



FOLIO DE
BASES

047

CÓDIGO
(uso interno)

BIOT-01- A - 13

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

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

Línea Temática:

Agricultura y ganadería

Rubro:

Diagnóstico de enfermedades en plantas

Región(es) de Ejecución:

Región Metropolitana

Fecha de Inicio:

15 Diciembre 2001

DURACIÓN:

48 meses

Fecha de Término:

30 Noviembre 2005

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas

Dirección : Santa Rosa 11 315, La Pintana Ciudad y Región: Santiago, RM

RUT :

Teléfono : 678 5714

Fax 6785812 y e-mail: jmonteal@uchile.cl

Cuenta Bancaria:

AGENTES ASOCIADOS:

UNIVIVEROS

Viña SANTA RITA

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Mario Silva Geneville

Cargo en el agente postulante:

Decano

Facultad de Ciencias Agronómicas U de Chile

RUT:

Firma:

Dirección: Santa Rosa 11 315, La Pintana, Santiago, Región Metropolitana

Fono: 678 5753

Fax:547055 y e-mail:

agrodec@uchile.cl

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

: \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO

(Valores Reajustados)

: \$

67

APORTE DE CONTRAPARTE

(Valores Reajustados)

: \$

33



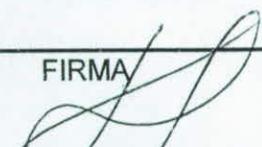
Handwritten signature and scribbles at the bottom of the page.

2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

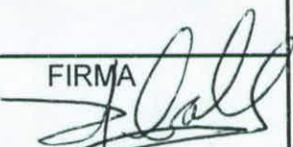
2.1. Equipo de coordinación del proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

NOMBRE Jaime Montealegre A.	RUT	FIRMA 
AGENTE Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año) 22,9	
CARGO ACTUAL Profesor Asociado	CASILLA 1004	
DIRECCIÓN Santa Rosa 11 315, La Pintana	CIUDAD Santiago	
FONO 6785714	FAX 6785812	E-MAIL Jmonteal@uchile.cl

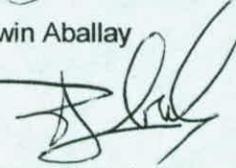
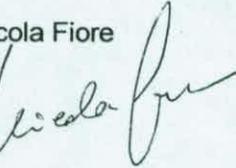
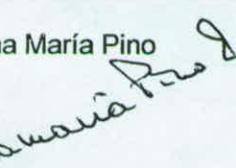
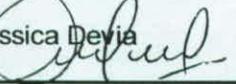
COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE Erwin Aballay	RUT 8.860.351-6	FIRMA 
AGENTE Universidad de Chile	DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO 11,5	
CARGO ACTUAL Profesor asistente	CASILLA 1004	
DIRECCIÓN Santa Rosa 11.315, La Pintana	CIUDAD Santiago	
FONO 6785821	FAX 6785812	EMAIL Eaballay@uchile.cl





2.2 . Equipo Técnico del Proyecto
(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
 Jaime Montealegre A.		Ingeniero Agrónomo	Fitopatología	Coordinador general del proyecto.	22,9
 Erwin Aballay		Ingeniero Agrónomo	Nematología	Coordinador alterno del proyecto. Coordinación de las actividades relacionadas con nemátodos.	11,5
 Nicola Fiore		Ingeniero Agrónomo	Virólogo	Jefe de laboratorio, coordinación de actividades vinculadas a laboratorio. Diagnóstico molecular.	56,8
NN HUMBERTO GODOFREDO PRIETO ENCALADA		Bioquímico	Biología molecular	Diagnóstico molecular y Caracterización génica.	4,5
 Ana María Pino		Ingeniero en Alimentos	Inmunología	Análisis de resultados obtenidos en diagnóstico y estudio de rentabilidad técnica económico	36,6
 Carolina Lagos		Licenciada en Ciencias Agronómicas	Diagnóstico serológico	Análisis serológico de material vegetal	13,5
 Jessica Devia		Licenciada en Ciencias Agronómicas	Cultivo en invernadero	Supervisión y manejo de invernadero	13,5
 Andrea Riveros		Técnico agrícola	Trabajo práctico en nematología	Muestreo y procesamiento de suelo para la extracción de nemátodos	12,0







3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

Chile posee 146.562 ha destinadas a la producción de vides viníferas, de mesa y pisqueras; la mayor área corresponde a vides viníferas siguiéndole en importancia las uvas de mesa, ésta última junto con la producción de vinos, son muy importantes en la exportación.

Los problemas fitosanitarios de la vid observados en países europeos y Norteamérica, con un material vegetal similar al chileno, nos permite asumir que nuestra situación fitosanitaria no es diferente. Como consecuencia de lo anterior, en este proyecto se plantea implementar técnicas desarrolladas en otros países para el diagnóstico de virus y virus afines.

Por lo tanto, se propone poner a punto la técnica de amplificación génica PCR (Polymerase Chain Reaction) para la detección de fitoplasmas y virus en vides viníferas y de mesa. En el caso de detección de virus se realizará utilizando como apoyo a PCR, la técnica inmunológica Elisa (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay).

Con el propósito de realizar lo especificado en el párrafo anterior, se realizará una prospección de la situación sanitaria en las zonas productivas de mayor importancia en el país (regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana). Esta recolección de muestras permitiría obtener vides infectadas con virus y fitoplasmas, algunos de los cuales se podrán caracterizar genéticamente. Además se realizará una evaluación técnica económica de los métodos de diagnóstico antes mencionados.

Los resultados de este trabajo serán difundidos como transferencia tecnológica a productores, técnicos y profesionales del sector.

La ejecución de este proyecto ayudará a poner las bases para obtener en un futuro cercano, la recuperación de valioso germoplasma infectado por virus y virus afines, utilizando las técnicas aquí desarrolladas en apoyo a la limpieza de material vegetal.





4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

La agricultura chilena, en especial los subsectores frutícola y vitivinícola han sido los de mayor dinamismo en los últimos años. Aumentando para el primero de 255,89 millones de dólares a US\$292,14 millones en el periodo 1998-1999, en cuanto a las exportaciones de vino, se ha producido un incremento para el mismo periodo del orden de 29,3%, pasando de 498,6 a 565,2 millones de dólares en la actualidad. Todo este crecimiento de la actividad se ha sustentado en un sistema de economía de mercado, lo que ha generado oportunidades comerciales muy interesantes para el sector agrícola nacional, lo que se ha constituido en un elemento dinamizador de las exportaciones chilenas (Covarrubias 1993)

Chile posee en la actualidad 146.562 ha destinadas a la producción de vides viníferas, de mesa y pisqueras; el incremento de la superficie cultivada con esta especie en la última década ha sido de 22.3%. La mayor área corresponde a vides viníferas (85.357 ha), las que aumentaron en un 30%; en el caso de las uvas de mesa el crecimiento para este mismo período fue de 5.4%, llegando a 50.862 ha. Lo anterior se explica por el cambio de variedades de uva de exportación y de vino.

Prácticamente todas la uva de mesa cultivadas en los setenta, con excepción de la Thompson Seedless, fueron reemplazadas por nuevos cultivares. Así, el cultivar Red Globe pasó a ocupar el segundo lugar de la superficie plantada con vides para uva de exportación en menos de una década. En materia de uva para vino, a partir del año 1985 se produce un arranque de variedades corrientes y su reemplazo por variedades finas. Como consecuencia del cambio de variedades, envejecimiento y declinación de la producción, se ha arrancado vides reemplazándolas en los mismos lugares que las plantaciones anteriores (replante), para aprovechar la infraestructura productiva existente.

