

CODIGO: FIA-PI-C-2005-1-A-036

Nombre: "IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE DIAGNÓSTICO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS EN TOMATE EN LA PRIMERA REGIÓN"

REGION DE EJECUSION: DE ARICA Y PARINACOTA (XV REGION)

AGENTE EJECUTOR: UNIVERSIDAD DE TARAPACA, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Recursos Ambientales, Laboratorio de Fitopatología

AGENTES ASOCIADOS: AGRICOLA DEL NORTE S. A.

COORDINADOR DEL PROYECTO: GERMAN F. SEPULVEDA CHAVERA

COSTO TOTAL:

PROGRAMADO (M\$)	REAL (M\$)
\$ 117.570.200	\$ 89.516.354.-

APORTE FIA:

PROGRAMADO (M\$)	REAL (M\$)
\$ 54.275.200	\$ 40.026.800.-

PERIODO DE EJECUSION:

DICIEMBRE 2005 A MARZO 2009 (38 MESES)



RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto fue ejecutado por el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá. El objetivo fundamental del proyecto fue generar y potenciar el servicio de análisis temprano de enfermedades virales en el cultivo del tomate, y favorecer la sustentabilidad del rubro tomate, principalmente para pequeños agricultores, en su mayoría de la etnia Aymará. Se generaron las bases del conocimiento epidemiológico que permiten impulsar estrategias de prevención y manejo de las enfermedades virales en el sistema productivo. Las pérdidas en las temporadas anteriores, donde se desconocía la presencia e impacto de las enfermedades virales fue superior al 50 %. El proyecto permitió establecer la importancia de las enfermedades virales a través de técnicas serológicas y moleculares, identificando los principales agentes causales – Tomato yellow vein streak virus (TYVSV) y Pepino mosaic virus (PepMV). Además, se pudo comprobar la ocurrencia de infecciones combinadas con la consecuente alteración de los patrones sintomáticos tradicionales. El flujo de información desde la unidad de ejecución del proyecto hacia el sector productivo permitió incorporar estrategias de manejo preventivo y medidas profilácticas, antes desconocida en Azapa. Hoy un porcentaje creciente de agricultores usa malla antivectores (o anti áfidos) e insecticidas sistémicos e inductores de resistencia adquirida como medidas de manejo de las enfermedades virales. Las compañías productoras de semillas incorporaron, como una práctica común, la evaluación de híbridos y líneas mejoradas de tomate. De esta forma, cada temporada se evalúan cerca de 200 híbridos de tomate en forma independiente. Además, se establecieron capacidades técnicas específicas en la región y hoy, parte del equipo técnico desarrolla actividades profesionales en otras empresas agrícolas. El proyecto permitió posicionar al laboratorio de fitopatología como un agente activo en la caracterización y evaluación de sistemas de manejo de enfermedades virales a nivel local, nacional e internacional, cumpliendo a cabalidad los objetivos del proyecto.

I. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

SECCIÓN 1 : OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivos Generales

<u>PLANTEADOS</u>	<u>LOGRADOS</u>
Implementar un Laboratorio de Diagnostico de Enfermedades virales de plantas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Tarapacá	<u>Logrado a cabalidad (100 %).</u> Actualmente existe un laboratorio habilitado en técnicas de detección de virus con técnicas serológicas y moleculares, al servicio de la comunidad.
Identificar los principales virus que afectan tomate (hortalizas) en el valle de Azapa y proponer estrategias de diagnostico molecular para el control de las enfermedades que causan.	<u>Logrado a cabalidad (100 %).</u> Actualmente se conocen los principales agentes causales de enfermedades virales en tomate en la región y su comportamiento epidemiológico.

Los objetivos generales se cumplieron en un 100 %.

Objetivos Específicos

1. Implementar un laboratorio de detección de virus de hortalizas de importancia económica y un Centro de Consulta en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Tarapacá como también que otorgue servicio a la zona norte de Chile y a los países vecinos.

Se habilito el laboratorio de identificación viral, en dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá, permitiendo la detección y caracterización de virus vegetales. Paralelamente se generó suficiente información técnica y se vinculó la actividad del Proyecto y de la unidad ejecutora con el sector productivo estructurando una plataforma de difusión o centro de consultas, el cual atiende las solicitudes de los agricultores de la región.

2. En colaboración con el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca se capacitará al personal institucional (Bioquímicos, Ingenieros Agrónomos, Técnicos Agrícola) como también a alumnos tesisistas de la carrera de agronomía, para que adquieran las destrezas para la implementación de los ensayos y metodologías para la detección y diagnostico de virus en plantas.

La colaboración del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca se concretó a través de intercambio profesional entre las dos instituciones. De esta forma, el Dr. Claudio Sandoval hizo 6 visitas al laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Tarapacá, durante el período de ejecución del proyecto y en cada una de ellas participo de programas de capacitación directa en técnicas de laboratorio (capacitando a parte del equipo técnico y estudiantes), así como en actividades de difusión tales como seminarios y conferencias. A la vez, parte del equipo técnico visito los laboratorios del Dr. Sandoval, en Talca, y el de la Dra. M. Rosales, en Santiago. A través de estas capacitaciones se entrenó a 5 estudiantes de Agronomía de la Universidad de tarapacá, quienes desarrollaron su memoria de titulación. Actualmente todos se encuentran empleados en instancias privadas (Pioneer Seeds S. A.; SAG; y consultoras privadas). Las capacidades humanas quedaron instaladas en la región.

3. Evaluar el estado de infección viral (fitosanitario) de las plantaciones de hortalizas del valle de Azapa que serán parte del muestreo de campo, como también las plantas de vivero de diferentes productores.

Este objetivo específico se desarrolló a través de todo el período de ejecución del proyecto. Se determinaron los niveles de infección para los principales virus presentes en la región y sus características epidemiológicas. El sistema de trabajo permitió estudiar el estado sanitario de más del 50 % de las explotaciones comerciales de la región, durante el período de ejecución del proyecto. Además, a través de estudios de caso, se determinó la curva de progreso de la enfermedad.

4. Determinar los principales insectos vectores asociados a las patologías virales en la primera región.

Este aspecto fue abordado en forma colaborativa entre los entomólogos parte del equipo técnico del proyecto y la participación de especialistas internacionales, tales como la Dra. Judith Brown de la Universidad de Arizona, EE. UU., el Dr. Francisco Morales, Colombia, y la Dra. Marlene Rosalez, del INIA La Platina. Con estos esfuerzos mancomunados se pudo determinar la presencia de *Bemisia tabaci* biotipo B. como principal insecto vector.

5. Mediante el uso de metodologías moleculares, tal como PCR, RT-PCR, y técnicas de inmunodiagnos (ELISA), identificar los virus que infectan los principales cultivos hortícolas de la primera región, especialmente aquellos asociados al cultivo de tomate.

Las técnicas usadas para identificar virus se basaron en inmunodiagnos y métodos de biología molecular. De hecho el laboratorio se implementó con equipos correspondientes, tales como lector de placas ELISA, y termociclador más reactivos de uso específico para esos métodos.

6. Secuenciar parcialmente el genoma de los virus identificados y mediante la ayuda de herramientas computacionales realizar los estudios comparativos con las secuencias genómicas dispuestas en las base de datos (NCBI, EMBL) y disponibilizar esta información a la comunidad científica nacional e internacional.

Actualmente, caracterizar a los microorganismos a través de secuenciar parte o todo su genoma es una herramienta fundamental que permite corroborar la identidad específica o subespecífica, si corresponde. De esta forma, este objetivo se cumplió parcialmente. Se secuenció el genoma del *Tomato yellow vein streak virus*, un geminivirus no registrado en Chile y de gran impacto en la región. El secuenciamiento del genoma de este fitopatógeno permitió aclarar la identidad del agente causal responsable de la epidemia en tomate. No fue posible secuenciar otros virus fitopatógenos presentes en tomate en la región, debido a que fallaron los métodos de purificación.

7. De acuerdo a los resultados del proyecto podremos confirmar la presencia de virus en plantas de tomate como también recomendar a los productores las medidas de manejo y control para el diagnóstico precoz de virosis en hortalizas.

Los resultados del proyecto permitieron confirmar la presencia de a lo menos 10 virus fitopatógenos asociados al cultivo de tomate en la región de Arica y Parinacota. Se evaluaron técnicas de manejo y estrategias de control, las que permitieron recomendar acciones específicas a los productores. También se estableció un sistema de evaluación y diagnóstico precoz en almaciguera y en los primeros estados del cultivo. Los resultados del proyecto permitieron incorporar definitivamente la tecnología de mallas antivectores y el uso de telas agrícolas (Figura 1).

SECCIÓN 2 : METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

Los métodos usados durante la ejecución del proyecto, obedecieron a la estrategia de incorporar, paulatinamente, sistemas y métodos más complejos y rigurosos en la detección, identificación y caracterización de enfermedades virales. Inicialmente se estudiaron los síntomas (ANEXO 1), para continuar con métodos serológicos aplicados a la detección (ANEXO 2), para finalmente implementar métodos de identificación molecular (ANEXO 3). Paralelamente se aplicaron estrategias estadísticas y muestrales para determinar el comportamiento epidemiológico de las principales enfermedades virales que afectan tomate (ANEXO 4). Estos estudios fueron complementados con trabajos de inoculación artificial aplicando los postulados de Koch (ANEXO 5).

La estrategia metodológica permitió determinar la presencia de los principales virus que afectan tomate, en base a inmunodiagnóstico aplicada y herramientas de biología molecular.

Considerando que sobre el 90 % de los productores son de origen aymara y de escasa preparación formal, se establecieron plataformas de trabajo colaborativo a través de sus organizaciones y, apoyo directo en temas fitosanitarios, con especial énfasis en el diagnóstico de enfermedades virales.

Se consolidó el espacio físico del laboratorio, ya definido en las etapas anteriores, y se definieron unidades evaluativas en campo. Para realizar estudios biológicos con plantas indicadoras y hospedantes alternantes, se continuó con estudios de inoculaciones artificiales en diferentes especies vegetales en el invernadero establecido con el proyecto. Este invernadero posee acceso restringido para las personas ya que se trabaja con material de riesgo biológico. Se establecieron los protocolos necesarios para limitar y regular el acceso, tránsito, eliminación y movimiento de las personas que trabajan en él y del material vegetal con el que se trabaja.

Se evaluó algunas de las estrategias recomendadas para reducir el impacto deletéreo de las virosis en el sistema productivo tomate. Los detalles metodológicos se indican para cada evaluación.

El proyecto adaptó conocimientos y generó tecnologías a nivel local (e interpredial), estableciendo capacidades especializadas en el valle de Azapa, región de Arica y Parinacota.

El esquema de control químico de plagas y enfermedades, basado en frecuentes aplicaciones de agroquímicos (en alta dosis), está generando mayores problemas que beneficios. Los productores de mayor tamaño, que eventualmente son autosuficientes en la búsqueda de soluciones, no son inmunes a esto, por lo tanto, aquellos agricultores de pequeñas superficies son aún más propensos a utilizar este tipo de soluciones. Precisamente, este hecho refuerza la importancia del proyecto, que propuso una solución innovativa para abordar el concepto de manejo de plagas y enfermedades, generando como producto secundario, pero no menos importante, quizá el más importante, condiciones de manejo ambiental sustentable para el sector.

- Principales problemas metodológicos enfrentados.

Los problemas metodológicos enfrentados se solucionaron con capacitación de los actores técnico profesionales involucrados. Las dificultades de muestreo se enfrentaron con la programación de actividades. Las dificultades en la implementación de métodos serológicos, se resolvieron con capacitación de parte del equipo técnico, al igual que en el caso de la implementación de técnicas moleculares. Las dificultades metodológicas se pueden resumir, de esta forma, a dificultades administrativas y de coordinación dentro de la unidad ejecutora, las cuales se resolvieron con planificación.

Debido a que los métodos son bastante específicos, no se hicieron adaptaciones metodológicas, por tanto los métodos usados son los que originalmente se consideraron en la propuesta.

La descripción detallada de protocolos y métodos utilizados se detallan en los anexos de este informe.

SECCIÓN 3 : ACTIVIDADES DEL PROYECTO

AÑO 2005 - 2006

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha planteada	Fecha Real
1	1.1	Adquisición de equipos e instrumentos (Lector de microplacas ELISA, Termociclador, Estufa, pH-metro, etc)	Septiembre 2005-Abril 2006	Agost 2006
DESPUES DE UN PROLONGADO PROCESO DE NEGOCIACION ENTRE LA UNIDAD EJECUTORA Y FIA, EL PROYECTO DIO INICIO A SUS ACTIVIDADES EN DICIEMBRE DE 2005, CON TRES MESES DE ATRASO, POR TANTO, TODAS LAS ACTIVIDADES PROGRAMADAS PARA EL SEGUNDO SEMESTRE DE 2005 FUERON REPROGRAMADAS DESDE DICIEMBRE DE 2005.				
1	1.2	Adquisición de insumos y reactivos (Antisuero, Placas Elisa, Buffer, fungibles de vidrio etc.)	Septiembre 2005-Abril 2006	Octubre 2006
IGUAL ARGUMENTO QUE EN EL PUNTO ANERIOR				
1	1.3	Adquisición otros Materiales (Material computacional, etc.)	Septiembre 2005-Abril 2006	Diciembre 2006
IGUAL ARGUMENTO QUE EN EL PUNTO ANERIOR				
1	1.4	Remodelación laboratorio de Fitopatología de la UTA	Noviembre-Diciembre 2005	Diciembre 2006
IGUAL ARGUMENTO QUE EN EL PUNTO ANERIOR. A ESTA ACTIVIDAD SE DEBE AGREGAR LAS DIFICULTADES ADMINISTRATIVAS PROPIAS DE LA GESTION DE LA UNIVERSIDAD DE TARAPACA.				
1	1.5	Implementación de un Invernadero para trabajos biológicos	Noviembre-Diciembre 2005	Diciembre 2006
1	1.6	Laboratorio viral funcionando	Diciembre 2005	Diciembre 2010
LAS ACTIVIDADES INICIALES SE ORIENTARON A LA ORGANIZACIÓN DEL LABORATORIO. ACTUALMENTE SE TRABAJA EN DETECCION Y EN CARACTERIZACION DE ENFERMEDADES VIRALES, PRESTANDO SERVICIO A EMPRESAS Y AGRICULTORES				
1	1.7	Primera visita Virólogo UTALCA	Noviembre 2005	Marzo 2006
2	2.1	Establecer estrategias de capacitación con la Institución asociada (U. Talca)	Septiembre 2005	Marza 2006
	2.2	Capacitación del personal en técnicas de Inmunodiagnos	Diciembre 2005	Marza 2006
ESTAS TRES ACTIVIDADES SE HICIERON CONFORME EL ATRASO INDICADO INICIALMENTE. A LA VEZ, FUERON ACTIVIDADES SIMULTANEAS, DONDE CON LA MVISITA DEL VIROLOGO DE LA U. TALCA, SE PROCEDIO A CAPACITAR AL PERSONAL TCNICO Y SE ESTABLECIERON ESTRATEGIAS DE CAPACITACIÓN				
3	3.1	Muestreo preliminar en el valle de Azapa. Colecta de material vegetal	Diciembre 2005	Marzo-Diciembre 2006
	3.2	Detección con técnica ELISA Etapa I	Diciembre 2005	Marzo-Diciembre 2006

ESTAS ACTIVIDADES SE EJECUTARON CON LA PRIMERA VISITA DEL VIROLOGO DE LA U. TALCA Y SE CONTINUARON DURANTE EL PERIODO				
	3.3	Sistematización de la información generada	Diciembre 2005	Diciembre 2006
SI BIEN ESTA ACTIVIDAD DE PROGRAMA PARA DICIEMBRE DE 2005, NO SE PUDO REALIZAR SINO HASTA DICIEMBRE DE 2006, MOMENTO EN EL CUAL EXISTIA INFORMACION SUFICIENTE COMO PARA SER SISTEMATIZADA				
		Articulación de convenios con los beneficiarios para la implementación del Centro de Información.	Febrero-Junio 2006	Diciembre 2006
ESTA ACTIVIDAD SE ENMARCA EN LOS ACUERDOS GENERALES CON LOS BENEFICIARIOS, ESTO ES AGRICULTORES QUE PERTENECEN A AGRICOLA DEL NORTE, CON QUIENES SE ESTA TRABAJANDO AÚN, CONFORME ACUERDOS INFORMALES.				

AÑO 2006-2007

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Planteada	Fecha Real
1	1.8	Laboratorio funcionando	Enero 2006 – Abril 2010	Enero 2006 - Abril 2010
ESTA ACTIVIDAD CONTINUA EN DESARROLLO, CONFORME LO PLANIFICADO INICIALMENTE				
2	2.3	Segunda visita virólogo U Talca	Abril 2006	Octubre 2006
CONFORME EL ATRASO INICIAL, ESTA SEGUNDA VISITA FUE REPROGRAMADA, EJECUTANDOSE A CONFORMIDAD DURANTE EL PERIODO				
2	2.4	Capacitación en técnicas moleculares en diagnostico de virus de plantas. Arica	Abril 2006	Octubre 2006
3	3.4	Estudio de los principales virus que afectan a los cultivos de hortalizas en la I región. Etapa II	Abril 2006	Octubre 2006 – Abril 2007
LAS ACTIVIDADES 2.4 Y 3.4 SE DESARROLLARON CON EL APOYO DEL VIROLOGO DE LA U. TALCA, EN ESTE CASO SE TRABAJO CON ESPECTOS MOLECULARES APLICADOS A LA DETECCION DE VIRUS DE TOMATE				
	3.5	Estudio de aspectos epidemiológicos de las enfermedades virales en los cultivos de tomate en la I región de Chile I	Abril 2006 - 2007	Junio 2008
ESTA ACTIVIDAD SE PROLONGO DEBIDO A LO COMPLEJO EN LA CARACTERIZACION DE PROCESOS EPIDEMIOLOGICOS. A LA VEZ, FUE NECESARIO HACER EL COMPAÑAMIENTO DE UN CULTIVO DE TOMATES CARACTERIZANDO LOS PRINCIPALES ASPECTOS. ESTE TABAJO ESTUBO LLENO DE DETALLES METODOLÓGICOS				
	3.6	Evaluación de algunas estrategias de control empleadas en el mundo	Mayo 2006 – Abril 2007	Mayo 2006 – Diciembre 2008
SI BIEN ESTA ACTIVIDAD SE INICIO DE ACUERDO A LO PROGRAMADO, FUE NECESARIO PROLONGAR SU EJECUSION DEBIDO A QUE ALGUNAS EVALUACIONES SE PROLONGARON Y, POR SE ACTIVIDADES DE CAMPO, NO FUE POSIBLE ADELANTAR SU TERMINO. POR EJEMPLO, LAS EVALUACIONES DE PRODUCTOS INDUCTORES DE SAR.				
	3.7	Efecto de infecciones dirigidas en plantas indicadoras	Mayo 2006	Abril – Diciembre 2008
ESTA ACTIVIDAD SE INICIO DE ACUERDO A LO PROGRAMADO, SIN EMBARGO FUE NECESARIO PROLONGARLA, SE INCLUYERON DIFERENTES ESPECIES VEGETALES Y FUE NECESARIO ENSAYAR Y SELECCIONAR EL MEJOR METODO DE INOCULACIÓN, CONFORME LA ESPECIE VIRAL INVOLUCRADA				
5	5.1	Secuenciamiento del genoma de tres virus aislados en plantas en Azapa	Junio – Noviembre	Noviembre 2006 – Mayo

			2006	2008
EL TRABAJO DE SECUENCIAMIENTO SE HIZO EN COLABORACION CON EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL INIA- LA PLATINA (DRA. M. ROSALES) Y A TREVES DE ESTA GESTION SE CONSIGUIO AISLAR Y S ECUENCIAR EL GENOMA DE UN UNICO VIRUS. NO FUE POSIBLE SECUENCIAR TRES GENOMAS DEBIDO A DIFICULTADES EN LA PURIFICACION DE LOS MISMOS. SE TRABAJO EN TRATAR DE SECUENCIAR EL GENOMA DE PepMV Y TYLCV. NINGUNO DE ESTOS FUE POSIBLE PURIFICAR Y POR TANTO NO SE PUDO SECUENCIAR SU GENOMA, AUN CUANDO SE DETECTARON PERSISTENTEMENTE EN PLANTAS DE TOMATE CULTIVADAS				
	5.2	Retroalimentación con GeneBank	Noviembre 2006	Mayo 2008
LA UNICA SECUENCIA VIRAL OBTENIDA SE COMPARO E INGRESO AL GENE BANK				

AÑO 2007-2008

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Propuesta	Fecha Real
3	3.1	Estudio de los principales virus que afectan a los cultivos de hortalizas en la I región. Etapa III	Abril 2007	Abril 2008
	3.7	Colecta de material vegetal	Abril 2007	Abril 2008
	3.8	Procesamiento de muestras	Abril 2007	Julio 2007
	3.9	Sistematización de la información generada	Abril 2008	Abril 2008
4	4.1	Aspectos teóricos del control de enfermedades virosas en hortalizas	Abril 2007	Enero 2008
	4.2	Evaluación de los principales métodos de control de enfermedades virosas en hortalizas	Abril 2007	Enero 2008
ESTAS ACTIVIDADES SE HICIERON CONFORME LO PROGRAMADO. EN LA EJECUSION DE ELLAS SE INCORPORO LA PARTICIPACION DE ESTUDIANTES, DE ACUERDO A LA ESTRATEGIA METODOLOGICA CONSIDERADA, Y ASPECTOS TALES COMO COLECTA DE MATERIAL, PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SISTEMATIZACION Y ASPECTOS TEORICOS, ASI COMO EVALUACION DE LOS PRINCIPALES METODOS DE CONTROL, SE DESARROLLARON CON SU COLABORACION, GENERANDO UN CUMULO DE RESULTADOS				
	4.2.1	Control de insectos vectores en las virosis vegetales	Abril 2007 – 2008	Octubre 2008
	4.2.2	Evaluación de métodos de transmisión mecánica	Abril 2007 - 2008	Octubre 2008
	4.2.3	Efecto de malla antiafidos en el control de virosis vegetales	Abril 2007 – 2008	Diciembre 2008
ESTE TRABAJO SE REALIZO EN ESTRECHA COLABORACION CON EKL SECTOR PRODUCTIVO. DE HECHO, SE HIZO EN PREDIOS DE PRODUCTORES				
		Seminario Nacional "Enfermedades sistémicas en plantas cultivadas"	Abril 2008	Abril 2008
ESTA ACTIVIDAD TUVO CONNOTACION REGIONAL Y SE HIZO EN DEPENDENCIAS DE UN PRODUCTOR, CONVOCANDO AL SECTOR PUBLICO Y A LOS PRODUCTORES DE TOMATE, ADEMAS, SE INCLUYO A DISTRIBUIDORES Y OTROS ACTORES DE LA COMUNIDAD PRODUCTIVA REGIONAL				
		Entrega de Informe Final a Organismos relacionados	Abril 2008	Abril 2008
LAS ACTIVIDADES PROGRAMADAS PARA 2008 SE ATRASARON DEBIDO AL EFECTO CAUSADO POR UNA MOVILIZACION ESTUDIANTIL, QUE SE TRADUJO EN UNA "TOMA" DE LAS DEPENDENCIAS DE LA UNIDAD EJECUTORA POR MAS DE 30 DIAS.				

