 957 400 000	536 397 040 000	536 397 040 000	536 397 040 000	536 397 040 000	509 580 200 000	482 763 360 000	455 946 520 000	429 129 680 000	402 312 840 000
ha repl vm			2 671	2 671	2 671	2 671	2 671	5 342	8 013	10 684	13 355
prod cajas ha repl							6 410 400	12 820 800	19 231 200	25 641 600	32 052 000
ingreso 1	525 754 640 000	528 957 400 000	536 397 040 000	536 397 040 000	536 397 040 000	536 397 040 000	32 180 208 000	64 360 416 000	96 540 624 000	128 720 832 000	160 901 040 000
sup pl vv ha	108 569	110 097	112 056	112 056	112 056	112 056	106 453	100 853	95 247	89 644	84 041
prod vino miles de l	526 496	640 848	605 206	735 991	735 991	735 991	735 991	735 991	735 991	735 991	735 991
litros/ha	4 849	5 821	5 401	6 568	6 568	6 568	6 568	6 568	6 568	6 568	6 568
US\$/lt	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4	853,4
pro vino en l	526 496 000	640 848 000	605 206 000	735 991 000	735 991 000	735 991 000	699 183 304	652 302 851	625 582 296	588 781 792	551 981 288
ingresos por vino	449 311 686 400	546 899 683 200	516 482 800 400	628 094 719 400	628 094 719 400	628 094 719 400	596 683 031 634	565 277 481 520	533 871 931 406	502 466 351 293	471 060 831 179
ha repl vv			5 603	5 603	5 603	5 603	5 603	11 206	16 809	22 412	28 015
prod vino miles l por rp							44 162 846	88 325 692	132 488 538	176 651 384	220 814 230
ingreso 2	449 311 686 400	546 899 683 200	516 482 800 400	628 094 719 400	628 094 719 400	628 094 719 400	37 688 572 776	75 377 145 553	113 065 718 329	150 754 291 106	188 442 863 882
5% ha a repl vm	0	0	2 671	2 671	2 671	2 671	2 671	2 671	2 671	2 671	2 671
pl/ha vm			1 200	1 200	1 200	1 200	1 200	1 200	1 200	1 200	1 200
pl/para rep vm			3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200	3 205 200
5% ha a repl vv	0	0	5 602	5 602	5 602	5 602	5 602	5 602	5 602	5 602	5 602
pl/ha vv			1 800	1 800	1 800	1 800	1 800	1 800	1 800	1 800	1 800
pl/para rep vv			10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600	10 083 600
egresos											
\$100/planta vm libre			320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000	320 520 000
\$100/planta vv libre			1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000	1 008 360 000

Supuestos

Debido al replante de vides libres de virus y fitoplasmas, las nuevas hectáreas replantadas darían:

20% aumento de producción de uva de mesa por hectárea (a partir de 2008)

16% aumento en litros de vino por hectárea (a partir de 2008)

Primer replante año 2004

Primer replante entra en producción el año 2008

Se considera como egreso el valor adicional (\$100/planta) de las nuevas plantas libres de virus y fitoplasmas

El costo de las plantas, trabajos de replante y mantenimiento de las vides no debiera variar y en caso de hacerlo sería menor, debido a menos uso de agroquímicos

ACTIVIDADES *DE DIFUSIÓN*

LUGAR

Sala de Video Conferencia
BIBLIOTECA RUY BARBOSA
Facultad de Ciencias Agronómicas
Universidad de Chile. Campus Antumapu.
Santa Rosa 11315. La Pintana.

VALOR INSCRIPCIÓN

Sin costo
Capacidad limitada

INSCRIPCIÓN E INFORMACIÓN

Consulta: Sra. Carolina Caroca
Fono: 9785960 - 9785961
Fax: 9785726
E-mail: anpino@uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE SANIDAD VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
AGRÍCOLA

PARTICIPANTES

Ing. Agr. Jaime E. Araya
Ing. Agr. Nicola Fiore
Ing. Agr. Jaime R. Montealegre

COORDINADORES

Ana Maria Pino
Nicola Fiore
Jaime R. Montealegre

CHARLA TÉCNICA Y DÍA DE CAMPO

***"FITOPLASMAS EN VID:
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS"***

30 de mayo de 2007

FINANCIADO POR FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA)

PROYECTO CÓDIGO BID-PI-C-2001-1-A-013

"Elaboración de un sistema confiable para la
detección y caracterización de virus y fitoplasmas
que afectan a la vid"

SANTIAGO, CHILE



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias
Agronómicas



Elaboración de un Sistema Confiable para la Detección y caracterización de Virus y Fitoplasmas que afectan a la Vid.



OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de diagnóstico basado en técnicas moleculares (serología y amplificación génica) y caracterización de los principales virus y fitoplasmas que afectan la vid.



FINANCIAMIENTO



Fundación para la Innovación Agraria

FIA-BIOT-BID-PI-C-2001-1-A-013

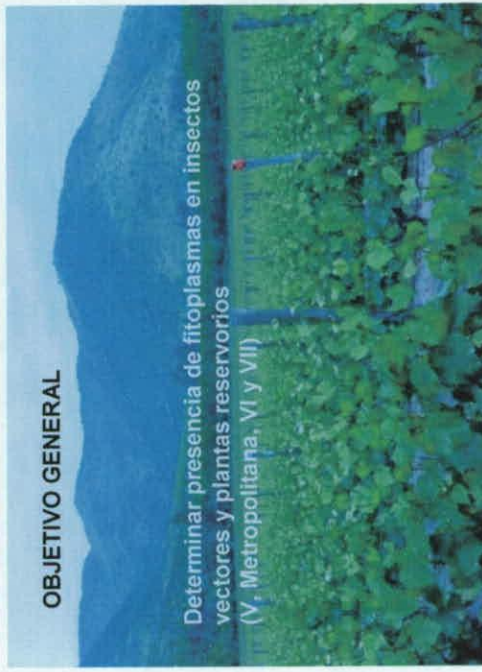
2001-2005

1 Diciembre 2005 al 30 de noviembre 2007



OBJETIVO GENERAL

Determinar presencia de fitoplasmas en insectos
vectores y plantas reservorios
(V. Metropolitana, VI y VII)



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar langostinos infectados por fitoplasmas

Determinar plantas infectadas por fitoplasmas asociadas al cultivo de la vid

Difundir los resultados obtenidos en el proyecto

UNIDADES PARTICIPANTES

Universidad de Chile Fac. de Cs. Agronómicas
Deptos. de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal
Laboratorios de Certificación Frutal, Microbiología y Nematología.

Università di Bologna - ITALIA
Università di Torino - ITALIA

EMPRESAS PARTICIPANTES

Vina Santa Rita S.A.
Viñedos Emiliana S. A.

EQUIPO DE TRABAJO

Nicola Fiore Ing. Agr. Fitopatólogo-Virólogo
Jaime Araya Ing. Agr. Ph. D. Entomólogo
Erwin Aballey Ing. Agr. MSc. Nematólogo
Ana M. Pino Ing. Alimentos
Jaime Montealegre Ing. Agr. Fitopatólogo
Assunta Bertaccini Ing. Agr. Dr. Fitoplasmatóloga
Alberto Alma Ing. Agr. Ph. D. Entomólogo
Università di Bologna - Italia
Università di Torino - Italia

HEMIPTERA

AUCHENORRHYNCHA

JAIME ARAYA CLERICUS



HEMIPTERA

- Orden cosmopolita de insectos con > 67,500 spp. en 3 subórdenes (recientemente 4).
- Estas taxa se agrupaban en 2 órdenes, **Homoptera** y **Heteroptera** (que se usa a menudo como sinónimo de Hemiptera).

HEMIPTERA

- Homoptera es ahora obsoleto, y Heteroptera está siendo reemplazado por Prosorrhyncha.
- Hemiptera {subórdenes Auchenorrhyncha y Sternorrhyncha}.
- Recientemente, el suborden Auchenorrhyncha se divide en dos, Archaeorrhyncha y Clypeorrhyncha.

Hemiptera = Heteroptera

- Incluye Homoptera, aunque algunos lo consideran un orden separado.
- Aparato bucal picador-chupador.
- Opistognatos.



HEMIPTERA

- Chinchas verdaderos.
- *Heteroptera*: 1^{er} par de alas membranosas desde la mitad.
- *Hemiptera*: media-ala (*en griego*).



Heteroptera

- Hemiptera se distinguen de otros insectos por su proboscis (ninfas y adultos) con un canal de saliva y otro de alimentación.
- Con la proboscis chupan jugos de plantas, pero también hay depredadores de animales pequeños, y algunos hematófagos en mamíferos.

AUCHENORRHYNCHA

- Suborden de Hemiptera que agrupa a la mayoría de los Homoptera tradicionales, como las chicharras (cicadas), langostinos (cicadélidos), membrácidos, fulgóridos y cercópidos.

AUCHENORRHYNCHA

- Suborden de Hemiptera que agrupa a las cicadas, langostinos, membrácidos, fulgóridos y cercópidos.
- Muchos Auchenorrhyncha producen sonidos audibles o vibraciones para comunicarse.

AUCHENORRHYNCHA

- Los áfidos (pulgones), escamas y conchuelas ("Homoptera"), están en el suborden Sternorrhyncha.

FULGOROIDEA (AUCHENORRHYNCHA)

- Parecen hojas o pétalos.
- A menudo saltan (treehoppers) para desplazarse, pero generalmente caminan lentamente para no ser notados.



FULGOROIDEA (AUCHENORRHYNCHA)

- Treehoppers distribuidos en todo el mundo, pero con pocas plagas.
- Se distinguen de los otros "Homoptera" clásicos por la vena anal bifurcada con forma de Y en alas delanteras, y antenas gruesas con 3 segmentos, el 3º globoso con una arista fina.

CICADIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- $\approx$ 2.500 especies en el mundo.
- Mayoría tropicales y subtropicales.
- Algunas tienen ciclos de varios años.



CICADIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Cabezas anchas con ojos separados y membrana de sonido (hasta > 120 dB).
- Grandes alas transparentes.



17-yr
cicada

CICADIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Debilitan el follaje y dejan heridas por ovipositora en ramillas.



CICADIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Sirven de alimento en Asia, Australia, Norte y Sudamérica y África (y en Grecia antigua).
- Se usan en medicina tradicional china y japonesa para tratar dolencias auditivas.

CERCOPIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Las ninfas se cubren con espuma de savia para evitar deshidratación y depredadores.



MEMBRACIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Ca. 3000 especies en >600 géneros.
- Treehoppers con pronoto alargado y ornamentado, que a menudo parece una espina (camuflaje).



Bizarre Membracid
from Mexico



Spiny Membracid
from Costa Rica

Algunos membrácidos
con formas espinosas

CICADELLIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Se encuentran en todo el mundo.
- 2ª familia más numerosa de [Hemiptera](#), con ca. 20.000 spp. descritas.



Empoasca fabae

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE CICADELLIDAE

- Antena muy corta con base gruesa y arista terminal.
- 2 ojos simples (ocelos) en corona o frente.
- Tarsos con 3 segmentos.
- Fémures de 1^{er} par de patas pueden tener espinas débiles.

CARACTERÍSTICAS DE CICADELLIDAE...

- Tibias traseras con 1 o más quillas, c.u. con una hilera de espinas móviles, a veces sobre bases grandes.
- Base del 2º par de patas muy cerca cuando nacen bajo el tórax.
- 1º par de alas no particularmente engrosadas.

CICADELLIDAE (AUCHENORRHYNCHA)



- Se alimentan de savia (a veces de insectos pequeños) y pueden transmitir virus y bacterias.

CICADELLIDAE (AUCHENORRHYNCHA)

- Algunos langostinos son plagas agrícolas severas, como los de la papa, remolacha, chicharrita de alas cristalinas y del manzano.

Langostino de la papa



Ciclo



Daño (hopperburn) en alfalfa

Quemadura disminuye rendimiento



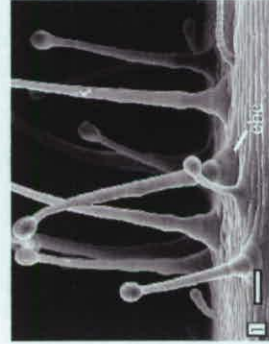
Langostino de la papa



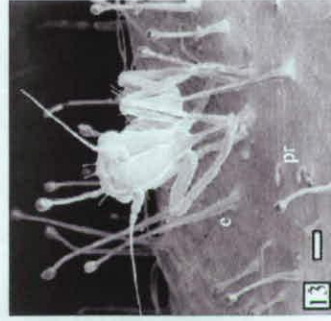
- Control conjunto con sistémicos contra pulgones.



Uso de variedades resistentes

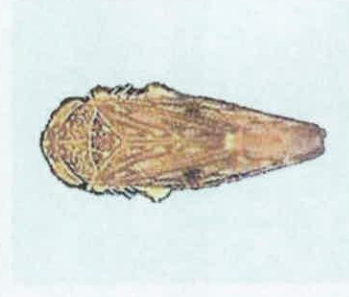


Tricomas glandulares en alfalfa y ninfa atrapada



Langostino de la remolacha

- Vector de la amarillez virosa.
- BMVY y BYV causan hojas gruesas y quebradizas. Reducen azúcar hasta 20%.



Amarillez virosa

- Enfermedad causada por BYV y BMV, transmitidos por pulgones y langostinos.



Amarillez virosa

- Los vectores adquieren virus en plantas infectadas o cultivos de remolacha aún no cosechados, chenopodiáceas (espinaca, quingüilla y atriplex) o plantas voluntarias de remolacha.
- Control con insecticidas al detectarse los primeros alados.

Langostino del manzano



Adulto y ninfa de *E. crataegui*



Langostino del manzano

- Plaga secundaria.
- Adulto: 2-3 mm; amarillo marrón; alas anteriores tornasol característico.
- Causa decoloración punteada en hojas, y manchas negras de excrementos que disminuyen calidad de la fruta.
- Inverna como huevo encastrado en ramillas.

Daños del langostino del manzano



Punteado en hojas



Manzana manchada

Langostino del manzano

- Comúnmente en huertos abandonados.
- Aumento de densidad en huertos bajo aplicaciones de fosforados contra *Cydia pomonella*.
- ¿Tolerancia o resistencia a estos insecticidas, como en NZ hacia azinfosmetil?

Chicharrita de alas cristalinas

- Se introdujo en Pascua desde Tahiti.
- Hospederos variados, especialmente cítricos.
- Transmite enfermedad de Pierce en vid.



Adulto con manchas de brocosomas

Estados de desarrollo



Ninfa



Huevos en
hoja desde
arriba



Huevos en
envés de
hoja

Control biológico y daños



Huevos
parasitados por
Gonatocerus
triguttatus



Fruta
manchada



Enfermedad de Pierce



- El vector y la enfermedad tienen control cuarentenario para Chile continental.
- *Xylella fastidiosa* no se ha encontrado en Pascua.

Bacteria *Xylella fastidiosa*



Daños en hoja,
sarmientos y
racimo



Daño en hojas
de almendro





UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS
 AGRONÓMICAS

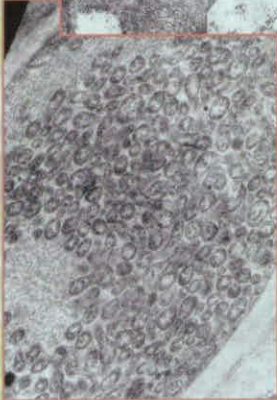


GOBIERNO DE CHILE
 FUNDACIÓN PARA EL
 DESARROLLO AGRARIO
 MINISTERIO DE AGRICULTURA

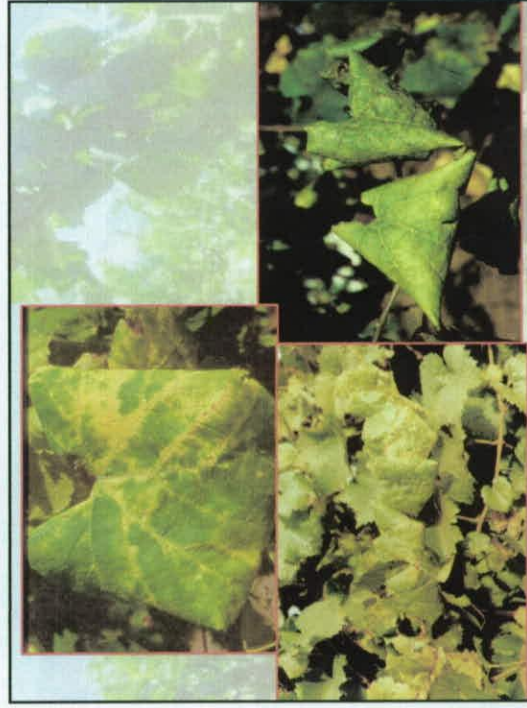
Potenciales insectos vectores y plantas reservorios de fitoplasmas asociados a los viñedos chilenos

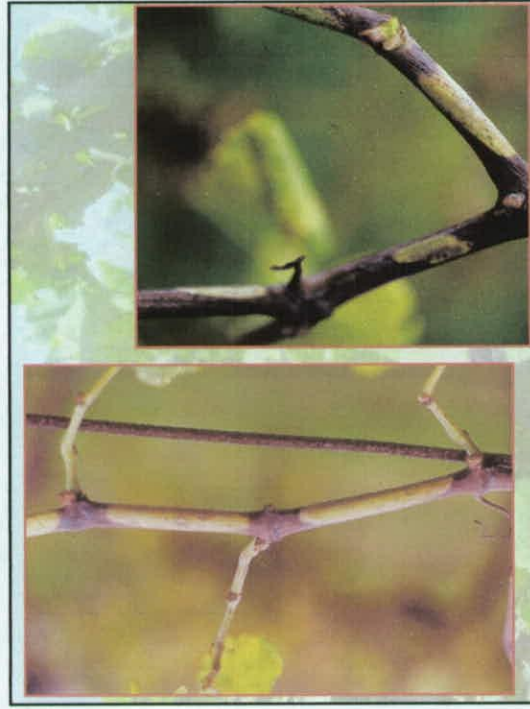
Ing. Agr. Nicola Fiore

FITOPLASMAS




Fuente: Bertaccini, 1998





Fitoplasmas de importancia epidémica en vid en Europa

16SrV-C e-D Flavescencia dorada o *Flavescence dorée*

- Genéticamente variable en el tiempo
- Epidémico
- Objeto de normas de cuarentena
- Transmitido por el cicadélido ampelófago *Scaphoideus titanus*



Estadio juvenil de *Scaphoideus titanus* Ball

Fitoplasmas de importancia epidémica en vid en Europa

16SrXII-A Madera Negra o

Bois Noir

- Genéticamente estable
- Normalmente endémico
- Transmitido por el Cixíde no ampelófago

Hyalesthes obsoletus y por ????



Reptalus panzeri



Hyalesthes obsoletus
Signoret



PORCENTAJE DE INFECCIÓN DE FITOPLASMAS EN VIDES

Muestras positivas: 73/183 → 40%

Carménère, Chardonnay, Petit Syrah, C. Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Sauvignon Blanc.

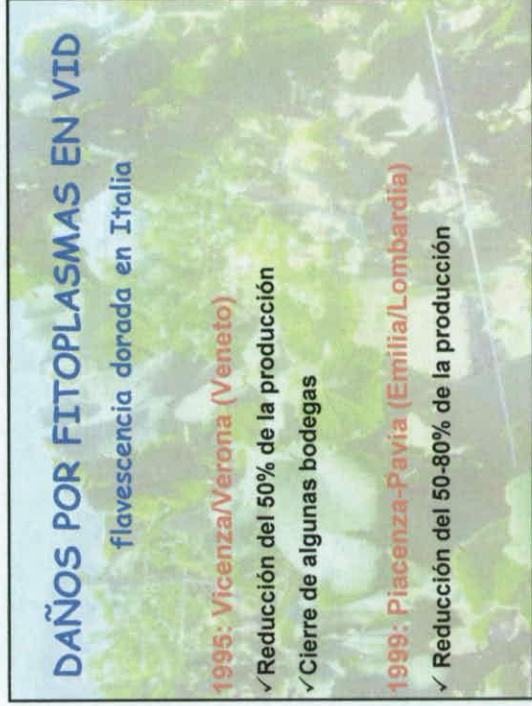
Thompson Seedless, Autumn Royal, Flame, Red Globe.

Freedom, Harmony.

-Pisqueras, Tintorería.

Fitoplasmas detectados en vides en el mundo (listado actualizado con datos chilenos)

16SrI (Aster yellows group)	16SrI-A
Tomato big bud (EEUU; Virginia)	16SrI-B
Aster yellows (Italia, Chile)	16SrI-C
Clover phyllody (Italia, Chile)	
16SrII (Peanut witches' broom)	16SrII-D
Sweet potato little leaf (Australia)	
16SrIII (X-disease group)	16SrIII-J
Virginian Grapevine yellows (EEUU)	
16SrIV (Elm yellows group)	16SrV-A
Elm yellows (Alemania, Italia)	16SrV-C
Flavescencia dorada (Francia, España, Norte de Italia, Serbia)	y 16SrV-D
16SrVII (Ash yellow group)	16SrVII-A
Ca. Phytoplasma fraxini (Chile)	
16SrX (Apple proliferation group)	16SrX-B
European stone fruit yellows (Hungria, Serbia)	
16SrXII (Stolbur group)	16SrXII-A
Madera Negra (U. Europea, Croacia, Serbia, Israel, Chile)	16SrXII-B
Ca. Phytoplasma australiense (Australia)	16SrXII-C?
Grapevine yellows (Chile)	



DAÑOS POR FITOPLASMAS EN VID

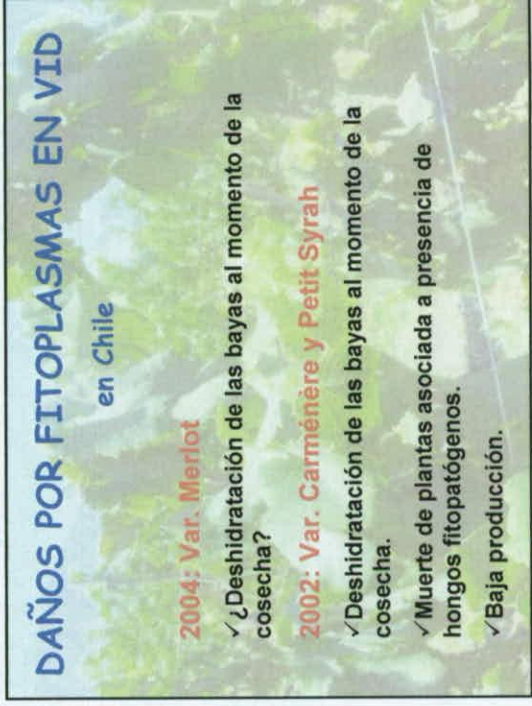
flavescencia dorada en Italia

1995: Vicenza/Verona (Veneto)

- ✓ Reducción del 50% de la producción
- ✓ Cierre de algunas bodegas

1999: Piacenza-Pavia (Emilia/Lombardia)

- ✓ Reducción del 50-80% de la producción



DAÑOS POR FITOPLASMAS EN VID

en Chile

2004: Var. Merlot

- ✓ ¿Deshidratación de las bayas al momento de la cosecha?

2002: Var. Carménère y Petit Syrah

- ✓ Deshidratación de las bayas al momento de la cosecha.
- ✓ Muerte de plantas asociada a presencia de hongos fitopatógenos.
- ✓ Baja producción.

Doble influencia en la planta infectada:

- 1) interfieren sobre el normal funcionamiento de los tubos cribosos determinando reducción de velocidad o bloqueo de la savia;
- 2) alteran el equilibrio de los reguladores de crecimiento (hormonas) induciendo malformaciones y anomalías del desarrollo.

Para la prevención de enfermedades debidas a fitoplasmas.....

Controlar la sanidad vegetal del material vegetal de propagación



CONTROL

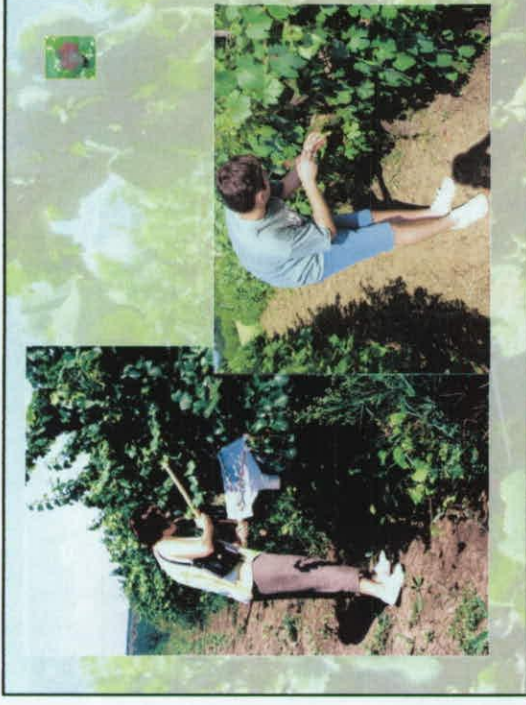
Basado principalmente en la prevención

Uso de material vegetal sano
(mejor si es certificado)



Para la prevención de
enfermedades debidas a
fitoplasmas.....