El mantenimiento de una plantación por un período largo de años produce un aumento significativo de las poblaciones de nemátodos, insectos, hongos y bacterias en el suelo ocupado por las plantas, como también una pequeña disminución de la disponibilidad de nutrientes.

El replantar suelo con vid inmediatamente después de arrancado el viñedo anterior, sin tomar medidas técnicas (como fumigación con bromuro de metilo labores especiales de suelo y uso de portainjertos), provoca un pobre o débil crecimiento de las nuevas plantas, una entrada en producción más tardía y una productividad y longevidad menor, circunstancias que limitan seriamente el éxito económico del cultivo.

La elección del portainjerto depende principalmente del tipo de plagas, problemas en el suelo (alcalinidad, salinidad y textura) y por la variedad a plantar. En Chile, a diferencia de la inmensa mayoría de los países en donde el problema es la filoxera (*Daktulospharia vitifolli*), la causa de mayor daño son los nemátodos, en especial si son vectores de virus.

Al mismo tiempo es extremadamente importante pensar en utilizar plantas libre de enfermedades, especialmente aquellas debidas a virus y virus-afines (ej. fitoplasmas), cuyo control es exclusivamente la prevención. Para lograr esto, es necesario desarrollar técnicas para el diagnóstico y caracterización de virus y fitoplasmas en vid, con el fin de conocer la condición patológica actual de la vid en Chile, y utilizar estas herramientas como base para la toma de decisiones para evitar la propagación de estas enfermedades en el país.



Es sabido que algunos virus y fitoplasmas no presentan síntomas destacados, por lo que a veces pasan inadvertidos o confundidos con otros factores. Los efectos sobre las parras se manifiestan de diferentes formas, lo cual dificulta una evaluación precisa de las pérdidas. Estas pérdidas pueden estar asociadas a disminución de rendimiento, menor crecimiento de las parras, cambios e irregularidades de coloración de la fruta, disminución de calibre, retardos de madurez, baja concentración de azúcares, aumento de susceptibilidad a otras formas de daños, efectos sinérgicos con otros patógenos, muerte de plantas e incompatibilidad del patrón-injerto. Estos efectos pueden pasar inadvertidos en plantas asintomáticas, aun cuando la disminución de la producción puede llegar a un 5% por año.

En el ámbito internacional, los datos relativos a las pérdidas de producto debidas a la presencia de virus y fitoplasmas en vid (injertada o no), evidencian cuan grande es el riesgo para Chile en el caso que estos patógenos se difundan sin control en el país. Baja de producción calculada en alrededor del 44 hasta al 66%, y reducción de contenido en azúcar del 9 hasta el 30%, son valores que podrían conducir al colapso del sistema productivo, con graves consecuencias sociales de las áreas del país cuya actividad económica se basa fundamentalmente en el cultivo de la vid.

Para Chile que ha aprovechando los menores costos de producción, debiera concentrar sus esfuerzos en mejorar calidad, ya que países como Sudáfrica y Nueva Zelanda obtienen precios muy superiores al producto nacional transado en una misma época. Estos países han seguido una estrategia de diferenciación de producto vía calidad.

En la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile se desarrolló el proyecto FONDEF D9712030 el cual importó kits de ELISA (desde Italia) para diagnóstico de algunos virus en vid. Sin embargo, no se conoce la sensibilidad de esta técnica, ni se han comparado los resultados con otros métodos de diagnóstico que son complementarios y fundamentales, tales como los biológicos y PCR. Como consecuencia de esto se plantea el presente proyecto.





5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

INTRODUCCIÓN

La superficie mundial de vides viníferas ha decrecido, principalmente por su arranque masivo. Los viñedos que se han mantenido han seguido una estrategia orientado a la calidad más que a la cantidad. En el caso de uva de mesa, se ha tenido una disminución de la superficie plantada (Rev. Agroeconómico, 1999), pero también ha tenido un aumento de la producción, llegando a un equilibrio de la demanda, lo que ha significado para los productores actuales mejorar calidad para mantenerse en el negocio.

Para Chile que ha aprovechando los menores costos de producción, debiera concentrar sus esfuerzos en mejorar calidad, ya que países como Sudáfrica y Nueva Zelanda obtienen precios muy superiores al producto nacional transado en una misma época. Estos países han seguido una estrategia de diferenciación de producto vía calidad.

Consecuente con lo anterior, en Chile se ha dado mayor énfasis en aspectos fitosanitarios y disminución de costos de producción. Es así como al renovar plantaciones de vid, se tiende a utilizar plantas injertadas para evitar el problema de replante que requiere, al no utilizar esta técnica, tratamientos químicos de alto costo en suelo como es el uso de bromuro de metilo.

Como resultado del uso de plantas injertadas, han aparecido síntomas antes desconocidos en el cultivo de la vid en Chile. Es así como se ha observado en terreno plantas con incompatibilidad de patrón-injerto y sintomatología atribuible a presencia de virus y fitoplasmas. Tales antecedentes dejan en claro que para el futuro de la viticultura chilena, es prioritario aclarar definitivamente cuales son los patógenos involucrados para poder actuar en forma correcta para su control.

Actualmente existe la tendencia mundial de utilizar material vegetal libre de virus y virus afines. En este contexto, el uso de material vegetal certificado es una práctica común en países tecnológicamente más avanzados. En el año 1990, en Francia, la superficie plantada con material certificado de vides era cinco veces mayor a la de material estándar (Walter, 1992). También en Italia, en los últimos 10 años, ha aumentado en 300% el número de frutales certificados (Lugli, 2000).

IMPORTANCIA ECONÓMICA DE VIRUS Y FITOPLASMAS EN VID

Las pérdidas económicas producidas por virus y fitoplasmas en vides son de diferente índole: disminución de rendimientos, reducción del crecimiento, alteración en el color y sabor de las bayas, deformación, retraso en la maduración, aumento de la sensibilidad a otros patógenos y plagas, incompatibilidad variedad/portainjerto y muerte de la planta (Covarrubias, 1993).



En presencia de síntomas se ha observado una reducción de producción de alrededor del 23% con una disminución del contenido en azúcar del 5%. Las pérdidas económicas aumentan si se considera que buena parte del producto resulta invendible por efecto de la incompleta coloración de las bayas maduras, y por la elevada mortalidad de las plantas (Digiario et al., 1997). Adicionalmente se ha comprobado que los injertos efectuados con material vegetal infectado en forma latente, pueden desarrollar fenómenos de incompatibilidad con la consiguiente muerte de la planta (Golino, 1993).

Golino (1993) encontró en plantas asintomáticas, una disminución de 5% anual en la productividad.

VIRUS Y FITOPLASMAS FITOPATÓGENOS EN VID

Los hallazgos e identificación de virus y fitoplasmas son relativamente recientes, especialmente debido al avance científico logrado, que ha permitido en los últimos años implementar procedimientos e instrumentos de gran alcance y precisión. Las principales virosis que afectan a la vid son las siguientes: Grapevine fanleaf virus (GFLV); Grapevine fleck virus (GFKV); Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs); Rugose Wood Complex; Tomato ringspot virus (ToRSV); Arabis mosaic virus (ArMV); Strawberry latent ringspot virus (SLRSV).

Fanleaf (hoja en abanico o degeneración infecciosa) es un nepovirus con razas que inducen: malformaciones de las hojas y sarmientos; o decoloración amarillo brillante del follaje. En ambos casos se observa una reducción de vigor y de calidad y cantidad de producción. Similares son los síntomas causados por los nepovirus **ArMV** y **SLRSV**.

Nepovirus es también el **ToRSV**, cuyos síntomas varían según las condiciones ambientales: en climas fríos se observan disminución del vigor, detención de crecimiento, deformación de hojas y sarmientos, baja productividad. En climas templados se ve afectado el rendimiento pero no el vigor, y las hojas pueden mostrar bandas amarillas a lo largo de las venas.