SECCIÓN 4: RESULTADOS ESPERADOS, INDICADORES Y RESULTADOS REALES

Resultados esperados	Indicador	Meta Final	Resultados Logrados
Equipos e instrumentos, disponibles	Equipos comprados.	Instrumentos funcionando	100 %. Abril 2006. De acuerdo a la modalidad establecida por FIA, se adquirieron los Equipos requeridos para el proyecto.. A saber: Un lector ELISA, 6 micropipetas de diferentes volúmenes, un termociclador, un termociclador, un pH-metro, un computador, un sistema de captura de imágenes digitales. Los equipos indicados se encuentran funcionando en dependencias del Laboratorio.
Antisuero, Placas Elisa, Buffer disponibles	Insumos comprados.	Insumos en Bodega	100 %. Se adquirieron partidores específicos (de 10 a 25 oligos), Deoxinucleótidostrifosfatos, buffer, agarosa, bromuro de etidio, anticuerpos poli y monoclonales, fosfatasa alcalina, y otros. Estos insumos se adquieren periódicamente ya que se consumen permanentemente.
Equipos y Material computacional disponible	Equipos y Material computacional instalados	Equipos y Material computacional funcionando	100 %. Los equipos se encuentran disponibles en el laboratorios.
Laboratorio de Fitopatología de la UTA Remodelado	Espacios físicos adecuados	Laboratorio funcionando	100 %. Con el proyecto se consiguió incorporar muebles de laboratorio y separar dependencias para mantener separadas las actividades de detección viral con otras actividades rutinarias del laboratorio.
Invernadero para trabajos biológicos estructurado	Plantas indicadoras desarrollándose	Invernadero funcionando	100 %. El Invernadero para trabajos biológicos se construyó en terrenos de la Fac. de Cs. Agronómicas de la U. Tarapacá. Se establecieron estrictos protocolos de tránsito y acceso al invernadero, considerando que en su interior se mantienen plantas infectadas con los virus estudiados.
Comunidad solicitando Servicio de detección	Numero de análisis mensual	Laboratorio funcionando	100 %. Periódicamente parte de la comunidad productora, solicita servicio de diagnóstico de enfermedades. Entre las empresas que solicitan regularmente, se pueden mencionar Alliance seeds; Semillas Latinoamericanas; Europlant; Truffa Hnoss.; Sr. Eri Rojas y otros productores locales.
Diagnóstico situación general	Visita Virólogo	Visita Virólogo	100 %. Con el desarrollo del proyecto se generó información suficiente como para conocer la realidad fitosanitaria desde el punto de vista viral, en el 100 %

			del valle de Azapa.
Estrategias de capacitación con Institución asociada (U. Talca) establecidas	Planificación y de calendario de trabajo.	Jornadas de capacitación realizadas	100 %. Se realizaron jornadas de capacitación en el Laboratorio de la U. Tarapacá y en el LAB. De la U. Talca. Además, se realizaron capacitaciones en el Laboratorio del INIA La Platina, al incorporar a la Dra. Rosales al proyecto.
Capacitación del personal en técnicas de Inmunodiagnóstico	Personal capacitado	Personal capacitado	100 %. Se capacitó al equipo técnico en el uso de herramientas serológicas
Material vegetal almacenado a -80°C	"N" muestras almacenadas	Laboratorio funcionando	100 %. Actualmente existe material almacenado a -80 °C con la evidencia de diferentes especies virales colectadas en el valle de Azapa.
"N" Virus detectados con técnicas de Inmunodiagnóstico	"N" virus detectados en tomate	Laboratorio funcionando	100 %. Se detectaron 10 especies virales durante el desarrollo del proyecto. Esta es información inédita antes de ejecutado el proyecto.
Información generada Sistematizada	Informes y publicaciones	Primer informe y publicaciones	100 %. Los informes técnicos y de avance se presentaron a FIA y fueron aprobados sistemáticamente.
Difundir parte de la información	Primer seminario	Dar a conocer resultados a la comunidad	100 %. Seminario con la participación de más de 120 personas, entre agricultores, empresarios, SAG, INDAP y otros.
Principales aspectos de Biología Molecular	Segunda visita virólogo U Talca	Personal capacitado	100 %. Este aspecto fue abordado con la concurrencia de diferentes especialistas, tales como la Dra. M. Rosales, Dra. J. Brown, Dr. F. Morales, Dr. P. Lunello
epidemiología de las enfermedades virales en los cultivos hortícolas	Epidemiología de CMV conocida	Esbozo de estrategias de control	100 %. Se generó la curva de progreso de las virosis transmitidas mecánicamente y redefinieron los principales insectos vectores presentes en la localidad
Seminario 2		sugerencias de control	100 % Diciembre 2008. Desarrollado a plenitud en enero de 2009, con la participación de especialistas extranjeros.
Caracterización de virosis en plantas indicadoras	Tres virus inoculados	Virus caracterizados biológicamente	100 %. Se trabajó con PepMV, Begomovirus y TSWV sobre plantas indicadoras tales como <i>Nicotiana</i> , <i>Lectuca</i> , <i>Chenopodium</i> , <i>Datura</i> y otras
Genoma viral secuenciado	Nucleótidos secuenciados	3 Virus secuenciados	100 %. Se secuenció sólo un genoma viral
Secuencias virales disponibles a la comunidad	Secuencias en GeneBank	3 secuencias en banco de datos	100 %. El genoma viral secuenciado se disponibilizó en el GeneBank
Charlas realizadas	Información publicada en prensa local	3 Charlas	100 %. Los logros y actividades del proyecto se difundieron en la prensa local

SECCIÓN 4: RESULTADOS

Colecta de material:

Durante la segunda semana de mayo de 2006, se inició la colecta de material correspondiente a las plantaciones tempranas de la temporada. Se colectaron brotes tiernos de tomate de la variedad Naomi, en predios del valle de Azapa.

Se colectó material correspondiente a brotes nuevos de tomate con síntomas de TSWV, es decir, clorosis, achaparramiento y distorsión de hojas. Paralelamente se colectaron malezas potencialmente hospedantes alternantes, tales como, *Amarantus*, *Malva*, *Chenopodium* y *Lycopersicon*.

El total de muestras colectadas fue de 336 muestras vegetales, incluyendo tomate sintomático (hojas y brotes distorcionados, achaparramiento, bronceado, mosaico, clorosis, etc.) y plantas asintomáticas en esa temporada. Paralelamente, se colectaron muestras de malezas asociadas al cultivo, principalmente asintomáticas.

Técnica desarrollada en la Detección del virus

Para detectar el virus en plantas infectadas, se tomaron trozos de aproximadamente 1 g de las muestras obtenidas de las plantas de tomate muestreadas. Este tejido se maceró en un mortero estéril al que se agregó 5 ml de buffer de extracción (0,01% tampón fosfato; pH 7,4; 0,05% Tween 20 (v/v); 2% polivinilpirrolidona (p/v) PM 4000 (Sigma) y 0,2% albúmina de huevo (p/v). Cada extracto se mantuvo en refrigerador a 4 °C hasta la maceración de la totalidad de las muestras. De cada extracto, con una micropipeta se tomaron 200 microlitros y se depositaron en una placa de poliestireno. Previamente, estas se sensibilizaron con 200 microlitros de gama-globulina específica del virus, diluyendo 1 µg/ml en 0,5 M buffer de carbonato de sodio a pH 6,9 y se incubaron durante 4 horas a 27 °C. Después de agregar los extractos, las placas se incubaron a una temperatura de 4 °C por toda la noche. Luego se lavaron tres veces con Buffer de lavado (Tween 20 (0,8% NaCl (p/v); 1% Fosfato de Sodio (p/v); 0,2% Fosfato de potasio (p/v); 0,02% KCl y 0,05% Tween 20, pH 7,4) por un lapso de 3 minutos. Finalizado el lavado se depositó una alícuota correspondiente a cada muestra en cada celdilla, el conjugado enzima (fosfatasa alcalina) – inmunoglobulina. Luego las placas se mantuvieron a 37 °C durante 4 horas, y se lavaron como se indicó anteriormente. Luego se adicionó en cada celdilla el sustrato P-nitrofenilfosfato, leyéndose la reacción a los 30, 60 y 90 minutos, en forma visual y con un lector de placas a 450 nm. Como control negativo se consideraron muestras provenientes

de plantas sanas y plántulas de almacigo no inoculadas. Las muestras con valores superiores a dos veces la lectura obtenida para el control negativo se consideraron positivas.

La siguiente tabla individualiza el muestreo realizado hasta la fecha y los respectivos resultados serológicos:

Tabla 3. MUESTREO (FECHA, SECTOR, RESULTADO)

Correlativo	Nº muestra	Sector	Fecha	Muestra	Resultado
1	1	alto	28-jun-06	maleza	-
2	2	alto	28-jun-06	tomate	+
3	3	alto	28-jun-06	tomate	+
4	4	alto	28-jun-06	tomate	+
5	5	alto	28-jun-06	tomate	+
6	6	alto	28-jun-06	maleza	+
7	7	alto	28-jun-06	maleza	-
8	8	alto	28-jun-06	maleza	+
9	9	alto	28-jun-06	tomate	+
10	10	alto	28-jun-06	maleza	-
11	11	alto	28-jun-06	tomate	+
12	12	alto	28-jun-06	maleza	-
13	13	alto	28-jun-06	tomate	+
14	14	alto	28-jun-06	maleza	+
15	15	alto	28-jun-06	maleza	-
16	25	alto	8-jun-06	tomate	+
17	26	alto	8-jun-06	maleza	-
18	27	alto	8-jun-06	tomate	+
19	34	alto	22-jun-06	tomate	+
20	35	alto	22-jun-06	maleza	-
21	36	alto	22-jun-06	tomate	+
22	43	alto	15-jun-06	tomate	+
23	44	alto	15-jun-06	tomate	+
24	45	alto	15-jun-06	maleza	-
25	58	alto	25-may-06	tomate	+
26	59	alto	25-may-06	tomate	-
27	66	alto	1-jun-06	maleza	-
28	67	alto	1-jun-06	tomate	+
29	68	alto	1-jun-06	tomate	+
30	69	alto	1-jun-06	maleza	-
31	95	alto	29-jun-06	tomate	-
32	96	alto	29-jun-06	tomate	+
33	97	alto	29-jun-06	maleza	-
34	98	alto	29-jun-06	maleza	-
35	99	alto	29-jun-06	maleza	-

36	100	alto	29-jun-06	maleza	-
37	101	alto	29-jun-06	maleza	-
38	102	alto	29-jun-06	maleza	-
39	115	alto	5-jun-06	tomate	-
40	116	alto	5-jun-06	tomate	+
41	117	alto	5-jun-06	maleza	+
42	118	alto	5-jun-06	maleza	+
43	119	alto	5-jun-06	maleza	-
44	120	alto	5-jun-06	maleza	+
45	121	alto	5-jun-06	maleza	+
46	122	alto	5-jun-06	maleza	+
47	123	alto	17-jul-06	pepino	-
48	124	alto	17-jul-06	maleza	-
49	125	alto	17-jul-06	pepino	-
50	126	alto	17-jul-06	pepino	-
51	127	alto	17-jul-06	pepino	-
52	128	alto	17-jul-06	pepino	-
53	129	alto	17-jul-06	pepino	-
54	130	alto	17-jul-06	pepino	-
55	131	alto	17-jul-06	pepino	-
56	132	alto	17-jul-06	pepino	-
57	133	alto	17-jul-06	pepino	-
58	134	alto	17-jul-06	pepino	-
59	135	alto	17-jul-06	maleza	+
60	136	alto	17-jul-06	maleza	+
61	137	alto	17-jul-06	maleza	-
62	138	alto	17-jul-06	maleza	-
63	151	alto	13-jul-06	tomate	+
64	152	alto	13-jul-06	tomate	+
65	153	alto	13-jul-06	maleza	-
66	154	alto	13-jul-06	maleza	-
67	155	alto	13-jul-06	maleza	-
68	156	alto	13-jul-06	maleza	-
69	157	alto	13-jul-06	maleza	-
70	158	alto	13-jul-06	maleza	+
71	206	alto	20-jul-06	tomate	+
72	207	alto	20-jul-06	tomate	+
73	208	alto	20-jul-06	maleza	+
74	209	alto	20-jul-06	maleza	-
75	210	alto	20-jul-06	maleza	+
76	211	alto	20-jul-06	maleza	-
77	212	alto	20-jul-06	maleza	-
78	213	alto	20-jul-06	maleza	+
79	227	alto	27-jul-06	tomate	+
80	228	alto	27-jul-06	tomate	+
81	229	alto	27-jul-06	maleza	+
82	230	alto	27-jul-06	maleza	+

83	231	alto	27-jul-06	maleza	+
84	232	alto	27-jul-06	maleza	-
85	233	alto	27-jul-06	maleza	+
86	234	alto	27-jul-06	maleza	-
87	235	alto	31-jul-06	tomate	+
88	236	alto	31-jul-06	maleza	-
89	237	alto	31-jul-06	tomate	-
90	238	alto	31-jul-06	maleza	+
91	239	alto	31-jul-06	tomate	+
92	240	alto	31-jul-06	tomate	-
93	241	alto	31-jul-06	tomate	+
94	242	alto	31-jul-06	tomate	+
95	243	alto	31-jul-06	tomate	+
96	244	alto	31-jul-06	maleza	+
97	245	alto	31-jul-06	tomate	+
98	246	alto	31-jul-06	tomate	+
99	247	alto	31-jul-06	tomate	+
100	248	alto	31-jul-06	tomate	+
101	249	alto	31-jul-06	tomate	+
102	250	alto	31-jul-06	tomate	+
103	251	alto	31-jul-06	maleza	-
104	252	alto	31-jul-06	maleza	+
105	253	alto	31-jul-06	maleza	+
106	254	alto	31-jul-06	tomate	+
107	255	alto	31-jul-06	tomate	+
108	256	alto	31-jul-06	tomate	+
109	257	alto	31-jul-06	locoto	-
110	258	alto	31-jul-06	tomate	-
111	277	alto	2-ago-06	tomate	+
112	278	alto	2-ago-06	tomate	+
113	279	alto	2-ago-06	maleza	-
114	280	alto	2-ago-06	maleza	+
115	281	alto	2-ago-06	maleza	-
116	282	alto	2-ago-06	maleza	-
117	283	alto	2-ago-06	maleza	+
118	284	alto	2-ago-06	maleza	-
119	300	alto	10-ago-06	tomate	+
120	301	alto	10-ago-06	tomate	+
121	302	alto	10-ago-06	maleza	-
122	303	alto	10-ago-06	maleza	-
123	304	alto	10-ago-06	maleza	-
124	305	alto	10-ago-06	maleza	+
125	306	alto	10-ago-06	maleza	-
126	307	alto	10-ago-06	maleza	-
127	323	alto	16-ago-06	tomate	+
128	324	alto	16-ago-06	tomate	+
129	325	alto	16-ago-06	maleza	+

130	326	alto	16-ago-06	maleza	-
131	327	alto	16-ago-06	maleza	-
132	328	alto	16-ago-06	maleza	-
133	329	alto	16-ago-06	maleza	+
134	330	alto	16-ago-06	maleza	-
135	331	alto	16-ago-06	tomate	+
136	332	alto	16-ago-06	tomate	+
137	333	alto	16-ago-06	tomate	+
138	334	alto	16-ago-06	tomate	+
139	335	alto	16-ago-06	tomate	-
140	336	alto	16-ago-06	tomate	+
141	28	medio	8-jun-06	maleza	-
142	29	medio	8-jun-06	tomate	+
143	30	medio	8-jun-06	tomate	-
144	37	medio	22-jun-06	tomate	-
145	38	medio	22-jun-06	tomate	-
146	39	medio	22-jun-06	maleza	-
147	46	medio	15-jun-06	maleza	-
148	47	medio	15-jun-06	tomate	+
149	48	medio	15-jun-06	tomate	+
150	56	medio	25-may-06	tomate	+
151	57	medio	25-may-06	tomate	-
152	63	medio	1-jun-06	tomate	+
153	64	medio	1-jun-06	tomate	+
154	65	medio	1-jun-06	maleza	-
155	70	medio	29-jun-06	tomate	+
156	71	medio	29-jun-06	tomate	-
157	72	medio	29-jun-06	tomate	+
158	73	medio	29-jun-06	lisianthus	+
159	74	medio	29-jun-06	lisianthus	+
160	75	medio	29-jun-06	lisianthus	+
161	76	medio	29-jun-06	papa	+
162	77	medio	29-jun-06	papa	+
163	78	medio	29-jun-06	papa	+
164	79	medio	29-jun-06	papa	+
165	90	medio	29-jun-06	tomate	+
166	91	medio	29-jun-06	tomate	+
167	92	medio	29-jun-06	maleza	-
168	93	medio	29-jun-06	maleza	-
169	94	medio	29-jun-06	maleza	-
170	110	medio	5-jun-06	tomate	+
171	111	medio	5-jun-06	tomate	+
172	112	medio	5-jun-06	maleza	-
173	113	medio	5-jun-06	maleza	+
174	114	medio	5-jun-06	maleza	-
175	146	medio	13-jul-06	tomate	+
176	147	medio	13-jul-06	tomate	+

177	148	medio	13-jul-06	maleza	-
178	149	medio	13-jul-06	maleza	+
179	150	medio	13-jul-06	maleza	-
180	159	medio	18-jul-06	tomate	+
181	160	medio	18-jul-06	tomate	+
182	161	medio	18-jul-06	tomate	+
183	162	medio	18-jul-06	tomate	+
184	163	medio	18-jul-06	tomate	-
185	164	medio	18-jul-06	tomate	+
186	165	medio	18-jul-06	tomate	+
187	166	medio	18-jul-06	tomate	+
188	167	medio	18-jul-06	lisianthus	-
189	168	medio	18-jul-06	papa	+
190	169	medio	18-jul-06	papa	+
191	201	medio	20-jul-06	tomate	+
192	202	medio	20-jul-06	maleza	+
193	203	medio	20-jul-06	maleza	-
194	204	medio	20-jul-06	maleza	-
195	205	medio	20-jul-06	maleza	+
196	214	medio	20-jul-06	tomate	+
197	222	medio	27-jul-06	tomate	+
198	223	medio	27-jul-06	tomate	+
199	224	medio	27-jul-06	maleza	+
200	225	medio	27-jul-06	maleza	-
201	226	medio	27-jul-06	maleza	-
202	259	medio	31-jul-06	pimentón	+
203	260	medio	31-jul-06	lisianthus	+
204	261	medio	31-jul-06	lisianthus	+
205	262	medio	31-jul-06	papa	-
206	263	medio	31-jul-06	papa	-
207	271	medio	2-ago-06	tomate	+
208	272	medio	2-ago-06	tomate	-
209	273	medio	2-ago-06	maleza	+
210	274	medio	2-ago-06	maleza	-
211	275	medio	2-ago-06	maleza	+
212	276	medio	2-ago-06	maleza	-
213	293	medio	10-ago-06	tomate	+
214	294	medio	10-ago-06	tomate	+
215	295	medio	10-ago-06	maleza	-
216	296	medio	10-ago-06	maleza	-
217	297	medio	10-ago-06	maleza	-
218	298	medio	10-ago-06	maleza	-
219	299	medio	10-ago-06	maleza	+
220	316	medio	16-ago-06	tomate	-
221	317	medio	16-ago-06	tomate	-
222	318	medio	16-ago-06	maleza	-
223	319	medio	16-ago-06	maleza	+