Controlar la presencia de insectos
vectores y plantas hospederas
secundarias



Periodo de latencia después de la infección
con insectos:

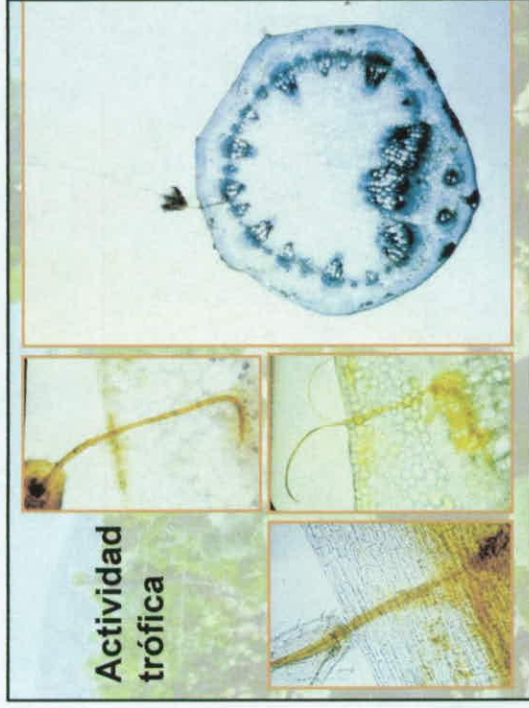
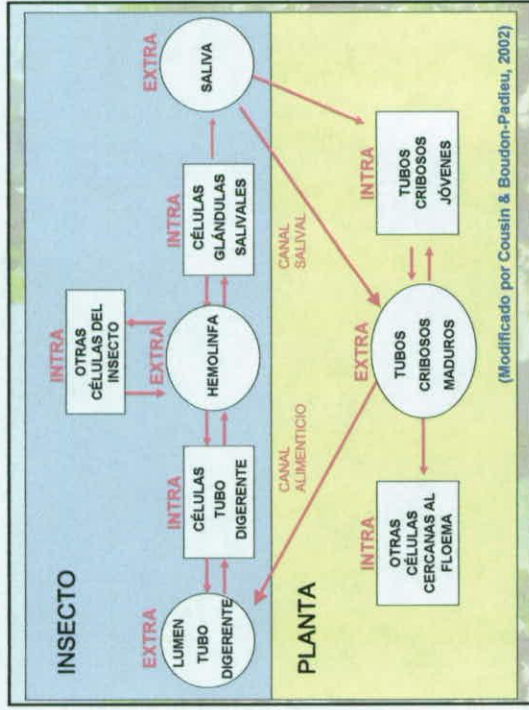
una temporada



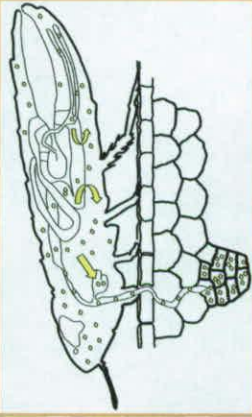
Periodo de latencia después de la
transmisión a través del material de
propagación:

1-2.....3 ??? años

INSECTOS VECTORES



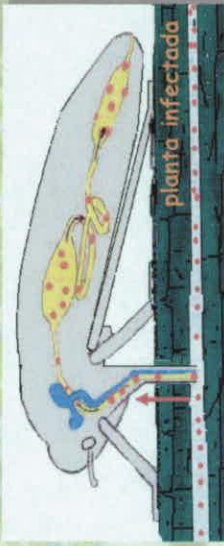
Los fitoplasmas son transmitidos según la modalidad persistente-propagativa



1. adquisición
2. latencia
3. inoculación

Vectores / fitoplasmas

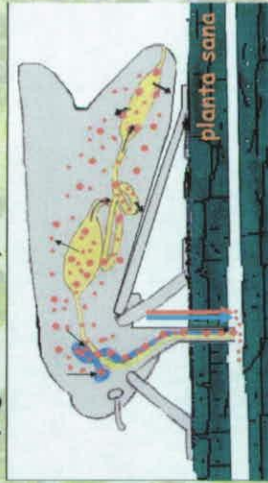
Adquisición: los fitoplasmas son adquiridos por las formas juveniles durante la alimentación y se acumulan en el intestino (horas – días)



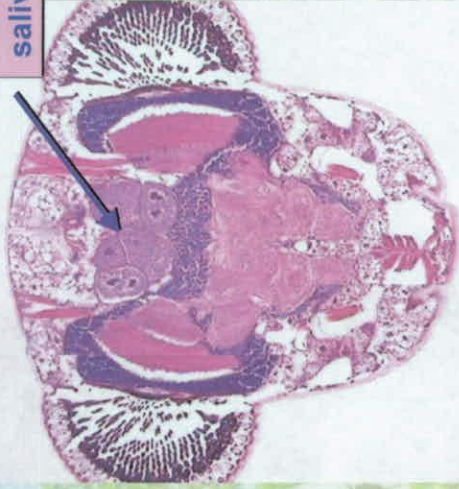
Vectores / fitoplasmas

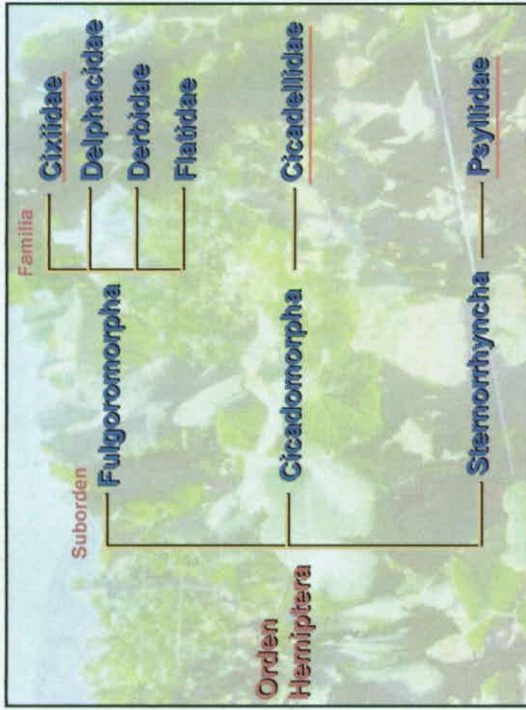
Latencia: el fitoplasma circula, se multiplica en el vector y alcanza las glándulas salivales (14-28 días)

Inoculación: el fitoplasma durante la actividad trófica es transmitido a través de la introducción de la saliva (algunas horas)



Glándulas salivales





AUQUENORRINCOS

VECTORES DE AGENTES FITOPATÓGENOS DE INTERÉS VITÍCOLA

Fulgoromorpha y Cicadomorpha

sección *Auchenorrhyncha*

fam. Cixiidae

fam. Delphacidae

fam. Derbidae

fam. Flatidae

fam. Cicadellidae

Fulgoromorpha y Cicadomorpha

Hyalestes absoletus

Metcalfa pruinosa

fam. Cixiidae

fam. Delphacidae

fam. Derbidae

fam. Flatidae

fam. Cicadellidae

Subfamilia

- Deltocephalinae: Euscelidius, Euscelis, Macrosteles

Macropsinae: Fieberiella, Scaphoideus, Psammotettix, Amplicephalus.

- Macropsinae: Macropsis, Oncopsis

- Agallinae: Anaceratagallia (= Agallia)

Cixiidae

Hyalestes absoletus

Cicadellidae

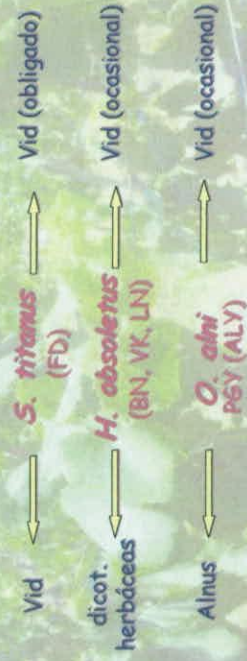
Scaphoideus titanus

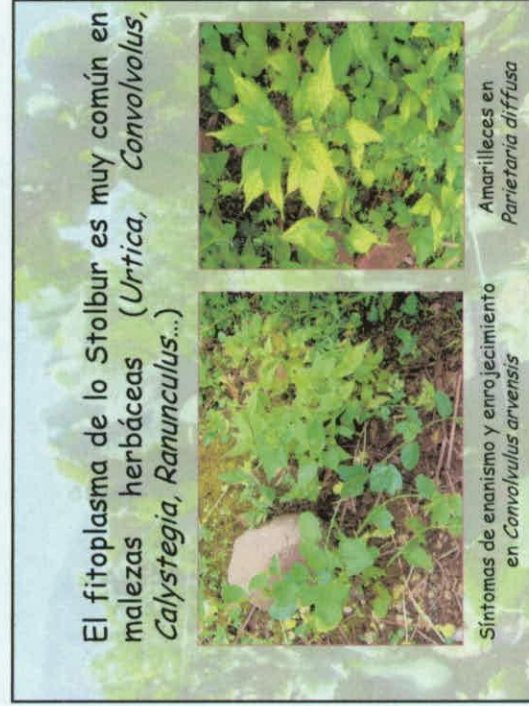
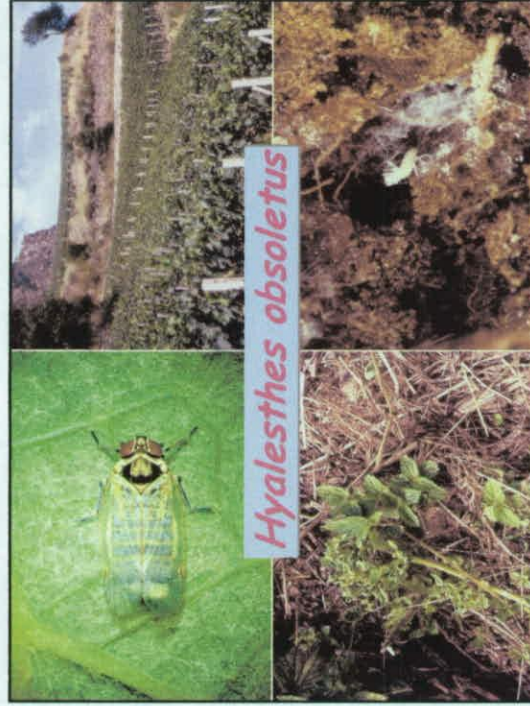
AUQUENORRINCOS VECTORES DE FITOPLASMAS EN EUROPA

VECTORES NATURALES DE FITOPLASMAS EN VID EN EUROPA

<i>Scaphoideus titanus</i>	FD
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	BN, VK, LN
<i>Oncopsis alni</i>	PGY (ALY)

RELACIONES VECTOR - PLANTA





El fitoplasma de lo Stolbur es muy común en poblaciones naturales de *H. obsoletus*.



Muchas otras especies de auquenorrincos son potenciales vectores del agente causal de Madera Negra. Las especies siguientes se han encontrado positivas a los fitoplasmas del grupo Stolbur:

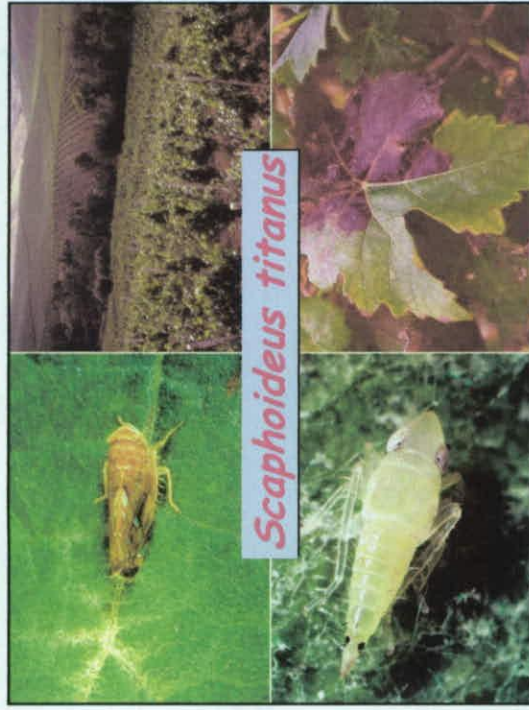
- *Laodelphax striatellus*
- *Stictiocephala bisonia*
- *Aphrodes* sp.
- *Zyginidia scutellaris*
- *Balclutha* sp.
- *Macrostelus* sp.
- *Mocydia crocea*
- *Euscelis* sp.
- *Psammotettix* sp.

(Fos *et al.*, 1992)

CICLO CERRADO
ENTRE VID Y VID

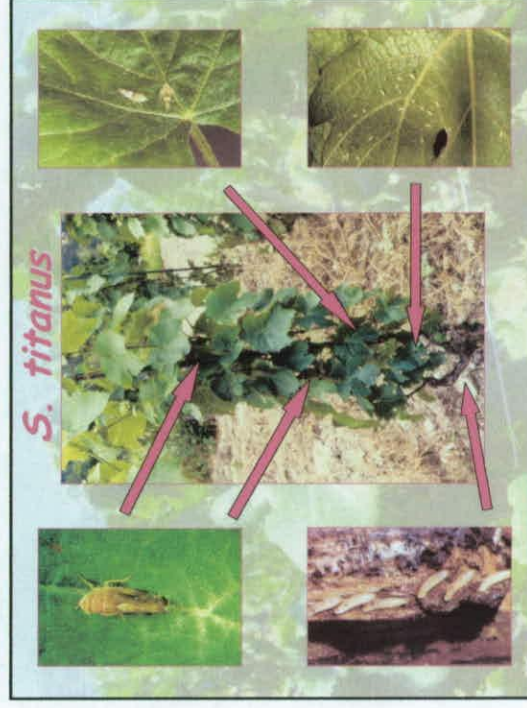


- *Neolathrus fenestratus* (Fos *et al.*, 1992; Orenstein *et al.*, 2003)
- *Pentastiridius beieri* (Gatineau *et al.*, 2001)
- *Orosius orientalis* (Klein *et al.*, 2001)
- *Circulifer haematodes* (Orenstein *et al.*, 2003)
- *Macrostelus quadripunctulatus* (Orenstein *et al.*, 2003)
- *Gonolathus guttulatus* (Garau *et al.*, 2004)
- *Reptalus panzeri* (Palermo *et al.*, 2004)



Especie	Fitoplasmas
<i>Scaphoideus densus</i> Delong	Ash yellows, X-disease
<i>Scaphoideus elongatus</i> Delong	Ash yellows, X-disease
<i>Scaphoideus intricatus</i> Uhler	Ash yellows

Especie	Fitoplasmas
<i>Scaphoideus luteolus</i> Van Duzee	Elm phloem necrosis
<i>Scaphoideus minor</i> Osborn	Ash yellows, X-disease
<i>Scaphoideus obtusus</i> Osborn	Ash yellows, X-disease
<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	Ash yellows, X-disease, Grapevine yellows Elm yellows (FD)



CICLO NATURAL (cerrado)



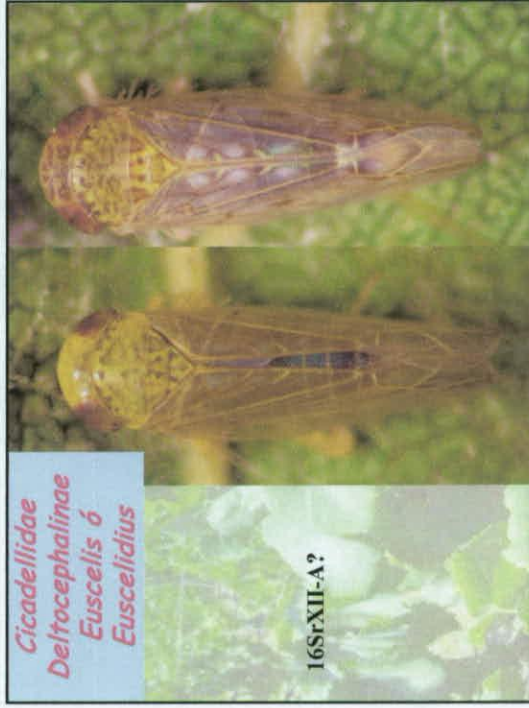
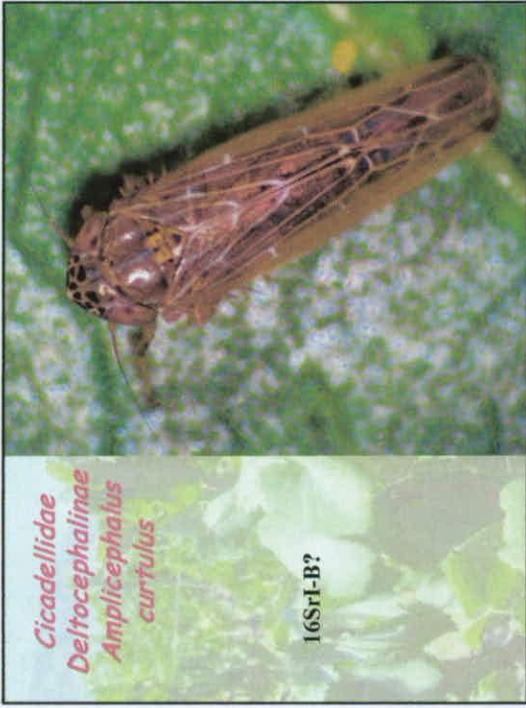
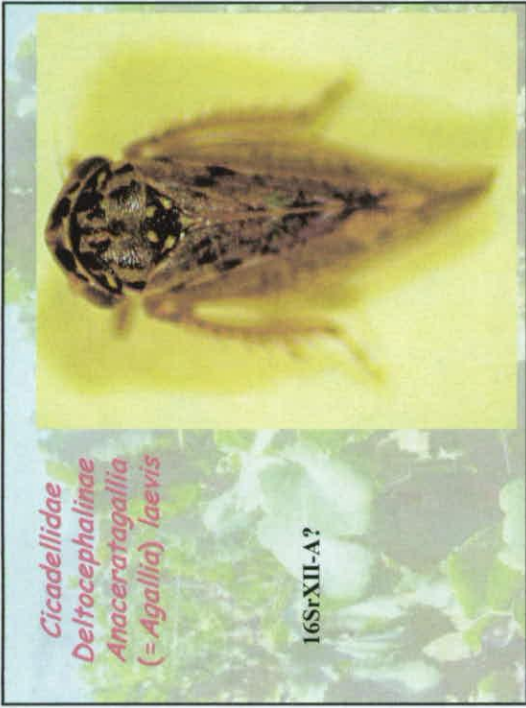
Insectos y plantas asociadas a viñedos chilenos

Fitoplasmas detectados en vides en el mundo (listado actualizado con datos chilenos)

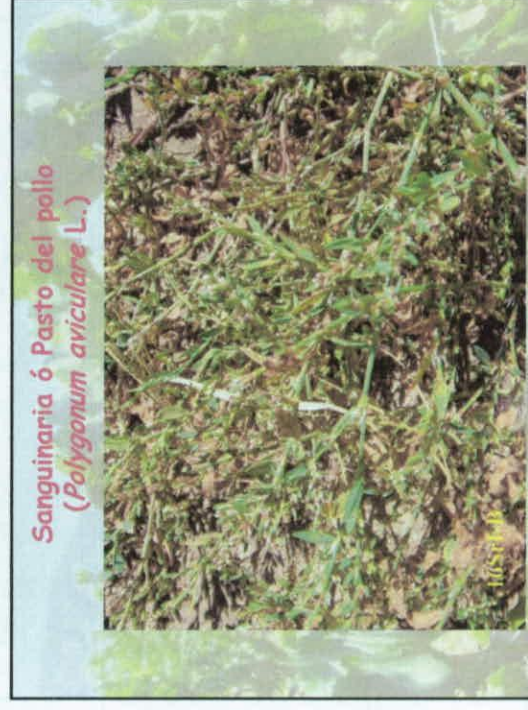
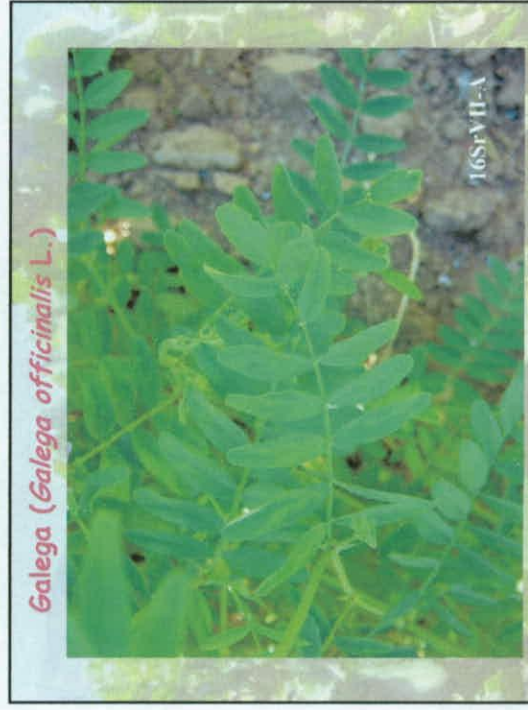
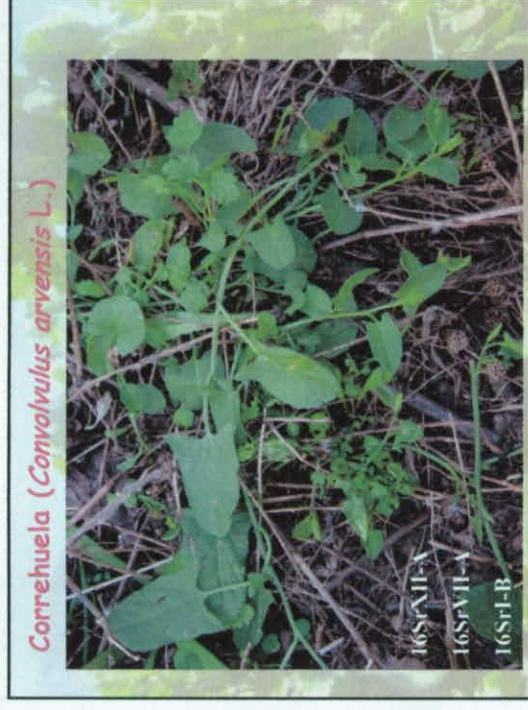
16SrI (Aster yellows group)	16SrI-A
Tomato big bud (EEUU; Virginia)	16SrI-B
Aster yellows (Italia, Chile)	16SrI-C
Clover phyllody (Italia, Chile)	
16SrII (Peanut witches' broom)	
Sweet potato little leaf (Australia)	16SrII-D
16SrIII (X-disease group)	16SrIII-J
Virginian Grapevine yellows (EEUU)	
16SrV (Elm yellows group)	16SrV-A
Elm yellows (Alemania, Italia)	16SrV-C
Flavescencia dorada (Francia, España, Norte de Italia, Serbia)	y 16SrV-D
16SrVII (Ash yellow group)	16SrVII-A
Ca. Phytoplasma fraxini (Chile)	
16SrX (Apple proliferation group)	16SrX-B
European stone fruit yellows (Hungría, Serbia)	
16SrXII (Stolbur group)	16SrXII-A
Madera Negra (U. Europea, Croacia, Serbia, Israel, Chile)	16SrXII-B
Ca. Phytoplasma australiense (Australia)	16SrXII-C
Grapevine yellows (Chile)	

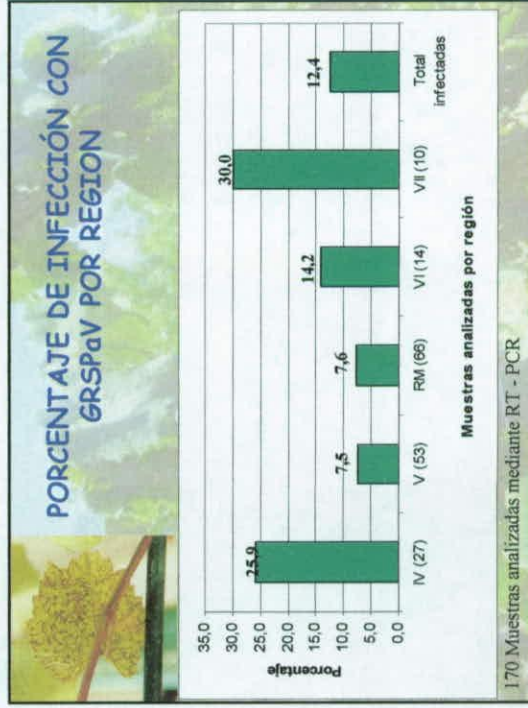
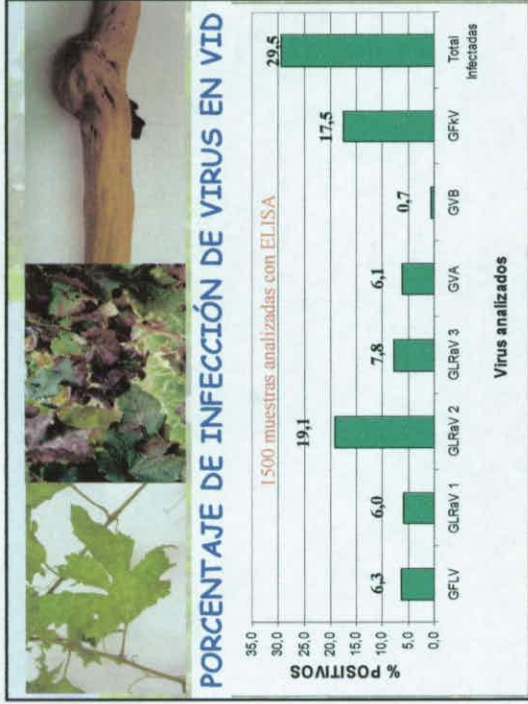


Cicadellidae
Deltocephalinae
Macrosteles ó *Exitiatus*









Registro Asistencia a Charla Técnica:

Nombre Actividad: Charla Técnica y Día de campo "Fitoplasmas en vid: Aspectos Epidemiológicos"

Fecha: 30 de Mayo de 2007

Asistentes:

Lugar: Salón Video Conferencia Campus Sur
BIBLIOTECA RUY BARBOSA

Nombres	Apellido	Empresa	E-mail	Firma
Radia Amador	Bravo Burgos	Particular	radia - anan@hotmail.com	Radia d. Bravo B.
Ricardo	Vidal	Sa. Rm	R. Vidal & P. VTR	
Jorge Valen	Valenzuela	UNA Sta. Rita	jvalenmulo@sanrita.cl	
Pablo Barbosini	Garbaini	UNA Luis Felipe Edwards	pbarbaini@ufewine.cl	
Tomislav	Curkovic	U. Chile	curkovi@uchile.cl	
Carolina Rmner P		SAG	Carolina.rmner@sag.gob.cl	
Isabel Margarita	del Real	U. MAYOR	ISABELREAL@HOTMAIL.COM	
Fab. Ramirez	Varon	Univers. Iberoamericana	framirez@iberpam.cl	
Madrene (Prado)	Prado	INIA	mdrosales@inia.cl	
Sebastián Andres	Miranda Q.	Particular	Sebastianalejandro.m.d	Sebastián m.
Pamela	Chavez V.	Programa Magister UdeChil	Pamela Chavez@gmail.com	
Maria Eugenia	Aravena	Aserer Aluma Mujeres	morendop@uta.cl	
Georis Francisco	Inamor	U. de Chile	gumz-706@uchile.cl	
Carolina	Uquillas	Particular	cquillas.h@gmail.com	
Flacolei	Leferre	Particular	lfever@ejay-sgm.cl	
Rebeca	Castillo	SAB. Lo Aguirre	rebeca.castillo@saag.gob.cl	
FELIPE	SILVA	SAG Lo Aguirre	Felipe Silva@saag.gob.cl	
Maniella	Barbosa	SAG. Lo Aguirre	maniella.barbosa@sag.gob.cl	M.B.T.