Fleck o Marbruna es latente en vides europeas y en muchos portainjertos americanos. En *Vitis rupestris* los síntomas consisten en el clareamiento de las venas de tercero y cuarto orden, con producción localizada de manchas traslúcidas. En algunos casos se puede observar detención de crecimiento y deformaciones de las hojas.

Leafroll (Hoja enrollada) se define así la enfermedad producida por siete virus serológicamente diferentes, la mayoría de los cuales son closterovirus. Las hojas son menos anchas de lo normal, con márgenes enrollados y decolorados, con cambio de color a rojo púrpura o amarillo en variedades rojas o tinta y blancas, respectivamente. El GLRaV-2 ha sido claramente asociado a fenómenos de incompatibilidad entre portainjerto y variedad (Greif et al., 1995).

Rugose Wood Complex (Madera Rugosa). Está asociada con cuatro trichovirus serológicamente diferentes denominados *rupestris stem pitting*, corky bark (GVB), Kober stem grooving (GVA), y LN33 stem grooving. Se observa reducción de vigor, brotación tardía, disminución de la producción, y en algunos casos hay declinación y muerte de la planta infectada en pocos años. Algunas veces hay engrosamiento y rugosidad de la corteza con textura esponjosa. La madera del injerto, portainjerto o ambos, resultan deformados con hendiduras y bordes (Martelli & Walter, 1998).



La vid es afectada por amarillamiento debidas a la acción de diferentes fitoplasmas, llamados: Flavescencia dorada, Bois noir, Vergilbungskrankheit, amarillamiento de vides mediterráneas, subtropicales o Norteamericanas (Caudwell, 1993). Los síntomas no difieren significativamente de los antes descritos para virus.

Algunos de los virus reportados anteriormente han sido detectados en Chile, con los consiguientes daños para la viticultura nacional. Afortunadamente en algunos de éstos, los niveles detectados son relativamente bajos y merecen atención por las repercusiones económicas que ellos puedan tener en el mediano y largo plazo; sobre todo en aquellos de mayor agresividad y velocidad de propagación. En relación con la extrema facilidad con que tales virus se transmiten, a través del material vegetativo de propagación, el control resulta fundamental e incluye diversas medidas complementarias que combinan aspectos de manejo como de sanidad del material reproductivo, proveniente de viveros. Un punto de partida en el combate de las enfermedades virosas lo constituye la disponibilidad de plantas sanas en vivero.

RECURSOS TÉCNICOS

Técnicas de diagnóstico de virus y fitoplasmas

Las técnicas de diagnóstico mas utilizadas en virología vegetal pueden clasificarse en inmunológicas, génicas y biológicas. Entre las técnicas inmunológicas la principal es la Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (**ELISA**), y de las génicas la Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (**RT-PCR**). De la unión de estas dos se obtiene una tercera técnica de diagnóstico muy utilizadas en el último periodo: la Inmuno Capture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (**IC-RT-PCR**). Estos métodos tienen la ventaja de ser seguros, sensibles y aceptados en numerosos protocolos oficiales a escala mundial. Con las técnicas biológicas se hace uso de **indicadores herbáceos o leñosos** diferenciados para cada especie. En el primer caso se infectan las plantas a través transmisión mecánica. Para los virus que no se transmiten mecánicamente es necesario hacer injertos en plantas indicadoras leñosas. En ambos casos existe la desventaja de necesitar más tiempo para el diagnóstico, respecto a la utilización de ELISA. (Martelli y Quacquarelli, 1983; Conti *et al.*, 1996).

La técnica mas utilizada para el diagnóstico de fitoplasmas es PCR. Para aumentar la sensibilidad se utiliza un método definido "Nested", que consiste en una primera amplificación por medio de PCR con partidores universales, cuyo producto se somete a un segundo ciclo de PCR. Para eso se hace uso de otra pareja de partidores universales o de partidores específicos capaces de amplificar una zona interna del producto de la primera amplificación.

Justificación

La situación que se observó en países europeos y Norteamérica con un material vegetal similar al chileno, nos permite asumir que la situación fitosanitaria no es diferente. Como consecuencia de lo anterior, en este proyecto se plantea implementar técnicas desarrolladas en otros países.



En Chile, en vides, a la fecha, se conocen trabajos sobre detección de virus utilizando fundamentalmente técnicas de ELISA y orientados a vides viníferas para las regiones V y VII.

El presente proyecto propone, para las condiciones chilenas, poner a punto la técnica génica PCR (Polymerase Chain Reaction) para la detección de fitoplasmas y virus en vides viníferas y de mesa. En el caso de detección de virus se realizará utilizando como apoyo a PCR, la técnica inmunológica Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Con el propósito de realizar lo especificado en el párrafo anterior, se realizara una prospección de la situación sanitaria en las zonas productivas de mayor importancia en el país (regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana).

Los resultados de este trabajo serán difundidos como transferencia tecnológica a productores, técnicos y profesionales del sector.

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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





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



6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

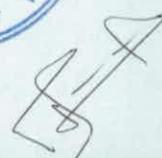
Se pretende contribuir a potenciar el mercado de uva vinífera y de mesa del país, aportando biotecnología a tecnologías de manejo del cultivo ya existentes en Chile, generando así una instancia de mejora en la calidad y productividad de este cultivo, tanto para el mercado nacional como internacional. Los viñedos y parronales se han generado, en general, a partir de material de propagación de desconocida condición patológica que tiene como característica la de perpetuar o incrementar los problemas sanitarios (virus y organismos similares) lo que redundará en una disminución de la calidad de la fruta.

Las áreas de cultivo donde se han podido observar estos problemas han sido desde la IV a la VI Región, que corresponden a los de mayor desarrollo de la viticultura chilena para la producción de uvas de mesa sin semilla (seedless), y de las uvas destinadas a la producción de vino.

Si a esto se asocia la necesidad de utilizar plantas injertadas para evitar el problema de suelo y de replante, queda de manifiesto la necesidad de contar a la brevedad con material sano para la propagación de vides tanto de patrón como injerto; además de contar con herramientas de diagnóstico biotecnológico que permita la evaluación sanitaria del parrón y viñedo a lo largo del tiempo.

El proyecto propone el desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles, rápidas y específicas que permitan la detección de virus y fitoplasmas orientadas a evaluar el estado sanitario de los viñedos y parronales asintomáticos.

Por último la realización del proyecto comprende la instancia de traspaso de información y transferencia tecnológica a productores, técnicos y profesionales vinculados al sector de producción de vino como de fruta.