224	320	medio	16-ago-06	maleza	-
225	321	medio	16-ago-06	maleza	-
226	322	medio	16-ago-06	maleza	+
227	16	bajo	28-jun-06	tomate	+
228	17	bajo	28-jun-06	tomate	+
229	18	bajo	28-jun-06	tomate	+
230	19	bajo	28-jun-06	tomate	+
231	20	bajo	28-jun-06	tomate	+
232	21	bajo	28-jun-06	tomate	+
233	22	bajo	28-jun-06	tomate	+
234	23	bajo	28-jun-06	tomate	+
235	24	bajo	28-jun-06	tomate	+
236	31	bajo	8-jun-06	maleza	-
237	32	bajo	8-jun-06	tomate	+
238	33	bajo	8-jun-06	tomate	+
239	40	bajo	22-jun-06	maleza	-
240	41	bajo	22-jun-06	tomate	-
241	42	bajo	22-jun-06	tomate	+
242	49	bajo	15-jun-06	maleza	-
243	50	bajo	15-jun-06	tomate	+
244	51	bajo	15-jun-06	tomate	+
245	52	bajo	25-may-06	tomate	-
246	53	bajo	25-may-06	maleza	-
247	54	bajo	25-may-06	tomate	+
248	55	bajo	25-may-06	maleza	-
249	60	bajo	1-jun-06	maleza	-
250	61	bajo	1-jun-06	tomate	-
251	62	bajo	1-jun-06	tomate	-
252	80	bajo	29-jun-06	tomate	-
253	81	bajo	29-jun-06	cucurbit.	-
254	82	bajo	29-jun-06	maleza	-
255	83	bajo	29-jun-06	cucurbit.	+
256	84	bajo	29-jun-06	tomate	+
257	85	bajo	29-jun-06	tomate	+
258	86	bajo	29-jun-06	maleza	-
259	87	bajo	29-jun-06	maleza	-
260	88	bajo	29-jun-06	maleza	-
261	89	bajo	29-jun-06	maleza	+
262	103	bajo	5-jun-06	tomate	+
263	104	bajo	5-jun-06	tomate	+
264	105	bajo	5-jun-06	maleza	+
265	106	bajo	5-jun-06	maleza	+
266	107	bajo	5-jun-06	maleza	-
267	108	bajo	5-jun-06	maleza	-
268	109	bajo	5-jun-06	maleza	-
269	139	bajo	13-jul-06	tomate	+
270	140	bajo	13-jul-06	tomate	+

271	141	bajo	13-jul-06	maleza	-
272	142	bajo	13-jul-06	maleza	-
273	143	bajo	13-jul-06	maleza	-
274	144	bajo	13-jul-06	maleza	-
275	145	bajo	13-jul-06	maleza	-
276	170	Lluta	21-jul-06	tomate	+
277	171	Lluta	21-jul-06	tomate	+
278	172	Lluta	21-jul-06	tomate	+
279	173	Lluta	21-jul-06	tomate	+
280	174	Lluta	21-jul-06	tomate	+
281	175	Lluta	21-jul-06	tomate	+
282	176	Lluta	21-jul-06	tomate	+
283	177	Lluta	21-jul-06	tomate	+
284	178	Lluta	21-jul-06	tomate	+
285	179	Lluta	21-jul-06	tomate	+
286	180	Lluta	21-jul-06	tomate	+
287	181	Lluta	21-jul-06	cherry	+
288	182	Lluta	21-jul-06	cherry	+
289	183	Lluta	21-jul-06	tomate	+
290	184	Lluta	21-jul-06	tomate	+
291	185	Lluta	21-jul-06	tomate	+
292	186	Lluta	21-jul-06	tomate	+
293	187	Lluta	21-jul-06	maleza	-
294	188	Lluta	21-jul-06	maleza	-
295	189	Lluta	21-jul-06	tomate	+
296	190	Lluta	21-jul-06	alfalfa	+
297	191	Lluta	21-jul-06	alfalfa	+
298	192	bajo	20-jul-06	pimentón	+
299	193	bajo	20-jul-06	pimentón	+
300	194	bajo	20-jul-06	tomate	-
301	195	bajo	20-jul-06	tomate	+
302	196	bajo	20-jul-06	maleza	-
303	197	bajo	20-jul-06	maleza	+
304	198	bajo	20-jul-06	maleza	+
305	199	bajo	20-jul-06	maleza	-
306	200	bajo	20-jul-06	maleza	+
307	215	bajo	27-jul-06	tomate	+
308	216	bajo	27-jul-06	tomate	+
309	217	bajo	27-jul-06	maleza	-
310	218	bajo	27-jul-06	maleza	+
311	219	bajo	27-jul-06	maleza	+
312	220	bajo	27-jul-06	maleza	-
313	221	bajo	27-jul-06	maleza	+
314	264	bajo	2-ago-06	tomate	+
315	265	bajo	2-ago-06	tomate	-
316	266	bajo	2-ago-06	maleza	-
317	267	bajo	2-ago-06	maleza	-

318	268	bajo	2-ago-06	maleza	-
319	269	bajo	2-ago-06	maleza	-
320	270	bajo	2-ago-06	maleza	-
321	285	bajo	10-ago-06	tomate	-
322	286	bajo	10-ago-06	tomate	-
323	287	bajo	10-ago-06	maleza	-
324	288	bajo	10-ago-06	maleza	-
325	289	bajo	10-ago-06	maleza	-
326	290	bajo	10-ago-06	maleza	-
327	291	bajo	10-ago-06	maleza	-
328	292	bajo	10-ago-06	maleza	-
329	308	bajo	16-ago-06	tomate	+
330	309	bajo	16-ago-06	tomate	+
331	310	bajo	16-ago-06	maleza	-
332	311	bajo	16-ago-06	maleza	-
333	312	bajo	16-ago-06	maleza	-
334	313	bajo	16-ago-06	maleza	-
335	314	bajo	16-ago-06	maleza	-
336	315	bajo	16-ago-06	maleza	-

De acuerdo a lo anterior es posible afirmar:

- De las 336 muestras de plantas estudiadas (tomate, malezas y otras), 185 (55,1 %) resultaron positivas a, por lo menos, un virus testeado.
- 147 muestras de tomate (43,8 %) resultaron positivas a los virus testeados.
- De las 336 muestras estudiadas, 85 (21,1 %) resultaron con infecciones combinadas, siendo PepMV y ToRSV, los virus que más interactuaron.
- La frecuencia relativa de los virus estudiados, respecto del total de muestras fue: ToMV: 0,9 %; TSWV: 2,1 %; ToRSV: 32,1 %; TMV: 9,8 %; CMV: 7,1 %; PepMV: 31,5 %; AMV: 18,2 %; PVX: 7,1 %; PVY: 10,7 % (Figura 1).

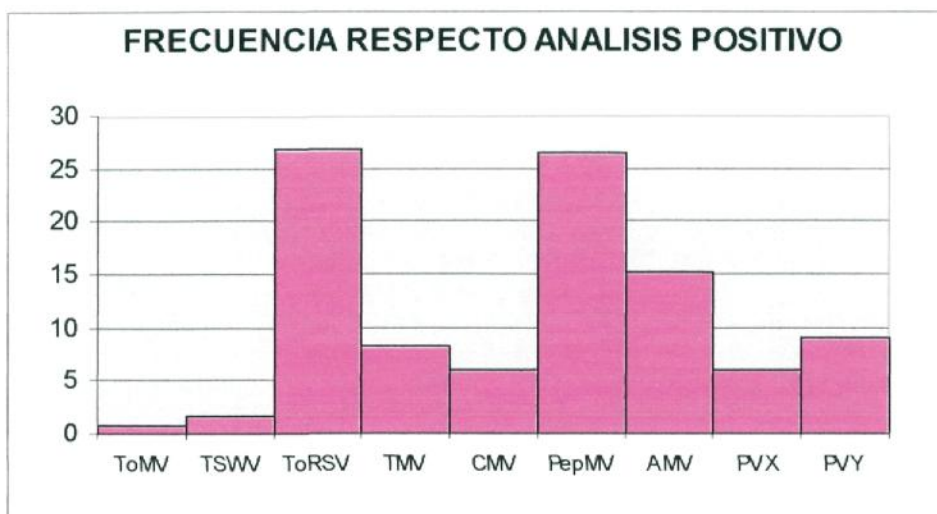


Figura 1: Gráfico de frecuencia de los virus analizados

- Considerando que ToRSV es un virus que presenta como vector al nemátodo *Xiphinema americanum*, es necesario estudiar las poblaciones de este vector.
- En cuanto a las malezas presentes en el valle de Azapa, los principales insectos vectores corresponden a mosquitas blancas.
- *Bemisia tabaci* presenta mayor preferencia por la especie vegetal *Pitraea cuneato-ovata* (maleza de nombre vernacular "Papilla"), con un 30,5%, mientras que *Trialeurodes vaporariorum* presenta mayor preferencia por *L. esculentum* Mill (Tomate), con un 28,4%. Este insecto muestra preferencia también por la maleza malva (Malvaceae), con un 26,2%.
- De ambas especies de mosca blanca, la que presenta mayor número de ninfas asociadas a hojas de tomate, en los tres sectores del valle, en un total de 23 semanas es *B. tabaci*, con un 30,5%.

I. CORRELACIÓN SINTOMA AGENTE CAUSAL

El muestreo realizado en campo, determinó que el síntoma predominante corresponde a manchado de frutos acompañado de clorosis de folíolos y hojas. De acuerdo a las observaciones de campo, fue posible relacionar síntomas con la presencia del (os) agente(s) causal(es). Se encuentra en elaboración un manual pictográfico de síntomas en tomate (las figuras que siguen representan una maqueta del mismo):

PepMV: Virus del mosaico del pepino dulce

Es un Potexvirus, de cadena simple de ARN, de forma tubular flexuosa. Mide 508 nm de largo por 11 nm de diámetro (Brunt 1989; Büchen 2004). Tiene un punto de inactivación termal entre los 65 y 80° C y sobrevive en la savia de las plantas. Entre 18 y 21° C se puede mantener infectivo por 90 días. Tiene un estrecho rango de hospederos, limitándose casi únicamente a solanáceas. No se conocen aún vectores directos.



Puede manifestarse un mosaico pálido, pero es más característico una clorosis intervenal en las hojas. El follaje desarrolla un mosaico color amarillo brillante y los tallos pueden presentar estrías de color café que los rodea cerca del punto de crecimiento, y ocurre algo similar en los pedicelos de las inflorescencias.

	PepMV: Los síntomas causados en plantas de tomate son encarrujamiento y deformación de hojas, las que luego toman forma de punta de flecha, y el ápice un aspecto puntiagudo. También ocurre aborto floral, y el cáliz de frutos en desarrollo puede tornarse café. En frutos de tomate se da un moteado amarillo anaranjado.
	ToRSV + PVY: Foliolo presentando síntomas de la Interacción entre dos virus: Virus de la mancha anillada del tomate junto a Virus Y de la papa. Es importante destacar la pérdida de clorofila y las manchas marrón-azuladas en amplias zonas del folíolo.

I. EPIDEMIOLOGÍA DE PepMV

TOMA DE MUESTRAS. Se estableció la sistemática de muestreo y la estrategia de estudio de los agentes virales de mayor impacto en el rubro tomate en la región de Arica y Parinacota. A modo de resumen, baste indicar que para definir el área de muestreo, se trabajó en un cultivo al aire libre. El método de muestreo se esquematiza en la figura 1, donde se tomaron muestras foliares desde el momento del trasplante, incluyendo 45 plantas por muestreo, en 6374,4 m², dejando 5 hileras de borde en cada extremo. El diseño consideró 3 repeticiones seleccionando 5 hileras consecutivas, y 10 plantas contiguas de cada hilera con tramos de 15 m de separación. Se mostraron la 1^a, 5^a y 10^a planta de cada tramo, y fueron analizadas serológicamente. El trabajo experimental obedeció a un diseño exploratorio y transeccional bajo el esquema descriptivo – investigativo (Hernández, 2004).

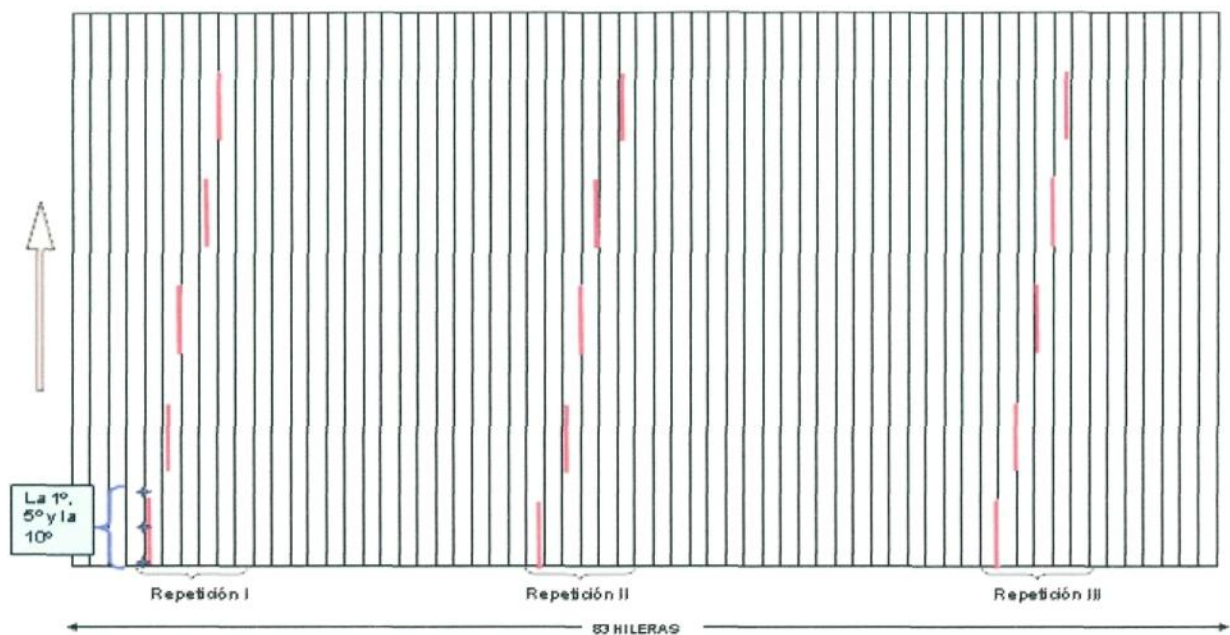


Figura 1: Esquema de muestreo del cultivo estudiado.

POSTULADOS DE KOCH. La verificación de los Postulados de Koch, corresponde a una herramienta básica para comprobar la patogenicidad de los presuntos agentes causales de enfermedades en las plantas y como tal, en este trabajo, se aplicaron los cuatro pasos fundamentales, corroborando la capacidad de “causar enfermedad” de los dos virus mas frecuentes y de mayor impacto en el agroecosistema del valle de Azapa, a saber: 1. lamiento del fitopatógeno a partir de material vegetal; 2. Identificación y obtención de cultivos puros; Pruebas de patogenicidad, a través de inoculación, y 4. Aislamiento y comprobación de síntomas.

PLANTAS INDICADORAS. El trabajo con plantas indicadoras se hizo en condiciones de aislamiento y en invernadero, de modo de reducir la acción de insectos y otros agentes vectores. Se buscó trabajar en un sistema de ambiente biológicamente controlado. Los materiales y procedimientos se encuentran detallados en los informes anteriores.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.

Los estudios epidemiológicos se centraron en las dos virosis más importantes dentro del agroecosistema. La herramienta aplicada fue serología. En esta etapa se generó información complementaria a la ya abundante información informada. Los protocolos y métodos aplicados fueron presentados detalladamente en los informes anteriores.

Se debe destacar que se confirmó la tendencia general de la curva de progreso de la enfermedad PepMV, tal como se indica en el gráfico 1.

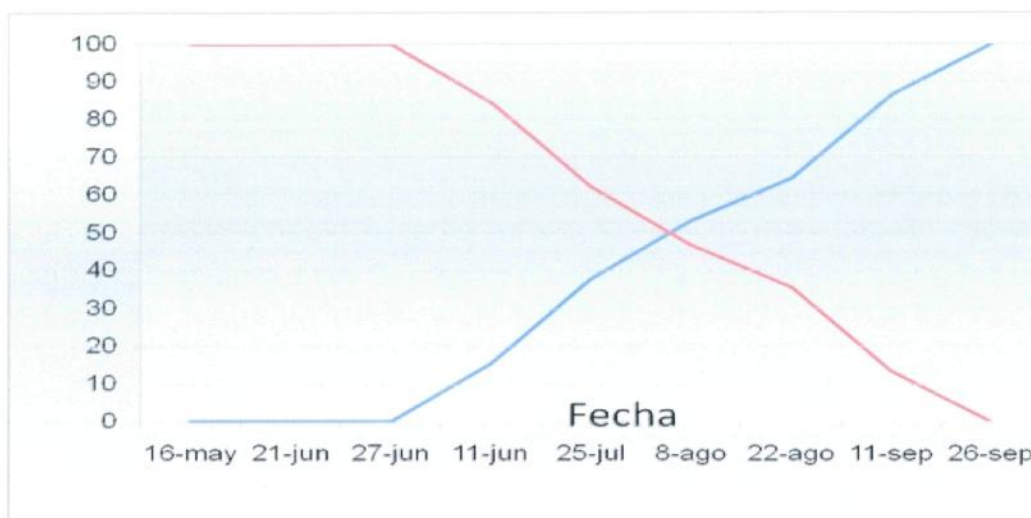


Gráfico N° 1: Curva de progreso de la infección de PepMV en un cultivo de tomate.

Con el desarrollo del proyecto, se generó información práctica orientada a proponer estrategias de control de las virosis que afectan tomate en la región e información científica que se disponibilizó a la comunidad científica. De esta forma, en el ámbito del control, se propuso:

- Establecer rotación de cultivos
- Reducir las fuentes de inóculo (malezas y rastrojos).
- Implementar invernaderos cubiertos con malla antivectores, que considere registro y restricción en la entrada al plantel de cultivo.
- Establecer sistemas complementarios, tales como pediluvios y lavatorios.
- Establecer un programa de manejo integrado que considere elementos integrados de control.
- Reducir el tránsito de personas en las diferentes unidades productivas.
- Implementar Buenas Prácticas Agrícolas en el trabajo cotidiano. Esto se enmarca en ordenar o estructurar una estrategia de trabajo en los potreros,

comenzando los trabajos en los cultivos más jóvenes y posteriormente intervenir las plantaciones más antiguas.

- Una medida básica, establecida parcialmente, es desinfectar manos, ropas y herramientas entre una plantación y otra.

Evaluación de algunas estrategias de control empleadas

1. Evaluación de malla antiáfido.

Efecto de malla antiáfido en el control de virosis vegetales

Se evaluó el efecto de la utilización de malla antivectores como medida preventiva para evitar el desarrollo de enfermedades virales transmitidas por insectos vectores (TYVSV).

La evaluación consideró el estudio de 3 cultivos de tomate var. Naomi bajo invernadero de malla antivectores, perteneciente a 3 productores distintos y ubicados en 3 sectores del valle de Azapa:

Sector	Productor
Km. 6,5	Agrícola Lombardi
Km. 7	Agrícola Santa María
Km. 19	Agrícola Truffa

Paralelamente se evaluó la incidencia de las enfermedades virales en diferentes estados de desarrollo de los cultivos (Figura 2):

Estado fenológico	Días post transplantes
Crecimiento vegetativo	1 – 30
Floración - fructificación	30 – 90
3° racimo	90 – en adelante

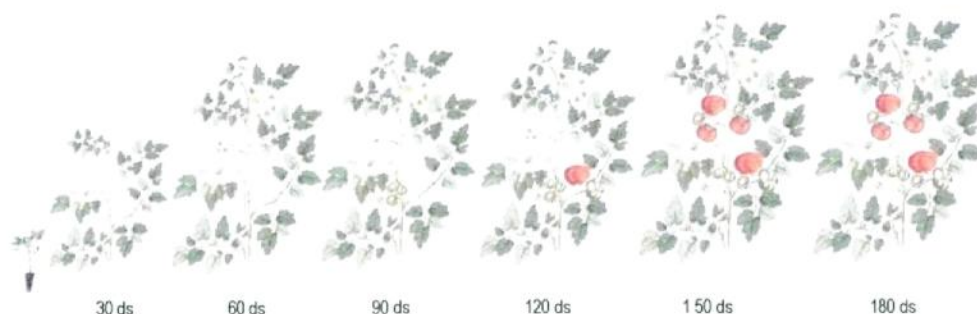


Figura 2: estados fenológicos muestreados

El manejo agronómico utilizado en cada unidad fue en general el utilizado para tomate indeterminado en el valle de Azapa.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los diferentes invernaderos se compararon con análisis de muestras provenientes de 3 cultivos de tomate al aire libre.