Registro Asistencia a Charla Técnica:

Nombre Actividad: Charla Técnica y Día de campo "Fitoplasmas en vid: Aspectos Epidemiológicos"

Fecha: 30 de Mayo de 2007

Asistentes:

Lugar: Salón Video Conferencia Campus Sur
BIBLIOTECA RUY BARBOSA

Nombres	Apellido	Empresa	E-mail	Firma
Claudia	Corvalán	INIA	claudia.ced@yahoo.com	
Rafaela	Chávez	INIA	RafaelaChavez@ytaleo.cl	
Peola	Valdéz	U Chile	peola.valdez@ugr.cl	
María Carolina	Valenzuela A.	U. de Chile	carixarenas@gmail.com	
Lebestian	Herrera	Ita. Caroline	sherrere@autocarro.cl	
Carolina	Orchard	Agrícola Chena	carolina.orchard@gmail.com	
Manuel Toro Valde	Toro.	Servicio Agrícola y Gan.	MANUEL.TORO@SAG.GOB.CL	
Paula Andrea	Ordones.	Particular	andreaod@yahoo.com	
Eduardo Fuentes	FUENTES	U. Guillermo Cuatrecasas	FUENTES@GREENWICH.CL	
Matteo Muro	Muro	SAG - Central	matteo.muro@reg.gob.cl	
Cecilia Muro	Miccoli	SAG - Central	cecilia.miccoli@sag.gob.cl	
Fernando Torres	Torres	SAG - Central	fernando.torres@sag.gob.cl	
Jenny	Frias	U Chile	JFriasmi@trials.com	
Paulina Sepúlveda		INIA	psepulveda@inia.cl	
MA. VALENTINA MUÑOZ	MUÑOZ	U. DE TALCA	mmunoz@utalca.cl	



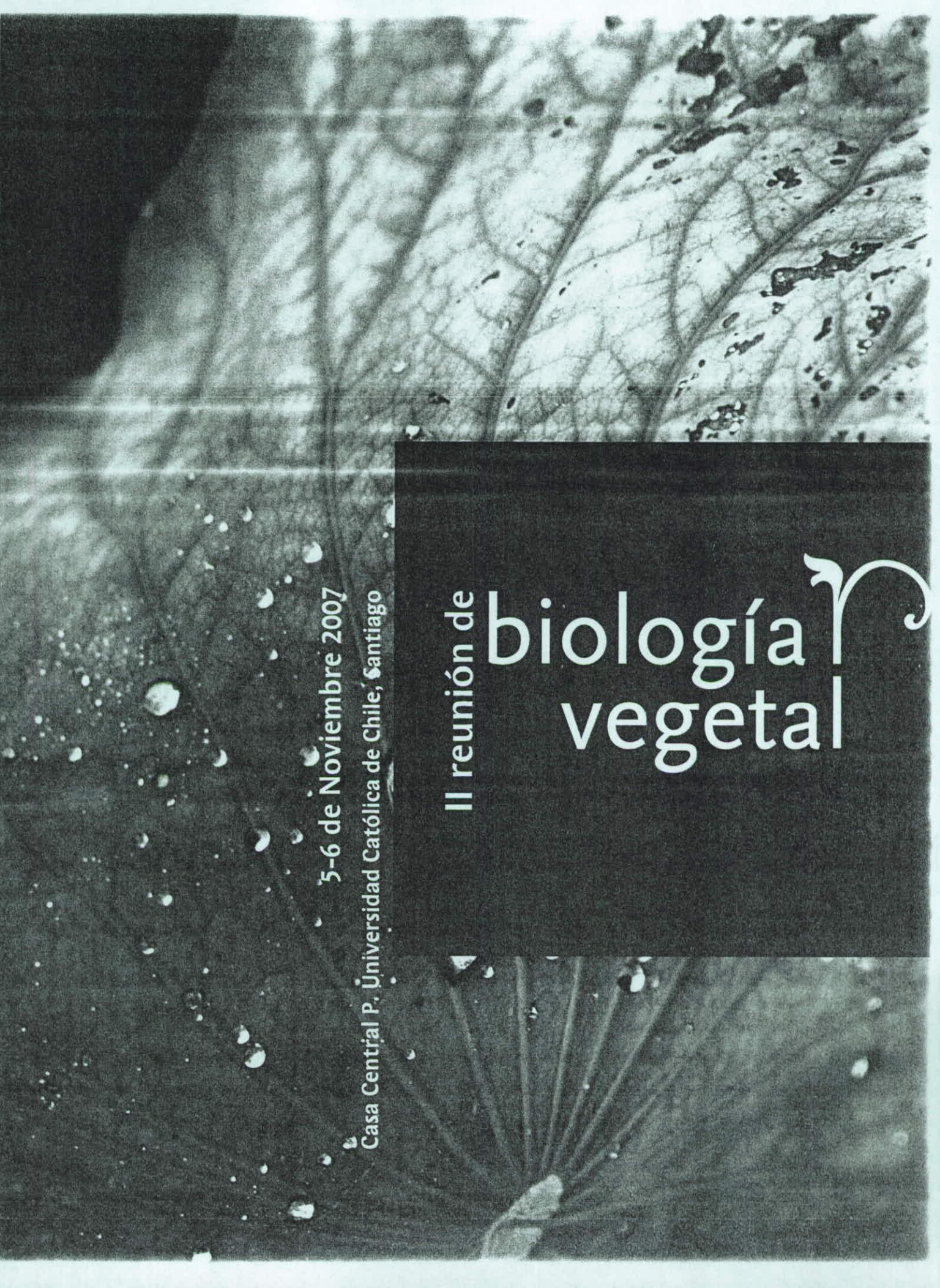


MENBRACIDAE (AUCHENORHYNCHA)

- Ca. 3500 especies en >600 géneros.
- Treshoppers con pronoto alargado y ornamentado, que a menudo parece una espina (camuflaje).







5-6 de Noviembre 2007

Casa Central P. Universidad Católica de Chile, Santiago

II reunión de *biología* vegetal

COMITE ORGANIZADOR

Patricio Arce
P. Universidad Católica de Chile

Marlene Ayala
P. Universidad Católica de Chile

Virginia Garretón
Austral Biotech & Universidad Santo Tomás

Rodrigo A. Gutiérrez (Coordinador)
P. Universidad Católica de Chile

Xavier Jordana
P. Universidad Católica de Chile

Michael Handfor
Universidad de Chile

Loreto Holuigue
P. Universidad Católica de Chile

Erwin Krauskopf
Universidad Andrés Bello

Alejandra Moya
Universidad de Talca

Ariel Orellana
Universidad Andrés Bello

Marlene Rosales
Instituto de Investigaciones Agropecuarias

Herman Silva
Universidad Andrés Bello

MEETING PROGRAM

Monday November 5th

MORNING

9:00 – 9:45 Registration and poster set up.

9:45 – 10:10 Welcome (Rodrigo Gutiérrez)

10:10-11:10 Seminar

Dr. Pamela Green. Delaware Biotechnology Institute. University of Delaware. **“Elucidating the small RNA Component of Plant Transcriptomes”.**

Host: Dr. Rodrigo Gutiérrez

11:10-11:30 Coffee break

11:30 – 13:00 **Session 1: Genomics, Bioinformatics and Systems Biology**

Chairs: Dr. Herman Silva and Dr. Marlene Rosales

11:30 - 12:00 Dr. Hugo Peña, Universidad Técnica Federico Santa María. **Co-relation of transcriptional profiles and metabolic profiles to characterize the development and ripening of grapevine berries.** Hugo Peña-Cortés, Alvaro Cuadros, Fernando Dorta, Ingrid Ramírez, Simón Ruíz, Enrique González, Fernando Poblete, Camila Caldana, Patricio Giavalescco and Lothar Willmitzer.

12:00 Felipe Aceituno, P. Universidad Católica de Chile.

Microarray data analysis reveals gene body methylation is a key factor for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Felipe F. Aceituno and Rodrigo A. Gutiérrez

12:15 Patricio Ramos, Universidad de Talca.

Differential expression of genes involves in gravitropic response of *Pinus radiata* D. Don. Ramos, P., Moya, M., and Herrera.R

12:30 Loreto Prat, Universidad Andres Bello.

Expression of aroma genes and accumulation of volatile compounds in cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and white strawberry (*Fragaria chiloensis*) during ripening. Prat, L., Marchant, L., Maldonado, J., Sanhueza, D., Agosin, E. and Silva, H.

12:45 Susana Rasmussen, Universidad Andres Bello.

A first glance at the *Eucalyptus globulus* cold-activated regulatory pathway. Erwin Krauskopf, Susana Rasmussen-Poblete, Pablo D.T. Valenzuela, Maria Cecilia Gamboa.

13:00 – 14:30 Lunch break

Monday November 5th

AFTERNOON

14:30 – 15:30 Seminar

Dr. Hugo K. Dooner, Waksman Institute & Department of Plant Biology, Rutgers University. **“Genome structure diversity and meiotic recombination in maize”**.

Host: Dr. Herman Silva

15:30 – 17:00 Session 2: Biochemistry and Molecular Biology

Chairs: Xavier Jordana and Michael Handford

15:30 – 16:00 Dr. Jorge Casal. IFEVA - Universidad de Buenos Aires, Argentina. **“Regulation of input-output relationships in phytochrome A signaling”**

16:00 Hannetz Roschztardtztz, P. Universidad Católica de Chile.

Regulation of *SDH2-3* expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. Binding studies of transcription factors to the promoter. Roschztardtztz, H., Vásquez, M., Gómez, I, Alonso, R., Vicente-Carbajosa, J., Araya, A., Jordana, X.

16:15 Francisca Blanco, P. Universidad Católica de Chile.

Glutaredoxin C9 as a model gene for the study of the early response to salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*. NPR1 dependence, promoter analysis and pathogen infection response. Blanco F., Herrera A, Cechinni N., Alvarez M, Laporte D, Holuigue L.

16:30 Carlos Figueroa, Universidad de Talca.

Differences in softening rates of strawberry fruits are related to differential pectin metabolism. Figueroa, C.R., Rosli, H.G., Civello, P.M., Pimentel, P., Gaete-Eastman, C., Herrera, R., Caligari, P.D.S., Moya-León, M.A.

16:45 Nilo Mejia, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA – La Platina).

Positional candidate genes for seedlessness and berry weight in table grape.

Nilo Mejia, Braulio Soto, Marcos Guerrero, Anne-Françoise Adam-Blondon and Patricio Hinrichsen.

17:00- 19:00 Poster presentations (Coffee and Beer)

Tuesday November 6th

MORNING

9:00-10:00 Seminar

Dr. Nina Fedoroff. Evan Pugh Professor of Biology and Willaman Professor of life Sciences. The Pennsylvania State University. Biology Department and Huck Institutes of the life Sciences. **“The role of the Arabidopsis HYL1 protein in miRNA processing”.**

Host: Virginia Garretón

10:00-11:30 Round Table

National policy for scientific and technological development.

The Biofuels case study

Session Chair: Virginia Garretón

10:00 – 10:30 **Maria Olivia Recart**, Subsecretaria Ministerio de Hacienda del Gobierno de Chile.

10:30 - 11:00 **Dr. Nina Fedoroff**, Science and Technology Advisor to the U.S. Secretary of the State, Condoleezza Rice. Biology Department and Huck Institutes, Penn State University.

11:00 - 11:30 Discusión.

11:30:12:00 Coffee break

12:00-13:30 Session 3: Cell Biology

Chairs: Loreto Holuigue and Ariel Orellana.

12:00 – 12:30 Kristiina Himanen. Ghent University. VIB Flanders Institute for Biotechnology, Belgium.. **The arabidopsis ortholog of yeast BRE1 has a function in chromatin regulation during early organ growth.** Himanen K., Fleury D., Cnops G., Nelissen H., Boccardi T., Inzé D., Van Lijsebettens M.

12:30 Dr. Gabriel León, Universidad Andrés Bello

UDP-Glucose transporters *AtUTr1* and *AtUTr3* are partially redundant and essential for pollen development in *Arabidopsis thaliana*. Gabriel León, Francisca Reyes and Ariel Orellana

12:45 Ingrid Letelier, P. Universidad Católica de Chile.

Expression of C/D-snoRNAs in *Arabidopsis thaliana*. Letelier I., Holuigue and Echeverría M.

13:00 Andrea Vega, P. Universidad Católica de Chile.

Changes in gene expression in response to compatible viral infection in grapevine berries. Vega, A., Medina C., Arce-Johnson, P.

13:15 Elena Vidal, P. Universidad Católica de Chile.

Nitrate:auxin interaction in the development of *Arabidopsis thaliana* roots. Vidal, EA., Araus, V. and Gutiérrez, RA.

13:30-15:00 Lunch break

Tuesday November 6th

AFTERNOON

15:00 - 16:30 Session 4: Plant Physiology

Chairs: Erwin Krauskopf and Alejandra Moya

15:00 – 15:30 Dr. Luis Corcuera, Universidad de Concepción. **“A physiological approach to study the intriguing distribution of *Notophagus dombeyi* and *Notophagus nitida*”.** Corcuera LJ, Reyes-Díaz M, Piper F, Alberdi M, Bravo LA.

15:30 Andrés Zurita, Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas - CEAZA.
Assessment of salinity and boron toxicity on *Arabidopsis thaliana* root architecture: physiological responses and expression of target genes. C. Saguas, C. Cornejo, A. Milla, M-L Guillemin, K. Ruiz and A. Zurita.

15:45 Pablo Zamora, Universidad de Santiago de Chile
Abiotic factors associated with the climate change and their effect on the *Deschampsia antarctica* biology. Pablo Zamora, Marcelo Ortega, Humberto Prieto, Gustavo E. Zúñiga.

16:00 Alvaro Castro, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA – La Platina).

Evaluation for tolerance against *Botrytis cinerea* in a population of field lines of grapes cv. Thompson seedless genetically modified with antifungal genes. Álvaro Castro; Fernando Reyes¹; Blanca Olmedo; Catalina Álvarez; Marisol Muñoz; Mario Pastén; María Antonieta Reyes; Manuel Acuña; Eduardo Tapia; Carlos Muñoz; Patricio Hinrichsen; Paola Dell'Orto¹; Mike Moynihan¹; Leonel Gonzalez²; Humberto Prieto.

16:15 Marcela Esterio, Universidad de Chile
Molecular characterization of the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from table grapes (*Vitis vinifera* L.) in Chile. Marcela Esterio, Jaime Auger, Cecilia Ramos, M. José Araneda, G. Muñoz y M. Rosales.

16:30 - 17:10 Organizational Session – III Plant Biology Meeting
Host: Organizing Committee.
[Open to all attendants]

17:10 - 18:30 Poster Session II

18:30 – 20:00 Meeting Reception

GRAPEVINES YELLOWS IN CHILE

Angela Gajardo¹, Simona Prodan¹, Samanta Paltrinieri², Simona Botti², Ana Maria Pino¹, Jaime Montealegre³, Alan Zamorano¹, Assunta Bertaccini², Nicola Fiore¹

¹ *Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, University of Chile*

² *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Bologna, Italy*

³ *Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, University of Chile*

Detection and identification of phytoplasmas associated with Chilean grapevines was performed. Symptomatic and/or asymptomatic grapevine plants were sampled and tested by nested PCR, that allows the detection of phytoplasmas in 30 out of 91 samples. Identification by RFLP analyses assigned the detected phytoplasmas to 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrVII-A and 16SrXII-A ribosomal subgroups. Cloning and sequencing selected isolates allow the detection of genetic variability in 16SrXII-A Chilean strains.

The finding of 16SrVII-A phytoplasmas is new for grapevine, while appear to be detected in different host species. *Flavescence doree* was not detected in Chilean grapevines.

Infection with more than one type of phytoplasma is not uncommon in Chilean grapevines. Mixed infections between phytoplasmas and viruses frequently occur, that difficult the visual diagnosis.

There is no evidence of epidemic spreading of yellows symptoms in the surveyed vineyards, nevertheless, future danger of 16SrXII-A epidemic spreading is not totally excluded. Survey to verify the presence and identity of insect vector or potential vector and also possible herbaceous weed hosts plants, acting as reservoir of phytoplasmas, are in progress.

This work was financed by Fundación para la Innovación Agraria (FIA), project BIOT-BID-PI-C-2001-1-A-013.

Corresponding autor: N. Fiore

Fax: +56 2 9785812

E-mail: nfiore@uchile.cl

GRAPEVINE YELLOWS IN CHILE

Angela Gajardo, Simona Prodan, Samanta Paltrinieri¹, Simona Botti¹, Ana Maria Pino, Jaime Montealegre, Alan Zamorano, Assunta Bertaccini¹, Nicola Fiore

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Avenida Santa Rosa 11315 La Pintana, Santiago, Chile

¹Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale, Bologna, Italy

E-mail: nfiore@uchile.cl Phone: +56 2 9785726

In Chile the yellows presence in *Vitis vinifera* L. was visual reported by Caudwell in 1988 and the first immunological, microscopical and molecular evidence of phytoplasmas in grape was published in 2003 (Gajardo *et al.*; Herrera and Madariaga). Field observation in the last years revealed the presence of plants exhibiting symptoms typical of grapevine yellows (Fig. 1) in five regions of Chile (Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana de Santiago, Libertador General Bernardo O'Higgins, Maule). Detection and characterization of phytoplasmas was performed using molecular tools.

Samples from 91 plants with yellows symptoms and also symptomless plants of table and wine grapes varieties were collected. To verify phytoplasma presence, nucleic acids was extracted from a mixture of main leaf midribs and phloem tissues with a chloroform/phenol method. After direct PCR using universal primer pairs P1/P7, nested PCR with F1/B6 and R16F2/R2 was performed. Further nested PCR were performed with R16(I)F1/R1 and/or M1/B6 primer pairs. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses were employed to identify phytoplasmas. Selected F1/B6 and R16F2/R2 amplification fragments from the diverse phytoplasmas identified after RFLP analyses were purified and DNA fragments were ligated into T/A cloning vector pTZ57R/T. Amplicons obtained from 5 colonies per cloned fragment were subjected to RFLP analyses and selected fragments from cloned DNA were sequenced in both directions. The sequences were then aligned with BLAST engine for local alignment for Nucleotide-nucleotide BLAST (BLAST-N) (version Blast N 2.2.12) and a phylogenetic tree was constructed using CLUSTAL X program.

Figure 1. Symptoms on vine plants.



Nested PCR allows the detection of phytoplasmas in 30 out of 91 samples. The phytoplasmas detected in Chilean grapevines with yellow symptoms were assigned by RFLP analyses to four different ribosomal subgroups: 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrXII-A (related to Stolbur) and 16SrVII-A (Fig. 2). Mixed phytoplasma infection occur in Chilean grapevines, thus for a precise identification, complementation of both RFLP and sequencing was required, to complete the diagnostic. Considering results of both molecular tools, group 16SrI and 16SrI-B as a single infection was identified in two samples and 16SrI-C in four samples; 16SrI-B and 16SrXII-A were present in mixed phytoplasmas infection in one sample; 16SrVII-A was detected in single infection in eight samples, and in mixed infection with 16SrI-B and I-C in one sample, with 16SrI-B in another one, and with a not more identified 16SrI group in another sample; 16SrXII-A was present as single infection in ten samples and combined with 16SrVII-A in another one. One sample present infection with phytoplasmas belonging to the stolbur group but with different RFLP profile (Fig. 3). Analysis by successive alignment and clustering of 16S rRNA sequences of 23 selected members of the genus 'Ca. Phytoplasma' with highest similarity, permitted the design of a cluster phenogram (Fig. 4), whose branching order was in agreement with the RFLP findings hereby reported. This tree showed that Chilean isolates are clustering close to the known members of their RFLP ribosomal groups. The BLAST-N search on 16SrRNA gene and calculation of sequence percentage similarity showed the close homology of each Chilean sequence with the members of their assigned group. There is no evidence of epidemic spreading of yellows symptoms in the surveyed vineyards, nevertheless, future danger of 16SrXII-A epidemic spreading is not totally excluded. Survey to verify the presence and identity of insect vector or potential vector and also possible herbaceous weed hosts plants, acting as reservoir of phytoplasmas, are in progress.

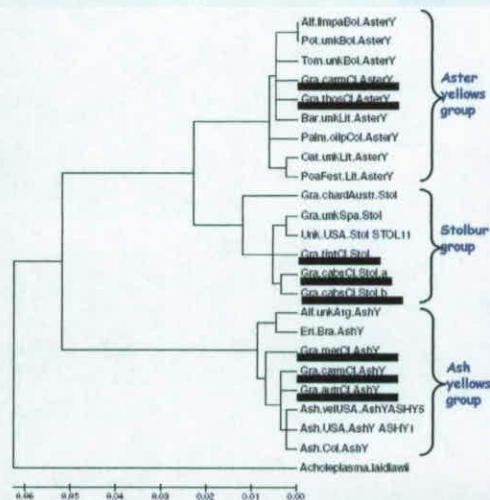


Figure 4. Phylogenetic tree, reporting placement of phytoplasmas associated with the Chilean isolates (underlined). *Achleplasma laidlawii* was employed as the out-group taxon.

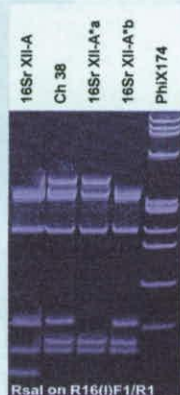


Figure 3. Polyacrylamide gel showing RFLP profiles of stolbur group phytoplasmas, obtained with *RsaI* on R16(I)F1/R1 fragment from direct PCR. Molecular variability was also present in different cloned fragments from the same PCR product. 16SrXII-A: control; Ch38: PCR product; 16SrXII-A'a and 16SrXII-A'b: cloned fragments from Ch38. PhiX174: marker ØX174.

16SrI (Aster yellows group)	16SrI-A
Tomato big leaf (USA, Virginia)	16SrI-B
Aster yellows (Italy, Italy)	16SrI-C
Clover yellow (Italy, Italy)	
16SrII (Pearl-necked brown)	16SrII-B
Sweet potato little leaf (Australia)	
16SrIII (X-disease group)	16SrIII-B
Y-green (Grapevine yellows (USA))	
16SrIV (Blue yellows group)	16SrIV-A
Blue yellows (Australia, Italy)	16SrIV-C
Flavescence dorée (France, Spain, North of Italy, Serbia)	16SrIV-D
16SrVII (Ash yellows group)	16SrVII-A
Ca. Phytoplasma fraxini (France)	
16SrIX (Apple proliferation group)	16SrIX-B
European stone fruit yellows (France, Serbia)	
16SrXII (Stolbur group)	16SrXII-A
Makara Negra (Spain, Greece, Serbia, France, Italy)	16SrXII-B
Ca. Phytoplasma quercus (Australia)	16SrXII-C
Grapevine yellows (Italy)	

Figure 2. Phytoplasmas detected in grapevine in the world. In red results originated with this work.



**“XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA
DE FITOPATOLOGIA”**

Facultad de Ciencias Forestales 28 al 30 de Noviembre de
2007

LIBRO DE RESUMENES

Con el patrocinio de

Facultad de Ciencias Forestales
Centro de Biotecnología
Sociedad Chilena de Fitopatología

Concepción-Chile 2007

PROGRAMA

MARTES 27 DE NOVIEMBRE

08:30 - 10:00 h	Inscripción de participantes	
10:00 - 10:30 h	Inauguración XVII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología	JS
10:30 - 11:00 h	Café	
	Presidentes: Gastón Apablaza Secretaría: Laura Böhm	ES
11:00 - 11:15 h	S1-1 "Determinación de la población de nematodos asociada a diferentes patrones de <i>Vitis</i> bajo dos condiciones de suelo en la zona central de Chile"	an
	Fariado P., Aballay E. y Casanova M.	V.
11:15 - 11:30 h	S1-2 "Uso de aceites minerales en el control de Oidio de la vid <i>Uncinula necator</i> (Schwein)"	
	Sánchez F. y Riveros F.	
11:30 - 11:45 h	S1-3 "Comportamiento de dos aceites minerales aplicados post infección de <i>Uncinula necator</i> "	a
	Riveros F.	
11:45 - 12:00 h	S1-4 "Cancrosis y muerte regresiva en ramillas de arándano. (<i>Vaccinium spp.</i>)"	no
	Espinoza J.G., Briceño E.X., Chávez E. y Latorre B.A.	
12:00 - 12:15 h	S1-5 "Control biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> (Kühn) en tomates con mutantes de <i>Trichoderma harzianum</i> (Rifai)"	
	Monteleone J., Valderrama L., Sanchez S., Herrera R., Perez L.M. y Besoin X.	
12:15 - 12:30 h	S1-6 "Concentración de anhídrido sulfuroso en cajas con diferentes generadores y condiciones de empaque y su efecto en el control de la pudrición gris en uva de mesa"	
	Henríquez J.L., Alarcón P. y Pinochet S.	
12:30 - 14:30 h	Almuerzo	

COMITE ORGANIZADOR

Dr. Eugenio Sanfuentes von Stowasser
Dra. Matilde Uribe Moraga
Dra. Katherine Sossa Fernández

COMITE CIENTIFICO

Dr. Bernardo Latorre G.
M. Sc. Ximena Besoin C.
Ing. Agr. Marco Muñoz F.
Dr. Claudio Sandoval B.