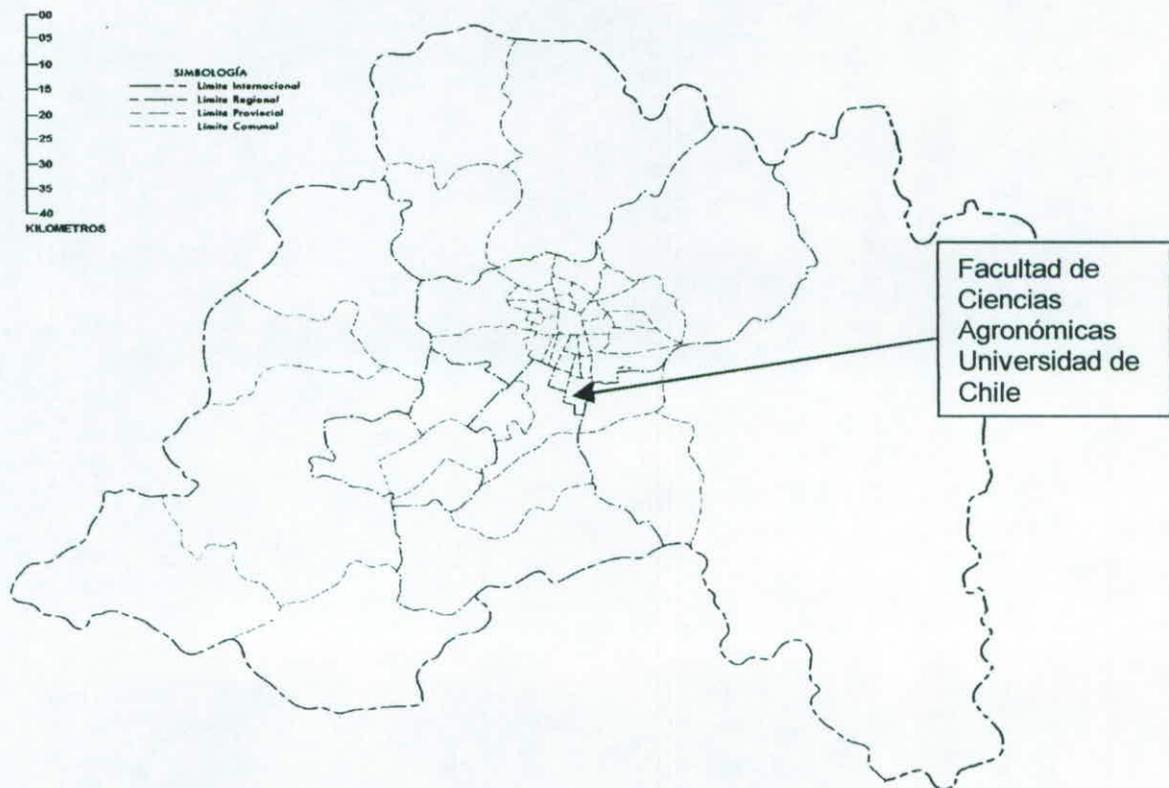


7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

(Anexar además un plano o mapa de la ubicación del proyecto)

El proyecto se ejecutará en los laboratorios e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en el Campus Antumapu, Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago. Los laboratorios corresponderán a los de Microbiología y Nematología del Departamento de Sanidad Vegetal y de Virología Frutal del Departamento de Producción Agrícola.

El material vegetal con que se trabajará se recolectará de parronales y viñas ubicados en la IV, V, VI, VII y Región Metropolitana.



8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL:

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

8.2. ESPECÍFICOS:

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



9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

(Describir en detalle la metodología y procedimientos a utilizar en la ejecución del proyecto)

Objetivo específico1.

RECOLECTAR SUELO Y MATERIAL VEGETAL NACIONAL PROCEDENTES DE VIDES DE LAS REGIONES VII, VI, IV, IV Y METROPOLITANA, PARA ESTABLECER LA SITUACIÓN FITOSANITARIA ACTUAL DE LA VID EN CHILE.

La condición fitosanitaria de la vid en Chile en relación a virus y fitoplasmas permitiría orientar las estrategias en el diagnóstico y control de los patógenos más dañinos para este cultivo. Por tal razón es necesario realizar una prospección en viñedos y parronales en diferentes zonas agroecológicas de Chile. También es importante señalar que la obtención de muestras apropiadas para los análisis a realizar es un punto crítico. Por lo tanto se propone elegir plantas con síntomas evidentes de virosis y fitoplasmas así como también plantas asintomáticas. Esta última opción es fundamental para poder detectar infecciones latentes (presencia de virus y fitoplasmas sin manifestación sintomatológica) que pueden afectar la calidad y la cantidad de la producción de las plantas.

Para asegurar una alta confiabilidad es necesario recolectar muestras con tres a cinco puntos distintos del viñedo o parronal. Se debe tomar en cuenta el tamaño del viñedo y el origen del material vegetal al momento de realizar el muestreo.

Cada muestra corresponderá a tres plantas cercanas. De cada planta se recolectará material de cinco puntos diferentes (trozos de sarmientos de a lo menos un año) formando así una muestra compuesta. Para asegurar el éxito de la detección de virus y fitoplasmas, es necesario realizar muestreos en diferentes épocas del año, que consideren distintos estados fenológicos de la planta.

1.1 Recolección de material vegetal IV Región

Se visitarán predios de la IV región y se recolectarán muestras de vides, cada cual se identificará claramente y se marcará la planta de origen. El total de vides recolectadas se llevarán al laboratorio y por cada muestra 1/3 se guardará a 4° C, otro tercio a -20°C y el tercio restante se enraizará en sustrato.

También se recolectarán muestras de suelo procedentes de los mismos predios visitados para muestrear material vegetal, con el fin de analizarlo para establecer presencia de nemátodos, particularmente *Xiphinema index* y *Xiphinema americanum*, notoriamente vectores de virus que afectan la vid.

El total de las visitas programada para la IV región es de 9 a lo largo del proyecto. En cada visita se recolectarán 10 muestras de vid (5 con síntomas y 5 asintomáticas) y 5 de suelo (correspondiente a los predios con vides sintomáticas). Se concentrarán las visitas en los primeros dos años de proyecto y se hará que coincidan con los diferentes estadios fenológicos que atraviesa la vid en pleno campo. El total de los predios muestreados será de 90.



1.2 Recolección de material vegetal Regiones V y Metropolitana

Se visitarán predios de la V y Región Metropolitana y se recolectarán muestras de vides, cada cual se identificará claramente y se marcará la planta de origen. El total de vides recolectadas se llevarán al laboratorio y por cada muestra 1/3 se guardará a 4° C, otro tercio a -20°C y el tercio restante se enraizará en sustrato.

También se recolectarán muestras de suelo procedentes de los mismos predios visitados para muestrear material vegetal, con el fin de analizarlo para establecer presencia de nemátodos, particularmente *Xiphinema index* y *Xiphinema americanum*, notoriamente vectores de virus que afectan la vid.

El total de las visitas programadas para la regiones es de 9 a lo largo del proyecto. En cada visita se recolectarán 10 muestras de vid (5 con síntomas y 5 asintomáticas) y 5 de suelo (correspondiente a los predios con vides sintomáticas). Se concentrarán las visitas en los primeros dos años de proyecto y se hará que coincidan con los diferentes estadios fenológicos que atraviesa la vid en pleno campo. El total de los predios muestreados será de 90.

1.3 Recolección de material vegetal VI y VII regiones

Se visitarán predios de las regiones VI y VII y se recolectarán muestras de vides, cada cual se identificará claramente y se marcará la planta de origen. El total de vides recolectadas se llevarán al laboratorio y por cada muestra 1/3 se guardará a 4° C, otro tercio a -20°C y el tercio restante se enraizará en sustrato.

También se recolectarán muestras de suelo procedentes de los mismos predios visitados para muestrear material vegetal, con el fin de analizarlo para establecer presencia de nemátodos, particularmente *Xiphinema index* y *Xiphinema americanum*, notoriamente vectores de virus que afectan la vid.

El total de las visitas programadas para las regiones es de 9 a lo largo del proyecto. En cada visita se recolectarán 10 muestras de vid (5 con síntomas y 5 asintomáticas) y 5 de suelo (correspondiente a los predios con vides sintomáticas). Se concentrarán las visitas en los primeros dos años de proyecto y se hará que coincidan con los diferentes estadios fenológicos que atraviesa la vid en pleno campo. El total de los predios muestreados será de 90.

1.4 Almacenaje y mantenimiento del material colectado

El material vegetal recolectado, que se indican en los 1.1, 1.2, y 1.3 se multiplicará y se mantendrá en sustrato, en invernadero, para poder acceder a él cuando sea necesario. El total de accesiones guardadas en sustrato corresponderá a 270.

Se utilizarán sarmientos de 0,7 a 1 cm de diámetro. Si los sarmientos no han recibido la cantidad de horas frío necesarias para la brotación, se someterán a un tratamiento de frío forzado el cual consiste en envolver los sarmientos en una arpillera húmeda y colocarlos dentro una bolsa de plástico para mantener la humedad. Luego son llevados a cámara de frío con temperatura regulada entre los 4 y 6°C. Cuando el tratamiento de frío se completa se cortarán estacas de 3 ó 4 yemas y se sumergirán 2 de ellas en una solución con fitohormonas para el enraizamiento. Las estacas así tratadas se establecerán en una cama caliente hecha de un sustrato inerte (mezcla de turba y perlita en relación 1:1) humedecido con una mezcla fungicida de amplio espectro (Benlate, Captan y Ridomil). Después de tres semanas, las estacas barbadadas serán, traspasadas a bolsas.





con sustrato enriquecido (mezcla de turba, perlita, suelo y tierra de hoja en partes iguales) a la cual se le agrega fertilizantes de liberación lenta.

Cuando sea necesario, se enraizarán también brotes verdes.

1.5 Determinación de poblaciones de nemátodos fitófagos vectores de virus *Xiphinema index* y *Xiphinema americanum* en los suelos recolectados.

Las muestras de suelo se tomarán con un barreno de 2,5 cm de diámetro, en la zona radical. La extracción de nemátodos fitoparásitos se hace utilizando una muestra de 250 mL de suelo con raicillas. Las formas móviles presentes se extraerán de acuerdo al método de tamizado de suelo, más un periodo de filtración de 48 horas según el método Baermann para obtener básicamente ejemplares en estados juveniles (Southey, 1970). Se procederá a la identificación y conteo de *X. index* y *X. americanum* en los extractos, utilizando una lupa estereoscópica.





Objetivo específico 2

DESARROLLAR UN SISTEMA DE DIAGNÓSTICO CONFIABLE Y RÁPIDO PARA VID, UTILIZANDO TÉCNICAS MOLECULARES (SEROLOGÍA Y AMPLIFICACIÓN GÉNICA) PARA DETECTAR VIRUS Y FITOPLASMAS

2.1 Desarrollo protocolo ELISA para diagnóstico de virus en vid

La técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es utilizada fundamentalmente para la detección e identificación de virus en laboratorio. Se considera como la prueba de rutina, primer acercamiento al conocimiento del estado sanitario de las plantas. Los Kits comerciales disponibles en el mercado consideran la variante de DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977). Se aplicará para los siguientes virus: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV.

2.2 Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en nemátodos: GFLV, ToRSV

Se procederá de acuerdo a lo indicado en el punto anterior. En este caso se necesita previamente de una etapa de extracción de los nemátodos desde el suelo.

2.3 Desarrollo protocolo de PCR para virus y fitoplasmas, en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, Rupestris stem pitting, y Fitoplasmas del amarillamiento de la vid

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) representa un sistema en donde la misma molécula "blanco" es amplificada selectivamente con respecto a la totalidad de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, a través del uso de una DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa) y de una pareja de partidores específicos. La reacción procede según tres fases:

- Desnaturalización de la molécula blanco;
- Apareamiento de los partidores a la molécula blanco;
- Síntesis de la cadena complementaria de DNA por medio de la Taq polimerasa.

La posibilidad de repetir un número infinito de veces tal reacción ha hecho si que se definiera Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Dado que la Taq polimerasa reconoce solamente moléculas de DNA como templado para sintetizar filamentos complementarios, la PCR se puede aplicar a los virus a RNA solo si precedida da la síntesis de un primer filamento de DNA complementario (cDNA) producido por transcriptasa reversa(RT).

En el caso de los virus GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV se aplicaran dos diferentes técnicas de purificación de los ácidos nucleicos virales: Silice-Captura (Malinowsky, 1997) e Inmuno-Captura (Chevalier *et al.* 1993).



Para los fitoplasmas se utilizarán partidores universales y/o específicos, diseñados sobre la base del gen 16S rRNA (Smart *et al.*, 1996). La metodología no difiere de la ya citada con respecto a los virus, en este caso no se necesita la etapa de transcriptasa reversa porque se trata de organismos con genoma a DNA y se utilizará el método de Zhang *et al.* (1998) para la extracción de los ácidos nucleicos. Se prefiere aplicar la técnica definida "NESTED", que consiste en una primera PCR con partidores universales, cuyo producto de amplificación se somete a una segunda PCR para mejorar la sensibilidad de la técnica o para determinar el grupo de pertenencia del fitoplasma infectante la muestra. Para eso se hace uso respectivamente de otra pareja de partidores universales o de partidores específicos, en grado de amplificar una zona interna al primer producto de amplificación.

Objetivo específico 3

CARACTERIZAR GENÉTICAMENTE TRES ENTRE LO MÁS IMPORTANTES VIRUS Y FITOPLASMAS ENCONTRADOS EN VIDES CHILENAS

3.1 Amplificación génica de patógeno de vid

Los fragmentos de cDNA virales y de DNA fitoplasmáticos amplificados a través de PCR serán purificados utilizando las columnas del Kit Wizard-PCR (Promega), y después se ligarán en un plásmido (Sambrook *et al.*, 1989) pGEM-T (Promega). Se efectuará con los tres patógenos más interesantes aislados desde el material recolectado en Chile. Por cada patógeno a caracterizar se estima un número de 4 amplificaciones, cada una correspondiente a 400 pares de bases.

3.2 Secuenciación génica

Los clones recombinantes positivos se secuenciarán (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando un equipo ABI-Prism 310. Se efectuará con los tres patógenos más interesantes aislados desde el material recolectado en Chile. Por cada patógeno a caracterizar se estima un número de 4 secuenciaciones, cada una correspondiente a 400 pares de bases.

La decisión de la secuenciación de tres patógenos se basa en que no es posible a priori establecer cuantos y cuales serán los más importantes para el país, ya que esto se obtendrá durante el desarrollo del proyecto. Además, el tiempo y costo de cada secuenciación no permitiría dentro del marco del presente proyecto secuenciar un número mayor.

3.3 Comparación de las secuencias

Utilizando el programa FASTA es posible comparar tales secuencias con las del banco de datos (GenBank o EBI), obteniendo la caracterización molecular de los virus y fitoplasmas objeto de la investigación. Se efectuará con los tres patógenos más interesantes aislados desde el material recolectado en Chile.

3.4 Bloque de plantas infectadas con patógenos caracterizados

Los patógenos caracterizados según los puntos 3.1, 3.2 y 3.3, se mantendrán disponibles en plantas de vid.





Objetivo específico 4

ESTABLECER UN PROTOCOLO SENSIBLE Y ESPECIFICO PARA LOS CUATRO PATÓGENOS (VIRUS Y FITOPLASMAS) MÁS IMPORTANTES DETECTADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO, EVALUADO TÉCNICA Y ECONÓMICAMENTE, ORIENTADO A LA DETECCIÓN EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS.

4.1 Determinación de costo, sensibilidad, especificidad y tiempo de duración de cada técnica, para el diagnóstico de los cuatros patógenos más importantes detectados en el estudio

Se procederá a determinar y comparar el costo, la sensibilidad, la especificidad y el tiempo de duración de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de los patógenos considerados en el presente proyecto. Además como consecuencia de los resultados obtenidos, se recomendará la mejor época para realizar los muestreos.

Objetivo específico 5

DIFUNDIR LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

5.1 Charlas técnicas

Se buscará transferir la tecnología desarrollada mediante charlas a productores, técnicos y profesionales vinculados al área. Realizandose dos eventos de este tipo durante el desarrollo del proyecto.

5.2 Día de campo

Se tendrá un día de campo para mostrar en terreno los logros alcanzados.

5.3 Seminario internacional

Se realizará un seminario internacional con invitados extranjeros vinculados con el tema.

5.4 Participación en Congresos de la Sociedad Chilena de Fitopatología con presentación de trabajos

Dos componentes del grupo de trabajo participaran en el XIII y XIV Congreso Chileno de Fitopatología para difundir los resultados logrados con el proyecto.

5.5 Presentación de trabajos para publicación en revistas internacionales

Se presentaran dos trabajos en revistas internacionales para difundir los resultados logrados.

5.6 Presentación de trabajos para publicaciones en revista nacional

Se presentaran dos trabajos en revistas nacionales para difundir los resultados logrados.





REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Chevalier, S., Greif, C., Bass, P. and Walter, B. 1993 Development of the immunocapture-reverse transcription-PCR procedure for detection of GVA in grapevine tissue. *Extended Abstract 11th Meeting of ICVG, Montreux 1993*, 151.

Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977 Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

Malinowsky, T. 1997 Silica capture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): Applications for the detection of several plant viruses. *In: Diagnosis and identification of plant pathogens*, Kluwer Academic Publishers, 445-448.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2^o Edition.

Southey, J.K. 1970 *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Min., Agric., Fisher and Food, London, England. Tech. Bull.2.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E. and Kirkpatrick, B.C. 1996 Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 8: 2988-2993.

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



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2001

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.1	Recolección de material vegetal IV Región	01.12.01	31.12.01
1	1.2	Recolección de material vegetal V y Región Metropolitana	01.12.01	31.12.01
1	1.3	Recolección de material vegetal VI y VII Regiones	01.12.01	31.12.01
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	01.12.01	31.12.01
2	2.1	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFKV	01.12.01	31.12.01



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO				
Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.1	Recolección de material vegetal IV Región	02.01.02	15.12.02
1	1.2	Recolección de material vegetal V y Región Metropolitana	02.01.02	15.12.02
1	1.3	Recolección de material vegetal VI y VII Regiones	02.01.02	15.12.02
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	01.01.02	31.12.02
1	1.5	Determinación de poblaciones de nemátodos fitófagos vectores de virus <i>Xiphinema index</i> y <i>X. americanum</i> en los suelos recolectados.	01.01.02	31.12.02
1	2.1	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV	01.01.02	31.12.02
2	2.2	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en nemátodos: GFLV, ToRSV	01.05.02	31.12.02
2	2.3	Desarrollo protocolo de PCR para virus y fitoplasmas, en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, Rupestris stem pitting, y Fitoplasmas del amarillamiento de la vid	01.03.02	31.12.02
6	6.1	Entrega de informe	30.8.02	30.8.02



Handwritten signatures in blue ink, including a large stylized signature and a smaller one with a checkmark.

10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2003

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.1	Recolección de material vegetal IV Región	01.01.03	15.12.03
1	1.2	Recolección de material vegetal V y Región Metropolitana	15.01.03	20.12.03
1	1.3	Recolección de material vegetal VI y VII Regiones	22.01.03	23.12.03
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	01.01.03	31.12.03
1	1.5	Determinación de poblaciones de nemátodos fitófagos vectores de virus <i>Xiphinema index</i> y <i>X. americanum</i> en los suelos recolectados.	01.01.03	31.12.03
2	2.2	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en nemátodos: GFLV, ToRSV	01.01.03	31.12.03
2	2.3	Desarrollo protocolo de PCR para virus y fitoplasmas, en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFKV, Rupestris stem pitting, y Fitoplasmas del amarillamiento de la vid	01.01.03	31.12.03
3	3.1	Amplificación génica de patógenos de vid	01.08.03	31.12.03
5	5.1	Charla técnica	07.07.03	20.07.03
5	5.4	Participación en Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología con presentación de trabajo	01.09.03	24.12.03
6	6.2	Entrega de informe	30.1.03	30.1.03
6	6.3	Entrega de informe	30.7.03	30.7.03



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2004

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	01.01.04	31.12.04
2	2.2	Desarrollo protocolo ELISA para los siguientes virus en nemátodos: GFLV, ToRSV	01.01.04	30.04.04
2	2.3	Desarrollo protocolo de PCR para virus y fitoplasmas, en vides: GFLV, ToRSV, ArMV, GVA, GVB, SLRSV, GLRaV-1, 2, 3, GFKV, Rupestris stem pitting, y Fitoplasmas del amarillamiento de la vid	01.01.04	31.07.04
3	3.1	Amplificación génica de patógenos de vid	01.01.04	31.12.04
3	3.2	Secuenciación génica	01.01.04	31.12.04
3	3.3	Comparación de las secuencias	01.06.04	31.12.04
4	4.1	Determinación de costo, sensibilidad, especificidad, tiempo de duración de cada técnica y mejor época de muestreo, para el diagnóstico de los cuatro patógenos detectados en el estudio	01.01.04	31.12.04
5	5.1	Charla técnica	10.05.04	20.05.04
5	5.2	Día de campo	14.01.04	30.01.04
5	5.3	Seminario internacional	04.11.04	30.11.04
5	5.4	Participación en Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología con presentación de trabajo	01.08.04	23.12.04
5	5.5	Presentación de trabajo para publicación en revista internacional	01.03.04	30.07.04
5	5.6	Presentaciones de trabajos para publicaciones en revistas nacionales	01.04.04	30.12.04
6	6.4	Entrega de informe	30.1.04	30.1.04
6	6.5	Entrega de informe	30.7.04	30.7.04





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2005

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.4	Almacenaje y mantenimiento del material colectado	01.01.05	30.11.05
3	3.1	Amplificación génica de patógenos de vid	01.01.05	30.09.05
3	3.2	Secuenciación génica	01.01.05	30.09.05
3	3.3	Comparación de las secuencias	01.01.05	30.09.05
3	3.4	Bloque de plantas infectadas con patógenos caracterizados	01.06.05	31.10.05
4	4.1	Determinación de costo, sensibilidad, especificidad, tiempo de duración de cada técnica y mejor época de muestreo, para el diagnóstico de los cuatro patógenos detectados en el estudio	01.01.05	30.09.05
5	5.5	Presentación de trabajo para publicación en revista internacional	01.08.05	30.11.05
6	6.6	Entrega de informe	30.1.05	30.1.05
6	6.7	Entrega de informe	30.6.05	30.6.05
6	6.8	Entrega de informe final	30.11.05	30.11.05



Handwritten signature and initials in blue ink.

11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Material vegetal y suelo recolectado	Número de muestras	405	255	31.10.2002
2	Virus detectados con ELISA en material vegetal	Número de virus	10	5	31.05.2002
2	Virus detectados con ELISA en nematodos	Numero de virus	2	1	30.09.2003
2	Patógenos detectados con PCR en material vegetal	Número de virus y fitoplásmas	11 virus y un fitoplasma	6 virus	30.06.2003
3	Patógeno caracterizados genéticamente	Número de virus y fitoplásmas	2 virus y 1 fitoplasma	1 virus	31.07.2005
4	Evaluación técnico-económico de diagnóstico utilizando ELISA y PCR	Estudio de rentabilidad técnica económica	estudios de rentabilidad para los 4 patógenos más importantes	Estudios de rentabilidad para 2 de los patógenos más importantes	31.01.2005
5	Charlas técnicas realizadas	Número de charlas	2	1	28.07.03
5	Día de campo realizado	Número de días de campo	1	Inicio organización	05.11.2003
5	Seminario internacional realizado	Número de seminarios	1	Inicio organización	25.01.2004
5	Participación en congresos nacionales con presentación de trabajos	Número de congresos nacionales	2	1	24.12.2003
5	Publicaciones en revistas internacionales	Número publicaciones	2	1	30.07.2004
5	Publicaciones en revistas nacionales	Número publicaciones	2	1	31.07.2004