Sector	Productor
Km. 6,5	Agrícola Lombardi
Km. 7	Roberto Cebra
Km. 30	Ángel Andrade

Metodología

1. Toma de muestras:

La toma de muestra (figura 3) dentro de los invernaderos se realizó al azar, abarcando un universo de 50 plantas. Simultáneamente se registraron los síntomas de cada muestra. En total se realizaron 3 muestreos en cada sector: entre 1 a 30 días post transplante (DPT), entre 30 y 90 (DPT) y 90 DPT en adelante los que correspondieron a los estados fenológicos de: crecimiento vegetativo, floración fructificación y 3° racimo en adelante respectivamente.

2. Análisis de las muestras.

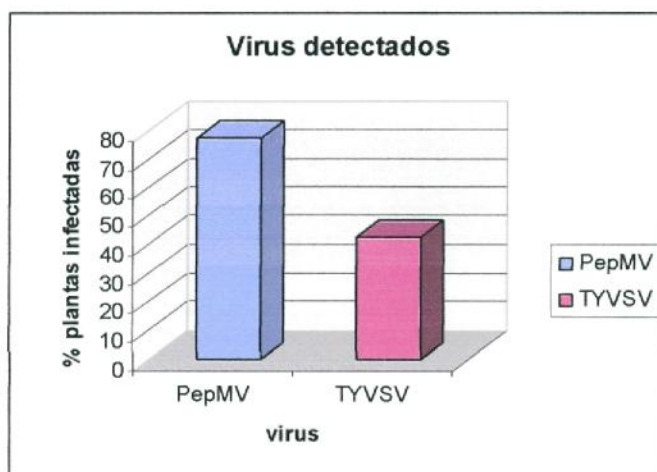
Para la detección del virus en las muestras colectadas, se utilizó la prueba serológica de DAS – ELISA, de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo 2.

Resultados y discusión

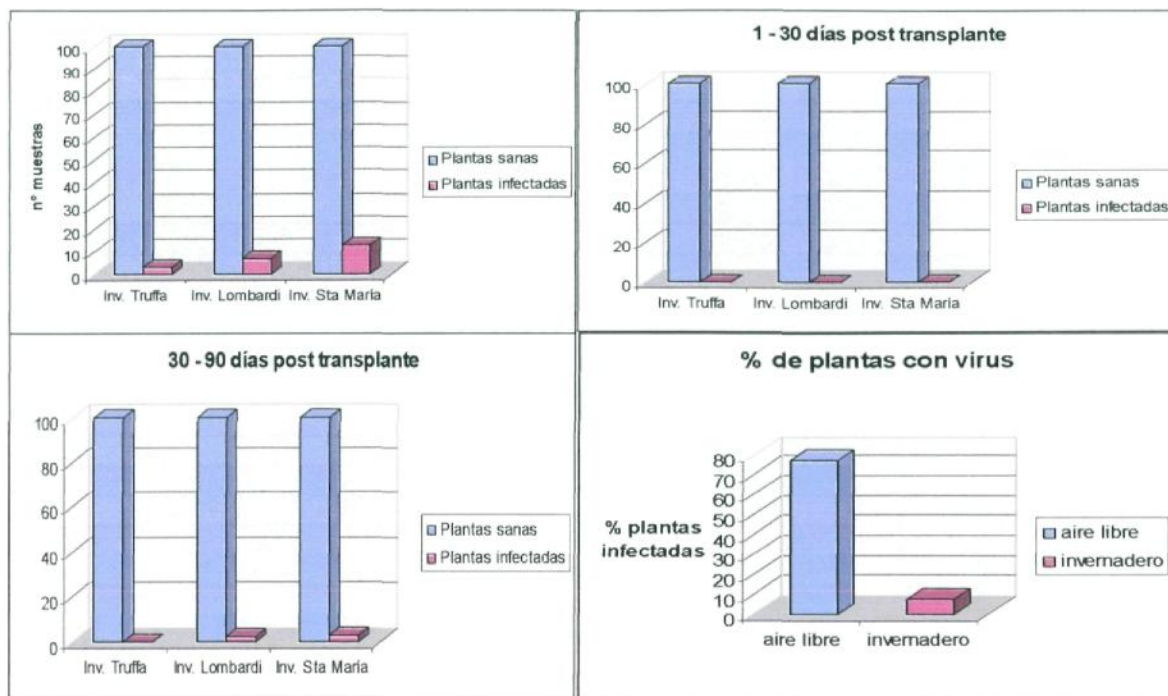
Análisis de la incidencia de virus en cultivos de tomate var. Naomi bajo invernadero de malla antivectores:

Al igual que estudios anteriores realizados en el valle de Azapa, la enfermedad viral predominante es el mosaico del pepino dulce (PepMV), enfermedad que presenta un eficiente mecanismo de transmisión mecánica (Brunt *et al.*, 1996). Por lo que se transmite fácilmente a través de labores culturales y contacto entre plantas (Van der Vlugt *et al.*, 2000; Fletcher, 2000; Jordá *et al.*, 2000; Stijger *et al.*, 2000). Los resultados de los análisis serológicos indican que en general, la incidencia viral en los tres invernaderos evaluados no sobrepasa el 15 % de plantas infectadas (gráfico 2). A su vez los resultados indican que durante los primeros 90 días de cultivo la incidencia de la enfermedad es muy baja (inferior al 10 %) (gráficos 3 y 4), situación que se puede explicar ya que durante los primeros tres meses la intervención del cultivo mediante prácticas culturales tales como poda, desbrote y hormoneo es muy baja. Dentro de este mismo contexto, Lacasa y colaboradores (2001) demostraron que el desbrotado y entutorado son las formas más rápidas de diseminación, ya que en tan solo en estas labores, un operario puede llegar a contaminar de 6 a 8 de una misma fila.

Por otra parte la incidencia de virus transmitidos por insectos tales como, virus del bronceado del tomate (TSWV), transmitido por *Frankliniella occidentalis* y virus del estriado de las venas amarillas del tomate (TYVSV) transmitido por *Bemisia tabaci* fue nula.



Al comparar los resultados obtenidos bajo invernadero con los resultados al aire libre, se puede observar un incremento de la incidencia de enfermedades virales en los cultivos al aire libre. Los virus que se presentaron con mayor frecuencia fueron el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y el virus del estriado de las venas amarillas del tomate (TYVSV) (gráfico).



Restos de cultivo anterior, cultivos colindantes enfermos y malezas pueden ser fuentes importantes de inóculo. Además, estudios recientes demuestran que el patógeno es capaz de mantenerse a niveles detectables por DAS – ELISA hasta tres meses luego de la incorporación de los rastrojos al suelo (Sandoval, 2005).

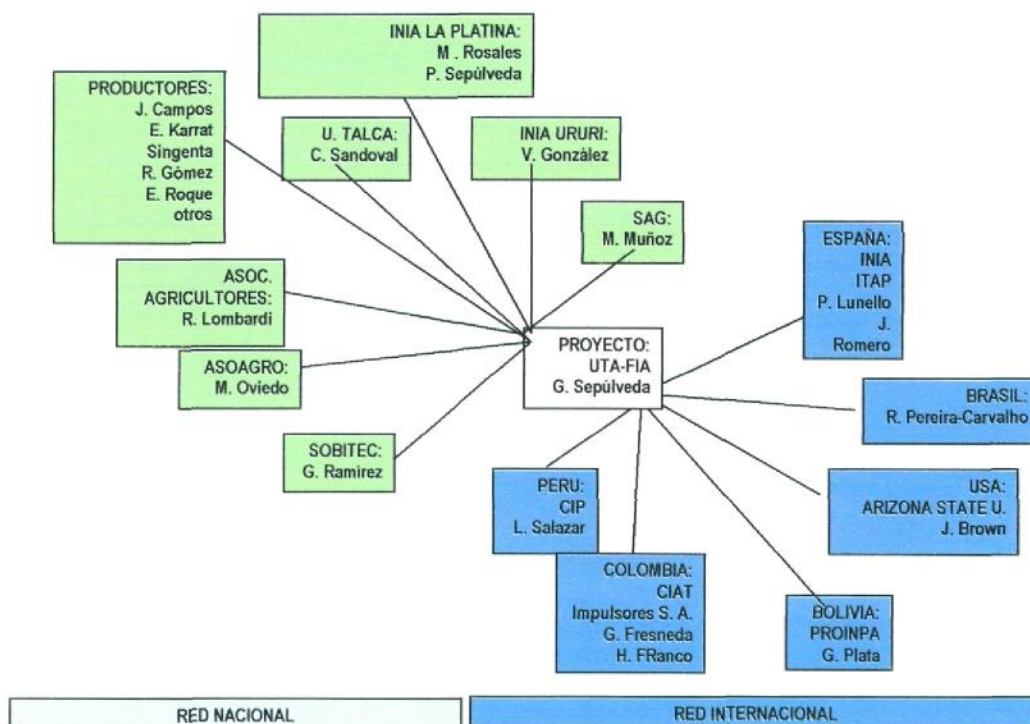
Así mismo, el movimiento de los trabajadores de un cultivo a otro es una fuente importante de diseminación de la enfermedad y si consideramos aún más, que en el valle de Azapa no son frecuentes las prácticas de desinfección de manos, ropas y herramientas entre un cultivo y otro. La baja incidencia de enfermedades virales que se transmiten mecánicamente en cultivos bajo invernadero se puede deber fundamentalmente a dos factores:

- Medidas profilácticas: la desinfección de manos y herramientas, eliminación de restos de poda y cosecha se realiza rigurosamente.
- Restricción de ingreso: designación de personal específico para trabajar en invernaderos. Estos solamente trabajan dentro y no tienen contacto con cultivos al aire libre.

SECCIÓN 5 : ESTABLECIMIENTO DE REDES DE TRABAJO INTERNACIONAL Y NACIONAL

Producto de la interacción del Proyecto a través de los integrantes del equipo técnico con otras unidades de trabajo en el país y en otros países, se estableció, informalmente una instancia colaborativa y de intercambio de información. De esta forma, a través de diferentes profesionales e investigadores se conformó una red de trabajo. Esta red, contribuyó a la consecución de las metas y objetivos planteados. El objetivo principal de esta red informal se tradujo en fomentar la cooperación en la investigación aplicada y el desarrollo tecnológico para la obtención de resultados científicos y tecnológicos transferibles al sistema productivo y facilitar la modernización productiva y mejorar la calidad de vida de los productores de hortalizas en general.

En el marco funcional los participantes individuales se constituyeron en nodos interactivos independientes y contribuyeron a enriquecer la actividad del proyecto. El siguiente esquema muestra la conformación de la red establecida (país, institución y representantes).



Especialistas que visitaron el Proyecto durante el período de ejecución.

Especialista	Institución, País
Pablo Lunello	INIA Madrid, España
Claudio Sandoval Briones	Universidad de Talca, Chile
Paulina Sepúlveda Briones	INIA La Platina, Chile
Marlene Rosales Villavicencio	INIA La Platina, Chile
Judith Brown	Arizona State University, EE UU.
Giovanna Plata	Proinpa, Bolivia
Anniek Schilder	Michigan State University, EE UU
David Cohen	Embajador de Israel en Chile, Israel
Marco Muñoz	SAG, Chile
Francisco Morales	Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Director Programa MIP Mosca Blanca Tropical. Colombia
Julio Muro Erreguerena	Universidad Pública de Navarra, España
Miguel Urresturazu	Universidad de Almeria, España
Luis Rios Cofré	Semillas Latinoamericanas
Tomas Stevenson	Pioneer S. A.
Guillermo Fresneda	Impulsores Internacionales. Colombia
German Sanchez	Corpoica, Colombia
Srs. Yoshiro Obatake, Félix Blu y Celso Netto	Production Administrative Manager, Production Manager y Gerente General de la Empresa Sakata Seed Chile S. A., respectivamente
William Dolezal	Research fellow de la empresa Pioneer S. A.
J. C. Magunacelaya	ONTA (Organización de Nematólogos del Trópico Americano)

Con la interacción de la red, fue posible desarrollar trabajos de microscopía electrónica, permitiendo la caracterización morfológica de los principales virus. Con esto se documentó fotográficamente las virosis de mayor importancia. Actualmente existen contactos con el Dr. P. Arce – Jhonson, para a través de su gestión, acceder al microscopio electrónico de la U. Católica, en Santiago, Chile. Esto es complementario a los trabajos aportados por el Dr. Pablo Lunello, quien hizo una serie de fotografías electrónicas de transmisión, en las instalaciones del Instituto Técnico Agronómico provincial de Albacete ITAP, del Servicio de Diagnóstico Fitosanitario SEDAF, España.



Figura 4. Algunas instancias de trabajo colaborativo entre diferentes profesionales y científicos virólogos. A: Dr. Giovana Plata y su equipo PROINPA – Bolivia; B: Parte del equipo técnico del proyecto junto a Paulina Sepúlveda (INIA La Platina), Dr. Claudio Sandoval (U. Talca), Dra. J. Brown (Arizona S. U.), Dra. Marlene Rosales (INIA La Platina); C: Parte del equipo técnico junto a representantes de la I. Municipalidad de Camiña durante una actividad de difusión - Capacitación.

En el marco del proyecto, se desarrollaron dos iniciativas independientes, estas fueron:

* “XVI Curso Internacional Teórico Práctico sobre Detección e Identificación de Virus, Viroides y Fitoplasmas”, organizado por Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), el cual se llevará a cabo los días 13 – 25 de Noviembre de 2006 en la ciudad de Madrid, España. Se postuló al Programa de Internacionalización de Proyectos de Innovación Agraria 2006, siendo aprobado y ejecutado a conformidad con el contrato.

* “Consultoría en Virología Vegetal Avanzada”, propuesta a la Tercera Convocatoria de Internacionalización de Proyectos de Innovación, impulsada por FIA, y aprobada con el código PROPUESTA FIC-CO-C-2007-3-A-003

VISITA DE LA DRA. ANNEMIEK C. SCHILDER. Associate Professor, Department of Plant pathology, Michigan State University

El Departamento de Recursos Ambientales de la Facultad de Ciencias Agronómicas, en su estrategia de vinculación internacional, recibió la visita de la Dra. Schilder, científica del Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Michigan, USA, quien desarrolló una intensa agenda de actividades. Se entrevistó con el Decano de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Sr. Eugenio Doussoulín Escobar en la perspectiva de establecer un convenio marco entre la U. y nuestra casa de estudios superiores, en virtud del cual se concretarían iniciativas de intercambio estudiantil y de científicos de ambas instituciones. Seguidamente, la Dra. Schilder visitó diferentes realidades productivas del valle de Azapa, entre ellas empresa productoras de tomate, de olivos y e aceitunas, conoció sistemas de compostaje,. A la vez y junto a parte del equipo técnico del proyecto FIA "Implementación de un sistema de diagnóstico de virus en tomate", se vinculó con la exitosa experiencia de un segundo proyecto FIA, desarrollado por la agrupación indígena Flor del Mañana y que busca establecer y promover el cultivo de nuevas especies de flores en la región.



Figura 12. Al centro la Dra. Schilder, junto a estudiantes y académicos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá.

ESTRATEGIAS DE IDENTIFICACION.

a. Diagnóstico mediante técnicas inmunológicas.

Con la experiencia adquirida en diagnóstico e identificación a través del uso de anticuerpos mono y policlonales, se estableció como trabajo rutinario el diagnóstico con el metodo ELISA y algunas de sus variantes.

b. Diagnóstico molecular

En esta etapa, se implementaron las técnicas para ejecutar estudios moleculares a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las etapas anteriores se realizaron pruebas preliminares, que permitieron detectar eventuales dificultades y corregir errores de los procesos.

Los metodos no se indicarán en esta oportunidad, considerando que fueron presentados detalladamente en los informes anteriores. Para mantener la coherencia del informe, se indica que la Extracción de RNAs totales desde tejido vegetal se hizo de acuerdo a los protocolos propuestos por Bertheau y colaboradores (1998).

El genoma de los Begomovirus puede estar formado por una o dos moléculas diferentes de DNA circular de cadena sencilla. En los estudios realizados en el marco del proyecto, se utilizaron partidores universales que amplifican a ambos grupos.

Los partidores usados fueron descritos en Wyatt, S.D., and J.K. Brown. 1996. *Phytopathology* 86: 1288-1293, que amplifican un fragmento de aproximadamente ~ 576 – 579 bp de la proteína de cubierta viral.

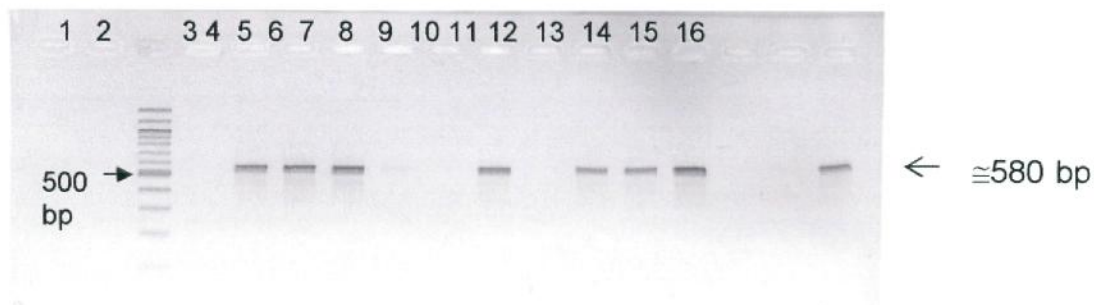


Figura 5. Productos de PCR amplificados con partidores para la detección universal de geminivirus (Wyatt, S.D., and J.K. Brown. 1996). Se amplifico un fragmento de aproximadamente ~576 - 579 bp de la proteína de cubierta viral.

Caracterización de los síntomas

El sistema productivo de tomate en el valle de Azapa, responde a una relativa homogenidad genética, considerando que el híbrido imperante, cultivado en más del 95 % de la superficie corresponde a Naomi[®], distribuido por Bioamérica S. A. Esta situación hace particularmente vulnerable a este sistema productivo ya que se está repitiendo el clásico y dramático ejemplo de las llamadas “hambrunas irlandesas”. En el caso específico del valle de Azapa, presiones económico – productivas hacen del híbrido Naomi[®] el más adaptado a la estrategia productiva, al transporte y comercialización, pero lo hace especialmente susceptible a las virosis presentadas y estudiadas en este proyecto.

La caracterización de síntomas se orientó principalmente al estudio de éstos sobre el híbrido Naomi[®]. resulta notable que los híbridos evaluados en estas últimas tres campañas, presenten diferente patrón sintomático, resultando algunos de ellos, muy afectados llegando incluso a la muerte de las plantas, mientras que otros híbridos resultan tolerantes y prácticamente no manifiestan síntomas.

Algunas de las casas semilleras que están evaluando híbridos de tomate temporada a temporada son: Semillas BHN (a través de Semillas Latinoamericanas); Sakata Seeds; Syngenta Seeds; Hazera (a través de ANASAC S. A.); Alliance Seeds. Cada una de estas casas semilleras evalúan del orden de 40 materiales en ensayos independientes temporada a temporada. Esto hace que en el valle de Azapa se evalúen del orden de 150 híbridos cada temporada. Las casas semilleras evalúan sistemáticamente estos materiales, considerando no solo aspectos fitosanitarios (manifestación de síntomas de virosis, resistencia a Fusarium 1, 2, resistencia a nematodos fitoparásitos, resistencia a Botrytis cinerea, Oidium sp.), sino que aspectos agronómicos, tales como días a primera flor, días a primer corte, calibre, consistencia, número de fruta por racimo, número de racimos, duración de la fruta en postcosecha y otros aspectos. Un elemento crítico es, precisamente la duración de la fruta en postcosecha, considerando que el transporte de la producción se realiza vía terrestre a las ciudades consumidoras, principalmente el Área Metropolitana de Santiago, Concepción, Viña del Mar – Valparaíso, Antofagasta, Calama y otros. Al considerar la distancia que separa a estas ciudades de la zona productora de Arica, resulta fundamental que los híbridos seleccionados cumplan con esta característica.

De esta forma, cada casa semillera posee a la fecha un híbrido candidato que eventualmente podría desplazar al híbrido dominante. No obstante esto, el equipo técnico del proyecto ha planteado la necesidad de seleccionar varios híbridos que cumplan con los requisitos agronómicos y fitosanitarios mínimos, de modo que en el valle de Azapa se reduzca la homogenidad genética y evite, de esa manera, la susceptibilidad de los cultivos no solo a las enfermedades virales, sino a otras enfermedades vegetales.

VISION SINOPTICA DE LAS EVALUACIONES DE HIBRIDOS EN EL VALLE DE AZAPA.



Figura 6. Vista general de la parte media del Valle de Azapa. En primer plano: cultivos de tomate.