SEGUNDA SESION

Presidente: Fernando Rivero
Secretario: Francisco Sánchez

- 4:30 – 14:45 h
S2-1 "*Phytophthora pinifolia* una nueva especie asociada a pino radiata en Chile"
Ahumada R., Duran A., Rotella A., Flores F. y Wingfield M.
- 4:45 – 15:00 h
S2-2 "Caracterización del Daño Foliar del Pino (DFP)"
Rotella A., Ahumada R. y Flores F.
- 5:00 – 15:15 h
S2-3 "Etiología y aspectos epidemiológicos de la mortalidad en jardín de setos de *Pinus radiata* D. Don" Castillo M., González G. y Sanfuentes E.
- 5:15 – 15:30 h
S2-4 "Análisis de la distribución espacial del daño foliar de pino (DFP)"
Flores F., Ahumada R. y Rotella A.
- 5:30 – 15:45 h
S2-5 "Evaluación del efecto de biocidas sobre biopelículas de *Pseudomonas syringae*"
Lobos P., Cárcamo G., Sossa K., Morris C. y Urrutia H.
- 5:45 – 16:00 h
S2-6 "Aislamiento y caracterización de metabolitos con actividad antagonista de cepas de *Bacillus* sp. hacia los agentes fitopatógenos *Erwinia carotovora* (Dye) Hall y *Rhizoctonia solani* Kühn."
Garay Y. y Ciampi L.
- 6:00 – 16:30 h
Cafe
- 6:30 – 18:00 h
Mesa Redonda
"Daño foliar del pino (DFP)"
Empresa Forestal, SAG e Investigadores.
- 9:30 – 21:30 h
Moderadora: María Eugenia Murillo.
Cóctel de Recepción

MIÉRCOLES 28 DE NOVIEMBRE

TERCERA SESION

Presidenta: Blanca Luz Pinilla.
Secretario: Mauricio Lolas.

- 09:00 – 09:15 h
S3-1 "Resultados de prospección de *Xylella fastidiosa* en cultivos de vides y cítricos de Chile"
Muñoz M. y Vega E.
- 09:15 – 09:30 h
S3-2 "Estudio etiológico de *Botryosphaeria* en diferentes frutales y evaluación de su virulencia en palto y sarmientos de vid"
Morales A., Besoain X. y Piontelli E.
- 09:30 – 09:45 h
S3-3 "Aspectos epidemiológicos de los fitoplasmas que afectan la vid (*Vitis* spp.) en Chile"
Zamorano A., Pino A.M., Paltrinieri S., Calari A., Bertaccini A., Alma A., Montealegre J., Araya J. y Fiore N.
- 09:45 – 10:00 h
S3-4 "Control de *Botrytis cinerea* en manzanas"
López C., Montealegre J., Henríquez J.L. y Herrera R.
- 10:00 – 10:15 h
S3-5 "Descripción de *Pestalotia* sp. en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y evaluación *in vitro* de la susceptibilidad a diferentes fungicidas"
France A. y Garrido C.
- 10:15 – 10:30 h
S3-6 "Determinación de *Chondrostereum purpureum* en arándano y su epidemiología en el país."
France A., Buddie A. y Santelices C.
- 10:30 – 11:00 h
Cafe.
- 11:00 – 12:30 h
Seminario I
"Enfermedades en arándano"
Donald Ramdell
Plant Pathology, Michigan State University
- Moderador: Andrés France
- 12:30 – 14:00 h
Almuerzo

CUARTA SESION

Presidente: Ricardo Madariaga
Secretaria: Paulina Sepúlveda

14:00 – 14:15 h

S4-1 "Enfermedad de la Vena Ancha en lechuga: relación entre intensidad de síntomas y acumulación de proteínas y RNAs virales"

Araya C., Román L., Peña E., Mora R. y Rosales, M.

14:15 – 14:30 h

S4-2 "Identificación de *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* (E. M. Turner) Dennis, un nuevo patógeno de avena en Chile"

Gutierrez M., Asejo C., Oyarzo O. y Peña P.

14:30 – 14:45 h

S4-3 "Efectividad de distintos fungicidas recomendados para el control de la mancha foliar o septorios (Mycosphaerella graminicola [Fuckel] Schroeter) de la hoja del trigo en Chile"

Andrade O. y Contreras E.

14:45 – 15:00 h

S4-4 "Detección de *Erysiphe cichoracearum* (D.C.) y *Alternaria alternata* (Fries) en el cultivo de achicoria (*Cichorium intybus* var. *sativum*) en Chile."

Almaraz M., Riegel R., Andrade N. y Arismendi N.

15:00 – 15:15 h

S4-5 "Control de la mancha café en alcachofas"

Sepúlveda P., Blanco C. y Rebufel P.

15:15 – 15:30 h

S4-6 "Desinfección de semilla de maíz con tres fungicidas para el control de *Fusarium moniliforme*"

Apablaza G. y Silva J.

15:30 – 16:30 h

Café – SESION DE POSTER

16:30 – 17:30 h

Seminario 2

"Patógenos para el control biológico de malezas"

Nick Waipara
Landcare Research, New Zealand

Moderador: Ximena Besoin

QUINTA SESION

Presidente: Claudio Sandoval
Secretario: Germán Sepúlveda

17:30 – 17:45 h

S5-1 "Comportamiento e identificación genómica de *Botrytis cinerea* aislada de esclerotios de sarmentos y frutos de vides provenientes de distintas zonas geográficas de Chile"

Pinilla B. y Corvalán C.

17:45 – 18:00 h

S5-2 "Identificación genética de las variedades de *Botrytis cinerea* que atacan a la frutilla: *Fragaria chilensis* y *Fragaria x ananassa*."

Valdés J., Lavandero B., Brevis P. y Caligari P.D.S.

18:00 – 18:15 h

S5-3 "Control preventivo de la pudrición "Ojo de Buey" en manzanas cv. Pink Lady, mediante aplicaciones de un fertilizante foliar y fungicidas inorgánicos"

Pinilla B. y Lolas M.

18:15 – 18:30 h

S5-4 "Evaluaciones y validación del comportamiento de portainjertos de vid a diferentes poblaciones de nemátodos fitoparásitos en plantaciones comerciales de más de tres años"

Escobar M. y Aballay E.

18:30 – 18:45 h

S5-5 "Evaluación de la eficacia de cepas nativas del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. en la disminución de la severidad de la enfermedad Muerte de Brazos y en la estimulación del crecimiento en kiwi"

Lolas M., Donoso E., Muñoz C., Sandoval C. y Díaz J.

18:45 – 19:00 h

S5-6 "Sensibilidad de diez cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a kasugamycin"

Besoain X. y Chahuán J.P.

19:00 – 19:45 h

Reunión SOCHIFIT

20:30 h

Cena de Camaradería

JUEVES 29 DE NOVIEMBRE

SEXTA SESION

Presidenta: Ivette Acuña
Secretaria: Rosa Arancibia

09:00 – 09:15 h

S6-1 "Enfermedad de la Vena Ancha de la lechuga: estudios de incidencia, variación en la expresión de síntomas y herramienta para su diagnóstico y control"

Rosales M., Araya C., Román L., Peña E., Mora R., Salazar E. y Aljaro A.

09:15 – 09:30 h

S6-2 "Expresión de genes en hojas de *Fragaria chiloensis* en respuesta a la infección de *Botrytis cinerea*"

González G.R., Sandoval C., Moya M., Herrera R.

09:30 – 09:45 h

S6-3 "Sensibilidad *in vitro* de cinco fungicidas y su efecto sobre los agentes causales de pudrición del racimo en uva de mesa"

Besoain X., Mora G., Salgado E. y Sánchez F.

09:45 – 10:00 h	S6-4 “Sensibilidad <i>in vivo</i> de cinco fungicidas y su efecto sobre pudrición del racimo en uva de mesa cv. red globe” <u>Besoain X.</u> , Mora G. y Sánchez F.	14:45 – 15:00 h	S7-4 “Evaluación de aislados nativos de <i>Pasteuria penetrans</i> en poblaciones de <i>Meloidogyne spp.</i> en cultivos de tomates” <u>Donoso E.</u> , Lolas M., Muñoz C., Sandoval C. y Davies K.
10:00 – 10:15 h	S6-5 “Evaluación del ciruelo (<i>Prunus domestica</i> L.) transgénico C-5 frente a distintos aislados chilenos del virus Plum pox (PPV)” <u>Wong W.</u> , Rosales M. y Prieto H.	15:00 – 15:15 h	S7-5 “Actividad del anhídrido sulfuroso sobre <i>Penicillium spp.</i> aislados de uva de mesa” <u>Alarcón P.</u> y Henríquez J.L.
10:15 – 10:30 h	S6-6 “Especies de <i>Aspergillus</i> ocratoxigénicos asociados a la vid (<i>Vitis vinifera</i>) en la zona central de Chile” <u>Díaz G.A.</u> , Torres R. y Latorre B.A.	15:15 – 15:30 h	S7-6 “Efecto de la aplicación de aficidas en la dinámica poblacional de los áfidos que transmiten BYDV, y el rendimiento y calidad de <i>Triticum turgidum</i> L. ssp. <i>durum</i> ” <u>Garcés C.E.</u> , Araya J.E. y Madariaga R.P.
10:30 – 10:45 h	S6-7 “Pudrición al cuello y raíces del arándano causada por especies de <i>Phytophthora</i> ” <u>Larachi A.</u> y Besoain X.	15:30 – 15:45 h	S7-7 “Control de peca bacteriana (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>) en tomate con Nacillus®, formulado en base a cepas nativas de <i>Bacillus spp.</i> ” <u>Lillo C.</u> , Donoso E., Lolas M., Hettich W. y Muñoz C.
10:45 – 11:15 h	Café	15:45 – 16:00 h	S7-8 “Sensibilidad de diez cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> a kasugamicina” <u>Besoain X.</u> y Cahuán J.P.
11:15 – 12:30 h	Seminario 3 “Aplicaciones de biopelículas en control de enfermedades de plantas” Dr. Homero Urrutia. Universidad de Concepción Moderadora: Ximena Besoain	16:00 – 16:15 h	S7-9 Evaluación de Trichonativa® en el control de <i>Botrytis cinerea</i> en uva de mesa cv. Thomson seedless. <u>Donoso E.</u> , Lolas M., Fuentes J., Sandoval C., Hettich W. y Guerra C.
12:30 – 14:00 h	Almuerzo	16:15 – 16:45 h	Café
5 SEPTIMA SESION	Presidente: Nicola Fiore Secretario: Rodrigo Herrera	16:45 – 17:45 h	Seminario 4 “Plantas GM para control de enfermedades” Dra. Sofía Valenzuela A. Universidad de Concepción Moderadora: Marlene Rozales
14:00 – 14:15 h	S7-1 “Uso de un sistema de alerta temprana para el desarrollo de estrategias de manejo integrado del tizon tardío en el sur de Chile” Acuña I., Sagredo B., Bravo R., Gutiérrez M., Maldonado I., Gaete N., Inostroza J., Secor G., Rivera V., Kalazich J., Solano J. y Rojas J.	17:45 – 18:15 h	Premiación mejores trabajos-Cierre
14:15 – 14:30 h	S7-2 “Control de nemátodos y hongos fitopatógenos del suelo con biofumigantes en el valle de Azapa” Magnan I., Ugalde S., Rojas M., Gallo P. y Sepúlveda G.	VIERNES 30 DE NOVIEMBRE	
14:30 – 14:45 h	S7-3 “Determinación de geminivirus en cultivos de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) del valle de Azapa, Región de Arica y Parinacota” <u>Cabrera M.</u> , Silva F., Baldera M., Carrasco J., Soto I. y Muñoz M.	08:30 – 18:00 h	Gira Técnica Actividad Opcional



FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN DE TRABAJOS



XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA
27 AL 30 DE NOVIEMBRE DE 2007
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES - UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Resumen de Trabajo

“ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS FITOPLASMAS QUE AFECTAN LA VID (*VITIS* SPP.) EN CHILE”

“Epidemiological aspects concerning phytoplasmas infecting Chilean grapevine (*Vitis* spp.)”

**ALAN ZAMORANO, ANA MARIA PINO, SAMANTA PALTRINIERI¹, ALBERTO
CALARI¹, ASSUNTA BERTACCINI¹, ALBERTO ALMA², JAIME
MONTEALEGRE, JAIME ARAYA, NICOLA FIORE**

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana,
Santiago de Chile. Teléfono: 9785726, Fax: 9785961. E-mail: nfiore@uchile.cl

¹Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale, Bologna, Italia.

²Università di Torino, DiVaPRA Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente, Grugliasco,
Torino, Italia.

Las amarilleces de la vid en Chile actualmente están asociadas a fitoplasmas pertenecientes a los grupos ribosomales 16SrI-B, 16SrI-C (ambos del género '*Candidatus* Phytoplasma asteris', 16SrVII-A ('*Ca. P. fraxini*') y 16SrXII-A (stolbur). La presencia de estos patógenos en las plantas depende de la propagación de material vegetal infectado y la diseminación natural ocurre por medio de diferentes especies de insectos vectores auquenorrincos (langostinos). Con la finalidad de averiguar la presencia de langostinos en los viñedos chilenos y determinar su rol en la transmisión de fitoplasmas, se ha procedido a la captura de individuos que han sido caracterizados y analizados para detectar fitoplasmas. Se ha podido así recolectar insectos pertenecientes a la subfamilia *Delthocephalinae* (familia *Cicadellidae*) y a las familias *Cixiidae* y *Delphacidae*, todos potenciales vectores de fitoplasmas. Varios insectos han resultado positivos a fitoplasmas y el 16SrXII-A (madera negra) se encontró en individuos que, según una primera caracterización, pertenecerían a los géneros *Macrosteles* ó *Exitianus*.

Proyecto FIA BIOT-BID-PI-C-2001-1-A-013

Los resúmenes de los trabajos según instrucciones y formulario adjuntos, deberán ser enviados vía correo electrónico (en línea) a congreso-fitopatologia@udec.cl; para mayor seguridad **se sugiere** enviar además CD por correo certificado a nombre de Comisión Organizadora, XVII Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología, Victoria 631, Ciudad Universitaria, Concepción, Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONÓMICAS



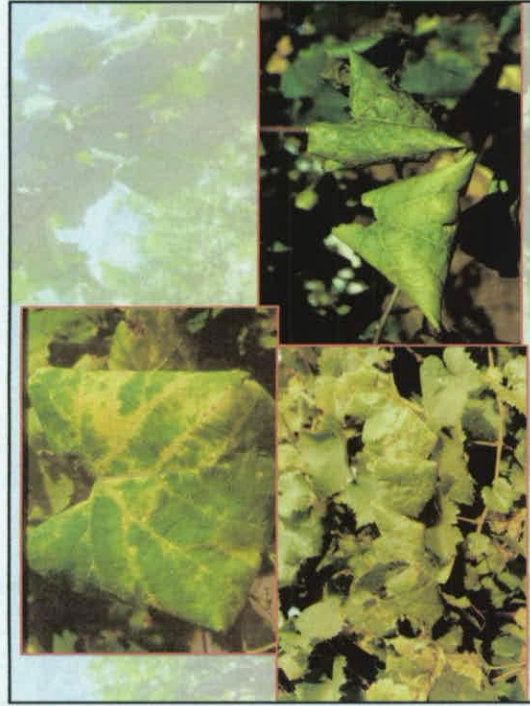
GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGROARIA
INSTITUTO DE AGRICULTURA

Proyecto FIA BIOT-BID-
PI-C-2001-1-A-013

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS FITOPLASMAS QUE AFECTAN LA VID (*VITIS* SPP.) EN CHILE

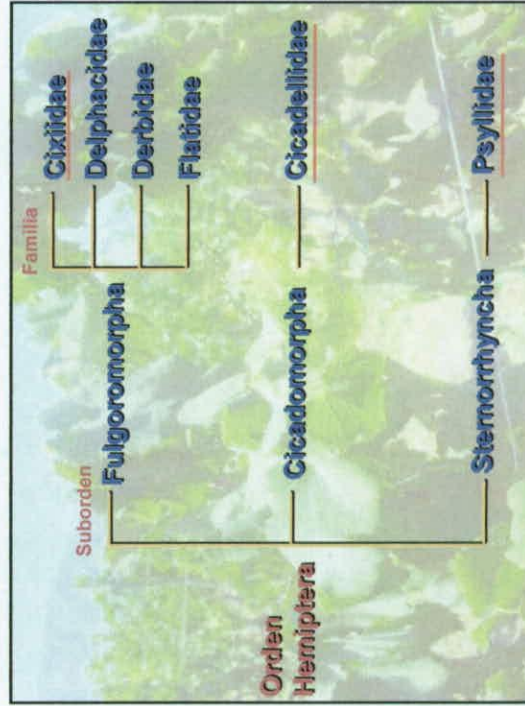
A. Zamorano, A. M. Pino, S. Paltrinieri¹, A. Calari¹,
A. Bertaccini¹, A. Alma², J. Montealegre,
J. Araya, N. Fiore

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago de Chile.
¹Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale, Bologna, Italia.
²Università di Torino, DiVaPRA Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente,
Grugliasco, Torino, Italia.





Fitoplasmas detectados en vides en el mundo (listado actualizado con datos chilenos)		
16SrI (Aster yellows group)	Tomato big bud (EEUU; Virginia)	16SrI-A
Aster yellows (Italia, <i>Chile</i>)		16SrI-B
Clover phyllody (Italia, <i>Chile</i>)		16SrI-C
16SrII (Peanut witches' broom)		16SrII-B
Sweet potato little leaf (Australia)		
16SrIII (X-disease group)		16SrIII-J
Virginian Grapevine yellows (EEUU)		
16SrIV (Elm yellows group)		16SrIV-A
Elm yellows (Alemania, Italia)		16SrIV-C
Flavescencia dorata (Francia, España, Norte de Italia, Serbia)		y 16SrV-D
16SrVII (Ash yellow group)		16SrVII-A
Ca. Phytoplasma fraxini (<i>Chile</i>)		
16SrX (Apple proliferation group)		16SrX-B
European stone fruit yellows (Hungria, Serbia)		
16SrXII (Stolbur group)		16SrXII-A
Madera Negra (U. Europea, Croacia, Serbia, Israel, <i>Chile</i>)		16SrXII-B
Ca. Phytoplasma australiense (Australia)		16SrXII-?
Grapevine yellows (<i>Chile</i>)		



AUQUENORRINCOS VECTORES DE FITOPLASMAS EN EUROPA

VECTORES NATURALES DE FITOPLASMAS EN VID EN EUROPA

Scaphoideus titanus FD

Hyalesthes obsoletus BN, VK, LN, MN
(....y 16 especies más)

Oncopsis alni PGY (ALY)

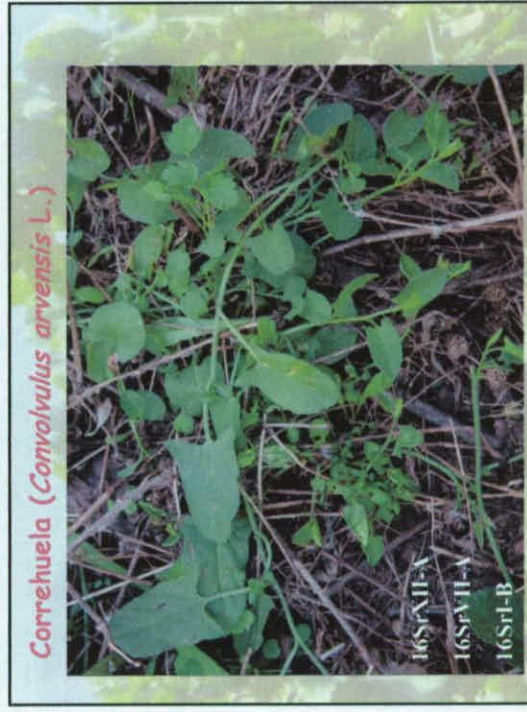
Insectos asociados a viñedos chilenos

Cicadellidae
Deltocephalinae
Macrosteles ó
Exitianus

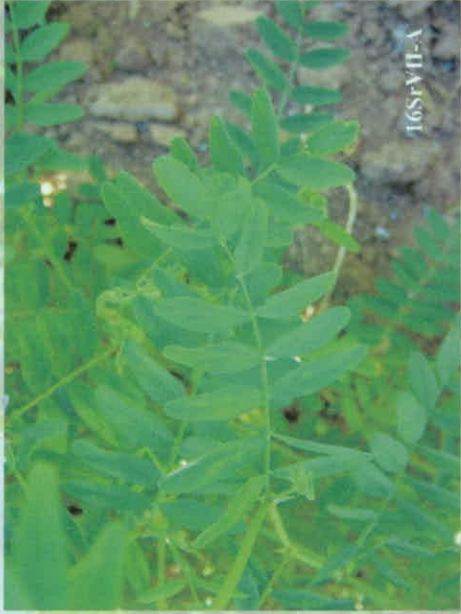
16SrXII-A







Galega (*Galega officinalis* L.)



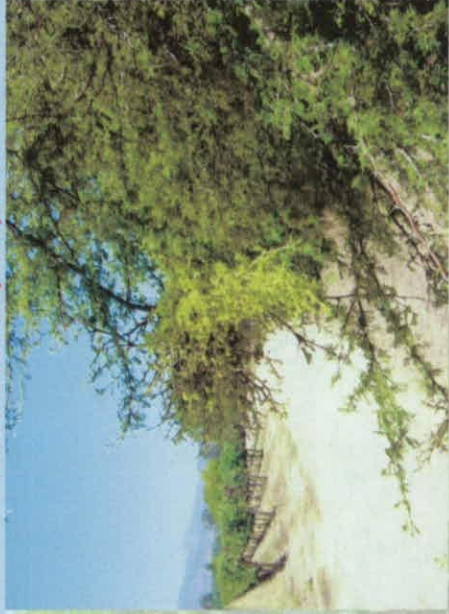
T6SrvII-A

Sanguinaria ó Pasto del pollo
(*Polygonum aviculare* L.)



T6SrvII-B

Espino
Acacia caven (Mol.) Mol.



Under the patronage of



MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE
ALIMENTARI E FORESTALI



COMUNE DI BOLOGNA



Sponsored by



Fermentas
LIFE SCIENCES



Bayer CropScience



VITRO ITALIA **plant**
Technological and Agricultural Plants



SARSTEDT



Contact Research Organization
AGREA
www.agrea.it

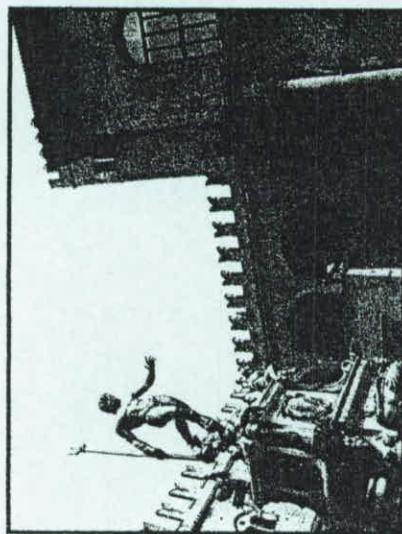


ALMA MATER STUDIORDINI
UNIVERSITA DI BOLOGNA



FACOLTA DI AGRARIA
ALMA MATER STUDIORDINI
UNIVERSITA DI BOLOGNA

First International Phytoplasma Group Working Group Meeting



November 12-15, 2007
Bologna – Italy



Faculty of Agriculture, Viale Fanin 46
Aula Magna, Ground Floor, North Wing

First
International
Phytoplasmologist
Working Group
Meeting
November 12-15, 2007
Bologna – Italy

*Parasitos tantummodo
in rerum natura investiganda
fortuna iuvit*

Monday November 12

From 8:00 Registration - Posters set up

9:00 Welcome addresses

10:00 Introduction Molecular biology and genomics of *Molluscites*
Shmuel Razin - The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

10:30 Coffee break

11:00 Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective
Shigetou Namba - The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Phytoplasma genomics

Saskia Hogenhout & Matt Dickinson

11:45 An overview of the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense' - Australian strain
Lucy Tran-Nguyen, M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt, K. Gibb

12:00 First look into the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma mali' in comparison to 'Candidatus Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB
Michael Kube, B. Schneider, R. Reinhardt, E. Seemüller

12:15 Purification of phytoplasma DNA for sequencing the "flavescence dorée" and stolbur phytoplasma genomes
Patricia Carle, S. Malembic-Maher, X. Foissac

12:30 Progress towards a chromosome map of the "flavescence dorée" phytoplasma
A. Cimerman, G. Arnaud, P. Carle, X. Foissac, E. Boudon-Padiou

12:45 Dynamic structures in phytoplasma genomes: sequence-variable mosaics (SVMs) of clustered genes
Robert E. Davis, R. Jomantiene, Y. Zhao

13:00 Lunch

Phytoplasma diseases worldwide I

Jana Franova & Phil Jones

14:30 Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*
Milan Navrátil, J. Příbylová, P. Válová, R. Fialová, D. Šafářová, J. Špáček, D. Kubelková, K. Petřík, R. Křešková, V. Špaková

14:45 Detection of 'Candidatus Phytoplasma pyri' in Turkey
Mona Gazel, Ç. Ulubaş Serçe, K. Çağlayan, H. Özlü

15:00 Molecular identification of 16Srl-A, 16Srl-B, 16Srl-C, and 16Srl-L subgroups of phytoplasmas in gramineous plants in Lithuania
Laima Urbanavičienė, R. Jomantiene, D. Valiūnas, R.E. Davis

15:15 List of phytoplasma hosts in Brazil
Helena G. Montano, P.S.T. Brioso, J.P. Pimentel

15:30 Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview
V. Lebsky, Arevik Poghosyan

15:45 Identification of phytoplasma associated with witches' broom and virescence diseases of sesame in Oman
Akthar Jamal Khan, K. Bollner, N. Al-Saadi, A. M. Al-Sudhi, I.-M. Lee

16:00 Coffee break

Phytoplasma diseases worldwide II

Cristina Marzachi & Wayne Myrie

16:15 Phytoplasma detected in reverted black currants in Finland
Anne Lemmerly, J. Příbylová, J. Špáček

Phytoplasma strains detected in ornamental plants in Lithuania
Marija Samuiliėnė, R. Jomantiene, D. Valiūnas, M. Navalskienė, R.E. Davis
Phytoplasmas detected in cultivated fruit plants in Lithuania
Deividas Valiūnas, R. Jomantiene, R.E. Davis

16:30 Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey - G. Serikaya, Marta Martini, R. Musetti, R. Osler

Diversity of the known phytoplasmas in Israel - Phyllis G. Weintraub, M. Zeidan, S. Spiegel, A. Gera

Molecular evidence for the presence of 'Candidatus Phytoplasma cynodontis', the Bermuda grass white leaf agent, in India - G.P. Rao, S.K. Raj, S.K. Snehi, S. Mall, M. Singh, Carmine Marcone

16:45 Phytoplasma in "fava d'anta" tree (*Dimorphandra gardeniana*) in Brazil
Helena G. Montano, G.S. Silva, R.C. Rocha, N.Z.A. Jimenez, R.C. Pereira, P.S.T. Brioso

Is a phytoplasma responsible for fig mosaic disease? - Kadriye Çağlayan, M. Gazel, Ç. Ulubaş Serçe, S. Soylu, S. Yalçın

Presence of phytoplasma infections in tomato plants in Mauritius
Arty Gungoosingh-Bunwaree, A. Bertaccini, S.P. Benimadhu

17:00 Molecular identification of "bois noir" phytoplasmas in grapevine in Bulgaria - Dimitrijka Sakaljeva, S. Paltrinieri, A. Calari, A. Bertaccini

Geographical distribution of "bois noir" phytoplasmas infecting grapevines in the Republic of Macedonia
Saša Milčević, E. Nakova, F. Pejčinovski, E. Angelini

Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece - Evangelos Vellios, F. Liolopoulou

17:15 Molecular detection and characterization of phytoplasmas associated with lethal yellowing disease of coconut palms in Jamaica
Wayne Myrie, N. Harrison, M. Dollet, B. Been

Are phytoplasmas the etiological agent of yellow leaf disease of *Areca catechu* in India? - C.R. Ajadkar, Purushothama, J. Gottavalli Ramanayaka, T. Sano, P. Casati, Pier Affilio Bianco

Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy - F. Landi, A. Prandini, S. Paltrinieri, Nicola Mori, A. Bertaccini

Phytoplasma diseases in New Zealand - Lia W. Liefing, R. E. Beaver, M.T. Andersen, G.R.G. Clover

17:30 IPWG discussion

Tuesday November 13

- 9:00 Insect vector of phytoplasmas and their control – an update
Phyllis Weintraub – Volcani Agricultural Research Organization, Gilat Research Center, Israel

Insect vectors of phytoplasmas I

Phyllis Weintraub & Michael Mairner

- 9:45 A handbook of leafhopper and planthopper vectors of plant disease
Michael Wilson
- 10:00 An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors
Michael Wilson, P.G. Weintraub
- 10:15 Search for the vector of Cape Saint Paul wilt (coconut lethal yellowing) in Ghana
R. Philippe, J.P. Nkansah, S. Fabre, R. Quacoe, F. Pilet, Michel Dollé
- 10:30 Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific northwest of the United States
Joseph E. Munyaneza, J.M. Crosslin, L.-M. Lee
- 10:45 *Coffee break*

Insect vectors of phytoplasmas II

Barbara Jarausch & Alberto Alma

- 11:00 '*Candidatus* Phytoplasma prunorum': the phytoplasma status of *Cacopsylla pruni* from apitot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic)
Renata Fialová, M. Navrátil, P. Lauterer, V. Navrátková
- 11:15 Are there several biotypes of *Cacopsylla pruni*?
Nicolas Sauvion, O. Lachenaud, G. Genson, J.-Y. Rasplus, G. Labonne
- 11:30 '*Candidatus* Phytoplasma mali': the current situation of insect vectors in northwestern Italy
Rosemarie Tedeschi, A. Alma
- 11:45 *Cacopsylla picta* as most important vector for '*Candidatus* Phytoplasma mali' in Germany and neighbouring regions
Barbara Jarausch, A. Fuchs, N. Schwind, G. Krczal, W. Jarausch

- 12:00 Molecular tests to determine pear decline phytoplasma presence in psyllid vectors from pear tree orchard in the Czech Republic – preliminary report
Jana Kucerová, L. Taláček, P. Lauterer, M. Navrátil, R. Fialová
- Survey of *Cacopsylla pruni* in different fruit tree producing areas of Spain
J. Sabaté, Amparo Lawiña, A. Batlle
- Acquisition capacities of the overwintering adults of the psyllid vectors of '*Candidatus* Phytoplasma mali' – *Federico Pedrazzoli, V. Gualandri, F. Forno, L. Mattedi, V. Malagnini, A. Salvadori, G. Stoppa, C. Ioriatti*

Federico Pedrazzoli

- 12:15 Occurrence and distribution of *Scaphoides titanus* in multiple outbreaks of "flavescence dorée" in Serbia – *Slodan Krnjajić, M. Mitrović, T. Čirković, J. Jović, A. Petrović, V. Forte, E. Angelini, I. Toševski*
- Scaphoides titanus* identified in Hungary – *Z. Dér, S. Koczor, B. Zsolnai, I. Ember, Mária Kolber, A. Bertaccini, A. Alma*

12:30 Lunch

Interactions among phytoplasmas and hosts I

Shigetou Namba & Lia Liefing

- 14:00 Behaviour and interaction of two '*Candidatus* Phytoplasma mali' strains in artificial infections
Paola Ermacora, M. Martini, L. Carraro, F. Ferrini, N. Loi
- 14:15 Effect of different strains of '*Candidatus* Phytoplasma mali' in susceptible and resistant *Malus* genotypes inoculated by *in vitro* grafting
Claudia Bisognin, A.M. Ciccoiti, A. Salvadori, M. Moser, M.S. Grando, W. Jarausch

- 14:30 Gene expression study in different '*Candidatus* Phytoplasma mali' – infected micropropagated *Malus* genotypes
M. Moser, C. Sprenger, C. Bisognin, R. Velasco, Wolfgang Jarausch

- 14:45 Chemo-ecologically mediated interactions among '*Candidatus* Phytoplasma mali', its vector *Cacopsylla picta*, and their host plant *Malus domestica*
Christoph J. Mayer, A. Vilcinskis, J. Gross

- 15:00 Production of polyclonal and monoclonal antibodies specific against membrane proteins of '*Candidatus* Phytoplasma asteris', *chrysanthemum yellows* isolate
Luciana Galetto, D. Bosco, J. Fletcher, C. Marzachi

- 15:15 Effect of pear decline phytoplasma on gene expression in *Catharanthus roseus*
V. Carginale, V. De Luca, C. Capasso, M.R. Baldi, G. Maria, M. Pastore, A. Bertaccini, L. Carraro, Antonio Capasso

- 15:30 Phytoplasma induced changes in gene expression in poinsettia
Mogens Nicolaisen, N. Meyn Christensen

- 15:45 A secreted effector protein of AY-WB phytoplasma accumulates in nuclei and alters gene expression of host plant cells, and is detected in various tissues of the leafhopper *Macrostelus quadrilineatus*
X. Bai, A. El-Desouky, Saskia A. Hogenhout

16:00 *Coffee break*

Interactions among phytoplasmas and hosts II

Alain Blanchard & Yaima Arocha

- 16:15 Gene expression and enzymatic activity of invertases and sucrose synthase in *Spiroplasma citri* or strobil phytoplasma infected plants
J. Machenaud, R. Henri, M. Dieuaide-Noubhani, P. Pracros, J. Renaudin, Sandrine Evellard

- 16:30 Strobil phytoplasma-infected tomato showed alteration of S-IDEF methylation status and deregulation of methyltransferase genes expression
P. Pracros, M. Hernould, E. Teyssier, Sandrine Evellard, J. Renaudin

- 16:45 Double infection of '*Candidatus* phytoplasma asteris' and "flavescence dorée" phytoplasma in the vector *Euscelidius variegatus*
Romina D'Amelio, C. Marzachi, D. Bosco

17:00 Aster yellows phytoplasma 'witches' broom (AY-WB; 'Candidatus Phytoplasma asteris') increases survival rates of *Macrosteles quadrilineatus* and *Dalbulus maidis* on various plant species - Heather N. Kingdom, S.A. Hogenhout

Pattern of chrysanthemum yellows phytoplasma multiplication in three leafhopper vector species (Cicadellidae: Deltocephalinae) - Domenico Bosco, L. Galetto P. Leoncini, P. Saracco, B. Raccach, C. Marzachi

Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiriplasma acquisition and environmental conditions
Elizabeth de Oliveira, J.C. Santos, P.C. Magalhães, I. Cruz

Elizabeth
de
Oliveira

17:15 Protein extraction for *Cocos nucifera* with and without lethal yellowing phytoplasma: gel-based proteomic - Celso Reyes-Martínez, D. Morales-Angel, M. Narvaez-Cab, J.A. Osuna-Castro, D. Zizumbo-Villarreal, C.M. Oropeza-Salín, E. Peña-Baltrán

Productive parameters in Chardonnay and Vermentino grapevines infected with "bois noir" and recovered in Sardinia - Raimondo Garau, A. Sechi, V.A. Prota, G. Moro

Recovery phenomena in grapevines affected by grapevine yellows in Friuli Venezia Giulia
C. Bellomo, L. Carraro, P. Ermacora, Francesco Pavan, R. Osler, C. Frausin, G. Governatori

Paolo
Ermacora

20:00 Social Dinner



Wednesday November 14

9:00 Prospects of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas
Ing-Ming Lee - Molecular Plant Pathology Laboratory, Beltsville, MD, USA

Phytoplasma detection methods I

9:45 Evaluation of SSCP analysis as a tool for detection of phytoplasma molecular variability
Martina Šeruga Musić, M. Krajčić, D. Skorić

10:00 Experiences with phytoplasma detection and identification by different methods
Jana Fránková, K. Petržik, F. Paprštein, J. Kučerová, M. Navrátil, P. Válová, J. Nebesářová, H. Jakesová

10:15 Optimization of extraction procedure can improve phytoplasma diagnostics
Jana Boben, N. Mehle, M. Ravnikar

10:30 A real-time PCR method for detection and quantification of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' in its natural hosts
Marta Martini, N. Loi, P. Ermacora, L. Carraro, M. Pastore

10:45 Coffee break

Phytoplasma detection methods II

11:00 Detection of "flavescence dorée" in grapevines by RT-PCR
Marta Marlini & Ing Ming Lee
Sabrina Palmato, P. Margaria, C. Marzachi, M. Turina

11:15 Establishing a real-time PCR detection procedure of "flavescence dorée" and "bois noir" phytoplasmas for mass screening
M. Gori, R. Monnanni, M. Buiatti, E. Gotti, S. Carnevale, L. Da Prato, A. Bertaccini, Stefano Bircicchi

11:30 Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California
Assunta Bertaccini, A. Calari, P. Felker
Repeated conserved sequences as genetic markers for phytoplasma detection
Rasa Jomantiene, R.E. Davis

11:45 Problems in detection of European stone fruit yellows phytoplasma in apricot trees in the Czech Republic - Jaroslav Polák, J. Salava, M. Bryxiová, J. Svoboda
Seasonal occurrence of 'Candidatus Phytoplasma pyri' in pear trees in the Czech Republic - Jana Kučerová, R. Karšiová, M. Navrátil, P. Válová
Detection of latent apple proliferation infection in two differently aged apple orchards in South Tyrol (northern Italy) - Sanja Baric, C. Kerschbamer, J. Dalla Via

New phytoplasmas and new phytoplasma diseases I

12:00 A new phytoplasma associated with 'witches' broom of *Cassia italica* in Oman
A.J. Khan, A.M. Al-Subhi, Alberto Calari, N.A. Al-Saady, A. Bertaccini

12:15 A new disease causing stunting and shoot proliferation in *Gypsophila* is associated with phytoplasma
Abdullah Gera, P.G. Weintraub, L. Maslenin, S. Spiegel, M. Zeidan

12:30 Detection and characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava
Elizabeth Alvarez, J.F. Mejia, G.A. Llano, J.B. Loke

12:45 A severe disease induced by 'Candidatus Phytoplasma asteris' in *Digitalis lanata*
M.G. Ballard, A. Benni, S. Palmieri, Assunta Bertaccini

13:00 Lunch

New phytoplasmas and new phytoplasma diseases II

14:30 First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*)
Helena G. Montano, P.S.T. Brioso, J.D. Cunha Jr, D.V. Figueiredo, J.P. Pimentel

14:45 Virescence of tenweeks stock associated to phytoplasma
S. Davino, A. Calari, M. Davino, Marilde Tessitore, A. Bertaccini, M.G. Bellard

15:00 Phytoplasma infection in the four o'clock flower (*Mirabilis jalapa*)
I. Sobolev, P.G. Weintraub, A. Gera, Y. Tam, Sara Spiegel

15:15 A new phytoplasma associated with a zigzag line pattern in leaves of *Lilium* spp. in Mexico
N.E. Cortés-Martínez, Ernestina Valadez-Moctezuma, L.X. Zelaya-Molina, J. Aguilar-Ríos

15:30 "Al-Wijam", a new phytoplasma disease of date palm in Saudi Arabia
Khalid Alhudaib, Y. Arocha, M. Wilson, P. Jones

15:45 *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae): a new phytoplasma host - Helena G. Montano, P.S.T. Brioso, R.C. Pereira, J.P. Pimentel
Molecular characterization of phytoplasma associated with *Echinops* 'witches' broom disease - Ali Masoud Al-Subhi, N.A. Al-Saady, A.J. Khan

16:00 Coffee break

Perspective towards control of phytoplasma diseases **Assunta Bertaccini & Robert E. Davis**

- 16:15 Effects induced by fungal endophytes in *Catharanthus roseus* tissues infected by phytoplasmas **Rita Musetti, R. Polizzotto, S. Gnan, M. Martini, S. Borselli, L. Carraro, R. Osler**
- 16:30 Factors affecting the spread of "bois noir" disease in grapevine cv Lambrusco in northern Italy **Nicola Mori, F. Pavan, R. Bondavalli, N. Reggiani, S. Palmieri, A. Bertaccini**
- 16:45 Push and pull strategy to reduce *Hyalesthys obscurus* population in vineyards by *Vitex agnus castus* as trap plant **Tiziana Zanavi, S. Peles, A. Harari, V. Soroker, R. Sharon**
- 17:00 Breeding of apple rootstocks resistant to 'Candidatus Phytoplasma mali' **Wolfgang Jarausch, C. Bisognin, B. Schneider, S. Grand, R. Velasco, E. Seemüller**
- 17:15 *Malus sieboldii*-based rootstocks mediate apple proliferation resistance to grafted trees **Erich Seemüller, E. Moll, B. Schneider**
- 17:30 Screening and development of resistant sesame varieties against phytoplasma **P.K. Singh, Mohammad Akram, M. Vajpeyi, R.L. Srivastava, K. Kumar, R. Nareesh**
- 17:45 Survey of sweet orange cultivars for stubborn disease resistance in Iran **Maghieh Nejati, M. Salehi, M. Fayyazi, K. Izadpanah**
- 18:00 Occurrence of 'Candidatus Phytoplasma mali' in apple cultivars or selections grown in Trentino (north Italy) orchards - Flavio Roberto De Salvador, M. Fischella, M. Fontanari, S. Palmieri, E. Galassi, S. Tartagni, A. Bertaccini
- Responses of six Turkish apricot cultivars to 'Candidatus Phytoplasma prunorum' under greenhouse conditions - Çiğdem Ulubas Serçe, M. Gazel, S. Yalçın, K. Çalgıyan
- Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infections - Franco Mannini
- Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control **S. Chiesa, S. Prati, Gemma Assante, D. Maffi, P.A. Bianco**
- Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques - Ivana Grubisic, P. Ruffa, D. Guizzo, G. Gambino, C. Marzachi
- Preliminary results on the evaluation of the effects of elicitors of plant resistance in chrysanthemum yellows phytoplasma infection - R. D'Amelio, N. Massa, E. Gualtero, G. D'Agostino, S. Sampa, G. Berra, F. Faoro, M. Irifi, D. Bosco, Cristina Marzachi
- 18:15 Management of pear decline caused by 'Candidatus Phytoplasma pyri' in Hungary **Sándor Sile, G. Jenser, É. Sita**
- Verification of phytoplasma presence in certified fruit tree material in Emilia Romagna region - R. Bissani, S. Boti, Marco Cardoni
- Investigation on European stone fruit yellows in experimental apricot orchards in the province of Trento (Italy) - Carlo Poggi Pollini, L. Bianchi, F. Forno, S. Franchini, L. Giunchedi, M. Gobber, L. Mattioli, P. Miorrelli, D. Pignatta, D. Profiazer, C. Ratti, N. Reggiani

Thursday November 15

Phytoplasma phylogeny and characterization I **Marina Barba & Xavier Foissac**

- 9:00 Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis and their relationships with grapevine "flavescence dorée" phytoplasmas **Luisa Filippin, J. Jović, V. Forte, T. Cvrkovic, I. Toševski, M. Borgo, E. Angelini**
- 9:15 Detection and diversity of "flavescence dorée" related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine - France **Sylvie Malembic-Maher, P. Salar, D. Vergnes, X. Foissac**
- 9:30 Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines **Nicola Fiore, S. Prodán, S. Palmieri, A. Gajardo, S. Boti, A.M. Pino, J. Montealegre, A. Bertaccini**
- 9:45 Genetic structure of *Scaphoides titanus* populations and genetic diversity of the epidemic strains of "flavescence dorée" phytoplasma: the situation in France **Daciana Papura, M. van-Helden, X. Giresse, P. Salar, J.-L. Danet, X. Foissac, S. Malembic-Maher**
- 10:00 Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey **Didem Canik, F. Ertunc**
- 10:15 Molecular investigation on the genetic polymorphism of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' detected in plum and apricot fruit trees **Luca Ferretti, G. Pasquini, G. Albanese, M. Barba**
- 10:30 *lmp* and *secY*, two new markers for MLST (MultiLocus Sequence Typing) in the 16S rRNA phytoplasma taxonomic group **Jean-Luc Danet, P. Bonnet, W. Jarausch, L. Carraro, D. Skoric, G. Labonne, X. Foissac**
- 10:45 *Coffea* break
- Phytoplasma phylogeny and characterization II **Fiona Constable & Paola Ermacora**
- 11:00 Identification of phytoplasmas belonging to aster yellows ribosomal group in vegetables in Serbia **Bogdan Duduk, A. Bulajic, N. Duduk, A. Calari, S. Palmieri, B. Krstic, A. Bertaccini**
- 11:15 Phylogenetic analysis of phytoplasmas based on sequences derived from the *secA* and 23S rDNA genes **Jennifer Hodgett, N. Harrison, R. Mumford, N. Bootham, M. Dickinson**
- 11:30 Genetic diversity of Italian and French "bois noir" phytoplasma isolates - *Gaius Pacifico*, X. Foissac, F. Veratti, C. Marzachi
- Phylogenetic relationships of sugarcane grassy shoot phytoplasma with closely related agents - Govind P. Rao, S. Srivastava, M. Singh, C. Marcone
- Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new subgroups in the clover proliferation phytoplasma group - W. Wei, L.-M. Lee, R.E. Davis, X. Sun, Yan Zhao

Epidemiology II		Gabi Krzczal & Wolfgang Jarausch	
11:45	Grapevine yellows survey in grape growing areas of four districts in Bologna province - Valerio Vicchi, P. Grillini, A.R. Babin, G. Ghermandi, R. Cornale Relationships among <i>Hyalesthes obsoletus</i> , its herbaceous host plant and "bois noir" phytoplasma strain in vineyard ecosystems in the Marche region (central-eastern Italy) - Paola Riolo, L. Landi, S. Nardi, N. Isidoro Molecular characterization of stolbur isolates collected in grapevines, weeds and insects in central and southern Italy - Graziella Pasquini, L. Ferretti, A. Gentili, B. Bagnoli, V. Cavaleri, M. Barba	14:30 Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru Matt Dickinson	
12:00	Phytoplasmas in Lebanon: characterization of 'Candidatus Phytoplasma pyri' and stolbur phytoplasma respectively associated with pear decline and grapevine "bois noir" diseases - Pascal Salar, E. Choueiri, F. Jreijri, S. El Zannar, J.-L. Danet, X. Foissac Molecular diversity in 'Candidatus Phytoplasma mali' in Lombardia - Paola Casati, A. Stern, P. Spadone, M. Calvi, D. Bulgari, P.A. Bianco, G. Belli Sequencing of the ribosomal protein gene <i>rpl16</i> from 'Candidatus Phytoplasma ulmi' infecting a historic <i>Ulmus minor</i> - G. Durante, F. Quaglino, Pier Athilio Bianco, P. Casati	14:45 Transmission of 'Candidatus Phytoplasma mali' by root bridges under natural and experimental conditions A.M. Cicotti, P.L. Bianchedi, P. Braggagna, M. Deromedi, M. Filippi, F. Forno, Luisa Mattedi	
		15:00 Research on European stone fruit yellows (ESFY) in Germany Barbara Jarausch, A. Fuchs, I. Mühlenz, I. Lampe, U. Harzer, W. Jarausch	
		14:30 Phytoplasma infected plants in Austrian forests: role as a reservoir? E. G. Borroto Fernández, A. Calari, V. Hanzer, H. Kättinger, A. Bertaccini, Margit Laimer	
		15:30 Bunchy top symptom of papaya in Cuba: new insights Yaima Arocha, B. Piñol, M. López, I. Miranda, R. Almeida, M. Wilson, P. Jones	
		15:45 The syndrome "basses richesses" of sugar beet in France is associated with different pathogen types and insect vectors A. Bressan, O. Séméty, B. Nusillard, Elisabeth Boudon-Padieu	
		16:00 Maize redness in Serbia caused by stolbur phytoplasma is transmitted by <i>Reptalus panzeri</i> Jelena Jović, T. Cvrković, M. Mitrović, S. Krnjanić, A. Petrović, M.G. Redinbaugh, R.C. Pratt, S.A. Hogenhout, I. Toševski	
		16:15 Host plant specificity of <i>Hyalesthes obsoletus</i> and consequences for "bois noir" epidemiology Michael Maixner, J. Johannesen, K. Michel, B. Lux, A. Seitz	
		16:30 Posters down	
		year Second International Phytoplasma Working Group meeting	
		20??	

Epidemiology I		Margaret Redinbaugh & Abdullah Gera	
12:15	Uneven distribution of stolbur phytoplasma in Italian grapevines as revealed by nested-PCR - F. Terlizzi, Rino Credi Incidence of "bois noir" phytoplasma in different wine-growing regions of Spain and its relation to <i>Hyalesthes obsoletus</i> - J. Sabaté, A. Laviña, J. Legorburu, J. Fortaneta, J.J. Perez de Obanos, J.L. Perez Marín, J. Reyes, Assumpció Batlle Surveys for grapevine yellows phytoplasmas in Bosnia and Herzegovina Duška Delić, G. Seljak, M. Martini, P. Ermacora, L. Carraro, A. Myrta, G. Đurić	14:30 Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru Matt Dickinson	
12:30	Detection and incidence of FD and BN phytoplasmas in vineyards of different grapevine cultivars in Serbia - S. Kuzmanovic, M. Martini, Zarko Ivanovic, D. Josic, S. Živkovic, M. Starovic Presence of <i>Scaphioideus titanus</i> on American grapevine in woodlands, and infection with "flavescence dorée" phytoplasmas - Federico Lessio, A. Alma "Flavescence dorée" in Switzerland: spread of the disease in canton of Ticino and of its insect vector, now also in cantons of Vaud and Geneva Santiago Schaefer, H. Johnston, P. Gugerli, C. Linder, L. Shaub, L. Colombi	14:45 Transmission of 'Candidatus Phytoplasma mali' by root bridges under natural and experimental conditions A.M. Cicotti, P.L. Bianchedi, P. Braggagna, M. Deromedi, M. Filippi, F. Forno, Luisa Mattedi	
12:45	Occurrence, distribution and detection of potato purple top phytoplasma disease in the Punjab (Pakistan) - Mian Muhammad Nasir, S.M. Mughal, S.M. Khan Detection of phytoplasmas in plantlets grown from different batches of seed-potatoes - Samanta Paltrinieri, A. Bertaccini Study on diverse grafting techniques for their capability in rapid and efficient transmission of apple proliferation disease to different host plants - Magid Aldaghi, S. Massart, S. Steyer, M. Lateur, M.H. Jijakli Molecular identification of phytoplasmas infecting myrtle plantations in Sardinia (Italy) - Vanda Assunta Prota, R. Garau, S. Paltrinieri, S. Botti, S. Nahdi, A. Calari, A. Sechi, A. Bertaccini	15:00 Research on European stone fruit yellows (ESFY) in Germany Barbara Jarausch, A. Fuchs, I. Mühlenz, I. Lampe, U. Harzer, W. Jarausch	
		14:30 Phytoplasma infected plants in Austrian forests: role as a reservoir? E. G. Borroto Fernández, A. Calari, V. Hanzer, H. Kättinger, A. Bertaccini, Margit Laimer	
		15:30 Bunchy top symptom of papaya in Cuba: new insights Yaima Arocha, B. Piñol, M. López, I. Miranda, R. Almeida, M. Wilson, P. Jones	
		15:45 The syndrome "basses richesses" of sugar beet in France is associated with different pathogen types and insect vectors A. Bressan, O. Séméty, B. Nusillard, Elisabeth Boudon-Padieu	
		16:00 Maize redness in Serbia caused by stolbur phytoplasma is transmitted by <i>Reptalus panzeri</i> Jelena Jović, T. Cvrković, M. Mitrović, S. Krnjanić, A. Petrović, M.G. Redinbaugh, R.C. Pratt, S.A. Hogenhout, I. Toševski	
		16:15 Host plant specificity of <i>Hyalesthes obsoletus</i> and consequences for "bois noir" epidemiology Michael Maixner, J. Johannesen, K. Michel, B. Lux, A. Seitz	
		16:30 Posters down	
		year Second International Phytoplasma Working Group meeting	
		20??	

13:00 Lunch

SCIENTIFIC COMMITTEE

- ASSUNTA BERTACCINI UNIVERSITY OF BOLOGNA
ITALY
- ALAIN BLANCHARD UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II AND INRA
BORDEAUX FRANCE
- JACQUELINE FLETCHER UNIVERSITY OF OKLAHOMA, STILLWATER, OK, USA
- XAVIER FOISSAC INRA, BORDEAUX
FRANCE
- KAREN GIBB CHARLES DARWIN UNIVERSITY, DARWIN
AUSTRALIA
- SASKIA HOGENOUT THE JOHN INNES CENTRE, NORWICH NORFOLK, UK
- BARBARA JARAUSCH ALPLANTA, NEUSTADT AN DER WEINSTRASSE
GERMANY
- WOLFGANG JARAUSCH ALPLANTA, NEUSTADT AN DER WEINSTRASSE
GERMANY
- PHIL JONES ROTHAMSTED RESEARCH, HAREPENDEN HERTS, UK
- ING MING LEE USDA, ARS, BELTSVILLE, MD
USA
- LIA LIEFTING MINISTRY OF AGRICULTURE AND FORESTRY
AUCKLAND NEW ZEALAND
- SHIGETOU NAMBA THE UNIVERSITY OF TOKYO, TOKYO
JAPAN
- PHILIS WEINTRAUB GILAT RESEARCH CENTER, D.N. NEGEV
ISRAEL

ORGANIZING COMMITTEE

Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Faculty of Agriculture

- ASSUNTA BERTACCINI
- MARIA GRAZIA BELLARDI
- ALBERTO CALARI
- BOJAN DUDUK
- SABRINE NAHDI
- SAMANTA PALTRINIERI
- CARLO POGGI POLLINI

Meeting extended abstracts will be available at: www.bulletinofinsectology.org
For further information please see: info@bulletinofinsectology.org Phone: FAX: ++39-051-2096723

See you at the Second IPWQ meeting...

... year 20??



Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines

Nicola FIORE¹, Simona PRODAN¹, Samanta PALTRINIERI², Angela GAJARDO¹, Simona BOTTI², Ana Maria PINO¹, Jaime MONTEALEGRE³, Assunta BERTACCINI²

¹Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, University of Chile

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Patologia vegetale, University of Bologna, Italy

³Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, University of Chile

Abstract

Extensive survey to detect and identify phytoplasmas associated with Chilean grapevines was performed from 2003 to 2005 sampling symptomatic or asymptomatic grapevine plants. Nested PCR amplification allow the detection of phytoplasmas in 28 out of 90 samples. RFLP analyses identified phytoplasmas as belonging to ribosomal subgroups 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrVII-A and 16SrXII-A. Cloning and sequencing of selected strains allow to detect genetic variability in 16SrXII-A strains.

Keywords: Phytoplasmas, grapevine yellows, nested-PCR, RFLP, sequencing.

Introduction

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is widely cultivated in Chile and visual detection of yellows symptoms was reported (Caudwell, 1988). More recently, plants with symptoms of grapevine yellows (GY) in both table and wine grape varieties were observed and preliminary phytoplasma identification was reported (Gajardo *et al.*, 2003). Further studies carried out on selected phytoplasmas allow to verify the presence of genetic variability in 16S ribosomal gene of Chilean grapevine strains (Bertaccini *et al.*, 2004).

To identify phytoplasmas present in symptomatic and/or asymptomatic grapevines, surveys were intensified in five regions of Chile (Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana de Santiago, Libertador General Bernardo O'Higgins, Maule), where the main grapevine production is concentrated.

Materials and methods

The optimal time-window to visualize yellows in Chile is from the end of January to middle of May. Samples from 90 symptomatic or asymptomatic grapevine plants belonging to table grape: Autumn Royal, Thompson Seedless, Crimson Seedless, and wine grape: Chardonnay, Petit Syrah, Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère were collected from summer 2003 to summer/fall 2005. Samples consist of branches with mature leaves, from which both leaf mid-ribs and phloem were quickly separated, tissues that are then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Total nucleic acids were extracted from 1 g of mixture of main leaf midribs and phloem tissues (Prince *et al.* 1993), dissolved in Tris-EDTA pH 8 buffer, and maintained at 4 °C; 20 ng/μl of nucleic acid were used for amplification.

After direct PCR with primer pair P1/P7, nested PCR with R16F2n/R2 primers (Gundersen and Lee, 1996) or

F1/B6 (Duduk *et al.*, 2004) was performed. Further nested PCR were performed with R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995) and 16R_{758p}/16S_{1232r} (Gibb *et al.*, 1995) primer pairs. PCR and nested PCR reactions were carried out following published protocol (Schaff *et al.*, 1992). Identification of detected phytoplasmas was done using RFLP analyses on amplified ribosomal DNA fragments with *TruI*, *RsaI*, *HhaI*, *Tsp509I*, *TaqI*, *AluI* (Fermentas, MBI, Vilnius, Lithuania) restriction enzymes.

Selected F1/B6, R16F2/R2 and R16(I)F1/R1 amplicons from the diverse phytoplasmas identified after RFLP analyses were purified using Concert Rapid PCR Purification System (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). DNA fragments were ligated into T/A cloning vector pTZ57R/T following the instructions of the InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, MBI, Vilnius, Lithuania). Putative recombinant clones were analysed by colony-PCR, sometimes in combination with the insert-specific primers. Amplicons obtained from 5 colonies per cloned fragment were subjected to RFLP analyses, as described above. Selected fragments from cloned DNAs were sequenced in both directions using the BIG DYE sequencing terminator kit (PE Biosystems, Warrington, UK). The sequences were then aligned with BLAST engine for local alignment (version Blast N 2.2.12).

Results and discussion

Positive results were obtained only after nested amplification on P1/P7. Among the 90 samples tested 28 resulted infected by phytoplasmas. The R16F2n/R2, R16(I)F1/R1 and/or 16R_{758p}/16S_{1232r} nested PCR products were subjected to RFLP analysis that allow the assignment of phytoplasmas to different ribosomal subgroups: 16SrI-B (related to Aster yellows), 16SrI-C (related to Clover Phyllody), 16SrVII-A (related to Ash yellows) and 16SrXII-A (related to Stolbur). In particular 16SrXII-A phytoplasmas were identified in 10 sam-

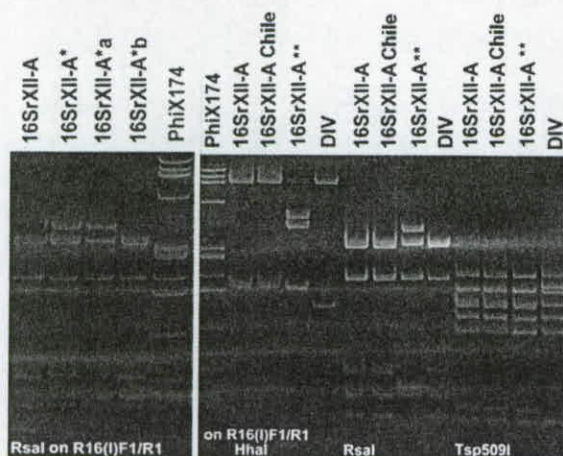


Figure 1. RFLP profiles of phytoplasmas 16SrXII-A from Chilean grapevines. Controls: 16SrXII-A; DIV, *Diplotaxis virescence* (16SrI-B).

ples, 16SrXII-A and 16SrI-B were present in mixed infection in 1 sample, 16SrVII-A was detected in 8 samples, and mixed infection of 16SrI and VII-A (2 samples) and 16SrI-B and 16SrVII-A (1 sample), group 16SrI was also identified in 4 samples. A Chilean isolate referred after RFLP to 16SrXII-A was sequenced and deposited in GenBank (DQ177148).

In one further sample a *RsaI* variability in the RFLP profile of R16(I)F1/R1 was observed; molecular variability was also present in different cloned fragments from the same PCR product. After RFLP with *RsaI*, *HhaI*, *TruI*, and *Tsp509I*, two molecular 16SrDNA variants were identified, revealing that the new profile was a mixed population of two phytoplasmas named 16SrXII-A*a and 16SrXII-A*b (figure 1). After sequencing both phytoplasmas showed 98% of homology with phytoplasma AF248959 clone STOL11 (16SrXII-A). They were submitted to GenBank with the accession code AY739654 and AY739653. A last positive sample, named 16SrXII-A**, collected in the same vineyard as the previous one, showed *HhaI* and *RsaI* variability (figure 1). Sequencing of relevant strains from ribosomal subgroup 16SrI-B (AY741532 and DQ177149) and 16SrVII-A (AY741531, DQ194355 and DQ232752) showed respectively 99-100% homology with 16SrI-B phytoplasma sequences world wide from different hosts, and 97-99% similarity with Ash yellows strains from USA, Colombia, Argentina and Brazil in different hosts.

During the extensive survey performed no evidence of "flavescence dorée" was verified; 16SrXII-A phytoplasmas are worldwide spread in viticultural areas therefore their detection in Chilean grapevine was not unexpected, however the presence of variability in the 16Sr gene was never reported before for this phytoplasma (Bertaccini *et al.*, 2006). The finding of 16SrVII-A phytoplasmas is new for grapevine while the phytoplasma appear to be mainly detected in America

areas in different host species. The 16SrI-B and 16SrIC phytoplasmas were already reported in some vineyards in Italy where no clear relationship with symptoms was determined. There is no evidence of epidemic spreading of yellows symptoms in the surveyed vineyards, however survey to verify presence and identity of insect vectors or potential vectors are in progress.

Acknowledgements

This research was financed by Fundación para la Innovación Agraria (FIA), proyect BIOT-BID-PI-C-2001-1-A-013.

References

- BERTACCINI A., BOTTI S., FIORE N., GAJARDO A., MONTEALEGRE J., 2004.- Identification of a new phytoplasma(s) infecting grapevine with yellows in Chile, pp. 63-64. In: *15th Congress of IOM*, July 11-16, 2004, Athens Georgia, USA.
- BERTACCINI A., PALTRINIERI S., BOTTI S., DUDUK B., FIORE N., KOLBER M., SKORIC D., TORRES E., CONTI M., 2006.- Diversity of 16SrXII phytoplasmas detected in grapevine growing areas worldwide, pp. 88-89. In: *15th Meeting of the ICVG*, April 3-7, 2006, Stellenbosch, South Africa.
- CAUDWELL A., 1988.- Bois noir and Vergelbungkrankheit. Other grapevine yellows, pp. 46-47. In *Compendium of grape diseases*. (PEARSON R.C., GOHEEN A.C., Eds).- American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- DUDUK B., BOTTI S., IVANOVIĆ M., KRSTIĆ B., DUKIĆ N., BERTACCINI A., 2004.- Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia.- *Journal of Phytopathology*, 152: 575-579.
- GAJARDO A., BOTTI S., MONTEALEGRE J., FIORE N., BERTACCINI A., 2003.- Survey on phytoplasmas identified in Chilean grapevines, pp. 85-86. In: *14th Meeting of the ICVG*, September 12-17, 2003, Locorotondo (BA), Italy.
- GIBBS K. S., PADOVAN A. C., MOGEN B. A., 1995.- Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other species growing in Northern Australia.- *Phytopathology*, 85: 169-174.
- GUNDERSEN D. E., LEE I.-M., 1996.- Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs.- *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- LEE I.-M., BERTACCINI A., VIBIO M., GUNDERSEN D. E., 1995.- Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy.- *Phytopathology*, 85: 728-735.
- PRINCE J. P., DAVIS R. E., WOLF T. K., LEE I.-M., MOGEN B. D., DALLY E. L., BERTACCINI A., CREDI R., BARBA M., 1993.- Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows MLOs.- *Phytopathology*, 83: 1130-1137.
- SCHAFF D. A., LEE I.-M., DAVIS R. E., 1992.- Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions.- *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 186: 1503-1509.

Corresponding author: Nicola FIORE (nfiore@uchile.cl). University of Chile, Avenida Santa Rosa, 11315 la Pintana, Santiago, Chile.

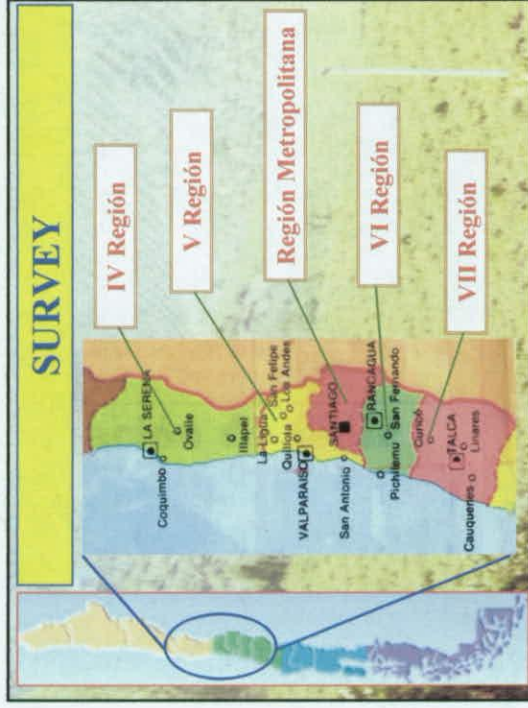
Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines

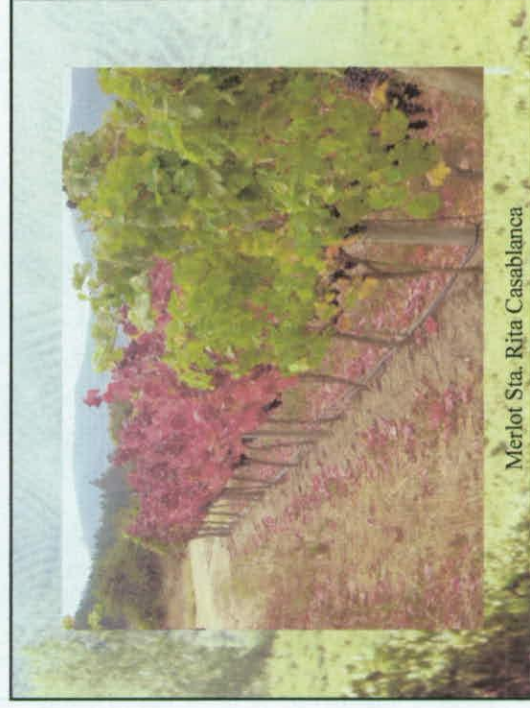
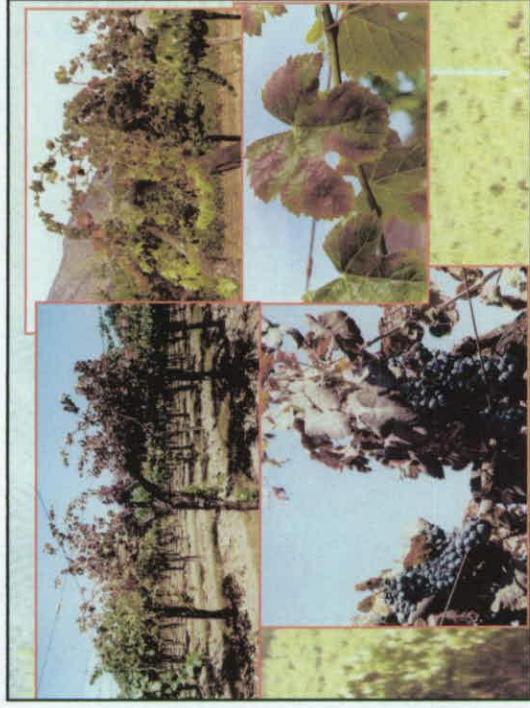
N. FIORE, S. PRODAN, S. PALTRINIERI, A.
GAJARDO, S. BOTTI, A.M. PINO, J.
MONTEALEGRE, A. BERTACCINI

University of Chile, Santiago, Chile

DISTA, Plant Pathology, Alma Mater Studiorum, University of
Bologna, Italy

Proyecto FIA BIOT 01-A-013







Pinot noir Sta Rita Casablanca



Pinot noir Casablanca CyT



Petit-Syrah

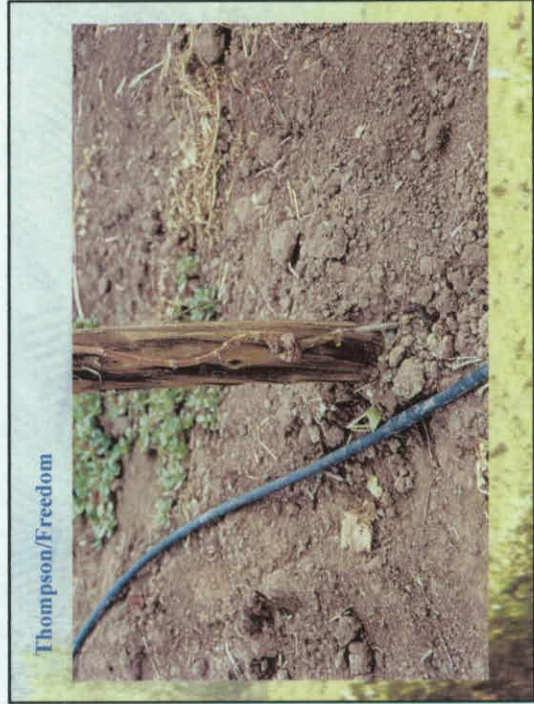
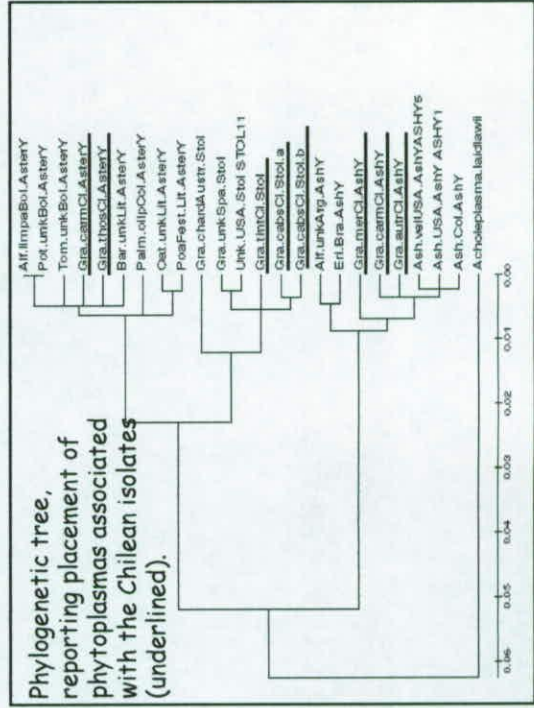


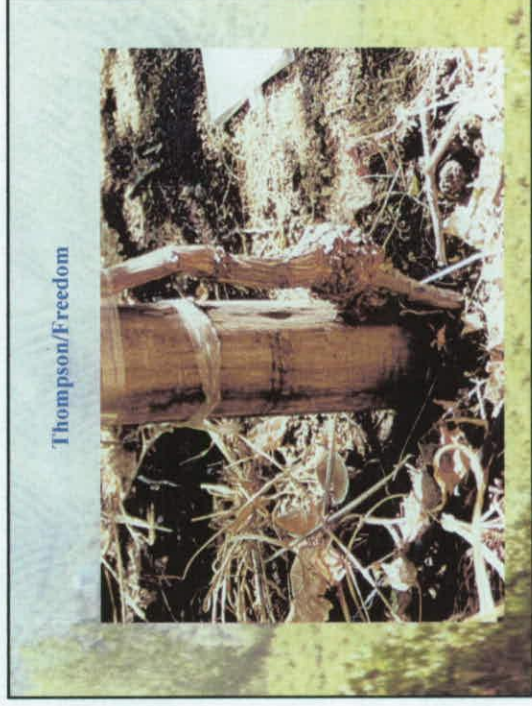
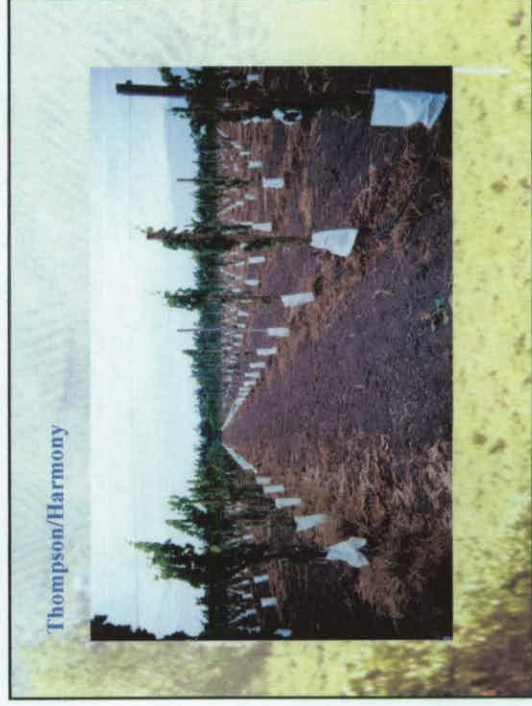
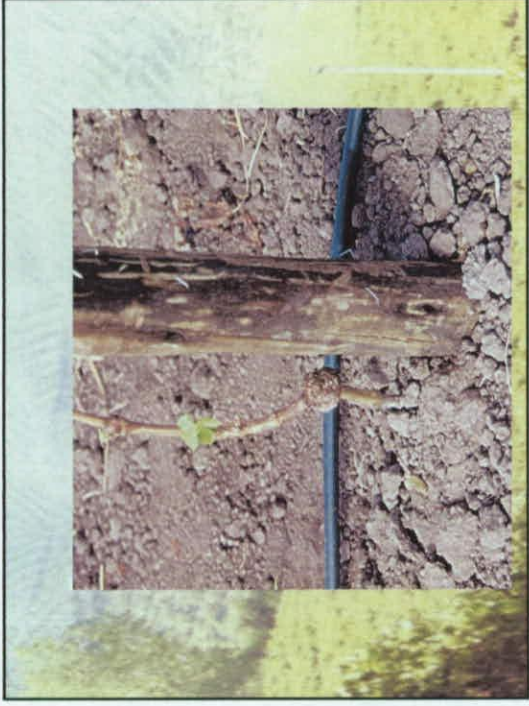
Merlot



Phytoplasmas detected in grapevine in the world. In red results originated with this work.

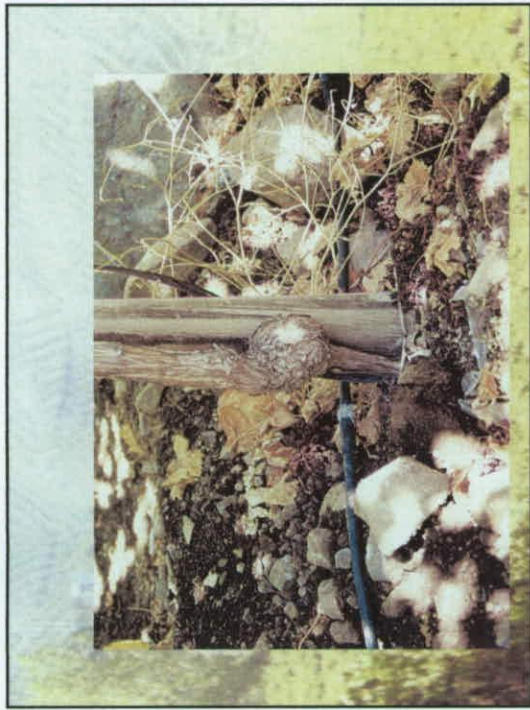
16SrI (Aster yellows group)	16SrI-A
Tomato big bud (EEU:Virginia)	16SrI-B
Aster yellows (Italia, Chile)	16SrI-C
Clover phyllody (Italia, Chile)	
16SrII (Peanut witches' broom)	
Sweet potato little leaf (Australia)	16SrII-D
16SrIII (X-disease group)	16SrIII-J
Virginian Grapevine yellows (EEU)	
16SrIV (Elm yellows group)	16SrIV-A
Elm yellows (Alemania, Italia)	16SrIV-C
Flavescencia dorada (Francia, España, Norte de Italia, Serbia)	y 16SrIV-D
16SrVII (Ash yellows group)	16SrVII-A
Ca. Phytoplasma fraxini (Chile)	
16SrX (Apple proliferation group)	16SrX-B
European stone fruit yellows (Hungria, Serbia)	
16SrXII (Stolbur group)	16SrXII-A
Madera Negra (U. Europea, Croacia, Serbia, Israel, Chile)	16SrXII-B
Ca. Phytoplasma australiense (Australia)	16SrXII-C?
Grapevine yellows (Chile)	





Thompson/Harmony

Thompson/Freedom

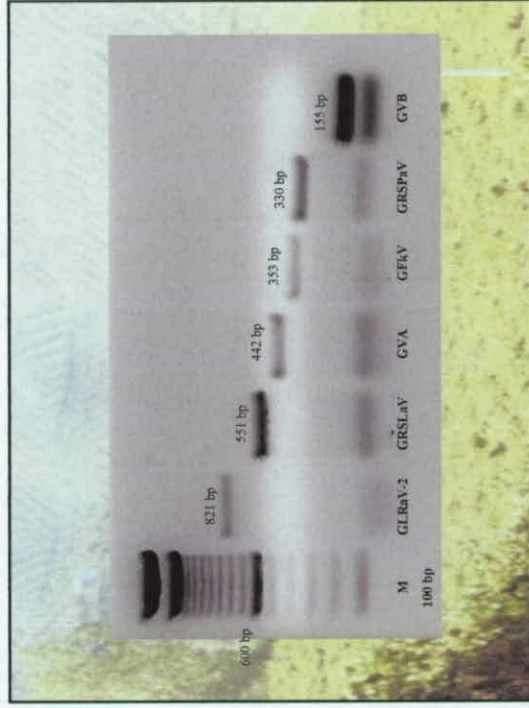


ELISA ASSAYS

DAS-ELISA:	DASI-ELISA:
GFLV	GVB
GLRaV-1, 2 and 3	GFKV
ToRSV	
SLRSV	
ArMV	
GVA	

RT-PCR ASSAYS

GRSPaV:			
48d / 49d	Zhang <i>et al.</i> , 1998		330nt
GRSLaV:			
RGHSP227V / 777C	Rowhani <i>et al.</i> , 2000		551nt
GLRaV-2			
LRaV-2(1) / (2)	Abou-Ghanem <i>et al.</i> , 1998		821nt
GVA			
H587 / C995	Minafra and Hadidi, 1992		442nt
GVB			
H28 / B-Bo	Minafra and Hadidi, 1992		155nt
GFRV			
L630 / U279	Shi <i>et al.</i> , 2000		353nt

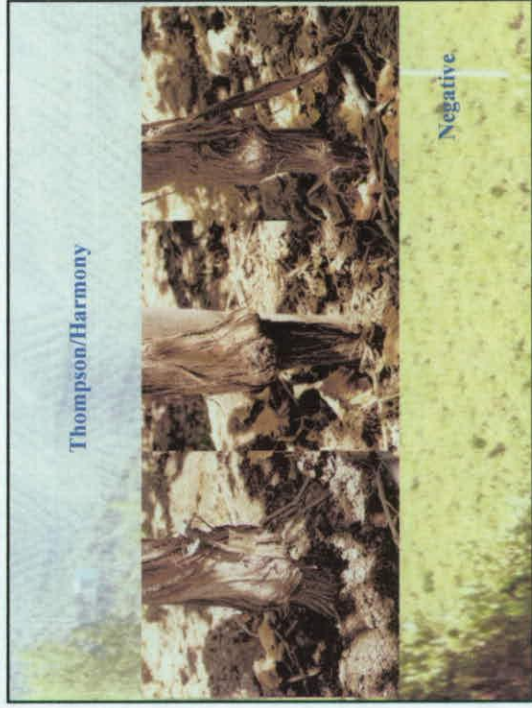
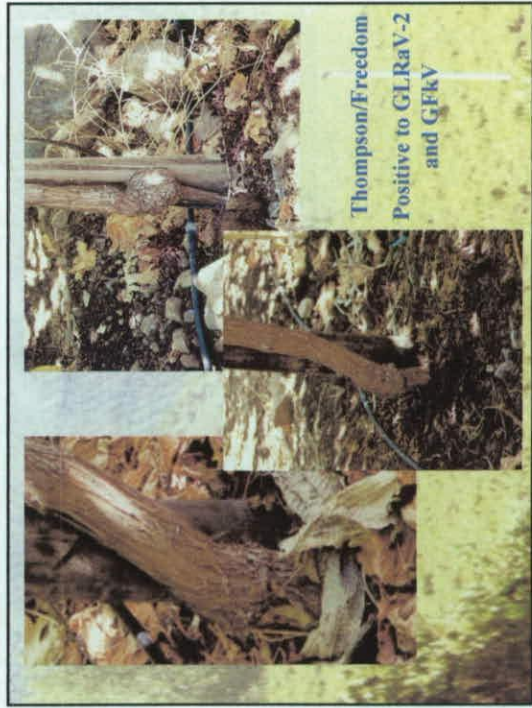
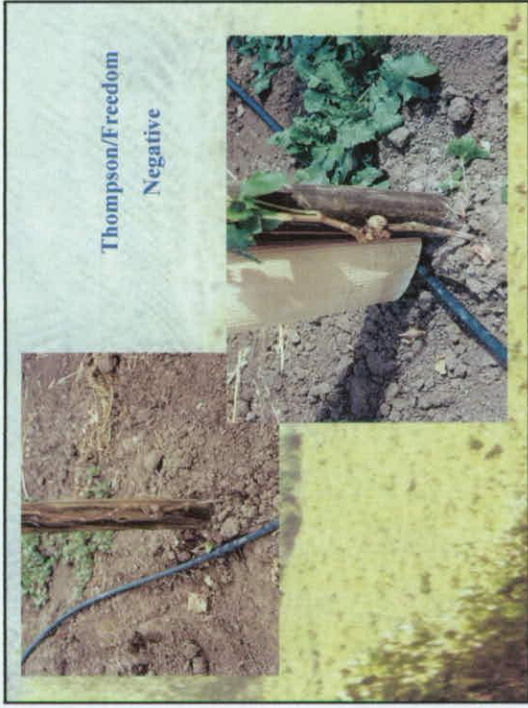
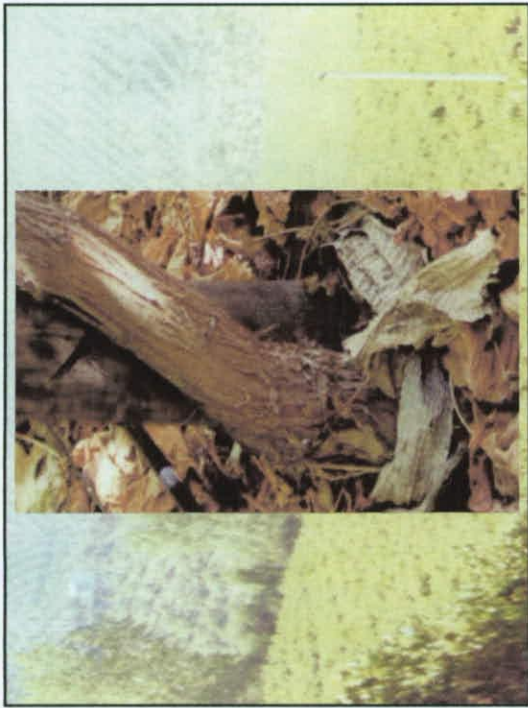


Results of RT-PCR assay

Scion/ Rootstock	N° plants analyzed	%	% plants positive to different viruses			
			GLRaV-2	GFRV	GVA	GRSLaV
Thompson /Freedom	20	65.0	65.0	60.0	0.0	5.0
with symptoms	17	58.8	58.8	58.8	0.0	0.0
Thompson/ Harmony	16	56.3	25.0	31.2	18.7	0.0
with symptoms	13	46.2	23.0	56.8	15.4	0.0
with symptoms						

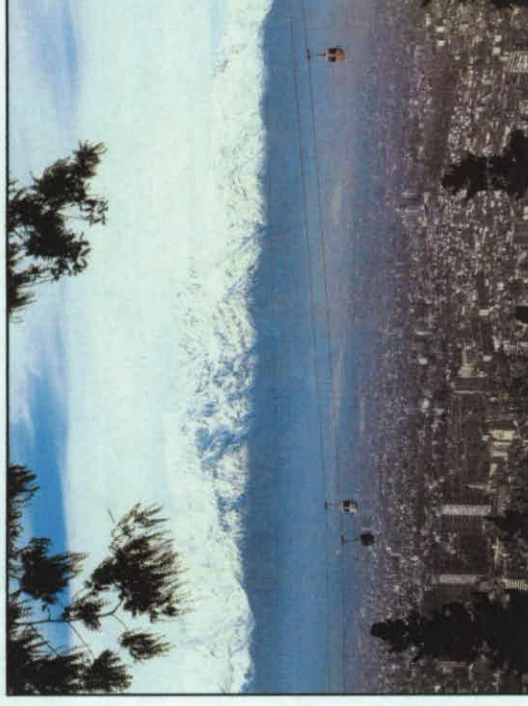
Thompson/Freedom





CONCLUSIONS

- GVB, GVA, GLRaV-2, GFkV, GRSPaV and GRSLaV not responsible
- Improve grafting techniques and management of plants in vineyards
- Further studies are necessary to clarify the origin of grapevine decline



SURVEY OF GRAPEVINE VIRUSES IN CHILE

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Running title: *Grapevine viruses in Chile*

Corresponding autor: N. Fiore

Fax: +56 2 9785812

E-mail: nfiore@uchile.cl

23 SUMMARY

24 Grapevines from six Chilean regions were surveyed for virus diseases and tested for
 25 the presence of the most important viruses. ELISA testing of 2535 samples and confirmatory
 26 RT-PCR of some ELISA-negative samples from symptomatic and symptomless vines gave
 27 the following infection rates: 6.36% for *Grapevine fanleaf virus* (GFLV); 4.67% for
 28 *Grapevine leafroll associated virus 1* (GLRaV-1); 16.05% for *Grapevine leafroll associated*
 29 *virus 2* (GLRaV-2); 6.41% for *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3); 0.26% for
 30 *Grapevine leafroll associated virus 7* (GLRaV-7); 14.99% for *Grapevine fleck virus* (GFkV);
 31 5.57% for *Grapevine virus A* (GVA) and 0.78% for *Grapevine virus B* (GVB). *Strawberry*
 32 *latent ringspot virus* (SLRSV) *Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Arabidopsis mosaic virus*
 33 (ArMV) were not detected. Overall infection in the surveyed Chilean grapevines, considering
 34 ELISA and RT-PCR, was 32.35%. Virus infection ratio obtained from ELISA analysis in the
 35 six regions, varied between 21.19% (Región Metropolitana) and 74.26% (Coquimbo). RT-
 36 PCR was used for detection of the Red Globe strain of GLRaV-2 and *Grapevine rupestris*
 37 *stem pitting associated virus* (GRSPaV), and to confirm and extend ELISA results. GVB,
 38 GFkV, GRSPaV, GLRaV-2 RG and GLRaV-7 are new records for Chile.

39
 40 *Key words:* Chile, Grapevine viruses, detection, ELISA, RT-PCR.

41
 42
 43 In Chile, grapevines represent one of the most valuable crops, being extensively grown
 44 between Atacama (III) and Maule (VII) regions (Fig.1). The main wine grape varieties are
 45 Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère, Chardonnay, Sauvignon blanc, Syrah and Pinot
 46 noir, whereas the prevailing table grape cultivars are Thompson Seedless, Flame Seedless,
 47 Red Globe, Crimson Seedless and Superior.

48 Between 2002 and 2007, a number of vineyards of different size were repeatedly
 49 visited to assess their sanitary status, from austral hemisphere late spring until autumn
 50 (October to May) in the following regions: Atacama (III) and Coquimbo (IV) in the north,
 51 Valparaíso (V) and Metropolitana de Santiago (RM) in the center, Libertador General
 52 Bernardo O'Higgins (VI) and Maule (VII) in the south of the country (Fig. 1).

53 A total of 2535 wine and table grape vines were sampled during the whole survey
 54 period, their geographical position was established by the GPS system and the precise
 55 coordinates of sampled plants within the vineyard were recorded to facilitate identification if
 56 further sampling were required.

57 Samples were collected in autumn (April, May and June), primarily from vines that
 58 showed virus symptoms but also from apparently symptomless plants. Phloem scrapings from
 59 mature dormant canes were used for testing, to bypass the limits posed by the seasonal
 60 variation of virus concentration (Kolber *et al.*, 1985; Monis and Bestwick, 1997).

61 Samples were tested for the presence of viruses previously reported from Chile, i.e.
 62 *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus 1, 2 and 3* (GLRaV-1, -
 63 2 and -3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Grapevine virus A* (GVA), *Arabidopsis mosaic virus*
 64 (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) (Cereceda and Auger, 1979; Auger *et al.*,
 65 1994; Herrera and Madariaga, 1994, 2001; Herrera, 1996) and for viruses hitherto unrecorded
 66 in the country, i.e. the Red Globe strain of GLRaV-2, [formerly *Grapevine rootstock stem*
 67 *lesion-associated virus* (Uyemoto and Rowhani, 2001)], *Grapevine fleck virus* (GFkV),

Grapevine virus B (GVB), and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV). In 2003 – 2004, *Grapevine leafroll associated virus 7* (GLRaV-7) was included in the testing.

Not all samples were analyzed for all the above listed agents for, in certain cases, the range of viruses to be tested for was suggested by the symptoms shown by the vines.

Detection of GLRaV-1, -2, -3, GFLV, GFkV, GVA, GVB, ToRSV and ArMV was by ELISA (Clark and Adams, 1977) and complemented by RT-PCR, while detection of GRSPaV and GLRaV-2-RG was exclusively by RT-PCR. GLRaV-7 was detected only by ELISA. Two ELISA commercial kits were used: (i) Agritest (Valenzano, Bari, Italy), DAS-ELISA for GLRaV-1, -2, -3, -7, GFLV, GVA, ArMV and DASI-ELISA for GFkV and GVB; (ii) Loewe (Munich, Germany), DAS-ELISA for ToRSV and SLRSV.

Testing was done following the manufacturers' instructions except that the minimal absorbance value considered for a positive reaction was two rather than three times that of the healthy control. This limit was arbitrarily set to increase the chance of detecting mild infections. Questionable and weak reactions were, in any case, verified by RT-PCR.

Total nucleic acids (TNA) extraction was by the silica capture method (MacKenzie *et al.*, 1997; Malinovski, 1997).

TNA aliquots were primed with DNA random hexanucleotides (Roche, Basel, Switzerland) and reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega, Madison, Wisconsin, USA). Target-specific primers were C995r/H587f, H28/BB₀ and LC1/LC2 for GVA, GVB and GLRaV-3, respectively (Minafra and Hadidi, 1992); C3310/H2999 and C867/H428 for GFLV and ArMV (MacKenzie *et al.* 1997); V2dCPr1/V2dCPf2 for GLRaV-2 (Bertazzon and Angelini, 2004); GFkV-L630/GFkV-U279 for GFkV (Shi *et al.*, 2000); ToRSV-C/ToRSV-H for ToRSV (Griesbach *et al.*, 1995); 49d/48d for GRSPaV (Zhang *et al.*, 1998) and RGHSP777-R/RGJSP227-F for GLRaV-2-RG (Rowhani *et al.*, 2000).

To improve detection of GLRaV-1, the primers described by Habili *et al.* (1997) were modified based on the CP sequence of GenBank accession AF195822 (Fazeli and Rezaian, 2000), divergent nucleotides are at positions in bold/underlined: LR-1R – 5'-GTTACGGCCTTTTGTTTACTATGG – 3' antisense and LR-1F – 5'-CGACCCCTTTATTGTTTGAGTACG – 3' sense primers.

Positive controls for ELISA and RT-PCR were fresh grapevine cortical scrapings or lyophilized leaf tissues from infected plants.

During this survey, virus symptoms were frequently seen in most of the vineyards. GFLV-infected vines were less vigorous than normal, showed distorted and mottled leaves, poor fruit setting and irregular ripening and reduced size of the berries. Leafroll symptoms were frequent, especially in red-berried varieties, whereas, despite of the presence of GVA, GVB and GRSPaV, symptoms of rugose wood were rare, likely because most of the old Chilean vineyards are established with self-rooted plants. Typical vein necrosis symptoms, observed on the rootstock 110R, were associated with the presence of GRSPaV.

Graft incompatibility was observed in cv. Red Globe on 1103P infected by GLRaV-2-RG.

Viruses detected by ELISA and their distribution and occurrence in the six regions surveyed are presented in Table 1 and 2, respectively. Of 2535 ELISA-tested vines, 740 were positive for at least one virus (29.19%). Results of RT-PCR assays are in Table 3 which, however, does not include the outcome of a number of tests that confirmed consistently the presence of GFLV, GLRaV-1, -2, -3, GVA, GFkV and GVB in ELISA-positive samples.

Of the three nepoviruses (GFLV, ArMV, ToRSV) looked for, GFLV had an average infection rate of 6.08% (Tab. 1). This virus occurred in all regions surveyed (Tab. 2) with a

prevalence in the Region Metropolitana de Santiago, where the highest infections rate was detected (9.27%), followed by Coquimbo (7.35%), then, in decreasing order, by Atacama (5.00%), Valparaiso (4.37%), Libertador General Bernardo O'Higgins (3.27%) and Maule (1.05%). The wide distribution of this virus probably reflects both the frequent soil infestation by *Xiphinema index* in all viticultural areas of the country (Aballay *et al.*, 1998) and the high GFLV inoculum reservoir represented by the traditional vineyards from the Central Zone. GFLV was detected in *X. index* by RT-PCR in Región Metropolitana (data not shown).

Because of the previously reported presence in Chile of ToRSV in grapevines and of *X. americanum sensu lato* (Lamberti *et al.*, 1988; Aballay *et al.*, 2001; Insunza *et al.*, 2001) a substantial presence of this virus was expected. This, however, was not the case, for only seven samples gave a weak and questionable ELISA reaction, which was not confirmed by RT-PCR. Furthermore, 213 samples ELISA-negative for ToRSV remained negative in RT-PCR assays (Tab. 3). Since these results did not confirm those of previous investigations (Herrera and Madariaga, 2001), the seven samples weakly ELISA-positive for ToRSV were re-assayed several times by ELISA and RT-PCR in different seasons, proving consistently free from this virus. This was taken as convincing evidence that no ToRSV was present in any of the 908 vines examined for this virus in our survey.

A comparable situation was encountered with ArMV, for only 2 of 775 vines tested by ELISA gave a reading close to the minimal level of absorbance value considered in this work, but the presence of this virus was not confirmed by RT-PCR, and it was not found in further 156 samples ELISA-negative for ArMV. It is therefore plausible to conclude that ArMV does not represent a problem for the Chilean grapevine industry, also because its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum*, does not seem to occur in the country (Gonzales, 1970, 1984; Magunacelaya, 1996).

No evidence was obtained for the presence of the sadwavirus SLRSV, another *X. diversicaudatum* - transmitted pathogen, in any of the 360 vines assayed by ELISA.

ELISA detection of GLRaV-2 was 14.84%. RT-PCR was performed on 194 ELISA-negative samples, using universal GLRaV-2 primer set (Bertazzon and Angelini, 2004) and more than 15% were successfully amplified (Tab. 3).

As to the distribution of GLRaV-2 in the territory (Tab. 2), the highest infection level was found in Coquimbo (43.38%) followed by Atacama (32.5%), Valparaiso (27.37%), Maule (20.22%), Libertador General Bernardo O'Higgins (9.72%) and Región Metropolitana (9.49%).

Infections by GFkV accounted for 14.37% (Tab.1), with a prevalence in Coquimbo (35.29%), followed by Maule (22.47%), Valparaiso (21.58%), Libertador General Bernardo O'Higgins (15.89%), Atacama (11.54%) and Region Metropolitana (7.91%).

GVA showed a moderate level of infection (5.08%) in the whole territory, its incidence being high in Coquimbo (25%), moderate in Atacama, Valparaiso and Maule (10, 9.97 and 8.99%, respectively) and little significant in Libertador General Bernardo O'Higgins (3.22%) and Región Metropolitana (1.31%).

A relatively low level of global infection by GLRaV-3 (6.17%) and GLRaV-1 (4.08%) was detected by serology. Coquimbo was the region with the highest infection levels (13.97 for GLRaV-3 and 12.50% for GLRaV-1) followed by Maule (8.99 for GLRaV-3 and 7.86% for GLRaV-1). Other regions had lower infection levels, not exceeding 8.38% (GLRaV-3) and 6.98% (GLRaV-1) (Tab. 2).

The single plant infected by GLRaV-7 out of 387 tested was in Coquimbo. This is not a surprising finding, for this virus is relatively rare being more common in eastern than in

western Mediterranean (Digiario *et al.*, 1999) and was only recently recorded from a few varieties in California (Morales and Monis, 2007).

A low number of plants infected by GVB were detected by ELISA, the global infection level being 0.72%, a figure confirmed by RT-PCR, since only one positive was found out of 129 ELISA-negative samples. GVB highest level of infection (4.41%) was in Coquimbo (Tab. 2).

As shown in Tab. 4, GRSPaV was detected in 57 of 236 vines (24.15%). Infections by GRSPaV in Chile most probably originate from propagating material because no natural vector is known, and the experimentally proven presence of the virus in the pollen of *Vitis rupestris* plants and its transmission through seeds (Rowhani *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2006) may not be significant in *V. vinifera*. GRSPaV alone induces mild or no rugose wood symptoms and some of its strains are latent in *V. rupestris* (Meng *et al.*, 1998). Mixed infection with other viruses (e.g. GVA) may be required for rugose wood symptoms to occur (Bonfiglioli *et al.*, 1998). This means that vines latently infected by GRSPaV may develop the disease if other viruses are transmitted via grafting or vectors (Gribaudo *et al.*, 2006).

To assay for GLRaV-2-RG specific primers were used, since no serological discrimination from GLRaV-2 type strain (GLRaV-2-TS) is possible. Of 72 samples positive for GLRaV-2-TS by ELISA, 13 proved to be GLRaV-2-RG, and of 108 samples ELISA-negative for GLRaV-2-TS, seven were positive for GLRaV-2-RG (Tab. 4). In four samples, both GLRaV-2 variants were present, indicating that mixed field infections are possible, but not frequent.

GLRaV-2-TS and its variant GLRaV-2-RG were shown to be responsible of graft-incompatibility in grapevines (Greif *et al.*, 1995; Uyemoto *et al.*, 2001), as determined by the type of rootstock (Pirolo *et al.*, 2006). Rootstocks are normally used nowadays in Chile, especially for replants, which makes certification of rootstocks, in addition to scions, of paramount importance to prevent young vine decline problems in new plantings.

A severe disease condition was recently observed in Chilean vineyards of cv. Crimson Seedless, whose bunches were unmarketable because of the pale color and low sugar content. It was ascertained that diseased vines were infected by GLRaV-1, -2 and -3 (Digiario *et al.*, 2006). Further examples of mixed infections were registered in the course of the present survey, the most frequent association being between GLRaV-2 and GFkV. However, combinations of two, three, four and even five different viruses were found, involving practically all detected viruses.

The highest level of infection of Chilean vines was by GLRaV-2, closely followed by GFkV. Since both viruses are disseminated by propagating material (Martelli and Boudon Padieu, 2006), their widespread occurrence is taken as an indication that grape nurseries are not producing plants free from these viruses. A similar conclusion may be drawn with reference to GLRaV-1, GLRaV-3, GVA and GVB, whose primary inoculum originates from commercial stocks, but whose subsequent spread at a site is likely to be mediated by pseudococcid mealybugs like *Pseudococcus viburni*, *Ps. longispinus* and *Planococcus ficus* (Martelli and Boudon Padieu, 2006), which are known to occur in Chile (Gonzales and Volosky, 2006).

In conclusion, this survey has determined that seven viruses, i.e. GFLV, GLRaV-1, -2, -3, GVA, GFkV and GRSPaV, are most frequent in Chilean grapevines. All these viruses should be taken into consideration if a national certification program for the production and marketing of sanitarily improved grapevine propagative material will be implemented, as it appears highly desirable. GVB, although less represented in the field, is no less dangerous than the other viruses. Thus, its addition to the proscription list is recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

Grateful thanks are expressed to Professor G.P. Martelli for his helpful suggestions and critical reading of the manuscript. This work was financed by Fundación para la Innovación Agraria (FIA), project BIOT-BID-PI-C-2001-1-A-013.

REFERENCES

- Aballay E., Benavides F., Vieira A., 1998. Resistance of some grapevine rootstocks to a Chilean population of *Xiphinema index*. *Nematologia Mediterranea* **26**: 185-188.
- Aballay E., Flores P., Insunza V., 2001. Nematicidal effect of eight plant species on *Xiphinema americanum sensus lato* in *Vitis vinifera*, var. Cabernet Sauvignon in Chile. *Nematropica* **31**: 95-102.
- Auger J., Aballay E., Pinto M., Pastenes C., 1994. Efectos del virus de la hoja en abanico VHA en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson Seedless. *Aconex* **46**: 20-23.
- Bertazzon N., Angelini E., 2004. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. *Journal of Plant Pathology* **86**: 283-290
- Bonfiglioli R.G., Habili N., Green M., Schliefert L.F., Symons R.H., 1998. The hidden problem – Rugose wood associated viruses in Australian viticulture. *Australian Grapegrower and Winemaker* **420**: 9-13
- Cereceda, C., Auger J., 1979. Aislamiento y caracterización del virus Mosaico Amarillo de la vid (*Vitis vinifera*, cv. Semillon) presente en Chile. *Investigación Agrícola* **5**: 15-16.
- Clarck M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475-483.
- Digiario M., Martelli G.P., Savino, V., 1999. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East: a synopsis. *Options Méditerranéennes, Ser. B Studies and Research* **29**: 83-92.
- Digiario M., Fiore N., Tarricone L., Prodan S., Elbeaino T. 2006. Influence of viruses on the performance and quality of cv. Crimson Seedless. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 186-188.
- Fazeli C.F., Rezaian, M.A. 2000. Nucleotide sequence and organization of ten open reading

frames in the genome of *grapevine leafroll-associated virus 1* and identification of three subgenomic RNAs. *Journal of General Virology* **81**: 605-615.

Gonzales R.H. 1970. Nuevas especies de nematodos que atacan a la vid en Chile. *Agricultura Tecnica* **30**: 31-37.

Gonzales R.H. 1984. Diagnostico nematologico en parronales de San Felipe y Los Andes. *Revista Fruticola* **4**: 94-98.

Gonzales R.H., Volosky C., 2006. Seasonal and management strategies for mealybugs, *Pseudococcus* spp., in pomefruits, table and wine grapes (Hemiptera: Pseudococcidae). *Fruticola* **27**: 37-47

Greif C., Garau R., Boscia D., Prota V.A., Fiori, M. Bass, P. Walter, B., Prota, U. 1995. The relationship of *grapevine leafroll-associated closterovirus 2* with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* **34**: 167-173.

Gribaudo I., Gambino G., Cuozzo D., Manzini F., 2006. Attempts to eliminate *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine clones. *Journal of Plant Pathology* **88**: 293-298.

Griesbach, J.A., 1995. Detection of *Tomato ringspot virus* by polymerase chain reaction. *Plant Disease* **79**: 1054-1056.

Habili N., Fazeli C., Rezaian M.A., 1997. Identification of a cDNA clone specific to *Grapevine leafroll-associated virus 1*, and occurence of the virus in Australia. *Plant Pathology* **46**: 516-522.

Herrera G., Madariaga M., 1994. Deteccion de los virus *Tomato ringspot virus* y *Arabis mosaic virus* en vides en Chile. *Fitopatologia* **44**: 42-44.

Herrera G., 1996. Panorama de enfermedades causadas por virus en frutales de carozo, pomaceas y vides. *Simiente* **66**: 35-36.

Herrera G., Madariaga M., 2001. Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* **61**: 393-400.

Insunza V., Aballay E., Macaya J., 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plants extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematropica* **31**: 47-54.

Kolber M., Beczner L., Pacsa S., Lehoczy, J., 1985, Detection of *Grapevine chrome mosaic virus* in field grown vines by ELISA. *Phytopathologia Mediterranea* **24**: 135-140.

Lamberti F., Roca F., Agostinelli A. 1988. On the identity of *Xiphinema americanum* in Chile

with a key to the *Xiphinema* species occurring in Chile. *Nematologia Mediterranea* **16**: 67-68.

Lima M.F., Rosa C., Molino D.A., Rowhani A., 2006. Detection of *Rupestris stem pitting associated virus* in seedlings of virus-infected maternal plants. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 244-245.

Magunacelaya J.C., 1996. Nematodos vectores de virus. In: Esterio M., Magunacelaya J.C. (eds.) *Avances en Sanidad Vegetal de Frutales y Vides*, pp. 147-153. Universidad de Chile, Fac. Cs. Agr. y For., Santiago, Chile.

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

Malinovski T., 1997. Silicacapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): Application for the detection of several plant viruses. In: Dehne H.W. (ed.) *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*, pp. 444-448. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Martelli G.P., Boudon-Padieu B., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. *Options Méditerranéennes Ser. B, Studies and Research* **55**: 7-201

Meng B., Pang S.Z., Forsline P.L., McFerson J.R., Gonsalves, D., 1998. Nucleotide sequence and genome structure of *Rupestris stem pitting-associated virus* 1 reveals similarities to *Apple stem pitting virus*. *Journal of General Virology* **79**: 2059-2069.

Minafra A., Hadidi A., 1992. Sensitive detection of Grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* **47**: 175-188

Monis J., Bestwick R.K., 1997. Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. *Plant Disease* **81**: 802-808.

Morales R.Z., Monis J., 2007. First detection of Grapevine leafroll-associated virus 7 in California vineyards. *Plant Disease* **91**: 465.

Pirola C., Boscia D., La Notte P., Campanale A., Savino V., Martelli G.P. 2006. Further evidence of the involvement of *Grapevine leafroll associated virus* 2 in graft incompatibility. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 242-243

Rowhani A., Zhang Y.P., Golino D. A., Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. *Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide 2000*: 82.

346 Shi B.J., Habili N., Symons R.H., 2000. *Grapevine fleck virus*: large sequence variation in a
347 small region of the genome. *Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide*
348 *2000*: 78.

349
350 Uyemoto J.K., Rowhani A., Luvisi D., Krag R. 2001. New closterovirus in Red Globe grape
351 causes decline of grafted plants. *California Agriculture* **55 (4)**: 28-31.

352
353 Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Golino D.A., Rowhani A., 1998. Nucleotide sequence and RT-
354 PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem pitting disease.
355 *Phytopathology* **88**: 1231-1237.

356
357
358
359 Received September 11, 2007

360 Accepted October 18, 2007

361 Caption to the figure
362
363

364 **Fig. 1.** Map of Chile showing the regions where grapevines were surveyed for the presence of
365 the most economically important viruses. III: Región Atacama; IV: Región Coquimbo; V:
366 Región Valparaíso; VI: Región Libertador General Bernardo O'Higgins; VII: Región Maule;
367 RM: Región Metropolitana.
368

Figure 1.

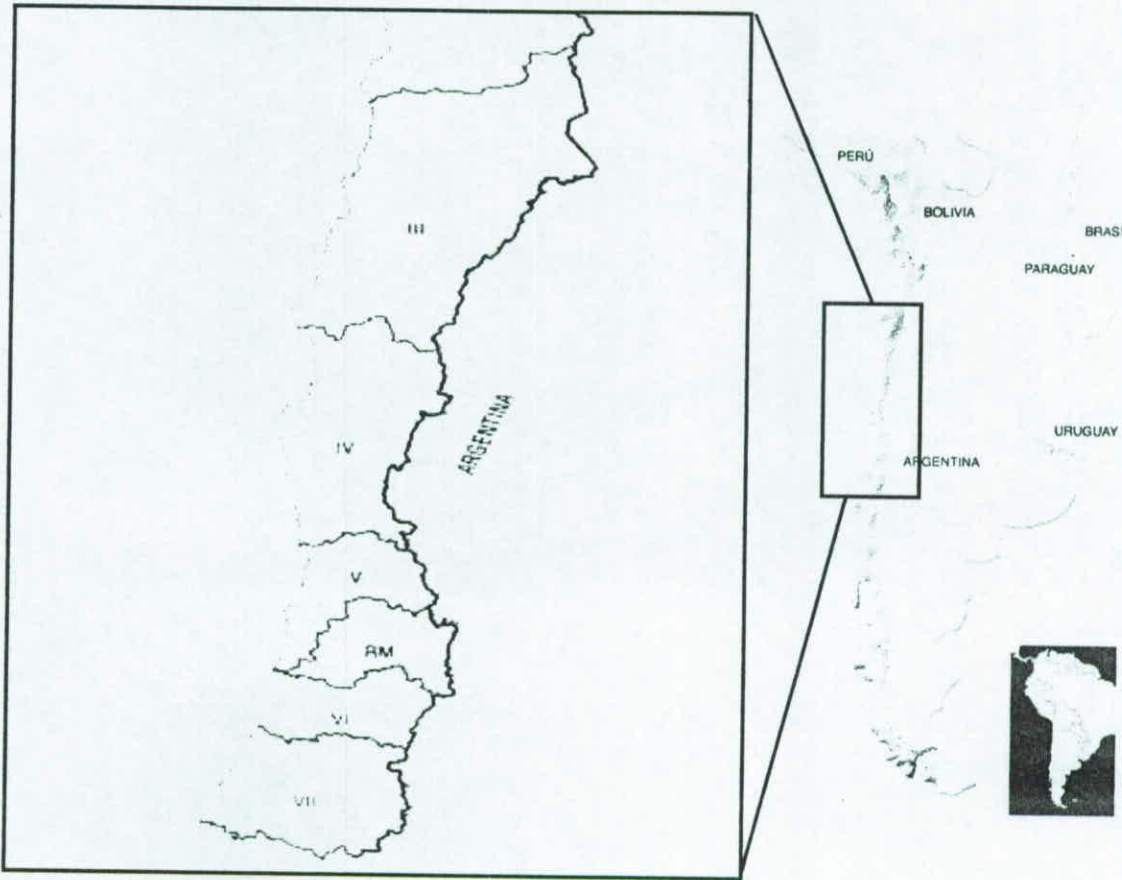


Table 1. Results of virus testing by ELISA

Virus ^a	Samples tested (No.)	Positive samples (No.)	Positive samples (%)
GFLV	2171	132	6.08
GLRaV-1	2181	89	4.08
GLRaV-2	2479	368	14.84
GLRaV-3	2170	134	6.17
GLRaV-7	387	1	0.26
GFkV	2254	324	14.37
GVA	2261	115	5.08
GVB	2064	15	0.72
ToRSV	908	0	0
ArMV	775	0	0
SLRSV	360	0	0
Overall infection	2535	740	29.19

^a GFLV = *Grapevine fanleaf virus*; GLRaV-1 to -7 = Grapevine leafroll associated viruses; GFkV = *Grapevine fleck virus*; GVA = *Grapevine virus A*; GVB = *Grapevine virus B*; ToRSV = *Tomato ringspot virus*; ArMV = *Arabis mosaic virus*; SLRSV = *Strawberry latent ringspot virus*.

379
380

Table 2. Regional distribution of the seven most important viruses detected in Chile based on ELISA results.

Region	Viruses ^a							Overall infection ^b
	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GFKV	GVA	GVB	
Atacama	2/40 (5.00%)	2/40 (5.00%)	13/40 (32.50%)	1/40 (2.50%)	3/26 (11.54%)	4/40 (10.00%)	0/26 (0%)	19/40 (47.50%)
Coquimbo	10/136 (7.35%)	17/136 (12.50%)	59/136 (43.38%)	19/136 (13.97%)	48/136 (35.29%)	34/136 (25.00%)	6/136 (4.41%)	101/136 (74.26%)
Valparaíso	15/343 (4.37%)	25/358 (6.98%)	104/380 (27.37%)	30/358 (8.38%)	82/380 (21.58%)	37/371 (9.97%)	8/361 (2.21%)	155/384 (40.36%)
Metropolitana	82/884 (9.27%)	14/882 (1.58%)	108/1137 (9.49%)	40/881 (4.54%)	82/1063 (7.91%)	14/1068 (1.31%)	0/991 (0%)	249/1175 (21.19%)
Libertador General Bernardo O'Higgins	22/673 (3.27%)	24/676 (3.55%)	66/697 (9.72%)	36/667 (5.39%)	89/560 (15.89%)	18/558 (3.22%)	1/461 (0.21%)	179/705 (25.39%)
Maule	1/95 (1.05%)	7/89 (7.86%)	18/89 (20.22%)	8/89 (8.99%)	20/89 (22.47%)	8/89 (8.99%)	0/89 (0%)	37/95 (38.95%)

^a Number and percentage of positives against all analyzed samples for each virus.

^b Total number of positive samples for at least one virus against all analyzed samples for each region.

381
382
383
384

Table 3. RT-PCR results of ELISA-negative samples.

Virus	Tested samples (No.)	Positive samples (No.)
GFLV	45	6
GLRaV-1	27	13
GLRaV-2	194	30
GLRaV-3	20	5
GFkV	91	14
GVA	154	11
GVB	129	1
ToRSV	220	0
ArMV	158	0
SLRSV	n.t.	n.t.

n.t.= not tested

Table 4. RT-PCR results of the assay for GLRaV-2-RG and GRSPaV.

Virus ^a	Tested samples (No.)	Positive samples (No.)
GLRaV-2-RG	180	20
GRSPaV	236	57

^a GRSPaV = *Grapevine rupestris stem pitting associated virus*;
GLRaV-2-RG = *Grapevine leafroll associated virus 2*, Red Globe strain.

FICHAS DATOS PERSONALES

ANEXO 1.1 : FICHA DATOS PERSONALES

Ficha Representantes Legales

Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal del Agente postulante o Ejecutor.		
Nombres	Luis Antonio		
Apellido Paterno	Lizana		
Apellido Materno	Malinconi		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Decano Facultad de Ciencias Agronómica, Universidad De Chile		
Dirección (laboral)	Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	9785753		
Fax	9417055		
Celular			
Email	agrodec@uchile.cl		
Web	www. uchile.cl		
Género	Masculino	☒ X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Viña Santa Rita S.A.

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal del Agente Asociado		
Nombres	Anibal		
Apellido Paterno	Ariztia		
Apellido Materno	Reyes		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Viña Santa Rita S.A.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada ☒
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente general		
Dirección (laboral)	Avenida Apoquindo 3669 o. f601		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Las Condes, Santiago		
Fono	(2) 3622000		
Fax			
Celular			
Email			
Web			
Género	Masculino	☒	Femenino ☐
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)			

Viñedos Emiliana S.A.

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal del Agente Asociado.		
Nombres	Karel		
Apellido Paterno	Havliczek		
Apellido Materno	Paci		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Viñedos Emiliana S.A.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente de Operaciones		
Dirección (laboral)	Av.Nueva Tajamar 481, oficina 702. Las Condes		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	3539130		
Fax	2036936		
Celular	-----		
Email	karelh@emiliana.cl		
Web	www. emiliana.cl		
Género	Masculino	X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)			

Univiveros

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal de Agente Asociado.		
Nombres	Luis		
Apellido Paterno	Fernández		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Sociedad Agrícola Uniagri Copiapó LTDA. (Univiveros)		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada ☒
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente General		
Dirección (laboral)	Av. 18 de Septiembre 6578, Fundo San Miguel		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Paine		
Fono	824 13 40		
Fax			
Celular			
Email	lfernandez@univiveros.cl		
Web			
Género	Masculino	☒	Femenino ☐
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)			

Ficha Coordinadores y Equipo Técnico

Coordinador

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador Principal		
Nombres	Jaime, Rolando		
Apellido Paterno	Montealegre		
Apellido Materno	Andrade		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor asociado		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Fitopatología		
Dirección (laboral)	Avenida Santa Rosa, 11315, La Pintana		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	9785714		
Fax	9785812		
Celular	09-4894891		
E-mail	jmonteal@uchile.cl		
Web	www.uchile.cl		
Género	Masculino	☒ X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Coordinador Alterno

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador alternativo		
Nombres	Erwin		
Apellido Paterno	Aballay		
Apellido Materno	Espinoza		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor asistente		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Nematología		
Dirección (laboral)	Avenida Santa Rosa, 11315, La Pintana		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	9785821		
Fax	9785821		
Celular	09-4346229		
E-mail	eaballay@uchile.cl		
Web	www.uchile.cl		
Género	Masculino	☒ X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Equipo técnico

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Jaime		
Apellido Paterno	Araya		
Apellido Materno	Clericus		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor titular		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Entomología		
Dirección (laboral)	Avenida Santa Rosa, 11315, La Pintana		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	9785714		
Fax	9785812		
Celular			
E-mail	jearaya@uchile.cl		
Web	www.uchile.cl		
Género	Masculino	☒ X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Nicola		
Apellido Paterno	Fiore		
Apellido Materno	-----		
RUT Personal	-----		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	-----		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	-----		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Fitopatología		
Dirección (laboral)	Avenida Lynch Norte 725. La Reina		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2775991		
Fax	-----		
Celular	09-9176519		
E-mail	nicolafiore_2000cl@yahoo.com		
Web	-----		
Género	Masculino	☒	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Ana María		
Apellido Paterno	Pino		
Apellido Materno	Elgueta		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	-----		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada ☒
Cargo o actividad que desarrolla en ella	-----		
Profesión	Ingeniero en Alimentos		
Especialidad	-----		
Dirección (laboral)	Doctor Ramón Corbalán 49. Departamento 106.Santiago		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2472081		
Fax	-----		
Celular	09-8240132		
E-mail	ampe@latinmail.com		
Web	Diagnóstico molecular		
Género	Masculino	☐	Femenino ☒
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Assunta		
Apellido Paterno	Bertaccini		
Apellido Materno	-----		
RUT Personal	-----		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Bologna		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesora		
Profesión	Bióloga		
Especialidad	Fitopatología		
Dirección (laboral)	Viale Fanin 46		
País	Italia		
Región	Emilia Romagna		
Ciudad o Comuna	Bologna		
Fono	-----		
Fax	-----		
Celular	-----		
E-mail	-----		
Web	-----		
Género	Masculino	☐	Femenino ☒ X
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Alberto		
Apellido Paterno	Alma		
Apellido Materno	-----		
RUT Personal	-----		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad de Torino		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Entomólogo		
Dirección (laboral)	Via Leonardo da Vinci 44		
País	Italia		
Región	Piemonte		
Ciudad o Comuna	Grugliasco (Turín)		
Fono	-----		
Fax	-----		
Celular	-----		
E-mail	-----		
Web	-----		
Género	Masculino	☒ X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Simona		
Apellido Paterno	Prodan		
Apellido Materno	-----		
RUT Personal	-----		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	-----		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	-----		
Profesión	Bioquímica		
Especialidad	Diagnóstico molecular		
Dirección (laboral)	Los Laureles 2505. Puente Alto		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2656996		
Fax	-----		
Celular	-----		
E-mail	-----		
Web	-----		
Género	Masculino	☐	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Mauricio		
Apellido Paterno	Estrada		
Apellido Materno	Llanos		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	-----		
RUT de la Organización	-----		
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	-----		
Profesión	Técnico Agrícola		
Especialidad	Manejo de invernadero		
Dirección (laboral)	Villa Real Audiencia. Calle 429 casa 1564. Peñalolén		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2796139		
Fax	-----		
Celular	09-9331566		
E-mail	m_estradall@yahoo.es		
Web	-----		
Género	Masculino	☒	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Fernando Javier		
Apellido Paterno	Reyes		
Apellido Materno	Badilla		
RUT Personal			
Profesión	Licenciado en Ciencias de la Ingeniería		
Especialidad	Biotecnología		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Género	Masculino	X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Carlos Christian		
Apellido Paterno	Valdivia		
Apellido Materno	Sepúlveda		
RUT Personal			
Profesión	Asesor Agrícola		
Especialidad	Asistente de Laboratorio		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	7412191		
Género	Masculino	X	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Pamela Roxana		
Apellido Paterno	Fernández		
Apellido Materno	Soto		
RUT Personal			
Profesión	Asesora de Microbiología		
Especialidad	Técnicas de diagnóstico		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Género	Masculino		Femenino X
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Rodrigo Enrique		
Apellido Paterno	Reyes		
Apellido Materno	Vásquez		
RUT Personal			
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Mantenimiento de material vegetal		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2670247		
Celular	09-8659739		
E-mail	reyesrodrigo@latinmail.com		
Género	Masculino	☒	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Carolina Del Pilar		
Apellido Paterno	Lagos		
Apellido Materno	Vásquez		
RUT Personal			
Profesión	Técnico Agrícola		
Especialidad	Apoyo en Laboratorio		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	2264793		
Género	Masculino	☐	Femenino ☒
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Jessica Isabel		
Apellido Paterno	Devia		
Apellido Materno	Parra		
RUT Personal			
Profesión	Asesoría Agrícola		
Especialidad	Apoyo en Laboratorio .Propagación de plantas		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	5257255		
Género	Masculino	Femenino	X
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo técnico		
Nombres	Andrea Del Carmen		
Apellido Paterno	Riveros		
Apellido Materno	Mora		
RUT Personal			
Profesión	Técnico Agrícola Generalista		
Especialidad	Apoyo en Laboratorio		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	8153874		
Género	Masculino	Femenino	X
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

FICHAS DATOS ORGANIZACIÓN

ANEXO 1.2 : FICHA DATOS ORGANIZACIÓN

Ficha Agentes Postulantes y Asociados

Agente Postulante o ejecutor: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas

Tipo de actor en el Proyecto (D)	Agente Postulante o Ejecutor		
Nombre de la organización, institución o empresa	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☒ X	Privada
Dirección	Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	9785916 – 6785726		
Fax	9785916		
E-mail	agrodec@uchile.cl		
Web	www.uchile.cl		
Tipo entidad (E)	Universidades Nacionales		

Agente asociado: Viña Santa Rita S.A.

Tipo de actor en el Proyecto (D)	Agente Asociado		
Nombre de la organización, institución o empresa	Viña Santa Rita S.A.		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	☐	Privada ☒ X
Dirección	Avenida Apoquindo 3669 of.601		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago, Las Condes		
Fono	(2) 3622000		
Fax			
Email			
Web	www.santarita.cl		
Tipo entidad (E)	Empresa productiva		

Agente asociado: Viñedos Emiliana S.A.

Tipo de actor en el Proyecto (D)	Agente Asociado		
Nombre de la organización, institución o empresa	Viñedos Emiliana S.A		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	X
Dirección	Av. Nueva Tajamar 481. oficina 702, Las Condes		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	3539130		
Fax	2036936		
Email	amoya@emiliana.cl		
Web	www.emilianal.cl		
Tipo entidad (E)	Vitivinícola		

Agente asociado: Univiveros

Tipo de actor en el Proyecto (D)	Agente Asociado		
Nombre de la organización, institución o empresa	Sociedad Agrícola Uniagri Copiapó LTDA. (Univiveros)		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	X
Dirección	Av. 18 de Septiembre 6578, Fundo San Miguel		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Paine		
Fono	824 13 40		
Fax			
Email			
Web			
Tipo entidad (E)	Empresa productiva		

VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Abou-Ghanem N., Sabanadodzovic S., Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G. P. 1998. Some proprieties of grapevine lefroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80, 37-46.

Alma A., Davis R.E, Vibio M., Danielli A., Bosco D., Arzone A. and Bertaccini A. 1996. Mixed Infection of grapevines in Northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease* 80: 418-421.

Barros T.S.L., Davis R.E., Resende O.R. and Dally E.L. 2002. Erigeron witches' broom phytoplasma in Brazil represents a new subgroup VI-B in 16S rRNA gen group VII, the Ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86: 1142-1148.

Beanland, L. and Wolf, T. 2003 Possible insect vectors of North American grapevine yellows phytoplasma in Virginia. 14th ICVG Meeting. Lcorotondo, Bari, Italy, september 12-17, 2003, 64-65.

Bertaccini, A. 2002 Malattie da fitoplasmi: stato dell'arte. *Petria* 12 (3): 325-343.

Bertaccini A., Murari E., Vibio M., Danielli A., Davis R.E., Borgo M., Consolaro R. and Sancassani P. 1996. Identificazione molecolare dei fitoplasmi presenti in viti affette da giallumi nel Veneto. *L'Informatore Agrario* 20: 55-59.

Bertaccini A., Vallillo E., Murari E. and Martini M. 1999. Presenza di legno nero in Molise. *L'Informatore Agrario* 2: 62-63.

Boudon-Padieu, E., 2003 The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, difusión and control. 14th ICVG Meeting. Lcorotondo, Bari, Italy, september 12-17, 2003, 47-53.

Braccini, P., Sfalanga, A., Martini, M., Pondrelli, M. and Bertaccini, A. 1999 Diffusione di fitoplasmosi in vigneti della Toscana centrale. *Petria*. 10: 177-178.

Caudwell A. 1993 Advances in grapevine yellows research since 1990. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux, 1993::* 79-83.

Conti, M. 2001 Giallumi della vite. *Informatore Fitopatologico*. 4: 35-40.

Conti, M. y Alma, A. 2002 Fitoplasmi ed insetti vettori. *Petria- 12 (3):* 353-359.

Conti, M., Gallitelli, D., Lisa, V., Lovisolo, O., Martelli, G. P., Ragozzino, A., Rana, G. L., Vovlas, C. 1996 Diagnosi delle malattie virali delle piante ortive. En: I principali virus delle piante ortive. Edagricole, Bologna, Italia, pp. 56-75.

Covarrubias, C. (1993). Virus en frutales: aspectos económicos. En: Virus en frutales de carozo, pomáceas y vides. INIA, La platina, Santiago de Chile.

D'Ascenzo D., Botti S., Paltrinieri S., Di Giovanni R., Di Silvestro D. and A. Bertaccini. 2003. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Abruzzo region (Italy). 14th Meet. Intern. Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) Sept. 12-17, Locorotondo (BA), Italy.

Deng S. and Hiruki C., 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479.

Digiario, M., Boscia, D., Simeone, V., and Savino, V. (1997). Detrimental effects of filamentous viruses to table grape varieties newly introduced in southern Italy. 12th meeting of the international council for the study of viruses and virus-like disease of the grapevine. Lisbon, Portugal.

Gibb K.S., Padovan A.C. and Mogen B.A. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85: 169-174.

Golino, D.A. 1993 Potencial interaction between rootstocks and grapevine latent virus. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 2: 148-152.

Greif, C., Garau, R., Boscia, D., Prota V.A., Fiori, M., Bass, P., Walter, B. and Prota, U. 1995 The relationship of grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopath. Medit.*, 34: 167-173.

Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M. and Gundersen D.E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.

Lugli, S. 2000 La certificazione vivaistica in Italia: sintesi delle rassegne regionali. *Rivista di Frutticoltura*, 2: 27-33.

Martelli G.P. y Quacquarelli, A. 1983 Tecniche di risanamento del materiale di propagazione. En: Il vivaismo in frutticoltura. Garda (Verona), Italia, pp. 75-90.

McKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S. and Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81, 222-226.

Minafra A. and Hadidi A. 1992 Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by c-DNA amplification. *Journal of Virological methods*, 47, 175-188

Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R. and Barba M., 1993. Molecular detection of diverse mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83: 1130-1137.

Revista Agroeconómico 1999 Producción, comercio y perspectivas de la uva de mesa. 51:8-14.

Rowhani A, Zhang Y.P., Golino D. A. and Uyemoto J.K. 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*. Adelaide, Australia. P.82.

Schneider B., Seemüller E., Smart C.D. and Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2: 369-380. S. Razin e J.G. Tully eds., Academic Press, New York.

Shi B.J., Habili N. and Symonds R.H. 2000. Grapevine fleck virus: large sequence variation in a small region of the genome. . In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*. Adelaide, Australia P. 78.

Walter, B. 1992 The French certification of grapevine. In *Grapevine viruses and certification in EEC countries: state of the art*. Quaderno n.3 CIHEAM. Ed. G.P.Martelli

Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.