11.2. Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. N°	Activi d. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	1.1	Material recolectado en la IV Región	Número de muestras	135 muestras	90 muestras	31.10.02
1	1.2	Material recolectado en la V y Región Metropolitana	Número de muestras	135 muestras	90 muestras	31.10.02
1	1.3	Material recolectado en la VI y VII regiones	Número de muestras	135 muestras	75 muestras	31.10.02
1	1.4	Material vegetal colectado, almacenado y mantenido	Numero de muestras	270 muestras	170 muestras	31.10.02
1	1.5	Determinación presencia <i>Xiphinema index</i> y <i>X. americanum</i> en muestras de suelo recolectadas en las actividades 1.1, 1.2 y 1.3	Numero de muestras de suelo	135	85	31.10.02
2	2.1	Protocolo ELISA en vides terminado	numero de virus	10 virus	5 virus	31.05.02
2	2.2	Protocolo ELISA en nematodos	numero de virus	2 virus	1 virus	30.09.03
2	2.3	Protocolo PCR terminado	Número virus y fitoplasmas	11 virus y un fitoplasma	6 virus	30.06.03
3	3.1	Amplificaciones génicas realizadas	Número de amplificaciones	12	4	31.08.04
3	3.2	Secuenciaciones génicas realizadas	Numero de secuenciaciones	12	4	31.12.04
3	3.3	Comparaciones de secuencias realizadas	Número de virus y fitoplasmas completamente secuenciados	2 virus y 1 fitoplasma	1 virus	31.03.05





3	3.4	Bloque de plantas infectadas con patógeno caracterizados genéticamente, completado	Número de virus y fitoplasmas	2 virus y un fitoplasma	1 virus	25.09.05
4	4.1	Estudios de costo, sensibilidad, especificidad y tiempo de duración de cada técnica y mejor época de muestreo, terminado.	Estudio de rentabilidad técnico económica	Estudios de rentabilidad para los 4 patógenos más importantes con sus respectivos protocolos	estudios de rentabilidad para 2 de los patógenos más importantes con sus respectivos protocolos	31.01.05
5	5.1	Charlas técnicas realizadas	número de charlas	2	1	28.07.03
5	5.2	Día de campo realizado	número de día de campo	1	inicio organización	05.11.03
5	5.3	Seminario internacional realizado	Número de seminarios	1	inicio organización	25.01.04
5	5.4	Participación en congresos nacionales con presentación de trabajos	Número de congresos	2	1	24.12.03
5	5.5	Publicaciones en revistas internacionales	Número de publicaciones	2	1	30.07.04
5	5.6	Publicaciones en revistas nacionales	Número de publicaciones	2	1	31.07.04



HITOS POR AÑO DE EJECUCION DEL PROYECTO

Los hitos que identifican sucesos significativos dentro de la programación de actividades en el proyecto, se relacionan con la obtención de resultados. Dentro del proyecto son:

Primer año. Diciembre del 2001 a diciembre del 2002.

ACTIVIDAD	Obtención de RESULTADO
1.1 Recolección material vegetal IV región (1)	Octubre del 2002
1.2 Recolección material vegetal regiones V y Metropolitana (1)	Octubre del 2002
1.3 Recolección material vegetal regiones VI y VII (1)	Noviembre del 2002
2.1 Desarrollo protocolo ELISA para virus en vides	Diciembre del 2002

(1)Para todo el proyecto se espera realizar un total de 9 recolecciones de material vegetal. En el primer año se deben completar las primeras 6.

Segundo año. Enero a diciembre del 2003.

ACTIVIDAD	Obtención de RESULTADO
1.1 Recolección material vegetal IV región (1)	Mayo del 2003
1.2 Recolección material vegetal regiones V y Metropolitana (1)	Mayo del 2003
1.3 Recolección material vegetal regiones VI y VII (1)	Mayo del 2003
1.5 Determinación de nematodos fitófagos vectores de virus	Diciembre del 2003
5.1 Primera charla técnica: Informe (2)	Julio del 2003
5.4 Participación en Congreso Nacional de la Sociedad Chilena de Fitopatología: Informe (2)	Diciembre del 2003

(1)Para todo el proyecto se espera realizar un total de 9 recolecciones de material vegetal. En el segundo año se deben completar las 3 restantes.

(2)Se entregarán Informes a FIA de las actividades de difusión de los resultados logrados hasta el segundo año de ejecución del proyecto.



Tercer año. Enero a diciembre del 2004.

ACTIVIDAD	Obtención de RESULTADO
2.2 Desarrollo de protocolo ELISA para virus en nemátodos	Abril del 2004
2.3 Desarrollo de protocolo PCR para virus y fitoplasmas en vid	Julio del 2004
5.1 Segunda charla técnica: Informe (3)	Mayo del 2004
5.2 Día de campo (3)	Enero del 2004
5.3 Seminario Internacional (3)	Noviembre del 2004
5.4 Participación en Congreso Nacional de la Sociedad Chilena de Fitopatología: Informe (3)	Diciembre del 2004
5.5 Primera publicación en revista internacional (4)	Julio del 2004
5.6 Primera y segunda publicación en revistas nacionales (4)	Diciembre del 2004

(3) Se entregarán Informes a FIA de las actividades de difusión de los resultados logrados hasta el segundo año de ejecución del proyecto.

(4) Despacho a Comité Editorial.

Cuarto año. Enero a noviembre del 2005.

ACTIVIDAD	Obtención de RESULTADO
1.4 Almacenaje y mantenimiento del material colectado (5)	Noviembre del 2005
3.1 Amplificación génica de patógenos de vid	Septiembre del 2005
3.2 Secuenciación génica de patógenos de vid	Septiembre del 2005
3.3 Comparación de secuencias génicas de patógenos de vid	Septiembre del 2005
3.4 Bloque de plantas infectadas con patógenos caracterizados (6)	Octubre del 2005
4.1 Determinación de costos, sensibilidad, especificidad, tiempo de duración y mejor época de muestreo de cada técnica para el diagnóstico de los 4 patógenos más importantes detectados en el estudio	Septiembre del 2005
5.5 Segunda publicación en revista internacional (7)	Noviembre del 2005

(5) 270 plantas almacenadas.

(6) 30 plantas almacenadas a razón de 10 plantas por cada patógeno caracterizado



(7) Despacho a Comité Editorial.

GRANDES METAS DEL PROYECTO

- 1 Conocer la situación fitosanitaria, en cuanto a enfermedades causadas por virus y fitoplasmas, de la uva de mesa y vinífera en las regiones IV a VII.
- 2 Establecer un protocolo de diagnóstico para los cuatro patógenos más importantes detectados en la zona de estudio. Para lo cual se utilizarán pruebas serológicas y moleculares, determinándose el mejor método de detección y la mejor época de muestreo.
- 3 Obtener la secuenciación génica de los dos virus y un fitoplasma más importantes detectados en la zona de estudio.
- 4 Difundir a nivel nacional e internacional los resultados obtenidos con el presente proyecto.

12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

El presente proyecto permitirá conocer el real estado fitosanitario en cuanto a enfermedades virales y fitoplasmas para las principales zona productoras de uva vinífera y de mesa del país. Lo cual permitirá tomar medidas sanitarias para la obtención de plantas libres de estos fitopatógenos, lo que redundará en una optimización del cultivo tanto por la vía de aumento de producción y/o cambio en sus atributos organolépticos y/o por vía de disminución de costos de producción.

En Chile, la combinación, de material de propagación sano y el uso de portainjertos resistentes a problemas de replante, permitirá dar un nuevo impulso y a su vez hacer más estable la producción de uva, contribuyendo a la disminución de costos de producción.

La economía de la III, IV, V, RM, VI y VII, en especial la rural, no será afectada por inestabilidad de la producción de vid. Para ello, el proyecto propone detectar virus y organismos afines para prevenir su difusión en los cultivos.

Habrá un incremento del input tecnológico, por ello tanto productores como empleados requerirán mayores conocimientos y demandarán capacitación mediante cursos, seminarios, charlas, revistas y artículos de extensión, lo cual derivará en una mayor culturización de las personas del medio (viveristas, productores de uva y vinos. profesionales y personas involucradas).

La ejecución de este proyecto ayudará a poner las bases para obtener en un futuro cercano, la recuperación de valioso germoplasma infectado por virus y virus afines utilizando las técnicas aquí desarrolladas en apoyo a la limpieza de material vegetal.



Con las técnicas desarrolladas en el proyecto se podrá conocer el estado fitosanitario de la vid en Chile, permitiendo tomar medidas de prevención y control para mejorar el estado sanitario de las plantas en nuestro país.

Con este proyecto, serán beneficiados viveristas (por tener la oportunidad de producir y distribuir plantas sanas) y productores de uva y vinos (mayor calidad organoléptica y aumento de la producción)

12.2. Social

Disminuiría la migración campo ciudad, la cual es fundamentalmente de jóvenes, que constituyen la principal fuente laboral.

El proyecto propone el desarrollo de técnicas de detección de virus y fitoplasmas en material de vid, lo que permite contar con material de vid sano para realizar nuevas plantaciones y replantes de esta especie, contribuyendo a una más estable demanda de mano de obras en las regiones donde se desarrolla este cultivo.

12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

El proyecto contribuirá al desarrollo de la biotecnología en Chile en el área de la Sanidad Vegetal. Permitiría la formación de personal capaz de ofrecer servicios en el diagnóstico de enfermedades virales y virus afines. También permitirá establecer protocolos de análisis que estarán disponibles para la comunidad científica y técnica del país.



13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

La presencia de virus y fitoplasmas en vid pueden producir entre otros, síntomas: amarilleces, decoloración de bayas, atraso de maduración y baja concentración en azúcares. Normalmente los productores relacionan estos fenómenos a falta de fertilización y por lo tanto aplican agroquímicos para solucionarlos.

Lo anterior tiene un impacto ambiental negativo debido a una mayor contaminación del suelo y de las aguas.

Por lo tanto el diagnóstico adecuado y oportuno evitaría esta forma de contaminación del medio ambiente.

13.2. Acciones propuestas

No es aplicable por lo indicado en el punto 13.2.

13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)

No es aplicable por lo indicado en el punto 13.2.



17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. *Técnicos*

1.- **No encontrar un número satisfactorio de muestras sintomáticas**

No existe la certeza de poder encontrar el número presupuestado de plantas infectadas sintomáticas, sobretodo en la zona norte del país en donde no se conocen a la fecha datos sobre las condiciones fitosanitarias de las viñas con respecto a virus y fitoplasmas.

2.- **Baja especificidad de la técnica de PCR**

Podría verificarse un resultado de baja especificidad de la técnica PCR aplicada a los virus y fitoplasmas objetos del presente estudio. El problema podría relacionarse a una baja especificidad de los partidores utilizados indicados por la literatura.

3.- **Baja sensibilidad de ELISA**

Posibilidad de baja sensibilidad del test ELISA para algunos de los patógenos contemplado en el proyecto como consecuencia de la calidad de los antisueros utilizados.

4.- **Virus no considerado en el proyecto**

Ya que la vid es afectada por un gran número de virus, durante la ejecución del proyecto se podría presentar un virus no considerado en la formulación del mismo,

5.- **Mayores tiempos para la secuenciación**

Podría requerirse un mayor tiempo que el propuesto para la secuenciación de algunos de los patógenos propuestos.





17.2. Económicos

1.- Baja demanda del servicio ofrecido

Existe el riesgo de una baja demanda del servicio ofrecido, sobretodo en los primeros años de funcionamiento del sistema de diagnóstico, debido a un general desconocimiento, por parte de productores y viveristas, de la oportunidad que se le ofrece para mejorar su actividad económica.

2.- Precios de los servicios ofrecidos inferiores a lo presupuestados

Se contempla la posibilidad de bajar los precios de los servicios de análisis ofrecidos, por la misma razón enunciadas anteriormente.

17.3. Gestión

17.4. Otros



17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Riesgos técnicos		
1.-No encontrar un número satisfactorio de muestras sintomáticas	Medio	Realizar la totalidad de las salidas presupuestadas.
2. -Baja especificidad de PCR	Medio	Uso de partidores más específico obtenidos: de nuevas publicaciones científica editada internacionalmente durante los años de duración del proyecto; de los profesionales que trabajan en el proyecto.
3.- Baja sensibilidad de ELISA	Bajo	Ensayar diferentes diluciones de trabajo de los kit de antisueros y uso de antisueros de distintas procedencia.
4.- Aparición de virus no considerados en la formulación del proyecto	Medio	Desarrollar las técnicas de diagnóstico para su identificación, incorporándolos en el estudio.
5.-Mayores tiempo para la secuenciación	Medio	Adelantar el período de secuenciación propuesto.
Riesgos económicos		
1.- Baja demanda del servicio ofrecido	Bajo	Es importante, en esta instancia, promocionar las actividades que se están llevando a cabo con el proyecto, a través de charlas técnicas, día de campo y seminario.
2.- Precios de los servicios ofrecidos inferiores a lo presupuestados	Bajo	Idem





18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se divulgarán a través de charlas técnicas, día de campo, seminario internacional, participación a congresos y publicaciones científicas. Además, por realizarse en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, los resultados se transferirán a los alumnos en los cursos afines de pre y postgrado.

Las charlas técnicas se orientarán a productores y viveristas, los que se informarán de los avances obtenidos en el proyecto. Una de las charlas se realizará en Rancagua y otra en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad, también asistirán alumnos de pre y post grado..

El día de campo se realizará en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y estará dirigido a productores de uva vinífera y de mesa, así como profesionales y técnicos del área,.

El Seminario Internacional se organizará para conocer los logros en el campo del diagnóstico de virus y organismos afines en vid, que se han obtenidos en el ámbito internacional.

Publicaciones nacionales:

Revista Fruticola
Aconex

Publicaciones Internacionales

Plant Disease
Journal of Plant Pathology

Los resultados a obtener en este proyecto se difundirán en eventos programados para los siguientes períodos:

Dos charlas técnicas

La primera en invierno del 2003 y la segunda en verano de 2004

Un día de campo

Verano de 2004.

Un seminario

Primavera de 2004

Dos participaciones a congresos

El primero en la primavera de 2003 y el segundo en la primavera de 2004

Dos publicaciones en revistas internacionales

Una en otoño de 2004 y la otra en primavera de 2005

Dos publicaciones en revistas nacionales

La primera en otoño de 2004 y la segunda en primavera de 2004



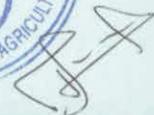
19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

El agente postulante, o Responsable del Proyecto, es una persona jurídica que se dedica a la investigación en el sector agropecuario. Posee una vasta experiencia en formulación y ejecución de proyectos de investigación.

Por otra parte, el equipo técnico que apoya este proyecto tiene una vasta experiencia en tema de diagnóstico de enfermedades virales en frutales, como queda de manifiesto en lo currículos que se adjuntan, además de sólidas vinculaciones con instituciones extranjeras especializadas y contacto con empresas frutícolas nacionales.



19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

La Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile cuenta con laboratorios, equipos de laboratorios, invernadero, bodega y oficina para cumplir con las labores que demande la realización del presente proyecto.

2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

La Facultad de Ciencia Agronómicas de la Universidad de Chile cuenta con la experiencia de personal calificado para brindar apoyo administrativo y contable necesario al desarrollo del proyecto.





20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones