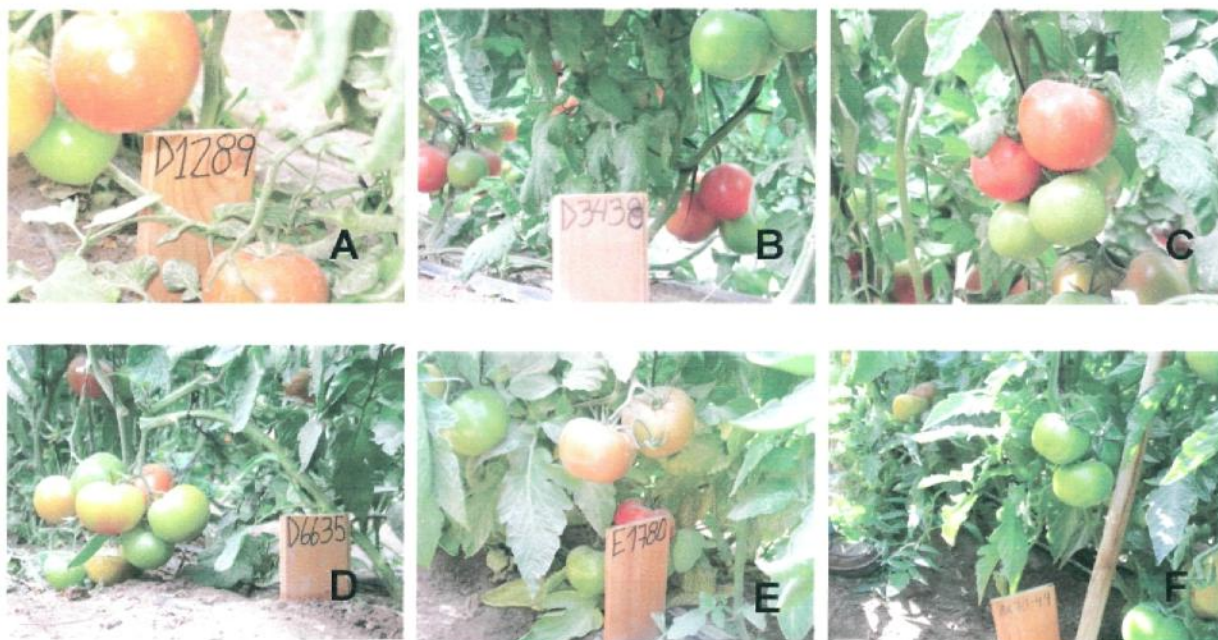


Figura 7. Algunos híbridos evaluados en la temporada 2008-2009 en el valle de Azapa. A: Híbrido D1289; B: Híbrido D 3438; C: Híbrido 1346; D: Híbrido D 6635; E: Híbrido E 1780; F: Híbrido AX 7049.

Los parámetros considerados en la evaluación de los diferentes cultivares son: comportamiento en almaciguera (% de germinación y vigor), porcentaje de plantas

establecidas, desarrollo de plantas a los 30, 60 y 90 días, días a primera flor, distancia y disposición de los racimos florales, vigor de la planta, número de frutos por racimo, número de racimos por planta, diámetro ecuatorial/polar, días a cosecha de primer racimo, duración de la fruta en post cosecha, y resistencia a plagas y enfermedades, rendimiento, rendimiento por calibre (primera, segunda, tercera). Debido a que la información que se genera en cada evaluación tiene un alto valor comercial, las diferentes compañías mantienen resguardada tal información. Si bien es cierto, parte de la información es de dominio público, la información clave se mantiene restringida.

En general, el patrón sintomatológico de los virus que afectan tomate en el valle de Azapa fueron: 1. Amaratamiento de venas y de folíolos apicales (prevalencia de pigmentos antocianínicos); 2. Acucharamiento de folíolos; 3. Abullonamiento de folíolos; 4. Enanismo; 5. Manchado de frutos.



Figura 8: Síntomas de Begomovirus en plantas de tomate cv Naomi. A: hojas distorcionadas y “acucharadas”; B: brotes azules en plantas de tomate.

Las observaciones de campo muestran que buena parte del descarte (fruta rechazada que no tiene posibilidades de comercialización), es eliminada desordenadamente conformando importantes focos de contaminación biológica, tal como se presenta en la imagen.



Figura 9. En primer plano, la Dra. Giovanna Plata acompañada de una estudiante de intercambio y productores de tomate. En segundo plano, un cúmulo de descarte de tomate. En tercer plano, invernadero con malla antivectores.



Figura 10. Vista general de un invernadero de 3,5 ha cubierto con malla antivector. Azapa, km 19, agricultor Sr. S. Truffa

Un aspecto complementario y que se incorporó al desarrollo del proyecto fue la evaluación de sistemas de control y manejo de insectos plaga vectores de virus. Un producto evaluado, aun cuando se presenta como un controlador de hongos en las plantas, fue Bellis el cual corresponde a una mezcla de boscalid y pyraclostrobin. Boscalid tiene acción sistémica, protectora y curativa. Los ingredientes activos de Bellis controlan los hongos actuando sobre las diferentes etapas de su desarrollo, inhibiendo de manera significativa la germinación de conidias (esporas); el crecimiento del tubo germinativo; la esporulación; la

formación de apresorios y el desarrollo del micelio. No obstante el planteamiento hipotético, que dice que Bellis genera respuesta sistémica adquirida – SAR – esta no fue confirmada, sugiriendo repetir la experiencia con abordajes más detallados. Parte de la información generada se presenta en el anexo 4.

SECCIÓN 6 : FICHAS TECNICAS Y ANALISIS ECONOMICO

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).
- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.
- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.
- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

Ficha técnica del cultivo:

La estructura de costos de tomate se puede definir de acuerdo al nivel tecnológico de los productores, distinguiendo tres niveles tecnológicos, definidos en términos de los insumos que utilizan (cantidad y calidad), lo cual se refleja directamente en los niveles productivos logrados, de acuerdo a la siguiente tabla, proyectada a una superficie de cinco hectáreas:

ITEM	NIVEL TECNOLÓGICO		
	ALTO	MEDIO	BAJO
Semilla	8.692.005.-	5.056.200.-	3.651.700.-
Maq. Agrícola	318.000.-	318.000.-	318.000.-
Fertilizantes	5.618.000.-	3.370.800.-	2.247.200.-
Pesticidas	5.618.000.-	2.809.000.-	1.123.600.-
Mano de obra	15.730.400.-	6.741.600.-	4.494.400.-
Abonos orgánicos	6.741.600.-	3.370.800.-	1.685.400.-
Otros	5.618.000.-	3.932.600.-	1.685.400.-
SubTotal	48.336.005.-	25.599.000.-	15.205.700.-
Imprevistos 10 %	4.833.600.-	2.559.900.-	1.520.570.-
TOTAL	53.169.605.-	28.158.900.-	16.726.270.-
Rendimiento (kg)	800.000.-	500.000.-	250.000.-
PRECIO VENTA			
Precio máximo	200	200	200
Precio mínimo	100	100	100
Ingreso máximo	160.000.000	100.000.000	50.000.000
Ingreso mínimo	80.000.000	50.000.000	25.000.000
Utilidad máxima	106.830.395.-	71.841.100.-	33.273.730.-
Utilidad mínima	26.830.395.-	21.841.100.-	8.273.730.-
Utilidad media	66.830.395	46.841.100.-	20.773.730.-

II. PROYECCIÓN SITUACIÓN CON PROYECTO (5 HA)

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1.ENTRADAS	19.660.000	42.600.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000
Subtotal Entradas	19.660.000	42.600.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000
Inversión	8.300.000					
Re- Inversión		17.990.000	27.675.000	27.675.000	27.675.000	27.675.000
Costos fijos						
2. SALIDAS						
2.1. Costos fijos de laboratorio y equipos	11.680.000	11.680.000	12.320.000	12.320.000	12.320.000	12.320.000
Terrenos	0	0	0	0	0	0
Costos Variables						
2.2. Gastos de Operación	5.288.000	8.288.000	2.288.000	2.288.000	2.288.000	2.288.000
2.3. Otros Gastos	300.000	300.000	300.000	300.000	300.000	300.000
Alcohol, algodón, material de vidrio, etc.						
Subtotal Salidas	(25.568.000)	(38.258.000)	(42.583.000)	(42.583.000)	(42.583.000)	(42.583.000)
3. BENEFICIOS NETOS	(23.602.000)	21.732.000	22.972.000	22.972.000	22.972.000	22.972.000
TOTALES (1-2)						
Utilidad Antes de Impuesto	(23.602.000)	21.732.000	22.972.000	22.972.000	22.972.000	22.972.000
Impuesto a la Renta (15%)	(3.540.300)	(3.259.800)	(3.445.800)	(3.445.800)	(3.445.800)	(3.445.800)
Utilidad después de Impuesto	(27.142.300)	18.472.200	19.526.200	19.526.200	19.526.200	19.526.200
VAN (10%)	41.744.184					
TIR	64,43					

III. FLUJO DE FONDOS DEL PROYECTO

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1. SUBTOTAL ENTRADAS SIN PROYECTO	6.555.000	14.200.000	21.850.000	21.850.000	21.850.000	21.850.000
2. SUBTOTAL ENTRADAS CON PROYECTO	19.660.000	42.600.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000	65.535.000
3. ENTRADAS TOTALES (2-1)	13.105.000	28.400.000	43.685.000	43.685.000	43.685.000	43.685.000
4. SUBTOTAL SALIDAS SIN PROYECTO	2.970.000	6.435.000	9.900.000	9.900.000	9.900.000	9.900.000
5. SUBTOTAL SALIDAS CON PROYECTO	8.300.000	17.990.000	27.675.000	27.675.000	27.675.000	27.675.000
6. SALIDAS TOTALES (5-4)	5.330.000	11.555.000	17.775.000	17.775.000	17.775.000	17.775.000
7. BENEFICIOS NETOS INCREMENTALES DEL PROYECTO (3-6)	7.775.000	16.845.000	25.910.000	25.910.000	25.910.000	25.910.000
8. BENEFICIOS NETOS TOTALES CON PROYECTO (2-5)	(37.290.000)	9.229.000	20.742.000	20.014.000	20.014.000	20.014.000
9. BENEFICIOS NETOS TOTALES CON PROYECTO DESPUÉS DEL IMPUESTO	(42.883.500)	7.844.650	17.630.700	17.011.900	17.011.900	17.011.900
VAN (10%)	12.529.570					
TIR	20,75					

ANÁLISIS FINANCIERO DEL LABORATORIO – DERIVADO DEL PROYECTO

La implementación del proyecto satisface la demanda de un sector de productores de tomate y empresas distribuidoras de semillas. Los beneficiarios – agrupados en la Sociedad Agrícola del Norte – adquirieron experiencia en la necesidad de diagnóstico viral. La demanda de servicios fue soportada por el proyecto y se trabaja con una demanda de 10 muestras mensuales, cantidad que se espera aumente a medida que la necesidad de servicio se arraigue en el sector. Considerando un precio de US \$ 5 por PCR (por evaluación de muestra), o sea, \$ 3.000.-, más 30 % como costo de marca UTA (\$ 3.900), se espera un ingreso por ese concepto de \$ 39.000.- al mes.

II.PROBLEMAS ENFRENTADOS

Problemas enfrentados durante el período informado:

Origen problema	Descripción
Legales	No se presentaron
Técnicos	No se presentaron
Administrativos	Dificultades para la compra de insumos y reactivos
De gestión	No se presentaron.

Medidas correctivas para los problemas identificados anteriormente.

Origen problema	Descripción
Administrativos	Se fortaleció la coordinación entre los encargados de adquisiciones del sistema central de compras de la Universidad de Tarapacá. No obstante los esfuerzos de coordinación, las dificultades administrativas adquirieron un peso tal, que en algunos casos, la gestión d el proyecto se redujo a solucionar los procesos administrativos.

III. ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN

El desarrollo del proyecto estuvo orientado a sostener una estrategia de difusión de los resultados y actividades obtenidas en el marco del proyecto, considerando una serie de actividades de difusión y capacitación hacia los productores y profesionales relacionados con el sector. A saber:

Charlas Técnicas: Se dictaron 3 charlas técnicas dirigidas a productores, técnicos y profesionales de la región de Arica y Parinacota. Estas se realizaron en los siguientes tiempos

Días de Campo: Se realizaron tres actividades de esta naturaleza; una (1) durante el segundo año y dos (2), durante el tercer año del proyecto, aprovechando los módulos de validación, en cada uno de los sectores del valle.

Boletines técnicos: Con la finalidad de entregar información a la comunidad productiva, con los resultados del proyecto, se editaron 6 boletines técnicos, donde se indicaron los protocolos para el manejo de enfermedades.

Página WEB: No se construyó.

Seminario: Se realizaron dos seminarios. Uno durante el año dos del proyecto, con el propósito de dar a conocer los alcances del proyecto para los productores y uno al término del año tres con la finalidad de entregar resultados y avances del proyecto.

Presentaciones a congresos: Se considero pertinente presentar los avances y resultados del proyecto en congresos profesionales con el propósito de comunicar a la sociedad científica nacional e internacional, los logros alcanzados.

Debido a los nexos permanentes que el equipo técnico mantiene con los agricultores de Agrícola del Norte, se considero que los mecanismos de difusión de los resultados del proyecto serán promovidos y facilitados por esta interacción. De esta forma, los beneficiarios indirectos del proyecto serán los agricultores asociados a Agrícola del Norte y profesionales del sector agrícola.

Por último, entre los beneficiarios indirectos, se consideran a todos los productores del valle de Azapa, quienes desarrollan el rubro olivícola considerado en esta propuesta. Adicionalmente, son beneficiarios indirectos, todos los técnicos y profesionales de empresas del sector privado y público ligado a la transferencia tecnológica, por cuanto los resultados serán traspasados íntegramente y sin costo alguno a estos sectores.

Además, el proyecto se difundió a través de la Radio y de la Página Web de la Universidad de Tarapacá

El seminario – taller consideró la participación de la Dra. Judith Brwon, Universidad de Arizona, Estados Unidos, quien posee amplia experiencia en la caracterización del complejo Begomovirus – Mosquita Blanca (se anexa cv.). Además, participaron de él la Dra. Marlene Rosales, la fitopatóloga Paulina Sepúlveda (ambas del CRI INIA La Platina), el Dr. Claudio Sandoval (U. Talca) y el equipo técnico del proyecto a través del Dr. Germán Sepúlveda. La orientación del seminario fue entregar antecedentes generales, de manjo – control de Bemisia tabaci y los Begomovirus (se anexan presentaciones). La participación fue notable, con participación del sector productivo y comunidad en general.

OTROS ASPECTOS Y LOGROS

En el contexto general del proyecto, se concretó una segunda misión exploratoria y de difusión, cimentando aún más los vínculos con el sector productivo del valle de Camiña, articulados con la Sociedad Agrícola de Camiña. De esta forma, se generó una externalidad importante al proyectar la experiencia acumulada en el período de ejecución del proyecto, hacia otros sistemas productivos. Hoy se trabaja en la formulación de un proyecto integral orientado a mejorar las condiciones productivas de ajo y cebolla de Camiña. El equipo técnico concuerda plenamente en el valor intrínseco que tiene el material biológico cultivado en estos aislados valles precordilleranos, valor que se maximiza al considerar las necesidades de incorporar nuevos genes a las variedades e híbridos que requiere la agricultura moderna. Esa es, precisamente, la justificación y el argumento básico en el plan de mejoramiento que debe ser incorporado a estos deprimidos sistemas productivos.

El protecto FIA-PI-C-2005-1-A-036 ha contribuido sustantivamente a ello.

Durante la actividad de capacitación desarrollada con los productores y productoras de ajo y cebolla de Camiña y localidades aledañas, se comprobó el interés por recibir capacitación y, así mismo, la necesidad de establecer programas sistemáticos de tecnificación de los cultivos. Ello, sin duda requiere de un soporte administrativo ágil y dinámico. En la oportunidad se trabajó con instrumentos ópticos, mostrando la realidad microscópica que está limitando el desarrollo y el éxito comercial de los cultivos.

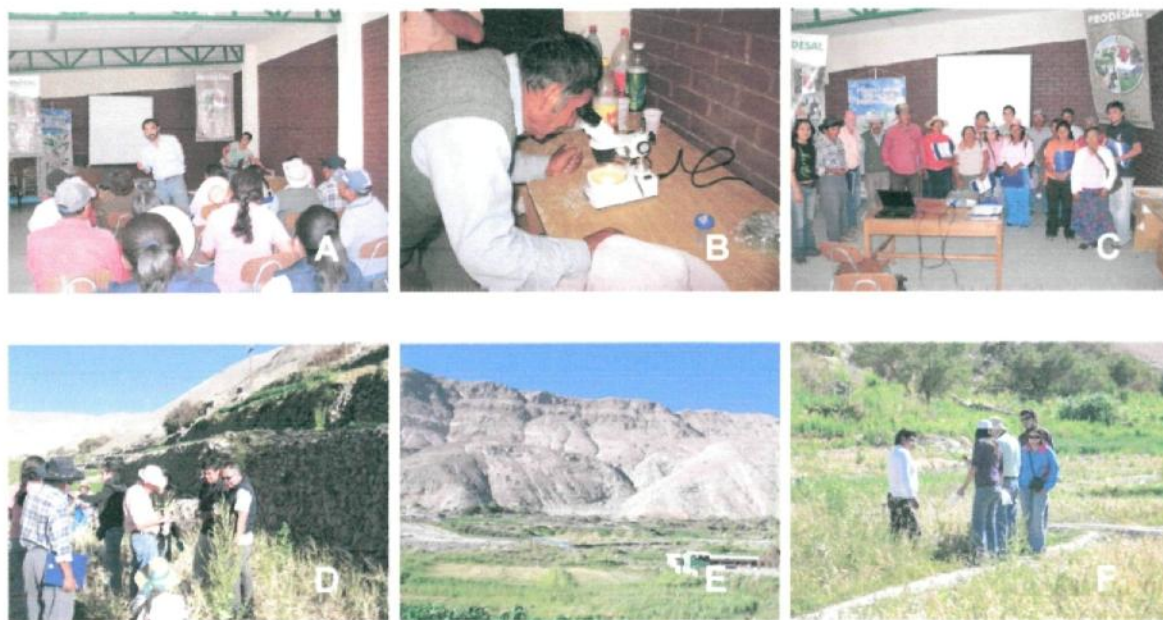


Figura 11. Algunos registros fotográficos de la segunda misión técnica al valle de Camiña. A: Vista general de la reunión entre el equipo técnico y los agricultores; B: Agricultor trabajando con microscopio; C: algunos participantes de la reunión de trabajo; D: Grupo de trabajo en campo; E: Vista general de la parte media del valle; F: Explicaciones en terreno de técnicas de muestreo.

En la actividad de difusión y transferencia tecnológica a productores del pueblo de Camiña y Nama se entregó material escrito generado con el proyecto (incluido en el cuarto informe técnico y de gestión). Se hicieron sugerencias técnicas en reunión general y en terreno, orientaciones fitosanitarias para reducir el impacto de enfermedades virales en ajo, orientación en la selección de material propagativo en ajo y cebolla, sugerencias de manejo agronómico en aspectos de preparación de suelo, riego, fertilización y manejo fitosanitario. No obstante esto, se detectó la necesidad de alfabetización de la comunidad en general, ya que un número significativo de productores se puede definir como analfabeto por desuso. Esta es una segunda externalidad que se desprende de las actividades del proyecto. Inmediatamente se sugiere incorporar algún programa de alfabetización de adultos.

Colaboración Universidad de Tarapacá – Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA – La Platina

El nexo de trabajo colaborativo establecido con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, CRI INIA – La Platina, se reforzó a través de los trabajos desarrollados en esta etapa. De hecho, con la creación de la oficina regional INIA URURI, se están potenciando acciones conjuntas en términos de apoyar sistemáticamente el desarrollo de la agricultura en los exigentes valles cultivados del norte grande de Chile.

Como resultado de esto, actualmente se coordinan acciones entre ambas instituciones (INIA y UTA). Esto es una tercera externalidad del proyecto.

Un cuarto efecto no dimensionado inicialmente, es que gracias a gestiones de la Dra. M. Rosales se concretó la visita de la especialista en Geminivirus de Arizona State University, Dra. Judith Brown, quien participó del seminario a indicado y presentó sus avances en el XX Congreso latinoamericano de fitopatología, con lo cual, la comunidad fitopatológica latinoamericana y chilena, accedieron a tal información y conocimientos.

Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.
- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio Consultas de Laboratorio	Estimación visual de síntomas de enfermedades virales en tomate	50 a 60 consultas de productores para identificar enfermedadse virales	Se incrementó significativamente la consulta por enfermedadse virales
Producción (<i>por producto</i>) Numero de consultas y orientaciones técnicas	Se solicitaban 10 asesorías al año	Se solicitan 50 asesorías al año	Incremento del 400 %
Costos de producción			
Ventas y/o Ingresos			
<i>Nacional</i>			
<i>Internacional</i>			
Convenios comerciales			

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual			
Nuevos empleos generados	0	4	+ 4
Con el proyecto se generaron capacidades humanas que quedaron establecidas en la región. Las personas que prestaban servicios en el proyecto y que adquirieron competencias en el trabajo de laboratorio, fueron reclutadas por le empresa privada, desarrollando actividades técnico profesionales en el marco del entrenamiento y formación recibida con el prproyecto.			
Productores o unidades de negocio replicadas			
El impacto de apoyar la sustentabilidad de las 450 hectáreas cultivadas con tomates, representa el 30% de las de las 1.500 hectáreas cultivables, lo que se traduce en generar un impacto fuertemente positivo y difícil de cuantificar por concepto de fuerza laboral empleada. La cesantía es una de la preocupaciones primordiales de las autoridades regionales, especialmente en la provincia de Arica. Dado que el cultivo de hortalizas (principalmente tomate) utiliza más mano de obra que otros cultivos alternativos (por ejemplo olivos), al ser sustentable el rubro, ahí mayor uso de mano de obra en la provincia. El costo social que esta mayor mano de obra implica, ya está			

considerado al corregir el precio privado por el factor de ajuste social que entrega MIDEPLAN; sin embargo, este ajuste no considera la externalidad positiva de disminuir la cesantía, al bajar el índice de robos, delincuencia y otros flagelos asociados al desempleo.

Actualmente, considerando la superficie bajo malla anti vector más la superficie que aún se cultiva al aire libre, se suman unas 800 ha, lo que significa un incremento del 77 % de la superficie cultivada. Si bien el incremento no responde exclusivamente al efecto de las medidas mitigadoras de las enfermedades virales, éstas contribuyen a mantener la sustentabilidad del sistema productivo, con toda las externalidades correspondientes, incluidos los efectos de mayores requerimientos de recursos humanos y mano de obra. Así, el impacto social es tangible y de efecto multiplicativo.

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto				
Proceso	0	50		
Servicio				
Con el proyecto se consiguió establecer el servicio de análisis de identificación de virus en tomate. Las técnicas fueron incorporadas al proceso habitual del laboratorio y se cuenta con la capacidad para procesar un gran número de muestras.				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar		
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		
No corresponde		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica		
Generación nuevos proyectos	01	En colaboración con el INIA La Platina, se accedió a un proyecto que busca caracterizar detalladamente el begomovirus ToYVSV detectado con el proyecto

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones		
(<i>Por Ranking</i>)		
Eventos de divulgación científica	08	
XLVIII Convención Nacional de Entomología del Perú	Lima los días 26 a 30 de noviembre, 2006	"Avance preliminar de epidemiología de geminivirus asociados a mosquitos blancos (<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) y <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) (hemíptera: aleyrodidae)) en el cultivo de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.), en el valle de Azapa: primer aporte"
XVI Congreso de la Sociedad chilena de Fitopatología.	La Serena, 14 al 17 de noviembre de 2006.	"Monitoreo de las principales enfermedades virales que afectan al cultivo de tomate en el valle de Azapa, I Región Chile".
XVII Congreso de la sociedad chilena de Fitopatología	Facultad de Ciencias Forestales - Universidad de Concepción	Diagnóstico de enfermedades virales en tomate en el valle de Azapa: resultados de la segunda temporada
XX Congreso peruano de fitopatología	Arequipa, 27 al 30 de agosto de 2008, Perú	"Presencia de un Begomovirus en tomate en el extremo norte de Chile"
XX Congreso peruano de fitopatología	Arequipa, 27 al 30 de agosto de 2008, Perú	"Algunos antecedentes epidemiológicos del virus del mosaico del pepino (Pepino mosaic virus, PepMV) en tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) cv Naomi, en el valle de Azapa, Chile"
XV Congreso Latinoamericano de Fitopatología XVIII Congreso chileno de Fitopatología	Santiago, 12 al 16 de enero de 2009, Chile	"Epidemiología del <i>pepino dulce mosaic virus</i> (pepmv) en tomate (<i>lycopersicon sculentum</i> mill.) cv naomi, en el valle de azapa, chile"
Seminario Internacional de tomate en el trópico.	Villa de Leyva, 9 al 13 de septiembre de 2008, Colombia	"Impacto y estrategias de manejo de Begomovirus y <i>Bemisia tabaci</i> en el extremo norte de Chile"
APS Centennial Meeting	Minnesota, July 26 -	"Begomovirus infecting tomato crops

	30, 2008, USA	in the north of Chile" S135
Integración a redes de investigación	01	Red de articulación entre instituciones nacionales e internacionales y la unidad ejecutora, aún es una red informal.

Con estas acciones, los resultados generados, el proyecto y las instituciones involucradas se difundieron ampliamente. Con todo, se logró fortalecer los vínculos entre el sector productivo y organismos públicos (FIA y universidad de Tarapacá) y Fomentar la cooperación internacional. Estos dos aspectos fueron, precisamente, dos objetivos planteados en la formulación original, los que se deben dar como cabalmente cumplidos.

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado		
Ingeniero Agrónomo		"Algunos antecedentes epidemiológicos del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en tomate variedad Naomi, en el valle de Azapa" P. Cid Menay y C. Cossio Cornejo. Arica, Universidad de Tarapacá.
Ingeniero agrónomo		"Prospección del TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus), su vector <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) y otros virus en el cultivo del tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) y malezas asociadas en el valle de Azapa".
Tesis postgrado		
Pasantías		* "Consultoría en Virología Vegetal Avanzada", propuesta a la Tercera Convocatoria de Internacionalización de Proyectos de Innovación, impulsada por FIA, y aprobada con el código PROPUESTA FIC-CO-C-2007-3-A-003
Cursos de capacitación		* "XVI Curso Internacional Teórico Práctico sobre Detección e Identificación de Virus, Viroides y Fitoplasmas", organizado por Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), el cual se llevará a cabo los días 13 – 25 de Noviembre de 2006 en la ciudad de Madrid, España. Se postuló al Programa de Internacionalización de Proyectos de Innovación Agraria 2006, siendo aprobado y ejecutado a conformidad con el contrato.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

En el proyecto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Establecer estrategias de prevención y manejo de enfermedades virales en hortalizas.
- Generar nuevas líneas de trabajo tanto en tomate como en otros cultivos hortícolas.
- Optimizar las técnicas de diagnóstico molecular y serológico para enfermedades causadas por virus.
- Ampliar el espectro de diagnóstico a otros agentes fitopatógenos tales como fitoplasmas.
- Fortalecer los vínculos entre el sector productivo y organismos públicos (FIA y universidad de Tarapacá).
- Fomentar la cooperación internacional.

En una visión retrospectiva de la propuesta, se concluye que los objetivos planteados se cumplieron a cabalidad, generando importantes externalidades positivas, tanto institucionales, profesionales, y productivas.

Queda establecido un laboratorio de virología vegetal, el cual se inserta en el laboratorio de fitopatología de una Universidad regional, potenciando el desarrollo regional y la descentralización.

Quedan establecidas capacidades humanas en la región. Se debe mencionar que la Ing. Agrónomo Srta. Monica Rojas Jara, fue reclutada por la empresa Pioneer S. A. para impulsar el laboratorio de semillas y patología. Sin duda, con ello, las instancias públicas de educación cumplen con su inspiración básica cual es apoyar el desarrollo de las personas y se confirma el rol fundamental de movilidad social. Ello no se hubiese conseguido sin el impulso del proyecto y de la Fundación para la Innovación Agraria.

Con la información generada, se abren nuevos desafíos que serán canalizados adecuadamente, conforme existan las instancias participativas y el apoyo financiero de las entidades correspondientes.

- Se abordaron algunos aspectos epidemiológicos y moleculares de los principales virus presentes en el valle de Azapa, sintomatología y formas de transmisión entre ellas insectos vectores y labores culturales.
- En esta etapa se desarrollaron estudios específicos de diagnóstico molecular y secuenciamiento y evaluaciones biológicas con plantas indicadoras (pruebas de transmisibilidad y evaluación de síntomas).

- Se estableció un fuerte programa de difusión, generando de esta manera un gran efecto en los agricultores, los cuales ya están implementando medidas preventivas para evitar la propagación de enfermedades virales dentro de sus cultivos.
- Así mismo se generaron vínculos con distintas instituciones del Ministerio de Agricultura con el objetivo de establecer un trabajo interinstitucional y abordar el problema desde un enfoque integral
- Se puede afirmar que el proyecto avanza conforme lo planificado y se están generando nuevas líneas de trabajo.

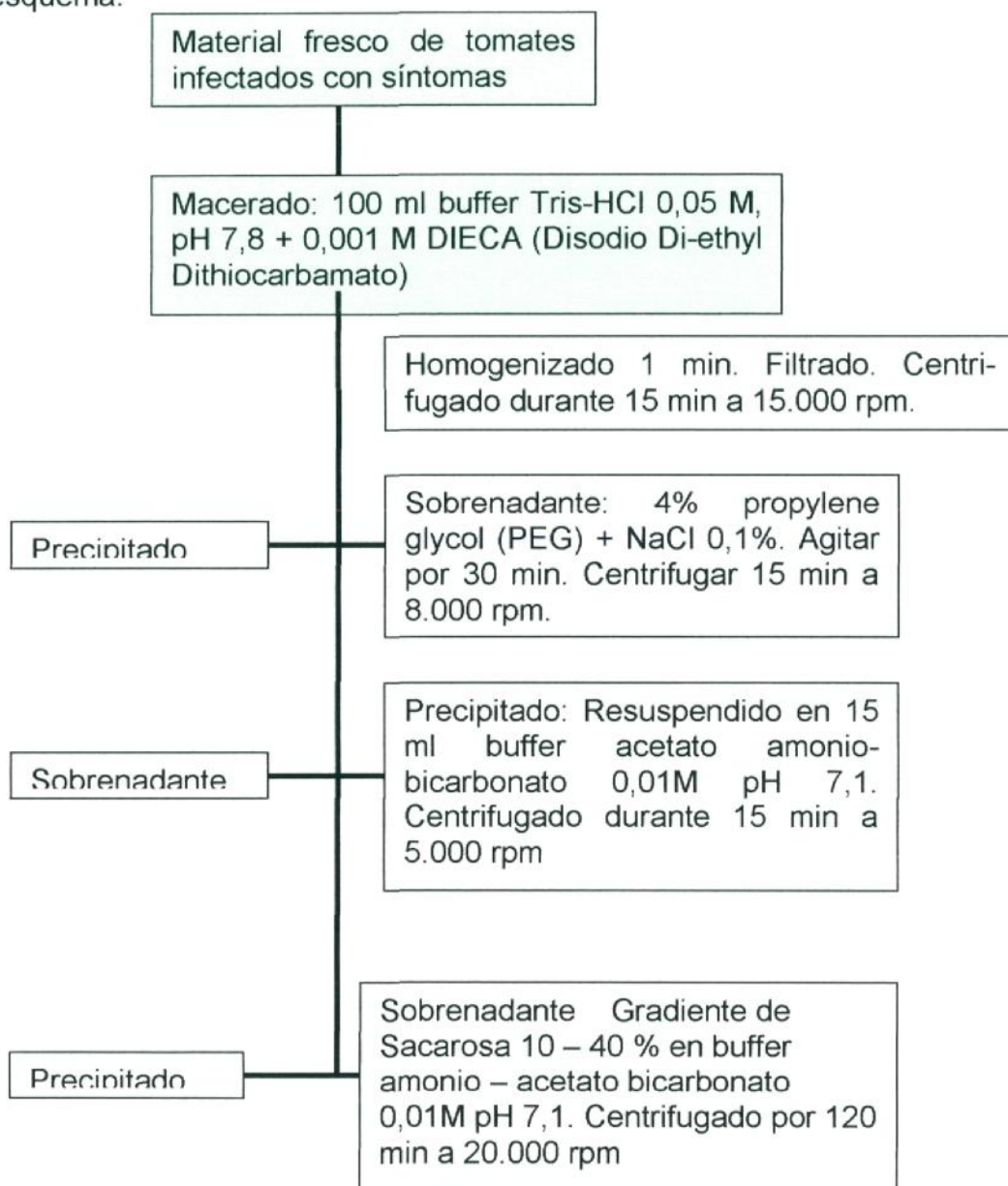
ANEXO 1

CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS PARA ESTUDIOS VIROLÓGICOS

El uso de plantas indicadoras corresponde a una herramienta biológica que complementa la identificación y caracterización de virus. El material vegetal enfermo puede ser recolectado en el campo. Se colectan hojas y brotes tiernos, con síntomas de mosaico, enanismo, distorsión, y otros. Las plantas indicadoras están siendo cultivadas en sustrato previamente esterilizado y se mantienen en un invernadero a prueba de insectos con una temperatura media de 25 °C.

La estrategia de trabajo contempla generar un banco de material vegetal, de modo de, primero, mantener material propagativo en cantidad adecuada. El segundo paso incluye realizar purificación de los diferentes virus que afecten tomate e inocularlos sistemáticamente en diferentes plantas hospederas. Para la inoculación mecánica de las plantas hospederas se procederá a triturar pedazos pequeños de hojas y brotes con síntomas de la enfermedad. El proceso se realizará en frío, utilizando para ello un mortero de porcelana estéril. El material será triturado con una solución de K_2HPO_4 al 1% + $MgSiO_3$ al 1%, pH 8,5 y será aplicado sobre las hojas de las plantas indicadoras previamente espolvoreadas con Carborundum 600 (en caso de no disponer de este elemento, se recurrirá a tierra de Diatomeas como abrasivo). Después de inoculadas, las plantas se lavarán con agua destilada estéril y serán colocadas en el invernadero para observar la aparición y desarrollo de los síntomas.

Los virus de interés serán purificados de acuerdo al siguiente esquema:



INOCULACION Y OBSERVACION DE SINTOMAS Y OTRAS CARACTERISTICAS

Con el desarrollo de esta línea de trabajo se dispone de plantas que permiten desarrollar modelos de protección contra enfermedades virales. Una estrategia

complementaria esta representada en el desarrollo de técnicas de cultivo in vitro, con lo cual se podrá estudiar tempranamente el desarrollo y manifestación de síntomas en tejidos nuevos de plantas.

	
Plantulas de <i>Brassica</i> sp.	<i>Brassica</i> sp. dispuestas a ser inoculadas
	
Plantulas de <i>Vicia</i> sp.	<i>Vicia</i> sp. dispuestas a ser inoculadas

ANEXO 2

TECNICAS SEROLÓGICAS APLICADAS A LA DETECCIÓN DE VIRUS EN TOMATE

1. DAS-ELISA.

El protocolo correspondió a las siguientes etapas:

a) Tapizado: Marcar en la placa de ELISA los pocillos que se vayan a rellenar, según un esquema previo.

- Diluir el anticuerpo con tampón carbonato 0,05M pH 9,6 en la proporción más adecuada (según referencia de proveedores ó determinada en ensayos previos).
- Añadir 100 µl de anticuerpo diluido a cada pocillo.
- Tapar la placa con parafilm para evitar la evaporación.
- Incubar a 37°C durante 3-4 h.

b) Preparación de muestras: Mezclar jugo vegetal de cada muestra con tampón de extracción a la dilución más apropiada, generalmente 1/10 (p/v). Incluir siempre un control positivo y otro negativo.

Para extraer el jugo vegetal de las muestras se introdujo el material vegetal en bolsas de plástico resistentes y posterior homogeneización con un rodillo.

c) Lavado de placas: Transcurrida la incubación se desecho la solución de los pocillos y se rellenaron con PBS-Tween. Dejando al menos 3 min a temperatura ambiente.

- La operación se repitió 3 veces.
- Añadir muestras: Añadir 100 µl de cada muestra problema diluida al pocillo correspondiente. Tapar la placa.
- Incubar a 4°C de 12 a 20 h. (Se suelen dejar toda la noche).
- Lavado de placas: Igual que en el caso anterior.

d) Conjugado: Diluir el conjugado con tampón conjugado en la proporción más adecuada previa titulación.

- Añadir 100 µl del conjugado diluido a cada pocillo y tapar la placa.
- Incubar a 37°C durante 3-4 h.
- Lavado de placas: Igual que en el caso anterior.

e) Sustrato:

- Solución sustrato de la fosfatasa alcalina: Diluir p-nitrofenil fosfato con tampón sustrato en la proporción 1 mg/ml.
- Tras los lavados, añadir a cada pocillo 100 µl de solución sustrato.
- Dejar a temperatura ambiente en oscuridad y esperar a que aparezca color.

- Medir absorbancias a 405 nm a distintos tiempos (por ej. a la media hora, a la hora, a las 3 horas, y al día siguiente, dejando la placa toda la noche a 4°C y en oscuridad).

ANEXO 3

ALGUNAS HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICADAS A LA DETECCIÓN DE VIRUS VEGETALES EN TOMATE. PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Materiales.

- Guantes
- Placas de poliestireno o policarbonato de fondo redondeado.
- Estufa o agitador de aire a 37°C.
- Material para procesar muestras (mortero, bolsas de plástico con un tubo de vidrio.
- Tubos eppendorf estériles
- Micropipetas y puntas estériles
- Termociclador (se pueden utilizar diferentes baños)
- Kit de transcripción inversa para obtención de cDNA (para virus RNA y viroides)
- Kit de PCR
- Aceite mineral
- Equipo de electroforesis horizontal: cubeta, bandeja-soporte, fuente de electroforesis y transiluminador de rayos UV.

Metodología.

En este método se consiguen una purificación parcial del patógeno y una reducción de los componentes de la planta que pudieran interferir en las reacciones de TI y PCR.

Consta de seis pasos: Tapizado, Preparación de la muestra, Inmovilización del antígeno, Transcripción inversa, PCR y Análisis de los productos de la reacción.

a)Tapizado

- Colocar los tubos de 200 µl a tapizar en un soporte para tubos de PCR, según el esquema previo de la plantilla.

- Dilución del antisuero: diluir el antisuero para PVY con tampón carbonato 1:500 (mezcla de anticuerpos monoclonales comerciales 1E10 + 10E3, de Ingenasa).
- Añadir 80 µl del antisuero diluido a cada pocillo.
- Tapar la placa con un plástico para evitar evaporaciones.
- Incubar a 37°C durante 2 h.

b) Preparación de muestras

- Homogeneizar el material vegetal (hojas de tabaco) a una dilución 1:2-1:5 (p(g)/v(ml)) en tampón de extracción método PCR-INIA, directamente en la bolsa con un tubo de vidrio previamente enfriado en hielo.
- Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm para eliminar los restos vegetales y facilitar el pipeteo.

C) Inmovilización del patógeno.

- Lavar los tubos con PBS-Tween durante 3 minutos. Repetir 3 veces.
- Añadir 80 µl de cada muestra al tubo correspondiente. Tapar la placa con plástico.
- Incubar a 4°C toda la noche.

d) Transcripción inversa-PCR

- Eliminar el homogeneizado de tejido vegetal con una pipeta antes de lavar.
- Lavar los tubos con PBS-Tween durante 3 minutos, con cuidado de no mezclar entre tubos. Repetir 3 veces.
- Preparar la cantidad adecuada de mezcla de TI-PCR (para tres tubos)

Mezcla TI-PCR (para una reacción)

	80 µl	240 µl	Cf
Tampón polimerasa 10X (suministrado con la enzima)	8 µl	24 µl	1x
MgCl ₂ 50 mM (suministrado con la enzima)	6,4 µl	19,2 µl	4 mM
dNTPs 10 mM (Promega)	1 µl	3 µl	0,125 mM
cebador 5' 10 µM (5' CTA/TTA/CAA/CTC/CGG/AAG/CCA 3')	1 µl	3 µl	0,125 µM
cebador 3' 10 µM (5' TGG/TCT/GGC/CAG/GCT/TTG/AC 3')	1 µl	3 µl	0,125 µM
inhibidor ribonucleasas (20 U/µl) (Applied Biosystems)	0,5 µl	1,5 µl	10 U
Transcriptasa Inversa (50 U/µl) (Applied Biosystems)	0,25 µl	0,75 µl	12,5 U
DNA polimerasa (1U/µl) (Biotools)	2 µl	6 µl	2 U
agua estéril	59,85 µl	179,55 µl	

Cf: concentración final

- Añadir 80 µl de mezcla TI-PCR a cada tubo.
- Colocar los tubos en un termociclador.
- Utilizar el programa siguiente:
30 min 42°C (transcripción inversa)
5 min 95°C (desnaturalización)
PCR: 20s 94°C / 20s 53,5°C / 1 min 72°C (35 ciclos)
5 min 72°C (elongación final)
Mantener a 4°C

e) Análisis de los Productos de la Reacción

- Preparar un minigel de Agarosa al 1% en TAE
- Tomar una alícuota de 7 µl por reacción.
- Mezclar las muestras con 1 µl de tampón de inserción 6X, centrifugar brevemente y cargar en los pocillos del gel.
- Introduciendo un DNA de peso molecular conocido (DNA del bacteriófago λ digerido con Pst I 250 ng/µl) se puede calcular el tamaño del fragmento amplificado y comprobar si es el esperado.
- Realizar la electroforesis (para un minigel de 6,5 x10 cm normalmente 60V, 90 min).
- Teñir el gel con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 15 min.
- Visualizar y fotografiar con luz ultravioleta en un transiluminador.

f) Soluciones a utilizar

• Agarosa 1% en TAE

- Añadir 1 g de agarosa a 100 ml de TAE 1X.
- Fundir la agarosa en un baño con agua hirviendo o en un microondas.
- Enfriar la solución a unos 50°C. Así se puede mantener para ir sirviendo los geles.

Agua tratada con DEPC

- A 100 ml de agua añadir 100 µl de DEPC (dietilpirocarbonato)
- Agitar durante 30 minutos en un agitador magnético.
- Esterilizar la solución en autoclave a 120 °C, 20 min. Después de la esterilización, agitar y dejar enfriar los botes parcialmente destapados para que se evaporen los productos de descomposición del DEPC, que podrían inhibir las reacciones enzimáticas.

Bromuro de etidio 10 mg/ml

- Pesar 0,1 g de Bromuro de etidio (para precauciones ver nota arriba)
- Añadir 10 ml de agua. Disolver en un agitador magnético durante varias horas hasta su total disolución.
- Guardar a 4°C en una botella oscura o tapada con papel de aluminio.

PBS-TWEEN

- Disolver 8 g de Cloruro Sódico (NaCl), 0,2 g de Cloruro Potásico (KCl), 1,44 g de Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) y 0,24 g de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 800 ml de agua destilada.
- Agregar 0,5 ml de Tween-20.
- Enrasar a 1 l y esterilizar por autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

TAE 50X

- A 571 ml ácido acético glacial añadir, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y 242 g de Tris base.
- Completar con agua hasta 1 l.

- Esterilizar en autoclave 120 °C, 20 min. Conservar a temperatura ambiente.

Tampón Carbonato 0,05 M pH=9,6

- Disolver en 800 ml de agua destilada 1,59 g de Carbonato sódico (CO_3Na_2), 2,93 g de Bicarbonato sódico (CO_3HNa) y 0,2 g de Azida sódica.
- Completar con agua destilada hasta 1 l.

Tampón de inserción 6X

- A 30 ml de agua destilada añadir 4 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0. y 15 g de Ficoll 400.
- Poner a calentar en agitador magnético con placa calefactora hasta que se disuelva el Ficoll.
- En un tubo de plástico con tapón disolver 0,1 g de azul de bromofenol y 0,1 g de xilencianol en 10 ml de agua destilada.
- Añadir a la solución del vaso, agitar y enrasar a 50 ml.
- Esterilizar en autoclave.
- Dividir en alícuotas de 1 ml. y guardar en congelador a -20°C.

Tampón extracción método PCR-INIA

- Mezclar:

	<u>100 ml</u>	<u>conc. final</u>
Tris HCl 1M, pH 8,3	50 ml	0,5 M
NaCl 5M	3 ml	150 mM
Tween 20®	50 µl	0,05%
Polivinilpirrolidona-40	2 g	2%
Polietilenglicol (6000)	1 g	1%
Azida Sódica (NaN_3)	20 mg	3 mM

- Enrasar con agua destilada a 100 ml.
- Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min.

Tris HCl 1 M

- Disolver 121,1 g de Tris en 800 ml de agua y ajustar el pH agregando HCl concentrado.:

<u>pH</u>	<u>HCl</u>
7,4	70 ml
7,6	60 ml
8,0	42 ml

ANEXO 4

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS Y SEMINARIOS

TRABAJO ACEPTADO EN LA XLVIII Convención Nacional de Entomología del Perú, a realizarse en Lima los días 26 a 30 de noviembre.

AVANCE PRELIMINAR DE EPIDEMIOLOGIA DE GEMINIVIRUS ASOCIADOS A MOSQUITAS BLANCAS (*Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (HEMÍPTERA: ALEYRODIDAE)) EN EL CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.), EN EL VALLE DE AZAPA:
PRIMER APORTE

1.INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate es el segundo en superficie cultivada para la región de Tarapacá (Chile), con 460 ha. Sin embargo, para el valle de Azapa, dentro de las hortalizas, el tomate es el que tiene mayor importancia, cubriendo una superficie aproximada de 600 ha en el año 2.005 (ODEPA, 2006).

Dada la importancia que adquiere este cultivo para el valle de Azapa, la economía local puede verse afectada ante una disminución en la productividad de este cultivo. Por tal motivo, las condiciones fitosanitarias del cultivo de tomate son determinantes para asegurar la productividad.

Las pérdidas ocasionadas por plagas en el cultivo de tomate son relevantes, en especial las causadas por *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), insectos de la familia Aleyrodidae. Estos causan daños directo en el tejido foliar por acción alimentaria, o succionando la savia en hojas y tallos, e indirecto al ser eficientes vectores de virus. Secundariamente, la formación de fumagina puede generar pérdidas al reducir la eficiencia fotosintética.

De esta forma, conocer, diagnosticar, monitorear y prevenir la presencia de plagas vectores de enfermedades es un aspecto esencial en el desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas.

2.OBJETIVOS

- Determinar la preferencia de cada una de las especie de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)), hacia las distintas malezas asociadas al cultivo.
- Determinar la especie predominante en el valle de Azapa y en cada uno de los sectores.

3.METODOLOGÍA

Se realizó una prospección de las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), a lo largo del valle de Azapa (primera región de Tarapacá, Chile). Esta se llevó a cabo efectuando visitas a tres puntos representativos del valle.

- Sector 1: Kilómetro 2,5 del valle. S 18°29.165' - WO 70°15.912' Altura: 73 m.s.n.m.
- Sector 2: Kilómetro 12 del valle. S 18° 30.849' - WO 70°10.947' Altura: 247 m.s.n.m.
- Sector 3: Kilómetro 30 del valle. S 18°34.507' - WO 70°01.794' Altura: 601 m.s.n.m.

El periodo de colecta comprendió los meses de mayo hasta noviembre, con una frecuencia de 7 días por muestreo. El propósito de esta metodología fue la de evaluar las fluctuaciones poblaciones de *B. tabaci* (G) y *T. vaporariorum* (W), dos especies potenciales en la transmisión de virus.

En la metodología de colecta, se eligieron al azar 10 plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv Naomi) de las cuales se obtuvieron hojas y brotes de distintas partes de esta. Una vez colectadas las muestras de cada sector, se procedió a contabilizar el número de ninfas presentes en las hojas (diferenciando las especies bajo lupa estereoscópica). Además del muestreo en plantas de tomate, se realizó también en las malezas asociadas al cultivo, las cuales tuvieron la misma metodología utilizada para las plantas de tomate.

4. RESULTADOS

Las plantas colectadas por sector fueron:

Sector 1

- *Lycopersicon esculentum* Mill., Nombre Común: Tomate
- *Euphorbia minuta* Phil., Nombre Común: Leche-Leche, Mariquita (Foto 2)
- *Ambrosia* sp., Nombre Común: Altamisa (Foto 6)
- *Malva nicreensis* H., Nombre Común: Malva (Foto 4)
- *Pitreaa cuneato-ovata*, Nombre Común: Papilla (Foto 3)
- *Bidens pilosa* L., Nombre Común: Amor Seco (Foto 5)
- *Amaranthus deflexus* L. Nombre Común: Bledo (Foto 8)

Sector 2

- *Lycopersicon esculentum* Mill., Nombre Común: Tomate
- *Ambrosia* sp., Nombre Común: Altamisa (Foto 6)
- *Malva nicreensis* H., Nombre Común: Malva (Foto 4)

- *Pitraea cuneato-ovata*, Nombre Común: Papilla (Foto 3)
- *Bidens pilosa* L., Nombre Común: Amor Seco (Foto 5)
- *Lippia nodiflora* Michxk, Nombre Común: Lipia (Foto 8)

Sector 3

- *Lycopersicon esculentum* Mill., Nombre Común: Tomate
- *Ambrosia* sp., Nombre Común: Altamisa (Foto 6)
- *Malva nicreensis* H., Nombre Común: Malva (Foto 4)
- *Pitraea cuneato-ovata*, Nombre Común: Papilla (Foto 3)
- *Bidens pilosa* L., Nombre Común: Amor Seco (Foto 5)
- *Lippia nodiflora* Michxk, Nombre Común: Lipia (Foto 8)
- *Phaseolus vulgaris* L., Nombre Común: Poroto (verde). (Foto 7)



Foto1: *Amaranthus deflexus* L.
"Bledo" (derecha)

Foto 2: *Euphorbia minuta* Phil.,
"Mariquita"
(Izquierda)



Foto 3: *Pitraea cuneato-ovata* "Papilla"



Foto 4: *Malva nicreensis* H. "Malva"



Foto 5: *Bidens pilosa* L. "amor Seco"

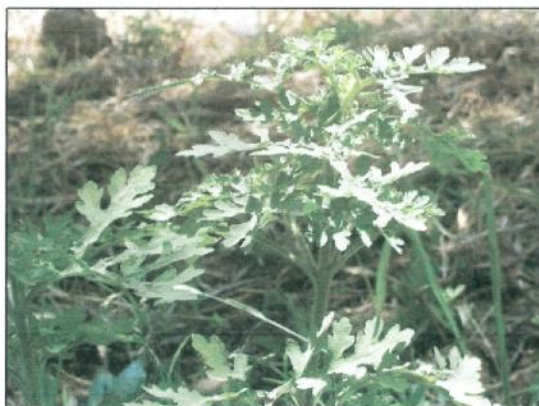
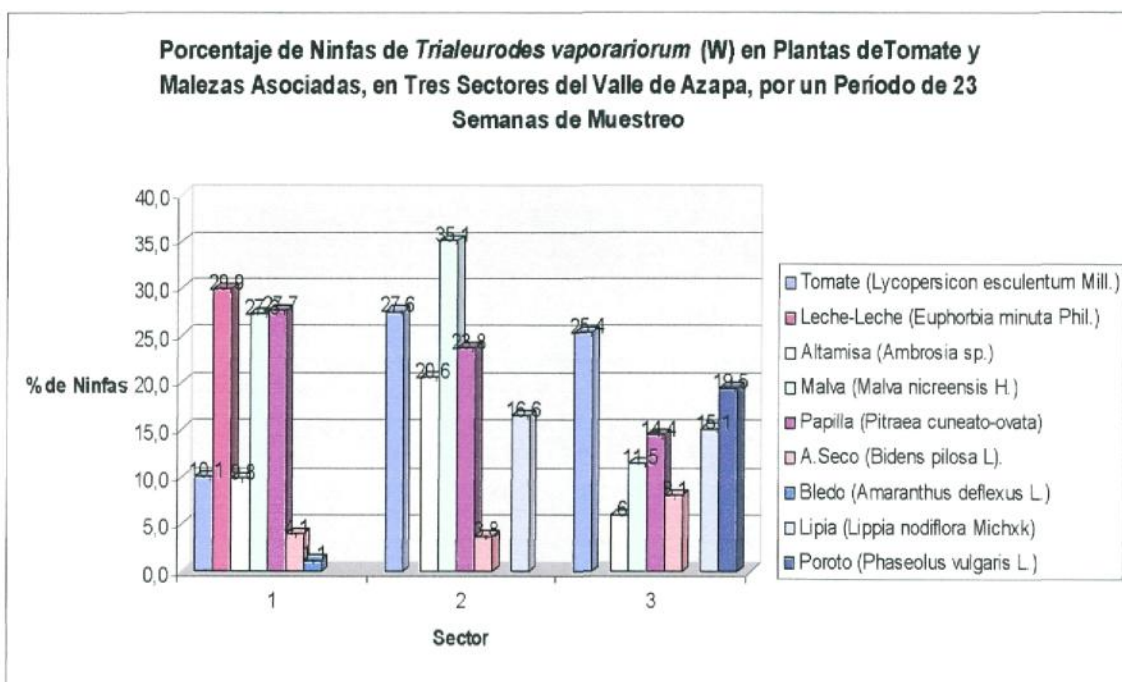
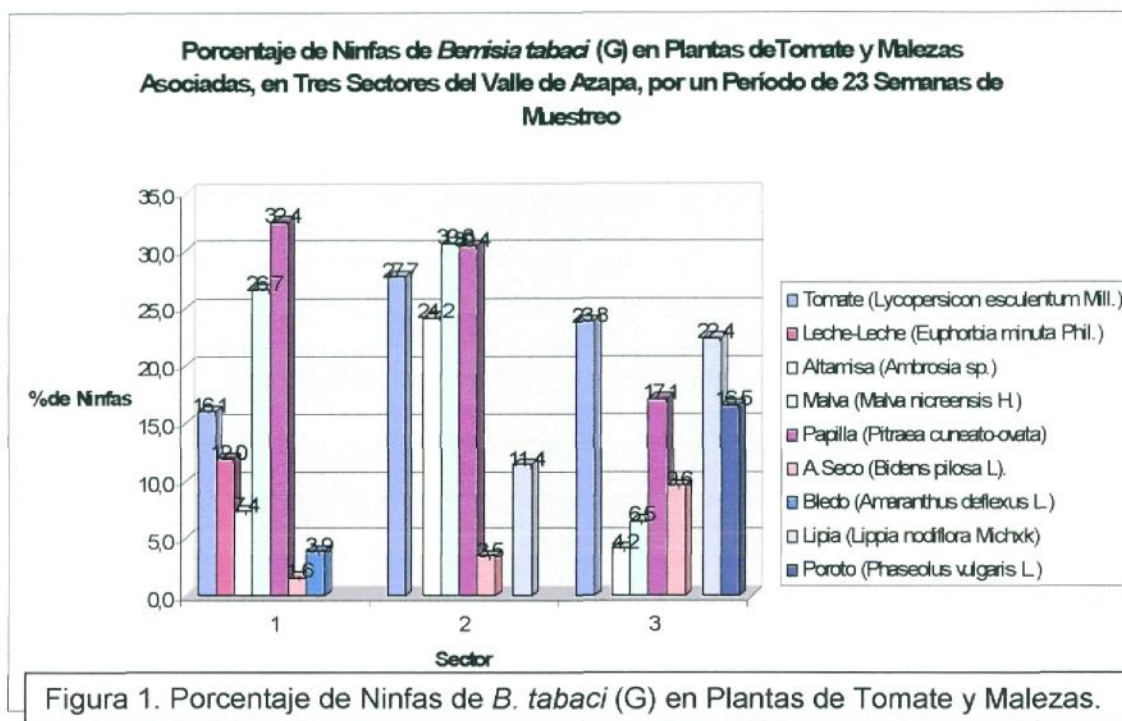


Foto 6: *Ambrosia* sp. "Altamisa"





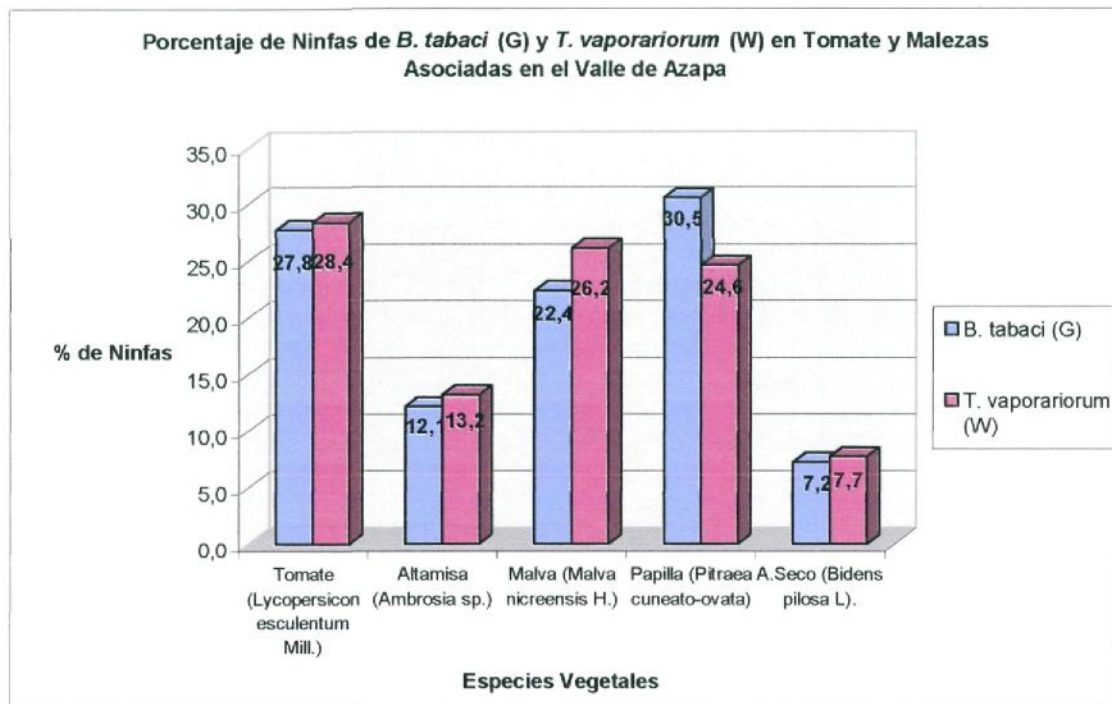


Figura 3: Porcentaje de Ninfas de *B. tabaci* (G) *T. vaporariorum* (W) en Tomate y Malezas Asociadas en el Valle de Azapa

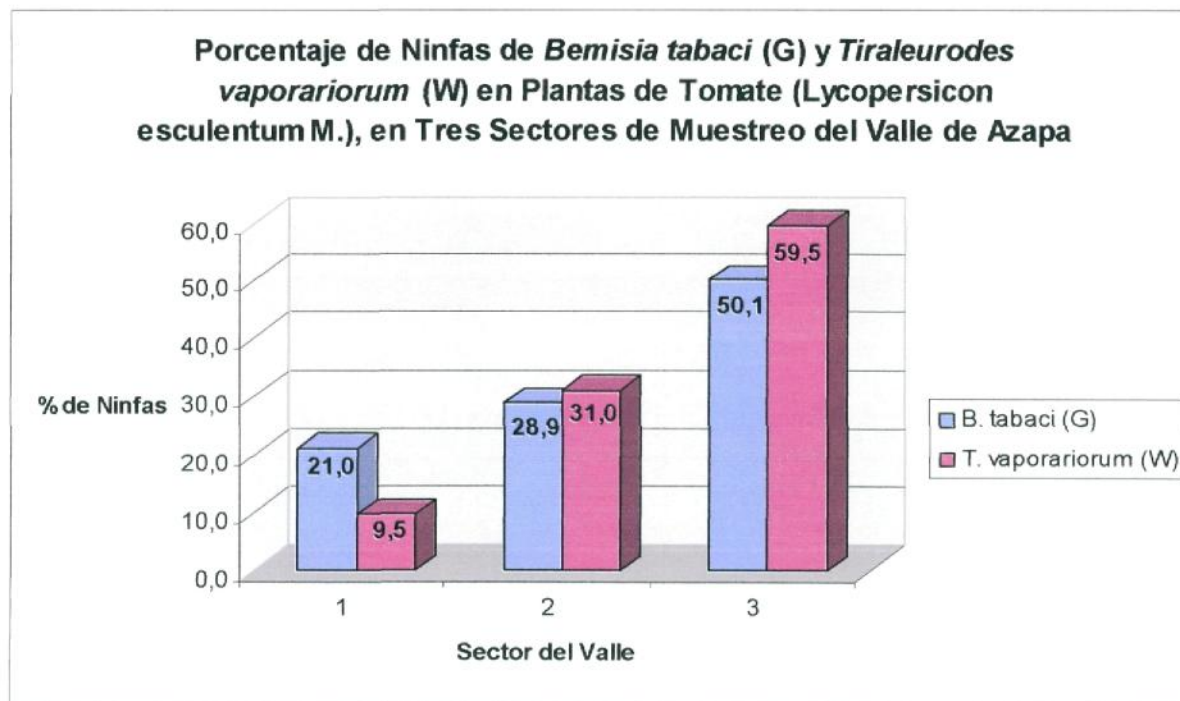


Figura 4. Porcentaje de ninfas de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* en plantas de tomate (*L. esculentum*), en tres sectores del valle de Azapa.

- En cuanto a las plantas colectadas en el valle, *B. tabaci* (G) presenta mayor preferencia por la especie vegetal *Pitreaea cuneato-ovata* ("Papilla"), con un 30,5%, mientras que *T. vaporariorum* (W) presenta mayor preferencia por *L. esculentum* Mill (Tomate), con un 28,4%, este insecto muestra preferencias también por la maleza malva (*Malva nicaeensis* H), con un 26,2%. (figura 3)
- De ambas especies de mosca blanca la que presenta mayor número de ninfas en los tres sectores del valle, y en un total de 23 semanas de muestreo, es *B. tabaci*, con un 30,5% (figura 3)
- Según la figura 1, el porcentaje de ninfas de *B. tabaci* en la planta Amor Seco (*Bidens pilosa* L) va creciendo a medida que aumenta la altura de cada sector del valle (más lejos de la costa).
- El porcentaje de ninfas de *T. vaporariorum* presentes en la planta Papilla (*Pitreaea cuneato-ovata*), va decreciendo hacia el sector 3, presentando el mayor valor en la población en el sector 1.
- En los sectores 2 y 3, se observa (en comparación con el sector 1) un incremento de la población de ninfas de *T. vaporariorum* (Figura 2) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).
- La planta por la que *T. vaporariorum* presenta menor preferencia a lo largo del valle de Azapa es Amor Seco (*Bidens pilosa* L) (Figura 3).
- En la figura 4 se observa que las poblaciones de ninfas de ambas especies de moscas blancas van incrementándose, a medida que se avanza al sector 3 del valle.
- En el sector 1 predominan las poblaciones de *B. tabaci* (21%) por sobre las de *T. vaporariorum* (9,5%), mientras que en el sector 2 y 3 predomina esta última, con un 31% y 59,5% respectivamente (Figura 4).

TRABAJO ACEPTADO EN EL XVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA. La Serena, 14 al 17 de noviembre de 2006.

Monitoreo de las principales enfermedades virales que afectan al cultivo de tomate en el valle de Azapa, I Región Chile.

G. Sepúlveda Chavera¹; M. Rojas Jara¹; C. Sandoval Briones²

Universidad de Tarapacá, Facultad de Ciencias Agronómicas, Laboratorio de Fitopatología.

Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Virología.

Durante la temporada mayo-septiembre de 2006, se monitorearon las principales incidencias virales en el cultivo de tomate, en el valle de Azapa, I región. Siguiendo el transecto mar-cordillera, se definieron tres sectores: bajo, alto y medio. Los puntos de muestreo fueron georreferenciados. Cada muestra consistió en brotes tiernos y tejido foliar de plantas de tomate asintomáticos y que presentaron síntomas de virosis. Para la detección de virus en plantas de tomate se utilizó la técnica DAS-ELISA. Se analizaron

9 especies virales (ToMV, TSWV, ToRSV, TMV, CMV, PepMV, AMV, PVX, PXY) con el objetivo de determinar la incidencia y predominancia de estos en el cultivo. Los resultados indican que de las 129 muestras analizadas, el 80% presentó alguna virosis. El 34% presentó infecciones cruzadas, infectadas por más de un virus. El virus de mayor incidencia correspondió a PepMV, seguido de ToRSV y AMV.

Proyecto FIA-UTA, Código FIA-PI-C-2005-1-A-036

PRESENTACIÓN DE TRABAJO EN XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES - UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Diagnóstico de enfermedades virales en tomate en el valle de Azapa: resultados de la segunda temporada

Tomato Viral Diseases in Azapa Valley: second year research

**MARLENE ROSALES VILLAVICENCIO²; CLAUDIO SANDOVAL BRIONES³;
MONICA ROJAS JARA¹; GERMAN SEPÚLVEDA CHAVERA¹**

1: Departamento de Recursos Ambientales, Fac. de Cs. Agronómicas Univ. de Tarapacá. Avda. General Velásquez 1775, Arica. 58-205507, gsepulve@uta.cl, Casilla 6-D;

2: Unidad de Biotecnología, INIA CRI-LA Platina, Sta. Rosa 11610, Santiago;

3: Facultad de Agronomía, Universidad de Talca, 2 norte 685, Talca.

Durante la temporada productiva 2007, se detectó una alteración en el patrón sintomatológico de enfermedades virales que afectan tomate en el valle de Azapa. Los síntomas observados corresponden a mosaicos en el follaje, reducción del área foliar, prevalencia de pigmentos antocianínicos (brotes azules), enrollamiento foliar, ampollamiento, reducción del área foliar, aborto floral, cribado en tallos y frutos, y manchas necróticas. Todo ello asociado a pérdida de rendimiento. Se estableció un sistema de monitoreo basado en toma de muestras dirigida en tres sectores del valle de Azapa (bajo: km 1 al 6; medio: km 6 al 16 y Alto: km 16 al 45), y estudios serológicos (DAS-ELISA) y moleculares (PCR). Los principales virus detectados corresponden a: PepMV, AMV, ToRSV. Además se está investigando la posible presencia de begomovirus (Familia *Geminiviridae*), debido a que se conoce de la presencia del vector de estos virus en la zona, la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. Paralelamente a estos estudios, se realizó un seguimiento epidemiológico de las poblaciones de mosquitas blancas asociadas al cultivo del tomate.

ANEXO 5

Evaluación de la respuesta SAR en tomate a través de parámetros agronómicos y fisiológicos ante una infección viral

1. Introducción

De acuerdo a Sepúlveda y Rojas (2007), el mosaico del pepino dulce (PepMV) es el virus que se presenta mayor frecuencia en cultivos de tomate en el valle de Azapa, generando pérdidas de rendimiento superiores al 30 – 40 %.

Este virus se transmite mecánicamente, siendo las labores de cultivo como podas, deshoje, aplicación de hormonas, cosecha, y el contacto entre plantas, mecanismos muy eficientes de contagio. El control se basa fundamentalmente en establecer medidas profilácticas que eviten la propagación de la infección. Mantener en óptimo estado nutricional (fisiológico, inmunológico) en las plantas es otra alternativa para disminuir la intensidad de la enfermedad. El uso de estimulantes de crecimiento,

Bellis es una mezcla de boscalid y pyraclostrobin. Boscalid tiene acción sistémica, protectora y curativa. Los ingredientes activos de Bellis controlan los hongos actuando sobre las diferentes etapas de su desarrollo, inhibiendo de manera significativa la germinación de conidias (esporas); el crecimiento del tubo germinativo; la esporulación; la formación de apresorios y el desarrollo del micelio. A nivel molecular, actúa afectando la respiración de los hongos, inhibiendo la enzima succinato ubiquinona reductasa (complejo II) en las mitocondrias. De esta manera Bellis otorga una prolongada persistencia de acción y reduce los riesgos de resistencia, ya que sus ingredientes activos pertenecen a diferentes grupo químicos.

2. Objetivo

Evaluar la acción SARC del producto ante inoculaciones dirigidas de PepMV en plantas de tomate bajo condiciones de campo.

3. Metodología

3.1. Diseño del experimento

Ensayo de campo

Diseño estadístico: bloques al azar

Nº de tratamientos: 6

Nº de repeticiones/bloque: 2
Nº de bloques: 5
Duración del ensayo: 150 días

Tabla 1: Descripción de los tratamientos

Trat.	Descripción
T ₀	Planta sana + manejo convencional
T ₁	Planta sana + manejo convencional + Bellis (3 aplic.)
T ₂	Planta sana+ manejo convencional + Comet (3 aplic.)
T ₃	Planta inoculada + tratamientos convencionales
T ₄	Planta inoculada + manejo convencional + Bellis (3 aplic. /1º aplic. pre-inoculación del virus)
T ₅	Planta inoculada + manejo convencional + Comet (3 aplic. /1º aplicación pre-inoculación del virus)

3.2. Verificación del estado fitosanitario pre y post inoculación con PepMV

Antes de la plantación, los plantines fueron analizados mediante DAS-ELISA para descartar la posible presencia de PepMV y otro virus.

A continuación se detalla la metodología utilizada

a) Tapizado: Marcar en la placa de ELISA los pocillos que se vayan a rellenar, según un esquema previo.

- Diluir el anticuerpo con tampón carbonato 0,05M pH 9,6 en la proporción más adecuada (según referencia de proveedores ó determinada en ensayos previos).
- Añadir 100 µl de anticuerpo diluido a cada pocillo.
- Tapar la placa con parafilm para evitar la evaporación.
- Incubar a 37°C durante 3-4 h.

b) Preparación de muestras: Mezclar jugo vegetal de cada muestra con tampón de extracción a la dilución más apropiada, generalmente 1/10 (p/v). Incluir siempre un control positivo y otro negativo.

Para extraer el jugo vegetal de las muestras se introdujo el material vegetal en bolsas de plástico resistentes y posterior homogeneización con un rodillo.

c) Lavado de placas: Transcurrida la incubación se desechó la solución de los pocillos y se rellenaron con PBS-Tween. Dejando al menos 3 min a temperatura ambiente.

- La operación se repitió 3 veces.
- Añadir muestras: Añadir 100 µl de cada muestra problema diluida al pocillo correspondiente. Tapar la placa.

- Incubar a 4°C de 12 a 20 h. (Se suelen dejar toda la noche).
- Lavado de placas: Igual que en el caso anterior.

d) Conjugado: Diluir el conjugado con tampón conjugado en la proporción más adecuada previa titulación.

- Añadir 100 µl del conjugado diluido a cada pocillo y tapar la placa.
- Incubar a 37°C durante 3-4 h.
- Lavado de placas: Igual que en el caso anterior.

f) Sustrato:

- Solución sustrato de fosfatasa alcalina: Diluir p-nitrofenil fosfato con tampón sustrato en la proporción 1 mg/ml.
- Tras los lavados, añadir a cada pocillo 100 µl de solución sustrato.
- Dejar a temperatura ambiente en oscuridad y esperar a que aparezca color.
- Medir absorbancias a 405 nm a distintos tiempos (por ej. a la media hora, a la hora, a las 3 horas, y al día siguiente, dejando la placa toda la noche a 4°C y en oscuridad).

3.3. Plantación

Una vez verificado el estado fitosanitario de los plantines, se procedió a la plantación de estos de acuerdo al diseño del ensayo.

El ensayo constó de 5 líneas, cada una correspondiente a un bloque. Cada bloque contenía los 6 tratamientos con 2 repeticiones cada uno.

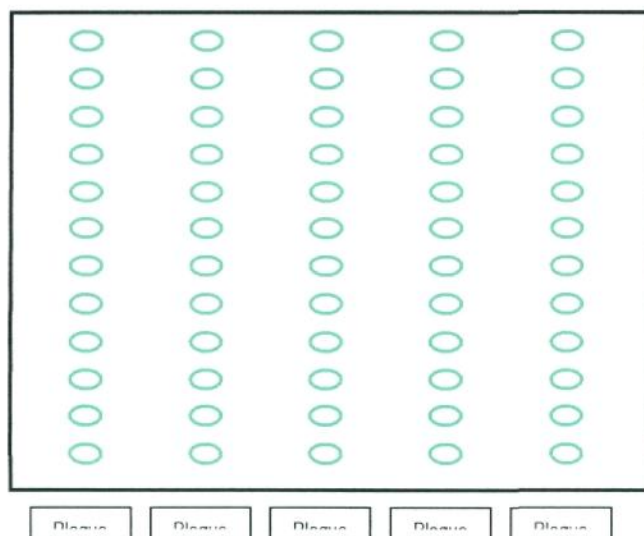


Figura 1: Diseño de ensayo y distribución de los tratamientos en terreno

Para evitar la contaminación entre los tratamientos y el contacto entre plantas inoculadas con virus y plantas sanas, cada tratamiento se separó con un biombo de malla ortoclima (figura 2).



Figura 2: Biombos utilizados para separar los tratamientos

3.4. Inoculación de plantas

Las plantas correspondientes a los tratamientos T3, T4 y T5 (plantas con virus) fueron inoculadas artificialmente con PepMV de acuerdo a la siguiente metodología (figura 3):

- Se homogenizó el material vegetal seleccionado como inóculo en un mortero con tampón de inoculación en la proporción 0,5 g/ml.
- Se espolvoreó sobre las hojas de las plantas a inocular carborundo o celita (abrasivos que producen daños en la superficie de las hojas)
- Se frotó suavemente el inóculo sobre la superficie de las hojas.



Figura 3: Etapas de la inoculación

3.4 Labores culturales

El cultivo se realizó de acuerdo a las labores agronómicas comunes para el cultivo de tomate indeterminado en el valle de Azapa.

3.4.1 Fertilización

La fertilización del cultivo se realizó diariamente de acuerdo a las necesidades nutricionales del cultivo según el estado fenológico y se presenta en el siguiente cuadro:

Época de aplicación	Productos	Dosis	Frecuencia
Transplante	• Razormin • Ultrasol inicial (15-30-15) • Humic Plus	• 2 ml/L • 2 g/L • 150 cc/1000 m²	día x medio semanal
día 6 al día 29	• Ultrasol inicial (15-30-15) • Humic Plus • Humic K	• 2 g/L • 150 cc/1000 m² • 2-3 cc/L	día x medio Semanal quincenal
día 30 al día 44 días	• Ultrasol desarrollo (18-6-18) • Humic K • Humic Plus	• 2 g/L • 2-3 cc/L • 150 cc/1000 m²	día x medio Semanal
día 45 al día 60 días	• Ultrasol producción (13-6-40) • Humic K	• 2 g/L • 2-3 cc/L	día x medio Semanal

3.4.2 Riego

Se utilizó riego por cinta (4 L/h metro lineal), ya que este es el sistema más representativo para el cultivo de tomate en el valle de Azapa:

Tiempo de riego: 10 – 15 minutos/día

3.4.3 Conducción

El sistema de conducción utilizado fue de un solo eje, eliminando cada cierto periodo las yemas axilares en desarrollo.

3.4.4 Poda y deshoje

Para favorecer la ventilación de las plantas, evitar aparición de enfermedades y mantener el cultivo uniforme, las plantas se revisaron semanalmente eliminando hojas e hijuelos. El procedimiento se realizó primero en las plantas sanas, dejando para el final las plantas infectadas artificialmente con virus. De esta misma forma y para evitar el

contagio planta-planta, se desinfectó con alcohol manos y tijeras constantemente durante la labor.

4. Control de insectos

Los principales problemas de plagas que se presentaron durante el desarrollo del estudio fueron:

- Polilla del tomate (*Tuta absoluta*)
- Mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*)

Se monitoreó semanalmente la presencia de plagas. Para esto se utilizaron trampas pegajosas de color amarillo para observar la presencia de moscas blancas y se revisaron los brotes apicales de las plantas para verificar presencia de la polilla del tomate.

Para su manejo se utilizaron los siguientes insecticidas.

Plaga	Producto	Dosis	Frecuencia
Polilla del tomate	Sunfire® 240 SC (clorfenapir)	20 – 30 ml/100 L	15 días
	Success® 48 (spinosad A+ D)	10 – 15 ml/100 L	
	Vertimec® 018 EC (abamectina)	70 – 100 ml/100 L	
Mosca blanca	Admiral® 10 Ec (Pyriproxyfen) Hurricane 70 WP	75 cc/100 L 13 – 15 gr/100 L	15 días

5. Control de enfermedades

El control de enfermedades se basó en prácticas culturales como poda, desbrote y eliminación de tejido infectado. También se estableció un manejo preventivo en base a productos químicos según el siguiente cuadro:

ENFERMEDAD	Producto	Dosis
Oidio	• Benomilo • Tacora mas • Azufre • Switch® 62.5 WG (Cyprodinil fludioxonil) +	• 1 Kg/ha • 50 – 75 cc/ 100L • espolvoreo • 0,8 – 1 Kg/ha
Botrytis	• Cadilac 80 WP(mancozeb) • Tacora mas • Switch® 65 WP	• 108 – 240 g/100 L • 75 - 100 cc/ 100 L • 0,8 – 1 Kg/ha
Alternaria	• Switch® 65 WP • Cadilac 80 WP	• 0,8 – 1 Kg/ha • 180 – 240 g/100 L

Hitos importantes

Evento	Fecha
Transplante	15 julio
Análisis fitosanitario	julio
Análisis de proteínas (grupo cero)	julio
Peso fresco y seco grupo cero	25 julio
1º aplicación (15 días post transplante)	30 julio
Inoculación con PepMV (3 días post aplicación Bellis y Comet)	4 agosto
Verificación de la enfermedad (ELISA)	11 agosto
Medición de fotosíntesis y análisis de proteínas	11 agosto
2º aplicación (25 días post transplante)	18 Agosto
Medición de fotosíntesis y análisis de proteínas	25 agosto
3º aplicación (40 días post transplante)	01 sep
Medición de fotosíntesis y análisis de proteínas	08 sep
Peso fresco y seco, cosecha	

6. Aplicación de los tratamientos

Los productos Bellis y Comet correspondientes a los tratamientos T1–T4 y T2–T5 respectivamente, fueron aplicados de acuerdo al siguiente calendario:

Evento	Fecha
1º aplicación (15 días post transplante)	30 julio
2º aplicación (25 días post transplante)	18 Agosto
3º aplicación (40 días post transplante)	01 sep

Los productos se aplicaron por aspersión utilizando una bomba manual, mojando todo el follaje de las plantas. Las dosis aplicadas fueron las recomendadas por el fabricante y se presentan en la siguiente tabla:

Producto	Dosis
Bellis® (Bocalid + Pyraclostrobin)	1 g/L
Comet® (Pyraclostrobin)	1,25 g/L

7. Medición de fotosíntesis

Para determinar si la aplicación de los productos (Bellis y Comet) y la interacción de ellos con la enfermedad viral en estudio ejercieron algún efecto sobre la actividad fotosintética de las plantas, se midieron varios parámetros fotorespiratorios.

8. Análisis de proteínas totales

Se realizó un análisis de expresión de proteínas totales (PRP) de cada tratamiento, sustrayendo una muestra de tejido vegetal de cada planta a los cinco días después de cada aplicación de los tratamientos, con el objetivo de determinar si los productos aplicados (Bellis y Comet) aumentaron la producción de proteínas relacionadas con la respuesta complejo SAR.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.Verificación del estado fitosanitario del material vegetal

Análisis pre-plantación

En total se analizaron 60 plantines de tomate var. Naomí, los cuales resultaron negativos para los virus: PepMV, ToMV, TSWV, ToRSV, TMV, CMV, AMV, PVX y PVY. Estos resultados permitieron asegurar la calidad del material de propagación, descartando cualquier enfermedad de origen viral proveniente de la almaciguera.

Plantines	PepMV	ToMV	TSWV	ToRSV	TMV	CMV	AMV	PVX	PVY
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-

19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-

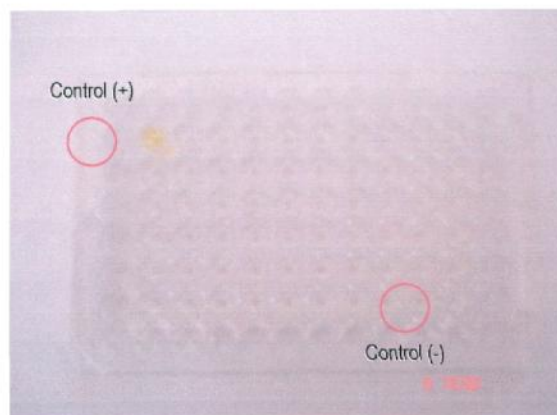


Figura 4: Placa DAS ELISA plantines

Análisis post-inoculación

5 días después de la inoculación artificial con PepMV y para verificar la efectividad de esta, se realizó DAS-ELISA a todas las plantas del ensayo. Los resultados del análisis indicaron que solamente las plantas correspondientes a los tratamientos con virus (T3, T4 y T5) resultaron positivas.

Así mismo la efectividad de la inoculación artificial del virus del mosaico del pepino se pudo comprobar con la aparición de los síntomas clásicos de esta enfermedad, tales como, mosaico, disminución del área foliar, deformación de folíolos, entre otros.



Figura 5: Deformación y mosaico foliar en plantas inoculadas con virus del mosaico del pepino (T3, T4 y T5)

2. Cosecha

La cosecha se inicio el día 30 de septiembre y se extendió hasta el día 27 de octubre y abarcó hasta el 5° racimo.

La producción (gramos) total de los tratamientos se presenta a continuación:

Tabla: Producción (g) de los tratamientos

Tratamientos	B I	B II	B III	B IV	V	Promedio
0	1752,59	1140,89	1543,82	1872,69	1254,19	1512,836
1	1410,86	1257,21	2516,6	1745,44	550,8	1496,182
2	1428,17	1580,57	1306,46	1316,58	1590,29	1444,414
3	1532,6	1455,27	1131,71	1506,06	1546,65	1434,458
4	962,37	1838,25	1866,58	1266,79	1497,04	1486,206
5	926,21	1903,06	1024,52	1867,25	1424,58	1429,124

Análisis de varianza: Diseño de bloques completamente aleatorizado

Significancia: 0,05

Fuentes variación	GL	Suma Cuad.	Cuad. Medio	F obs.	F req.
Total	29	4105728			
Bloques	4	1210525	302631,3	3,125028	2,87
Tratamientos	5	958379,2	191675,8	1,97928	2,71
Error	20	1936824	96841,17		

Coef. Var.: 21,21%

Test Tuckey. G° libertad error: 20sig.: 0,05 Cuad. Medio error:96841,17

N° rep: 6

Tratamientos	n° Rep	Medias	Grupos est.
T0 (sana)	5	1821,638	A
T1 (sana-bellis)	5	1528,188	A
T2 (sana-comet)	5	1442,174	A
T3 (virus)	5	1417,318	A
T4 (virus-bellis)	5	1321,872	A
T5 (virus-comet)	5	1272,03	A



- No existen diferencias significativas en la producción de los tratamientos
- Los productos evaluados no tienen ningún efecto sobre la producción, tanto en plantas sanas e inoculadas con PepMV, y con respecto al testigo

3. Fotosíntesis

Para determinar eventuales diferencias en la eficiencia fotosintética de las plantas tratadas con Bellis, se evaluó, al momento de la cosecha del primer racimo, algunos de los indicadores fotosintéticos tales como temperatura de la hoja, tasa de asimilación de CO₂, y liberación de H₂O.

		Parámetro				
T0	Obs	Photo	T°air	T°leaf	CO ₂ S	H ₂ O S
	1	32,3	22,58	23,61	339,03	18,401
	2	32,6	22,69	24	336,88	18,843
	3	32,7	22,76	24,19	336,14	19,183
T1	1	33,9	24,14	25,23	335,09	19,972
	2	34,2	24,2	25,33	334,81	19,99
	3	34,5	24,27	25,42	334,93	20,022
T3	1	28,4	24,84	27,6	343,69	20,714
	2	38,3	25,22	27,53	338,2	20,829
	3	33,5	25,4	27,24	334,56	20,654
T4	1	28	22,84	27,2	341,02	20,613
	2	36,2	24,11	27,4	336,2	20,132
	3	34,5	24,4	27,12	332,51	20,651

Los datos obtenidos, si bien son parciales, sugieren que no existen diferencias entre los tratamientos. Es decir, la aplicación de Bellis no mejora significativamente la eficiencia fotosintética en plantas inoculadas artificialmente con el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV).