

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	3.0 MAYO 2008
Hora	9:20
Nº Ingreso	2614

**ANEXOS AL
INFORME FINAL TECNICO Y DE DIFUSIÓN**

I. ANTECEDENTES GENERALES

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

NOMBRE DEL PROYECTO:

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

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

AGENTE EJECUTOR: Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Agronómicas

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

COORDINADOR DEL PROYECTO: JaimeR. Montealegre A.

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

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCIÓN	

III. INFORME TÉCNICO

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

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

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

Cuadro 1

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

5	5.1	Recolección de langostinos.	450 insectos	509 insectos	30.11.07
5	5.2	Separación de langostinos según característica morfológicas.	14 grupos	18 grupos	30.09.07
5	5.3	Análisis para fitoplasmas en langostinos.	400 análisis	438 análisis	30.11.07
5	5.4	Caracterización de langostinos y fitoplasmas encontrados en ellos.	-Langostinos: 3 familias y 3 subfamilias; -Fitoplasmas: 4 especies.	-Langostinos: 3 familias y 5 subfamilias; -Fitoplasmas: 5 especies.	30.11.07
6	6.1	Recolección de plantas asociadas a las vides.	70 plantas	89 plantas	31.08.07
6	6.2	Separación de plantas asociadas a las vides, según características morfológicas.	18 grupos	26 grupos	30.09.07
6	6.3	Análisis para fitoplasmas en plantas asociadas a las vides.	70 análisis	89 análisis	31.10.07
6	6.4	Caracterización de plantas asociadas a vides y fitoplasmas encontrados en ellas.	-Plantas: 18 especies; -Fitoplasmas: 3 especies.	-Plantas: 19 especies; -Fitoplasmas: 3 especies.	30.11.07
7	7.1	Charlas técnicas	3 charlas	3 charlas	07.05.04
7	7.2	Día de Campo	2 días de campo	2 días de campo	27.01.04
7	7.3	Seminario Internacional	1 seminario	1 seminario	06.04.05
7	7.4	Participación a congresos nacionales e internacionales con presentación de trabajos	12 trabajos	19 trabajos	17.11.05
7	7.5	Presentación de trabajos para publicaciones en revistas internacionales	5 trabajos	8 trabajos	30.11.05
7	7.6	Presentación de trabajos para publicaciones en revistas nacionales	2 trabajos	2 trabajos más 6 resúmenes de presentaciones a congresos	30.04.05

2. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Para la realización de la actividad 2.1

Se desarrollaron los protocolos propuestos por la empresa Agritest Italia, que se anexaron en "protocolos".

Para la realización de la actividad 2.3

Los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y para la ejecución de RT-PCR para la detección de virus y de Nested-PCR para los fitoplasmas se adjuntaron en el anexo "protocolos".

Para la realización de la actividad 5.3

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

Para la realización de la actividad 6.3

Para la detección de fitoplasmas, el método de extracción de DNA desde plantas asociadas a viñedos es idéntico al que se usa para la vid (véase protocolo Nested-PCR). Para análisis de fitoplasmas se utilizó la técnica de Nested-PCR.

4. RESULTADOS DEL PROYECTO

Actividades 1.1, 1.2, 1.3 y 1.5

Recolección de material vegetal

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

El cuadro 1 con los detalles de este muestreo se encuentra en el anexo “cuadros”.

Recolección de suelo

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

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

Los detalles se encuentran en el cuadro 2.

Actividad 2.3

En el anexo “protocolos” se detallan los protocolos de extracción de ácidos nucleicos para la detección de virus y de fitoplasmas. Además se detallan los protocolos para realizar la RT-PCR para GLRaV-2, GVA, GVB, GRSPaV y GLRaV-2 Red Globe –RG- (nueva denominación de Grapevine rootstock stem lesion-associated virus - GRSPaV). Siempre en el mismo anexo se encuentran los protocolos de RT-PCR para GFkV y de Nested-PCR para la detección de fitoplasmas en vid y se incluyeron los protocolos de RT-PCR para GFLV, GLRaV-3, GLRaV-1, ToRSV, ArMV y SLRV.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Véase cuadro 18 y supuesto del análisis económico en anexo.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

**Se hace referencia a las actividades 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6
Toda la información se encuentra en anexo “actividades de difusión”.**

Organización realización de tres Charlas Técnicas

1. Primera charla técnica, en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.
2. Segunda charla técnica, en el Campus Limarí de la Universidad de La Serena.

Organización de un Seminario Internacional

Seminario Internacional del proyecto, cuyo título fue: “Situación actual de la vid en relación a virus, viroides y fitoplasmas”. El evento se celebró en el centro de extensión Los Almendros, Camino La Pirámide 5625, Huechuraba, Santiago, el 5 y 6 de abril 2005. El evento se cofinanció a través del Programa de Captura y Difusión Tecnológica de FIA.

Organización de un Día de Campo

Realizado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Participación a Congresos Nacionales

1. Tres trabajos se presentaron al XII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT)
2. Un trabajo se presentó al 53° Congreso Agronómico de Chile.
3. Un trabajo al XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).
4. Dos trabajos presentados al XIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).
5. Un trabajo presentado al XV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología (SOCHIFIT).

Participación a Congresos Internacionales

1. Presentación de tres trabajos al 14th Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine (ICVG), celebrado en Locorotondo (Bari), Italia.
2. Presentación de un trabajo al IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, celebrado en Santiago, Chile.
3. Presentación de un trabajo al XII Congreso Latinoamericano de Fitopatología (ALF)/III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, celebrado en Vila Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
4. Presentación de tres trabajos al 15th Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine (ICVG), celebrado en Stellenbosch, Sudáfrica, del 3 hasta el 7 de abril del 2006.

Publicaciones internacionales

- 1) S. Prodan, J. Montealegre and N. Fiore (2003). Aetiology of decline in Thompson Seedless grafted plants. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 142-143.
- 2) A. Gajardo, S. Botti, J. Montealegre, N. Fiore and A. Bertaccini (2003). Survey on Phytoplasmas identified in chilean grapevines. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 85-86.
- 3) S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, P. Fernández, R. Reyes and N. Fiore (2003). Report of new viral disease in chilean grapevines. *Extended Abstract* of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italia 2003, 145.
- 4) A. Bertaccini, S. Paltrinieri, S. Botti, B. Duduk, N. Fiore, M. Kolber, D. Skoric, E. Torres, M. Conti (2006). Diversity of 16SrXII phytoplasmas detected in grapevine growing areas worldwide. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 88-89.
- 5) E. Engel, V. Arredondo, C. Girardi, A. Gonzalez, P. Escobar, N. Fiore, P. Arce and P.D.T. Valenzuela (2006). Grapevine viruses in Chile: genomics and detection based on immunocapture and microarray technologies. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 118-119.
- 6) M. Digiario, N. Fiore, L. Tarricone, S. Prodan and T. Elbeaino (2006). Influence of viruses on the performance and quality of cv. Crimson Seedless. *Extended Abstract* of 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch, South Africa 2006, 186-188.
- 8) N. Fiore, S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, and A. Zamorano (2008). Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology* (en prensa).

Publicaciones nacionales

Resúmenes

- 1) En la revista Aconex N° 78 de Enero, Febrero y Marzo 2003, se publicó el resumen de un trabajo presentado al XII Congreso de la SOCHIFIT:
Fiore N., Botti S., Montealegre J., Bertaccini, A. (2003). Reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI en vides chilenas. *Aconex* N° 78: 8.
- 2) En la revista Simiente N° 72 de Julio-Diciembre 2002, se publicó el resumen del trabajo presentado en 53° Congreso Agronómico de Chile:
Fiore N., Montealegre J., Aballay E., Prodan S., Fernández P., Reyes R. Botti S., Bertaccini A. y Pino, A. (2002). Nuevos reportes de enfermedades producidas por virus y fitoplasmas en vides chilenas. *Simiente* 72 (3-4): 97.
- 3) Fiore N., Montealegre J., Aballay E., Prodan S., Fernández P., Reyes R. y Pino, A. (2003). Nuevos reportes de enfermedades virales en vides chilenas. *Fitopatología* Vol.38, N°2: 93.

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

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

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

Artículos

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

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

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

V. ANEXOS

PROCOLOS

ELISA



SET OF DIAGNOSTIC KITS FOR 5 GRAPEVINE VIRUS INSTRUCTIONS FOR USE

Introduction

The intended purpose of this set of five diagnostic kits is the detection in grapevine tissue of GFLV, GLRaV 1, GLRaV 3, GVA, and GFkV. This set has been primarily conceived to be employed in the certification programs for control of fanleaf, leafroll, rugose wood complex (Kober stem grooving), and fleck.

Principle of the assay

The method for the detection of the five viruses is an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on (i) Double Antibody Sandwich (DAS) and (ii) Double Antibody Sandwich Indirect (DASI). The latter technique applies to the GFkV kit. Signal develops by alkaline phosphatase activity.

Specificity

Each assay specificity refers to the following bibliography:

- GFLV
- Quacquarelli A., D. Gallitelli, V. Savino and G.P. Martelli, 1976. Properties of grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology* 32, 349-360.
- GLRaV 1 and GLRaV 3
- Boscia D., Greif C., Gugerli P., Martelli G.P., Walter B., and Gonsalves D., 1995. Nomenclature of grapevine leafroll associated putative closterovirus. *Vitis* 34:171-175.
 - Gugerli, P. 1991. Grapevine closterovirus, p.40-51. In I.C. Rumbos, R. Bovey, D. Gonsalves, W.B. Hewitt, and G.P. Martelli (ed.), *Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG)*. Plant Protection Institute, P.O. Box 303, 38001 Volos, Greece.
- GVA
- Boscia D., E. Aslouj, V. Elicio, V. Savino, M.A. Castellano and G.P. Martelli, 1992. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to grapevine virus A. *Archives of Virology* 127, 184-194.
- GFkV
- Boscia D., V. Elicio, V. Savino and G.P. Martelli, 1994. Production of monoclonal antibodies to grapevine fleck virus. *Plant Pathology* 44, 160-163.

Assay quality control

The positive and the negative controls provided with each kit can be used as references (i) to verify that each assay was carried out correctly, (ii) to check the activity of reagents as prepared for the assay, and (iii) to set the test threshold.

- Positive control consists of grapevine phloem tissue tested for GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, and GFkV. The presence of the viruses was ascertained by ELISA, indexing on *Vitis* indicators, and PCR.
- Negative control consists of grapevine phloem tissue tested for GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, and GFkV. The absence of the viruses was ascertained as above.

Reconstitute freeze dried controls by adding distilled water, as stated on the label. When available, use your fresh positive control too. Process each control content as the samples.

Antigen extraction

Each kit is calibrated for testing grapevine phloem tissue. The antigen can also be detected in other tissues: GFLV in leaf tissue; GFkV in young leaf tissue; GLRaV-1 and 3 in mature leaf or petiole tissue. Do not use leaf source of American *Vitis* species and their hybrids to detect GLRaV. Antigen extractions are achieved by Tris-HCl buffer, pH 8.2.

Testing time

Reading of results is made after adding the substrate within 30'-120'. Follow the color development.

Storage of set components

All set components must be kept at 4°C. The set should be used within 9-12 months since the date of packaging. The reagents are stored in glycerol. Reconstituted controls can be stored at -20°C and used no more than 2-3 times. When GVA reagents are not used at once, please subdivide protein A per volumes ready to use and store them at -20.

Components provided with the set (see the label inside the set package)

Equipment and materials required but not supplied

- spectrophotometer, 405 filter, blank setting program,
- thermostatic chamber or thermostatically-controlled moist chamber,
- manual or automatic device for rinsing wells,
- micropipette with disposable tips (10, 100, 200 μ l)
- microtiter plates (recommended: MicroTest III U-bottom, Falcon Becton Dickinson Labware),
- substrate p-nitrophenil phosphate (pNPP),
- buffer solutions (coating, washing, extraction, conjugate, substrate).

Buffer preparation and volumes

Prepare buffer solution according to classical ELISA formulation. In general, buffer volume calculation refers to the use of 20 ml/plate/step. In addition, consider that washing buffer volume is 60 ml/plate/washing step, while extraction buffer volume depends on sample grind technique.

Sample preparation

It is recommended to prepare samples the day the assay begins. Grind plant tissue and dilute it in extraction buffer, p/V 1:15.

Reagent preparation and dilutions

Antibody reagents must be prepared just before the assay development. Calculation of reagent volume, to be diluted in the proper buffer, is based on (i) dilutions stated on the reagent label.

Example:

dilution 1:500	dilute 40 μ l in 20 ml buffer /plate
dilution 1:1000	dilute 20 μ l in 20 ml buffer /plate
dilution 1:2000	dilute 10 μ l in 20 ml buffer /plate

Plate lay-out

It is recommended to design the plate lay-out as follows:

- positive control placed into two replicate wells per assay,
- negative control placed into two replicate wells per assay,
- 2 blank wells per plate,
- each sample placed into two replicate wells.

The edge-wells can be used when a thermostatically-controlled moist chamber is available.

Protocols (see the label inside the kit package)

Reading and interpretation of results

Blank the spectrophotometer with the blank and read the absorbance.

The presence or the absence of virus is determined by relating the absorbance of the unknown samples to that of the threshold value. Absorbance greater or lower than the threshold value are, respectively, positive or negative results.

The threshold can be determined as 3 times the mean absorbance value of the negative control.

The mean absorbance value of positive control should be at least equal to the threshold value. If not, the results should be considered uncertain.

Precautions

In order to obtain reliable results a strict observation of the instructions and a skilful technique are required. It is recommended to

- check for quality of buffers (purity, contaminations, pH, etc...)
- be accurate in dispensing, withdrawing and washing steps
- replace micropipette tips when different vials or samples are used
- avoid substrate contamination by using clean labware
- avoid using reagents remaining from other kit



SET OF DIAGNOSTIC KITS FOR 5 GRAPEVINE VIRUSES PROTOCOLS

Each kit is used to carry out its ELISA protocol :

- ⇒ DAS-ELISA protocol applies to GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 assays,
- ⇒ DAS-ELISA beginning with pre coating step, applies to GVA assay,
- ⇒ DAS-ELISA protocol applies to GFkV assay.

It is recommended to dedicate each ELISA plate to a specific protocol.

For any enquiry, contact Agritest : +39.80.8770 549 (fax) or +39.6. 589 7645 (ph/fax) ; info@agritest.no.it

DAS-ELISA PROCEDURE

- 0. *PRE COATING only for GVA ASSAY*
 - dilute Protein A (**red code**) in coating buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 µl per well
 - incubate 2 hr at 37°C
 - wash the plate 3 times with washing buffer , 3' soaking each time
- 1. COATING ANTIBODIES
 - dilute specific antibody reagent (**blue code**) in coating buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 µl per well
 - incubate 2 hr at 37°C or over night at 4°C
 - wash the plate 3 times with washing buffer, 3' soaking each time
- 2. SAMPLE DISTRIBUTION
 - prepare samples and controls as described in the instructions
 - dispense 200 µl per well according to the designed plate lay-out
 - incubate 2 hr at 37°C or over night at 4°C. *For GVA assay, incubate over night at 4°C.*
 - wash the plate 3 times with washing buffer at room temperature, 3' soaking each time
- 3. CONJUGATE ANTIBODIES
 - dilute the specific conjugate antibody (**green code**) in conjugate buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 µl per well
 - incubate 2 hr at 37°C or over night at 4°C
 - wash the wells 3 times with washing buffer at room temperature, 3' soaking each time.
- 4. SUBSTRATE
 - dilute p-nitrophenil phosphate in substrate buffer at 1 mg/ml
 - dispense 200 µl per well
 - incubate at room temperature following signal development for 60'-120'
- 5. RESULTS
 - read the absorbance of samples with a spectrophotometer at 405 nm, blank setting
 - signal development can be stopped by dispensing 50 µl per well of sodium hydroxide 3 M

NOTE: Please do not carry out more then one incubation over night

DASI-ELISA PROCEDURE

- 1. COATING ANTIBODIES
 - dilute specific antibody reagent (**blue code**) in coating buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 μ l per well
 - incubate 2 hr at 37°C or o.n. at 4°C
 - wash the plate 3 times with washing buffer, 3' soaking each time
- 2. SAMPLE DISTRIBUTION
 - prepare samples and controls as described in the instructions
 - dispense 200 μ l per well according to the designed plate lay-out
 - incubate 2 hr at 37°C or o.n. at 4°C
 - wash the plate 3 times with washing buffer at room temperature, 3' soaking each time
- 3. SPECIFIC ANTIBODIES
 - dilute the specific antibody reagent (**white code**) in conjugate buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 μ l per well
 - incubate 2 hr at 37°C or o.n. at 4°C
 - wash the wells 3 times with washing buffer at room temperature, 3' soaking each time.
- 4. CONJUGATE ANTIBODIES
 - dilute the conjugate antimouse (**yellow code**) in conjugate buffer at the dilution stated on the label
 - dispense 200 μ l per well
 - incubate 2 hr at 37°C or o.n. at 4°C
 - wash the wells 3 times with washing buffer at room temperature, 3' soaking each time.
- 5. SUBSTRATE
 - dilute p-nitrophenil phosphate in substrate buffer at 1 mg/ml
 - dispense 200 μ l per well
 - incubate at room temperature following signal development for 30'-60'
- 6. RESULTS
 - read the absorbance of samples with a spectrophotometer at 405 nm, blank setting
 - signal development can be stopped by dispensing 50 μ l per well of sodium hydroxide 3 M

NOTE: Please do not carry out more then one incubation over night

RT-PCR

Extracción desde plantas de ácidos nucleicos totales

1. Macerar 0,2 g de tejido vegetal en 1 mL de tampón de extracción.
2. Recolectar todo en un tubo "eppendorf" y agregar 300 μL de Sodio Lauril Sarkosil (NaLS) al 10% y agitar por 1 minuto.
3. Incubar a 70°C por 10 minutos y al termino poner en hielo por 5 minutos.
4. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos.
5. Transferir 300 μL de sobrenadante en un nuevo "eppendorf" y agregar: 150 μL de EtOH al 100%, 300 μL de NaI 6M y 50 μL de solución de partículas de sílice.
6. Agitar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.
8. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 μL de tampón de lavado.
9. Repetir los pasos 7 y 8.
10. Repetir el paso 7 y eliminar el sobrenadante.
11. Resuspender el precipitado en 150 μL de agua bidestilada estéril.
12. Incubar a 70°C por 4 minutos en baño termorregulado, después agitar.
13. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos, y transferir el sobrenadante en un "eppendorf" nuevo.
14. Guardar el ácido nucleico total (TNA) a -20°C .

Síntesis de DNA complementario (cDNA) por medio de la Transcriptasa Reversa (RT)

1. Preparación de la mezcla de RT para una muestra:

TNA	15 μL
Partidores al azar (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)*	1 μL
Agua bidestilada estéril	7,5 μL
Tampón de RT 5X	10 μL
Mercaptoetanol 0,3 M	5 μL
dNTPs (10 mM)	2,5 μL
Agua bidestilada estéril	8 μL
Volumen final	49 μL

2. Poner el tubo "eppendorf" antes preparado a 95°C por 3 minutos en baño termorregulado.
3. Dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Agregar 1 μL de la enzima M-MLV RT (200U/ μL).
5. Poner a 39°C por 1 hora en baño termorregulado.
6. Guardar el cDNA obtenido a -20°C .

PCR

1. Preparación de la mezcla de PCR para una muestra:

cDNA	5	μL
Taq buffer 10X	10	μL
MgCl ₂ 25 mM	5	μL
dNTPs mix (10 mM)	2	μL
primer upstream (0,2 μg/μL)	2	μL
primer downstream 0,2 μg/μL	2	μL
H ₂ O bd estéril	73,75	μL
Taq polymerase (5 U/μL)	0,25	μL
Volumen total	100	μL

2. Ciclo de amplificación en termociclador

-pre-PCR	95°C x 3 minutos*	
-PCR	desnaturalización 94°C x 30 segundos**	}x 40 CICLOS**
	apareamiento 58°C x 40 segundos**	
	extensión 72°C x 54 segundos**	
-extensión final	72°C x 10 minutos*	
-mantenimiento	16°C (o también a 4°C) x ∞*	

3. Partidores específico utilizados en RT-PCR

Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)

Primers: 1BA
2BA

Amplifica un producto de 820 bp.

Grapevine virus A (GVA)

Primers: H587
C995

Amplifica un producto de 432 bp.

Grapevine virus B (GVB)

Primers: H28
B/Bo

Amplifica un producto de 155 bp.

Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)

Primers: 48d
49d

Amplifica un producto de 330 bp.

Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV)

Primers: RGJSP227
RGHSP777

Amplifica un producto de 551 bp.

Grapevine fleck virus (GFkV)

Primers: L630
U279

Amplifica un producto de 353 bp.

Grapevine fanleaf virus(GFLV)

Primers: H2999
C3310

Amplifica un producto de 312 bp.

Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)

Primers: LC1
LC2

Amplifica un producto de 550 bp.

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)

Primers: Sefc 1
Sefc 2

Amplifican un producto de 275 bp.

Tomato ringspot virus (ToRSV)

Primers: Griesbach 1
Griesbach 2

Amplifican un producto de 449 bp.

Arabidopsis mosaic virus (ArMV)

Primers: MacKenzie H428
MacKenzie C867

Amplifican un producto de 430 bp.

EXTRACCIÓN DNA DE FITOPLASMAS EN VID

1. Pulverizar en nitrógeno líquido 1 o 2 gramos de venas;
2. Agregar 8 mL de tampón de extracción y homogenizar la muestra;
3. Transferir 1 mL de extracto en eppendorf y vortexar;
4. Poner en baño termorregulado a 65°C por 10 minutos;
5. Añadir igual volumen (1mL) de cloroformo:isoamilalcohol (24:1), vortexar;
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos a 20°C;
7. Transferir la fase acuosa (500 µL) en nuevo eppendorf;
8. Añadir 150 µL de isopropanol frío y 150 µL de EtOH (100%) frío, 600 µL de NaI 6M y 50 µL de silica;
9. Vortexar e incubar a T° ambiente per 10 minutos;
10. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto;
11. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 µL de Propanol wash;
12. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto;
13. Repetir los puntos 11 y 12;
14. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 µL de EtOH (100%);
15. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto y eliminar el sobrenadante;
16. Secar el precipitado a T° ambiente y resuspenderlo a 200 µL de H₂O bd estéril;
17. Incubar a 65°C en baño termorregulado por 3 minutos;
18. Vortexar y centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos;
19. Recolectar el sobrenadante;
20. Hacer medición con espectrofotometro;
21. Guardar a 4°C.

NESTED PCR PARA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN VID

PCR con partidores universales P1/P7

Primera Nested con partidores universales R16 F2/R2

Segunda Nested con partidores específicos para el grupo 16SrI y 16SrXII: R16 (I) F1/R1

Mezcla de reacción para PCR con P1/P7

Taq buffer 10X	3	µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	µL
dNTPs mix (10 mM)	2	µL
partidor forward (40 µM)	0,5	µL
partidor reverse (40µM)	0,5	µL
H ₂ O bd estéril	19,6	µL
<u>Taq polymerase</u>	<u>1</u>	<u>µL</u>
Volumen total	29	µL

Preparar una diluición a 50 ng/µL de ácido nucleico total y agregar 1 µL a la mezcla de reacción.

En cada tubo de reacción el volumen final será de 30 μ L.

Mezcla de reacción para Nested-PCR con R16 F2/R2 y R16 (I) F1/R1

Taq buffer 10X	3	μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	μ L
dNTPs mix (10 mM)	2	μ L
partidor forward (40 μ M)	1	μ L
partidor reverse (40 μ M)	1	μ L
H ₂ O bd estéril	18,6	μ L
<u>Taq polymerase</u>	<u>1</u>	<u>μL</u>
Volumen total	29	μ L

Preparar una dilución a 1/30 del amplicón P1/P7 y agregar 1 μ L a la mezcla de reacción para el Nested-PCR con los partidores R16 F2/R2.
Preparar una dilución a 1/30 del amplicón R16 F2/R2 y agregar 1 μ L a la mezcla de reacción para el Nested-PCR con los partidores R16 (I) F1/R1.
En cada tubo de reacción el volumen final deberá ser de 30 μ L.

Ciclo de PCR (aplicable para las tres parejas de partidores)

Pre PCR	94°C x 2 minutos	}x 35 CICLOS
desnaturalización	94°C x 1 minuto	
apareamiento	50°C x 1 minutos	
extensión	72°C x 3 minutos	
extensión final	72°C x 10 minutos	

Partidores

R16 (I) F1/R1 amplifica un producto de 1100 par de bases (bp).

Preparación gel de agarosa y corrida electroforética para la observación de los productos de amplificación de virus fitoplasmas

1. Se prepara un gel al 1,2% de agarosa en TAE buffer.
2. La corrida electroforética se hace en 100 Volts constantes.
4. Para teñir el gel se utiliza Bromuro de Etidio (EB) 0,5 μ g / 1 ml de gel.
5. El gel se observa con un transiluminador.

CUADROS

Cuadro N° 1. Identificación y origen de las plantas marcadas

1	RM	41	V	84	RM	133	V	184	IV	228	VI	274	RM	317	V	372	IV	821	RM	1005	VI
2	=	42	=	85	=	137	=	185	=	229	=	275	=	318	=	373	=	823	=	1006	=
3	=	43	=	86	=	138	IV	186	=	230	=	276	=	319	=	374	=	825	=	1007	=
4	=	44	=	87	=	139	=	187	=	231	=	277	=	321	=	375	=	840	VI	1008	=
5	=	45	=	88	=	140	=	188	=	232	=	278	=	322	=	629	RM	857	=	1010	=
6	=	46	=	89	=	141	=	189	=	233	=	279	=	324	=	630	=	882	=	1011	=
7	=	47	=	90	=	142	=	190	=	234	=	280	=	325	=	631	VI	887	=	1013	=
8	=	48	=	91	=	143	=	191	=	235	=	281	VII	326	=	632	=	901	=	1028	VII
9	=	51	=	92	=	145	=	192	=	236	=	282	=	327	=	675	V	906	=	1029	=
10	=	52	=	93	V	146	=	193	=	237	=	283	=	328	=	676	=	908	=	1032	=
11	=	53	=	94	=	147	=	194	=	238	=	284	=	330	=	719	IV	912	=	1033	=
12	=	55	=	95	=	148	=	195	VII	239	=	285	=	331	=	720	=	914	=	1034	=
13	=	56	=	97	=	149	=	197	=	240	=	286	=	332	=	724	V	916	=	1035	V
14	=	57	=	98	=	150	=	198	=	241	=	289	=	333	VI	758	RM	917	=	1036	=
15	=	58	=	99	=	151	=	199	=	242	=	290	=	334	=	759	=	919	=	1037	=
16	=	59	=	100	=	152	=	200	=	243	=	291	=	337	=	780	=	922	=	1039	=
17	=	60	=	102	=	153	=	201	=	244	=	292	=	338	=	782	=	925	=	1060	VI
18	V	61	=	103	=	154	=	202	=	245	=	294	V	339	=	783	=	928	=	1063	=
19	=	62	=	105	=	155	=	203	=	246	=	295	=	340	=	784	=	932	=	1071	=
20	=	63	=	108	=	156	=	204	=	247	=	296	=	341	=	785	=	936	=	1075	=
21	=	64	=	109	=	157	=	205	=	248	=	297	=	343	=	786	=	940	=	1081	=
22	=	65	=	110	=	158	=	206	=	249	=	298	=	344	=	787	=	944	=	1084	=
23	=	66	=	111	=	159	=	208	=	250	=	299	=	345	RM	788	=	948	=	1088	=
24	=	67	=	112	=	160	=	209	=	251	=	300	=	346	=	789	=	952	=	1115	=
25	=	68	=	113	=	161	=	210	=	253	=	301	=	347	=	790	=	956	=	1116	=
26	=	69	=	114	=	162	=	211	=	254	=	302	=	348	=	792	=	959	=	1117	=
27	=	70	=	115	=	163	=	212	=	255	V	303	=	349	=	794	VI	963	=	1118	=
28	=	71	=	116	=	170	=	213	=	256	=	304	=	350	=	796	=	966	=	1119	=
29	=	72	=	118	=	171	=	214	=	257	=	305	=	351	=	798	=	970	=	1122	=
30	=	73	=	119	=	172	=	215	=	258	=	306	=	352	=	799	=	976	=	1123	=
31	=	74	=	120	=	173	=	216	VI	260	=	307	=	356	VI	800	IV	978	=		
32	=	75	=	121	=	174	=	217	=	262	=	308	=	357	=	801	=	981	=		
33	=	76	RM	122	=	176	=	218	=	263	=	309	=	360	=	802	=	984	=		
34	=	77	=	123	=	177	=	219	=	264	=	310	=	362	=	803	=	987	=		
35	=	78	=	124	=	178	=	220	=	265	=	311	=	364	RM	804	=	990	=		
36	=	79	=	125	=	179	=	221	=	266	=	312	=	367	=	805	=	992	=		
37	=	80	=	126	=	180	=	222	=	267	=	313	=	368	=	806	RM	995	=		
38	=	81	=	127	=	181	=	223	=	268	VI	314	=	369	=	808	=	999	=		
39	=	82	=	130	=	182	=	224	=	272	=	315	=	370	IV	809	VI	1001	=		
40	=	83	=	131	=	183	=	227	=	273	=	316	=	371	=	810	=	1003	=		

Cuadro 2. Determinación de poblaciones de nemátodos fitófagos en suelo

Predio (Variedad - Región)	Resultado ELISA en plantas		Cantidad de nematodo en 250 cm ³ de suelo	
	GFLV	ToRSV	<i>Xiphinema</i> <i>index</i>	<i>Xiphinema</i> <i>americanum</i> s.l.
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	175
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	400
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	1500
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	45	0
Thompson - V	Neg.	Neg.	50	75
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	15	46
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	5	30
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	10	198
Carmenere - RM	Neg.	Neg.	100	70
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	8	25
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	10	40
Sauvignon B.- V	Neg.	Pos.	0	18
Chardonnay - V	Pos.	Neg.	0	55
C.Sauvignon -RM	Pos.	Neg.	0	45
Carmenere -RM	Pos.	Neg.	0	30
Carmenere -RM	Pos.	Neg.	10	85
Thompson -V	Pos.	Neg.	10	5
Thompson -V	Pos.	Pos.	90	85
Crimson -IV	Pos.	Neg.	220	35
Pisquera -IV	Pos.	Neg.	90	75
Red Globe -IV	Pos.	Neg.	290	45
Flame -IV	Pos.	Neg.	115	35
Thompson -IV	Pos.	Neg.	210	145
Merlot -VII	Neg.	Pos.	0	35
Thompson -VI	Pos.	Neg.	55	80
Pinot Noir -V	Pos.	Neg.	0	45
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	90	0
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	40	0
Carmenere -RM	Pos.	Neg.	90	0
Carmenere -RM	Pos.	Neg.	20	0
Thompson - V	Pos.	Neg.	120	10
Crimson - V	Pos.	Neg.	80	10
Thompson -V	Pos.	Neg.	105	30
Thompson -V	Pos.	Neg.	45	15
Merlot - VII	Neg.	Pos.	0	10
Syrah -VII	Neg.	Pos.	20	120
Syrah -VII	Pos.	Pos.	0	0

Thompson -VI	Pos.	Neg.	40	0
Petit Syrah -RM	Pos.	Neg.	0	35
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	30	10
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	90	35
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	900	10
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	35	0
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	10	0
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	60	0
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	10	0
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	65
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	95
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	120
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	30
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	75
Chardonnay - V	Neg.	Neg.	0	200
Thompson – V	Neg.	Neg.	80	0
Petit Syrah – RM	Neg.	Neg.	0	0
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	40	5
C.Sauvignon – RM	Neg.	Neg.	0	0
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – RM	Neg.	Neg.	0	0
Thompson – IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson - IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson - IV	Neg.	Neg.	0	0
Crimson - V	Pos.	Neg.	230	0
Petit Syrah – RM	Neg.	Neg.	0	0
Chardonnay – RM	Neg.	Neg.	120	0
Carmenere – RM	Neg.	Neg.	25	0
Chardonnay – RM	Neg.	Neg.	30	0
Merlot – RM	Neg.	Neg.	0	50
C.Sauvignon – RM	Pos.	Neg.	170	0
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	280	0
C.Sauvignon - RM	Pos.	Neg.	450	0
Thompson - RM	Neg.	Neg.	10	0
Red Globe - RM	Neg.	Neg.	15	0
C.Sauvignon - VI	Neg.	Neg.	15	35
Carmenere – VI	Neg.	Neg.	10	20
Carmenere – VI	Neg.	Neg.	0	30
Thompson - IV	Neg.	Neg.	0	0
Red Globe - IV	Neg.	Neg.	0	0
Thompson - IV	Neg.	Neg.	0	0
Red Globe - IV	Neg.	Neg.	0	0
Petit Syrah - RM	Neg.	Neg.	40	0

Petit Syrah - RM	Pos.	Neg.	35	0
Merlot - VI	Neg.	Neg.	0	45
C. Sauvignon - VI	Neg.	Neg.	0	25
Carmenere - RM	Neg.	Neg.	0	0
3309 - VI	Neg.	Neg.	0	0
Merlot - VI	Neg.	Neg.	0	0
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	60
Syrah - VII	Neg.	Neg.	0	45
Autumn Royal - V	Pos.	Neg.	130	0
Autumn Royal - V	Pos.	Neg.	210	0
Serna - V	Neg.	Neg.	15	0
Carmenere - V	Neg.	Neg.	0	15
Carmenere - V	Neg.	Neg.	0	85
Merlot - V	Neg.	Neg.	0	220
Merlot - V	Neg.	Neg.	0	25
Sauvignon Blanc - V	Neg.	Neg.	0	145
Sauvignon Blanc - V	Neg.	Neg.	0	25
Sauvignon Blanc - V	Neg.	Neg.	0	40
Pinot Noir - V	Neg.	Neg.	10	140
Carmenere - RM	Neg.	Neg.	0	15
C.Sauvignon - RM	Neg.	Neg.	0	50
Thompson - IV	Neg.	Neg.	35	20
Thompson - IV	Neg.	Neg.	40	10
Thompson - IV	Neg.	Neg.	110	15
Thompson - IV	Neg.	Neg.	45	0
Thompson - IV	Neg.	Neg.	80	75
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	40	55
Crimson - IV	Neg.	Neg.	155	0
Red Globe - IV	Neg.	Neg.	105	40
Moscatel - IV	Neg.	Neg.	240	0
Red Globe - IV	Neg.	Neg.	150	30
Crimson - IV	Neg.	Neg.	115	0
Thompson - IV	Neg.	Neg.	0	20
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	0	105
Thompson - IV	Neg.	Neg.	195	45
Black Seedless - IV	Neg.	Neg.	75	40
Thompson - IV	Neg.	Neg.	550	100
Flame - IV	Neg.	Neg.	240	55
Thompson - IV	Neg.	Neg.	420	110
Thompson - IV	Neg.	Neg.	335	25
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	20
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	30
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	15
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	30
Syrah - VII	Neg.	Neg.	0	10

Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	130
Syrah - VII	Neg.	Neg.	0	0
Thompson - V	Neg.	Neg.	0	10
Thompson - V	Neg.	Neg.	10	5
Thompson -IV	Neg.	Neg.	10	25
Syrah - IV	Neg.	Neg.	0	110
Syrah - IV	Neg.	Neg.	0	75
Merlot - VII	Neg.	Neg.	0	30
C. Sauvignon - VII	Neg.	Neg.	0	80
Carmenere - VII	Neg.	Neg.	0	0

**Cuadro 18:
Evaluación económica**

Evaluación económica

Vid de mesa

Evaluación económica incremental

ITEM/ANOS	Año 0 2002	Año 1 2003	Año 2 2004	Año 3 2005	Año 4 2006	Año 5 2007	Año 6 2008	Año 7 2009	Año 8 2010	Año 9 2011	Año 10 2012
INGRESOS en miles de pesos											
Ingresos por venta de uva de mesa	-	-	-	-	-	33.600.000	76.800.000	129.600.000	188.400.000	252.912.000	-
Ingreso por venta uva de mesa en ha replantadas	-	-	-	-	-	33.600.000	76.800.000	129.600.000	188.400.000	252.912.000	322.848.000
INGRESOS TOTALES (\$)											322.848.000
EGRESOS en miles de pesos											
Costos operacionales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Costo plantas	-	-	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000	3.000.000
EGRESOS TOTALES			(3.000.000)								
UTILIDAD ANTES IMPUESTO											
Impuesto a las utilidades (17%)	-	-	(3.000.000)	(3.000.000)	(3.000.000)	30.600.000	73.800.000	126.600.000	185.400.000	249.912.000	319.848.000
Utilidad después de impuesto	-	-	510.000	510.000	510.000	(5.202.000)	(12.546.000)	(21.522.000)	(31.518.000)	(42.485.040)	(54.374.160)
	-	-	(2.490.000)	(2.490.000)	(2.490.000)	25.398.000	61.254.000	105.078.000	153.882.000	207.426.960	265.473.840
INVERSIONES PARA:											
Proyecto de Innovación Tecnológica en miles de pesos	(1)										
Proyecto Productivo											
Capital de Trabajo para la Producción											
Total Inversiones	(1)										
RECUPERACIÓN INVERSIÓN											
ACTUALIZACIÓN FLUJOS FUTUROS (Año 11 a Perpetuidad)											
FLUJO NETO CAJA	(1)		(2.490.000)	(2.490.000)	(2.490.000)	25.398.000	61.254.000	105.078.000	153.882.000	207.426.960	265.473.840
RESULTADOS											
TIR (%)											172%
VAN (12%) (miles de \$)											310.062.926

Situación vid de mesa con proyecto

ITEM/AÑOS	Año 0 2002	Año 1 2003	Año 2 2004	Año 3 2005	Año 4 2006	Año 5 2007	Año 6 2008	Año 7 2009	Año 8 2010	Año 9 2011	Año 10 2012
INGRESOS en pesos											
Ingresos por venta de uva de mesa		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
Ingreso por venta uva de mesa en ha replantadas		-	-	-	-	120.000.000	264.000.000	436.800.000	609.600.000	782.400.000	955.200.000
INGRESOS TOTALES (\$)		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	677.122.275	705.055.134	772.001.902	848.431.355	933.659.858	1.027.048.433
EGRESOS en pesos											
Costos operacionales		534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085
Costo plantas libres de virus y fitoplasmas		-	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000
EGRESOS TOTALES		(534.818.800)	(551.809.895)	(557.400.990)	(562.992.085)						
UTILIDAD ANTES IMPUESTO											
(Impuesto a las utilidades (17%))		605.181.200	422.890.105	265.679.010	121.193.165	114.130.190	142.063.049	209.009.817	285.439.270	370.667.773	464.056.348
Utilidad después de impuesto		(102.880.804)	(71.891.318)	(45.165.432)	(20.602.838)	(19.402.132)	(24.150.718)	(35.531.669)	(48.524.676)	(63.013.521)	(78.889.579)
		502.300.396	350.998.787	220.513.578	100.590.327	94.728.058	117.912.331	173.478.148	236.914.594	307.654.252	385.166.769
INVERSIONES PARA:											
Proyecto de Innovación Tecnológica en miles de pesos		(200.000.000)									
Proyecto Productivo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capital de Trabajo para la Producción		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total Inversiones		(200.000.000)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RECUPERACIÓN INVERSIÓN											
ACTUALIZACIÓN FLUJOS FUTUROS (Año 11 a Perpetuidad)											
FLUJO NETO CAJA		(200.000.000)	350.998.787	220.513.578	100.590.327	94.728.058	117.912.331	173.478.148	236.914.594	307.654.252	385.166.769
RESULTADOS											
TIR (%)											
VAN (12%) (miles de \$)											
		219%									
		1.271.785.196									

Situación con proyecto

ITEM/ANOS	Año 0 2002	Año 1 2003	Año 2 2004	Año 3 2005	Año 4 2006	Año 5 2007	Año 6 2008	Año 7 2009	Año 8 2010	Año 9 2011	Año 10 2012
INGRESOS en miles de pesos											
Ingresos por venta de uva de mesa		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
Ingreso por venta uva de mesa en ha replantadas		-	-	-	-	120.000.000	264.000.000	436.800.000	609.600.000	782.400.000	955.200.000
INGRESOS TOTALES (\$)		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	677.122.275	705.055.134	772.001.902	848.431.355	933.659.858	1.027.048.433
EGRESOS en miles de pesos											
Costos operacionales		534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085
Costo plantas libres de virus y fitoplasmas		-	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000
EGRESOS TOTALES		(534.818.800)	(551.809.895)	(557.400.990)	(562.992.085)						
UTILIDAD ANTES IMPUESTO		605.181.200	422.890.105	265.679.010	121.193.165	114.130.190	142.063.049	209.009.817	285.439.270	370.667.773	464.056.348
Impuesto a las utilidades (17%)		(102.880.804)	(71.891.318)	(45.165.432)	(20.602.838)	(19.402.132)	(24.150.718)	(35.531.669)	(48.524.676)	(63.013.521)	(78.889.579)
Utilidad después de impuesto		502.300.396	350.998.787	220.513.578	100.590.327	94.728.058	117.912.331	173.478.148	236.914.594	307.654.252	385.166.769
INVERSIONES PARA:											
Proyecto de Innovación Tecnológica en miles de pesos	(1)										
Proyecto Productivo											
Capital de Trabajo para la Producción											
Total Inversiones	(1)										
RECUPERACIÓN INVERSIÓN											
ACTUALIZACIÓN FLUJOS FUTUROS (Año 11 a Perpetuidad)											
FLUJO NETO CAJA	(1)	502.300.396	350.998.787	220.513.578	100.590.327	94.728.058	117.912.331	173.478.148	236.914.594	307.654.252	385.166.769
RESULTADOS											
TIR (%)		50230039570%									
VAN (12%) (miles de \$)		1.471.785.195									

Supuestos de evaluación económica de vid de mesa con proyecto

\$480/US\$	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
superficie pl vm ha	100	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
prod cajas /ha	2.500	2.375	2.256	2.143	2.036	1.934	1.838	1.746	1.659	1.576	1.497
\$/cj (10 dol/cj)	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800
prod.cajas	250.000	237.500	203.063	171.475	142.539	116.067	91.886	69.834	49.757	31.512	14.968
ingreso 1	1.200.000.000	1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
ha repl vm			10	20	30	40	50	60	70	80	90
prod cj /ha repl 2004						2.500	3.000	3.600	3.600	3.600	3.600
prod cj /ha repl 2005							2.500	3.000	3.600	3.600	3.600
prod cj /ha repl 2006								2.500	3.000	3.600	3.600
prod cj /ha repl 2007									2.500	3.000	3.600
prod cj /ha repl 2008										2.500	3.000
prod cj /ha repl 2009											2.500
prod.cajas ha repl											
ingreso 2						25.000	55.000	91.000	127.000	163.000	199.000
Plantas libres virus y fitopl						120.000.000	264.000.000	436.800.000	609.600.000	782.400.000	955.200.000
egreso 1	0	0	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000	11.400.000
Control fitosanitario/ha	1.258.938	1.258.938	1.290.411	1.321.885	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358
Fertilizantes/ha	977.500	977.500	1.001.938	1.026.375	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813
Mano de obra/ha	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500
Otros insumos/ha	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250
egreso por ha	5.348.188	5.348.188	5.404.099	5.460.010	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921
egreso 2	534.818.800	534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085
	665.181.200	605.181.200	422.890.105	265.679.010	121.193.165	114.130.190	142.063.049	209.009.817	285.439.270	370.667.773	464.056.348

ingreso 1: cajas/ha producidas en plantación antigua

ingreso 2: cajas/ha producidas en terreno replantado

egreso 1: plantas nuevas para realizar el replante

egreso 2: costos de manejo agrícola

Situación vid de mesa sin proyecto

ITEM/AÑOS	Año 0 2002	Año 1 2003	Año 2 2004	Año 3 2005	Año 4 2006	Año 5 2007	Año 6 2008	Año 7 2009	Año 8 2010	Año 9 2011	Año 10 2012
INGRESOS en pesos											
Ingresos por venta de uva de mesa		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
Ingreso por venta uva de mesa en ha replantadas		-	-	-	-	86.400.000	187.200.000	307.200.000	421.200.000	529.488.000	632.352.000
INGRESOS TOTALES (\$)		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	643.522.275	628.255.134	642.401.902	660.031.355	680.747.858	704.200.433
EGRESOS en pesos											
Costos operacionales		534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085
Plantas para replante		-	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000
EGRESOS TOTALES		(534.818.800)	(548.809.895)	(554.400.990)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)
UTILIDAD ANTES IMPUESTO		605.181.200	425.890.105	268.679.010	124.193.165	83.530.190	68.263.049	82.409.817	100.039.270	120.755.773	144.208.348
Impuesto a las utilidades (17%)		(102.880.804)	(72.401.318)	(45.675.432)	(21.112.838)	(14.200.132)	(11.604.718)	(14.009.669)	(17.006.676)	(20.528.481)	(24.515.419)
Utilidad después de impuesto		502.300.396	353.488.787	223.003.578	103.080.327	69.330.058	56.658.331	68.400.148	83.032.594	100.227.292	119.692.929
INVERSIONES PARA:											
Proyecto de Innovación Tecnológica en miles de pesos	(100.000.000)										
Proyecto Productivo											
Capital de Trabajo para la Producción											
Total Inversiones	(100.000.000)										
RECUPERACIÓN INVERSIÓN											
ACTUALIZACIÓN FLUJOS FUTUROS (Año 11 a Perpetuidad)											
FLUJO NETO CAJA	(100.000.000)	502.300.396	353.488.787	223.003.578	103.080.327	69.330.058	56.658.331	68.400.148	83.032.594	100.227.292	119.692.929
RESULTADOS											
TIR (%)	472%										
VAN (12%) (miles de \$)	1.061.722.269										

Situación sin proyecto

ITEM/AÑOS	Año 0 2002	Año 1 2003	Año 2 2004	Año 3 2005	Año 4 2006	Año 5 2007	Año 6 2008	Año 7 2009	Año 8 2010	Año 9 2011	Año 10 2012
INGRESOS en miles de pesos											
Ingresos por venta de uva de mesa		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
Ingreso por venta uva de mesa en ha replantadas		-	-	-	-	86.400.000	187.200.000	307.200.000	421.200.000	529.488.000	632.352.000
INGRESOS TOTALES (\$)		1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	643.522.275	628.255.134	642.401.902	660.031.355	680.747.858	704.200.433
EGRESOS en miles de pesos											
Costos operacionales		534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085	551.592.085
Plantas para replante		-	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000
EGRESOS TOTALES		(534.818.800)	(548.809.895)	(554.400.990)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)	(559.992.085)
UTILIDAD ANTES IMPUESTO		605.181.200	425.890.105	268.679.010	124.193.165	83.530.190	68.263.049	82.409.817	100.039.270	120.755.773	144.208.348
Impuesto a las utilidades (17%)		(102.880.804)	(72.401.318)	(45.675.432)	(21.112.838)	(14.200.132)	(11.604.718)	(14.009.669)	(17.006.676)	(20.528.481)	(24.515.419)
Utilidad después de impuesto		502.300.396	353.488.787	223.003.578	103.080.327	69.330.058	56.658.331	68.400.148	83.032.594	100.227.292	119.692.929
INVERSIONES PARA:											
Proyecto de Innovación Tecnológica en miles de pesos	(1)										
Proyecto Productivo											
Capital de Trabajo para la Producción											
Total Inversiones	(1)										
RECUPERACIÓN INVERSIÓN											
ACTUALIZACIÓN FLUJOS FUTUROS (Año 11 a Perpetuidad)											
FLUJO NETO CAJA	(1)	502.300.396	353.488.787	223.003.578	103.080.327	69.330.058	56.658.331	68.400.148	83.032.594	100.227.292	119.692.929
RESULTADOS											
TIR (%)		50230039570%									
VAN (12%) (miles de \$)		1.161.722.268									

Supuestos de evaluación económica de vid de mesa sin proyecto

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
\$480/US\$											
superficie pl vm ha	100	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
prod cajas /ha	2.500	2.375	2.256	2.143	2.036	1.934	1.838	1.746	1.659	1.576	1.497
\$/cj (10 dol/cj)	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800
prod.cajas	250.000	237.500	203.063	171.475	142.539	116.067	91.886	69.834	49.757	31.512	14.968
ingresos 1	1.200.000.000	1.140.000.000	974.700.000	823.080.000	684.185.250	557.122.275	441.055.134	335.201.902	238.831.355	151.259.858	71.848.433
ha repl vm			10	20	30	40	50	60	70	80	90
prod cj /ha repl 2004						1.800	2.100	2.500	2.375	2.256	2.143
prod cj /ha repl 2005							1.800	2.100	2.500	2.375	2.256
prod cj /ha repl 2006								1.800	2.100	2.500	2.375
prod cj /ha repl 2007									1.800	2.100	2.500
prod cj /ha repl 2008										1.800	2.100
prod cj /ha repl 2009											1.800
prod.cajas ha repl						18.000	39.000	64.000	87.750	110.310	131.740
ingresos 2						86.400.000	187.200.000	307.200.000	421.200.000	529.488.000	632.352.000
Plantas p/replante			8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000	8.400.000
egreso 1	0	0	8.400.000								
Control fitosanitario/ha	1.258.938	1.258.938	1.290.411	1.321.885	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358	1.353.358
Fertilizantes/ha	977.500	977.500	1.001.938	1.026.375	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813	1.050.813
Mano de obra/ha	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500	1.909.500
Otros insumos/ha	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250	1.202.250
egresos por ha	5.348.188	5.348.188	5.404.099	5.460.010	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921	5.515.921
egreso 2	534.818.800	534.818.800	540.409.895	546.000.990	551.592.085						
	665.181.200	605.181.200	425.890.105	268.679.010	124.193.165	83.530.190	68.263.049	82.409.817	100.039.270	120.755.773	144.208.348

ingresos 1: cajas/ha producidas en plantación antigua
 ingresos 2: cajas/ha producidas en terreno replantado
 egreso 1: plantas nuevas para realizar el replante
 egreso 2: costos de manejo agrícola

Evaluación económica

Vid para vinificación

Supuestos de evaluación económica con proyecto de vid para vinificación

\$480/US\$	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
superficie plantas/ha	100	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
producción litros /ha	5.000	4.875	4.753	4.634	4.518	4.405	4.295	4.188	4.083	3.981	3.882
\$/litro	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960
\$. producción/100 ha	500.000	487.500	427.781	370.744	316.291	264.329	214.767	167.518	122.498	79.624	38.816
ingreso 1	480.000.000	468.000.000	410.670.000	355.914.000	303.639.131	253.755.560	206.176.392	160.817.586	117.597.860	76.438.609	37.263.822
ha replantadas			10	20	30	40	50	60	70	80	90
prod l/ha replant. 2004					3.000	4.500	6.000	7.000	7.000	7.000	7.000
prod l/ha replant. 2005						3.000	4.500	6.000	7.000	7.000	7.000
prod l/ha replant. 2006							3.000	4.500	6.000	7.000	7.000
prod l/ha replant. 2007								3.000	4.500	6.000	7.000
prod l/ha replant. 2008									3.000	4.500	5.000
prod l/ha replant. 2009										3.000	4.500
prod.cajas ha repl					30.000	75.000	105.000	175.000	245.000	315.000	375.000
ingreso 2					28.800.000	72.000.000	100.800.000	168.000.000	235.200.000	302.400.000	360.000.000
Pl. libres virus y fitopl.				22.000.000	22.000.000	22.000.000	22.000.000	22.000.000	22.000.000	22.000.000	22.000.000
egreso 1	0	0	22.000.000								
Mano de Obra	385.000	385.000	394.625	404.491	414.603	414.603	385.000	385.000	385.000	385.000	385.000
Maquinaria	260.000	260.000	266.500	273.163	279.992	279.992	260.000	260.000	260.000	260.000	260.000
Insumos	215.399	215.399	220.784	226.304	231.961	231.961	215.399	215.399	215.399	215.399	215.399
Flete	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000
Imprevistos	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420
egresos por ha	1.016.819	1.016.819	1.038.329	1.060.377	1.082.976	1.082.976	1.016.819	1.016.819	1.016.819	1.016.819	1.016.819
egreso 2	101.681.900	101.681.900	103.832.898	106.037.670	108.297.562	108.297.562	101.681.900	101.681.900	101.681.900	101.681.900	101.681.900
egreso 1	378.318.100	366.318.100	284.837.103	227.876.330	202.141.570	195.457.998	183.294.492	205.135.686	229.115.960	255.156.709	273.581.922

ingreso 1: cajas/ha producidas en plantación antigua
 ingreso 2: cajas/ha producidas en terreno replantado
 egreso 1: plantas nuevas para realizar el replante
 egreso 2: costos de manejo agrícola

Supuestos de evaluación económica sin proyecto de vid para vinificación

\$480/US\$	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
superficie plantas/ha	100	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
producción litros /ha	5.000	4.875	4.753	4.634	4.518	4.405	4.295	4.188	4.083	3.981	3.882
\$/litro	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960
\$. producción/100 ha	500.000	487.500	427.781	370.744	316.291	264.329	214.767	167.518	122.498	79.624	38.816
ingreso 1	480.000.000	468.000.000	410.670.000	355.914.000	303.639.131	253.755.560	206.176.392	160.817.586	117.597.860	76.438.609	37.263.822
ha replantadas			10	20	30	40	50	60	70	80	90
prod l/ha replant. 2004						3.000	4.000	5.000	6.000	5.850	5.704
prod l/ha replant. 2005							3.000	4.000	5.000	6.000	5.650
prod l/ha replant. 2006								3.000	4.000	5.000	6.000
prod l/ha replant. 2007									3.000	4.000	5.000
prod l/ha replant. 2008										4.000	5.000
prod l/ha replant. 2009											4.000
prod.cajas ha repl						30.000	70.000	120.000	180.000	238.500	293.540
ingreso 2						30.000	70.000	120.000	180.000	238.500	293.540
Plantas p/replante			12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000	12.000.000
egreso 1	0	0	12.000.000								
Mano de Obra	385.000	385.000	394.625	404.491	414.603	424.968	435.592	446.482	457.644	457.644	457.644
Maquinaria	260.000	260.000	266.500	273.163	279.992	286.991	294.166	301.520	309.058	309.058	309.058
Insumos	215.399	215.399	220.784	226.304	231.961	237.760	243.704	249.797	256.042	256.042	256.042
Flete	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000	108.000
Imprevistos	48.420	48.420	48.420	48.420	48.420	48.421	48.422	48.423	48.424	48.424	48.424
egresos por ha	1.016.819	1.016.819	1.038.329	1.060.377	1.082.976	1.106.141	1.129.884	1.154.222	1.179.168	1.179.168	1.179.168
egreso 2	101.681.900	101.681.900	103.832.898	106.037.670	108.297.562	110.614.051	112.988.449	115.422.206	117.916.803	117.916.803	117.916.803
ingreso 1:	378.318.100	366.318.100	294.837.103	237.876.330	183.341.570	159.941.509	148.387.943	148.595.380	160.481.056	175.481.805	189.145.418

ingreso 1:
 ingreso 2:
 egreso 1
 egreso 2

cajas/ha producidas en plantación antigua
 cajas/ha producidas en terreno replantado
 plantas nuevas para realizar el replante
 costos de manejo agrícola

La posibilidad de replantar con plantas de vid libres de 7 virus y fitoplasmas, permitiría obtener mejores rendimientos en uva de mesa y vinos de alta calidad.

Algunas plantas afectadas por virus y fitoplasmas no presentan síntomas, pasando inadvertidos o confundidos con otros factores. Los efectos están asociados a disminución de rendimiento, menor crecimiento, irregularidades de coloración de la fruta, disminución de calibre, retardos de madurez, baja concentración de azúcares, deshidratación de bayas, aumento de susceptibilidad a otros patógenos, efectos sinérgicos con otros patógenos, incompatibilidad patrón-injerto y muerte de plantas. En plantas asintomáticas la disminución de la producción puede llegar a un 5% por año (Golino, 1993). El control de estos patógenos se basa en la prevención de la infección no existiendo métodos curativos realizables en el viñedo.

En el ámbito internacional, los datos relativos a las pérdidas de producto debidas a la presencia de virus y fitoplasmas en vid, evidencian el riesgo para Chile en el caso que estos patógenos se difundan sin control en el país. En plantas sintomáticas la baja de producción se calcula entre 44 y 66% y la reducción del contenido en azúcar del 9 al 30%. Estos valores podrían conducir al colapso del sistema productivo, con graves consecuencias sociales

Evaluación económica

Vid de mesa

Se considera 100 ha como superficie de plantación y cada ha produce 2500 cajas.

La pérdida de 5% de producción de uva en predios asintomáticos. La presencia de virus en Chile es sobre el 25% (Fiore *et al.*, 2008).

El precio promedio de la caja de uva de 8,2 kilos es de US\$10 y el valor del dólar es de \$480

Se inicia el replante de 10 ha anuales en el tercer año del proyecto.

Las hectáreas replantadas en el año 3, comienzan a ser consideradas productivas desde el año 6.

En el caso de situación sin proyecto se considera que la nueva plantación aumenta desde el primer año de producción en el orden de 17% y que al tercer año de producción comienza a bajar la productividad en un 5%, al igual que las ha antiguas.

En la situación con proyecto, las plantas limpias de los 7 virus y fitoplasmas comienzan a producir a los 3 años y con un crecimiento de productividad del 20% y se considera un escenario de baja expectativa si consideramos los rendimientos históricos obtenidos en Chile según algunos productores en conversaciones personales.

Para los egresos se considera la replantación habitual del 10% de las hectáreas plantadas, tanto en la situación sin proyecto como aquella con proyecto. La diferencia se debe a que las plantas limpias poseen un valor estimado de \$950 contra el precio de mercado (\$700) de las plantas en bolsa que se distribuyen en la actualidad.

Los costos operacionales se anulan en el incremental por considerarse equivalente en las dos situaciones base.

Vid para vinificación

Se considera 100 ha como superficie de plantación y cada ha produce 5.000 litros.

La pérdida de 2,5% de producción de uva en predios asintomáticos. La presencia de virus en Chile es sobre el 25% (Fiore *et al.*, 2008).

El precio promedio del litro de mosto es de US\$ 2 y el valor del dólar es de \$480

Se inicia el replante de 10 ha anuales en el tercer año del proyecto.

Las hectáreas replantadas en el año 3, comienzan a ser consideradas productivas desde el año 6.

En el caso de situación sin proyecto se considera que la nueva plantación aumenta desde el primer año de producción en el orden de 20 al 30% y que al tercer año de producción comienza a bajar la productividad en un 2,5%, al igual que las ha antiguas.

En la situación con proyecto, las plantas limpias de los 7 virus y fitoplasmas comienzan a producir a los 3 años y con un crecimiento de productividad del 30 al 40% y se considera un escenario de baja expectativa si consideramos los rendimientos históricos obtenidos en Chile.

Para los egresos se considera la replantación habitual del 10% de las hectáreas plantadas, tanto en la situación sin proyecto como aquella con proyecto. La diferencia se debe a que las plantas limpias poseen un valor estimado de \$550 contra el precio de mercado (\$300) de las plantas en bolsa que se distribuyen en la actualidad.

Los costos operacionales se anulan en el incremental por considerarse que es equivalente en las dos situaciones base.

Comentarios

El escenario planteado de 10 años de proyecto es el mínimo ya que el ciclo productivo de viñedos y parronales libres de virus y fitoplasmas puede sobrepasar los 25 años.

Vid de mesa. No se considera que algunas plantaciones deben ser arrancadas después de cuatro años porque no producen. También se han detectado plantaciones que en este momento están produciendo 1.100 cajas/ha. Existen otros problemas de coloración y acidez de las bayas y esas plantas deben ser arrancadas.

Vid para vinificación. No se considera que algunas plantaciones deben ser arrancadas después de cuatro años porque no producen. También se han detectado plantaciones que en este momento están produciendo 2.800 litros. Otro problema detectado es que hay cuarteles con bayas deshidratadas y ácidas que no son aptas para vinificación.

ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN

Charlas Técnicas

Sala Roberto Opazo
Facultad de Ciencias Agronómicas
Universidad de Chile. Campus Antumapu.
Santa Rosa 11315, Paradero 32, La Pintana.

VALOR INSCRIPCIÓN

Sin costo
Cupos limitados

INSCRIPCIONES E INFORMACIÓN

Consultas a: Sra. Myriam Pizarro P.
Departamento de Sanidad Vegetal.
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de Chile
Santa Rosa 11315 - Casilla 1004, Santiago
- Fonos: 678 5714 - 678 5815 - 678 5817
Fax: 678 5812
E-mail: saniveg@uchile.cl

PARTICIPANTES

Ing. Agr. M.Sc. Erwin Aballay
Ing. Agr. Nicola Fiore
Ing. Arg. Dr. Rodrigo Infante
Ing. Agr. Jaime R. Montealegre

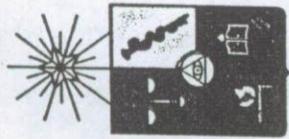
COORDINADORES

Jaime R. Montealegre
Nicola Fiore

**FINANCIADO POR FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA)
PROYECTO CÓDIGO BIOT-01-A-013**
"Elaboración de un sistema confiable para la
detección y caracterización de virus y fitoplasmas
que afectan a la vid"



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



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

CHARLA
ENFERMEDADES VIRALES
EN VID

31 de Julio de 2003

SANTIAGO - CHILE - 2003

ENFERMEDADES VIRALES EN VID

PROGRAMA

9:30 - 9:45

Bienvenida y presentación del Proyecto denominado "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid".

Jaime R. Montealegre.

9:45 - 10:00

¿Que son los virus fitopatógenos?

Jaime R. Montealegre

10:00 - 11:00

Síntomas de las principales virosis que afectan a la vid en Chile y pérdidas que ellas producen.

Resultados y proyecciones de la investigación conducida en viñas y parronales chilenos.

Nicola Fiore

11:00 - 11:15

Café

11:15 - 11:45

Nemátodos vectores de virus en vid. Relación entre virus y vector.

Erwin Aballay

11:45 - 12:15

Sistemas de producción de plantas certificadas.

Rodrigo Infante



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONÓMICAS



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

MARIO SILVA G., Decano de la Facultad de Ciencias y Agronómicas de la Universidad de Chile, tiene el agrado de invitar a usted a participar en la Charla Técnica "**Enfermedades Virales en Vid**", que se realizará el 31 de julio de 2003, a las 9:30 horas, en la Sala Roberto Opazo de la Facultad de Ciencias Agronómicas, ubicada en Santa Rosa 11315, Santiago.

La actividad se enmarca en el proyecto denominado "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid", código BIOT-01-A-013, financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Espero contar con su valiosa presencia, que dará realce a esta actividad.

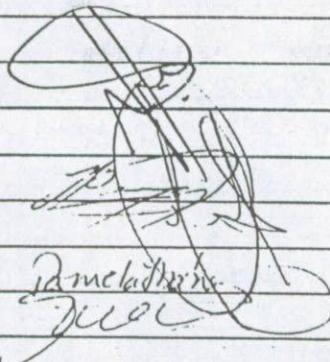
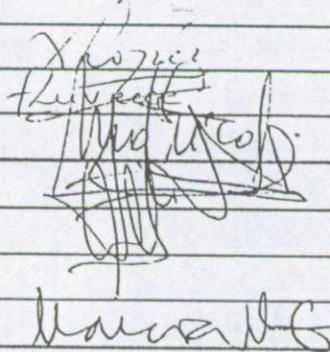
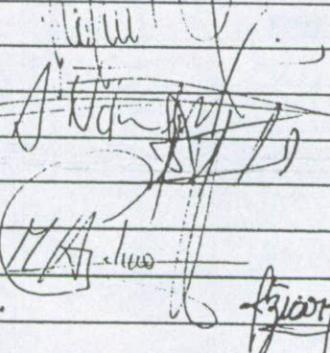
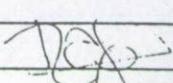
Mayores informaciones y confirmación, a los fonos: (2) 678 5815 - 678 5714 - 678 5817

Santiago, 1 de julio de 2003.

Hojas firmas asistentes

CHARLA " ENFERMEDADES VIRALES EN VID "

Nº	NOMBRE	EMPRESA	FIRMA
1	ALARCON PAULA		
2	ALFARO LORENA		
3	ARIAS MAURICIO		
4	ARREDONDO VANIA	FCPV	
5	ASTORGA ILANIA		
6	BARRAZA MARCIA	VIVERO EL TAMBO	
7	BARROS IGNACIO		
8	BONILLA DARIO		
9	BRIGANDO CARLA	CONEXION L-De	
10	BRUNO CONSUELO		
11	BUJARD		
12	BUSTOS ALEJANDRA	SAB la Aguirre	
13	CABELLO MELLA ARNALDO		
14	CABRERA MARCELO	SAB la Marianne	
15	CAÑETE MORALES ALBERTO		
16	CARRASCO CRISTIAN		
17	CARRASCO VILLEGAS TANIA		
18	CARRASCO XIMENA		
19	CASTILLO JORGE	CASA CAPOSPOLLE	
20	CLASING CAROL	C. Clasing	
21	CONSIGLIERE JOSE		
22	CORREA FERRER LORETO		
23	CUEVAS GIANNIENI EMILIO		
24	DOMANGE MAURICIO		
25	DOMINGUEZ VALERIA		
26	EGUIGURREN TOMAS		
27	ENGEL ESTEBAN	FCPV	
28	ESPOSITO PERRY JUAN		
29	FLORES NECTOR		
30	FRISTUS BERNHARD		
31	GALLARDO GALLARDO TERESA		
32	GARCIA OYARZUN HECTOR		
33	GOMEZ GARRIDO RODRIGO	VINA CONCHA y TONDO SA	
34	GONZALEZ CRISTIAN		
35	GONZALEZ MARISEL		

36	GUTIERREZ CRISTIAN			
37	HAGAR GERARDO			
38	HEMARD CRISTOBAL			
39	HENRIQUEZ ELIANA			
40	HERRERA FRANCISCO			
41	IBAÑEZ PAMELA			
42	ILLES CA MARIA TERESA			
43	LILLO VILLASECA CLAUDIO			
44	LOPEZ LUIS			
45	LOPEZ XIMENA			
46	LUVECCE FABIOLA			
47	MADARIAGA MONICA			
48	MADRID CARLOS			
49	MOLINA LEONARDO			
50	MONDACA CLAUDIO			
51	MONTEDONEICO MARCIA			
52	MONTES CARLOS			
53	MORALES GONZALO			
54	MORENO CLAUDIO			
55	MULLER VERENA			
56	MUÑOZ LUZ		lvgamusa@hotmail.com	
57	MUÑOZ MARCOS			
58	NAREAS CRISTIAN		x	
59	NARVAEZ HURTADO CLAUDIO			
60	NAWRATH ANDRES			
61	ORELLANA REYES MARCELO			
62	PACHECO XIMENA			
63	PALMA MARIA ANTONIETA			
64	PEÑA GLORIA			SAG. fjicon@SAG
65	PEREZ HARVEY JORGE			
66	PIZARRO IRADI ELEONORA			
67	PUEBLA CORDOVA PLACIDO			
68	QUEZADA DIANA			
69	QUINTA JOSE ALFREDO			
70	RAMIREZ NAVARRO GONZALO			
71	RAMOS BLANCO CECILIA			
72	REVECO MONICA			
73	RIOS ALEJANDRA		SAG	

74	RIOS RAFAEL		
75	ROJAS HECTOR	ISSUSPOSTOLLE	
76	ROSALES MARLEN	ISSUSPOSTOLLE INIA	
77	SAN MARTIN CRISTIAN	Club Agro SA.	
78	SANTANDER CRISTIAN		
79	SCHIESS MACARENA	Agropecuaria U Chile	
80	SEPULVEDA ROJAS LORETO		
81	TAMES IGNACIO	VIVERO VITIS GRAFT LOS ANDES	
82	TAPIA ENRIQUE	ALMAVIVA SAG	
83	TRIBIÑO ORIANA	VIÑA SAN PEDRO	
84	ULLOA ALVARO	SAG	
85	VALENZUELA JORGE		
86	VALENZUELA MIRYAM		
87	VARGAS JARA MARJORIE		
88	VENEGAS OSCAR		
89	VILLAGRAN JORGE	Viveros SUCRAUPE UNIVERSIDAD CATOLICA	
90	VILLARROEL GONZALEZ SERGIO	Rio Blanco UNIVERSIDAD CATOLICA	
91	ZBINDEN VELIZ ANNELIE	AGRICOLA PEPPI	
92	RODRIGUEZ RICARDO	Viña Sta Rita	
93	Bornscheuer Cristian	Univiveros	
94	PATOT CRISTIAN		
95	MANUEL ANO	LOS VASLOS	
96	HUGO PARDO	Exp Rio Blanco	
97	Luis Gonzalez C.	S.A.G.	
98	LUIS WRASCHI	AGRICOLA FRONTERA.	
99	Alvaro Castro O.	INIA	
100	Manuel Toro U	SAG	
101	Manuel Acuña	INIA	
102	Consuelo Bruno	Fund. Ciencia para la Vida	
103	Julio Bencillo	UNIVEX	
104	IGNACIO LETANENDI		
105			
106			
107			
108			
109			
110			

LUGAR

Salón Auditorium
Facultad de Ciencias
Departamento de Agronomía
Universidad de La Serena. Campus Limarí.
Avenida La Paz 1108. Ovalle.

VALOR INSCRIPCIÓN

Sin costo.
Cupos limitados.

INSCRIPCIONES E INFORMACIÓN

Consultas a: Sra. Ana María Pino
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de Chile
Santa Rosa 11315, Santiago
Fono-Fax: 6785916
E-mail: anpino@uchile.cl
projects@uchile.cl

PARTICIPANTES

Ing. Agr. Nicola Fiore
Ing. Agr. Jaime R. Montealegre
Ing. Agr. M.Sc. Erwin Aballay

COORDINADORES

Nicola Fiore
Jaime R. Montealegre

FINANCIADO POR FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA)

PROYECTO CÓDIGO BID-PI-C-2001-1-A-013

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



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA



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

CHARLA

**"ENFERMEDADES EN VID:
VIRUS Y FITOPLASMAS"**

7 de mayo de 2004

OVALLE, CHILE – 2004

PROGRAMA

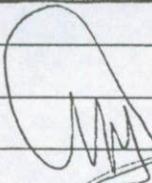
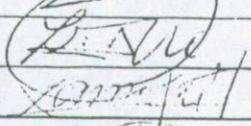
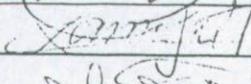
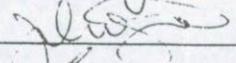
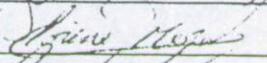
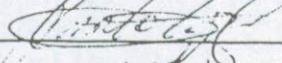
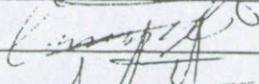
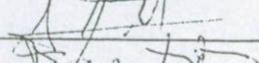
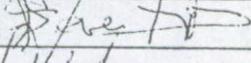
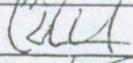
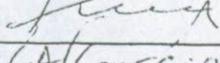
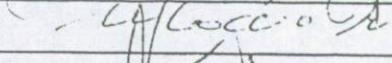
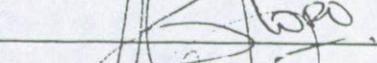
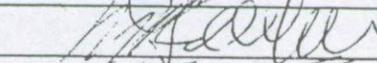
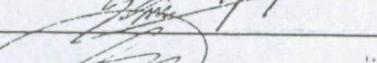
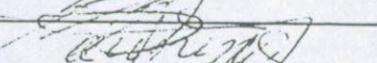
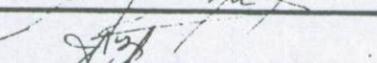
16:00 - 16:10	Bienvenida y presentación del Proyecto "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid". <i>Jaime R. Montealegre</i>	17:20 - 17:40	Café
16:10 - 16:30	¿Qué son los virus fitopatógenos y los fitoplasmas? <i>Jaime R. Montealegre</i>	17:40 - 18:20	Síntomas de las fitoplasmosis que afectan a la vid en Chile y pérdidas que ellas producen. Resultados y proyecciones de la investigación conducida en viñas y parronales chilenos. <i>Nicola Fiore</i>
16:30 - 17:20	Síntomas de las principales virosis que afectan a la vid en Chile y pérdidas que ellas producen. Resultados y proyecciones de la investigación conducida en viñas y parronales chilenos. <i>Nicola Fiore</i>	18:20 - 19:00	Nemátodos vectores de virus en vid. Relación entre virus y vector. <i>Erwin Aballay</i>

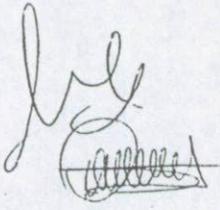
ASISTENTES A CHARLA TECNICA EN OVALLE
7 de mayo de 2004

	APPELLIDO	NOMBRE	FIRMA
1	ZEPEDA	JUAN	
2	Contreras	José Luis	
3	Carvajal	Pedro	
4	Chamblé	Osman	
5	Elyveto	Mario	
6	Secura	Mario	
7	Berros n	J. J. Shaw	
8	Ureta	Claudia	
9	PINO	Valeria	
10	Rizarré	Sonia	
11	LOPEZ	ROSA	
12	FARINAS	CARLOS	
13	KRAUSZ	BAROL	
14	ASTORIAS	PEDRO	
15	GUINEZ	PICARDO	
16	Brigantia	Maria Paula	
17	Monteón	WISSE	
18	Pinto	Andrés	
19	Renece	Janet	
20	CHAVES	Cecilio	
21	Alvarado	Luis	
22	DANOS	Cristian	
23	MADRID	CHAVES	
24	MUNOZ	MARCO	
25	Suñer	Ignacio	
26	HIDALGO	DETEL	
27	ARAYA	JUAN T	
28	FLORES	ROSE	
29	KOTAS	MURICIO	
30	ROJAS	DANIEL	
31	FUENTES	SERGIO	
32	Secura	PE SUEL	
33	ROJAS	WALTER	
34	Torres Díaz	Hector	

ASISTENTES A CHARLA TECNICA EN OVALLE

7 de mayo de 2004

	APELLIDO	NOMBRE	FIRMA
11	Ruiz	Miguel	
12	Muñoz	Marco	
13	Monje	Hernán	
14	Parra Sabaj	Horacio	
15	RICKE	Luis	
16	...Jalil	Ximena	
17	MEYER	Jairo	
18	RODRIGUEZ	Luis	
19	RODRIGUEZ	Carlos	
20	CONDOR	Carlos	
21	CAVALLO	Javier	
22	FERRI	FERNANDO	
23	ROSA	Carlos	
24	ARAYA	Ryszard	
25	CAVALLO	MARIELA	
26	TORO	SERGIO	
27	MUNOZ	DAVID	
28	CASTRO	JAVIER	
29	RODRIGUEZ	RAFAEL	
30	PALTRA	RICHARDO	
31	HONEYMAN	ANDRES	
32	GOSBY	ERIC	
33	BUFFALO	PABLO	
34	...BARRIOS	OSWALDO	
35	AROS	GONZALO	

Ximena Marandis
 Marco Araya Arzales 

Seminario Internacional

LUGAR

Centro de Extensión Los Almendros
Camino La Pirámide 5625
Huechuraba. Santiago

VALOR INSCRIPCIÓN

\$ 20.000

Becas para pequeños productores y estudiantes.
Cupos limitados.

INSCRIPCIÓN E INFORMACIÓN

Consultas a : Ana María Pino E.
 Angélica Espinoza E.
Fonos: 6785916 - 6785726
Fax: 6785916
E-mail: anpino@uchile.cl

PARTICIPANTES EXTRANJEROS

Doctora Assunta Bertaccini
Doctor Michele Digiaro

COORDINADORES

Jaime R. Montealegre
Nicola Fiore
Ana María Pino

**FINANCIADO POR FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA)
PROYECTO CÓDIGO BID-PI-C-2001-01-A-013**
"Elaboración de un sistema confiable para la
detección y caracterización de virus y fitoplasmas
que afectan a la vid"



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA



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

SEMINARIO
SITUACION ACTUAL
DE LA VID
EN RELACIÓN A VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS

5 y 6 de abril de 2005

SEMINARIO

"SITUACION ACTUAL DE LA VID EN RELACION A VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS"

PROGRAMA

Martes 5 de abril

08:30 Inscripciones

9:30 Bienvenida.

Mario Silva Geneville. Decano Facultad de Ciencias. Agronómicas. Universidad de Chile.

9:45 Visión general de los proyectos realizados en vid en Chile.

Margarita d'Etigny. Directora Ejecutiva FIA.

10:15 *Café*

10:45 Producción y exportación de uva de mesa. Situación actual y futura.

Fernando Sat. Exportadora Río Blanco

11:15 Producción y exportación de vinos. Situación actual y futura.

Representante de Viñas de Chile

11:45 Producción de plantas de vid en Chile.

Cristian Bornscheuer. Univiveros.

12:15 Situación fitosanitaria de la vid en Chile: insectos y ácaros.

Luis Sazo. Universidad de Chile.

13:00 *Almuerzo*

14:30 Situación fitosanitaria de la vid en Chile: nematodos.

Erwin Aballay. Universidad de Chile.

15:00 Situación fitosanitaria de la vid en Chile: enfermedades y hongos de la madera de la vid.

Jaime Auger. Universidad de Chile.

15:45 *Café*

16:15 Aplicación de la biotecnología para el control de virus y fitoplasmas".

Humberto Prieto. INIA La Platina.

Miércoles 6 de abril

9:30 Presentación Proyecto FIA. "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid

Jaime Montealegre. Universidad de Chile

10:00 *Café*

10:30 Impacto de virus y viroides en vid a nivel mundial.

Michele Digiario. Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari.

11:30 Virus que afectan a la vid en Chile

Nicola Fiore. Universidad de Chile

12:30 *Almuerzo*

14:00 Impactos de los fitoplasmas en vid a nivel mundial.

Assunta Bertaccini. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali

15:00 Fitoplasmas que afectan a la vid en Chile

Angela Gajardo. Universidad de Chile

15:30 *Café*

16:30 Situación actual de la certificación de plantas de vid en Chile.

Manuel Toro

“piedra en el zapato”

candidato de la SNA?

—Muy agricultor, identificado con las bases, ojalá no de la Región Metropolitana, con trayectoria gremial y ser empresario de prestigio.

—¿Schmidt lo cumple?

—Creo que de una u otra manera, débilmente, lo cumple. Fue presidente de Fedefruta, institución que ha crecido mucho y muy fuerte. Esa no es su parte débil.

—¿Santa Cruz se hizo cargo de su sucesor?

—Sí, derechamente. Schmidt es un hijo político de Santa Cruz y lo ha mantenido fuertemente todos estos últimos meses. Por eso digo que Santa Cruz tiene que ser el

gran guardián de Schmidt.

—Frente a qué temas...

—A la línea de la institución, para decirlo en una palabra.

—Hasta qué punto esta falta de apoyo de los cardenales no responde a la intención de no perder cuotas de poder en la institución...

—Este término de los cardenales es bien entre comillas. El tiempo pasa y las personas están muy desvinculadas. De los consejeros honorarios la mitad no concurre, pero no deja de preocupar que todos los ex presidentes estén en la misma postura. No es una cuestión de poder.

—¿En términos prácticos esta

oposición a Schmidt en qué se puede traducir?

—No, en nada. En la práctica no visualizo nada, por lo menos ahora.

—¿Cree que hubo el debate necesario en términos de propuestas para sacar una opción presidencial?

—No, no digo que nada, pero ha faltado. Falta elaborar una política de la institución. Hubo conversaciones esporádicas entre grupos chicos.

La SNA hoy

—Respecto a la situación actual de la SNA, ¿qué evaluación hace de

la gestión del presidente Andrés Santa Cruz?

—Tuvo un gran mérito en resolver el tema económico. En materia gremial creo que ha sido mucho más débil. Probablemente un tema le quitó tiempo al otro, pero el balance gremial es débil.

—En qué puntos...

—Bueno, partiendo en que no logró mantener la unidad del gremio y en que la presencia de la SNA en las distintas regiones es muy débil.

—¿La SNA ha perdido peso como interlocutor válido frente a otros sectores?

—Algo ha perdido, pero 150

años de historia no se borran en una semana. La influencia que tiene la radio y en los medios tampoco.

Probablemente esté un poco “machucada”, pero de ahí a decir que ha perdido toda su influencia está muy lejos. Es perfectamente recuperable.

—A su juicio, qué se requiere...

—Unidad, espíritu de trabajo y presencia en las regiones.

—¿Se planteó la candidatura?

—No, nunca los segundos pasos son buenos, dice un viejo adagio campesino. No se puede decir nunca jamás, pero no se me ha pasado por la mente.

THE WINE SCHOOL
 “Aprenda de Vino, Elaborando su Propio Vino”
 Mayores detalles e inscripciones:
 www.thewineschool.cl
 ventas@thewineschool.cl
 494 2623
 09 - 133 9843

COMPRO CIRUELA
 VARIEDAD LARRY ANNE
09-1298203

MICORRIZAS TRI-TON®
 Aumento del sistema radical, mayor crecimiento y vigor de la planta y mayor resistencia al ataque de patógenos.
BIO TRITON S.A.
 Av. El Golf 192 - Of. 115 Las Condes
 Fono-Fax: 2-334 69 58
 E-mail: biotri-ton@biotri-ton.cl
 www.tri-ton.cl

VENDO 3 HAS EUCALIPTUS GLOBULUS DE 18 AÑOS
 \$ 12.000.000 + IVA
 Fundo Agua Clara, Curauquilo Santa Cruz, Camino Pichilemu km 35, costado bodega Lapostolle, entrar 800 metros, horario agrícola.
 (2) 2184358
 (09) 7413586 - (72) 930677

UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
 Seminario Internacional
SITUACION ACTUAL DE LA VID EN RELACION A VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS
 5 y 6 de abril de 2005
 GOBIERNO DE CHILE
 FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA
 LUGAR
 Centro de Extensión Los Almendros
 Camino La Pirámide 5625 Huechuraba, Santiago
INSCRIPCIÓN E INFORMACIÓN
 Ana María Pino E. • Angélica Espinoza E.
 Fonos/Fax: 6785916 - 6785726 - 6785916
 E-mail: anpino@uchile.cl

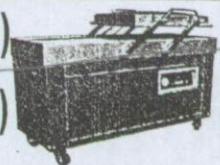
BUSCAMOS
 Al mejor vendedor riego agrícola VI-VII región
 Requisitos:
 • Cartera propia y movilización.
 • Residencia zona.
 • Conocimiento del mercado.
 • Motivación al logro.
 Ofrecemos:
 • Atractiva remuneración e incentivos.
 • Apoyo red de locales de venta.
 • Mejor stock y precios del mercado.
 Enviar curriculum vitae y pretensiones de renta a casilla 3110, Santiago o al mail: riego@buscajefes.cl

UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
CURSO FISILOGIA Y MEJORAMIENTO DEL RENDIMIENTO EN CULTIVOS ANUALES
 Coordinador:
 Ing. Agrónomo M.S. PhD. Edmundo Acevedo H.
 14 marzo al 20 de junio de 2005
 Lunes de 9:00 a 13:00 hrs.
 Código Sence: 123472847
 Tels: 6785716 - 6785717 - 6785728 • Fax: 6785805
 Email: prodag@uchile.cl

Hoy Compramos su Almendra...

Prodalmen CHILE
 ...Durante la Temporada Mejoramos su Producción
 Fono/Fax 8215583 - 8215584

REMATE EQUIPOS ACERO INOXIDABLE (NUEVOS)
 A. MOLINA 77, METRO ULA (Vereda Sur) - JUEVES 10 DE MARZO, 11:00 HRS.
6 SELLADORAS al VACIO (CAMARA DOBLE)
 CON MODIFICADOR ATM. - 0,66 kpa - VACIO 60 m³ /hr. Min. \$ 1.280.000
15 SELLADORAS al VACIO (CAMARA SIMPLE)
 SIN MODIFICADOR ATM. - 0,66 kpa - VACIO 20 m³ /hrs. Min. \$ 575.000
 EQUIPOS NUEVOS (SIN USO), REMATE POR UNIDAD, CON DERECHO
 NOTA: A LA VISTA desde 07/03/05 de 10 a 13 y 15 a 18 hrs. COMISION 10% + IVA. PAGO CONTADO (CHEQUE SOLO GARANTIA)
 TEL: (2) 4880832 FAX: (2) 4980803
 www.macal.cl
 A. MOLINA 77 - STGO. ↔ U.L.A. ENRIQUE CALVO A. RNM 244 RAUL MENDEZ B. RNM 928



APÉNDICE 1
RESUMENES DE EXPOSITORES

PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN DE UVA DE MESA: SITUACIÓN ACTUAL Y FUTURA

Fernando Sat
Exportadora Río Blanco

De las 200.000 ha plantadas con frutales en Chile, 45.000 son de uva de mesa, lo cual representa a esta especie con 22% del total, distribuidas entre la III y VI Regiones principalmente. Las principales variedades son Thompson Seedless, Flame Seedless y Red Globe. Junto con ser la principal especie frutal cultivada, también es la principal exportada (en la temporada 2003-2004 se exportaron 91.800.000 cajas), siendo los destinos más importantes USA, Europa, Latinoamérica y Lejano Oriente. Los mayores volúmenes de exportación lo efectúan 5-6 grandes empresas, existiendo un gran número de pequeñas empresas y/o exportadores con un reducido volumen.

En el principal mercado (USA) de la uva de mesa chilena, el gran volumen es recibido por sólo 10 recibidores (71,2% del total), mientras que en Europa, a excepción de Inglaterra, los 10 recibidores más importantes sólo concentran el 36,5% del total.

En Inglaterra, los compradores están exigiendo fruta que provenga de packings y/o predios que cumplan con las normas solicitadas y en el futuro cercano sólo deberá provenir de predios certificados; también se está solicitando cambios en el embalaje de la fruta.

En el Lejano Oriente, los principales mercados son Hong Kong, Taiwan, Japón y Corea.

En conclusión, se puede indicar que:

- Ha aumentado el número de pequeños exportadores, los que no tienen una buena capacidad de negociación con los recibidores (especialmente en USA).
- Las variedades más importantes son: T. Seedless, Red Globe, F. Seedless y Crimson Seedless.
- Las variedades nuevas con proyección son Autumn Royal, Princess o Melisa y Queen Rose.
- Se debe tener en consideración la calidad fitosanitaria de las plantas (viroides, virus y fitoplasmas pueden ir en material vegetativo utilizado en multiplicación) para evitar problemas a futuro.
- En el país existen graves problemas de mano de obra, lo que está limitando a éste y otros negocios frutícolas.
- Existen buenas perspectivas para nuevos mercados en Europa del Este, principalmente.
- La calidad y condición de la fruta son aspectos fundamentales a considerar, para mantener e incrementar este negocio.

PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN DE VINOS: SITUACIÓN ACTUAL Y FUTURA

Elizabeth Díaz

Asociación de Viñas de Chile A.G.

Entre 1995 y 2003/2004 ya sea la superficie de viñas plantadas como la producción de vino aumentó notablemente en el país, en cambio el consumo doméstico de vino no creció tanto, por lo que el excedente se tradujo en mayores exportaciones. Entre los años 2000-2003 dicha superficie se estabilizó, pero no obstante este dato, ya se prevé que para el 2005 la cosecha debiera ser superior a la del 2003.

El nivel de consumo de vino en Chile no es comparable con otros países –sobre todo europeos–, pero mientras en éstos se observa una caída constante, en Chile a partir del 2003 el consumo doméstico empieza a recuperarse. Esto apoyado a través de múltiples actividades –galas del vino, muestras itinerantes, etc.– que Viñas Chile promueve constantemente.

La gran capacidad de exportación (pasó de un 0,4 % del total de exportaciones mundiales en 1986-1990 a un 5,6% en 2003) que demuestra nuestro país en un sector competitivo como el vino es una gran fortaleza, pero por otro lado, su dependencia de los mercados de exportación lo hacen un país vulnerable a crisis mundiales y muy atento a la competencia.

El impulso dado a mediados de los '80 al desarrollo de la industria vitivinícola, junto con la gran inversión y apertura al comercio exterior, provocaron un aceleramiento de las exportaciones que empezó a mitad de los '90. Entre 1995-2004 ya sea los precios del vino embotellado como las exportaciones aumentaron considerablemente, llegando estas últimas a un record histórico en cuanto a valor en el 2004. Los destinos fueron principalmente Europa (54%) y USA y Canadá (26%).

Como sabemos, el sector vitivinícola mundial es muy competitivo, por lo que el éxito exportador de Chile nace de los esfuerzos individuales de cada viña y de la promoción genérica del vino a través del sector público y privado, este último representado por Wines of Chile y Chilevid AG.

Además, sumada a la inversión en investigación y desarrollo, es vital la capacitación de los trabajadores (Viñas Chile creó la OTIC Chilevino, con más de 2500 trabajadores capacitados), la productividad y la eficiencia productiva para poder ser competitivos.

Aumentando la calidad y diferenciación del vino chileno, respondiendo así a las preferencias del consumidor internacional, se persigue que los vinos de calidad representen más del 12% del total de ventas en el 2003.

En ese sentido Viñas Chile ha invertido en diversos proyectos de investigación, participado en el concurso de Consorcios tecnológicos empresariales de Investigación del Gobierno de Chile, y comprometido importantes recursos para los años 2005-2009. Esto ha permitido además la incorporación de diversas viñas e instituciones de investigación sea nacionales que extranjeras.

El 2004 fue muy exitoso para la industria del vino y el 2005 en prospectiva se ve similar. Este éxito se ha mantenido a través de una calidad consistente y permanente del vino, que fomenta además un aumento en el consumo de vino de mayor precio.

En el plano externo Wines of Chile potencia la imagen de Chile como un país favorable, realizando exitosas promociones en el Reino Unido y proyectándose a futuro en mercados como USA y Alemania.

Por lo tanto, vemos que para la optimización de la producción y exportación de vinos en Chile y el mundo son esenciales: la inversión en investigación y desarrollo; el mejoramiento de la imagen del vino chileno en el exterior; el aumento de la promoción a un consumo moderado de vino en Chile. Todas metas a las cuales Viñas de Chile está intensamente abocada.

"PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE VID EN CHILE".

Cristián Bornscheuer Veas
UNIVIVEROS®

I. Antecedentes Generales.

La vid es una de las especies cultivadas más antiguas e importante del mundo, cuya explotación comenzó en Chile con la llegada de los conquistadores españoles. Su amplia distribución en todo el planeta se vio fuertemente favorecida por su rusticidad, adaptabilidad a toda clase de suelos y climas y la facilidad para ser propagada por estacas.

Sin embargo, la devastación ocasionada por la introducción de la filoxera a Europa a mediados del siglo XIX determinó un profundo cambio en el cultivo de la vid. Fue necesario recurrir a portainjertos americanos menos sensibles a esta plaga para poder restablecer los viñedos. El uso de portainjertos que entonces se efectuó para poder sobrellevar esta fatal afección, comenzó a evidenciar una serie de ventajas para poder hacer frente a otros problemas productivos para la vid. Fue así como comenzó en Europa y posteriormente también Norteamérica, Sudáfrica y Australia el desarrollo y uso de una serie de portainjertos específicos para ciertas condiciones de suelo, clima, fitopatológicas y productivas. Finalmente en Chile también se ha adoptado esta tecnología, buscando mejorar las condiciones de producción de esta especie tan interesante para nuestra economía.

Otro aspecto determinante en la evolución del cultivo de la vid tanto para mesa como vinificación dice relación con el desarrollo de variedades y selección de clones específicos, con objeto de diversificar y ampliar nuestras alternativas varietales y ocupar nichos interesantes en los mercados de destino, aumentar la productividad, reducir los costos de producción o conseguir una mejor calidad de producto. Es así como en los últimos años ha habido una creciente evolución de la industria del "breeding" en esta especie, en la selección y determinación de clones y por último, en los modelos comerciales de estas nuevas obtenciones (variedades protegidas) en términos de pago de royalty o regalías.

Finalmente, la calidad sanitaria de los materiales de propagación, la calidad del proceso de producción de plantas y la mantención de esa condición en el campo son temas que interesan en forma creciente en la el cultivo moderno de la vid.

A continuación se analizará estos puntos con mayor detalle, puesto que repercuten directamente sobre la producción de plantas de vid en Chile, tema de esta charla.

II. Contexto de la Industria de la Vid en Chile.

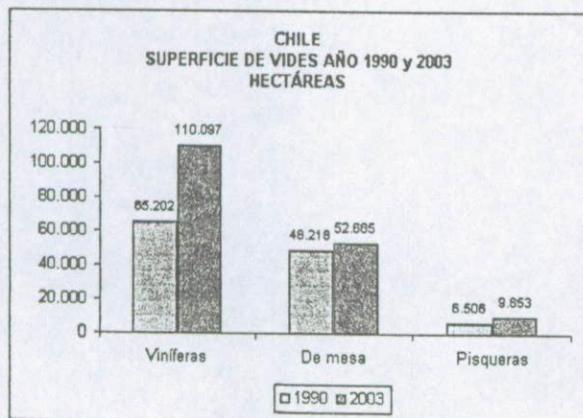
La industria de la vid se divide según la orientación de la producción. Es así como en los análisis de los mercados se hace diferencia entre uva de mesa, uva para vinificación y en ocasiones también se segrega en la uva para pisco. A continuación se presenta un cuadro con cifras generales que permiten graficar un poco la envergadura de los distintos negocios.

Paralelo Superficie / Producción/ Ingresos de la Vid

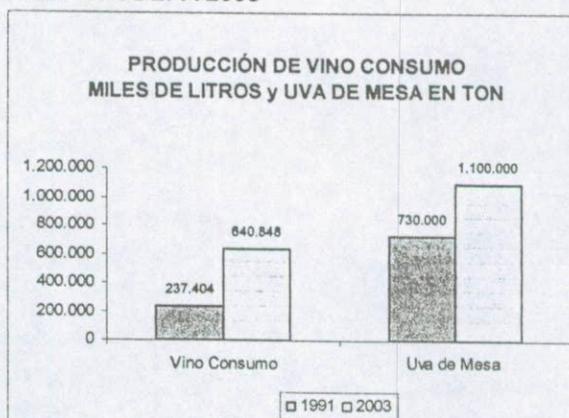
	Superficie (ha)	Producción	Exportación (US\$)
Uva de Mesa	53.000	90.000.000 cajas	796.000.000
Uva de Vinificación	110.000.000	630.000.000 lts	820.000.000
Uva Pisuera	10.000.000	100.000.000 lts	s/í
Total:	173.000.000		

Lo recién expuesto es en general la situación actual de superficies, producciones e ingresos. Sin embargo, es interesante analizar brevemente la "evolución" de las superficies y producciones. Ver cuadro 1 y 2.

Cuadro 1:
Fuente: ODEPA 2005



Cuadro 2:
Fuente: ODEPA 2005



Destaca el fuerte incremento en la superficie de viníferas, la que se incrementó en casi 70% en algo más de 10 años. También han sufrido incrementos las superficies de uva de mesa (8,3%) y pisquera (51%), pero en mucho menor medida.

Estas cifras dejan de manifiesto el establecimiento de una nueva etapa del negocio del vino, en términos de nuevos mercados, incorporación variedades y clones y modernización de los procesos de vinificación, lo que redundará en nuevas plantaciones, así como también reflejan la madurez y estabilidad del negocio de la uva de mesa. Esta última ha basado su actualización fundamentalmente en la renovación de la superficie existente mediante replantaciones y en cierta medida en la incorporación de nuevas plantaciones y variedades (p.e. Red Globe, Crimson Sdl.).

Sin embargo, las producciones por unidad de superficie han aumentado considerablemente lo que explica la mayor producción total en el lapso de tiempo en cuestión (50,7% de aumento de producción en 12 años con un aumento de la superficie de sólo un 8%). Esto se explica claramente por un aumento de la eficiencia y mejoras en las técnicas productivas que han permitido obtener el potencial de producción de cada variedad.

III. Producción de Plantas de Vid en Chile.

Los antecedentes del negocio de la vid en Chile recién expuestos permiten entender que la evolución del negocio repercute directamente sobre la producción de plantas. Es así como ha aumentado el número de plantas producidas, pero también es importante destacar que se ha producido un cambio en las preferencias del tipo de plantas, calidad y variedad de materiales genéticos a utilizar.

A continuación se presenta un cuadro con el número de plantas que se estima se producen actualmente en Chile por año.

Mercado de plantas en Chile.

	N° plantas
Uva de Mesa	3.500.000
Uva de Vinificación	10 a 15.000.000
Uva Pisquera	s/ información
Total:	13.5 a 18.5 millones

En relación con los tipos de plantas actualmente a disposición de la Industria, se tiene:

- **Francas o autorradicadas**
Son aquellas plantas obtenidas a partir de la rizogénesis de la estaca de la variedad, es decir produce su propia raíz y no cuenta con portainjerto.
 - Contenedores (bolsas, contenedores biodegradables)
Plantas que crecen en contenedor plástico o de turba prensada. Son plantas que se entregan con brotes en crecimiento activo desde la primavera, por lo que constituye un buen complemento a la plantación invernal.
 - Barbadas
Plantas de mayor uso en el país, que se entregan a raíz desnuda durante el receso invernal.
- **Injertadas**
Son aquellas plantas obtenidas a partir de la injertación de una determinada variedad sobre un determinado portainjerto, siendo este último inducido simultáneamente al desarrollo de raíces. También se producen en formato de:
 - Contenedores (bolsas, cont. Biodegradables)
 - Barbadas

La producción tradicional de plantas de vid en Chile se basaba en la obtención de estacas de los parrones o viñedos y su enraizamiento directo. Básicamente se trataba de producción de autoconsumo, a pesar de que también la escasa dificultad asociada a la producción de plantas de esta especie, permitía la existencia de gran cantidad de viveros, algunos de ellos muy rústicos en lo que la incorporación de tecnologías se refiere.

Las actuales exigencias de la Industria en relación con sus mercados de destino, tanto en el negocio de la fruta como el del vino, ha llevado a requerir de los productores de plantas una serie de garantías en términos de sanidad, trazabilidad y seguridad genética, lo que constituye un camino sin retorno.

A estas necesidades se suman otra serie de exigencias a los viveros, relacionadas con la superación de problemas productivos y acceso y disponibilidad de nuevas variedades. Es por ello que la producción de plantas de vid se ha visto obligada a profesionalizarse e incorporar nuevas tecnologías y herramientas por un lado, y por otro, destinar grandes esfuerzos en la búsqueda de variedades nuevas e interesantes, acceder a variedades protegidas, incorporar el uso de portainjertos y la difícil tecnología de injertación. Ha aumentado la inversión en infraestructura, plantales madre, internaciones y cuarentenas y evaluación varietal.

IV. El Viverismo Moderno

1. Injertación y Uso de Portainjertos

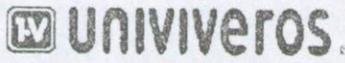
Destaca en el último tiempo el creciente uso de portainjertos en la producción de plantas. Se inició a comienzos de la década en uva de mesa, como una forma de hacer frente al problema de replante. En el caso de la uva de vino, el uso de portainjertos en Chile comenzó unos dos años más tarde, buscando estar preparado frente a una potencial aparición de Filoxera, además de permitir la superación de nemátodos en el suelo. Esta última condición ha sido particularmente importante en ciertas zonas, como lo es Casablanca. Sin embargo, en ambas industrias se ha ido reconociendo en el uso de portainjertos una herramienta muy eficaz para resolver otros problemas productivos, tales como el control de vigor, aumento de productividad, adaptación a otras condiciones limitantes de suelo.

A continuación se entrega una tabla que resume las principales características de los portainjertos más conocidos y utilizados en el mundo:

CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES PORTAINJERTOS DE VIDES

PORTAINJERTOS	FREEDOM	HARMONY	P 1103	R 110	R 140	SO4	RAMSEY
	1613 C X DOGRIDGE			VITIS RUPESTRIS X VITIS BERLANDIERI		VITIS RIPARIA X VITIS BERLANDIERI	VITIS CHAMPINI
	● ● ●	● ● ● ●	● ●	● ●	● ●	● ● ●	● ● ● ●
	●	●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ●
	s/i	s/i	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	s/i
	● ●	● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	●	● ● ●
	● ●	● ●	● ●	●	●	● ● ●	● ●
	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ●	● ● ● ●
	●	● ●	s/i	● ● ●	s/i	● ● ●	s/i

GRADO CRECIENTE DE INTENSIDAD	● ● ● ●
• ALTA	● ● ● ●
• MEDIA ALTA	● ● ● ●
• MEDIA	● ● ● ●
• BAJA	● ● ● ●
• SIN INFORMACIÓN	s/i



NOTA:
PROHIBICIÓN DE ANTECEDENTES
DIFERENCIALES EN LAS PLANTACIONES Y
EXTRAJERAS NO NECESARIAMENTE
EXTRAPOLABLES A OTRAS REGIONES

Teléfono (2) 824 1340 Fax (2) 824 1422 univiveros@entelchile.net

Todos los beneficios descritos anteriormente requieren, sin embargo, de una serie de cuidados con el fin de que se manifiesten en mejores resultados en las plantaciones de vid. A continuación se detallará algunos de estos puntos a observar:

Exigencias de infraestructura y tecnología a los viveros.

La injertación de vides en viveros es una labor compleja, en la que ocurre en los tejidos vegetales que se están uniendo, una serie de eventos fisiológicos que deben ser promovidos en forma óptima para dar con la mayor eficiencia y calidad de plantas.

Establecimiento de plántulas madre de materiales de propagación:

La calidad de los materiales a injertar (variedad y portainjerto) es fundamental para asegurar resultados exitosos. Es por ello que los viveros deben formar sus plántulas madre de portainjertos y de variedades o clones, teniendo presente cuáles pueden ser precisamente aquellas variedades más indicadas para el contexto nacional.

Ello implica la internación de los materiales y su cuarentena, incremento, preparación y desinfección de suelos para las plantaciones y finalmente la plantación y conducción de los plántulas madre de portainjertos.

Infraestructura de injertación, encallado y rizogénesis:

En vides, la técnica de injertación de plantas de vivero con mayor éxito es la de injertación de banco de estacas de portainjerto con púas de la variedad. Ello exige de los viveros desarrollar un muy buen procedimiento de recolección y desinfección de los materiales, su adecuada identificación y almacenamiento, contar con las máquinas injertadoras, realizar una adecuada manipulación, contar con los insumos (parafina, cajones), equipos de óptima calidad y personal calificado.

A la injertación le sigue el encallado, proceso extremadamente exigente en regulación de condiciones ambientales en términos de humedad relativa y temperatura. Ello implica la necesidad de invertir en invernaderos especiales para favorecer este período tan delicado.

Por último, mientras aún no termina el sellamiento total de la zona de injertación y restablecimiento de la conducción vascular en lo que se conoce como encallado, debe comenzar el proceso de enraizamiento, también exigente en condiciones de temperatura y humedad. El manejo de las plantas injertadas en este



Caso de Uva de Mesa

A diferencia de otras especies, en las que año a año se incorporan al mercado nuevas variedades interesantes, como es el caso de los carozos, en la uva de mesa reinan en Chile desde hace muchos años las mismas variedades principales que siguen siendo interesantes en cuanto a volumen y retornos. Tal es el caso de Thompson Seedless (1872), Red Globe (1980), Flame (1973).

Sin embargo, desde hace unos años se han incorporado nuevas variedades al repertorio, algunas de ellas en condición de venta libre, como Crimson Seedless (1989), Autumn Royal (1998), Princess (1999), pero otras protegidas en régimen de venta bajo regalías (o royalties), como es el caso de Regal Seedless®, por ejemplo. Ello expone una realidad de la que la industria nacional debe enfrentar. Actualmente ya no hay programas de breeding en uva de mesa que no pretenda obtener un retorno por medio de royalties o regalías. Incluso el programa del USDA, importante programa de mejoramiento genético americano que dio origen a variedades como Flame, Fantasy y Crimson Sdl. y que liberó Autumn Royal y Princess recientemente, cambió su forma de entregar las obtenciones a la Industria.

Entonces actualmente el debate se libra entre cobrar un royalty por planta, como ha sido el caso de Red Globe, o cobrar un royalty por producción, que es una modalidad cada vez más deseada por los programas de breeding o finalmente si se trata de producciones restringidas de una determinada variedad (en otras especies se habla de "clubes"), que permiten controlar la oferta y con ello conseguir mejores precios por la fruta.

Chile debe acercarse a los grandes programas de breeding para poder ofrecer nuevas variedades a la Industria local. Ello le genera un punto vulnerable, lo que puede tener enormes repercusiones, dado el tamaño e importancia de la uva de mesa como cultivo para Chile. Es por ello que las iniciativas de breeding locales, como las del INIA tienen gran importancia para nosotros como país y deben ser seguidas, evaluadas y apoyadas. Esto nos puede generar la moneda de cambio para futuros intercambios y/o negociaciones con otros países competidores.

A continuación se mencionan los principales programas de mejoramiento genéticos en vides:

1. USA
 - 1.1. USDA
 - Flame, Fantasy, Crimson, Autumn Royal, Princess, Sweet Scarlet®)
 - 1.2. SUNWORLD
 - Superior Sdl. ®, Midnight Beauty® , Sable®, Sofia®, Coachella®
 - 1.3. SHEEHAN GENETICS
 - 1.4. IFG
 - 1.5. Otros
2. SUDAFRICA
 - 2.1. ARC- RSA
 - Magestic, Dauphine, Bonheur, La Rochelle, Sunred, Regal Sdl®, Ebony Star®.
3. ISRAEL
 - 3.1. Vulcani Center
 - Prime®, Mistery®.
4. CHILE
 - 4.1. INIA – La Platina

Selección de clones de viníferas.

La Selección clonal se inició en Europa y en particular en Francia en la década del 60. La selección clonal, como su nombre lo indica, está basada en la obtención de individuos con una incuestionable identidad, con características morfológicas y sanitarias particulares. Esta consiste en la detección e identificación de una planta, examen de la planta desde el punto de vista genético y sanitario, evaluación de clon seleccionado y certificado para terminar con la el resguardo del clon en el Banco de Germoplasma y su multiplicación posterior a partir de éste.

Los objetivos de la selección genética son la certificación y propagación de clones cuyo comportamiento agronómico y potencial de producción y calidad sean conocidos. La selección está basada en las diferentes características o variaciones de una variedad y la posibilidad de manejar esta variación.

período que buscan producir un enraizamiento equilibrado y coordinado con la brotación, son los objetivos fundamentales en esta etapa, que sólo se cumplen adecuadamente en invernaderos con buen control de temperatura, humedad y riego. Son las condiciones que requiere el callo de la zona de injertación para que se siga desarrollando sana y fuertemente permitiendo que la planta pueda posteriormente tener éxito en el huerto.

Elección adecuada del portainjerto por parte del productor

La elección del portainjerto es uno de los aspectos más importantes en el establecimiento de un huerto con plantas injertadas. Para obtener los beneficios que proporciona el uso de éstas, es indispensable la correcta decisión del portainjerto. Cada portainjerto tiene sus características propias de vigor, afinidad, adaptación a ciertas características del suelo, etc

El conocer las características de vigor del portainjerto es fundamental, con el fin de aprovechar este atributo en suelos pobres o con variedades débiles, como es el caso de SO4 y Ramsey. Distinto es el caso de Riparia Gloire, que es una variedad de arraigamiento superficial que en suelos pobres, arenosos y pedreguientos puede limitar seriamente su desarrollo y uniformidad del huerto.

Por otro lado, es importante conocer la afinidad que tienen las distintas variedades con los diferentes portainjertos. Es sabido que en uva de mesa determinados portainjertos proporcionan buen calibre a las bayas, e incrementan el número de kilogramos embalables. Sin embargo, los mismos pueden producir problemas de color con otras variedades y las consecuentes mermas en la producción. De esta forma, los factores combinación variedad - portainjerto, suelo y clima son fundamentales en la elección del patrón.

Cuidados propios de la planta injertada

La injertación consiste en la fusión de tejidos que se encontraban naturalmente separados, a partir de la aproximación del cambium de cada uno de ellos. En un primer momento, se produce en la zona de unión injerto - portainjerto la proliferación de un tejido indiferenciado, denominado callo, el que luego da origen a los haces vasculares y restantes tejidos que permiten generar una continuidad entre el pie y la variedad.

En las vides, el proceso de encallado y restitución de la continuidad vascular es lento y delicado. Para el vivero ello representa un exigente proceso de producción, que requiere de haber puesto a punto todos los pasos y de conocer y manejar los complejos requerimientos ambientales asociados a favorecer un buen encallado. La zona de unión demora varios meses en conectar la variedad con el portainjerto (tanto mecánica como funcionalmente) y recién luego de una a dos temporadas, la continuidad vascular se restituye del todo. Es por esto último que las plantas de vid injertadas en bolsa son mucho más delicadas que las barbadas. En estas últimas la zona de unión tiene un año de edad y se encuentra mucho más firme al momento de la entrega material de plantas a productores.

Afortunadamente se ha ido generando algún nivel de experiencia en relación a las plantas injertadas de vid y se ha logrado ir determinando los factores que han provocado algunas de las dificultades en los primeros años de plantación de este nuevo tipo de planta. Los viveros han ido afinando la técnica, desde el manejo de los plantales madres, el proceso de injertación, encallado y cultivo de las plantas, hasta la decisión de ajustar la fecha de la entrega material de las plantas. Del mismo modo, los productores han ido aprendiendo a manejar este producto con el cuidado que amerita, evitando la mayor cantidad de estrés en la plantación, intensificando los cuidados y atenciones en la etapa inicial alcanzando con ello el real potencial que tiene este nuevo producto: la planta de vid injertada. Todo esto ha permitido conseguir altos porcentajes de éxito.

Los resultados se están viendo: huertos más vigorosos, racimos más grandes y uniformes, y con una importante estabilidad y sustentabilidad en el tiempo.

2. Incorporación de Nuevas Variedades y Clones.

Otro elemento de enorme importancia, tanto en la Industria de la uva de mesa como la del vino, es la de contar con las variedades más adecuadas para el consumidor en los mercados de destino, pero que a la vez se adecúen a las condiciones locales de producción y comercialización.



Es así como pueden obtenerse clones tipo A que son poco productivos o menos productivos que el promedio, que generalmente permiten la obtención de vinos de calidad dentro del tipo de variedad y del tipo de suelo que se encuentre.

Clones tipo B que son ligeramente productivos a productivos y que dependiendo de las condiciones y métodos de cultivo, los clones pueden ser productivos y vigorosos. El control de la producción otorga una especial alta calidad a los vinos producidos.

Clones tipo C: Altos a muy altamente productivos. La producción es insuficientemente controlada, lo que hace que estos clones produzcan vinos neutros y comunes.

Clones tipo D. De acuerdo a las condiciones específicas de suelo, la producción y el comportamiento frecuentemente cambian. Estos clones son recomendados cuando el comportamiento es bien conocido bajo condiciones especiales.

También es importante y no está demás destacar las tareas del FPS (Foundation Plant Service), UC Davis California y del ARC – Infruitec de RSA quienes también se han preocupado de la selección y limpieza de clones específicos. Estas organizaciones han contribuido importantemente en la distribución de materiales debidamente identificados y saneados. De esta forma las industrias vitícolas de los Estados Unidos y Sudáfrica han mantenido controlados los problemas atribuibles a las mezclas varietales y condición sanitarias de los materiales de propagación.

3. Calidad genética y sanitaria de las plantas

Conocimiento de los problemas atribuibles a la condición sanitaria de las plantas

Evidentemente que la condición sanitaria de los materiales usados en la propagación y sobre todo en el caso de la injertación influyen sobre los resultados de vivero, en términos de éxito en la injertación y posteriormente también en huerto. Es deseable que los materiales se encuentren libres de hongos, bacterias y virus para facilitar el enclavamiento en la zona de unión y promover los resultados de producción esperados.

Es por ello que los viveros están haciendo enormes esfuerzos en la introducción de materiales madre desde fuentes calificadas, establecimiento de plantales madre bajo condiciones especiales de resguardo para mantener la condición sanitaria inicial, y perfeccionando los protocolos de selección de plantas tanto en plantales como en el mismo proceso de producción.

En paralelo, las universidades han comenzado a estudiar más sistemáticamente los problemas sanitarios de la vid, su diagnóstico, consecuencias y tratamiento. Ello ha permitido a los viveros incorporar estos conocimientos en el perfeccionamiento de sus técnicas de producción.

Univiveros®, al igual que algunas universidades que están desarrollando proyectos en torno a esta especie, se ha anticipado a esta contingencia y cuenta con plantales madres constituidos por material de elite provenientes de las más prestigiosas fuentes extranjeras, cuya calidad sanitaria ha sido confirmada por los testajes efectuados por el laboratorio del Centro Repositorio de la Universidad de Chile. Estos materiales deben seguir constituyendo la base de la propagación de vides injertadas corrientes.

Por otra parte, el Servicio Agrícola y Ganadero ha aprobado el Reglamento Específico de Certificación de Vides, lo que proporcionará un marco regulatorio para la propagación de plantas certificadas, las que se deberán encontrar libres de todas las enfermedades especificadas. Ello permite comenzar a trabajar en el desarrollo de la certificación para contar con plantas certificadas de vides en el mediano plazo.

Evaluación de la calidad genética

Como se mencionó previamente, ha habido en los últimos años un fuerte incremento en el desarrollo, producción y selección de nuevas variedades y clones. Existe todo un trabajo para los viveros en el sentido de obtener los permisos para propagar estas nuevas selecciones, que ya se describió.

Sin embargo, el trabajo no concluye en la obtención de la licencia. Los viveros deben evaluar estos nuevos materiales bajo nuestras condiciones, para verificar que los méritos que se le atribuyen son suficientes y determinar también cómo afectan las condiciones edafoclimáticas, pero también aquellas de procesamiento o comercialización de la fruta a estas nuevas selecciones así como también las características agronómicas y enológicas de los nuevos clones que se incorporan.

De allí que se haga necesario para los viveros contar con centros de evaluación de los nuevos materiales, y montar numerosos ensayos de tratamientos de producción con ellos. Se debe resolver preguntas tales como cuántas "pasadas" de giberélico y en qué concentración – propio de las nuevas selecciones de uva de mesa, o cuán productivo, cuánta azúcar, alcanza un determinado clon o selección en uva de vino.

Se puede concluir entonces que no basta con saber que la planta corresponde a la variedad que se dice que es (propio de la certificación genética asociada a la Certificación), sino además se hace cada vez más necesario conocer el mérito agrícola y los problemas asociados a una determinada nueva obtención vegetal.



V. Conclusiones: Tareas por Realizar en la Producción de Plantas.

Los viveros entendemos que aún quedan muchos desafíos por resolver. La adopción del **uso de las plantas injertadas** como una forma de superar los numerosos y crecientes problemas productivos en el cultivo de la vid, ha requerido de una enorme actualización de los viveros y también de los productores. La incorporación de **nuevas variedades y/o clones** también es una tarea que muchos viveros y también exportadoras o viñas han asumido con responsabilidad y dedicación. Sin embargo, queda aún por darle mayor apoyo a la producción y selección de **variedades propias**. No es menos importante mencionar la relevancia que toma hoy en día el **respeto a la propiedad intelectual** el cual basa y fundamenta nuestras posibilidades de captar genética extranjera, especialmente bajo la situación y circunstancias actuales de relaciones internacionales enmarcadas en Tratados de Libre Comercio que asumen el respeto de protocolos internacionales en torno a este tema. En relación con calidad de plantas, si bien las exigencias de trazabilidad sobre los productos agrícolas, tales como las BPA y Eurepgap han repercutido en todos los viveros obligando a mejorar sus registros y técnicas de producción, no es menos cierto que es probable que sólo la **Certificación del SAG** a los viveros permita homologar los conceptos y calidades. Ya es un avance que desde hace un tiempo existan las Normas Específicas para la Certificación de Vides. Queda por superar las dificultades técnicas y de costo que la implementación de ésta implica, que esperamos que de alguna manera el trabajo colectivo bajo el alero de la Asociación Gremial de Viveros y su Corporación de Desarrollo Viverístico nos lo resuelva.

SITUACIÓN FITOSANITARIA DE LA VID EN CHILE: INSECTOS Y ÁCAROS

Luis Sazo R.

Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

La vid presenta en nuestro medio un importante número de especies asociadas (51), de las cuales 16 tienen importancia económica y 4 son consideradas plagas claves, es decir aquellas que se presentan todas las temporadas; los niveles poblacionales sobrepasan los umbrales de acción; el daño ocasionado puede afectar seriamente la producción y requieren medidas de control en forma regular. El resto de las especies mencionadas, tienen el carácter de plagas ocasionales, vale decir, no se presentan regularmente, el nivel de daño es variable y solo algunas temporadas requieren medidas de control. Con relación a lo anterior, es importante destacar que la ocurrencia de algunas de ellas, esta directamente asociada al entorno del huerto, como ocurre con aquellas unidades productivas ubicadas en laderas de cerros o sectores contiguos donde las especies presentes en la vegetación del lugar colonizan la vid.

En el Cuadro siguiente se informan las principales plagas asociadas a la vid, el carácter y su distribución geográfica en Chile.

Orden: Familia	Nombre de la plaga	Tipo de plaga	Distribución
Acari: Eriophyidae	Ácaro de la avariosis de la vid <i>Calepitrimerus vitis</i> (Nalepa).	Ocasional	RM, V- VII Región
Acari: Eriophyidae	Erinosis de la vid <i>Colomerus vitis</i> (Pgst.)	Ocasional	I - VII Región
Acari: Tenuipalpidae	Falsa araña roja de la vid <i>Brevipalpus chilensis</i> Baker	Clave	III - X Región
Acari: Tetranychidae	<i>Eotetranychus lewisi</i> MacGregor	Ocasional	RM
Acari: Tetranychidae	Araña del parronal <i>Oligonychus vitis</i> Zah. y She	Ocasional	II - VII Región
Coleóptera: Bostricidae	Taladrador del manzano <i>Dexicrates robustus</i> (Bl)	Ocasional	III - IX Región
Coleóptera: Bostricidae	Taladrador de la vid <i>Micrapate scabrata</i> (Er.)	Ocasional	I - IX Región
Coleóptera: Curculionidae	Burrito de la vid <i>Naupactus xanthographus</i> (Germar)	Clave	I - VIII Región
Coleóptera: Scarabeidae	Pololo chico café <i>Athlia rustica</i> Er.	Ocasional	III - VIII Región
Hemíptera: Coccidae	Conchuela café europea <i>Parthenolecanium corni</i> (Bouché)	Ocasional	III - IX Región
Hemíptera: Coccidae	Conchuela grande café del duraznero <i>Parthenolecanium persicae</i> (F.)	Ocasional	I - IX Región
Hemíptera: Margarodidae	Margarodes de la vid <i>Margarodes vitis</i> (Phil.)	Ocasional	IV- IX Región
Hemíptera: Pseudococcidae	Chanchito de cola larga <i>Pseudococcus longispinus</i> (Targ. Tozz.)	Ocasional	I - IX Región
Hemíptera: Pseudococcidae	Chanchito blanco de la vid <i>Pseudococcus viburni</i> Maskell	Clave (uva de mesa)	I a la IX región.
Lepidóptera: Tortricidae	Eulia <i>Proeulia auraria</i> (Clarke)	Ocasional	III - VII Región
Thysanoptera: Thripidae	Trips de los brotes <i>Drepanothrips reuteri</i> Uzel	Ocasional	III - VII Región
Thysanoptera: Thripidae	Trips de California <i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande	Clave (uva de mesa)	III - VII Región

1.-Burrito de la vid *Naupactus xanthographus* G. (Curculionidae)

Distribución: I - VIII región.

Importancia: plaga clave y cuarentenaria. Nativa.

Hospederos frutales: ciruelo, duraznero, nectarino, frambuesa, cerezo, kiwi, nogal, peral, manzano, vid, almendro, limonero, naranjo, palto.

Hospederos no frutales: alfalfa, frejol (chacarera en general), malezas (importante: maicillo).

Daño: El adulto se alimenta de las hojas, pueden destruir los racimos en brotación. La larva se alimenta de raíces y raicillas destruyéndolas seriamente, pero quizá el daño más importante es el causado por el rechazo en las inspecciones fitosanitarias al detectar adultos y/o huevos.

2.-Chanchito blanco de la vid *Pseudococcus viburni* (Pseudococcidae)

Distribución: Cosmopolita, en Chile de la I a la IX región.

Importancia económica: clave en uva de mesa. En vid vinífera es clave en algunas zonas.

Hospederos frutales: Cerezo, ciruelo, duraznero, frambuesa, kiwi, manzano, mora, naranjo, nectarino, níspero, peral, vid de mesa y vinífera.

Hospederos no frutales: jacarandá, laurel de flor, acacio. Malezas como correhuela, sanguinaria, malva, tomatillo, pilapila, cardo, bledo. Forrajeras y cultivos de chacarera.

Daño: El los racimos suele observarse presencia de mielecilla que atrae a hormigas y favorece el desarrollo de hongos saprófitos (*Cladosporium*), pero es más importante el daño indirecto, ya que la presencia de individuos y/u ovisacos en el racimo es motivo de rechazo en las inspecciones fitosanitarias (Corea, México).

Su reducido control natural, así como la constante reinfestación desde especies no frutales; especies arbóreas y malezas; son causales de su presencia en los viñedos. Además la implementación de programas de control insuficientes, basados en aplicaciones específicas en épocas inapropiadas y la deficiente implementación de medidas culturales de manejo (eliminación de los racimos en contacto con los brazos en la zona de la corona) favorecen su persistencia.

3.-Thrips de California *Frankliniella occidentalis* P. (Thripidae)

Distribución: Cosmopolita en Chile de la III a VII la región.

Importancia económica: Clave.

Hospederos frutales: Cerezo, ciruelo, nectarinos, durazneros, manzano, peral, vid.

Hospederos no frutales: Flores de corte, pimentón, tomate, yuyo, correhuela, hierba de la culebra, diente de león, rábano; especies arbóreas como espino, aroma, acacio y también en forrajeras como alfalfa y trébol blanco entre otras.

Daño: La hembra penetra tempranamente los órganos florales internos, donde deposita un número variable de huevos lo que genera el síntoma conocido como "halo spot", además las bayas presentan russet y los racimos corredura. Es vector del virus "Tomato Spotted Wilt Virus" (TSWV).

El daño se intensifica con la presencia de vegetación natural con flores vistosas en la unidad de producción o en las inmediaciones y en zonas en que la floración es más larga. También favorece el daño las temporadas de sequía.

4.-Falsa araña roja de la vid *Brevipalpus chilensis* B. (Tenuipalpidae)

Distribución: Argentina y Chile. En Chile desde la III a X la región. Nativa.

Importancia económica: Clave en vid vinífera y cuarentenaria en uva de mesa.

Hospederos frutales: vid, caqui, chirimoyo, kiwi, limonero, naranjo, peral.

Hospederos no frutales: Ligustrina, sauce, correhuela, palqui.

Daño: Ocurre muy temprano en la temporada, desde yema algodonosa en adelante. La parte basal del brote se necrosa y las hojas afectadas exhiben un aspecto acucharado e incluso los bordes necrosados. En general las variedades tintas (Cabernet, Merlot) son más susceptibles que las blancas (Chardonnay).

B. chilensis inverna al estado de hembra adulta fecundada y durante la temporada puede completar hasta 5 generaciones. En invierno se localiza bajo el ritidoma suelto de los brazos y cargadores.



NEMÁTODOS ASOCIADOS A VIDES

Erwin Aballay E.

Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

Los nematodos fitoparásitos son parásitos obligados que normalmente no matan a su hospedero, solo se alimentan de ellos causándoles una desvigorización que puede ser extrema. Sin embargo, además de su daño directo, es frecuente encontrar una asociación con otros patógenos del suelo, tal como hongos o bacterias, lo que normalmente acarrea una destrucción acelerada del sistema radical, observándose pudriciones, pérdida de corteza, daños a los vasos conductores y otros síntomas, lo que puede causar incluso la muerte de las plantas.

Los antecedentes analíticos indican que donde se desarrollan vides, siempre hay presencia de nematodos en distintos niveles, dependiendo de las condiciones ambientales y de las variedades existentes. Generalmente su presencia alcanza niveles de infestación altos en aquellos suelos livianos, arenosos, pedregosos con temperaturas altas y humedad permanente. Por el contrario, las texturas finas, arcillas, suelos fríos o condiciones de falta de humedad en el perfil, limitan considerablemente su desarrollo.

La vid, como cualquier otro vegetal, está sujeta al parasitismo de diversos organismos, tanto aéreos como del suelo. En este último, los problemas fungosos, de insectos y nematodos son los más importantes. Los daños ocasionados a los cultivos en general son variables dependiendo de la relación hospedero parásito que se establezca. En un suelo cultivado se pueden detectar sobre 10 géneros o especies de nematodos fitoparásitos, todos los cuales presentan distintos hábitos de alimentación y por lo tanto diferentes grados de daño y sintomatologías.

Muchos tipos de nematodos fitoparásitos han sido reportados presentes en vides, pero no todos presentan un mismo grado de agresividad. Los géneros que claramente ocasionan daños de consideración al cultivo, se caracterizan por presentar diferentes hábitos de parasitismo. En primer término están aquellos que necesitan entrar a la raíz para poder alimentarse y cumplir sus ciclos, estableciéndose en puntos fijos, sin volver a moverse. A estos se les conoce como **endoparásitos sedentarios**. Otros géneros penetran las raíces, pero a diferencia de los anteriores, no se establecen permanentemente en ellas sino que son capaces de moverse libremente en su interior, salir de estas, volver a entrar por otros puntos o a otras raicillas. Corresponden a los llamados **endoparásitos migratorios**. Existe un grupo mayoritario de géneros que se alimentan de las raicillas desde el exterior, es decir se ubican en la rizósfera, sin penetrar completamente en ellas, introduciendo solo su aparato de alimentación. Son los llamados **ectoparásitos**, los que se establecen permanentemente en la superficie de las raíces, movilizándose a otros sectores de la misma raicilla o de la masa de raíces con un desplazamiento variable dependiendo del género o especie de nematodo.

En los análisis nematológicos que se realizan rutinariamente en vides en nuestro país, es posible detectar la presencia de más de 13 géneros asociados a su sistema radical, de los cuales solo algunos son de real preocupación. Los nematodos fitoparásitos de mayor importancia en este cultivo corresponden a los géneros *Meloidogyne*, *Xiphinema*, *Mesocriconema*, *Tylenchulus* y *Pratylenchus*. La importancia de cada uno se discute a continuación.

***Meloidogyne* spp.** Los nematodos de este género, llamados comúnmente "nematodos del nudo de la raíz" o "nematodos de los nódulos radicales", corresponden a endoparásitos sedentarios y deben este nombre a la reacción de las raíces de la planta atacada, las que desarrollan nódulos originados por la división anormal de células.

El daño que se observa en plantas atacadas es en parte mecánico, como resultado de las microheridas, del agallamiento o nodulación del sistema radical y la consecuente alteración del sistema vascular. Ello incide en que exista una menor absorción de agua y nutrientes, lo que se refleja en la parte aérea observándose plantas con menor desarrollo, brotes cortos, tendencia a la marchitez y clorosis.

La incidencia de *Meloidogyne* spp. sobre las plantas no es solo directa, sino que además se produce una predisposición en los tejidos de la raíz haciéndolos más susceptibles al ataque de otros organismos, tal como hongos y bacterias. En vides es frecuente que en ataques de importancia se presenten asociaciones con hongos, entre ellos *Phytophthora*, *Verticillium*, *Pythium* o bacterias del género *Agrobacterium*, entre otros.

***Xiphinema* spp.** Los nematodos pertenecientes a este género se caracterizan por ser organismos alargados en todos sus estadios, de mayor tamaño que el resto, variando entre 1,5 y 5 mm dependiendo de la especie y la población y por tener hábitos de alimentación de tipo ectoparasitario. Estos nematodos se alimentan principalmente en los extremos de las raicillas en crecimiento, variando el sitio de alimentación dependiendo de la especie presente. *X. americanum* s.l., es muy polífago, atacando muchos cultivos anuales y perennes, además de plantas nativas y algunas malezas. *Xiphinema index* es la especie de mayor agresividad en Chile, en uva de mesa especialmente y se encuentra ampliamente distribuida en la mayor parte de las zonas productoras. Se alimenta casi exclusivamente de las puntas de las raíces, introduciendo su estilete en los ápices, succionando los contenidos celulares, luego de lo cual puede cambiar de sector dentro de esa raíz o cambiar de raicilla.



El nematodo se alimenta en el extremo de las raicillas, y aunque el período de alimentación sea corto, provoca en ellas detención del crecimiento resultando una pequeña hinchazón y el extremo ligeramente torcido, a su vez se producen nuevas raicillas, las que también son dañadas, dando por resultado masas de raíces con muchas ramificaciones cortitas y deformadas. Si los nematodos persisten alimentándose, las raíces se tornan necróticas, y se destruyen quedando la planta limitada para absorber agua y nutrientes, lo que finalmente se manifiesta en la parte aérea presentando la planta un aspecto desvigorizado, con brotes mas cortos, cierta clorosis, falta de follaje, racimos mas expuestos al sol y otros.

Además del detrimento que los nematodos del género *Xiphinema* causan por su daño directo en la vid, en este género se encuentran especies que además son transmisoras de virus. Algunas especies del grupo *Xiphinema americanum* son transmisoras del virus de la mancha anular del tomate, TomRSV, el cual ha sido detectado en vides en nuestro país. Según algunas observaciones en plantas muy infectadas, se puede señalar que los síntomas son difíciles de diagnosticar al comienzo de la estación y aparecen cuando las plantas están severamente afectadas; brotes de entrenudos cortos, muertos o débiles.

Xiphinema index, por otro lado, además del daño directo que causa, es el transmisor del "virus de la hoja en abanico de la vid" (grape fan leaf virus), importante enfermedad que se manifiesta por provocar en las hojas una mayor abertura peciolar y deformaciones, sarmientos con entrenudos cortos.. Es especialmente notorio en variedades viníferas para producción de vinos tintos.

Mesocriciconema sp. Es un organismo conocido comúnmente como "nematodo anillado", de hábito ectoparasitario, frecuente en vides y carozos entre otros frutales. Al igual que la mayoría de los nematodos fitoparásitos se desarrolla bien en suelos livianos, con humedad y temperaturas sobre lo 20° C. En el suelo se encuentran todos los estados, 4 juveniles y los adultos, mayoritariamente hembras. La especie de mayor relevancia corresponde a *M. xenoplax*. Se alimentan no solo de los ápices radicales, sino que pueden ir a zonas posteriores, destruyendo las células de la corteza principalmente, ocasionando zonas necróticas y alcanzando en algunos tipos de raíces, células del floema.

Tylenchulus semipenetrans. Es un nematodo que se califica como semiendoparásito, ya que las hembras adultas tienen la parte anterior de su cuerpo, cabeza y esófago enterrada en la raíz y su parte posterior fuera de esta. Una vez establecida en la planta, pierde la facultad de moverse por lo que podría también considerarse un endoparásito sedentario. Su nombre común, "nematodo de los cítricos", deriva del hecho que sus hospederos principales son este grupo de plantas.

Tylenchulus semipenetrans no produce síntomas muy notorios en las raíces, no hay deformaciones importantes o nodulaciones, fuera de observarse una masa radical de menor crecimiento. Las hembras adultas exudan una matriz gelatinosa en donde depositan sus huevos y que sirve para protegerlos del medio ambiente. En ataques masivos, esta jalea rodea la raíz, lo que a su vez provoca una fuerte adherencia de las partículas de suelo, dándoles el aspecto de un diámetro mayor y una apariencia bastante más sucia de lo normal. Esta es una manifestación muy típica de raíces parasitadas. Tampoco *T. semipenetrans* produce un síntoma claramente definido en la parte aérea de las parras. Al igual que en otros casos solo se aprecia un menor vigor y disminución de producción. El ciclo de vida dura aproximadamente de 6 a 8 semanas a 25°C.

Pratylenchus spp. Conocido con el nombre común de "nematodo de las lesiones radicales", es un nematodo endoparásito migratorio, tiene la habilidad de penetrar y salir libremente de las raíces y puede depositar sus huevos dentro o fuera de ellas. Tanto en el suelo como en las raíces se encuentran todos los estados indicados. Existen muchas especies de *Pratylenchus*, las cuales generalmente son bastante polífagas, es decir presentan una amplia gama de hospederos. Este nematodo tampoco produce síntomas específicos a su ataque, reconocibles en la parte aérea de las parras. Se puede apreciar una falta de vigor y menos crecimiento que en plantas normales, como también una baja de producción.

Aspectos De Control De Nematodos Fitoparásitos En Vides. Los aspectos de control o manejo de las poblaciones existentes tienen que ver en primera instancia con la prevención, de forma tal de no caer en la presencia de poblaciones altas que obliguen al establecimiento de programas curativos.

El control preventivo se refiere básicamente a tomar todas las medidas, desde la plantación, que impidan o dificulten el incremento de la plaga. El punto de partida por lo tanto se dirige tanto al establecimiento de la plantación en terrenos con bajas poblaciones de nematodos fitoparásitos, como al uso de plantas con un sistema radical sano, por lo que el origen de ese material es muy importante.

Para tener claridad respecto al estado sanitario del terreno a plantar y de las plantas a utilizar, la única forma de hacerlo es mediante un **análisis nematológico** del suelo y de las raíces respectivamente, el cual nos indica los géneros de nematodos presentes y la cantidad en que se encuentran. De acuerdo a esto podremos implementar las medidas que nos permitan disminuir sustancialmente la cantidad de parásitos presente.

Cuando no se ha realizado un buen trabajo desde un comienzo, es altamente probable que aparezcan focos de daño atribuibles a uno o a varios géneros de nematodos, lo que obliga a iniciar un **programa de control o manejo curativo** del problema, lo cual ciertamente involucra ya un daño al cultivo además de un costo permanente, no contemplado en forma inicial.



“SITUACIÓN FITOSANITARIA DE LA VID EN CHILE: ENFERMEDADES FUNGOSAS”

Jaime Auger S.

Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

El cultivo de la vid en Chile es afectado por un importante número de agentes fitopatógenos de origen fungoso, entre los cuales especial mención tienen los que provocan daño en los tejidos en crecimiento como Botrytis, Oídio y Pudrición ácida, y en algunas temporadas de condiciones climáticas muy húmedas Mildiú y Escoriosis de la vid (*Phomopsis viticola*). Estas enfermedades son fácilmente identificables por los síntomas característicos que producen y su efecto se traduce en pérdidas directas en la producción del cultivo. En un segundo grupo se encuentran las enfermedades que afectan la madera entre las cuales las más importantes son “La declinación y muerte de plantas jóvenes” y el envejecimiento de planta adulta como es el caso del “Enrollamiento Clorótico de la vid” (*Fomitiporella vitis*), y las que afectan el sistema radical, como Phytophthora y Verticilosis y Pie Negro (*Cylindrocarpon destructans*).

En la presente exposición se abordará con mayor detención a las enfermedades que afectan la madera y que provocan la declinación de la vid, cuyo efecto no es tan evidente en la etapa inicial de infección pero cuyas pérdidas con el tiempo pueden llegar a ser más destructivas, causando un envejecimiento prematuro y la muerte de las plantas.

Durante las últimas temporadas se han observado con bastante frecuencia síntomas de declinación y muerte asociados a hongos que infectan el sistema vascular y degradan la madera en vides jóvenes, de 1 a 5 años.

Los hongos que hoy se asocian a este tipo de daño en las plantas de vides jóvenes han estado presentes siempre en el ecosistema de la viña o parronal; sin embargo su acción patogénica asociada a síntomas de declinación se ha logrado mostrar recientemente, debido a los progresos obtenidos al analizar más detenidamente diversos aspectos de la patología de la vid permitiendo dilucidar situaciones que anteriormente no lograban ser debidamente explicadas.

Es así como diversos síntomas -como menor desarrollo general o parcial de las plantas debido a entrenudos cortos, hojas de menor tamaño, clorosis de la lámina foliar, brotes en zigzag, necrosis vascular- habitualmente se atribuían a otros agentes causales, como virosis. Por otra parte, generalmente este tipo de plantas debilitadas morían por la acción de patógenos oportunistas, atribuyéndoseles a éstos la causa de la enfermedad.

En relación a la mayor presencia de hongos asociados a problemas de declinación, existen diversas hipótesis. Una de las más aceptadas es que estos organismos han aumentado paulatinamente en el ecosistema del huerto por la ausencia de tratamientos con productos fungicidas de amplio espectro. Cabe recordar que hasta los años 80 en Europa se utilizaba arseniato de sodio, como aplicación invernal como una medida de limpieza del huerto, pero este producto se prohibió por problemas de contaminación ambiental. En Chile, en tanto, se utilizaban los dinitros como tratamientos erradicantes de estados invernantes. De este modo, hoy los tratamientos de las diferentes enfermedades de la vid se realizan con productos patógeno-específicos, por lo tanto no se incluyen en los programas fitosanitarios productos de un espectro de acción más amplia que afecten a estos hongos.

Además de estas razones, se deben considerar otras situaciones que han contribuido con la propagación de estos patógenos. Un ejemplo es lo ocurrido en California, donde el portainjerto más utilizado hasta comienzos de los años 90 era el AXR1 (resistente a filoxera), portainjerto que al perder la resistencia a esa plaga fue posteriormente reemplazado por otros como: SO4, 101-4, Freedom, C3309, 110R, los cuales son más susceptibles a la acción de estos hongos vasculares.

Otras causas para la propagación de estos hongos son problemas de manejo del cultivo, en los que se incluyen situaciones de compactación del suelo, estrés hídrico o estrés provocado, por daño radicular y sobresaturación del suelo, que no permiten que la planta logre un desarrollo adecuado e implemente un apropiado sistema de defensa.

Síntomas y agentes causales

Los principales síntomas provocados por los hongos de la madera varían dependiendo del tipo de planta, injertadas o de pie franco. En las plantas sin injerto los síntomas se manifiestan como: menor desarrollo, entrenudos cortos, hojas pequeñas y clorosis laminar, defoliación prematura y reducción del diámetro de tronco y brazos. Las vides severamente afectadas pueden causar la muerte de las plantas durante el primer año de plantación. Sin embargo, al podarse a dos yemas en inviernos sucesivos, estas plantas pueden generalmente continuar creciendo, pero débilmente. Posteriormente, cuando a estas plantas se les deja carga, ocurre el colapso de la parra. Por lo general este tipo de planta viene infectada desde vivero.

En las plantas injertadas los síntomas se manifiestan de forma más severa, principalmente como una incompatibilidad y/o muerte súbita que generalmente ocurre al entrar en producción. En estas plantas las prácticas de manejo que minimicen el estrés y maximicen el crecimiento vegetativo son insuficientes para recuperarlas. Cuando se examina el tronco y brazos de las plantas enfermas, es posible visualizar la presencia de estrías de color pardo oscuro en el sistema vascular. Este síntoma se presenta en algunos vasos o en la totalidad del sistema vascular, dependiendo del grado de severidad de la enfermedad. Al realizar un corte transversal se pueden distinguir puntuaciones pardo oscuras alrededor del xilema, que corresponden al taponamiento de los vasos xilemáticos. Esta coloración pardo oscura es producto de la oxidación de compuestos fenólicos producidos por el micelio del patógeno y la obstrucción de los vasos es consecuencia del aumento en tamaño de las células parenquimáticas adyacentes, como reacción propia de la planta para detener el avance del patógeno.

La declinación de la planta joven es provocada por un complejo de hongos vasculares, entre los cuales el principal es el hongo *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch) y cinco especies de *Phaeoacremonium*. De estas cinco especies, dos son las principalmente citadas como agentes causales, *Ph. inflatipes* (Pi) y *Ph. aleophilum* (Pa) y en forma secundaria *Ph. parasiticum*, *Ph. angustius* y *Ph. rubrigenum*. Además, frecuentemente participa causando daño en la madera el hongo *Botryosphaeria obtusa*.

Algunos microorganismos pueden habitar internamente las plantas sin causar daño aparente (microorganismos endófilos), que en algunos casos bajo ciertas circunstancias son capaces de activarse y crecer rápidamente causando severos desórdenes fisiológicos en las plantas. Un ejemplo de este tipo de microorganismos son los hongos *Phaeoconiella* y *Phaeoacremonium* spp. que están asociados a la declinación de la vid, habitando internamente en la vid sin causar enfermedad. Sin embargo, a través de observaciones de campo se ha comprobado que bajo condiciones de estrés -tales como pobre desarrollo radical, inducción de producción precoz, baja fertilidad del suelo y principalmente estrés hídrico-, se gatilla el comportamiento patogénico de estos hongos.

Durante la fase patogénica, los hongos invaden el sistema vascular (xilema) de la madera de la vid causando decoloración debido a la acción enzimática, como estrías pardo oscuras, síntoma que solamente se puede observar cuando se corta el tronco de las plantas afectadas. Estacas provenientes de plantas infectadas no producen callo tanto en el injerto así como en estacas de pie franco. Las variedades más susceptibles no prosperan en la etapa de vivero, alcanzando un pobre y escaso desarrollo. Es importante mencionar que se ha comprobado que *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* se pueden transmitir a través de estacas provenientes de plantas madres infectadas asintomáticas. Asimismo, estos hongos producen gran cantidad de esporas utilizando diversas formas, como es el caso de *P. chlamydospora*, que además de esporas en conidióforos y picnidios, producen esporas de resistencia del tipo chlamidosporas, contaminando el suelo y utilizando esta forma como principal vía de infección de plantas en vivero. La principal forma de diseminación aérea es mediante conidias o picniosporas, las cuales inician la infección contaminando los cortes de poda.

A medida que la planta envejece, estos hongos predisponen a la madera a la infección por otros hongos, particularmente aquellos que producen pudrición blanda como es el caso del Enrollamiento clorótico, enfermedad que se desarrolla principalmente en vides de 8 años y mayores, resultando finalmente en la pérdida total de la planta adulta.

Síntomas de Pie Negro y su causa

Asociado a la declinación de planta joven o favorecido por la presencia de *Phaeoconiella* y *Phaeoacremonium* spp., se manifiesta otra enfermedad que afecta a la vid denominada "Pie Negro" y que es causada por un hongo del suelo del género *Cylindrocarpon*. Este hongo es un habitante común del suelo, frecuentemente asociado a la raíz de plantas herbáceas y leñosas y que sobrevive como saprófito o parásito facultativo, y ha sido identificado causando el síndrome de Pie Negro en nuestro país.

Los síntomas ocasionados por *C. destructans* que corresponden a un decaimiento general de la planta; entrenudos cortos y hojas pequeñas, y generalmente se confunden con los de declinación. Las plantas afectadas por *C. destructans* desarrollan síntomas de necrosis en raíces y cuellos; las raíces adquieren un color pardo oscuro a negro. Para sobrevivir la planta produce raíces en la parte superior, formándose de esta manera una segunda capa de raíces más superficiales. Las plantas severamente afectadas brotan y mueren o simplemente no brotan.



Medidas de control

Hasta la fecha las recomendaciones para viveristas y viticultores se basan en la limitada información disponible. Los métodos de diagnóstico para la detección en gran escala del o los agentes causales de la declinación de planta joven aún están en proceso de perfeccionamiento, existiendo buenas perspectivas de contar pronto con pruebas rápidas de diagnóstico que permitan detectar el ADN del patógeno en plantas asintomáticas, y con esto poder desarrollar un esquema de certificación de plantas libres de hongos vasculares.

El método de diagnóstico utilizado hasta la fecha es mediante el aislamiento en medios de cultivo *in vitro*, el cual es particularmente difícil en este tipo de hongos, que se caracterizan por presentar un lento desarrollo.

Investigadores sudafricanos recomiendan el tratamiento de estacas de vid en dormancia con agua caliente a 50°C por 30 minutos. Temperatura a 51°C puede causar daño a las estacas y reducir su viabilidad, así como la temperatura bajo 49°C permitiría la sobrevivencia de los patógenos. Sin embargo, ensayos con agua caliente en California han demostrado que este tratamiento no elimina a *P. chlamydospora*.

Actualmente, resultados generados en el Laboratorio de Fitopatología Frutal del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad de Chile, basados en ensayos de control *in vitro* con fungicidas sobre los principales hongos causantes de declinación de planta joven, permiten establecer que su aplicación en ensayos de invernadero y de campo evitarían la dispersión de la enfermedad, evitando la infección de cortes de poda o recuperando plantas ya infectadas.

Finalmente, no obstante lo anteriormente indicado es importante señalar que la principal medida de control de este complejo cuadro patológico es sin lugar a dudas la prevención evitando la infectación de las plantas y optimizando el crecimiento de estas mediante prácticas culturales adecuadas que minimicen el estrés y mantengan a las plantas sanas y vigorosas.

Literatura Consultada

- Adalat, K.; C. Whiting, S. Rooney and W.D. Gubler. 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathol. Mediterr.* 39: 92-99.
- Auger, J.; M. Esterio, M. Reveco y J. Venegas. 2001. Diagnóstico de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss.) Scholten, en vides (*Vitis vinifera* L.) cv. Red Globe mediante PCR. En: XI Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Santa Cruz, Chile. Diciembre 2001. p. 32 (resumen).
- Auger, J.; M. Esterio, G. Castillo, A. Droguett y J. Venegas. 2001. Obtención de plantas libres de *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten, agente causal del Mal del Pie Negro en *Vitis vinifera* L., cv. Red Globe. En: XI Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Santa Cruz, Chile. Diciembre 2001. p. 68 (resumen).
- Auger, J.; M. Esterio, I. Pérez, W.D. Gubler and A. Eskalen. 2004. First Report of *Phaemoniella chlamydospora* on *Vitis vinifera* and French American Hybrid in Chile. *Plant Dis.* 88: 1285.
- Auger, J.; M. Esterio, I. Pérez, V. Navia, W.D. Gubler, A. Eskalen. 2004. Hongos asociados con degradación de la madera y declinación de planta joven de la vid en Chile. En: XIV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Talca, Chile.
- Auger, J.; M. Esterio, I. Pérez, W.D. Gubler, A. Eskalen, E. Holzappel. 2004. *Phaemoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* asociados a síntomas de la enfermedad de petri o declinación de planta joven de la vid (*Vitis vinifera*) en Chile. En: XIV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Talca, Chile.
- Auger, J.; M. Esterio y I. Pérez. 2004. La declinación y muerte de planta joven de la vid en Chile. *Rev. Aconex* 85: 15-21.
- Crous, P.; L. Swart and S. Coertze. 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathol. Mediterr.* 40: S464-S466.
- Edwards, J.; I.G. Pascoe, S. Salib and N. Laukart. 2003b. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaemoniella chlamydospora* in young vines. 3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 1-2 February, p. 37 (abstr.).
- Fourie, P.H. and F. Halleen. 2001. Field and diagnostic observations of grapevine decline in South Africa. Proc. 11th Congr. MPU. Evora, Portugal, 17-20 Sept. p. 58-60.
- Fourie, P.H. and F. Halleen. 2003. Proactive control measures for Petri diseases in grapevine nurseries. 3rd Intl. Workshop Grapevine Trunk Diseases. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 1-2 February, p. 34 (abstr.).
- Rego, M.C.; A. Carvalho, T. Nascimento and H. Olivera. 2001b. First approach on the understanding of inoculum sources of *Cylindrocarpon destructans* and *Phaemoniella chlamydospora* concerning grapevine rootstocks in Portugal. *Bull. OIL/SROP* 24: 67-72.
- Scheck, H.; S. Vásquez, D. Fogle and W.D. Gubler. 1998. Grape growers report losses to black foot and grapevine decline. *Calif. Agric.* 52(4): 19-23.
- Van Niekerk, J.; P. Crous, P.H. Fourie, E. Groenewald and F. Hallenn. 2001. Botryosphaeria canker and dieback of grapevine. *Wynboer*, Sept. 2002, 6 pp.



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

Whiteman, S.; M. Jaspers, A. Stewart and H.J. Ridgway. 2003. Identification of potential sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in the grapevine propagation process. 3rd Intl. Workshop Grapevine Trunk Diseases. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 1-2 February, p. 26 (abstr.).

APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA EL CONTROL DE VIRUS Y FITOPLASMAS

Humberto Prieto E.

INIA – La Platina

Es ampliamente reconocido por fitomejoradores y fitopatólogos que el mejor método de control de enfermedades es el desarrollo de cultivares resistentes. Consecuentemente, uno de los objetivos fundamentales de la mayoría de los programas de mejoramiento vegetal es la identificación e introducción de genes de resistencia través de cruzamientos entre especies sexualmente compatibles. Algunos ejemplos de esto lo constituyen programas de mejoramiento que han utilizado alelos naturales de resistencia para el *Cucumovirus del Mosaico del Pepino* (CMV) o para los *Potyvirus del Anillado de la Papaya* (PRSV), del *Mosaico Amarillo de la Calabaza* (ZYMV) y del *Mosaico de la Sandía tipo II* (WMV-II) (Provvidenti, R., 1993). En estos programas se ha utilizado la aproximación tradicional del retrocruzamiento reiterado, para incorporar (introgresar) genes de resistencia a ciertos cultivares de interés comercial, utilizando generalmente, fuentes de resistencia de especies silvestres. Como se prevé, son necesarias varias generaciones de individuos retrocruzados antes de que se obtenga una nueva variedad de características aceptables para su uso comercial. A pesar de esto, resulta evidente que en la mayoría de los casos, los mejoradores no disponen de fuentes naturales de resistencia para utilizarlas, o aún cuando se hayan identificado algunos *loci* de resistencia para virus, ellos se encuentran en materiales silvestres y, por lo tanto, su introducción como carácter estable hacia variedades mejoradas requiere al menos, de su identificación genética inequívoca, con una gran inversión de tiempo y dinero.

Técnicas de ingeniería genética y biología molecular han permitido acortar de manera significativa el tiempo necesario para llegar a obtener variedades resistentes adaptadas a las condiciones de cultivo particulares de cada agro-ecosistema. Actualmente está demostrado en una serie de modelos que, transformando plantas con los vectores de expresión adecuados y genes quiméricos que contengan las secuencias que codifican para diversas proteínas virales, es posible conferir resistencia o algún grado de tolerancia a virus en las plantas transformadas, sin alterar el resto de las características agronómicas de la variedad. En líneas generales, estos procesos de mejoramiento por transformación genética explotan el fenómeno conocido como "Protección Cruzada", cuya esencia es la de conferir un estado de resistencia/tolerancia a un cultivo frente a una cepa viral agresiva o severa mediante una inoculación previa del cultivo con una cepa atenuada de la misma especie (Gibbs, A., 1969). La Protección Cruzada ha sido utilizada en la agricultura con fines comerciales por varias décadas en todo el mundo (Hamilton, R., 1980). En Japón, más de un millón de plantas de tomate, destinadas tanto para el mercado de consumo fresco de tomate como para tomate destinado a procesamiento, presentan protección conferida contra CMV, ya que portan un RNA satélite derivado de una cepa japonesa atenuada del mismo virus (Samaya *et al.*, 1993). En este mismo cultivo, otro ejemplo lo constituye el *Tobamovirus del Mosaico del Tomate* (ToMV), donde si bien es cierto que una parte importante de la oferta de tomate para consumo fresco tanto en Europa como en Japón proviene de variedades de tomate mejoradas por métodos convencionales, también se encuentran tomates para consumo fresco procedentes de variedades con protección conferida debido a la inoculación previa con cepas atenuadas de ToMV (Samaya *et al.*, 1993). Finalmente, se tiene el caso de árboles de cítricos y papaya, donde existen reportes que describen la utilización de Protección Cruzada contra el *Closteovirus Tristeza de los Cítricos* (CTV) (Fulton, 1986) y el PRSV (Yeh *et al.*, 1988), respectivamente. En el ámbito de los cultivos de propagación vegetativa, la utilización de Protección Cruzada tiene como ejemplos muy importantes a las frutillas y algunas variedades de especies florales.

Con la aparición de algunos sistemas de transformación genética de plantas, se observó que este mismo fenotipo de protección podía imitarse (obtenerse) a través de la introducción en la planta, de secuencias virales. Inicialmente, las secuencias utilizadas para generar este fenómeno de resistencia en su mayoría correspondían a genes de la proteína de cubierta o a la replicasa, enzima encargada de la replicación del genoma viral. Sin embargo, con el correr del tiempo y la masificación del uso de esta estrategia, la experimentación mostró que una gran cantidad de plantas transgénicas que no expresaban las proteínas mencionadas y que sólo poseían insertadas establemente sus secuencias e incluso algunas mutaciones de estos genes, también inhibían la replicación del virus ante una infección de dicha planta transgénica. Todos estos eventos han sido agrupados finalmente, en un proceso biológico aparentemente normal en muchos, sino en todos, los sistemas eucarióticos, referidos como silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Este se puede definir como una reducción de los niveles de estado estacionario de un mRNA específico. La base de la respuesta del PTGS consiste en la generación de un RNA doble hebra (dsRNA), correspondiente al gen específico (o un segmento de él) que será silenciado. En el caso del PTGS "derivado de virus", las secuencias tanto del virus como de los transcritos transgénicos, inducen y son blanco a la vez, del proceso de silenciamiento. Un punto clave de esta respuesta y del presente trabajo, es que la existencia de dsRNA en el citoplasma de las células (transgénicas) infectadas, ha mostrado gatillar un proceso de defensa general que es transmisible hacia toda la planta, es decir, se estaría montando una resistencia sistémica. A partir de este conocimiento, diversos sistemas inductores del silenciamiento génico contra genes

virales se han desarrollado en plantas, tratando incluso de buscarse estrategias que eviten el uso de plantas transgénicas a través de la aplicación directa sobre hojas de las construcciones quiméricas inductoras de silenciamiento.

Una estrategia paralela al uso del silenciamiento génico como vía de control de virus en plantas, es el desarrollo de anticuerpos específicos de ratón contra la proteína de cubierta de estos virus y el uso de sus genes para el desarrollo de construcciones quiméricas que se expresen en plantas transgénicas. Estas construcciones pueden expresar estos genes de anticuerpo completa o parcialmente ("plantibodies") (Voss *et al.*, 1995), estrategia que ha reducido la tasa de multiplicación viral exitosamente en dichas plantas transgénicas (Baum *et al.*, 1996).

Por otro lado, los fitoplasmas representan una enfermedad emergente de gran impacto proyectado en los sistemas agrícolas. Inicialmente llamados Organismos Similes de Micoplasmas (mycoplasma-like organisms), estos procariontes endocelulares sin pared celular se han descrito en más de 600 enfermedades afectando al menos 300 especies vegetales (McCoy *et al.*, 1989; Kirkpatrick, 1992). Sin embargo y debido a su complejo comportamiento biológico, estos se constituyen en los patógenos más pobremente caracterizados a la fecha. Es sabido que habitan los haces vasculares floemáticos y que debido a esto, su mecanismo de transmisión son insectos que se alimentan precisamente de fluidos de estos haces (Tsai, 1979). La misma estrategia del uso de "plantibodies" específicos para proteínas de cubierta virales, se ha utilizado para generar plantas transgénicas que expresan anticuerpos contra proteínas principales de membrana ("major membrane protein" o "immunodominant membrane protein") de algunos fitoplasmas (Garnier *et al.*, 1990). Plantas de tabaco transformadas con el gen del anticuerpo que reconoce la proteína mayor del "stolbur phytoplasma", han mostrado tras dos meses de infección, no poseer síntomas de la enfermedad (Le Gall *et al.*, 1998). Un nuevo blanco de bloqueo ha aparecido recientemente al describirse proteínas codificadas por DNAs extracromosomales en estos organismos (similares a los plasmidios de las bacterias), cuyos genes pueden codificar proteínas que estén específicamente involucradas en la patogenicidad de los fitoplasmas (Nishigawa *et al.*, 2001).

Referencias.

- Baum, T. J., A. Hiatt, W. A. Parrott, L. H. Pratt y R. S. Hussey (1996). Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:382-387.
- Fulton, R. (1986). Practices and precautions in the use of cross-protection for plant virus control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:67-81.
- Garnier, M., G. Martin-Gros, M. L. Iskra, L. Zreik, J. Gandar, A. Fos y J. M. Bove'. (1990). Monoclonal antibodies against the MLOs associated with tomato stolbur and clover phyllody, p. 263-269. En G. Stanek, G. H. Cassel, J. G. Tully, and R. F. Whitcomb (ed.), *Recent advances in mycoplasmaology*. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gibbs, A. (1969). Plant virus classification. *Adv. Virus Res.* 14:263-328.
- Hamilton, R. (1980). Defenses triggered by previous invaders: viruses. En: *Plant disease: an advanced treatise.*, Vol. 5, Academic Press, New York, Horsfall, J. and E. Cowling (Eds.), pp. 279-303.
- Kirkpatrick, B. (1992). Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. En *The Prokaryotes*, 2a ed., pp. 4050-4067. Editado por A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Le Gall, F., Bové M. y Garnier, M. (1998). Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the Stolbur Phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Appl. Env. Microbiol.* 64:4566-4572
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J. y 16 otros autores (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. En *The Mycoplasmas*, vol. 5, pp. 546-640. Editado por R. F. Whitcomb y J. G. Tully. New York: Academic Press.
- Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T. y Namba, S. (2001). *In planta* expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147:507-513
- Provvidenti, R. (1993). Resistance to virus diseases of Cucurbits. Págs. 8-43. En *Resistance to viral diseases and vegetables: genetics and breeding*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Samaya, H., Sato, T., Kominato, M., Natusuaki, T. y Karper, J. (1993). Field testing of a satellite containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* 83:405-410.
- Tsai, J. H. (1979). Vector transmission of mycoplasmal agents of disease. En *The Mycoplasmas*, vol. III, pp. 266±309. Editado por R. F. Whitcomb y J. G. Tully. New York: Academic Press.
- Voss, A., M. Niersback, R. Hain, H. J. Hirsch, Y. C. Liao, F. Kreuzaler y R. Fischer. (1995). Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. *Mol. Breed.* 1:39-50.
- Yeh, S., Gonsalves, D., Wang, H., Namba, R. y Chiu, R. (1988). Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Disease* 72:375-380.

PRESENTACIÓN PROYECTO FIA: "ELABORACIÓN DE UN SISTEMA CONFIABLE PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS Y FITOPLASMAS QUE AFECTAN A LA VID"

Jaime R. Montealegre A.

Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

La superficie plantada con uva vinífera y de mesa en Chile se estima en más de 162.000 hectáreas (110.000 y 52.685 ha respectivamente), siendo estos dos cultivos frutícolas unos de los más relevantes para la agricultura chilena, no sólo como fuente de divisas para el país, sino también como fuente de trabajo directo e indirecto para las empresas asociadas al rubro.

Lo anterior ha llevado a una mayor producción de ambos tipos de uva y por lo tanto una mayor exportación de vinos y de uva de mesa; sin embargo, a pesar del desarrollo tecnológico alcanzado por el cultivo en Chile, existía carencia de información respecto a la causa y diagnóstico de enfermedades ocasionadas por fitoplasmas, virus y viroides.

En muchos casos, los síntomas producidos por estos fitopatógenos pueden pasar inadvertidos en plantas asintomáticas, o bien éstos asociarse a otras causas como deficiencias nutricionales, factores abióticos, etc.; sin embargo, los efectos se manifiestan de diferentes formas, lo cual dificulta una evaluación precisa de las pérdidas. Estas pérdidas pueden a veces estar asociadas a disminución de rendimiento, menor crecimiento de las plantas, cambios e irregularidades de coloración de la fruta, disminución de calibre, retardos de madurez, baja concentración de azúcares, aumento de susceptibilidad a otros fitopatógenos, efectos sinérgicos con otros patógenos (ej. fitoplasmas + hongos), muerte de plantas e incompatibilidad del patrón-injerto. Lo anterior, el mayor costo interno de producción y considerando los menores precios obtenidos por el vino y uva de exportación debido a la competencia en el mercado internacional, hace que día a día los márgenes de ganancias sean menores para el productor chileno. Por lo que estas pérdidas a la fecha casi no consideradas, gravitarán cada día más en el resultado económico del cultivo.

Considerando estos antecedentes, en el Proyecto FIA: BID-PI-C-2001-1-A-013 financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), desarrollado por la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, en colaboración con la Universidad de Bologna (Italia), UNIVIVEROS S.A. y Viña Santa Rita S.A., 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 ha realizado utilizando como apoyo a PCR, la técnica inmunológica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

El proyecto se ha ejecutado realizando una prospección en las zonas productivas de mayor importancia en el país (regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana). Junto con identificar los agentes causales, se caracterizarán genéticamente a los tres patógenos más importantes y al final del proyecto se realizará una evaluación técnico-económica de los métodos de diagnóstico utilizados.

La información obtenida, permitirá poner las bases para obtener en un futuro cercano, la recuperación de germoplasma valioso infectado por fitoplasmas, virus y virus afines, utilizando las técnicas desarrolladas en apoyo a la limpieza de material vegetal; sin embargo, también plantea la necesidad de investigar en estos fitopatógenos la situación en la III Región de Chile, su incidencia, severidad, vectores asociados en la transmisión y su manejo en la producción de uvas en Chile.

IMPACTO DE VIRUS Y VIROIDES EN VID A NIVEL MUNDIAL

Michele Digiario

Istituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano (Ba), Italy

Introducción

Han sido identificados alrededor de 70 entre virus, viroides y fitoplasmas en la vid, lo que significa el número más alto en absoluto de entidades infectivas registrado en un mismo cultivo. Los virus ya superan abundantemente cincuenta especies, pero de ellos solo la mitad está implicado en la etiología de enfermedades de importancia económica. Estos son capaces de alterar las normales funciones fisiológicas de la planta interviniendo en los mecanismos que regulan la fotosíntesis, la respiración, las actividades enzimáticas, el balance hormonal, el transporte floemático, el metabolismo de los azúcares y del nitrógeno. De esto deriva uno o más de los siguientes efectos: progresivo decaimiento y muerte de la planta, reducida cantidad y calidad de producción, reducción del ciclo productivo del viñedo, modificación de la composición de los mostos, reducida capacidad rizógena del material de propagación, reducido prendimiento de los injertos y reducción de la resistencia a factores abióticos y bióticos.

Degeneración infecciosa y decaimiento

Ambas enfermedades son causadas por virus de los géneros *Nepovirus* e *Sadwavirus*. El estado degenerativo producido por *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) en las principales áreas vitícolas mundiales y por otros nepovirus europeos en algunas áreas relativamente restringida de Europa central y balcánica, es internacionalmente conocido con el nombre de "*fan-leaf*" (hoja en abanico). Con el nombre de *decline* (decaimiento) en cambio se hace referencia a las análogas enfermedades de la vid provocadas en Norteamérica (USA e Canadá) por nepovirus americanos.

GFLV posee cepas deformantes y cromógenas. Las primeras provocan síntomas caracterizados por malformaciones foliares (senos peciolares y marginales amplios, hojas como perejil, hojas asimétricas, nervaduras principales muy juntas) y de los brotes (entrenudos cortos, crecimiento a zig-zag, nudos dobles, fasciaciones, bifurcaciones) además de varios tipos de alteraciones cromáticas cloróticas (mosaicos, manchas lineales y anulares). Los racimos son a menudo más pequeños y menos numerosos de lo normal, maduran irregularmente y pueden mostrar varios grados de corrimiento. Las pérdidas varían desde 5-10% hasta el 90% o más.

Las cepas cromógenas son responsables de la amarillez infecciosa, enfermedad particularmente evidente en primavera por las vivaces amarilleces de las hojas que la caracterizan.

En lo que se refiere al decaimiento, la sintomatología de campo es parecida a aquella de la degeneración infecciosa, pero puede variar en el tipo y en la variedad de los síntomas según las diferentes virulencias de las cepas virales, las condiciones ambientales, la sensibilidad varietal y otros aspectos biológicos y agronómicos del mismo viñedo.

Como todos los otros virus, los nepovirus se transmiten a larga y media distancia con el material de propagación infectado. Dentro del mismo viñedo la transmisión ocurre a través de nematodos longidoros con un mecanismo de transmisión de tipo semipersistente. La relación virus-nematodo es altamente específica, por lo tanto cada virus puede ser transmitido solo por una o pocas especies de nematodos (véase Tab. 1).

Tab. 1 – *Nepovirus* y *Sadwavirus* (SLRSV) encontrados en la vid y sus vectores

Virus	Vector
A. Degeneraciones infecciosas (<i>Nepovirus</i> euro-asiáticos)	
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Xiphinema index</i>
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	<i>X. diversicaudatum</i>
<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)	<i>Paralongidorus maximus</i>
<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	<i>Longidorus attenuatus</i>
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	<i>X. diversicaudatum</i>
<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV)	desconocido
<i>Artichoke Italian latent virus</i> (AILV)	desconocido
<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> (GBLV)	desconocido
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	desconocido
<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV)	desconocido
<i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV)	desconocido
<i>Grapevine Tunisina ringspot virus</i> (GTRSV)	desconocido



B. Decaimiento (Decline)
(Nepovirus americanos)

Tomato ringspot virus (ToRSV)

- vein yellowing strain
- decline strain

Tobacco ringspot virus (TRSV)

Peach rosette mosaic virus (PRMV)

Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)

X. californicum

X. rivesi, *X. americanum* (*sensu stricto*)

X. americanum (*sensu lato*)

X. americanum (*sensu stricto*), *L. elongates*, *L. diadecturus*

desconocido

Enrollado de la vid

Es sin duda la virosis más difundida en el mundo. En su etiología están implicadas al menos nueve distintas entidades virales filamentosas, de las cuales una pertenece al género *Closterovirus* (GLRaV-2) y las otras en general clasificadas en el género *Ampelovirus* (GLRaVs).

La sintomatología en la vid europea consiste en el enrollamiento hacia abajo de la lámina foliar acompañado de amarillez o enrojecimiento internerval, según se trate de variedades de uva blanca o roja. Este síntoma comienza a aparecer al final del verano y tiende a acentuarse en otoño. Resulta alterado sobretodo el sistema de conducción de la planta y el aparato fotosintético de las hojas. Como resultado las plantas infectadas pueden mostrar una reducción del vigor vegetativo y de la producción (en promedio desde el 10% hasta el 60-70%), formar racimos más chicos que maduran irregularmente y tienen bajo contenido de azúcar y mayor acidez.

El enrollado de la vid se difunde sobretodo con el material de propagación. Sin embargo en la transmisión a breve distancia no es irrelevante el rol en cuatro de sus agentes (GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-5 e GLRaV-9) realizado por cóccidos y pseudocóccidos (véase Tab. 2), en forma aparentemente inespecífica y con modalidad semipersistente. Los portainjertos híbridos americanos, aunque infectados, no muestran síntomas, lo que sin duda ha contribuido a favorecer la propagación de la enfermedad en todo el mundo.

Tab. 2 – Virus asociados al enrollado de la vid y sus vectores

Virus	Especies de cóccidos y pseudocóccidos vectores
GLRaV-1	<i>Helicoccus bohemicus</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i>
GLRaV-3	<i>Planococcus ficus</i> , <i>Pl. citri</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Ps. affinis</i> , <i>Ps. calceolariae</i> , <i>Ps. viburni</i> , <i>Ps. maritimus</i> , <i>Ps. comstocki</i> , <i>Pulvinaria vitis</i>
GLRaV-5	<i>Ps. longispinus</i>
GLRaV-9	<i>Ps. longispinus</i>

Madera rugosa

Es una enfermedad presente en todas las áreas vitícolas del mundo y se manifiesta sobretodo en plantas injertadas. Las plantas enfermas muestran un ligero retardo en la brotación, un generalizado estado de decaimiento, vegetación reducida y menor productividad (desde el 20-30% hasta la total esterilidad). En los casos más graves pueden incluso morir. Los síntomas específicos de la enfermedad se observan en la madera bajo de la corteza al nivel del punto de injerto y consisten en acanaladuras más o menos profundas, a las cuales corresponden protuberancias en la zona del cambio. Estos síntomas pueden comprometer tanto la variedad como el portainjerto, determinando daños que repercuten en la funcionalidad de floema y xilema. La excesiva suberosidad de la corteza y la gran diferencia de diámetro entre portainjerto y variedad a veces favorecen la individuación de las plantas infectadas. Grande son los daños en el material viverístico porque hay reducción de producción de madera, de raíces y de porcentaje de prendimiento de los injertos.

El injerto en tres indicadores leñosos (*V. rupestris*, Kober 5BB e LN 33) permite poder distinguir para esta enfermedad al menos cuatro distintos síndromes: corky bark (CB), *rupestris* stem pitting (RSP), kober stem grooving (KSG) y LN33 stem grooving (LNSG). Para al menos tres de los mencionados síndromes han sido identificados los posibles agentes etiológicos. En particular, los vitivirus GVA y GVB parecerían estar asociados respectivamente a KSG y CB, mientras que GRSPaV a RSP. De otros vitivirus que infectan a la vid (GVC, GVD e GVE) existe solamente la sospecha del posible rol etiológico en la enfermedad, todavía no corroborado por evidencias experimentales.

Para su transmisión en campo al menos dos de los agentes identificados de la madera rugosa (GVA y GVB) utilizan algunas de las mismas especies de cóccidos y pseudocóccidos activos en la transmisión del enrollamiento foliar (véase Tab. 3), lo que explica la frecuente asociación en que las dos enfermedades se encuentran en la naturaleza.

Tab. 3 – Virus asociados a la madera rugosa y sus vectores

Enfermedad	Virus	Especie de cóccidos y pseudocóccidos vectores
KSG	GVA	<i>P. citri</i> , <i>P. ficus</i> , <i>P. longispinus</i> , <i>P. affinis</i> , <i>P. comstocki</i> , <i>N. innumerabilis</i>
CB	GVB	<i>P. ficus</i> , <i>P. longispinus</i> , <i>P. affinis</i>
LNSG	desconocido	desconocido
RSP	GRSPaV	desconocido (polen?)

Fleck

Fleck es una enfermedad latente con distribución mundial que pero se expresa solamente en *V. rupestris* con síntomas foliares como esclarecimientos de las nervaduras de tercero y cuarto orden, bien visible en contra luz y, en las formas graves, con malformaciones de las láminas foliares y una evidente reducción de la vegetación. Su presencia puede reducir la producción de raíces y el prendimiento de injertos en *V. rupestris* y otros de sus híbridos, además del vigor vegetativo de las plantas en el vivero.

El agente de la enfermedad es el virus homónimo *Grapevine fleck* (GFkV), un virus esférico de localización floemática, del genero *Maculavirus*.

La notable difusión de la enfermedad en las zonas vitícolas de todo el mundo se atribuye a la propagación de material infectado, la mayor parte de las veces asintomático. Vectores naturales no han sido identificados, si bien no faltan observaciones que indican la posible difusión natural de la enfermedad.

Incompatibilidad al punto de injerto

En estos últimos años han crecido las indicaciones de graves desordenes que se manifiestan en vides barbadas ya sea en el vivero o en jóvenes viñedos, a pocos años del trasplante. Las jóvenes vides crecen con dificultad, los brotes son cortos, las hojas son pequeñas, enrolladas y con coloración amarilla y rojiza según el color de las bayas. El punto de injerto se engruesa y pueden desarrollarse en el portainjerto lesiones necróticas de diversa extensión. Las plantas enfermas decaen y pueden morir en el lapso de uno o dos años. Casos de este tipo de incompatibilidad han sido detectados en Europa (sobre todo con Kober 5BB), California, Nueva Zelanda, Australia y Chile.

El agente infectivo que más frecuentemente se encuentra en las vides sintomáticas es el *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2), un closterovirus ubicuário, presente en la naturaleza con una multiplicidad de variantes moleculares, que sin embargo parecen ser bastante uniformes serológicamente. GLRaV-2 no tiene vectores conocidos, se transmite con el material de propagación y puede estar presente en forma latente en algunas combinaciones de injerto.

En California ha sido identificada una forma de la enfermedad que se manifiesta con síntomas característicos de lesiones necróticas en el portainjerto. En este caso el posible agente responsable ha sido identificado en una variante molecular de GLRaV-2, que sin embargo no provoca el enrojecimiento típico del enrollado de la vid en los indicadores leñosos, al que ha sido dado el nombre de *Grapevine rootstock stem lesion-associated virus* (GRSLa-V).

No es improbable que otros virus –no aún identificados y/o algunos de los agentes ya conocidos de la madera rugosa- puedan determinar los fenómenos de desafinidad señalados.

Enfermedades virus afines a etiología desconocida

En esta categoría entran numerosas enfermedades cuyos agentes etiológicos son aún en parte o del todo desconocidos. Merecen una particular mención, por los graves daños que causan en Francia, Argentina y Sudáfrica el "Syrah disease", y en Italia aquella del "bushy stunt", sobre todo en combinación de injerto con el 140 Ru.

Otra importante enfermedad de este grupo es aquella de las *enaciones*. Esta se manifiesta con notable discontinuidad, pero cuando aparece puede causar daños bastante importantes a la vegetación, con repercusiones notables (hasta el 30-50%) sobre la producción.

Por su importante difusión en los viñedos de todo el mundo, más que por la entidad de los daños provocado, deben recordarse también la necrosis y el mosaico de las nervaduras. Su detección se realiza por injerto en los indicadores específicos 110 R y *Vitis riparia*. Recientemente la necrosis de las nervaduras ha sido reconocida como una posible manifestación sintomatológica producida por el virus GRSPaV su 110 R.

Enfermedades causadas por viroides

Al contrario de otras especies frutícolas los viroides en la vid no parecen provocar graves alteraciones desde un punto de vista económicos. Son ubicuarias y seguramente muy difundidas. Han sido detectadas al menos cinco distintas especies (véase Tab. 4), de las cuales solamente dos asociadas a claros síntomas estivales de

yellow speckle y vein banding. Las decoloraciones perinervales, en sus manifestaciones más claras, a menudo se deben a la combinación de GYSVd con GFLV.

Tab. 4 – Viroides encontrados en vid

Especie	Genero	Enfermedad
<i>Grapevine yellow speckle viroid- 1</i> (GYSVd-1)	<i>Apscaviroid</i>	yellow speckle
<i>Grapevine yellow speckle viroid- 2</i> (GYSVd-2)	<i>Apscaviroid</i>	yellow speckle
<i>Australian Grapevine viroid</i> (AGVd)	<i>Apscaviroid</i>	latente
<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	<i>Hostuviroid</i>	no señalada
<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	<i>Pospiviroid</i>	no señalada

Diagnóstico

Las virosis de la vid son sobretodo identificables en campo en base a los síntomas inducidos. Sin embargo las infecciones latentes son más bien frecuentes y no son raros los casos en que especies virales diferentes son capaces de causar la misma enfermedad. Las observaciones en terreno son esenciales para el reconocimiento preliminar porque dan útiles informaciones sobre las condiciones sanitaria generales de los viñedos examinados, pero proporcionan pocas certezas sobre la naturaleza y el tipo de los agentes etiológicos involucrados en las enfermedades observadas. Para un diagnóstico más preciso y confiable es necesario por lo tanto recurrir a prueba de laboratorio. Gracias a los progresos realizados en este sector muchos agentes virales de la vid, incluyendo casi todos aquellos responsables de las enfermedades más importantes, pueden hoy ser identificados rápidamente (en 1-3 días) recurriendo a técnicas de diagnóstico serológicas (ELISA) o molecular (hibridación molecular, PCR), para la realización de las cuales es posible fácilmente adquirir en las empresas comerciales todos los reactivos (kits de antisueros, sondas y partidores) necesarios. No obstante esto, las técnicas de diagnóstico biológicos (transmisión mecánica en hospederos herbáceos, indexaje en indicadores leñosos), que han dominado la escena hasta los años 70, conservan todavía su importancia sobretodo para el diagnóstico de aquellas enfermedades de etiología todavía incierta o del todo desconocidas, y además para apoyar el diagnóstico de agentes virales para los cuales las más refinadas técnicas serológicas o moleculares muestran limitaciones de aplicación (por escasa sensibilidad de los reactivos, irregular distribución del virus en la planta, exceso de sustancias inhibidoras, etc.)

Estrategias de control

Como es de amplio conocimiento, el control de las virosis no se puede realizar con los comunes métodos directos de tipo físico o químico, sino que debe ser efectuada exclusivamente con métodos preventivos. Los más importantes son los siguientes:

- uso de variedades y/o portainjertos resistentes o tolerantes a las virosis o a sus vectores. Estas formas de resistencias se pueden encontrar en el ámbito de la misma especie o adquirir en manera no convencional (plantas transgénicas) de otras especies vegetales o no (esta práctica es hoy técnicamente posible, pero encuentra muchos obstáculos de tipo ético y legislativo en muchos países);
- control de los vectores naturales de la enfermedad (encuentra a menudo muchas limitaciones de aplicación, y por eso no es muy eficaz);
- multiplicación y distribución de material de propagación "sano" o "sanitariamente mejorado", procedente de programas de selección clonal y sanitaria y/o de saneamiento (termoterapia, cultivo de meristemas, embriogénesis somática);
- adecuada acción de control en las aduanas para impedir la entrada de virus exóticos (aún no presentes en el país) a través de eficaces acciones de cuarentena.



VIRUS QUE AFECTAN A LA VID EN CHILE

Nicola Fiore

Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

Introducción

Los virus son agentes infecciosos visibles sólo al microscopio electrónico. Están constituidos por una envoltura cuya naturaleza es esencialmente proteica y que contiene un solo tipo de ácido nucleico (RNA o DNA). Son capaces de replicarse solamente en células vivas porque carecen de una estructura celular y de metabolismo propio, por lo que dependen de las células hospederas para su replicación. Ellos llegan a ser parte de un sistema viviente solamente después de que su material genético ha sido introducido al interior de una célula hospedera y empieza a multiplicarse utilizando los mecanismos biológicos de la célula misma.

En específico, el ácido nucleico de los virus que afectan a la vid es RNA a simple hebra y de sentido positivo. Hospedero de 55 virus, la vid se coloca dentro de los cultivos más afectados en el mundo por estos agentes infecciosos, cuya peligrosidad es acentuada por la existencia de modalidades de difusión eficientes que actúan principalmente a través de nematodos e insectos.

La única medida de control posible consiste en obtener y multiplicar plantas libres de virus.

Los resultados de recientes investigaciones conducidas por la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, indican que los principales virus responsables de pérdidas económicas en la vides chilenas son Grapevine fanleaf (GFLV), Grapevine fleck (GFkV), Grapevine virus A (GVA), Grapevine leafroll associated-virus 1, 2 y 3 (GLRaV-1, 2 y 3) y Grapevine rupestris stem pitting associated-virus (GRSPaV). Preocupa también Grapevine virus B (GVB), aunque aparentemente su presencia no es muy frecuente.

Principales virosis

GFLV es el virus de la "hoja en abanico" o "degeneración infecciosa" de la vid. Pertenece al Género *Nepovirus*. Es muy frecuente y universalmente difundido. De este virus se conocen dos cepas: una que produce deformaciones y la otra que induce alteraciones de color en las hojas. En el primer caso es muy común la aparición de deformaciones a cargo de hojas y sarmientos, hay también entrenudos cortos, corredura de racimos y maduración irregular de bayas. La alteración del color consiste principalmente en la aparición en primavera de fuertes amarilleces o mosaicos blandos que reducen notoriamente la actividad fotosintética de la planta.

En ambos casos hay una reducción de la vida útil de las plantas afectadas, del porcentaje de éxito de los injertos y del número de plantas barbadadas obtenidas durante la propagación en viveros.

GLRaVs es un grupo de virus perteneciente a la Familia *Closteroviridae*. Se trata de nueve virus que son serológicamente diferentes entre ellos. Además se ha informado de otros dos en vía de caracterización que podrían pronto sumarse a este largo listado, el cual probablemente no terminará de crecer a futuro. Los síntomas en las hojas consisten en un enrollamiento hacia el envés, con leve amarillez de la lámina foliar en variedades de uva blanca y enrojecimiento en la de uva tinta, en la cual normalmente la modificación del color no incluye a las nervaduras. También hay corredura de racimos, y en las bayas disminución de la cantidad de azúcares y aumento de acidez total. Siempre en variedades tintas se puede observar parcial o total falta de coloración de las bayas acercándose el periodo de cosecha.

De los casi once "leafroll" los más frecuentes resultan ser los primeros tres, denominados GLRaV-1, 2 y 3.

El Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV) es una variante del GLRaV-2. Ambos han sido relacionados con casos de incompatibilidad en plantas injertadas.

El "complejo de la madera rugosa" es una enfermedad grave compuesta por cuatro diferentes síndromes, Rupestris stem pitting, Corky bark, Kober stem grooving y LN33 stem grooving, que pueden ser identificados a través de ensayos biológicos en plantas indicadoras del género *Vitis*.

Los efectos negativos del complejo de la madera rugosa consisten en la pérdida de vigor de las plantas, atraso en la brotación, formación de engrosamientos en el punto de injerto, acanaladuras en la madera tanto del portainjerto como de la variedad. En varios casos la enfermedad puede ser latente (presencia de infección sin aparición de síntomas), con sensible reducción de las pérdidas.

Cuatro *Vitivirus* (GVA, GVB, GVC y GVD) y un *Foveavirus* (GRSPaV) han sido asociados a las vides afectadas por el complejo de la madera rugosa. Para Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB) y Grapevine rupestris stem pitting (GRSPaV) ha sido comprobado su rol como agente etiológico de tres

síndromes del complejo respectivamente: Kober stem grooving, Corky bark y Rupestris stem pitting.

GfKv o marbruna es latente en *Vitis vinifera* y en muchos híbridos americanos manifestándose solo en *V. rupestris* St. George, con decoloración de las nervaduras secundarias, deformaciones de las hojas y reducción del crecimiento. Las alteraciones cromáticas son más evidentes en primavera.

Ha sido evidenciada la transmisión natural en campo, pero sin poder individualizar el vector responsable. Es difícil poder estimar los daños producidos por esta virosis como consecuencia de su estado de latencia. Sin embargo, ha sido comprobado que reduce el porcentaje de éxito de los injertos, reduce la capacidad de producir raíces en *V. rupestris* y reduce el vigor de algunos portainjertos.

Tanto el fleck como los GLRaVs y los virus del "complejo de la madera rugosa" poseen un hábitat exclusivamente floemático.

Situación en Chile

Desde el 2002 al 2004 se realizó una prospección en viñedos y parronales ubicados en las regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana para la identificación de plantas con síntomas atribuibles a la presencia de virus y/o fitoplasmas. Se recolectaron 1500 muestras con o sin síntomas que fueron analizadas mediante las técnicas de ELISA y/o amplificación por PCR de secuencias de cDNA viral (RT-PCR) para la detección de los virus GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GfKv, GVA, GVB, GRSPaV, Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV), Tomato ringspot (ToSRV), Arabis mosaic (ArMV) y Strawberry latent ringspot (SLRV).

Los resultados de la investigación revelaron que el 29,5 de las muestras analizadas con ELISA estaban infectadas por al menos uno de los virus antes mencionados. En particular se detectó la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA y ArMV, informando además por primera vez en Chile la presencia de GfKv, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus detectados con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y GfKv. Cercano a cero el porcentaje de plantas infectadas por ArMV, mientras nunca ha sido detectada la presencia de SLRV y ToRSV.

Control

El uso de material de multiplicación sano es el primer paso a cumplir para poder evitar problemas en viñas y parronales en producción. La prevención se apoya fundamentalmente en las técnicas de detección, cuya optimización consiste en elevar sensibilidad y especificidad, reduciendo costos y tiempos de respuesta.

Es muy importante también realizar un control constante de los vectores naturales tales como nematodos, chanchitos blancos y conchuelas. Al mismo tiempo es necesario eliminar posibles fuentes de inóculo presente en el huerto o en su cercanía, tal como plantas en producción que manifiestan síntomas y hospederos secundarios de estos patógenos.

Otra opción consiste en evaluar la posibilidad de utilizar plantas resistentes y saneadas. Estas últimas obtenidas utilizando la técnica de termoterapia.

Bibliografía

- FIORE, N. Y MONTEALEGRE, J. (2003) Decaimiento de vides: un mal sin nombre. Revista del Campo-El Mercurio 1406, A14-A15.
- MARTELLI, G.P. (1999). Infectious diseases and certification of grapevines. In *Options Méditerranéennes*, Sér. B/n°29 –Proceedings of the Mediterranean Network on Grapevine Closteroviruses 1992-1997-. Martelli G.P. and Digiario M. (eds) pp.47-64.
- MARTELLI, G.P. (2003). Grapevine virology highlights. 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus ad Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Locorotondo (Bari), Italia, 12 a 17 de septiembre 2003. Extended Abstracts, 3-10.
- PRODAN, S., MONTEALEGRE, J. y FIORE, N. (2003). Aetiology of decline in Thompson Sedles grafted table grape plants. 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus ad Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Locorotondo (Bari), Italia, 12 a 17 de septiembre 2003. Extended Abstracts, 142-143.
- PRODAN, S., MONTEALEGRE, J. ABALLAY, E., PINO, A. FERNÁNDEZ, P., REYES, R. y FIORE, N. (2003). Report of new viral diseases in chilean grapevines. 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus ad Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Locorotondo (Bari), Italia, 12 a 17 de septiembre 2003. Extended Abstracts, 145.

IMPACTOS DE LOS FITOPLASMAS EN VID A NIVEL MUNDIAL

Assunta Bertaccini

DiSTA. Patologia vegetale - Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Desde hace más de cincuenta años se conocen y estudian enfermedades infecciosas de la vid conocidas con el nombre de amarilleces, sin embargo es solo en los últimos veinte años que estas enfermedades se han difundido de manera importante, como por otra parte se ha difundido también la viticultura a nivel mundial. Las amarilleces de la vid y su forma más conocida -denominada flavescencia dorada- son enfermedades asociadas a la presencia de fitoplasmas. Estos últimos son microorganismos unicelulares que viven y se multiplican en el floema de las plantas infectadas y en la hemolinfa de sus insectos vectores. Las enfermedades asociadas a la presencia de fitoplasmas pueden ser tan devastadoras hasta llegar a ser responsables, en algunos casos, de la pérdida completa de la producción vitícola en las regiones en las que son endémicas o en las que son introducidas. En todo caso generalmente provocan una reducción de vigor y fruta de escasa calidad. La incapacidad de cultivar estos patógenos en sustratos artificiales ha frenado mucho los progresos en el estudio de sus características biológicas y de los procesos patogenéticos, pero con el uso de técnicas moleculares de diagnóstico ahora existe la posibilidad de conocer y controlar estas enfermedades. En vid los síntomas más frecuentes y típicos asociados a la presencia de fitoplasmas son parecidos en todas las áreas de cultivo y para todas las variedades: clorosis de las nervaduras, decoloraciones generalizadas o sectoriales de las hojas que se ponen amarillo-doradas en los cultivos de baya blanca y rojo vivo en las de baya roja, enrollamiento hacia el envés de la lámina foliar, lignificación irregular de los sarmientos, abortos florales y deshidratación de las bayas.

Los fitoplasmas que provocan amarilleces en la vid individualizados hasta hoy pertenecen a siete diferentes grupos ribosomales, los dos más difundidos en el hemisferio boreal son aquellos asociados a las dos enfermedades denominadas flavescencia dorada (FD) y madera negra (BN). El fitoplasma asociado a flavescencia dorada es un organismo de cuarentena en el ámbito de la Comunidad Europea y se difundió en Europa pese a las reglamentaciones de control, erradicación y protección de los campos de plantas madres en vigor en Francia desde 1987 y en Italia y España desde el 2000. Los fitoplasmas asociados a FD están representados por dos isoformas molecularmente distinguibles en base al gen que codifica por la subunidad 16 del RNA ribosomal (16S rRNA) que han sido colocadas en los subgrupos ribosomales 16SrV-C y 16SrV-D respectivamente. De estas dos isoformas una resulta genéticamente estable, mientras la otra (FD-C) se muestra más variable. El vector de esta fitoplasmosis es el cicadelido *Scaphoideus titanus* (Ball), insecto monófago que vive exclusivamente en plantas de vid, en donde efectúa una sola generación al año; inverna como huevo dentro del ritidoma de los sarmientos de dos o más años.

La madera negra, conocida también con el nombre francés de "Bois Noir" (BN), es la amarillez de la vid asociada a fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrXII-A (stolbur) presente en toda Europa, en Asia Menor y también en América del Sur. El vector de la enfermedad conocido en Europa es *Hyalesthes obsoletus* Signoret, un insecto homóptero auquenorrinco perteneciente a la familia de los Cixidos, difundido en todo el continente Europeo y en toda la cuenca del Mediterráneo.

En Italia, Israel y Virginia (USA) han sido además detectados en vid fitoplasmas del grupo 16SrIII, el subgrupo fue determinado sólo en Virginia y resultó ser 16SrIII-J, hasta ahora señalado solo en vid. En algunas áreas vitícolas italianas han sido detectados fitoplasmas del grupo de la amarillez del olmo (16SrV-A), los fitoplasmas de este subgrupo no pueden ser considerados FD, ya que presentan vectores distintos de esta última, como sucede en algunas regiones de Alemania en que está presente en vid un fitoplasma 16SrV-C cuyo vector es *Oncopsis alni* y no *S. titanus*, no encontrado en estas zonas.

En algunos viñedos europeos (Hungria y Serbia) han sido individualizados además fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosómico 16SrX-B -típicamente asociados en general a fitoplasmosis de los frutales- a veces en infecciones mixtas con BN o FD. También los fitoplasmas del grupo aster yellows (16Srl) han sido detectados en vid tanto en Europa como en América del Norte y del Sur: los subgrupos identificados fueron 16Srl-A, 16Srl-B y 16Srl-C; sin embargo sería interesante subrayar que, al menos en Italia, en algunos casos estos fitoplasmas han sido detectados en vides asintomáticas.

En lo que se refiere al Hemisferio austral las investigaciones son menos numerosas. En los viñedos australianos se identificaron en algunas áreas fitoplasmas genéticamente afines a los de BN ya que pertenecen al grupo ribosomal 16SrXII-B. Los daños más relevantes sin embargo se asociaron a la presencia de fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrlI-A típicamente muy difundido también en otros cultivos no solo en el área australiana-neozelandesa, sino también en las limítrofes regiones asiáticas.

Un caso interesante y particular es el chileno, en donde junto con fitoplasmas individuados en otras áreas vitícolas mundiales, han sido típicamente detectados fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrVII-A (ash yellows) y también algunas variantes de BN y de 16Srl-B.

Es necesario especificar que fuera de Europa los fitoplasmas más difundidos son distintos de BN y FD, aunque el impacto en los cuarteles afectados no es menos grave ya que a menudo los síntomas asociados a estos patógenos infectivos se confunden con problemas fisiológicos o de manejo agronómico. Por lo tanto las plantas infectadas no se eliminan en forma inmediata y representan una peligrosa fuente de inóculo especialmente en consideración a la presencia de vectores.

Las fitoplasmosis, como todas las enfermedades infectivas sistémicas pueden ser transmitidas también a través del material de propagación. Esta transmisibilidad al puede ser limitada si se toman adecuadas precauciones como por ejemplo evitar la utilización de material sintomático o proveniente de zonas infectadas y evitar la infestación de *S. titanus* que, poniendo los huevos bajo la madera, podría ser transportado en áreas en las que no está presente. Poco o nada se sabe sobre el denominado período de latencia, es decir el período que va desde la implantación a la manifestación de los síntomas. En espera de ulteriores informaciones sobre este importante problema, para reducir los riesgos relativos a la difusión epidémica de fitoplasmosis en nuevas áreas vitícolas es necesario por lo tanto intervenir en dos niveles: controlar el territorio para asegurarse de la ausencia de vectores (cuando y si conocidos) y verificar la ausencia de los síntomas típicos en el material destinado a la multiplicación, utilizando la detección molecular en apoyo al análisis visual.

Fitoplasmas detectados en vid en el mundo

Estado	Denominación enfermedad	Grupo, subgrupo ribosomal
Australia	Amarillez	16SrII, 16SrXII-B
Chile	Amarillez	16SrI-C, 16SrXII-A, 16SrVII-A, 16SrI-B
Croacia	Madera negra	16SrXII-A
Francia	Flavescencia dorada Madera negra	16SrV-C y 16SrV-D 16SrXII-A
Alemania	Amarillez Vergilbungskrankheit	16SrV-C 16SrXII-A
Israel y Medio oriente	Madera negra Amarillez	16SrXII-A 16SrIII
Italia	Flavescencia dorada Madera negra Amarillez	16SrV-C y 16SrV-D 16SrXII-A 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII, 16SrV-A, 16SrX
Portugal	Madera negra Flavescencia dorada(*)	16SrXII-A 16SrV-D
Serbia & Montenegro	Madera negra Flavescencia dorada Amarillez	16SrXII-A 16SrV-C 16SrX-B
Eslovenia	Madera negra Amarillez	16SrXII-A 16SrI
España	Flavescencia dorada Madera negra	16SrV-D 16SrXII-A
Hungría	Madera negra Amarillez	16SrXII-A 16SrXII-B
USA, Virginia	Amarillez	16SrI-A, 16SrIII



FITOPLASMAS QUE AFECTAN A LA VID EN CHILE

Ángela Gajardo Serra

Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

La vid (*Vitis vinifera* L.) es susceptible a la infección por diversos microorganismos fitopatógenos entre los que destacan los virus, viroides y fitoplasmas, asociados a variadas enfermedades que disminuyen la calidad y producción de sus cosechas. Los fitoplasmas son organismos procariontes sin pared celular pertenecientes a la clase *Mollicutes*, conocidos anteriormente como "Mycoplasma-like organisms" (MLOs), que se encuentran en el floema de las plantas infectadas, utilizando los elementos nutritivos de la savia e interfiriendo con el transporte normal de los productos fotosintéticos.

Las enfermedades producidas por fitoplasmas en vides son conocidas en forma genérica como Amarilleces de la vid ("Grapevine yellows"), afectando a todas sus variedades silvestres y cultivadas. Están distribuidas en grandes zonas de Europa, América del Norte, Asia Menor y Australia, y recientemente se ha confirmado su presencia en Chile. La infección está asociada al desarrollo de una serie de síntomas característicos, entre los cuales destaca la decoloración de hojas. Las manchas que se originan son de tipo difuso o angular de color amarillo en las variedades blancas y rojizo en las negras. Además las hojas se enrollan y endurecen, hay lignificación irregular de los sarmientos y en su totalidad las plantas afectadas presentan decaimiento, que se expresa como alteraciones del crecimiento y falta de vigor. En algunos casos se llega a la muerte de las plantas. En las bayas aumenta el contenido ácido y disminuye la concentración de azúcares, con bajas en la calidad de los vinos elaborados utilizando estas uvas¹.

Los síntomas asociados a la presencia de fitoplasmas varían en intensidad y distribución, dependiendo de la variedad de las vides, del tipo de microorganismo presente, de las condiciones ambientales y del manejo agronómico de las plantaciones. No es posible relacionar la sintomatología de las plantas infectadas con la identidad de los fitoplasmas presentes en ellas.

Los estudios realizados a la fecha han permitido establecer que los amarilleces de la vid observados en las viñas y parronales de la zona central de Chile están asociados a la presencia de fitoplasmas de diferente tipo, identificándose aislados pertenecientes a los subgrupos 16SrI-B (Aster yellows), 16SrI-C (Clover phyllody), 16SrVII-A (Ash yellows) y 16SrXII-A (Stolbur)². Se ha detectado la presencia de infecciones únicas o mixtas de fitoplasmas en un 40% de las muestras analizadas durante los años 2002-2004, indicación de la gravedad del problema en Chile.

Los fitoplasmas pertenecientes a los Aster yellows están ampliamente distribuidos en el mundo, y han sido detectados en gran número de especies vegetales. En vides producen amarilleces leves que disminuyen la productividad y la calidad de las bayas pero que no comprometen mayormente la vitalidad de las vides. Sin embargo, al asociarse con hongos y/o virus fitopatógenos pueden actuar en forma sinérgica, agravando los síntomas y produciendo la muerte de las plantas infectadas.

Hasta la realización de nuestro estudio se desconocía la existencia del grupo Ash yellows en vides, por lo cual no existe información previa sobre las consecuencias de la infección en este hospedero. Estos fitoplasmas fueron descritos por primera vez en América del Norte como agentes causales de enfermedades en diversas especies de los géneros *Fraxinus* y *Syringa*, produciendo amarilleces de hojas, proliferación de brotes basales, pérdida de la dominancia apical, disminución del crecimiento y declinación. En Sudamérica han sido encontrados en Brasil asociados a plantas enfermas de *Erigeron* sp. y *Catharanthus roseus* con síntomas de escoba de bruja y clorosis foliar y recientemente en Colombia en árboles de fresno. Cabe destacar que estos fitoplasmas están presentes también en cultivos europeos de *Hypericum perforatum*, especie de la cual existen extensas plantaciones en el sur de Chile.

Los fitoplasmas del grupo Stolbur han sido encontrados en todos los países vitícolas del mundo, asociados a la grave enfermedad Bois Noir, de carácter epidémico en varios países de Europa. Durante los análisis en vides chilenas se encontraron tanto fitoplasmas referibles al subgrupo 16SrXII-A como otros aislados cuyos patrones de restricción y secuencias nucleotídicas difieren de los fitoplasmas identificados a la fecha.

La información disponible parece sugerir que en vides chilenas existen fitoplasmas que provienen de la introducción de material vegetal infectado que ha sido propagado en nuestro país, pero que también existen cepas endémicas que pueden estar siendo transmitidas por insectos vectores, provenientes de plantas herbáceas infectadas que actúan como reservorio de estos patógenos. Se hace urgente la necesidad de realizar estudios más acabados sobre el tema con el fin de establecer claramente la etiología y epidemiología



de las amarilleces, identificando las cepas de fitoplasmas importantes desde el punto de vista patológico para tomar las medidas de prevención necesaria y evitar la difusión de estos microorganismos en nuestro país.

Bibliografía:

1. Bertaccini, A. 2002. Grapevine phytoplasmas: molecular epidemiology and posible control. *Bulletin O.I.V.* 75:438-469.
2. Gajardo, A.; Botti, S.; Montealegre, J.; Fiore, N. y Bertaccini, A. 2003. Survey on phytoplasmas identified in chilean grapevines. 14th Meeting of the International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), 12-17 de Septiembre de 2003, Locorotondo (BA), Italia.
3. Griffiths, H.M., Sinclair, W.A., Smart, C.D. y Davis, R.E. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: 'Candidatus *phytoplasma fraxini*'. *Int. J. Bacteriol.* 49:1605-1614.
4. Barros, T.S.L., Davis, R.E., Resende, O.R. y Dally, E.L. 2002. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents a new subgroup VI-B in 16SrRNA group VII, the Ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86:1142-1148.
5. Salcedo, E., Cruz, M., Gutierrez, C., Filgueira, J.J. y Franco, L. 2004. Detection and molecular characterization of Ash yellows phytoplasmas in Fraxinus trees in Bogota, Colombia, Genbank Accesion n° AY687786.
6. Paltrinier, S., Tasso, L., Bellardi, M.G. y Bertaccini, A. 2002. Identificazione molecolare di fitoplasmi associati a nanismo e scopazzi in iperico. *Petria* 12:395-396.

CERTIFICACIÓN DE PLANTAS FRUTALES

Manuel Toro Ugalde

Encargado Nacional Certificación de Plantas Frutales
División Semillas, Servicio Agrícola y Ganadero

El éxito de una empresa de producción de frutas depende, en gran medida, de la calidad de las plantas con que se establece un huerto. Dentro de los factores productivos que afectan a la calidad de la fruta se encuentran los diferentes patógenos que las afectan. Uno de los problemas fitopatológicos de mayor incidencia mundial, y que afecta al desarrollo de las plantas y la calidad de la producción son las enfermedades causadas por virus. En el cultivo de la vid, a nivel mundial se han identificado 55 virus diferentes, sin considerar los agentes infecciosos afines a virus tales como viroides y fitoplasmas. Por las razones antes expuestas es que plantas enfermas y que no correspondan a la variedad planificada, serán factores determinantes en el éxito comercial de la empresa.

La certificación de plantas frutales ha sido la respuesta a una necesidad cada vez más creciente de contar, por un lado, con un producto de calidad comprobada y por el otro con sistemas productivos de plantas de vivero que respondan a las necesidades de seguridad fitosanitaria frente a problemas presentes como el PPV, y potenciales como la Tristeza de los cítricos, entre muchos otros.

En la actualidad, y desde hace varias décadas en el mundo se cuenta con Programas de Certificación en diversas especies, los cuales han tenido en la mayoría de los casos un éxito comprobado.

Chile se encuentra en una situación privilegiada desde el punto de vista geográfico para el ingreso de plagas exóticas, sin embargo estas barreras no han sido suficientes, produciéndose el establecimiento de plagas tan graves como el PPV. La evolución de los medios de transporte ha facilitado el traslado de las personas a cualquier rincón del planeta y si consideramos que el hombre es el principal vector de plagas agrícolas, las barreras naturales y los servicios de protección agrícola ya no son suficientes. Es claro que no existen sistemas infalibles y por lo demás los mismos se apoyan en un componente de confianza en las personas, el cual muchas veces no es respetado.

Los Programas de Certificación son la respuesta a muchos de los problemas antes mencionados y su generalización será la respuesta del país al control de plagas de importancia económica que afectan el establecimiento y posterior éxito de los huertos. Un programa de certificación garantiza la calidad fitosanitaria de las plantas certificadas hasta el momento de su venta, ya que una vez en el huerto comercial se verán expuestas a las condiciones donde se desarrollan aquellas plagas de las que fueron halladas sanas. En nuestro país, la mayoría del material de propagación disponible para la venta, tanto para uva de mesa como vides para vinificación, corresponde a material calificado como corriente. Esto significa que los diferentes viveros sólo pueden acreditar que el material es obtenido de plantas madres vigorosas y aparentemente libres de enfermedades sobre la base de una inspección visual.

EL SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO Y LA CERTIFICACION

El SAG, según lo estipula la Ley de Semillas N° 1.764 del año 1977, es el encargado de dictar las normas generales y específicas por las que se regirá el proceso de certificación de semillas y plantas frutales.

El Decreto Supremo N° 195 del 2 de julio de 1979, que reglamenta la Ley de Semillas, señala que **la certificación será realizada por el Servicio Agrícola y Ganadero** de acuerdo con las normas de este reglamento y con las normas generales o específicas que, para cada especie o cultivar dispone el mismo servicio, asesorado por el Comité Técnico Normativo.

La **resolución N° 2086 del 01 de agosto de 2003** establece las Normas Específicas de Certificación de Material de Propagación de *Vitis* spp.

NORMAS DE CERTIFICACION DE PLANTAS FRUTALES

La certificación de plantas frutales persigue tres objetivos claros:

- 1° Garantizar la obtención de una planta terminada libre de las plagas establecidas en cada normativa.
- 2° Garantizar la genuinidad varietal
- 3° Mantener la trazabilidad a lo largo de la cadena productiva

Los factores de manejo productivo que establece cada normativa, están compuestos por las medidas de aislamiento, manejo de las plantas, técnicas de diagnóstico, tolerancias, frecuencias de análisis, intensidades de análisis y la genuinidad varietal, entre otros.

Etapas de la certificación

El proceso de certificación está constituido por etapas productivas, las cuales tendrán en general características similares para todas las especies, estableciéndose diferencias específicas desde el punto de vista de aislamiento, frecuencia e intensidad de análisis y forma de propagación e incrementación del material certificado según la especie.

Bloques Productivos

Banco de Germoplasma: Corresponde a material vegetal, principalmente de reserva, del cual se extraerá en forma esporádica material para la formación de otros bloques productivos. Este material vegetal de reserva está constituido por plantas madres en un bajo número.

Bloque Fundación: Este bloque productivo se forma a partir de material vegetal proveniente del Banco de Germoplasma, y está constituido por plantas madres mantenidas en condiciones de aislamiento, cuyo objetivo es ser fuente de material de propagación y para realizar las pruebas de comprobación varietal. Este bloque es 100% testado.

Bloque Incremento: Se forma a partir de material vegetal proveniente del Bloque Fundación y está constituido por plantas madres mantenidas en condiciones de aislamiento (Invernadero o campo), testado parcialmente, según la frecuencia de análisis determinada para las plagas consideradas en la normativa específica.

Bloque Certificado: Se forma a partir del Bloque anterior y está constituido por la planta certificada final, que corresponde a la planta que se entrega al productor. Este Bloque también se mantiene en condiciones de aislamiento (Invernadero o campo).

La certificación de plantas frutales en Chile

La certificación es un sistema voluntario de participación supervisado por el organismo oficial, y requiere del apoyo y trabajo comprometido de instituciones como las Universidades, Institutos de Investigación, asociaciones de viveristas, etc., y por supuesto de los productores nacionales a través de su toma de conciencia de la importancia que tiene el establecimiento de huertos comerciales con plantas sanas y varietalmente genuinas.

Los programas que en la actualidad se encuentran en pleno desarrollo son los de producción de plantas de carozos, cítricos y frutillas, iniciándose durante el año 2004 el proceso de diagnóstico sanitario de plantas de vides.

El **SAG** tiene como objetivo que las normativas de certificación actual y las que están en período de actualización, no sean un documento rígido desde el punto de vista de su contenido, es decir, que año a año se realizarán reuniones del Comité Normativo, con el objetivo de discutir el desarrollo de la certificación, la actualización de las exigencias, el mejoramiento y el perfeccionamiento general de la normativa. Es importante destacar, que esta orientación dinámica del **Servicio** no va en desmedro del cumplimiento estricto de los requerimientos específicos, sino en apoyo de una función más efectiva.

NORMA DE CERTIFICACION DE MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE VIDES

La resolución que establece la Certificación de Material de Propagación de *Vitis* spp. se dictó el 01 de agosto de 2003 y en ella participaron los distintos entes involucrados en esta área como los Departamentos de Protección Agrícola y el de Laboratorios del SAG, la Asociación Gremial de Viveros Frutales, la Universidad de Chile, la Universidad de Talca y viveristas.

La normativa establece una serie de requisitos como aislaciones, plazos de utilización de los materiales, plagas, frecuencia e intensidad de muestreo y técnicas de diagnóstico, entre otros, los que son presentados en los siguientes cuadros:

Cuadro 1. Condiciones de aislamiento y plazo de utilización para las distintas etapas

Etapas	Condiciones de Aislamiento	Período de utilización
Banco de Germoplasma	En Invernadero a prueba de insectos, doble puerta, sistema de desinfección en la entrada. Cada planta deberá estar en un contenedor con sustrato inerte o desinfectado, este contenedor no deberá estar en contacto directo con el suelo	25 años
Bloque Fundación	En campo: 30 m de cualquier plantación comercial o vivero corriente de <i>Vitis</i> spp	15 años
Bloque Comprobación varietal	Sin aislación	
Bloque Pre-Incremento	En Invernadero: Idem Banco de Germoplasma o En campo: 20 m de cualquier plantación comercial o vivero corriente de <i>Vitis</i> spp	10 años
Bloque Incremento	En Invernadero: Idem Banco de Germoplasma o En campo: 20 m de cualquier plantación comercial o vivero corriente de <i>Vitis</i> spp	10 años
Bloque Certificado (porta-injertos y variedades)	En Invernadero: Idem Banco de Germoplasma o En campo: 20 mt de cualquier plantación comercial o vivero corriente de <i>Vitis</i> spp	1 año desde la injertación o plantación

Cuadro 2. Plagas de control permanente en el Programa de Certificación y su Técnica de Detección

ENFERMEDAD	Técnica de Diagnóstico
Degeneración Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) Arabis Mosaic Virus (ArMV) Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRSV)	ELISA/ RT-PCR / Indexaje ELISA/ RT-PCR / Indexaje ELISA / RT - PCR
Declinación Tomato Ringspot Virus (ToRSV) Tobacco Ringspot Virus (TRSV)	ELISA/ RT-PCR / Indexaje ELISA/ RT-PCR / Indexaje
Complejo de Leafroll GLRaV 1 a 7	ELISA/ RT-PCR / Indexaje
Complejo Rugoso de la Madera LN33 Stem Grooving Rupestris Stem Pitting (RSPaV) Kober Stem Grooving (GVA) Corky Bark (GVB)	Indexaje RT-PCR - Indexaje ELISA/ RT-PCR / Indexaje ELISA/ RT-PCR / Indexaje
Fleck	ELISA/ RT-PCR / Indexaje
Enfermedades causadas por fitoplasmas	PCR / Indexaje
Grapevine rootstock stem lesion associated virus (GRSLaV)	PCR

Cuadro 3. Intensidad, frecuencia y técnica de análisis de plantas madres

Etapas de Certificación	Nº de plantas a muestrear	Técnica de Diagnóstico	Frecuencia	Re-muestreo
Banco Germoplasma	1/1	ELISA / RT-PCR y Transmisión a hospederos herbáceos	1 año	no
		Indexaje	5 años	
Bloque Fundación *	1/1	ELISA / RT-PCR y Transmisión a hospederos herbáceos	1 año	no
		Indexaje	5 años	
Bloque Pre-incremento	1/5	ELISA / RT-PCR y Transmisión a hospederos herbáceos	1 año	1/2
Bloque Incremento	1/50	ELISA / RT-PCR y Transmisión a hospederos herbáceos	1 año	1/10
Bloque Certificado	1/5000	ELISA	1 año	

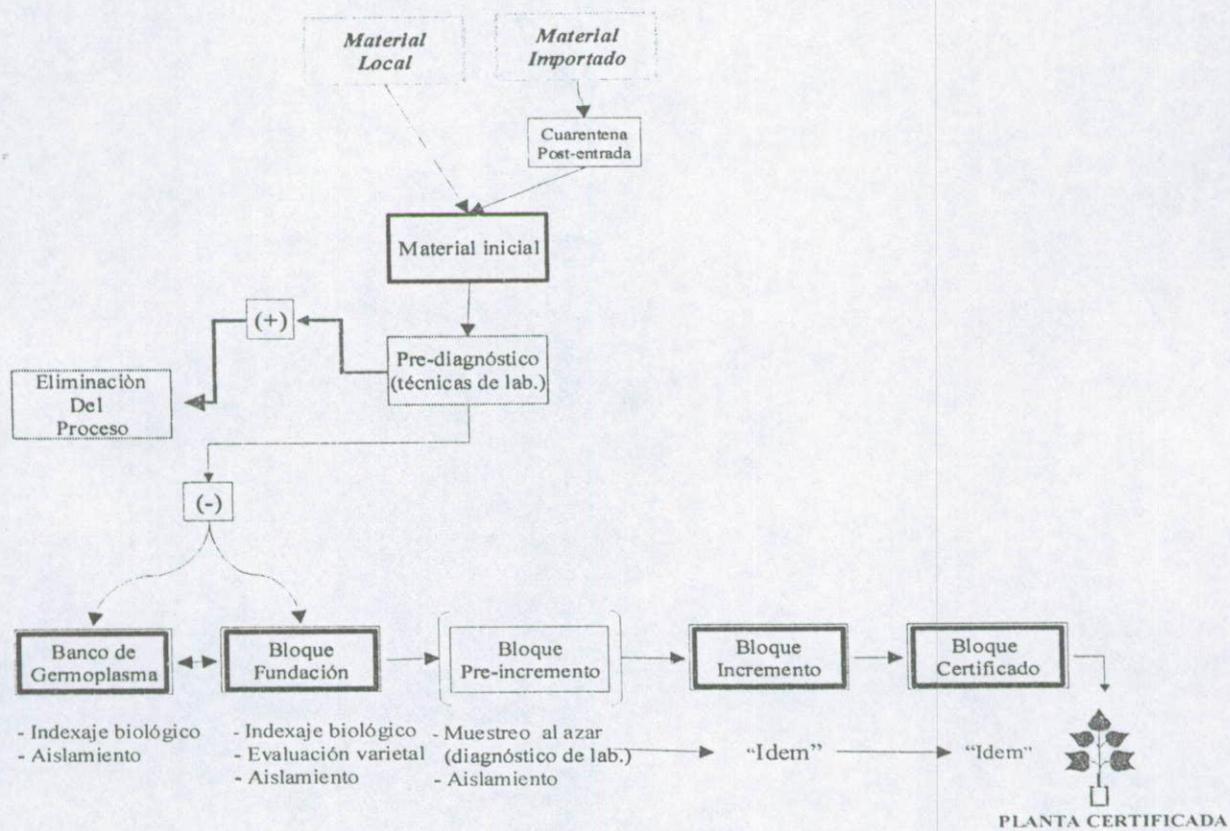
* CUANDO CORRESPONDA

Cuadro 4. Indicadores para detección de virus y fitoplasmas en vides

Indicadores	Virus o Enfermedad a identificar
Cabernet Franc	Leaf Roll
<i>Vitis rupestris</i> St George	GFLV, Fleck, RSPaV, Corky Bark
Kober 5bb	Kober Stem Grooving, ToRSV
LN33	LN33 Stem Grooving, Corky Bark
Siegfriedrebe	ArMV
Chardonnay	Fitoplasmas, TRSV

En la siguiente figura se presenta el esquema de la certificación de material de propagación de vides, en ella se observan las distintas etapas de multiplicación y los análisis sanitarios que se deben realizar.

Figura 1. Esquema de la certificación de plantas de vides



La certificación de material de propagación de vides en Chile

El programa de certificación de material de propagación de vides se inició formalmente después de dictada la resolución con la presentación de 13 clones de Carmenere por la Fundación Agro UC, posteriormente se presentaron 5 variedades de vides viníferas (Cabernet sauvignon, Chardonnay, Cabernet franc, Syrah y Merlot) y 4 variedades de uva de mesa (Autumn royal, Crimson , Flame y Thompson). En la actualidad todos estos materiales se encuentran en período de análisis fitosanitario, el cual se realizó en una primera etapa por ELISA y ahora por técnicas más sensibles como RT-PCR e indexaje según lo establecido por la normativa vigente. De resultar negativos todos estos análisis se procederá a formar parte del Banco Germoplasma del primer Programa de Certificación de Plantas de Vides.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. 1980. Reglamento de la Ley de Semillas. Decreto N° 195. Junio 26 de 1980. 34 p.

Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. 1982. Normas Generales de Certificación para Semillas y Plantas Frutales. 12 p.

Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. 1982. Normas Específicas de Certificación para Semillas y Plantas Frutales de Carozos y Pomáceas. 10 p.

Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. 1997. Normas Específicas de Certificación de Material Vegetal de Propagación de Cítricos. 16 p.

Jadue, Y. 2000. "La Certificación y Mejoramiento de la Vid en Chile". En "Viticultura Chilena, Perspectiva Económicas y Material de Propagación". Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestales, Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile.

Narea, C. 1996. Certificación de Plantas Frutales Libres de Virus, Normas y Requisitos para su Producción. Avances en Sanidad Vegetal de Frutales y Vides. pp 95-99.

Dias de Campo

LUGAR

Sala de Video Conferencia en la
BIBLIOTECA RUY BARBOSA
Facultad de Ciencias Agronómicas
Universidad de Chile. Campus Antumapu.
Santa Rosa 11315, Paradero 32, La Pintana.

VALOR INSCRIPCIÓN

Sin costo
Cupos limitados.

INSCRIPCIONES E INFORMACIÓN

Consultas a: Sra. Ana María Pino
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de Chile
Santa Rosa 11315 – Casilla 1004, Santiago
Fono-Fax: 6785916
E-mail: ampel@123click.cl

PARTICIPANTES

Ing. Agr. M.Sc. Erwin Aballay
Ing. Agr. Nicola Fiore
Ing. Agr. Jaime R. Montealegre

COORDINADORES

Jaime R. Montealegre
Nicola Fiore

**FINANCIADO POR FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA)
PROYECTO CÓDIGO BIOT-01-A-013**

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



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



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

DIA DE CAMPO

**"VIRUS Y FITOPLASMAS EN VID:
OBSERVACIONES DE SÍNTOMAS
Y LOGROS OBTENIDOS A LA
FECHA EN EL MARCO DEL
PROYECTO
BIOT-01-A-013"**

27 de enero de 2004

SANTIAGO, CHILE – 2004

PROGRAMA

9:30-9:45	Bienvenida e introducción. Avances del Proyecto: "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid". <i>Jaime Montealegre</i>	11:00 - 12:30	Observación de plantas de vid con síntomas producidos por virus y fitoplasmas. Visita a los laboratorios de Nematología, Certificación Frutal y observación de la realización del diagnóstico para virus, fitoplasmas y nematodos. <i>Jaime Montealegre Nicola Fiore Erwin Aballay</i>
9:45-10:30	Sintomatología producida por virus y fitoplasmas en vides chilenas. <i>Nicola Fiore</i>		
10:30 - 11:00	Café	13:00 - 14:00	Invitación a un almuerzo en el casino de la Facultad.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONOMICAS



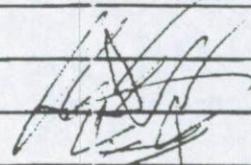
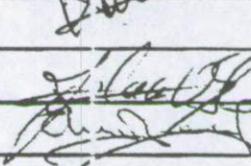
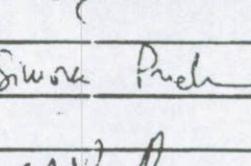
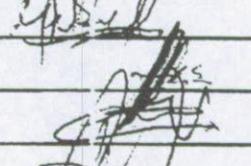
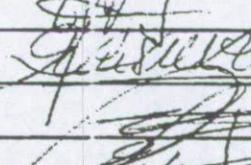
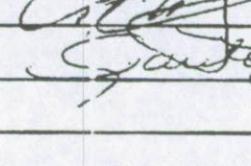
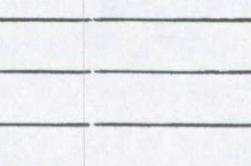
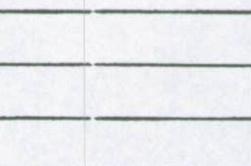
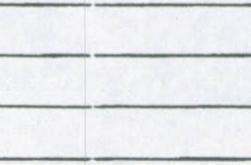
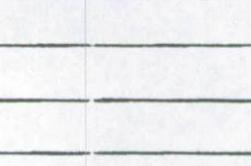
GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA

MARIO SILVA G., Decano de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, tiene el agrado de invitar a usted a participar en el Día de Campo "VIRUS Y FITOPLASMAS EN VID: OBSERVACIONES DE SÍNTOMAS Y LOGROS OBTENIDOS A LA FECHA EN EL MARCO DEL PROYECTO BIOT-01-A-013 (Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid)", financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), que se realizará el 27 de enero de 2004, a las 9:30 horas, en la Sala de Video Conferencia en la Biblioteca Ruy Barbosa de la Facultad de Ciencias Agronómicas, ubicada en Avenida Santa Rosa 11315, Santiago.

RSVP: (2) 6785916.

Santiago, 12 de enero de 2004.

ASISTENTES A DIA DE CAMPO.
27 de enero de 2004

	APELLIDO	NOMBRE	EMPRESA	FIRMA
1	Araya	Carolina	USACH	
2	Azua	Armando	Universidad de Chile	
3	Correa	José	Universidad de Chile	
4	Correa Ferrer	Loreto	Universidad de Chile	
5	Estrada	Mauricio	Universidad de Chile	
6	Fernández	Pamela	Universidad de Chile	
7	Núñez Becerra	David	Universidad de Chile	
8	Obreque	Johanna	USACH	
9	Pizarro	Eleonora	Universidad de Chile	
10	Prat	Loreto	Universidad de Chile	
11	Prodan	Simona	Universidad de Chile	Simona Prodan
12	Rojas	Gabriela	USACH	
14	Schiess Espinoza	Macarena	Universidad de Chile	
15	Stegmann	Rodrigo	Universidad de Chile	
16	Valdivia	Carlos	Universidad de Chile	
17	Vera	Jorge	USACH	
18	Villaseca	Maureen	Universidad de Chile	
19	GAJEZ	CARLOS	UNIVERSIDAD DE CHILE	
20	VAJEBAT	REDIZO	UNIVERSIDAD DE CHILE	
21	TRONCOSO	Paula	Univ. de Chile	
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				

ASISTENTES A DIA DE CAMPO.
27 de enero de 2004

	APELLIDO	NOMBRE	EMPRESA	FIRMA	
9	1	Aguilera	Ricardo	Del Monte S.A.	
2	2	Amunátegui	Pedro	Inversiones Magnota	
7	3	Astorga	Luis	Los Aromos	
20	4	Barraza	Marcia	Viveros El Tambo S.A.	
15	5	Bolvarán	Felipe	Frutícola Viconto	
26	6	Cabrera	Marcelo	SAG	
3	7	Contreras	Carlos	Hacienda Chada S.A.	
14	8	Cornejo Rosales	Luis	Frutícola Viconto	
18	9	Cosio	Andrés	Dole-Chile	
27	10	Fiabane	Claudio	SAG-Lo Aguirre	
5	11	González	Leonel	Agrícola Brown Ltda.	
12	12	Guzmán	Cecilia	Viña Haras de Pirque	
11	13	Leal	Gerardo	Viña Haras de Pirque	
38	14	Lillo	Claudio	PUC	
10	15	Lorca	Marlene	Viveros Copequen	
13	16	Marty	Pascal	Frutícola Viconto	
4	17	Medina	Víctor Hugo	Exportadora Río Blanco S.A.	
21	18	Muñoz	Marcela	Viveros El Tambo S.A.	
24	19	Palma Caamaño	María Antonieta	SAG- 5ª Región	
1	20	Peppi	Hugo	Exportadora Río Blanco S.A.	
23	21	Puebla Cordova	Plácido	Viña Los Vascos	
17	22	Riveros	Ana María	Connexion Ltda.	
6	23	Rodríguez	Miguel	Los Aromos	
25	24	Rosales	Marlene	INIA-La Platina	
22	25	Va enzuela	Macarena	El Mercurio. Rev.del campo	
16	26	Valenzuela Edwards	Jorge	Viveros Gillaume S.A	
8	27	Vásquez	Guillermo	Agrícola Brown Ltda.	
19	28	Veloso	Alberto	Dole-Chile	
31	29	Salser	Quintale	USA CH	
	30	Azizurra	GUSTAVO	AGRICOLA S.A. AMENA	
	31	URO	RAMIRO	V.V.A LOS VASCOS	
	32	ULLWA	CIETHA	—	
	33	Delcartegosa	RODOLFO	VIVEROS VICONTIS	
	34	

ASISTENTES A DIA DE CAMPO

27 de enero de 2004

	APELLIDO	NOMBRE	EMPRESA	FIRMA
1	Moraga	J. Carlos	Hacienda Sta. Amalia	
2	CAZACA	Carlos	Agrícola Sta. Andrea	
3	RAMIREZ	ARNANDO	S.A. UVA SA SA	
4	BARCELO	Hugo	Exp. Rio Blanco	
5	STUART	ROBERT	EXP. RIO BLANCO	
6	DEKLEYS	XIMENA	VIV. ANDES	
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				

Participación a Congresos Nacionales

“ XII CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGIA ”

HOTEL CABAÑAS DEL LAGO, 1, 2, 3 Y 4 DE OCTUBRE DE 2002
PUERTO VARAS – X REGION - CHILE

Libro de Resúmenes

Organiza
Instituto de Investigaciones Agropecuarias
Centro Regional de Investigación Remehue

Colabora
Laboratorio Regional Osorno
Servicio Agrícola y Ganadero

Puerto Varas - Chile 2002

L33.

“NUEVOS REPORTES DE ENFERMEDADES VIRALES EN VIDES CHILENAS”

“New reports of viral diseases in chilean grapevines”

N. FIORE, J. MONTEALEGRE, E. ABALLAY, S. PRODAN, P. FERNANDEZ, R. REYES Y A. PINO

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Fono/Fax: (56) 2 6785726. E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com

Dentro del marco del proyecto FIA “Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid” se procedió a efectuar una prospección en viñedos y parronales ubicados en la IV V, VI, VII y Región Metropolitana, en plantas con síntomas atribuibles a presencia de virus como en asintomáticas. Se visitaron parronales y viñedos desde donde se recolectaron muestras las que se analizaron a través de la técnica ELISA para los siguientes virus: GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToRSV, ArMV y SLRSV. Una parte de las muestras recolectadas se analizaron a través de RT-PCR para el diagnóstico de GRSPaV y GRSLaV. El 60,7% de las plantas analizadas con ELISA resultaron positivas por lo menos a un virus. El estudio revela la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, ArMV y ToRSV, además se reporta por primera vez en Chile la presencia de GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y Fleck.

Proyecto FIA BIOT-01-A-13

L34.

“REPORTE DE FITOPLASMAS PERTENECIENTES AL SUBGRUPO 16SrI-C EN VIDES CHILENAS”

“Report of 16SrI-C subgroup phytoplasmas in chilean grapevines”

FIORE¹ N., BOTTI² S., MONTEALEGRE¹ J. Y BERTACCINI² A.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Fono/Fax: (56) 26785726. E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com ²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale

Durante el otoño 2002 se encontraron, en viñedos ubicados en la VI y Región Metropolitana, plantas que presentaban síntomas tales como: decaimiento, hojas enrolladas, amarillez del follaje en el caso de cepas de uva blanca y enrojecimiento del tejido foliar y de las nervaduras en uvas tintas. También se consideraron plantas que presentaban bayas parcialmente deshidratadas y con los sarmientos insuficientemente lignificados (preferentemente alrededor de los nudos). El ácido nucleico total extraído desde las nervaduras de hojas procedentes de plantas con la sintomatología antes indicada, se analizó a través de PCR con los partidores universales P1/P7, cuyo producto de amplificación fue procesado a través de un “Nested-PCR” con los partidores universales R16F2/R2 seguidos por una ulterior amplificación con partidores específicos para los grupos ribosomal de fitoplasmas 16SrI y 16SrXII [R16(I)F1/R1]. Sobre los amplicones obtenidos se procedió a efectuar un análisis del perfil de restricción enzimático (RFLP) con *TruI* y *Tsp509I* que permitió ubicar a los fitoplasmas dentro del grupo 16SrI (aster yellows group), subgrupo C. Las muestras positivas se obtuvieron en plantas de las variedades Carmenere, Petit Syrah y Chardonnay. Estos antecedentes constituyen el primer reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI-C en vides chilenas.

Proyecto FIA BIOT-01-A-13

P4.

“RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE LA ETIOLOGÍA DEL DECAIMIENTO EN PLANTAS DE UVA DE MESA INJERTADAS”

“Preliminary results on decline etiology of grafted table grape plants”

N. FIORE¹, J. MONTEALEGRE¹, H. PRIETO², Y S. PRODAN¹

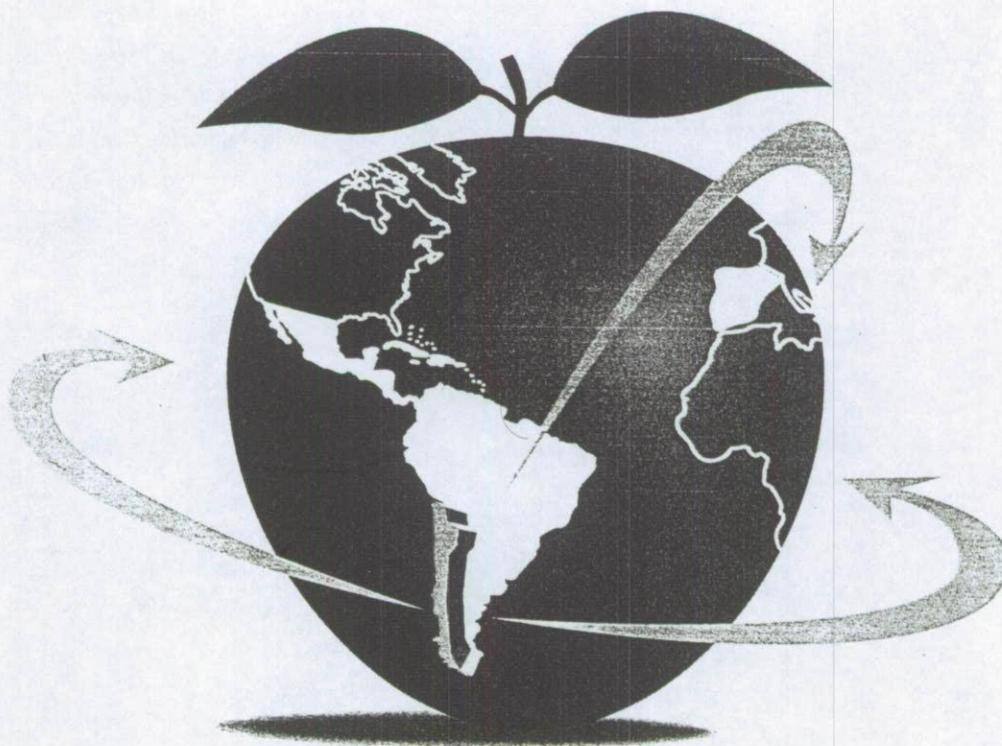
¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Fono/Fax: (56) 2 6785726. E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com ²Instituto de Investigaciones Agropecuarias La Platina, Santiago

En plantas injertadas de uva de mesa cultivadas en la V, VI y RM se encontraron síntomas tales como exceso de crecimiento en el punto de unión patrón/injerto, menor desarrollo vegetativo, hojas enrolladas y declinación. Esta sintomatología se produce desde los primeros meses después del trasplante y en los casos más graves se puede llegar hasta la muerte de las mismas. Al observar los tejidos interno, en el punto de unión patrón/injerto, los elementos conductores del portainjerto se encuentran parcialmente soldados a los de la variedad con presencia de necrosis. Se han visitado alrededor de 16 predios que presentaban el problema y las variedades más afectadas son principalmente Thompson Seedless, Red Globe, Flame, Superior y Crimson Seedless sobre diferentes portainjertos tales como: Harmony, Freedom, Paulsen 1103 y Richter 110. Se han analizados alrededor de 80 muestras a través de ELISA para 10 virus (GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToRSV, SLRSV y ArMV) y RT-PCR para 5 virus (GLRaV-2, GRSLaV, GRSPaV, GVA y GVB). También se realizaron análisis para determinar presencia de hongos y bacterias. En la mayoría de los casos los resultados fueron positivos para GLRaV-2 y GFkV, seguidos por GRSPaV, GRSLaV y GVA. Nunca se detectó *Agrobacterium vitis*, ni hongos directamente responsables de la alteración observada. Muestras de Red Globe positivas con ELISA a GLRaV-2, dieron resultado positivo solo para GRSLaV con RT-PCR. Esto indica que existiría una posibilidad de reacción cruzada con GRSLaV utilizando antisueros comerciales para el diagnóstico de GLRaV-2. Los resultados obtenidos a la fecha muestran que la etiología de este desorden no es simple. Si bien es cierto que, con diferente incidencia y en los casos más graves, se han encontrados GLRaV-2, GRSLaV, GRSPaV, GVA y GFkV, todavía no se explica porque muestras analizadas resultan negativas a todos los virus antes mencionados.

Proyecto FIA BIOT-01-A-13

TRABAJOS PRESENTADOS EN

3^{er} CONGRESO IBEROAMERICANO DE TECNOLOGIA
POSTCOSECHA Y AGROEXPORTACIONES
5^{er} CONGRESO AGRONOMICO DE CHILE
3^{er} CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA
DE FRUTICULTURA



3 - 6 DE DICIEMBRE DE 2002. SANTIAGO, CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS. UNIVERSIDAD DE CHILE

Organizadores



Sociedad Agronómica de Chile



Universidad de Chile



Sociedad Chilena de Fruticultura

Auspiciadores



Asociación Iberoamericana
de Tecnología Postcosecha



COMISIÓN INTERAMERICANA
DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



GOBIERNO DE CHILE
CONICYT



INSTITUTO INTERAMERICANO
DE COOPERACIÓN AGRICOLA

COMISIÓN ORGANIZADORA

Presidente:	Luis Luchsinger Lagos
Vicepresidente:	María Verónica Díaz Martínez
Directores:	Horst Berger Stumpe Pedro Calandra Bustos Ana María Estévez Alliende Gabino Reginato Meza Marco Schwartz Melgar
Tesorero:	María de la Luz Hurtado Pumarino
Representante Sociedad Agronómica de Chile:	Horacio López Tapia
Representante Sociedad Chilena de Fruticultura:	Julio Retamales Aranda
Relacionadora Pública:	Montserrat Figuerola Estévez

medio (6-15 %); alto (16-30%) y severo (> 30 %). Con los valores, se determinó el grado de ataque de acuerdo a la fórmula de Townsend y Heuberger. Se concluyó que dos aplicaciones durante la floración ejercen similar control que 5 aplicaciones desde pre-flor a baya de 6-8 mm. Asimismo, se determinó que las aplicaciones tanto en pre-flor (antes de caliptras partidas) como en baya de 6-8 mm no tienen ninguna incidencia en el control de esta plaga en uva de mesa.

¹Trabajo realizado con financiamiento de Dow Agrosciences. Agradecimientos a Sr. Carlos Merino

O 44 IDENTIFICACIÓN DEL CLOSTEROVIRUS GRAPEVINE LEAFROLL-2 (GLRaV-2), EN CULTIVARES DE UVA DE MESA CON SEVEROS SÍNTOMAS DE INCOMPATIBILIDAD

Auger, Jaime; Narváez, Claudio y Esterio, Marcela

Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santa Rosa 11315, Santiago. Chile. E-mail: jauger@abello.dic.uchile.cl

En Chile la mayor superficie de uva de mesa se encuentra sobre pie franco, pero en los últimos años por diferentes razones, (suelos de replante con antecedentes de alta infestación de nematodos u otros problemas locales), se ha recurrido a la utilización de portainjertos tolerantes a este tipo de problemas. En el presente trabajo se estudió y analizó la posible causa de la declinación y síntomas de incompatibilidad del injerto en numerosas plantas de vid de las var. Thompson Seedless y Crimson Seedless injertadas sobre los patrones Harmony, Freedom, y Kober 5BB de 2 a 4 años de edad. Mediante diagnóstico inmunológico (ELISA) y molecular (PCR) en plantas con síntomas de declinación e incompatibilidad se identificó a GLRaV-2, y se confirmó la presencia del virus en viveros de propagación de los portainjertos.

A partir de un producto de PCR se secuenció un fragmento correspondiente a 200 pb. Posteriormente, utilizando el programa BLASTN, se confirmó la identidad del virus, estableciéndose una similitud de un 99% con un fragmento del gen HSP-70 de GLRaV-2. La técnica RT-PCR demostró ser más efectiva que ELISA en la detección de GLRaV-2, y de acuerdo a estos resultados es recomendable considerar la utilización de esta técnica en programas de certificación de vides.

O 45 NUEVOS REPORTES DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR VIRUS Y FITOPLASMAS EN VIDES CHILENAS¹

Fiore, Nicola¹; Montealegre, Jaime¹; Aballay, Erwin¹; Prodan, Simona¹; Fernández, Pamela¹; Reyes, Rodrigo¹; Botti, Simona¹; Bertaccini, Assunta² y Pino, Ana¹

¹Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004. Santiago. Chile. E-mail: nicola.fiore_2000cl@yahoo.com
²Università di Bologna. DiSTA Patologia Vegetale

Dentro del marco del proyecto FIA "Elaboración de un sistema confiable para la detección y

caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid" se procedió a efectuar una prospección en viñedos y parronales ubicados en la IV, V, VI, VII y Región Metropolitana, en plantas con síntomas atribuibles a virus y fitoplasmas como en asintomáticas. Se recolectaron muestras las que se analizaron a través de la técnica ELISA para los siguientes virus: GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToRSV, ArMV y SLRSV. Una parte de las muestras recolectadas se analizaron a través de RT-PCR para el diagnóstico de GRSPaV y GRSLaV. El 60,7% de las plantas analizadas mediante ELISA resultaron positivas por lo menos a un virus. El estudio revela la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, ArMV y ToRSV, además se reporta por primera vez en Chile la presencia de GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y GFkV.

Para los fitoplasmas se procedió a la extracción del ácido nucleico total desde las nervaduras de hojas, éste se analizó a través de PCR con los partidores P1/P7, cuyo producto de amplificación fue procesado a través de un "Nested-PCR" con R16F2/R2 seguidos por una amplificación con partidores específicos para los grupos ribosomal de fitoplasmas 16Srl y 16SrXII R16(I)F1/R1. Sobre los amplicones obtenidos se procedió a efectuar un análisis del perfil de restricción enzimático (RFLP) con *TruI* y *Tsp509I* que permitió ubicar a los fitoplasmas dentro del grupo 16Srl (aster yellows group). Algunos de ellos se identificaron como pertenecientes al subgrupo C. Estos antecedentes constituyen el primer reporte de fitoplasmas en vides chilenas.

¹Proyecto FIA BIOT-01-A-13

O 46 RESPUESTA DEL CEREZO (*Prunus avium*) A LA APLICACIÓN DE CIANAMIDA HIDROGENADA EN LA IV REGIÓN

Lemus, Gamaliel¹ y Rivas, Brian²

¹INIA
²FDI

En las temporadas 2001 y 2002, se evaluaron distintas fechas de aplicación de Cianamida Hidrogenada en cerezos en la Provincia de Limarí, IV Región y su efecto sobre la brotación y la floración. El 2001 se aplicó, en la variedad 'Van', en cinco fechas: 1 y 15 de junio y 1, 15 y 31 de julio, dejando un tratamiento testigo sin aplicación. La primera respuesta observada fue un significativo adelanto de la brotación en todos los tratamientos con respecto al testigo, ya que el estado llamado "lado verde" ocurrió a principios de agosto, 45 días antes que en el testigo. La floración fue distinta en todos los tratamientos. Se observó que a medida que se atrasaba la aplicación, la floración era más concentrada y uniforme en el árbol. Es así como en el tratamiento del 15 de julio, la floración se inició el 31 de agosto y la plena flor se alcanzó el 7 de septiembre, con un 30,3% de flores abiertas y en el tratamiento del 31 de julio, la floración se inició el 5 de septiembre y la plena flor ocurrió el 17 de



UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



1928 - 2003



XIII CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA



MARBELLA RESORT MAITENCILLO
V REGION - CHILE



28 AL 31 DE OCTUBRE 2003

T.4

“CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE FITOPLASMAS AISLADOS DE VIDES CHILENAS”

“Enzymatic characterization of phytoplasma isolates from Chilean grapevines”

A. GAJARDO¹, S. BOTTI², J. MONTEALEGRE¹, A. BERTACCINI² y N. FIORE¹.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Fono / fax (56-2) 6785726. E-mail nfiore@uchile.cl. ²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale.

Los fitoplasmas son agentes causales de variadas enfermedades en vid. Con el propósito de verificar la asociación entre los síntomas observados en predios chilenos y la presencia de estos patógenos, fueron analizadas mediante pruebas moleculares 41 plantas de vid provenientes de las Regiones V, VI, VII y Metropolitana. La identificación se realizó mediante la amplificación de secuencias específicas ubicadas en el operón de genes ribosomales de los fitoplasmas. Para la PCR se utilizaron los partidores universales P1/P7 y se procedió para “PCR anidada” con el par universal R16F2/R2 y/o los pares específicos de grupo ribosomal 16Sr R16(I)F1/R1 y R16(V)F1/R1. Posteriormente, los distintos aislados fueron caracterizados según sus perfiles de restricción enzimática (RFLP) mediante digestión con las enzimas *TruI*, *TaqI*, *RsaI*, *AhaI*, *HhaI* y *TspI*. Este análisis permitió la identificación de fitoplasmas pertenecientes a los grupos *Aster yellow* (16SrI subgrupos B y C), *Ash yellow* (16SrVII) y *Stolbur* (16SrXII subgrupo A), a veces encontrado en las plantas como infección mixta. En ningún caso se detectó “Flavescencia dorada”. Los resultados obtenidos constituyen la primera indicación de la presencia en Chile de fitoplasmas de los grupos 16SrXII y 16SrVII, siendo este último detectado por primera vez a nivel mundial en vides.

Proyecto FIA BIOT-01-A-13.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS - UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS - UNIVERSIDAD DE TALCA



UNIVERSIDAD DE
TALCA

XIV CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGIA



AGRONOMIA



X I V C O N G R E S O
S O C I E D A D C H I L E N A D E F I T O P A T O L O G I A
F A C U L T A D D E C I E N C I A S A G R A R I A S - U N I V E R S I D A D D E T A L C A

OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE VIRUS EN VID

Optimization of grapevine virus detection

PRODAN, S.; VALDIVIA, C.; PINO, A.; MONTEALEGRE, J. Y FIORE, N.

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana.
Casilla 1004, Santiago. E-mail nfiore@uchile.cl

Los virus que causan mayores pérdidas en vides chilenas son *Grape vine fanleaf virus*-GFLV, *Grapevine fleck virus*-GFkV, *Grape vine virus A*-GVA, *Grapevine leafroll associated virus* -GLRaV-1, 2 y 3, cuyo control se logra principalmente con el uso de material vegetal sano, resultado de un proceso de selección que incluye el uso de técnicas de laboratorio para la detección de virus. Considerando la necesidad de optimizar la detección mediante las técnicas de ELISA y RT-PCR, se analizaron tres plantas por cada uno de los virus mencionados provenientes de tres viñas de la Región Metropolitana durante los meses de Septiembre a Junio. Las muestras, según el estado fenológico fueron: brotes, hojas, pecíolos de hojas, sarmientos verdes y floema de sarmientos lignificados. La mayor sensibilidad con RT-PCR se encontró en hojas y pecíolos desde septiembre a noviembre; con ELISA en pecíolos de diciembre a febrero y en floema con las dos técnicas desde marzo hasta junio.

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

X I V C O N G R E S O
S O C I E D A D C H I L E N A D E F I T O P A T O L O G I A
F A C U L T A D D E C I E N C I A S A G R A R I A S · U N I V E R S I D A D D E T A L C A

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FITOPLASMAS EN VIDES
CHILENAS

Detection and identification of new phytoplasmas infecting chilean grapevines

GAJARDO A.¹; BOTTI, S.²; PINO, A.¹; MONTEALEGRE, J.¹; BERTACCINI, A.² Y
FIORE, N.²

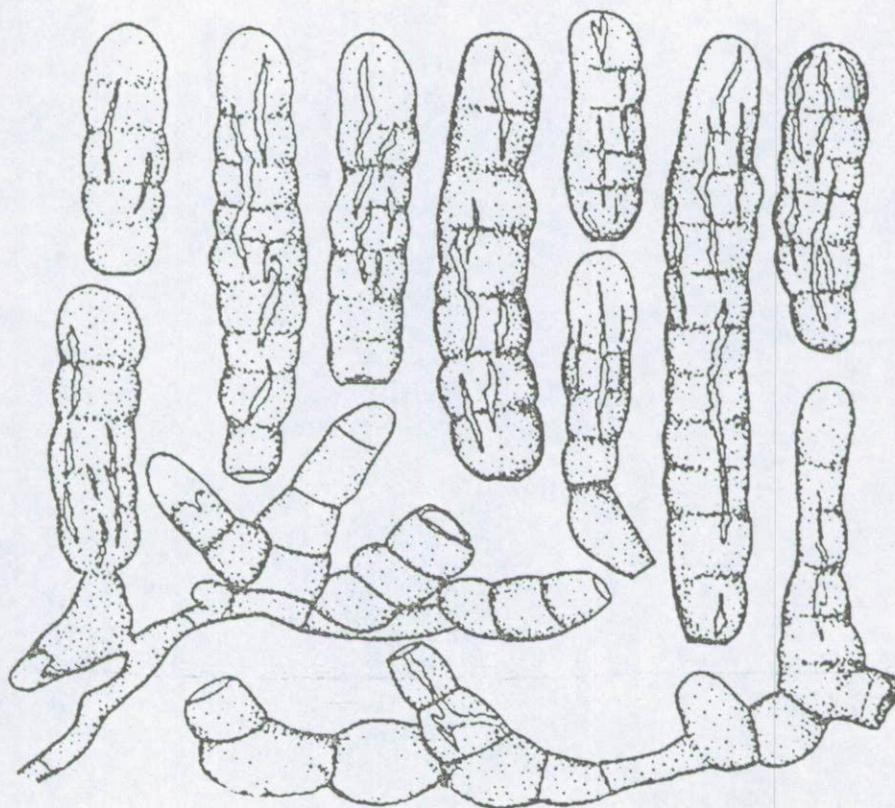
¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana.
Casilla 1004, Santiago.

²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale, Bologna, Italia. E-mail: nfiore@uchile.cl

La presencia de fitoplasmas en plantas de vid con síntomas de amarilleces se determinó a través de PCR anidada utilizando los partidores P1/P7 y R16F2/R2, que reconocen secuencias específicas del oprón de genes ribosomales de estos microorganismos. Mediante la caracterización enzimática de los productos de amplificación obtenidos y el análisis de secuencias de algunos de ellos, se identificaron fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI-B (aster yellows), 16SrI.C (clover phyllody), 16SrVII-A (ash yellows) y 16SrXII-A (stolbur), encontrando además nuevos perfiles de restricción enzimática referibles a los grupos 16SrI y VII. El análisis de las secuencias nucleotídicas de estos aislados resultó en 98 y 99 % de similitud con fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B y 16SrVII-A respectivamente. Otros dos aislados, denominados "Chile a" y "Chile b", mostraron mayor similitud con fitoplasmas miembros del grupo Stolbur, que incluye el 16SrXI-A ("*Candidatus Phytoplasma solani*") y 16SrXII-B ("*Ca. Phytoplasma australiense*"). Ambas variantes chilenas presentan una similitud genética del 98% con el subgrupo 16SrXII-A. Sin embargo, en el caso de "Chile a", las diferencias moleculares encontradas permiten asignarlo a un nuevo taxon llamado "*Ca. Phytoplasma chilensis*".

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

XV CONGRESO CHILENO DE FITOPATOLOGIA



LIBRO DE RESUMENES



SOCIEDAD
CHILENA
DE
FITOPATOLOGÍA

FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD
DE TARAPACA



**CLOSTEROVIRIDAE RESPONSABLES DE LA PARCIAL COLORACIÓN DE LAS
BAYAS DE LA VAR. CRIMSON SEEDLESS**

Closteroviridae responsible for the bunches pale-coloured of cv. Crimson Seedless

**SIMONA PRODAN, ANA MARIA PINO, JAIME MONTEALEGRE, CARLOS
VALDIVIA Y NICOLA FIORE**

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamentos de Producción
Agrícola y Sanidad Vegetal. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago. Casilla 1004.
Fono/Fax: (2) 9785726. E-mail: nfiore@uchile.cl

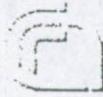
Crimson Seedless es una variedad de uva de mesa de alto interés entre los productores chilenos. Sin embargo, en los últimos cuatro años, durante el periodo de cosecha, se observó frecuentemente una reducción, o ausencia de coloración de las bayas, que impide la comercialización de los racimos causando pérdidas que en algunos predios han alcanzado el 100% de la producción. Con el fin de establecer el origen de tal alteración se han realizados análisis virológicos utilizando las técnicas DAS-ELISA para la detección de Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll-associated virus 1, -2 y -3 (GLRaV-1, GLRaV-2 y GLRaV-3), Tomato ringspot virus (ToRSV) y Grapevine virus A (GVA), y DAS-ELISA para Grapevine virus B (GVB) y Grapevine fleck virus (GFkV). Se han analizado 70 plantas con y sin síntomas y los resultados obtenidos revelan que los agentes etiológicos responsables de la alteración son el *Closterovirus* GLRaV-2 y los *Ampelovirus* GLRaV- 1 y 3. Plantas infectadas simultáneamente por dos o tres de estos virus, manifiestan síntomas más intensos, incluso racimos completamente verdes, cuyas bayas presentan una elevada acidez y baja concentración de azúcares.

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

Participación a Congresos Internacionales



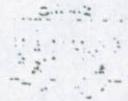
Department of Plant
Protection and Applied
Microbiology
University of Bari



Institute of Plant Virology
of the National Council of
Research, Unit of Bari
(CNR-IVV/BA)

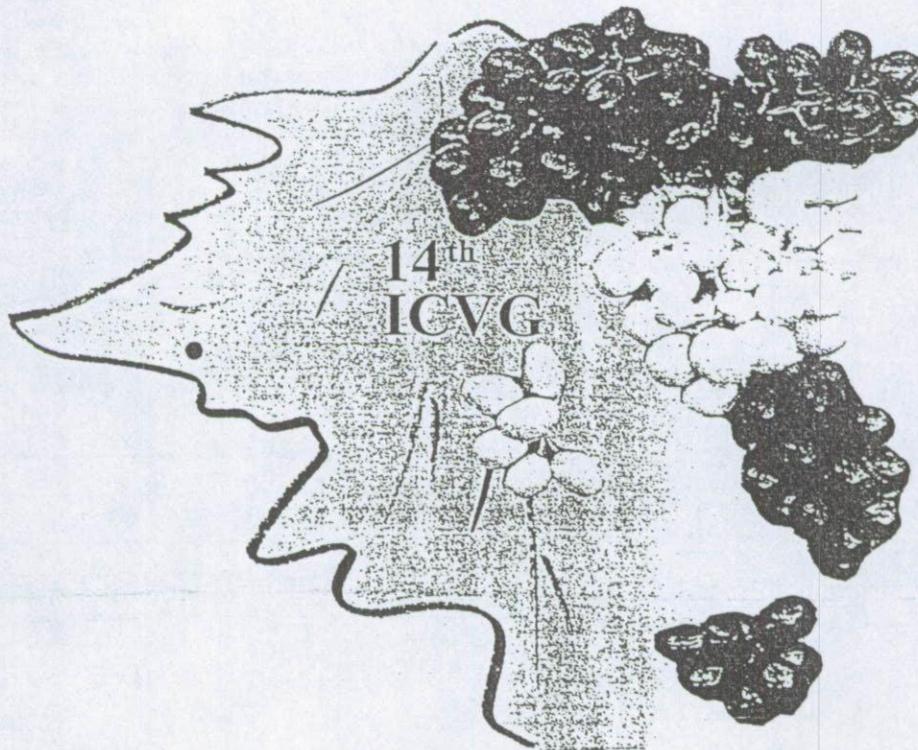


Mediterranean Agronomic
Institute, Bari
(IAM-B)



Centro di Ricerca e
Sperimentazione in
Agricoltura "Basile Cara"
Locorotondo (CRSA)

14TH MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE



EXTENDED ABSTRACTS

September 12 – 17, 2003
Locorotondo (BARI), ITALY

AETIOLOGY OF DECLINE IN THOMPSON SEEDLESS GRAFTED TABLE GRAPE PLANTS

S. Prodan, J. Montealegre and N. Fiore

Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago de Chile, Chile.

Chile is an important producer of table grapes, with a planted area that has grown 5.4% in the period 1998-1999, reaching 50862 ha. During these last years, the natural aging of plantations and the introduction of new varieties have prompted an intense replanting using grafted plants especially on soils with history of nematode infestation and high levels of plant pathogenic microorganisms.

Grafting on table grapes is a technique recently introduced in Chile, and this may cause problems related with an inadequate agronomic management together with the presence of graft transmissible pathogens that can generate incompatibility phenomenon. (2, 3).

In the 2000-2003 period, particularly in farms planted with the variety Thompson Seedless, grafted on Freedom and Harmony, a syndrome identifiable as "Decline of Grafted Plants" has been observed.

The main symptoms of this alteration are a local excessive growing of tissue in the point of graft union, with an internal necrosis and incomplete connection between the conductive elements of the rootstock and scion. In some cases these symptoms continue with a lesser development and even the death of the plants affected. Also, and with some frequency, it is possible to observe a good progress of the variety but not of the rootstock, which presents a stem diameter reduced comparable with the scion, and a root system clearly insufficient to support the demand of nutrients and water. Normally, these alterations are expressed during the first 2-4 months after planting, from mid spring to summer.

With the objective of studying the cause of the symptoms described, several plant pathology analyses have been conducted on plants of Thompson Seedless grafted onto Freedom and Harmony, with and without symptoms of the decline, using DAS-ELISA technique for the diagnosis of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, and 3* (GLRaV-1, GLRaV-2, and GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), and *Grapevine virus A* (GVA), and DAS-ELISA for *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine fleck virus* (GFkV). The antibodies were obtained from Agritest, Bioreba and Loewe and the assays were performed according to manufacturer's instructions. The same samples have been analyzed also through RT-PCR to detect *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine rootstock stem lesion associated virus* (GRSLaV), GLRaV-2: GVA, GVB, and GFkV (1, 4, 5, 6, 7). Also, some samples have been analyzed to determine the eventual presence of fungi and bacteria as agents possibly causing the alteration described.

From the plants analyzed through ELISA and RT-PCR, positive results were obtained only for GLRaV-2, GFkV, GVA and GRSLaV. As presented in Table 1, the highest percentage of positive from all analyzed plants occurred for GLRaV-2 and GFkV, for both symptomatic and asymptomatic plants.

Results between Thompson Seedless plants grafted onto Freedom or Harmony were not too different, excepting that GVA was detected only in the second case.

In none of the samples analyzed were found phytopathogenous bacteria, but in some of them the presence of *Verticillium dahliae* and *Fusarium* spp. fungi was determined in the necrotic area of the rootstock-scion union.

Table 1. Results of RT-PCR assay

Plants	Plants analyzed	% plants positive	% plants positive to diferent viruses			
			GLRaV-2	GFkV	GVA	GRSLaV
THOMPSON SEEDLESS/ FREEDOM						
with symptoms	20	65.0	65.0	60.0	0.0	5.0
w/o symptoms	17	58.8	58.8	58.8	0.0	0.0
THOMPSON SEEDLESS/ HARMONY						
with symptoms	16	56.3	25.0	31.2	18.7	0.0
w/o symptoms	13	46.2	23.0	30.8	15.4	0.0

From the results, it is evident that GLRaV-2 and GFkV were the virus with the highest frequency in the samples analyzed. Even though the percentages of incidence were greater in the plants with symptoms than in those asymptomatic, differences are not important as to indicate certainly that one or both pathogens would be responsible directly for the decline.

It has been observed also during the three seasons of the study that a high proportion of the plants affected have been able to survive the crisis and achieve a sustained development of vegetation, and even to obtain good production levels. Besides, it has been determined that many plants which were positive for GLRaV and GFkV never expressed decline symptoms.

The low percentage of infection by GRSLaV and GVA definitely excludes these agents as causing the alterations. The fungi detected are also not responsible for the problem, they act as opportunistic pathogens, that means they develop due to the general stress condition that the plants present. But without any doubt they contribute, together with GLRaV-2 and GFkV, to worsen drastically the condition of the plants in the more critical cases.

After the three season observations conducted to determine the cause of the "Decline of Grafted Plants" in Thompson Seedless table grapes, it is concluded that this phenomenon does not seem to be related clearly with the virus and pathogens herein mentioned. Considering that there are no evidences of genetic incompatibility in grapes, it is necessary to continue studying the causes of grapevine decline, without forgetting to investigate aspects of grafting techniques and agronomic management of plants in commercial vineyards.

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013

References

1. Abou-Ghanem N., Sabanadodzovic S., Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G. P., 1998. Some properties of grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80:37-46.
2. Golino D.A., 1993 Potential interaction between rootstocks and grapevine latent virus. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(2):148-152.
3. 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.
4. McKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S. and Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
5. Minafra A. and Hadidi A., 1992 Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by c-DNA amplification. *Journal of Virological methods* 47:175-188
6. Rowhani A, Zhang Y.P., Golino D. A. and Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings. Adelaide, Australia.* P.82.
7. Shi B.J., Habili N. and Symons R.H., 2000. Grapevine Fleck virus : large sequence variation in a small region of the genome. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings. Adelaide, Australia* P. 78.

SURVEY ON PHYTOPLASMAS IDENTIFIED IN CHILEAN GRAPEVINES

A. Gajardo¹, S. Botti², J. Montealegre¹, N. Fiore¹ and A. Bertaccini²

¹Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile

²DiSTA, Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, via F. Re 8, 40126 Bologna, Italy

Objectives

To verify association of phytoplasmas with yellows symptoms detected in Chilean grapevines plants in the last two years molecular detection was employed to test samples collected in the grapevine growing region of the state. First years of survey allow to identify 16SrI-C phytoplasmas in some of the symptomatic plants examined (7), during 2003 further monitoring was performed to cover the main grapevine growing areas of Chile.

Material and Methods

Grapevine samples showing typical yellows symptoms were collected starting from March 2002 from the V, VI, VII and Metropolitana Regions (RM) of Chile. The molecular testing was carried out on 14 samples in 2002 and on 41 in 2003. Total nucleic acids were extracted from 1 g of leaf midribs following the protocols described by Prince *et al.* (10) in 2002, and by Zhang *et al.* (12) in 2003 with further silica particles purification step, diluted to a final concentration of 20 ng/ μ l in sterile deionized water. One μ l of this dilution was used in direct PCR using universal primer pair P1/P7 (6, 11), followed by nested PCR on products diluted 1:30 in sterile distilled water, using primer pair R16F2/R2 (9). Group specific primers R16(I)F1/R1 and R16(V)F1/R1 (9) were finally employed to increase detection sensitivity. Primers M1/M2 (8) were also employed in nested-PCR to cross confirm results. Each 25 μ l PCR reaction mix contained 2,5 μ l 10X PCR buffer, 0,8 U of *Taq* polymerase (Polymed, Florence, Italy), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ and 0,4 μ M each primer. Thirty-five PCR cycles were performed in an automated thermocycler (Biometra, Uno Thermoblock, Gottingen, Germany, EU) under the following conditions: 1 min (2 min for the first cycle) denaturation step at 94°C, 2 min for annealing at 50°C and 3 min (10 min for the last cycle) for primer extension at 72°C. Six μ l of PCR products were analyzed in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide, and then visualized with a UV transilluminator. To differentiate among phytoplasmas, PCR products were digested with *TruI*, *TaqI*, *RsaI*, *AclI*, *HhaI*, and *Tsp509I* restriction enzymes according with the amplicon studied, and RFLP fragments were separated in a 5% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide, and then visualized with an UV transilluminator and profiles were compared with those of described phytoplasma strains.

Results

Molecular analyses demonstrated phytoplasma association with yellows disease in the surveyed vineyards of Chile: phytoplasmas were identified in grapevines collected in the regions studied in both 2002 and 2003. These phytoplasmas were mainly detected with nested PCR using general primers R16F2/R2 and M1/M2 and/or with R16(I)F1/R1 specific primers; identification was obtained by RFLP using the above mentioned enzymes. Phytoplasma identification showed the presence of phytoplasmas belonging to 16SrI-C subgroup (Fig. 1) in 2002 samples, the same subgroup was occasionally detected in grapevine in the past in Italy in both Veneto region (3) (North Italy) and recently in Abruzzo region (5) (Central-South Italy). In 2003 samples, 16SrI-B phytoplasmas were identified together with phytoplasmas belonging to group 16SrVII (Fig. 2) in some cases in mixed infection (data not shown); phytoplasmas of this subgroup were detected in grapevine in both north and south Italy (1, 4). Phytoplasmas of group 16SrVII were never reported before in grapevine; they were however reported to infect ash and lilac in the US and a subgroup 16SrVII-B has been identified in South America (Brazil) in São Paulo state in *Erigeron* and *Catharanthus roseus* plants naturally infected and showing witches' broom symptoms (2). Phytoplasma clearly referable to group 16SrXII-A ("Bois Noir") (3) were also identified together with a previously unreported RFLP profile in sample 28 on amplicons obtained with R16(I)F1/R1 with four restriction enzymes (Fig. 2). This phytoplasma show profiles referable to group 16SrI or 16SrXII-A

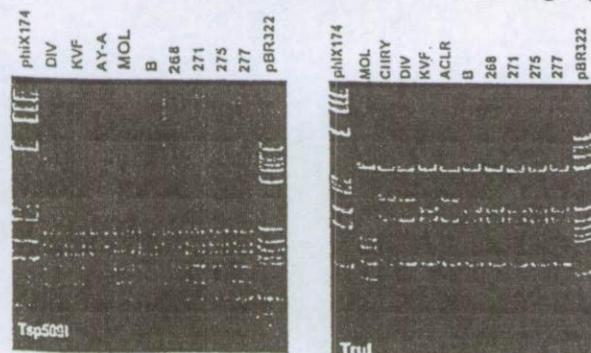


Fig. 1. Polyacrylamide gels (5%) showing the *Tsp509I* and the *TruI* RFLP patterns of phytoplasma rDNA fragments obtained after nested PCR with primers R16(I)F1/R1 from grapevine samples with yellows symptoms from Chile 2002. Phytoplasma reference strains: MOL, Molière disease (16SrXII-A); CHRY, Chrysanthemum yellows from Germany (16SrI-A); DIV, diplotaxis virescence (16SrI-B); KVF, clover phyllody from France (16SrI-C); AY-A, aster yellows from Spain (16SrI-F). Markers: ϕ X174 *HaeIII* digested: fragment sizes in base pairs from top to bottom: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, and 72; pBR322 *MspI* digested: fragment sizes in base pairs from top to bottom: 622, 527, 404, 307, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34.

with *HhaI*. profiles referable to 16SrXII-A with *Tsp509I* and *TruI* but it differs from all the employed controls with *RsaI*. No FD phytoplasmas were identified in the samples analysed. All the samples resulted to be positive were collected from symptomatic grapevine plants located in VI, VII and Metropolitana Regions of Chile. There were not evidence of epidemic spreading of yellows symptoms in the surveyed vineyards:

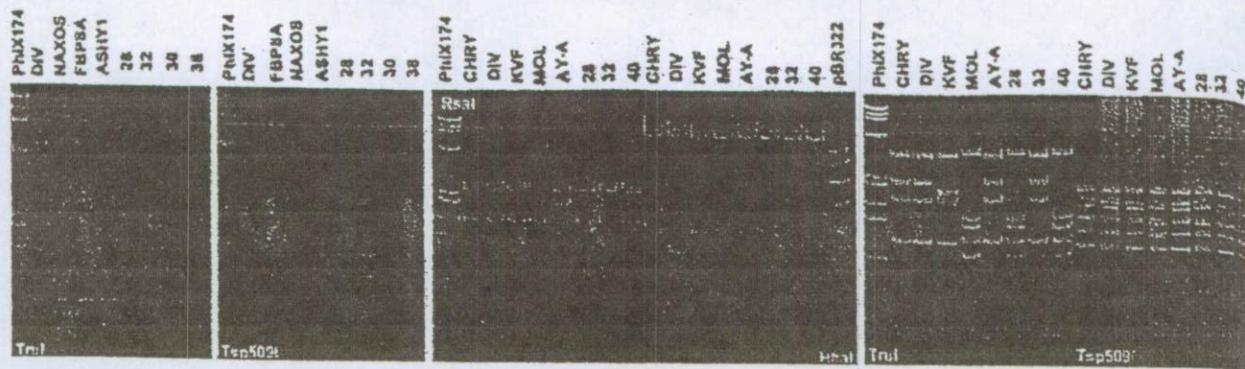


Fig. 2. Polyacrylamide gels (5%) showing the RFLP patterns of phytoplasma rDNA fragments obtained after nested PCR from grapevine samples with yellows symptoms collected in Chile in 2003. RFLP with *TruI* and *Tsp509I* on the left were obtained on M1/M2 amplicons; profiles with *RsaI*, *HhaI*, *TruI* and *Tsp509I* on the right were obtained on R16(I)F1/R1 amplicons. Sample 28 show the undescribed profile referable to groups 16SrI and XII. Phytoplasma reference strains not in fig. 1: NAXOS, periwinkle virescence from Sicily (group 16SrIX-C), FBPSA, faba bean phyllody from Sudan (16SrII-C), ASHY1, ash yellows from New York State, US (16SrVII-A).

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013.

References

- Alma A., Davis R.E., Vibio M., Danielli A., Bosco D., Arzone A. and Bertaccini A., 1996. Mixed Infection of grapevines in Northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease* 80: 418-421.
- Barros T.S.L., Davis R.E., Resende O.R. and Dally E.L., 2002. Erigeron witches' broom phytoplasma in Brazil represents a new subgroup VI-B in 16S rRNA gen group VII, the Ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86: 1142-1148.
- Bertaccini A., Murari E., Vibio M., Danielli A., Davis R.E., Borgo M., Consolaro R. and Sancassani P., 1996. Identificazione molecolare dei fitoplasmi presenti in viti affette da gialumi nel Veneto. *L'Informatore Agrario* 20:55-59.
- Bertaccini A., Vallillo E., Murari E. and Martini M., 1999. Presenza di legno nero in Molise. *L'Informatore Agrario* 2: 62-63.
- D'Ascenzo D., Botti S., Paltrinieri S., Di Giovanni R., Di Silvestro D. and Bertaccini A., 2003. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Abruzzo region (Italy). 14th Meet. Intern. Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) Sept. 12-17, Locorotondo (BA), Italy (this volume).
- Deng S. and Hiruki C., 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479.
- Fiore N., Botti S., Montealegre J. and Bertaccini A., 2002. Primer reporte de fitoplasmas en vides Chilenas. XII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Puerto Varas, Xª región. Chile 1-4 octubre 2002: 45.
- Gibb K.S., Padovan A.C. and Mogen B.A., 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85: 169-174.
- Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M. and Gundersen D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.
- Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R. and Barba M., 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83: 1130-1137.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D. and Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2: 369-380. S. Razin e J.G. Tully eds., Academic Press, New York.
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.

REPORT OF NEW VIRAL DISEASES IN CHILEAN GRAPEVINES

S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, P. Fernández, R. Reyes and N. Fiore

Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana. Santiago de Chile, Chile.

In order to study the phytosanitary conditions of Chilean grapevines, and responding to the increasing preoccupation for lower quantitative and qualitative levels of production that appear in some areas, we began in 2002 a prospective study aimed at covering a significantly large geographical area, from the north (4th Region), passing through the central (5th and Metropolitan Regions) and ending in the south (6th and 7th Regions) production zones of Chile. The material, collected during the winter season (June-July) from 15 areas, consisted of mature canes from plants with symptoms, that may indicate viral infection, and also symptomless plants. The most frequent symptoms were a yellowish, mosaic and downwards rolling of the leaves, a poor coloration of the berry, low production, and a decline of the whole plant.

The 366 plants collected were analyzed through DAS-ELISA to detect *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, and 3* (GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), and *Grapevine virus A* (GVA). DAS-ELISA was used to determine *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine fleck virus* (GFkV). ELISA kits from Agritest, Bioreba and Loewe were used according to the manufacturer's instructions.

Sixty-two of the samples collected were also analyzed through RT-PCR to detect *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine rootstock stem lesion-associated virus* (GRSLaV), GLRaV-2, GVB, GVA (1, 2, 3, 4). Also, some of the ELISA positive samples for GFkV were analyzed through RT-PCR (5). Both techniques were performed on phloem tissue grinded 1:10 (w/vol) in the respective grinding buffer.

From all plants analyzed by ELISA, 60% were positive for at least one virus. This study reveals the presence of GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, GVB, GFkV, ArMV, and ToRSV. GLRaV-2 and GFkV had the greatest infection levels (30.1 and 28.7%, respectively), followed by GVA (13.7%), GFLV (10.7%), GLRaV-3 (10.1%), GLRaV-1 (9.3%), GVB (2.2%), ToRSV (1.6%) and ArMV (0.5%). SRLV was not detected. The most affected table grapes were Thompson Seedless (78.4%), Superior (71.4%), Crimson Seedless (63%), and Flame (8.3%); and the vine varieties were Syrah (91.7%), Sauvignon Blanc (86.7%), Cabernet Sauvignon (65.6%), Merlot (57.9%), and Chardonnay (28.6%).

Two viruses never reported previously in Chile were found through RT-PCR: GRSPaV and GRSLaV, with 22.6 and 19.4% infection levels, respectively. ELISA results were confirmed for GVA, GVB and GFkV meanwhile the results for GLRaV-2 virus were just partially confirmed by RT-PCR. The exception was Red Globe variety, where the ELISA positive samples showed to be in fact GRSLaV positive. The two viruses show a 74% genomic sequence similarity and cross-reaction occurs when using the commercial ELISA kit for GLRaV-2 detection (4).

The results indicate that in Chile are present the most important viruses that affect grapevines, and GVB, GFkV, GRSLaV and GRSPaV are reported for the first time.

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria. Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013.

References

1. Abou-Ghanem N., Sabanadodzovic S., Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G. P., 1998. Some properties of grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80:37-46.
2. McKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S. and Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
3. Minafra A. and Hadidi A., 1992. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by c-DNA amplification. *Journal of Virological methods* 47:175-188.
4. Rowhani A., Zhang Y.P., Golino D. A. and Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*. Adelaide, Australia. P. 82.
5. Shi B.J., Habili N. and Symons R.H., 2000. Grapevine fleck virus: large sequence variation in a small region of the genome. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*. Adelaide, Australia P. 78.

IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología

24 al 28 de Noviembre de 2003

Santiago de Chile



Pontificia Universidad Católica de Chile

una menor incidencia y severidad de DPB. Como umbral se estableció que bajo una relación de 80 (cm de área foliar/raíz menor o igual a 2 mm) no debiera presentarse el problema. Dicho umbral deberá validarse y ajustarse luego de varias temporadas y mediciones bajo distintas condiciones. El factor frecuencia de riego para las condiciones del ensayo efectuado no fue significativo, sin embargo, el abastecimiento hídrico debe seguir siendo investigado para establecer la importancia relativa del riego y del balance Copa:Raíz sobre la DPB.

82. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE RIEGO SOBRE LA INCIDENCIA DE DESHIDRATACION PREMATURA DE BAYAS EN CV. MERLOT. Samuel Ortega-Farías², Claudio Pardo³, Yerko Moreno³, y César Acevedo²

¹Investigación financiada por el Centro de Investigación y Transferencia en Riego y Agroclimatología (CITRA), Centro Tecnológico de la Vid y el Vino (CTVV) y Viña San Pedro. ²CITRA, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Casilla 747, Talca, Chile.

E-mail: sorteaga@utalca.cl.

³CTVV, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Casilla 747 - Talca, Chile.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la frecuencia de riego sobre la deshidratación prematura de bayas, un experimento fue realizado en un viñedo ubicado en Molina, VII región (35° 6' LS; 71° 16' LW), durante la temporada agrícola 2002-2003. El viñedo utilizado correspondió al cv. Merlot de 5 años de edad, regado por goteo (4 L h⁻¹) y conducido en espaldera simple (orientación norte sur) podada en cargador apitonado. Los tratamientos consistieron en una frecuencia de riego de dos veces por semana (T1), en forma diaria (T2) y dos veces al día (T3) para todo el período de crecimiento de

la vid. Para estimar el tiempo de riego se instaló una Estación Meteorológica Automática (EMA) para medir las variables de entrada del modelo de Penman-Monteith tales como temperatura del aire (Ta), humedad relativa (HR), velocidad del viento (Vv) y radiación solar (Rs), en intervalos de una hora. Los resultados de este estudio indicaron que existieron diferencias significativas entre los tratamientos, donde el tratamiento T3 presentó el menor porcentaje de racimos con bayas deshidratadas. Al respecto, los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron un 66, 52 y 34 % de racimos con bayas deshidratadas, respectivamente.

83. DETECCIÓN MOLECULAR DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR NUEVOS VIRUS Y FITOPLASMAS EN VIDAS CHILENAS. Ángela Gajardo¹, Simona Prodán¹, Simona Botti², Erwin Aballay¹, Ana María Pino¹, Pamela Fernández¹, Rodrigo Reyes¹, Assunta Bertaccini², Jaime Montealegre¹ y Nicola Fiore¹

¹Facultad de Cs. Agronómicas, Universidad de Chile. ²Università di Bologna, Italia.

E-mail: nfiore@uchile.cl

En el marco del proyecto FIA "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid" se realizó una prospección en viñedos y parronales ubicados en las regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana para la identificación de plantas con síntomas atribuibles a la presencia de virus y/o fitoplasmas. Se recolectaron muestras sintomáticas y asintomáticas que fueron analizadas utilizando las técnicas de ELISA y/o amplificación por PCR de secuencias de cDNA viral (RT-PCR) para el diagnóstico de los virus GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToSRV, ArMV y SLRSV. La detección de fitoplasmas se realizó mediante la amplificación por PCR de secuencias

génicas conservadas de RNA ribosomal, reamplificadas por PCR anidado utilizando partidores universales para fitoplasmas y/o específicos de grupo ribosomal e identificadas por análisis de sus perfiles de restricción enzimática (RFLP).

Los resultados del estudio revelaron la presencia de los virus GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, ArMV y ToRSV, reportando además por primera vez en Chile la presencia de GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus detectados con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y Fleck. La identificación de fitoplasmas mostró la presencia de miembros de los grupos *Aster yellow* (16SrI-B y I-C), *Ash yellow* (16SrVII) y *Stolbur* (16SrXII-A) en infecciones únicas o mixtas. Estos resultados constituyen la primera identificación de fitoplasmas de los grupos 16SrVII y XII en Chile, correspondiendo además al primer reporte mundial de la presencia de miembros del grupo VII en vides.

Financiado por proyecto FIA BIOT-01-A-013.

84. USE OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING FOR DETECTION XYLEM BLOCKAGES IN XYLELLA FASTIDIOSA-INFECTED GRAPEVINES.

Alonso Pérez¹, Carl Greve¹, Jeffrey Walton², Ken Shackel¹, Eleanor Thorne³, Mark Matthews³, Susan Lurie⁴ and John Labavitch¹ OF

Pomology Department¹, Nuclear Magnetic Resonance Facility², and Department of Viticulture and Enology³. University of California, Davis. agperez@ucdavis.edu.

Agricultural Research Organization of Israel, The Volcani Center⁴.

Pierce's Disease (PD) is a serious bacterial disease of grapevines in California that is caused by the xylem-limited bacterium

Xylella fastidiosa (Xf). Vines affected by PD become nonproductive, declining in vigor and ultimately dying from the disease within two years. Currently, there is no known cure for the disease. Until recently, it was thought that multiplication of the bacteria within the xylem-vessels was the sole factor responsible for the blockage of the water movement in the plant. However, results from our studies have provided substantial support for the idea that vessel obstructions, and likely other aspects of PD syndrome, result from the grapevine's active responses to the presence of Xf, rather than to the direct action of the bacterium. The use of Magnetic Resonance Imaging (MRI) to observe the distribution of water within the xylem has allowed us to test the role of the plant hormone ethylene in promoting xylem obstruction development and consequent reduction in vine water transport. Thus far, MRI has shown a clear, progressive and localized deterioration of water movement capacity of grapevines treated with exogenous ethylene. The loss of xylem function (assessed by MRI) has been also correlated with two kinds of physical xylem obstructions; these are tyloses (balloon-like outgrowth from living parenchyma cells adjacent to vessels that expand into and fill the water-conducting cells) and carbohydrate-rich gels that can plug the vessels. We think that ethylene may be involved in a series of cellular events that sense the presence of Xf and stimulate a plant defense response that includes the production of tyloses and gels, perhaps in an effort to slow systemic movement of the bacteria.

85. IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA UVA FRENTE A *Botrytis Cinerea*, *Penicillium Expansum* Y



Asociación Argentina
de Fitopatólogos

Libro de Resúmenes

**XIII Congreso Latinoamericano
de Fitopatología**

**III Taller de la Asociación
Argentina de Fitopatólogos**

19 - 22 de abril de 2005 - Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina

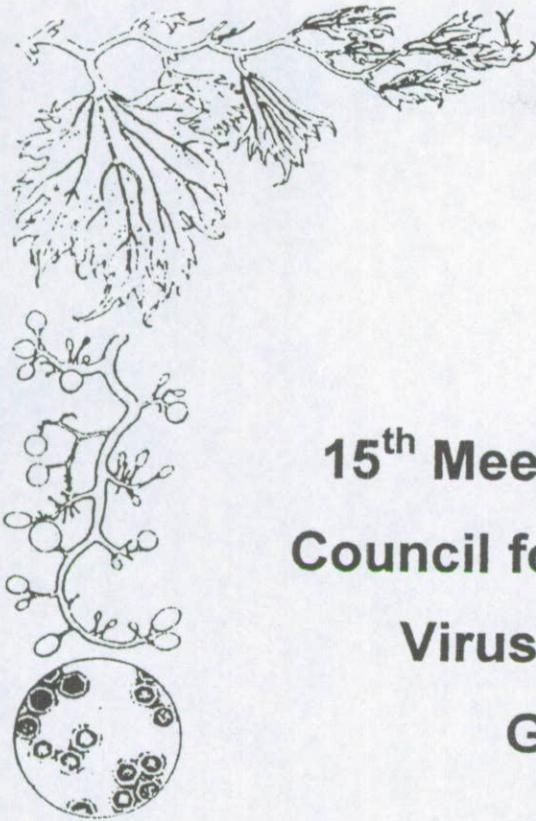
ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR VIRUS Y FITOPLASMAS EN VIDES CHILENAS (Virus and phytoplasmas diseases in chilean grapevine)

C. Valdivia¹, A. Gajardo¹, S. Prodán¹, S. Botti², A. M. Pino¹, A. Bertaccini², J. Montealegre¹ y N. Fiore¹. ¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. Casilla 1004, Santiago. ²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale, Bologna, Italia. carvaldi@uchile.cl

En el marco del proyecto FIA "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid" se realizó una prospección en viñedos y parronales ubicados en las regiones IV, V, VI, VII y Metropolitana para la identificación de plantas con síntomas atribuibles a la presencia de virus y/o fitoplasmas. Se recolectaron muestras sintomáticas y asintomáticas que fueron analizadas utilizando las técnicas de ELISA y/o RT-PCR para la detección de Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll associated virus -1, -2, and -3 (GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), Tomato ringspot virus (ToRSV), Strawberry latent ringspot virus (SLRV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine fleck virus (GFkV), Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) y Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV). La detección de fitoplasmas se realizó mediante la amplificación por PCR anidada utilizando los partidores P1/P7 y R16F2/R2, que reconocen secuencias específicas del operón de genes ribosomales de estos microorganismos. Se encontraron los virus GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Aquellos detectados con mayor frecuencia fueron GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV y GVA. Con respecto a los fitoplasmas, la caracterización enzimática de los productos de amplificación obtenidos y el análisis de secuencias de algunos de ellos, permitieron la identificación de los subgrupos 16SrI-B (aster yellows), 16SrI-C (clover phyllody), 16SrVII-A (ash yellows) y 16SrXII-A (stolbur). Con este trabajo se determinó por primera vez en Chile la presencia de los virus GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV y a nivel mundial la presencia de fitoplasmas del subgrupo VII-A en vides.

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

VETETIOLOGÍA
VIRUS



**15th Meeting of the International
Council for the Study of Virus and
Virus-like Diseases of the
Grapevine (ICVG)**

3-7 April 2006

Stellenbosch, South Africa

Extended abstracts

Although abstracts are published as received from authors, minor changes to the layout has been made. While every effort has been made to reproduce abstracts in their original form, SASEV regrets errors which may have arisen during the printing process.

ISBN 1-86849-318-0

Acknowledgements: Prof P.G. Goussard, Mr Abraham Vermeulen and Mrs R. Carstens photo's on cover page

CORRECT CITATION

Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006, pg. - pg.



Title: 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine – Extended Abstracts.

Editor: None - Published as received

Publisher: South African Society for Enology and Viticulture

ISBN: 1-86849-318-0

DIVERSITY OF 16SRXII PHYTOPLASMAS DETECTED IN GRAPEVINE GROWING AREAS WORLDWIDE

A. Bertaccini^{1*}, S. Paltrinieri¹, S. Botti¹, B. Duduk², N. Fiore³, M. Kolber⁴, D. Skoric⁵, E. Torres⁶, M. Conti⁷

¹DiSTA, Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, viale Fanin, 42, 40127 Bologna, Italy Telephone/Fax ++390512096723 E-mail Bertaccini_a@biblio.cib.unibo.it

²Agricultural Research Institute "Serbia", Pesticide and Environmental Research Centre, Banatska 31b, 11080 Zemun, Belgrade, Serbia

³Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, Santiago. Chile

⁴Central Service for Plant Protection and Soil Conservation, Budapest, Hungary

⁵Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Marulićev trg 9a, Zagreb, Croatia

⁶Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

⁷Istituto di Virologia vegetale, CNR, Strada delle Cacce, 73, Torino, Italy

Introduction

During the last five years, severe spreading of Bois Nois (BN) phytoplasmas '*Candidatus* Phytoplasma solani', has been described (Bertaccini *et al.*, 2003) in several grapevine-growing areas, where samples of grapevines, other plant species and insect vectors, or potential BN vectors – were collected. Molecular identification of BN-related phytoplasmas performed on 16S ribosomal gene on grapevine samples, allowed to find some variability that does not appear to be involved in the epidemiology of this disease (Bertaccini *et al.*, 2004; Botti *et al.*, 2005). Preliminary results obtained on both grapevine and the leafhoppers *Hyalesthes obsoletus* Signoret and *Reptalus panzeri* Löw collected in heavily BN-infected Italian vineyards, indicated that the use of *Tuf* gene could help in studying the spreading of BN phytoplasmas (Botti *et al.*, 2005). Further research was performed in several grapevine growing regions worldwide, in order to evaluate the usefulness of *Tuf* gene polymorphism in BN epidemiological studies.

Material and Methods

Grapevine samples collected since 2002 onwards in several regions of Northern Italy [Emilia Romagna (MO, RE, BO, RA), Veneto (PD, VE, VR), Lombardy (BS), Piedmont (AT), and of Central and Southern Italy [Umbria (PG), Tuscany (SI), and Apulia, (TA)] were analyzed together with samples from Spain (Catalonia), Hungary (Eger, Tolna and Mecsekajka regions), Croatia, Serbia and Chile. Seventy-eight samples of different plant species growing in, or in close proximity of BN infected vineyards in Modena (MO), Reggio Emilia (RE), and Asti (AT) Italian provinces, as well as from Rasina County in Serbia were tested. Two hundred and seventy samples of *H. obsoletus*, and 190 of *R. panzeri* (frequently captured in vineyards in which BN phytoplasmas were detected : Palermo *et al.*, 2004), collected in MO and RE provinces were also tested. Nucleic acids of plants and insects were extracted following different protocols, from 1 g of phloem tissue, or insect batches, respectively. Direct PCR with universal primer pair P1/P7, followed by nested PCRs using primer pairs F1/B6, R16F2/R2, and/or R16(I)F1/R1 was carried out. PCR products were digested with *TruI*, *RsaI*, *HhaI*, and *Tsp509I* restriction enzymes. In some cases cloning and sequencing of amplified products were also performed following the procedures previously described (Botti and Bertaccini, 2004). Phytoplasmas showing affinity to the ribosomal subgroup 16SrXII were subjected to molecular characterization using *Tuf* gene primers: *Tuf1f/r* in direct PCR, and primers *TufAYf/r* (Schneider *et al.*, 1997), and *TufINT1f/TufINT4r* (Andersen *et al.*, 2004) in nested PCR reactions. RFLP analyses of all obtained amplicons were performed with *HpaII* restriction enzyme.

Results and Discussion

16S rRNA. In the majority of the tested samples (200 grapevine, 18 other plant samples, and 140 insects) no polymorphism was observed after RFLP analyses of 16S ribosomal gene confirming that '*Ca. P. solani*' (stolbur) is associated with grapevine yellows in all the geographical areas surveyed. In only two cases the presence of polymorphisms was ascertained: grapevine samples collected in Chile contained, together with phytoplasmas clearly referable to subgroup 16SrXII-A, one peculiar strain showing, after *TruI* restriction, a double phytoplasma infection profile, referable to 16SrXII and to 16SrI phytoplasmas respectively. After RFLP with *RsaI* on R16(I)F1/R1 amplicons, a 16SrXII-A profile was distinguishable from the typical stolbur RFLP profile. After cloning the 16Sr amplicon of this sample and screening by RFLP, ten recombinant colonies were obtained which showed 3 different profiles. Their sequencing revealed that one phytoplasma was referable to the subgroup 16SrI-A (tomato big bud) while the other two (Chile "a" and "b") were homologous with members of the 16SrXII phytoplasma group. In particular,

Chile "a" (AY739654) and Chile "b" (AY739653) showed 99% and 98% sequence identity to 'Ca. P. solani', respectively, and the latter showed also 97% identity to 'Ca. P. australiense'. Virtual digestion of these sequences confirmed both the RFLP profiles obtained from cloned amplicons: Chile "b" profile was identical to the one detected in the original PCR product from grapevine. A 16S ribosomal gene molecular variant was identified also by RFLP with *Trul* in some of the *R. panzeri* samples collected in RE and MO provinces. The sequence of this molecular variant showed 98% identity with 'Ca. P. solani', however its economic importance remains uncertain since it has not been detected so far in either grapevine or other plant species.

***Tuf* gene.** Only about 70% of all 16SrXII phytoplasmas detected in the samples tested were amplified with the *tuf* gene system, however the *R. panzeri* molecular variant was amplified, and its *Hpa*II restriction profile was different from those previously reported (Langer and Maixner, 2004). Therefore, it was designed as the type D. RFLP analyses performed on amplicons from grapevine collected in all the areas investigated from *Medicago sativa*, *Galega* spp., *Urtica dioica*, *R. panzeri*, *H. obsoletus* from MO and RE provinces, and on *Convolvulus arvensis* from MO, RE, and Rasina county in Serbia, allowed phytoplasma identification of the type B. Type A phytoplasmas were detected in very high percentage of samples from grapevine tested in MO, RE, Verona (VR) and Venice (VE) provinces. The same phytoplasma type (A) was sporadically detected in the Padua (PD), Bologna (BO), Ravenna (RA), Brescia (BS), Perugia (PG) and Siena (SI) provinces of Italy, and in the areas of Brodski-Stupnik, Jazbina and Jaska in Croatia. It was also detected in Italy in *Parthenocissus quinquefolia* from Asti province in mixed infection with type B, and in *H. obsoletus* and *R. panzeri* from MO and RE provinces. The type A phytoplasma was never detected in herbaceous samples even though it appeared to be the most frequent type in both grapevine and *H. obsoletus* samples collected in BN epidemic areas in Italy.

Acknowledgements

Work performed with sponsorships of MiPAF- Italy under the project GIAVI, and of CRPV Emilia-Romagna under the project "Studio sui giallumi da fitoplasma della vite".

References

- Andersen, M.T., Beever, R.E. & Newcomb, R.D., 2004. Polymorphism in the *tuf* gene of 'Candidatus Phytoplasma australiense'. In: 15th Congress of IOM, July 2004, Athens Georgia, USA, p. 129.
- Bertaccini, A., Mori, N., Botti, S., Castiglioni, A., Cavallini, G., & Malossi, A. 2003. Survey on Bois Noir phytoplasmas spreading in vineyards of Modena province (Italy). In: Extended abstracts of the 14th Meeting of the ICVG, September 2003 Locorotondo (Bari), Italy, pp. 104-105.
- Bertaccini, A., Botti, S., Fiore, N., Gajardo, A. & Montealegre, J., 2004. Identification of a new phytoplasma(s) infecting grapevine with yellows in Chile. In: 15th Congress of IOM July 2004, Athens Georgia, USA, pp. 63-64.
- Botti, S. & Bertaccini, A., 2004. Flavescence dorée associated phytoplasmas: identification of molecular variants and epidemiological implications. In: 15th Congr. of IOM, July 2004, Athens Georgia, USA, p. 122.
- Botti, S., Paltrinieri, S., Mori, N., Milanesi, L., Bondavalli, R. & Bertaccini, A., 2005. Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. In: III Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi Milano, Italy, giugno 2005, pp. 73-75.
- Langer, M. & Maixner, M., 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non ribosomal DNA. *Vitis* 43(4), 191-199.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., Orosz, A., Bertaccini, A. & Kölber, M., 2004. Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas. *Vitis* 43(4), 201-203.
- Schneider, B., Gibb, K.S., & Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.

GRAPEVINE VIRUSES IN CHILE: GENOMICS AND DETECTION BASED ON IMMUNOCAPTURE AND MICROARRAY TECHNOLOGIES

E. Engel^{*1,2}, V. Arredondo¹, C. Girardi¹, A. Gonzalez¹, P. Escobar¹, N. Fiore³, P. Arce⁴ & P.D.T. Valenzuela^{1,2,4}

¹Fundación Ciencia Para La Vida

²Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB), Facultad de Agronomía Universidad de Chile³ & Facultad de Cs. Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile⁴. Avda Zañartu 1482, Santiago-Chile.

*Autor for correspondence, eaengeli@yahoo.com, Phone 562-2383178, Fax 562-2372259.

Introduction

Fruit exports are one of the main economic activities of Chile being grapevine among the most important species grown for table grapevine and wine production. As fruit production is widely affected by viral pathogens that diminish the quality and quantity of the fruit obtained, certification programs are being developed. Towards this objective, we decided to isolate and sequence four of the main viruses present in our country: GFLV, GFkV, GLRaV-3 and GLRaV-1. With the sequences available, we produced monoclonal and polyclonal antibodies raised against both, recombinant viral coat proteins and synthetic peptides (Engel *et al*, 2003). Using these tools, we developed sensitive and specific viral detection kits based on ELISA and IC-RT-PCR, they showed to work with a variety of local and foreign infected plants.

Towards the design of a comprehensive parallel viral detection system we produced a microarray chip containing oligonucleotides to detect all viruses known to infect grapevines (Bystricka *et al*, 2005; Bowtell & Sambrook, 2003). These probes are complementary to highly conserved as well as to variable domains of all the known grapevine viruses that have been totally or partially sequenced. This approach will allow the detection in a fast and simple assay of the already known viruses, and detecting new unknown viruses not explicitly represented on the array if their genomes have partial homology with the printed probes.

Material and Methods

Grapevine samples were collected from the central, V and VI geographical regions of Chile. Their sanitary status was confirmed by commercial ELISA and RT-PCR. Total RNA was extracted (Chang *et al*, 1993), and reverse transcription with random hexamers was performed. Different overlapping PCR products were obtained according to the specific viral primers used together with the co-amplification of a grapevine constitutive gene as positive control. For some viruses, 5' and 3' prime race was also performed. Each purified product was cloned in the p-GEM-T easy vector and sequenced. Specific primers containing restriction sites were used to clone the coat protein coding region of each virus in the prokaryotic vectors pET-32a, pET-28a and pGEX 6P-1. Recombinant fusion coat proteins were affinity purified and injected to rabbits and mouse to produce monoclonal and polyclonal antibodies (Van Regenmortel, 1982; Frangioni & Neel, 1993). Additionally, a total of 18 synthetic peptides were produced based on highly immunogenic portions from the coat protein sequences of local isolates of GFLV, GLRaV-1 and GLRaV-3, they were coupled to a carrier and used to obtain polyclonal antibodies (Van Regenmoertel & Muller, 1999). Rabbit antisera and mouse ascitic fluid were analyzed against injected antigens and infected plants. Positive antibodies were used for viral detection purposes by means of TAS-ELISA and IC-RT-PCR (Sefc *et al*, 2000; Clark & Adams, 1977).

A microarray chip containing 574 oligonucleotides, each of 70-mer length was printed in our genomic core facility. Viral sequence data were obtained from our local database of sequenced virus and from curated databases of total or partially sequenced viral genomes in GenBank. Each genome was divided in 70 nt segments offset by 25 nt and alignment was done between each probe and all the viral members from each family. Between 10 and 20 probes were synthesized for each viral genome depending on the size, complexity and amount of sequence available. Additionally, probes complementary to constitutive grapevine genes and hybridization controls were printed.

Results and Discussion

Chilean isolates from 4 of the main viruses present in our country were sequenced. One local isolate of GLRaV-3 and GFLV was completely sequenced and several others local isolates of GLRaV-3, GLRaV-1, GFLV & GFkV were partially sequenced. Their variability rates were analyzed and compared with foreign isolates. GFLV RNA2 showed to have approximately 90% of identity when compared to French and German isolates. GLRaV-3 complete genome showed to have approximately 97% of identity when compared to a US isolate. The coat protein coding regions of these 4 viruses was completely sequenced,

cloned and expressed in *E. coli*. Monoclonal and polyclonal antibodies were produced against these recombinant viral coat proteins. They demonstrated to have very good specificity and titer when compared with commercially available antibodies by IC-RT-PCR or ELISA assays. In all cases, the antibodies capture efficiency was much better when the complete recombinant coat protein was used as antigen instead of a mix of synthetic peptides.

A prototype microarray system was produced and shown to be able to detect most if not all the grapevine viruses. The chip accuracy was validated for several of the viruses using viral genomic libraries and well known infected grapevines. This approach showed to be a powerful and fast diagnostic method when compared with traditional systems (Engel & Valenzuela, 2005).

Acknowledgements

This research was partially financed by Iniciativa Genoma Chile, FONTEC-CORFO and MIFAB.

References

- Bowtell, D. & Sambrook, J. 2003. (1st ed). DNA Microarrays. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, I., Piherova, L., Kmoch, S. & Sip, M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *J Virol Methods*. 128(1-2), 176-182.
- Chang, Puryear & Cairney. 1993. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11(2), 113-116.
- Clark, M. & Adams, A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Engel, E., Arredondo, V., Martinez, R., Fiore, N., Burzio, L.O. & Valenzuela, P.D.T. 2003. Isolation, Sequencing and Expresión of Genes of Chilean Isolates of Grapevine Fanleaf Virus. 14th Meeting of The International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine., September 2003, Locorotondo, Italy. pp. 24.
- Engel, E. & Valenzuela, P.D.T. 2005. Simultaneous Detection of Grapevine Viruses using Microarrays. XLVIII Meeting of the Biological Society of Chile. October 2005, Pucón, Chile.
- Frangioni, J.V. & Neel, B.G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* 210(1), 179-187.
- Sefc, K.M., Leonhardt, W. & Steinkellner H. 2000. Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *J Virol Methods*. 86(1), 101-106.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology and Inmunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, USA.
- Van Regenmortel, M.H.V. & Muller, S. 1999. (1st ed). Synthetic Peptides as Antigens. Elsevier, The Netherlands.

INFLUENCE OF VIRUSES ON THE PERFORMANCE AND QUALITY OF CV. CRIMSON SEEDLESS

M. Digiario¹(*), N. Fiore², L. Tarricone³, S. Prodan² and T. Elbeaino¹

¹Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie 9, 70010, Valenzano (Bari), Italy; ²Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile, Av. Santa Rosa 11315, Santiago, Chile; ³C.R.A., Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Sez. di Turi (BA), Via Casamassima 142, 70010, Turi (Bari), Italy
(*):Tel: +39 080 4606255; Fax: +39 080 4606275; digiario@iamb.it

Introduction

To widen the offer for an increasingly demanding market, a number of new table grape varieties, among which the cv. Crimson Seedless, have been introduced in the last years in Apulia, the leading table grape growing region in Italy, and in Metropolitana IV, V and VI Chile regions. In many areas young vines of Crimson developed a disease condition that caused much concern to the growers. Affected vines delayed bud break by one-two weeks and exhibited extensive bud failure. The vegetation was less vigorous than normal and crop visibly reduced. Leaves displayed a light early reddening and rolling of the blades and bunches were pale-coloured, failing to ripen properly.

The severity of the symptoms suggested to investigate the disorder in more detail to ascertain its nature and the agents involved.

Materials and methods

In autumn 2004 some Crimson vineyards were selected in Apulia and Chilean regions and vines with and without symptoms chosen. Differences in productivity and berry quality between symptomatic and symptomless vines were determined and the viruses present in both types of plants were identified by ELISA.

Tests were made on cortical scrapings extracts by DAS-ELISA (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), DAS-ELISA (GfKv), and protein A-DAS ELISA (GVA) (Boscia *et al.*, 1996). Polyclonal antisera and monoclonal antibodies raised at University of Bari and from Agritest, Valenzano-Bari (Italy), were used as reagents.

Results and discussion

As shown in Tab 1, the presence of symptoms was associated with a remarkable reduction of the yield (from 20 to 44%, in two years of observation) mainly due to the reduced number of fertile buds, thus of bunches per vine. Other significant detrimental effects were the lower sugar content (from 13 to 26%) and the irregular and scarce coloration of the berries (Tab. 2). Because of the pale colouring many of the bunches were unmarketable, the economic loss for the grower was much higher than that caused by the simple reduction in the weight and number of clusters.

Table 1. Influence of sanitary status on vegetative characteristics and bud fruitfulness of Crimson Seedless grapevines in Italian vineyards.

*	Year	Bud load/ vine (n)	Shoots/vine (n)	Clusters/vine (n.)	Clusters per vine/ Buds per vine	Clusters per vine/ Shoots per vine	Yield/ vine (kg)	Yield/hectare (ton)
S	2004	84.67 aA	39.53 aA	25.07 bB	0.29 bB	0.62 bB	11.48 bB	18.37 bB
H		86.93 Aa	44.87 aA	37.67 aA	0.47 aA	0.86 aA	20.37 aA	32.59 aA
S	2005	46.87 aA	27.07 aA	14.93 aA	0.32 aA	0.52 aA	6.54 aA	10.46 aA
H		51.6 aA	29.4 aA	17.33 aA	0.35 aA	0.62 aA	8.18 aA	13.09 aA

* S = symptomatic; H = symptomless;

Values followed by different letters differ at $P \leq 0,05$ (small letters) e per $P \leq 0,01$ (capital letters)

Table 2. Influence of sanitary status on the cluster and colour characteristics on Crimson Seedless at harvest.

*	Year	Vineyard	Cluster Weight (g)	Berries/ Cluster (n.)	Berry weight (g)	Total soluble Solids (^o Brix)	Brightness** L
S	2004	1	457,97 bA	100,93 bA	4,53 aA	12,70 bB	38,49 aA
H	2004	1	540,80 aA	115,77 aA	4,70 aA	17,23 aA	31,17 bB
S	2004	2	604, 8 aA	144,90 aA	4,20 bB	14,81 bB	40,14 aA
H	2004	2	573,17 aA	114,14 bB	4,96 aA	20,10 aA	30,15 bB
S	2005	1	437,72 aA	134,50 aA	3,22 bA	14,13 bB	29,80 aA
H	2005	1	472,03 aA	118,65 aA	3,92 aA	16,20 aA	20,68 bB

* S = symptomatic; H = symptomless; **this parameter is strictly correlated with the colour and to the anthocian content. Values followed by different letters differ at $P \leq 0,05$ (small letters) e per $P \leq 0,01$ (capital letters).

All six viruses tested were detected, to a different extent, in the totality of the 166 vines examined (Table 3). Symptomatic vines had an higher infection rate (94%) than symptomless vines (69%). The surprisingly high infection rate of symptomless vines was mainly due to GLRaV-2 (63%), which was detected in all the Italian Crimson vines tested, and to GFkV (24%). In symptomatic vines the most common viruses were: GLRaV-2 (80%), GFkV (72%), GLRaV-3 (67%), GVA (64%) and GLRaV-1 (35%). GFLV was detected only in 4 vines in Chile, therefore its presence was considered only occasional and unrelated with the disease. GLRaV-1, GLRaV-3 and GVA were only sporadic or completely absent in symptomless vines.

Table 3. Results of ELISA tests on Chilean (Ch) and Italian (It) vines of cv. Crimson.

*	Total vines (n.)	Infected vines (%)	GVA (%)	GLRaV-1 (%)	GLRaV-2 (%)	GLRaV-3 (%)	GFkV (%)	GFLV (%)
Ch S	43	86	35	60	56	37	42	9
Ch H	27	19	15	-	-	-	4	-
It S	51	100	88	14	100	92	98	-
It H	45	100	7	-	100	9	36	-
Tot S	94	94	64	35	80	67	72	4
Tot H	72	69	10	-	63	6	24	-

* S = symptomatic; H = symptomless

A comparative analysis of virus incidence in diseased and symptomless vines (Tab. 3) suggests that: (i) the syndrome under study has a clear-cut viral origin since, in general, symptomatic vines in both countries had the worst sanitary condition. In Chile 86% of symptomatic vines were infected, versus 19% of the symptomless ones, and in Italy, if GLRaV-2 is excluded because of its presence in all vines tested, 100% of symptomatic vines were infected, versus 40% of the symptomless ones; (ii) excepted for GLRaV-2, whose presence was consistent in both symptomatic and symptomless vines (in particular in Italian vineyards), the other viruses looked for, i.e. GLRaV-1, GLRaV-3, GVA and GFkV, were detected at a significant higher rate in symptomatic than in symptomless vines; (iii) rather than by the infection by single specific viruses, as the widespread presence of GLRaV-2 also in symptomless vines seems to indicate, the diseased status seems to be determined and enhanced by mixed infections by two or more viruses; (iv) viruses of the *Closteroviridae* family seem to have a major role in eliciting leafroll and its detrimental effects, as suggested by their highly frequent detection in most of the Italian and Chilean symptomatic vines; (v) GVA and GFkV, which were especially found in symptomatic Italian vines, seem to influence the severity of the symptoms.

The origin of such a heavy presence of filamentous viruses is unknown, but it is likely that it came from budwood and/or rootstocks rather than from mealybug vectors. If so, the present case represent a further example of the devastating consequences of the introduction of new varieties in an area without previous evaluation of their susceptibility to the prevailing viruses, and of the use of sanitary uncontrolled propagation material.

References

Boscia D., Digiario M., Fresno J., Greif C., Grenan S., Kassemeyer H.H., Prota V.A. and De Sequeira O., 1997. ELISA for the detection and identification of grapevine viruses. In: Walter, B. (ed.). Sanitary Selection of the Grapevine. Protocols for Detection of Viruses and Virus-like Diseases. *Les Colloques* INRA 86, 129-155.

Publicaciones internacionales

AETIOLOGY OF DECLINE IN THOMPSON SEEDLESS GRAFTED TABLE GRAPE PLANTS

S. Prodan, J. Montealegre and N. Fiore

Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago de Chile, Chile.

Chile is an important producer of table grapes, with a planted area that has grown 5.4% in the period 1998-1999, reaching 50862 ha. During these last years, the natural aging of plantations and the introduction of new varieties have prompted an intense replanting using grafted plants especially on soils with history of nematode infestation and high levels of plant pathogenic microorganisms.

Grafting on table grapes is a technique recently introduced in Chile, and this may cause problems related with an inadequate agronomic management together with the presence of graft transmissible pathogens that can generate incompatibility phenomenon. (2, 3).

In the 2000-2003 period, particularly in farms planted with the variety Thompson Seedless, grafted on Freedom and Harmony, a syndrome identifiable as "Decline of Grafted Plants" has been observed.

The main symptoms of this alteration are a local excessive growing of tissue in the point of graft union, with an internal necrosis and incomplete connection between the conductive elements of the rootstock and scion. In some cases these symptoms continue with a lesser development and even the death of the plants affected. Also, and with some frequency, it is possible to observe a good progress of the variety but not of the rootstock, which presents a stem diameter reduced comparable with the scion, and a root system clearly insufficient to support the demand of nutrients and water. Normally, these alterations are expressed during the first 2-4 months after planting, from mid spring to summer.

With the objective of studying the cause of the symptoms described, several plant pathology analyses have been conducted on plants of Thompson Seedless grafted onto Freedom and Harmony, with and without symptoms of the decline, using DAS-ELISA technique for the diagnosis of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, and 3* (GLRaV-1, GLRaV-2, and GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), and *Grapevine virus A* (GVA), and DASI-ELISA for *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine fleck virus* (GFkV). The antibodies were obtained from Agritest, Bioreba and Loewe and the assays were performed according to manufacturer's instructions. The same samples have been analyzed also through RT-PCR to detect *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine rootstock stem lesion associated virus* (GRSLaV), GLRaV-2, GVA, GVB, and GFkV (1, 4, 5, 6, 7). Also, some samples have been analyzed to determine the eventual presence of fungi and bacteria as agents possibly causing the alteration described.

From the plants analyzed through ELISA and RT-PCR, positive results were obtained only for GLRaV-2, GFkV, GVA and GRSLaV. As presented in Table 1, the highest percentage of positive from all analyzed plants occurred for GLRaV-2 and GFkV, for both symptomatic and asymptomatic plants.

Results between Thompson Seedless plants grafted onto Freedom or Harmony were not too different, excepting that GVA was detected only in the second case.

In none of the samples analyzed were found phytopathogenous bacteria, but in some of them the presence of *Verticillium dahliae* and *Fusarium* spp. fungi was determined in the necrotic area of the rootstock-scion union.

Table 1. Results of RT-PCR assay

Plants	Plants analyzed	% plants positive	% plants positive to different viruses			
			GLRaV-2	GFkV	GVA	GRSLaV
THOMPSON SEEDLESS/FREEDOM with symptoms	20	65.0				
	17	58.8	65.0	60.0	0.0	5.0
THOMPSON SEEDLESS/HARMONY with symptoms	16	56.3				
	13	46.2	25.0	31.2	18.7	0.0
			23.0	30.8	15.4	0.0

From the results, it is evident that GLRaV-2 and GFkV were the virus with the highest frequency in the samples analyzed. Even though the percentages of incidence were greater in the plants with symptoms than in those asymptomatic, differences are not important as to indicate certainly that one or both pathogens would be responsible directly for the decline.

It has been observed also during the three seasons of the study that a high proportion of the plants affected have been able to survive the crisis and achieve a sustained development of vegetation, and even to obtain good production levels. Besides, it has been determined that many plants which were positive for GLRaV and GFkV never expressed decline symptoms.

The low percentage of infection by GRSLaV and GVA definitely excludes these agents as causing the alterations. The fungi detected are also not responsible for the problem, they act as opportunistic pathogens, that means they develop due to the general stress condition that the plants present. But without any doubt they contribute, together with GLRaV-2 and GFkV, to worsen drastically the condition of the plants in the more critical cases.

After the three season observations conducted to determine the cause of the "Decline of Grafted Plants" in Thompson Seedless table grapes, it is concluded that this phenomenon does not seem to be related clearly with the virus and pathogens herein mentioned. Considering that there are no evidences of genetic incompatibility in grapes, it is necessary to continue studying the causes of grapevine decline, without forgetting to investigate aspects of grafting techniques and agronomic management of plants in commercial vineyards.

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013

References

1. Abou-Ghanem N., Sabanadzovic S., Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G. P., 1998. Some properties of grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80:37-46.
2. Golino D.A., 1993. Potential interaction between rootstocks and grapevine latent virus. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(2):148-152.
3. 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.
4. McKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S. and Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
5. Minafra A. and Hadidi A., 1992. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by c-DNA amplification. *Journal of Virological methods* 47:175-188.
6. Rowhani A, Zhang Y.P., Golino D. A. and Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings. Adelaide, Australia.* P.82.
7. Shi B.J., Habili N. and Symons R.H., 2000. Grapevine Fleck virus : large sequence variation in a small region of the genome. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings. Adelaide, Australia* P. 78.

SURVEY ON PHYTOPLASMAS IDENTIFIED IN CHILEAN GRAPEVINES

A. Gajardo¹, S. Botti², J. Montealegre¹, N. Fiore¹ and A. Bertaccini²

¹Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile

²DiSTA, Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, via F. Re 8, 40126 Bologna, Italy

Objectives

To verify association of phytoplasmas with yellows symptoms detected in Chilean grapevines plants in the last two years molecular detection was employed to test samples collected in the grapevine growing region of the state. First years of survey allow to identify 16SrI-C phytoplasmas in some of the symptomatic plants examined (7), during 2003 further monitoring was performed to cover the main grapevine growing areas of Chile.

Material and Methods

Grapevine samples showing typical yellows symptoms were collected starting from March 2002 from the V, VI, VII and Metropolitana Regions (RM) of Chile. The molecular testing was carried out on 14 samples in 2002 and on 41 in 2003. Total nucleic acids were extracted from 1 g of leaf midribs following the protocols described by Prince *et al.* (10) in 2002, and by Zhang *et al.* (12) in 2003 with further silica particles purification step, diluted to a final concentration of 20 ng/μl in sterile deionized water. One μl of this dilution was used in direct PCR using universal primer pair P1/P7 (6, 11), followed by nested PCR on products diluted 1:30 in sterile distilled water, using primer pair R16F2/R2 (9). Group specific primers R16(I)F1/R1 and R16(V)F1/R1 (9) were finally employed to increase detection sensitivity. Primers M1/M2 (8) were also employed in nested-PCR to cross confirm results. Each 25 μl PCR reaction mix contained 2,5 μl 10X PCR buffer, 0,8 U of *Taq* polymerase (Polymed, Florence, Italy), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ and 0,4 μM each primer. Thirty-five PCR cycles were performed in an automated thermocycler (Biometra, Uno Thermoblock, Gottingen, Germany, EU) under the following conditions: 1 min (2 min for the first cycle) denaturation step at 94°C, 2 min for annealing at 50°C and 3 min (10 min for the last cycle) for primer extension at 72°C. Six μl of PCR products were analyzed in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide, and then visualized with a UV transilluminator. To differentiate among phytoplasmas, PCR products were digested with *TruI*, *TaqI*, *RsaI*, *AclI*, *HhaI*, and *Tsp509I* restriction enzymes according with the amplicon studied, and RFLP fragments were separated in a 5% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide, and then visualized with an UV transilluminator and profiles were compared with those of described phytoplasma strains.

Results

Molecular analyses demonstrated phytoplasma association with yellows disease in the surveyed vineyards of Chile: phytoplasmas were identified in grapevines collected in the regions studied in both 2002 and 2003. These phytoplasmas were mainly detected with nested PCR using general primers R16F2/R2 and M1/M2 and/or with R16(I)F1/R1 specific primers; identification was obtained by RFLP using the above mentioned enzymes. Phytoplasma identification showed the presence of phytoplasmas belonging to 16SrI-C subgroup (Fig. 1) in 2002 samples, the same subgroup was occasionally detected in grapevine in the past in Italy in both Veneto region (3) (North Italy) and recently in Abruzzo region (5) (Central-South Italy). In 2003 samples, 16SrI-B phytoplasmas were identified together with phytoplasmas belonging to group 16SrVII (Fig. 2) in some cases in mixed infection (data not shown); phytoplasmas of this subgroup were detected in grapevine in both north and south Italy (1, 4). Phytoplasmas of group 16SrVII were never reported before in grapevine; they were however reported to infect ash and lilac in the US and a subgroup 16SrVII-B has been identified in South America (Brazil) in São Paulo state in *Erigeron* and *Catharanthus roseus* plants naturally infected and showing witches' broom symptoms (2). Phytoplasma clearly referable to group 16SrXII-A ("Bois Noir") (3) were also identified together with a previously unreported RFLP profile in sample 28 on amplicons obtained with R16(I)F1/R1 with four restriction enzymes (Fig. 2). This phytoplasma show profiles referable to group 16SrI or 16SrXII-A.

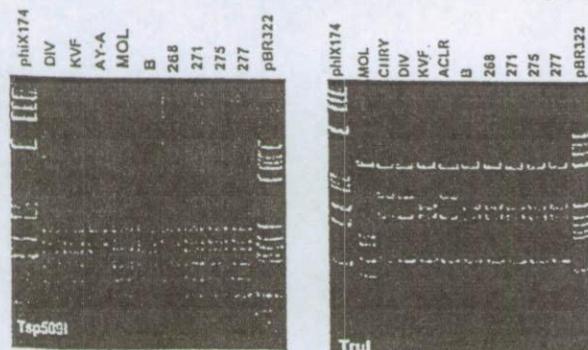


Fig. 1. Polyacrylamide gels (5%) showing the *Tsp509I* and the *TruI* RFLP patterns of phytoplasma rDNA fragments obtained after nested PCR with primers R16(I)F1/R1 from grapevine samples with yellows symptoms from Chile 2002. Phytoplasma reference strains: MOL, Molière disease (16SrXII-A); CHRY, Chrysanthemum yellows from Germany (16SrI-A); DIV, diplotaxis virescence (16SrI-B); KVF, clover phyllody from France (16SrI-C); AY-A, aster yellows from Spain (16SrI-F). Markers: φX174 *HaeIII* digested: fragment sizes in base pairs from top to bottom: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, and 72; pBR322 *MspI* digested: fragment sizes in base pairs from top to bottom: 622, 527, 404, 307, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34.

with *HhaI*, profiles referable to 16SrXII-A with *Tsp509I* and *TruI* but it differs from all the employed controls with *RsaI*. No FD phytoplasmas were identified in the samples analysed. All the samples resulted to be positive were collected from symptomatic grapevine plants located in VI, VII and Metropolitana Regions of Chile. There were not evidence of epidemic spreading of yellows symptoms in the surveyed vineyards.

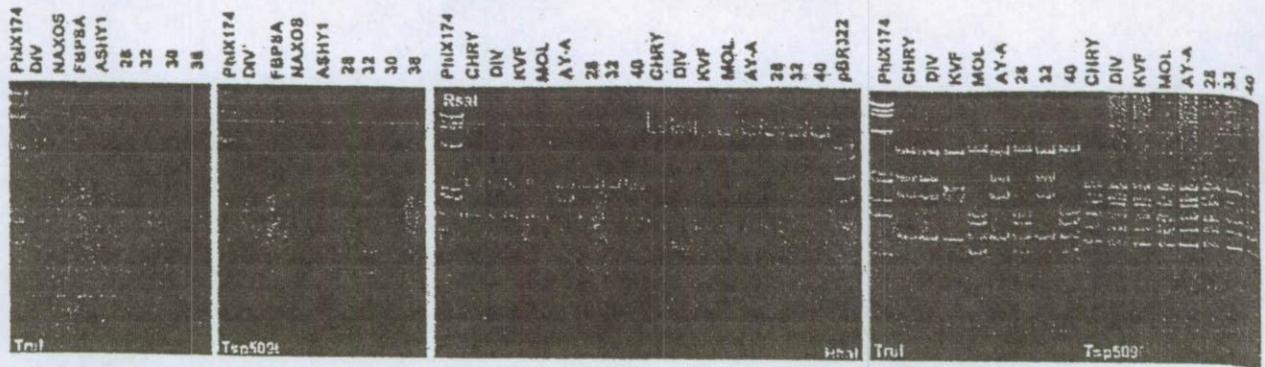


Fig. 2. Polyacrylamide gels (5%) showing the RFLP patterns of phytoplasma rDNA fragments obtained after nested PCR from grapevine samples with yellows symptoms collected in Chile in 2003. RFLP with *TruI* and *Tsp509I* on the left were obtained on M1/M2 amplicons; profiles with *RsaI*, *HhaI*, *TruI* and *Tsp509I* on the right were obtained on R16(I)F1/R1 amplicons. Sample 28 show the undescribed profile referable to groups 16SrI and XII. Phytoplasma reference strains not in fig. 1: NAXOS, periwinkle virescence from Sicily (group 16SrIX-C), FBPSA, faba bean phyllody from Sudan (16SrII-C), ASHY1, ash yellows from New York State, US (16SrVII-A).

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013.

References

- Alma A., Davis R.E., Vibio M., Danielli A., Bosco D., Arzone A. and Bertaccini A., 1996. Mixed infection of grapevines in Northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease* 80: 418-421.
- Barros T.S.L., Davis R.E., Resende O.R. and Dally E.L., 2002. Erigeron witches' broom phytoplasma in Brazil represents a new subgroup VI-B in 16S rRNA gen group VII, the Ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86: 1142-1148.
- Bertaccini A., Murari E., Vibio M., Danielli A., Davis R.E., Borgo M., Consolaro R. and Sancassani P., 1996. Identificazione molecolare dei fitoplasmi presenti in viti affette da giallumi nel Veneto. *L'Informatore Agrario* 20:55-59.
- Bertaccini A., Vallillo E., Murari E. and Martini M., 1999. Presenza di legno nero in Molise. *L'Informatore Agrario* 2: 62-63.
- D'Ascenzo D., Botti S., Paltrinieri S., Di Giovanni R., Di Silvestro D. and Bertaccini A., 2003. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Abruzzo region (Italy). 14th Meet. Intern. Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) Sept. 12-17, Locorotondo (BA), Italy (this volume).
- Deng S. and Hiruki C., 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479.
- Fiore N., Botti S., Montealegre J. and Bertaccini A., 2002. Primer reporte de fitoplasmas en vides Chilenas. XII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Puerto Varas, Xª región. Chile 1-4 octubre 2002: 45.
- Gibb K.S., Padovan A.C. and Mogen B.A., 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85: 169-174.
- Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M. and Gundersen D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.
- Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R. and Barba M., 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83: 1130-1137.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D. and Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2: 369-380. S. Razin e J.G. Tully eds., Academic Press, New York.
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.

REPORT OF NEW VIRAL DISEASES IN CHILEAN GRAPEVINES

S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino, P. Fernández, R. Reyes and N. Fiore

Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana. Santiago de Chile, Chile.

In order to study the phytosanitary conditions of Chilean grapevines, and responding to the increasing preoccupation for lower quantitative and qualitative levels of production that appear in some areas, we began in 2002 a prospective study aimed at covering a significantly large geographical area, from the north (4th Region), passing through the central (5th and Metropolitan Regions) and ending in the south (6th and 7th Regions) production zones of Chile. The material, collected during the winter season (June-July) from 15 areas, consisted of mature canes from plants with symptoms, that may indicate viral infection, and also symptomless plants. The most frequent symptoms were a yellowish, mosaic and downwards rolling of the leaves, a poor coloration of the berry, low production, and a decline of the whole plant.

The 366 plants collected were analyzed through DAS-ELISA to detect *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, and 3* (GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), and *Grapevine virus A* (GVA). DASI-ELISA was used to determine *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine fleck virus* (GFkV). ELISA kits from Agritest, Bioreba and Loewe were used according to the manufacturer's instructions.

Sixty-two of the samples collected were also analyzed through RT-PCR to detect *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine rootstock stem lesion-associated virus* (GRSLaV), GLRaV-2, GVB, GVA (1, 2, 3, 4). Also, some of the ELISA positive samples for GFkV were analyzed through RT-PCR (5). Both techniques were performed on phloem tissue grinded 1:10 (w/vol) in the respective grinding buffer.

From all plants analyzed by ELISA, 60% were positive for at least one virus. This study reveals the presence of GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, GVB, GFkV, ArMV, and ToRSV. GLRaV-2 and GFkV had the greatest infection levels (30.1 and 28.7%, respectively), followed by GVA (13.7%), GFLV (10.7%), GLRaV-3 (10.1%), GLRaV-1 (9.3%), GVB (2.2%), ToRSV (1.6%) and ArMV (0.5%). SRLV was not detected. The most affected table grapes were Thompson Seedless (78.4%), Superior (71.4%), Crimson Seedless (63%), and Flame (8.3%); and the vine varieties were Syrah (91.7%), Sauvignon Blanc (86.7%), Cabernet Sauvignon (65.6%), Merlot (57.9%), and Chardonnay (28.6%).

Two viruses never reported previously in Chile were found through RT-PCR: GRSPaV and GRSLaV, with 22.6 and 19.4% infection levels, respectively. ELISA results were confirmed for GVA, GVB and GFkV meanwhile the results for GLRaV-2 virus were just partially confirmed by RT-PCR. The exception was Red Globe variety, where the ELISA positive samples showed to be in fact GRSLaV positive. The two viruses show a 74% genomic sequence similarity and cross-reaction occurs when using the commercial ELISA kit for GLRaV-2 detection (4).

The results indicate that in Chile are present the most important viruses that affect grapevines, and GVB, GFkV, GRSLaV and GRSPaV are reported for the first time.

Research supported by Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile. Proyecto FIA BIOT-01-A-013.

References

1. Abou-Ghanem N., Sabanadzovic S., Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G. P., 1998. Some properties of grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80:37-46.
2. McKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S. and Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
3. Minafra A. and Hadidi A., 1992. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by c-DNA amplification. *Journal of Virological methods* 47:175-188.
4. Rowhani A., Zhang Y.P., Golino D. A. and Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*, Adelaide, Australia. P. 82.
5. Shi B.J., Habili N. and Symons R.H., 2000. Grapevine fleck virus: large sequence variation in a small region of the genome. In: *Proceedings of the 13th ICVG Meetings*, Adelaide, Australia P. 78.

DIVERSITY OF 16SRXII PHYTOPLASMAS DETECTED IN GRAPEVINE GROWING AREAS WORLDWIDE

A. Bertaccini^{1*}, S. Paltrinieri¹, S. Botti¹, B. Duduk², N. Fiore³, M. Kolber⁴, D. Skoric⁵, E. Torres⁶, M. Conti⁷

¹DiSTA, Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, viale Fanin, 42, 40127 Bologna, Italy Telephone/Fax ++390512096723 E-mail Bertaccini_a@biblio.cib.unibo.it

²Agricultural Research Institute "Serbia", Pesticide and Environmental Research Centre, Banatska 31b, 11080 Zemun, Belgrade, Serbia

³Departamentos de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, Santiago. Chile

⁴Central Service for Plant Protection and Soil Conservation, Budapest, Hungary

⁵Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Marulićev trg 9a, Zagreb, Croatia

⁶Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

⁷Istituto di Virologia vegetale, CNR, Strada delle Cacce, 73, Torino, Italy

Introduction

During the last five years, severe spreading of Bois Nois (BN) phytoplasmas '*Candidatus Phytoplasma solani*', has been described (Bertaccini *et al.*, 2003) in several grapevine-growing areas, where samples of grapevines, other plant species and insect vectors, or potential BN vectors – were collected. Molecular identification of BN-related phytoplasmas performed on 16S ribosomal gene on grapevine samples, allowed to find some variability that does not appear to be involved in the epidemiology of this disease (Bertaccini *et al.*, 2004; Botti *et al.*, 2005). Preliminary results obtained on both grapevine and the leafhoppers *Hyalesthes obsoletus* Signoret and *Reptalus panzeri* Löw collected in heavily BN-infected Italian vineyards, indicated that the use of *Tuf* gene could help in studying the spreading of BN phytoplasmas (Botti *et al.*, 2005). Further research was performed in several grapevine growing regions worldwide, in order to evaluate the usefulness of *Tuf* gene polymorphism in BN epidemiological studies.

Material and Methods

Grapevine samples collected since 2002 onwards in several regions of Northern Italy [Emilia Romagna (MO, RE, BO, RA), Veneto (PD, VE, VR), Lombardy (BS), Piedmont (AT), and of Central and Southern Italy [Umbria (PG), Tuscany (SI), and Apulia, (TA)] were analyzed together with samples from Spain (Catalonia), Hungary (Eger, Tolna and Mecsekajka regions), Croatia, Serbia and Chile. Seventy-eight samples of different plant species growing in, or in close proximity of BN infected vineyards in Modena (MO), Reggio Emilia (RE), and Asti (AT) Italian provinces, as well as from Rasina County in Serbia were tested. Two hundred and seventy samples of *H. obsoletus*, and 190 of *R. panzeri* (frequently captured in vineyards in which BN phytoplasmas were detected : Palermo *et al.*, 2004), collected in MO and RE provinces were also tested. Nucleic acids of plants and insects were extracted following different protocols, from 1 g of phloem tissue, or insect batches, respectively. Direct PCR with universal primer pair P1/P7, followed by nested PCRs using primer pairs F1/B6, R16F2/R2, and/or R16(I)F1/R1 was carried out. PCR products were digested with *TuI*, *RsaI*, *HhaI*, and *Tsp509I* restriction enzymes. In some cases cloning and sequencing of amplified products were also performed following the procedures previously described (Botti and Bertaccini, 2004). Phytoplasmas showing affinity to the ribosomal subgroup 16SrXII were subjected to molecular characterization using *Tuf* gene primers: *Tuf1f/r* in direct PCR, and primers *TufAYf/r* (Schneider *et al.*, 1997), and *TufINT1f/TufINT4r* (Andersen *et al.*, 2004) in nested PCR reactions. RFLP analyses of all obtained amplicons were performed with *HpaII* restriction enzyme.

Results and Discussion

16S rRNA. In the majority of the tested samples (200 grapevine, 18 other plant samples, and 140 insects) no polymorphism was observed after RFLP analyses of 16S ribosomal gene confirming that '*Ca. P. solani*' (stolbur) is associated with grapevine yellows in all the geographical areas surveyed. In only two cases the presence of polymorphisms was ascertained: grapevine samples collected in Chile contained, together with phytoplasmas clearly referable to subgroup 16SrXII-A, one peculiar strain showing, after *TuI* restriction, a double phytoplasma infection profile, referable to 16SrXII and to 16SrI phytoplasmas respectively. After RFLP with *RsaI* on R16(I)F1/R1 amplicons, a 16SrXII-A profile was distinguishable from the typical stolbur RFLP profile. After cloning the 16Sr amplicon of this sample and screening by RFLP, ten recombinant colonies were obtained which showed 3 different profiles. Their sequencing revealed that one phytoplasma was referable to the subgroup 16SrI-A (tomato big bud) while the other two (Chile "a" and "b") were homologous with members of the 16SrXII phytoplasma group. In particular,

Chile "a" (AY739654) and Chile "b" (AY739653) showed 99% and 98% sequence identity to 'Ca. P. solani', respectively, and the latter showed also 97% identity to 'Ca. P. australiense'. Virtual digestion of these sequences confirmed both the RFLP profiles obtained from cloned amplicons: Chile "b" profile was identical to the one detected in the original PCR product from grapevine. A 16S ribosomal gene molecular variant was identified also by RFLP with *Tru1* in some of the *R. panzeri* samples collected in RE and MO provinces. The sequence of this molecular variant showed 98% identity with 'Ca. P. solani', however its economic importance remains uncertain since it has not been detected so far in either grapevine or other plant species.

Tuf gene. Only about 70% of all 16SrXII phytoplasmas detected in the samples tested were amplified with the *tuf* gene system, however the *R. panzeri* molecular variant was amplified, and its *HpaII* restriction profile was different from those previously reported (Langer and Maixner, 2004). Therefore, it was designed as the type D. RFLP analyses performed on amplicons from grapevine collected in all the — areas investigated from *Medicago sativa*, *Galega* spp., *Urtica dioica*, *R. panzeri*, *H. obsoletus* from MO and RE provinces, and on *Convolvulus arvensis* from MO, RE, and Rasina county in Serbia, allowed phytoplasma identification of the type B. Type A phytoplasmas were detected in very high percentage of samples from grapevine tested in MO, RE, Verona (VR) and Venice (VE) provinces. The same phytoplasma type (A) was sporadically detected in the Padua (PD), Bologna (BO), Ravenna (RA), Brescia (BS), Perugia (PG) and Siena (SI) provinces of Italy, and in the areas of Brodski-Stupnik, Jazbina and Jaska in Croatia. It was also detected in Italy in *Parthenocissus quinquefolia* from Asti province in mixed infection with type B, and in *H. obsoletus* and *R. panzeri* from MO and RE provinces. The type A phytoplasma was never detected in herbaceous samples even though it appeared to be the most frequent type in both grapevine and *H. obsoletus* samples collected in BN epidemic areas in Italy.

Acknowledgements

Work performed with sponsorships of MiPAF- Italy under the project GIAVI, and of CRPV Emilia-Romagna under the project "Studio sui giallumi da fitoplasma della vite".

References

- Andersen, M.T., Beever, R.E. & Newcomb, R.D., 2004. Polymorphism in the *tuf* gene of 'Candidatus Phytoplasma australiense'. In: 15th Congress of IOM, July 2004, Athens Georgia, USA, p. 129.
- Bertaccini, A., Mori, N., Botti, S., Castiglioni, A., Cavallini, G., & Malossi, A. 2003. Survey on Bois Noir phytoplasmas spreading in vineyards of Modena province (Italy). In: Extended abstracts of the 14th Meeting of the ICVG, September 2003 Locorotondo (Bari), Italy, pp. 104-105.
- Bertaccini, A., Botti, S., Fiore, N., Gajardo, A. & Montealegre, J., 2004. Identification of a new phytoplasma(s) infecting grapevine with yellows in Chile. In: 15th Congress of IOM July 2004, Athens Georgia, USA, pp. 63-64.
- Botti, S. & Bertaccini, A., 2004. Flavescence dorée associated phytoplasmas: identification of molecular variants and epidemiological implications. In: 15th Congr. of IOM, July 2004, Athens Georgia, USA, p. 122.
- Botti, S., Paltrinieri, S., Mori, N., Milanesi, L., Bondavalli, R. & Bertaccini, A., 2005. Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. In: III Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi Milano, Italy, giugno 2005, pp. 73-75.
- Langer, M. & Maixner, M., 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non ribosomal DNA. *Vitis* 43(4), 191-199.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., Orosz, A., Bertaccini, A. & Kölber, M., 2004. Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas. *Vitis* 43(4), 201-203.
- Schneider, B., Gibb, K.S., & Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.

GRAPEVINE VIRUSES IN CHILE: GENOMICS AND DETECTION BASED ON IMMUNOCAPTURE AND MICROARRAY TECHNOLOGIES

E. Engel^{1,2}, V. Arredondo¹, C. Girardi¹, A. Gonzalez¹, P. Escobar¹, N. Fiore³, P. Arce⁴ & P.D.T. Valenzuela^{1,2,4}

¹Fundación Ciencia Para La Vida

²Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB), Facultad de Agronomía Universidad de Chile³ & Facultad de Cs. Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile⁴. Avda Zañartu 1482, Santiago-Chile.

*Autor for correspondence, eaengeli@yahoo.com, Phone 562-2383178, Fax 562-2372259.

Introduction

Fruit exports are one of the main economic activities of Chile being grapevine among the most important species grown for table grapevine and wine production. As fruit production is widely affected by viral pathogens that diminish the quality and quantity of the fruit obtained, certification programs are being developed. Towards this objective, we decided to isolate and sequence four of the main viruses present in our country: GFLV, GFkV, GLRaV-3 and GLRaV-1. With the sequences available, we produced monoclonal and polyclonal antibodies raised against both, recombinant viral coat proteins and synthetic peptides (Engel *et al*, 2003). Using these tools, we developed sensitive and specific viral detection kits based on ELISA and IC-RT-PCR, they showed to work with a variety of local and foreign infected plants.

Towards the design of a comprehensive parallel viral detection system we produced a microarray chip containing oligonucleotides to detect all viruses known to infect grapevines (Bystricka *et al*, 2005; Bowtell & Sambrook, 2003). These probes are complementary to highly conserved as well as to variable domains of all the known grapevine viruses that have been totally or partially sequenced. This approach will allow the detection in a fast and simple assay of the already known viruses, and detecting new unknown viruses not explicitly represented on the array if their genomes have partial homology with the printed probes.

Material and Methods

Grapevine samples were collected from the central, V and VI geographical regions of Chile. Their sanitary status was confirmed by commercial ELISA and RT-PCR. Total RNA was extracted (Chang *et al*, 1993), and reverse transcription with random hexamers was performed. Different overlapping PCR products were obtained according to the specific viral primers used together with the co-amplification of a grapevine constitutive gene as positive control. For some viruses, 5' and 3' prime race was also performed. Each purified product was cloned in the p-GEM-T easy vector and sequenced. Specific primers containing restriction sites were used to clone the coat protein coding region of each virus in the prokaryotic vectors pET-32a, pET-28a and pGEX 6P-1. Recombinant fusion coat proteins were affinity purified and injected to rabbits and mouse to produce monoclonal and polyclonal antibodies (Van Regenmortel, 1982; Frangioni & Neel, 1993). Additionally, a total of 18 synthetic peptides were produced based on highly immunogenic portions from the coat protein sequences of local isolates of GFLV, GLRaV-1 and GLRaV-3, they were coupled to a carrier and used to obtain polyclonal antibodies (Van Regenmoertel & Muller, 1999). Rabbit antisera and mouse ascitic fluid were analyzed against injected antigens and infected plants. Positive antibodies were used for viral detection purposes by means of TAS-ELISA and IC-RT-PCR (Sefc *et al*, 2000; Clark & Adams, 1977).

A microarray chip containing 574 oligonucleotides, each of 70-mer length was printed in our genomic core facility. Viral sequence data were obtained from our local database of sequenced virus and from curated databases of total or partially sequenced viral genomes in GenBank. Each genome was divided in 70 nt segments offset by 25 nt and alignment was done between each probe and all the viral members from each family. Between 10 and 20 probes were synthesized for each viral genome depending on the size, complexity and amount of sequence available. Additionally, probes complementary to constitutive grapevine genes and hybridization controls were printed.

Results and Discussion

Chilean isolates from 4 of the main viruses present in our country were sequenced. One local isolate of GLRaV-3 and GFLV was completely sequenced and several others local isolates of GLRaV-3, GLRaV-1, GFLV & GFkV were partially sequenced. Their variability rates were analyzed and compared with foreign isolates. GFLV RNA2 showed to have approximately 90% of identity when compared to French and German isolates. GLRaV-3 complete genome showed to have approximately 97% of identity when compared to a US isolate. The coat protein coding regions of these 4 viruses was completely sequenced,

cloned and expressed in *E. coli*. Monoclonal and polyclonal antibodies were produced against these recombinant viral coat proteins. They demonstrated to have very good specificity and titer when compared with commercially available antibodies by IC-RT-PCR or ELISA assays. In all cases, the antibodies capture efficiency was much better when the complete recombinant coat protein was used as antigen instead of a mix of synthetic peptides.

A prototype microarray system was produced and shown to be able to detect most if not all the grapevine viruses. The chip accuracy was validated for several of the viruses using viral genomic libraries and well known infected grapevines. This approach showed to be a powerful and fast diagnostic method when compared with traditional systems (Engel & Valenzuela, 2005).

Acknowledgements

This research was partially financed by Iniciativa Genoma Chile, FONTEC-CORFO and MIFAB.

References

- Bowtell, D. & Sambrook, J. 2003. (1st ed). DNA Microarrays. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, I., Piherova, L., Knoch, S. & Sip, M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *J Virol Methods*. 128(1-2), 176-182.
- Chang, Puryear & Cairney. 1993. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11(2), 113-116.
- Clark, M. & Adams, A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Engel, E., Arredondo, V., Martinez, R., Fiore, N., Burzio, L.O. & Valenzuela, P.D.T. 2003. Isolation, Sequencing and Expression of Genes of Chilean Isolates of Grapevine Fanleaf Virus. 14th Meeting of The International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine., September 2003, Locorotondo, Italy. pp. 24.
- Engel, E. & Valenzuela, P.D.T. 2005. Simultaneous Detection of Grapevine Viruses using Microarrays. XLVIII Meeting of the Biological Society of Chile. October 2005, Pucón, Chile.
- Frangioni, J.V. & Neel, B.G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* 210(1), 179-187.
- Sefc, K.M., Leonhardt, W. & Steinkellner H. 2000. Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *J Virol Methods*. 86(1), 101-106.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology and Immunochimistry of Plant Viruses. Academic Press, USA.
- Van Regenmortel, M.H.V. & Muller, S. 1999. (1st ed). Synthetic Peptides as Antigens. Elsevier, The Netherlands.

INFLUENCE OF VIRUSES ON THE PERFORMANCE AND QUALITY OF CV. CRIMSON SEEDLESS

M. Digiario¹(*), N. Fiore², L. Tarricone³, S. Prodan² and T. Elbeaino¹

¹Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie 9, 70010, Valenzano (Bari), Italy; ²Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile, Av. Santa Rosa 11315, Santiago, Chile; ³C.R.A., Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Sez. di Turi (BA), Via Casamassima 142, 70010, Turi (Bari), Italy
(*):Tel: +39 080 4606255; Fax: +39 080 4606275; digiario@iamb.it

Introduction

To widen the offer for an increasingly demanding market, a number of new table grape varieties, among which the cv. Crimson Seedless, have been introduced in the last years in Apulia, the leading table grape growing region in Italy, and in Metropolitana IV, V and VI Chile regions. In many areas young vines of Crimson developed a disease condition that caused much concern to the growers. Affected vines delayed bud break by one-two weeks and exhibited extensive bud failure. The vegetation was less vigorous than normal and crop visibly reduced. Leaves displayed a light early reddening and rolling of the blades and bunches were pale-coloured, failing to ripen properly.

The severity of the symptoms suggested to investigate the disorder in more detail to ascertain its nature and the agents involved.

Materials and methods

In autumn 2004 some Crimson vineyards were selected in Apulia and Chilean regions and vines with and without symptoms chosen. Differences in productivity and berry quality between symptomatic and symptomless vines were determined and the viruses present in both types of plants were identified by ELISA.

Tests were made on cortical scrapings extracts by DAS-ELISA (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), DAS-ELISA (GFKV), and protein A-DAS ELISA (GVA) (Boscia *et al.*, 1996). Polyclonal antisera and monoclonal antibodies raised at University of Bari and from Agritest, Valenzano-Bari (Italy), were used as reagents.

Results and discussion

As shown in Tab 1, the presence of symptoms was associated with a remarkable reduction of the yield (from 20 to 44%, in two years of observation) mainly due to the reduced number of fertile buds, thus of bunches per vine. Other significant detrimental effects were the lower sugar content (from 13 to 26%) and the irregular and scarce coloration of the berries (Tab. 2). Because of the pale colouring many of the bunches were unmarketable, the economic loss for the grower was much higher than that caused by the simple reduction in the weight and number of clusters.

Table 1. Influence of sanitary status on vegetative characteristics and bud fruitfulness of Crimson Seedless grapevines in Italian vineyards.

*	Year	Bud load/	Shoots/vine (n)	Clusters/vine (n.)	Clusters per	Clusters per	Yield/ vine (kg)	Yield/hectare (ton)
		vine (n)			vine/ Buds per vine	vine/ Shoots per vine		
S	2004	84.67 aA	39.53 aA	25.07 bB	0.29 bB	0.62 bB	11.48 bB	18.37 bB
H		86.93 Aa	44.87 aA	37.87 aA	0.47 aA	0.86 aA	20.37 aA	32.59 aA
S	2005	46.87 aA	27.07 aA	14.93 aA	0.32 aA	0.52 aA	6.54 aA	10.46 aA
H		51.6 aA	29.4 aA	17.33 aA	0.35 aA	0.62 aA	8.18 aA	13.09 aA

* S = symptomatic; H = symptomless;

Values followed by different letters differ at $P \leq 0,05$ (small letters) e per $P \leq 0,01$ (capital letters)

Table 2. Influence of sanitary status on the cluster and colour characteristics on Crimson Seedless at harvest.

*	Year	Vineyard	Cluster Weight (g)	Berries/ Cluster (n.)	Berry weight (g)	Total soluble Solids (*Brix)	Brightness** L
S	2004	1	457,97 bA	100,93 bA	4,53 aA	12,70 bB	38,49 aA
H	2004	1	540,80 aA	115,77 aA	4,70 aA	17,23 aA	31,17 bB
S	2004	2	604,8 aA	144,90 aA	4,20 bB	14,81 bB	40,14 aA
H	2004	2	573,17 aA	114,14 bB	4,96 aA	20,10 aA	30,15 bB
S	2005	1	437,72 aA	134,50 aA	3,22 bA	14,13 bB	29,80 aA
H	2005	1	472,03 aA	118,65 aA	3,92 aA	16,20 aA	20,68 bB

* S = symptomatic; H = symptomless; **this parameter is strictly correlated with the colour and to the anthocian content. Values followed by different letters differ at $P \leq 0,05$ (small letters) e per $P \leq 0,01$ (capital letters).

All six viruses tested were detected, to a different extent, in the totality of the 166 vines examined (Table 3). Symptomatic vines had an higher infection rate (94%) than symptomless vines (69%). The surprisingly high infection rate of symptomless vines was mainly due to GLRaV-2 (63%), which was detected in all the Italian Crimson vines tested, and to GFkV (24%). In symptomatic vines the most common viruses were: GLRaV-2 (80%), GFkV (72%), GLRaV-3 (67%), GVA (64%) and GLRaV-1 (35%). GFLV was detected only in 4 vines in Chile, therefore its presence was considered only occasional and unrelated with the disease. GLRaV-1, GLRaV-3 and GVA were only sporadic or completely absent in symptomless vines.

Table 3. Results of ELISA tests on Chilean (Ch) and Italian (It) vines of cv. Crimson.

*	Total vines (n.)	Infected vines (%)	GVA (%)	GLRaV-1 (%)	GLRaV-2 (%)	GLRaV-3 (%)	GFkV (%)	GFLV (%)
Ch S	43	86	35	60	56	37	42	9
Ch H	27	19	15	-	-	-	4	-
It S	51	100	88	14	100	92	98	-
It H	45	100	7	-	100	9	36	-
Tot S	94	94	64	35	80	67	72	4
Tot H	72	69	10	-	63	6	24	-

* S = symptomatic; H = symptomless

A comparative analysis of virus incidence in diseased and symptomless vines (Tab. 3) suggests that: (i) the syndrome under study has a clear-cut viral origin since, in general, symptomatic vines in both countries had the worst sanitary condition. In Chile 86% of symptomatic vines were infected, versus 19% of the symptomless ones, and in Italy, if GLRaV-2 is excluded because of its presence in all vines tested, 100% of symptomatic vines were infected, versus 40% of the symptomless ones; (ii) excepted for GLRaV-2, whose presence was consistent in both symptomatic and symptomless vines (in particular in Italian vineyards), the other viruses looked for, i.e. GLRaV-1, GLRaV-3, GVA and GFkV, were detected at a significant higher rate in symptomatic than in symptomless vines; (iii) rather than by the infection by single specific viruses, as the widespread presence of GLRaV-2 also in symptomless vines seems to indicate, the diseased status seems to be determined and enhanced by mixed infections by two or more viruses; (iv) viruses of the *Closteroviridae* family seem to have a major role in eliciting leafroll and its detrimental effects, as suggested by their highly frequent detection in most of the Italian and Chilean symptomatic vines; (v) GVA and GFkV, which were especially found in symptomatic Italian vines, seem to influence the severity of the symptoms.

The origin of such a heavy presence of filamentous viruses is unknown, but it is likely that it came from budwood and/or rootstocks rather than from mealybug vectors. If so, the present case represent a further example of the devastating consequences of the introduction of new varieties in an area without previous evaluation of their susceptibility to the prevailing viruses, and of the use of sanitary uncontrolled propagation material.

References

Boscia D., Digiario M., Fresno J., Greif C., Grenan S., Kassemeyer H.H., Prota V.A. and De Sequeira O., 1997. ELISA for the detection and identification of grapevine viruses. In: Walter, B. (ed.). Sanitary Selection of the Grapevine. Protocols for Detection of Viruses and Virus-like Diseases. *Les Colloques INRA 86*, 129-155.

SHORT COMMUNICATION
SURVEY OF GRAPEVINE VIRUSES IN CHILE

N. Fiore, S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino and A. Zamorano

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

Samples were tested for the presence of viruses previously reported from Chile, i.e. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus 1, 2 and 3* (GLRaV-1, -2 and -3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Grapevine virus A* (GVA), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) (Cereceda and Auger, 1979; Auger *et al.*, 1994; Herrera and Madariaga, 1994, 2001; Herrera, 1996) and for viruses hitherto unrecorded in the country, i.e. the Red Globe strain of GLRaV-2, [formerly *Grapevine rootstock stem lesion-associated virus* (Uyemoto and Rowhani, 2001)], *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus B* (GVB), and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV). In 2003-2004, *Grapevine leafroll associated virus 7* (GLRaV-7) was included in the testing.

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

Detection of GLRaV-1, -2, -3, GFLV, GFkV, GVA, GVB, ToRSV and ArMV was by ELISA (Clark and Adams, 1977) and complemented by RT-PCR, while detection of GRSPaV and GLRaV-2-RG was exclusively

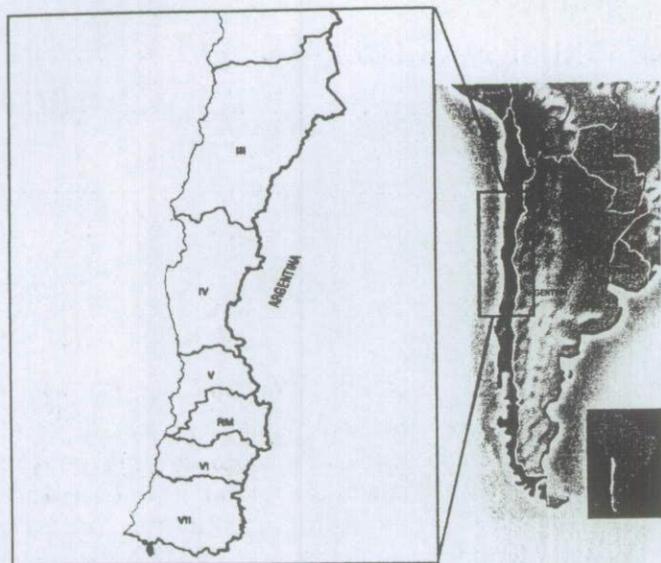


Fig. 1. Map of Chile showing the regions where grapevines were surveyed for the presence of the most economically important viruses. III: Región Atacama; IV: Región Coquimbo; V: Región Valparaíso; VI: Región Libertador General Bernardo O'Higgins; VII: Región Maule; RM: Región Metropolitana.

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

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

Total nucleic acids (TNA) extraction was by the silica capture method (MacKenzie *et al.*, 1997; Malinovski, 1997). TNA aliquots were primed with DNA random hexanucleotides (Roche, Basel, Switzerland) and reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega, Madison, Wisconsin, USA). Target-specific primers were C995r/H587f, H28/BB_O and LC1/LC2 for GVA, GVB and GLRaV-3, respectively (Minafra and Hadidi, 1992); C3310/H2999 and C867/H428 for GFLV and ArMV (MacKenzie *et al.*, 1997); V2dCPr1/V2dCPr2 for GLRaV-2 (Bertazzon and Angelini, 2004); GFkV-L630/GFkV-U279 for GFkV (Shi *et al.*, 2000); U1/D1 for ToRSV (Griesbach *et al.*, 1995); 49d/48d for GRSPaV (Zhang *et al.*, 1998) and RGH-SP777-R/RGJSP227-F for GLRaV-2-RG (Rowhani *et al.*, 2000).

To improve detection of GLRaV-1, the primers described by Habili *et al.* (1997) were modified based on

the CP sequence of GenBank accession AF195822 (Fazeli and Rezaian, 2000), divergent nucleotides are at positions in bold/underlined: LR-1R - 5' - GTTACG-GCCTTTTGTTTACTATGG - 3' antisense and LR-1F - 5' - CGACCCCTTATTGTTTGAGTACG - 3' sense primers.

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

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

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

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

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

Table 1. Results of virus testing by ELISA.

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

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

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

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

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

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

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

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

A comparable situation was encountered with ArMV, for only 2 of 775 vines tested by ELISA gave a reading close to the minimal level of absorbance value consid-

ered in this work, but the presence of this virus was not confirmed by RT-PCR, and it was not found in further 156 samples ELISA-negative for ArMV. It is therefore plausible to conclude that ArMV does not represent a problem for the Chilean grapevine industry, also because its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum*, does not seem to occur in the country (Gonzales, 1970, 1984; Magunacelaya, 1996).

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

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

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

n.t.= not tested

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

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

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

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

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

The single plant infected by GLRaV-7 out of 387 tested was in Coquimbo. This is not a surprising finding, for this virus is relatively rare being more common in eastern than in western Mediterranean (Digiario *et al.*, 1999) and was only recently recorded from a few varieties in California (Morales and Monis, 2007).

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

As shown in Table 4, GRSPaV was detected in 57 of 236 vines (24.15%). Infections by GRSPaV in Chile

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Aballay E., Benavides F., Vieira A., 1998. Resistance of some grapevine rootstocks to a Chilean population of *Xiphinema* index. *Nematologia Mediterranea* 26: 185-188.
- Aballay E., Flores P., Insunza V., 2001. Nematicidal effect of eight plant species on *Xiphinema americanum sensu lato* in *Vitis vinifera*, var. Cabernet Sauvignon in Chile. *Nematropica* 31: 95-102.
- Auger J., Aballay E., Pinto M., Pastenes C., 1994. Efectos del virus de la hoja en abanico VHA en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson Seedless. *Aconex* 46: 20-23.
- Bertazzon N., Angelini E., 2004. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. *Journal of Plant Pathology* 86: 283-290.
- Bonfiglioli R.G., Habili N., Green M., Schliefer L.F., Symons R.H., 1998. The hidden problem - Rugose wood associated viruses in Australian viticulture. *Australian Grapegrower and Winemaker* 420: 9-13.
- Cereceda C., Auger J., 1979. Aislamiento y caracterización del virus Mosaico Amarillo de la vid (*Vitis vinifera*, cv. Semillon) presente en Chile. *Investigación Agrícola* 5: 15-16.
- Clarck M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Digiario M., Martelli G.P., Savino V., 1999. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East: a synopsis. *Options Méditerranéennes, Ser. B Studies and Research* 29: 83-92.
- Digiario M., Fiore N., Tarricone L., Prodan S., Elbeaino T., 2006. Influence of viruses on the performance and quality of cv. Crimson Seedless. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 186-188.
- Fazeli C.F., Rezaian M.A., 2000. Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of *grapevine leafroll-associated virus 1* and identification of three subgenomic RNAs. *Journal of General Virology* 81: 605-615.
- Gonzales R.H., 1970. Nuevas especies de nematodos que atacan a la vid en Chile. *Agricultura Técnica* 30: 31-37.
- Gonzales R.H., 1984. Diagnostico nematológico en parronales de San Felipe y Los Andes. *Revista Frutícola* 4: 94-98.
- Gonzales R.H., Volosky C., 2006. Seasonal and management strategies for mealybugs, *Pseudococcus* spp., in pomefruits, table and wine grapes (Hemiptera: Pseudococcidae). *Fruticola* 27: 37-47.
- Greif C., Garau R., Boscia D., Prota V.A., Fiori M., Bass P., Walter B., Prota U., 1995. The relationship of *grapevine leafroll-associated closterovirus 2* with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 34: 167-173.
- Griboaud I., Gambino G., Cuozzo D., Manzini F., 2006. Attempts to eliminate *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine clones. *Journal of Plant Pathology* 88: 293-298.
- Griesbach J.A., 1995. Detection of *Tomato ringspot virus* by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 79: 1054-1056.
- Habili N., Fazeli C., Rezaian M.A., 1997. Identification of a cDNA clone specific to *Grapevine leafroll-associated virus 1*, and occurrence of the virus in Australia. *Plant Pathology* 46: 516-522.
- Herrera G., Madariaga M., 1994. Detección de los virus *Tomato ringspot virus* y *Arabis mosaic virus* en vides en Chile. *Fitopatología* 44: 42-44.
- Herrera G., 1996. Panorama de enfermedades causadas por virus en frutales de carozo, pomáceas y vides. *Simiente* 66: 35-36.
- Herrera G., Madariaga M., 2001. Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 61: 393-400.
- Insunza V., Aballay E., Macaya J., 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plants extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematropica* 31: 47-54.
- Kolber M., Beczner L., Pacsa S., Lehoczyk J., 1985. Detection of *Grapevine chrome mosaic virus* in field grown vines by ELISA. *Phytopathologia Mediterranea* 24: 135-140.
- Lamberti F., Roca F., Agostinelli A., 1988. On the identity of *Xiphinema americanum* in Chile with a key to the *Xiphinema* species occurring in Chile. *Nematologia Mediterranea* 16: 67-68.
- Lima M.F., Rosa C., Molino D.A., Rowhani A., 2006. Detection of *Rupestris stem pitting associated virus* in seedlings of virus-infected maternal plants. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 244-245.
- Magunacelaya J.C., 1996. Nematodos vectores de virus. In: Esterio M., Magunacelaya J.C. (eds.) *Avances en Sanidad Vegetal de Frutales y Vides*, pp. 147-153. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago, Chile.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerij S., Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.

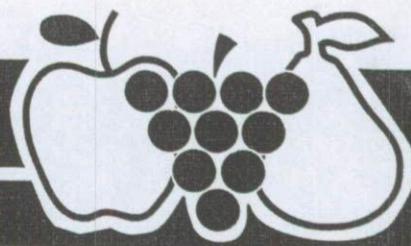
- Malinovski T., 1997. Silicacapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): Application for the detection of several plant viruses. In: Dehne H.W. (ed.) *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*, pp. 444-448. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Martelli G.P., Boudon-Padieu B., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. *Options Méditerranéennes Ser. B, Studies and Research* 55: 7-201.
- Meng B., Pang S.Z., Forsline P.L., McFerson J.R., Gonsalves D., 1998. Nucleotide sequence and genome structure of *Rupestris stem pitting-associated virus 1* reveals similarities to *Apple stem pitting virus*. *Journal of General Virology* 79: 2059-2069.
- Minafra A., Hadidi A., 1992. Sensitive detection of Grapevine virus A, B or leafroll-associated 3 from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* 47: 175-188.
- Monis J., Bestwick R.K., 1997. Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. *Plant Disease* 81: 802-808.
- Morales R.Z., Monis J., 2007. First detection of Grapevine leafroll-associated virus 7 in California vineyards. *Plant Disease* 91: 465.
- Pirola C., Boscia D., La Notte P., Campanale A., Savino V., Martelli G.P., 2006. Further evidence of the involvement of *Grapevine leafroll associated virus 2* in graft incompatibility. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch 2006*: 242-243.
- Rowhani A., Zhang Y.P., Golino D.A., Uyemoto J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. *Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide 2000*: 82.
- Shi B.J., Habili N., Symons R.H., 2000. *Grapevine fleck virus*: large sequence variation in a small region of the genome. *Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide 2000*: 78.
- Uyemoto J.K., Rowhani A., Luvisi D., Krag R. 2001. New closterovirus in Red Globe grape causes decline of grafted plants. *California Agriculture* 55 (4): 28-31.
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Golino D.A., Rowhani A., 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem pitting disease.

Received September 10, 2007

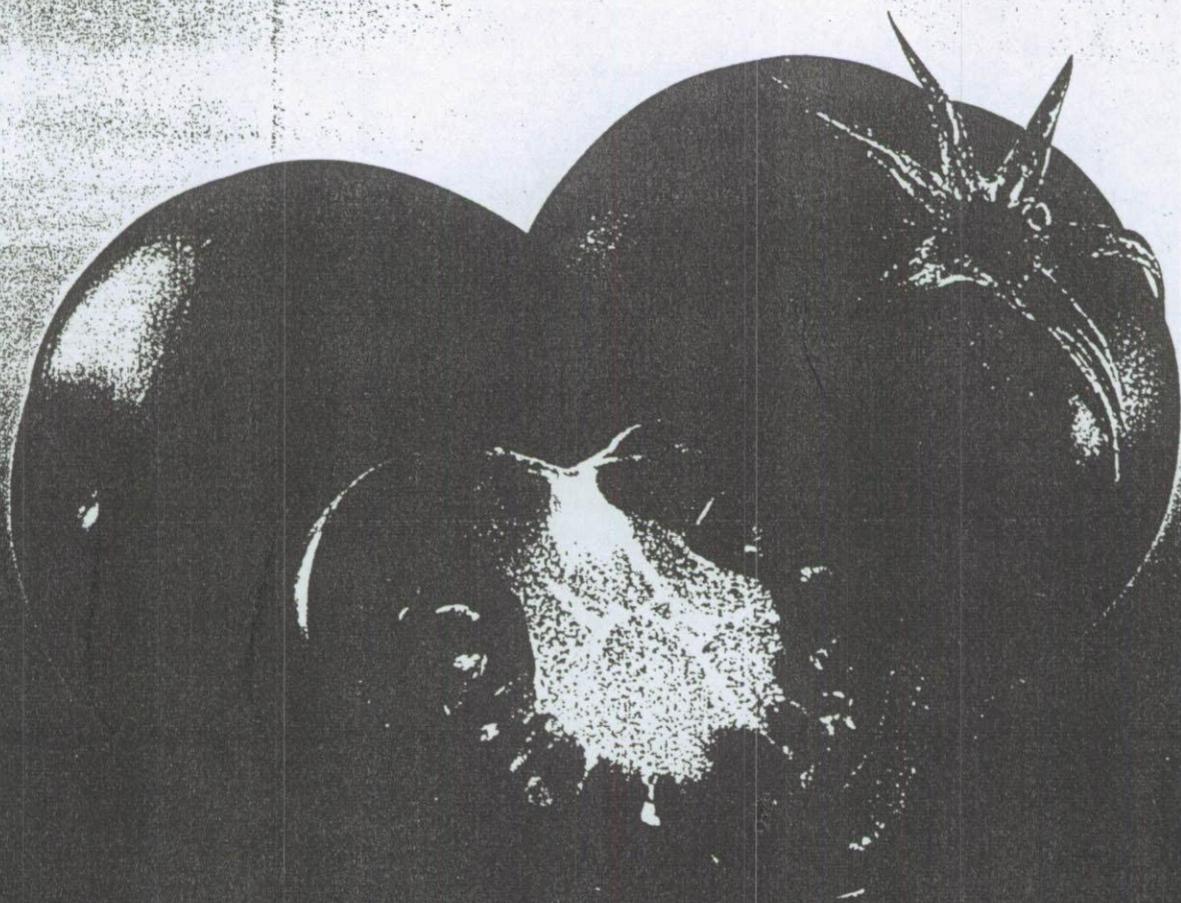
Accepted October 9, 2007

Publicaciones nacionales
Resúmenes

ACONEX



ENERO - FEBRERO - MARZO 2003 - 78



■ "REPORTE DE FITOPLASMAS PERTENECIENTES AL SUBGRUPO 16Srl-C EN VIDES CHILENAS"

Fiore N.¹, Botti S.², Montealegre J.¹ y Bertaccini A.²

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.

E-mail: nicolafigiore_2000cl@yahoo.com

²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale.

Durante el otoño 2002 se encontraron, en viñedos ubicados en la VI y Región Metropolitana, plantas que presentaban síntomas tales como: decaimiento, hojas enrolladas, amarillez del follaje en el caso de cepas de uva blanca y enrojecimiento del tejido foliar y de las nervaduras en uvas tintas. También se consideraron plantas que presentaban bayas parcialmente deshidratadas y con los sarmientos insuficientemente lignificados (preferentemente alrededor de los nudos). El ácido nucleico total extraído desde las nervaduras de hojas procedentes de plantas con la sintomatología antes indicada, se analizó a través de PCR con los partidores universales P1/P7, cuyo producto de amplificación fue procesado a través de un "Nested-PCR" con los partidores universales R16F2/R2 seguidos por una ulterior amplificación con partidores específicos para los grupos ribosomal de fitoplasmas 16Srl y 16SrXII R16(I)F1/R1. Sobre los amplicones obtenidos se procedió a efectuar un análisis del perfil de restricción enzimático (RFLP) con *TruI* y *Tsp509I* que permitió ubicar a los fitoplasmas dentro del grupo 16Srl (aster yellows group), subgrupo C. Las muestras positivas se obtuvieron en plantas de las variedades Carmenere, Petit Syrah y Chardonnay. Estos antecedentes constituyen el primer reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16Srl-C en vides chilenas. (Proyecto FIA BIOT-01-A-13).

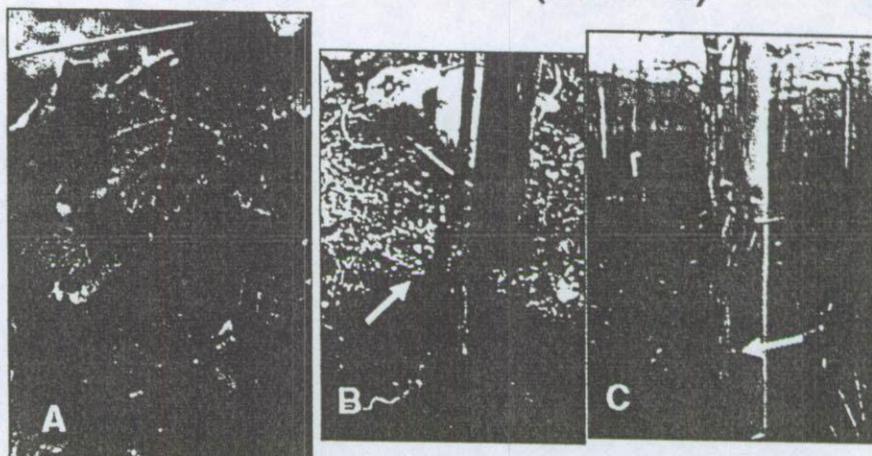
■ "IDENTIFICACIÓN DEL CLOSTEROVIRUS GRAPEVINE LEAFROLL-2 (GLRaV-2), EN VIDES CV THOMPSON SEEDLESS CON SEVEROS SÍNTOMAS DE INCOMPATIBILIDAD"

J. Auger, C. Narváez y M. Esterio.
Departamento de Sanidad Vegetal,
Fac. de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

E-mail: jauger@abello.dic.uchile.cl

En Chile la mayor superficie de uva de mesa está sobre pie franco, pero en los últimos años en suelos de replante con

Principales Síntomas del Closterovirus
Grapevine Leaf Roll-2 (GLRaV-2)



■ FIG. 8. GRAPEVINE LEAF ROLL-2 (GLRaV): A) SÍNTOMAS FOLIARES; Y SÍNTOMAS DE INCOMPATIBILIDAD EN: B) THOMPSON SEEDLESS SOBRE FREEDOM, Y C) CRIMSON SEEDLESS SOBRE KOBER 5BB. (FUENTE: J. AUGER)

antecedentes de alta infestación de nemátodos u otros problemas locales, se han utilizado plantas injertadas. En el presente trabajo se investigó la causa de la declinación y síntomas de incompatibilidad del injerto en numerosas plantas de vid cv Thompson Seedless, injertadas sobre los patrones Harmony y Freedom, de 2 y 3 años de edad, respectivamente. Mediante diagnóstico inmunológico (ELISA) y molecular (PCR) en plantas con síntomas de declinación e incompatibilidad se identificó a GLRaV-2, y se confirmó la presencia del virus en viveros de propagación de los portainjertos. A partir de un producto de PCR se secuenció un fragmento correspondiente a 200pb. Posteriormente, utilizando el programa BLASTN, se confirmó la identidad del virus, estableciéndose una similitud de un 93% con un fragmento del gen HSP-70 de GLRaV-2. La técnica RT-PCR demostró ser más efectiva que ELISA en la detección de GLRaV-2, recomendándose por esto la utilización de esta técnica en programas de certificación de vides.

■ "RESULTADOS DE ANÁLISIS VIROLÓGICOS EN VIDES (*Vitis vinifera* L.) DE BLOQUE DE SELECCIÓN CLONAL AGRO UC COLECTADAS EN ANTIQUOS VIÑEDOS DE CHILE DE LAS REGIONES: METROPOLITANA, VI Y VII"

C. Lillo y J. Pérez Harvey.

Fac. de Agronomía e Ing. Forestal,
Pontificia Univ. Católica de Chile.
E-mail: clillo@puc.cl

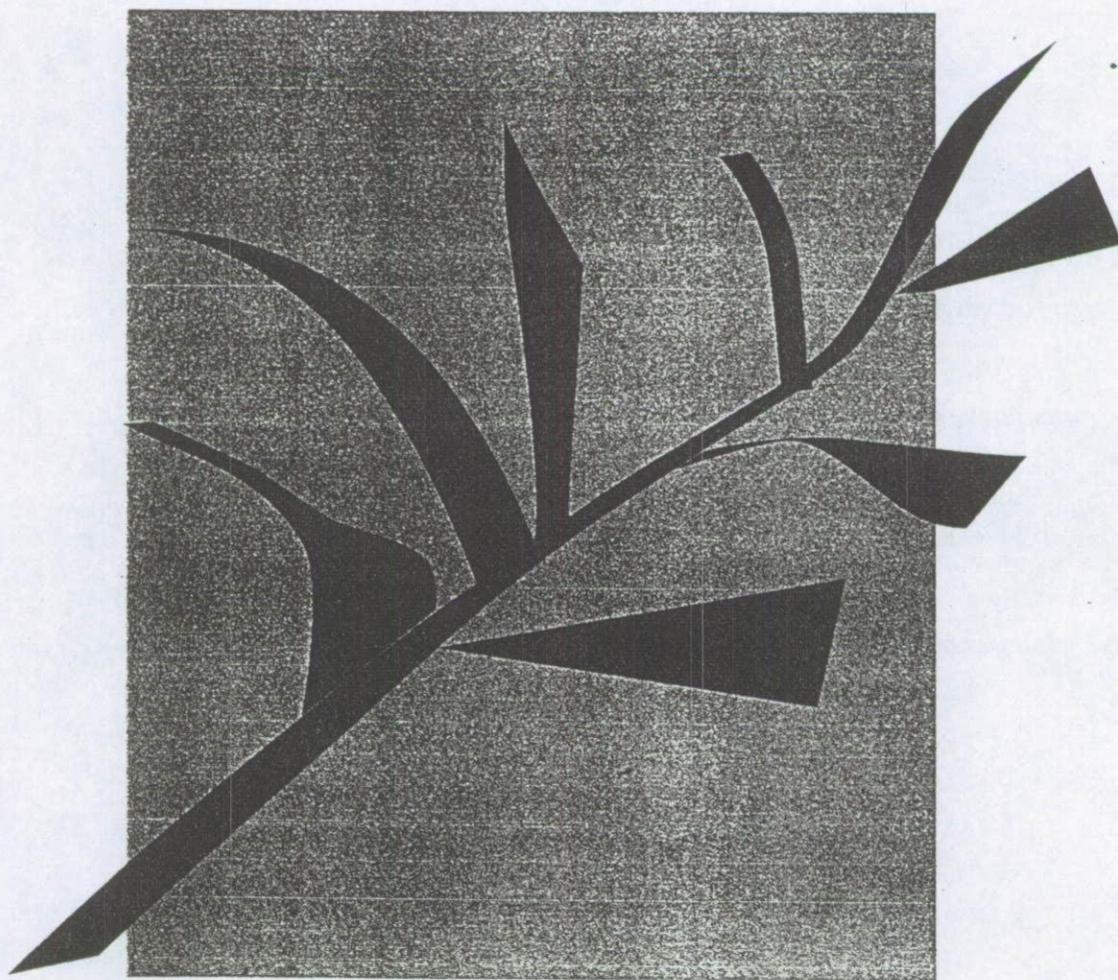
Las enfermedades causadas por virus provocan importantes daños en la viticultura, desde reducción de vigor, disminución en la producción, calidad de la fruta y vinos obtenidos hasta provocar la muerte de la planta. En el año 2000 se seleccionaron 80 potenciales clones asintomáticos de *Vitis vinifera* provenientes de 15 viñas: Cabernet franc, Cabernet sauvignon, Carménère, Cot, Pinot noir, Merlot, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Semillon y Verdot. Estas vides se establecieron en un Bloque de Selección Clonal en el Campex COPEVAL, San Fernando.

Las vides fueron evaluadas para detectar la presencia de virus de importancia económica, a fin de incorporarlas al Programa de Certificación de Vides (*Vitis spp.*) por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en Chile. Los análisis fueron realizados a partir de hojas y brotes utilizando la técnica serológica DAS-ELISA con anticuerpos policlonales para los siguientes Nepovirus: Tomato ringspot virus (ToRSV), strain Chickadee y Peach yellow bud mosaic (PYMB) (Bioreba, USA), Grapevine fan leaf virus (GFLV).

En Closterovirus Grapevine leaf roll associated virus (GLRaV-1, 3 y 7) se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales para GLRaV-2 (Agritest, Italia). El resto de las pruebas fue realizado

SIMIENTE

VOLUMEN 72 (3-4) JULIO- DICIEMBRE 2002



SOCIEDAD AGRONOMICA DE CHILE

medio (6-15 %); alto (16-30%) y severo (> 30 %). Con los valores, se determinó el grado de ataque de acuerdo a la fórmula de Townsend y Heuberger. Se concluyó que dos aplicaciones durante la floración ejercen similar control que 5 aplicaciones desde pre-flor a baya de 6-8 mm. Asimismo, se determinó que las aplicaciones tanto en pre-flor (antes de caliptras partidas) como en baya de 6-8 mm no tienen ninguna incidencia en el control de esta plaga en uva de mesa.

¹Trabajo realizado con financiamiento de Dow Agrosociencias. Agradecimientos a Sr. Carlos Merino

O 44 IDENTIFICACIÓN DEL CLOSTEROVIRUS GRAPEVINE LEAFROLL-2 (GLRaV-2), EN CULTIVARES DE UVA DE MESA CON SEVEROS SÍNTOMAS DE INCOMPATIBILIDAD

Auger, Jaime; Narváez, Claudio y Esterio, Marcela

Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santa Rosa 11315, Santiago, Chile. E-mail: jauger@abello.dic.uchile.cl

En Chile la mayor superficie de uva de mesa se encuentra sobre pie franco, pero en los últimos años por diferentes razones, (suelos de replante con antecedentes de alta infestación de nematodos u otros problemas locales), se ha recurrido a la utilización de portainjertos tolerantes a este tipo de problemas. En el presente trabajo se estudió y analizó la posible causa de la declinación y síntomas de incompatibilidad del injerto en numerosas plantas de vid de las var. Thompson Seedless y Crimson Seedless injertadas sobre los patrones Harmony, Freedom, y Kober 5BB de 2 a 4 años de edad. Mediante diagnóstico inmunológico (ELISA) y molecular (PCR) en plantas con síntomas de declinación e incompatibilidad se identificó a GLRaV-2, y se confirmó la presencia del virus en viveros de propagación de los portainjertos. A partir de un producto de PCR se secuenció un fragmento correspondiente a 200 pb. Posteriormente, utilizando el programa BLASTN, se confirmó la identidad del virus, estableciéndose una similitud de un 99% con un fragmento del gen HSP-70 de GLRaV-2. La técnica RT-PCR demostró ser más efectiva que ELISA en la detección de GLRaV-2, y de acuerdo a estos resultados es recomendable considerar la utilización de esta técnica en programas de certificación de vides.

O 45 NUEVOS REPORTES DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR VIRUS Y FITOPLASMAS EN VIDES CHILENAS¹

Fiore, Njcoia¹; Montealegre, Jaime¹; Aballay, Erwin¹; Prodan, Simona¹; Fernández, Pamela¹; Reyes, Rodrigo¹; Botti, Simona²; Bertaccini, Assunta² y Pino, Ana

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Casilla 1004, Santiago, Chile. E-mail: nicolaifiore_2000ci@yahoo.com
²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale

Dentro del marco del proyecto FIA "Elaboración de un sistema confiable para la detección y

caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid" se procedió a efectuar una prospección en viñedos y parronales ubicados en la IV, V, VI, VII y Región Metropolitana, en plantas con síntomas atribuibles a virus y fitoplasmas como en asintomáticas. Se recolectaron muestras las que se analizaron a través de la técnica ELISA para los siguientes virus: GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GfKv, GVA, GVB, ToRSV, ArMV y SLRSV. Una parte de las muestras recolectadas se analizaron a través de RT-PCR para el diagnóstico de GRSPaV y GRSLaV. El 60,7% de las plantas analizadas mediante ELISA resultaron positivas por lo menos a un virus. El estudio revela la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, ArMV y ToRSV, además se reporta por primera vez en Chile la presencia de GfKv, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y GfKv.

Para los fitoplasmas se procedió a la extracción del ácido nucleico total desde las nervaduras de hojas, éste se analizó a través de PCR con los partidores P1/P7, cuyo producto de amplificación fue procesado a través de un "Nested-PCR" con R16F2/R2 seguidos por una amplificación con partidores específicos para los grupos ribosomal de fitoplasmas 16SrI y 16SrXII R16(I)F1/R1. Sobre los amplicones obtenidos se procedió a efectuar un análisis del perfil de restricción enzimático (RFLP) con *TruI* y *Tsp509I* que permitió ubicar a los fitoplasmas dentro del grupo 16SrI (aster yellows group). Algunos de ellos se identificaron como pertenecientes al subgrupo C. Estos antecedentes constituyen el primer reporte de fitoplasmas en vides chilenas.

¹Proyecto FIA BIOT-01-A-13

O 46 RESPUESTA DEL CEREZO (*Prunus avium*) A LA APLICACIÓN DE CIANAMIDA HIDROGENADA EN LA IV REGIÓN

Lemus, Gamaller¹ y Rivas, Brian²

¹INIA
²FDI

En las temporadas 2001 y 2002, se evaluaron distintas fechas de aplicación de Cianamida Hidrogenada en cerezos en la Provincia de Limarí, IV Región y su efecto sobre la brotación y la floración. El 2001 se aplicó, en la variedad 'Van', en cinco fechas: 1 y 15 de junio y 1, 15 y 31 de julio, dejando un tratamiento testigo sin aplicación. La primera respuesta observada fue un significativo adelanto de la brotación en todos los tratamientos con respecto al testigo, ya que el estado llamado "lado verde" ocurrió a principios de agosto, 45 días antes que en el testigo. La floración fue distinta en todos los tratamientos. Se observó que a medida que se atrasaba la aplicación, la floración era más concentrada y uniforme en el árbol. Es así como en el tratamiento del 15 de julio, la floración se inició el 31 de agosto y la plena flor se alcanzó el 7 de septiembre, con un 30,3% de flores abiertas y en el tratamiento del 31 de julio, la floración se inició el 5 de septiembre y la plena flor ocurrió el 17 de

ISSN 0430-6155

Fitopatología

VOL. 38

JUNIO 2003

Nº. 2

Esta publicación es abarcada por los servicios compendiosos y de índice, entre otros,
de BioSciences Information Service of Biological Abstracts, Chemical Abstracts y
CAB Abstracts



ORGANO OFICIAL DE LA
ASOCIACION LATINOAMERICANA
DE FITOPATOLOGIA - ALF

localidades.

Proyecto FONDECYT 1010494.

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS EN MALEZAS ASOCIADAS A PIMIENTO EN LA IV REGIÓN. (Virus identification on weeds associated to sweet peppers in IVth Region, Chile). Sepúlveda P., J. Ormeño y P. Rebufel. Instituto de Investigaciones Agropecuarias La Platina, Casilla 439/3, Santiago, Chile. E-mail: psepulve@platina.inia.cl; jormeno@platina.inia.cl

Durante la temporada 2001/02, se identificaron virus en malezas asociadas a pimientos en diversas localidades de la IV Región. Se hizo un muestreo de plantas de las malezas más abundantes en los distintos lugares prospectados, las que se encontraban con y sin síntomas atribuibles a virosis. La determinación de virus se realizó mediante la prueba de ELISA para virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), impatiens necrotic spot virus (INSV) y virus Y de la papa (PVY). De un total de 26 especies de malezas pertenecientes a 13 familias, fue posible determinar los 5 tipos de virus, tanto en plantas con y sin síntomas. Las familias Solanaceae y Asteraceae fueron las más importantes como reservorio de estos virus donde predominaron las detecciones de AMV, INSV y TSWV en pacoyuyo (*Galinsoga parviflora*), tomatillo (*Solanum nigrum*), chamico (*Datura* spp.) y nicandra (*Nicandra physalodes*).

Proyecto FONDECYT 1010494.

NUEVOS REPORTE DE ENFERMEDADES VIRALES EN VIDES CHILENAS. (New reports of viral diseases in chilean grapevines). Fiore N., J. Montealegre, E. Aballay, S. Prodan, P. Fernández, R. Reyes y A. Pino. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago, Chile. E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com

Dentro del marco del proyecto FIA "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid" se procedió a efectuar una prospección en viñedos y parronales ubicados en la IV, V, VI, VII

y Región Metropolitana, en plantas con síntomas atribuibles a presencia de virus como en asintomáticas. Se visitaron parronales y viñedos desde donde se recolectaron muestras, las que se analizaron a través de la técnica ELISA para los siguientes virus: GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToRSV, ArMV y SLRSV. Una parte de las muestras recolectadas se analizaron a través de RT-PCR para el diagnóstico de GRSPaV y GRSLaV. El 60,7% de las plantas analizadas con ELISA resultaron positivas por lo menos a un virus. El estudio revela la presencia de GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GVA, ArMV y ToRSV, además se reporta por primera vez en Chile la presencia de GFkV, GVB, GRSPaV y GRSLaV. Los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron GLRaV-2 y Fleck.

Proyecto FIA BIOT-01-A-13.

REPORTE DE FITOPLASMAS PERTENECIENTES AL SUBGRUPO 16SrI-C EN VIDES CHILENAS. (Report of 16SrI-C subgroup phytoplasmas in chilean grapevines). Fiore N.¹, Botti S.², J. Montealegre¹ y A. Bertaccini². ¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago, Chile. E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com ²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale. Italia.

Durante el otoño 2002, se encontraron en viñedos ubicados en la VI y Región Metropolitana, plantas que presentaban síntomas tales como: decaimiento, hojas enrolladas, amarillez del follaje en el caso de cepas de uva blanca, y enrojecimiento del tejido foliar y de las nervaduras en uvas tintas. También se consideraron plantas que presentaban bayas parcialmente deshidratadas y con los sarmientos insuficientemente lignificados (preferentemente alrededor de los nudos). El ácido nucleico total extraído desde las nervaduras de hojas procedentes de plantas con la sintomatología antes indicada, se analizó a través de PCR con los partidores universales P1/P7, cuyo producto de amplificación fue procesado a través de un "Nested-PCR" con los partidores universales R16F2/R2 seguidos por una ulterior amplificación con partidores específicos para los grupos ribosomal de fitoplasmas 16SrI y 16SrXII [R16(I)F1/R1]. Sobre

los amplicones obtenidos se procedió a efectuar un análisis del perfil de restricción enzimático (RFLP) con TruI y Tsp509I que permitió ubicar a los fitoplasmas dentro del grupo 16SrI (aster yellow group), subgrupo C. Las muestras positivas se obtuvieron en plantas de las variedades Carmenère, Petit Syrah y Chardonnay. Estos antecedentes constituyen el primer reporte de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrI-C en vides chilenas. Proyecto FIA BIOT-01-A-13.

IDENTIFICACIÓN DEL CLOSTEROVIRUS GRAPEVINE LEAFROLL-2 (GLRaV-2), EN VIDES CV THOMPSON SEEDLESS CON SEVEROS SÍNTOMAS DE INCOMPATIBILIDAD. (Identification of Grapevine Leafroll - associated Closterovirus 2 (GLRaV - 2), in Thompson Seedless grapevines with graft incompatibility symptoms). Auger J., C. Narvaez y M. Esterio. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, Santiago - Chile. E-mail: jauger@abello.dic.uchile.cl.

En Chile, la mayor superficie de uva de mesa está sobre pie franco, pero en los últimos años en suelos de replante con antecedentes de alta infestación de nemátodos u otros problemas locales, se han utilizado plantas injertadas. En el presente trabajo se investigó la causa de la declinación y síntomas de incompatibilidad del injerto en numerosas plantas de vid cv Thompson Seedless, injertadas sobre los patrones Harmony y Freedom, de 2 y 3 años de edad, respectivamente. Mediante diagnóstico inmunológico (ELISA) y molecular (PCR) en plantas con síntomas de declinación e incompatibilidad se identificó a GLRaV-2, y se confirmó la presencia del virus en viveros de propagación de los portainjertos. A partir de un producto de PCR se secuenció un fragmento correspondiente a 200pb. Posteriormente, utilizando el programa BLASTN, se confirmó la identidad del virus, estableciéndose una similitud de un 93% con un fragmento del gen HSP-70 de GLRaV-2. La técnica RT-PCR demostró ser más efectiva que ELISA en la detección de GLRaV-2, recomendándose por esto la utilización de esta técnica en programas de certificación de vides.

RESULTADOS DE ANÁLISIS VIROLÓGICOS EN VIDES (*Vitis vinifera* L.) DE BLOQUE DE SELECCIÓN CLONAL AGRO UC COLECTADAS EN ANTIGUOS VIÑEDOS DE CHILE DE LAS REGIONES: METROPOLITANA, VI Y VII. (Results of virological analysis in grapevines (*Vitis vinifera* L.) of clonal selection block Agro UC collected of old vineyards in regions of Chile: metropolitan, VI y VII). Lillo C. y J. Pérez Harvey. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Casilla 306 Correo 22, Santiago. Chile. E-mail. clillo@puc.cl

Las enfermedades causadas por virus provocan importantes daños en la viticultura, desde reducción de vigor, disminución en la producción, calidad de la fruta y vinos obtenidos hasta provocar la muerte de la planta. En el año 2000 se seleccionaron 80 potenciales clones asintomáticos de *Vitis vinifera* provenientes de 15 viñas: Cabernet franc, Cabernet sauvignon, Carmenère, Cot, Pinot noir, Merlot, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Semillon y Verdot. Estas vides se establecieron en un Bloque de Selección Clonal en el Campex COPEVAL. San Fernando. Las vides fueron evaluadas para detectar la presencia de virus de importancia económica, a fin de incorporarlas al Programa de Certificación de Vides (*Vitis* spp.) por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en Chile. Los análisis fueron realizados a partir de hojas y brotes utilizando la técnica serológica DAS-ELISA con anticuerpos policlonales para los siguientes Nepovirus: Tomato ringspot virus (ToRSV), strain Chickadee y Peach yellow bud mosaic (PYMB) (Bioreba, USA), Grapevine fan leaf virus (GFLV). En Closterovirus Grapevine leaf roll associated virus (GLRaV-1, 3 y 7) se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales para GLRaV-2 (Agritest, Italia). El resto de las pruebas fue realizado por DAS-ELISA, con anticuerpos monoclonales: Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB) y Fleck virus (GFkV) (Agritest, Italia). De las 80 muestras analizadas 9 resultaron positivas (11,3%) con incidencias por variedad de: Cabernet franc 20%, Cabernet sauvignon 15%, Carmenère 6,7%, Pinot noir 20%, Sauvignon vert 16,7% y Syrah con 66,7%.

estado inicial para el desarrollo de pudrición ácida en postcosecha, puede ser controlado con la temperatura de almacenaje de 0°C y SO₂. Sin embargo, concentraciones elevadas pueden acelerar la descomposición de la baya, permitiendo la proliferación de bacterias acéticas, desarrollando el estado terminal de la pudrición ácida.

COMPORTAMIENTO QUINOXIFENO EN EL CONTROL DEL OÍDIO DE LA VID. RESULTADOS DE TRES TEMPORADAS DE ENSAYO. (Quinoxiphen assessing on powdery mildew disease of grape. Results from three year assays). Riveros F. y C. Merino. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Intihuasi. Colina San Joaquín SN. La Serena. Casilla: Apartado Postal 36/B La Serena. Chile.
E-mail: friveros@intihuasi.inia.cl.

Durante 3 temporadas se condujo en Limarí Bajo (Ovalle), ensayos de campo sobre un cultivar altamente susceptible al oídio de la vid (Moscatel de Alejandría). En las temporadas 1999 y 2000, la investigación tuvo por objeto verificar el efecto de diferentes concentraciones del fungicida Quinoxifeno, aplicadas cada 10 y 20 días, en el control del oídio de la vid (*Oidium tuckeri*), mientras que en la tercera temporada de ensayo, el objetivo fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de Quinoxifeno y Fenarimol en el control de la enfermedad. Los resultados obtenidos en las dos primeras etapas de esta investigación determinaron que en aplicaciones cada 20 días de 20 cc/hl de Quinoxifeno, presentó índices de ataque de 4.9 y 2.9, e índices de control de 88.1 y de 97.5 (temporadas 1999 y 2000 respectivamente). En ambas temporadas, 10 cc/hl de Quinoxifeno aplicado cada 10 días, presentó índices de ataque de 6.1 y 0.8, con índices de control de 93.4 y de 99.1 respectivamente. Los resultados de la tercera etapa de ensayos demostraron que concentraciones de 8 + 5 cc/hl, de 16 + 10 cc/hl, de 24 + 15 cc/hl y 32 + 20 cc/hl de la combinación de Quinoxifeno y Fenarimol respectivamente, aplicadas cada 20 días, presentaron un índice de ataque de 4.0, 2.2, 1.2 y 0.6 respectivamente. Al mismo tiempo que para estos tratamientos se estimó índices de control de 93.4, 95.9, 98.0 y 99.0, respectivamente.

EFFECTO DEL CONTROL DE *Xiphinema index* y *Criconebella* sp. EN VID CV. THOMPSON SEEDLESS A DISTINTAS DOSIS, CONCENTRACIONES Y FORMAS DE APLICACIÓN DE DITERA Y ENZONE. (Control of *Xiphinema index* and *Criconebella* sp., in *Vitis vinifera* Thompson Seedless, with different doses, concentrations and methods of application of Ditera and Enzone). Valdivia M. y J. Magunacelaya. Departamento Sanidad Vegetal, Facultad Ciencias Agronómicas, Universidad Chile, Santiago, Chile.
E-mail: jmagunac@uchile.cl.

Se estudió el control de *Xiphinema index* y *Criconebella* sp. con los siguientes tratamientos: aplicados por goteo fueron DiTera 30 l/ha 2500 ppm, DiTera 30 l/ha 8300 ppm, DiTera 40 l/ha 2500 ppm, DiTera 40 l/ha 8500 ppm, Enzone 11 l/ha 500 ppm, Enzone 23 l/ha 1000 ppm; aplicados por inyección fueron Enzone 15 l/ha 500 ppm y Enzone 30 l/ha 1000 ppm. El ensayo se realizó en vid cv. Thompson Seedless, en la localidad de Alto Jahuel, comuna de Paine, en la temporada 2001-2002. La población de nemátodos se obtuvo de muestras de suelo realizadas antes de la aplicación de los tratamientos, a 30 días y en postcosecha. Se evaluó rendimiento, daños en raíces y peso de poda. A 30 días de realizado el control químico las poblaciones de *X.index* y de *Criconebella* sp. se incrementaron sólo en el testigo. Todos los tratamientos redujeron los niveles poblacionales iniciales aunque fueron estadísticamente iguales. En el largo plazo se mantuvieron las tendencias de control. Los rendimientos más altos se obtuvieron en los tratamientos de DiTera y Enzone aplicados por goteo. La poda de los tratamientos de DiTera y Enzone fue más alta estadísticamente que Nema-cur y el testigo. La calidad de las raíces fue mejor en los tratamientos que en el testigo, aunque no mostró diferencia estadística.

RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE LA ETIOLOGÍA DEL DECAIMIENTO EN PLANTAS DE UVA DE MESA INJERTADAS. (Preliminary results on decline etiology of grafted table grape plants). Fiore N.¹, J. Montealegre¹, H. Prieto², y S. Prodan¹. ¹Universidad de Chile,

Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Chile.

E-mail: nicolafiore_2000cl@yahoo.com²Instituto de Investigaciones Agropecuarias La Platina, Santiago. Chile.

En plantas injertadas de uva de mesa cultivadas en la V, VI y RM se encontraron síntomas tales como exceso de crecimiento en el punto de unión patrón/injerto, menor desarrollo vegetativo, hojas enrolladas y declinación. Esta sintomatología se produce desde los primeros meses después del trasplante y en los casos más graves se puede llegar hasta la muerte de las mismas. Al observar los tejidos internos, en el punto de unión patrón/injerto, los elementos conductores del portainjerto se encuentran parcialmente soldados a los de la variedad con presencia de necrosis. Se han visitado alrededor de 16 predios que presentaban el problema y las variedades más afectadas son principalmente Thompson Seedless, Red Globe, Flame, Superior y Crimson Seedless sobre diferentes portainjertos tales como: Harmony, Freedom, Paulsen 1103 y Richter 110. Se han analizados alrededor de 80 muestras a través de ELISA para 10 virus (GFLV, GLRaV-1, 2, 3, GFkV, GVA, GVB, ToRSV, SLRSV y ArMV) y RT-PCR para 5 virus (GLRaV-2, GRSLaV, GRSPaV, GVA y GVB). También se realizaron análisis para determinar presencia de hongos y bacterias. En la mayoría de los casos los resultados fueron positivos para GLRaV-2 y GFkV, seguidos por GRSPaV, GRSLaV y GVA. Nunca se detectó *Agrobacterium vitis*, ni hongos directamente responsables de la alteración observada. Muestras de Red Globe positivas con ELISA a GLRaV-2, dieron resultado positivo sólo para GRSLaV con RT-PCR. Esto indica que existiría una posibilidad de reacción cruzada con GRSLaV utilizando antisueros comerciales para el diagnóstico de GLRaV-2. Los resultados obtenidos a la fecha muestran que la etiología de este desorden no es simple. Si bien es cierto que, con diferente incidencia y en los casos más graves, se han encontrados GLRaV-2, GRSLaV, GRSPaV, GVA y GFkV, todavía no se explica por qué muestras analizadas resultan negativas a todos los virus antes mencionados. Proyecto FIA BIOT-01-A-13

IDENTIFICACIÓN DE PROGENITORES QUE TRANSMITAN MAYOR RESISTENCIA A OÍDIO (*Podosphaera leucotricha*) EN HIBRIDACIONES DE MANZANO CON RESISTENCIA A *Venturia inaequalis*. SEGUNDA PARTE. (Selection of parents that transmit a high level of mildew resistance (*Podosphaera leucotricha*) to their progenies in scab resistant apple hybridization. Second part). Cruz M. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Quilamapu. Casilla: 426. Chillán. Chile. E-mail: mcruz@quilamapi.inia.cl

En la temporada 2000, se evaluó en condiciones de campo la infección de *Podosphaera leucotricha* en una población de 2.888 plántulas seleccionadas por resistencia a *Venturia*, en la progenie de 17 combinaciones de cruzamientos de variedades de Malus X Domestica: Gala X Murray, Fuji X Murray, Royal Gala X Pink Lady, Royal Gala X Prima, Fiesta X Idared, Astracán rojo X Prima, Jonagold X Klarapfel, Jonathan X Murray, Gala X Pink Lady, Lustre Elstar X Prima, Reineta del Canadá X Prima, Braeburn X Murray, Jonagold X Murray, Puchacay X Murray, Hoover X Murray, Alston X Prima, y Red Chief X Prima. Murray y Prima son resistentes a *Venturia* debido los genes Vm y Vf, respectivamente. Murray es, además, resistente a oídio, y Prima también, aunque moderadamente. El resto de las variedades progenitoras tienen distinto grado de susceptibilidad a los dos patógenos. La infección de oídio en las distintas progenies tuvo valores de media ponderada de ataque entre 1 y 2,46, registrados en Reineta de Canadá X Prima y Royal Gala X Pink Lady, respectivamente. Se usó una escala ascendente de severidad de 0 a 5. Las diferencias entre medias de distintas combinaciones de progenitores fueron estadísticamente significativas (P=0,05).

EFICIENCIA DE TRATAMIENTOS DE POSTCOSECHA CON FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE *Rhizopus* sp. EN NECTARINOS. (Efficiency of postharvest treatments with fungicides in the control of *Rhizopus* sp. in nectarines). Torres F.¹, B. Pinilla² y M. Alvarez². ¹Universidad de la Américas, Facultad de Ciencias

ISSN 0430-6155

Fitopatología

VOL. 39

MARZO 2004

Nº. 1

Esta publicación es abarcada por los servicios compendiadores y de índice, entre otros,
de BioSciences Information Service of Biological Abstracts, Chemical Abstracts y
CAB Abstracts



ORGANO OFICIAL DE LA
ASOCIACION LATINOAMERICANA
DE FITOPATOLOGIA - ALF

solanacearum, even in viable form, by Enrichment-DASI-ELISA and Cooperative-PCR.

M.M. LOPEZ, E. BERTOLINI, P. CARUSO, M.T.GORRIS, M.CAMBRA y E.G.BIOSCA.
IVIA, 46113, Moncada, Spain. Tel:34963424000, fax:34963424001 mlopez@ivia.es

Ralstonia solanacearum es una bacteria de cuarentena en la Unión Europea. En los últimos 10 años se han detectado focos de este patógeno en distintos países europeos, relacionados con su presencia en agua de riego. Dada la frecuente existencia de infecciones latentes de *R. solanacearum* y su supervivencia en aguas superficiales, incluso a bajas temperaturas, en estado viable pero no cultivable (VBNC), son necesarios métodos sensibles y específicos capaces de detectar la bacteria también en dicho estado. Se ha puesto a punto la técnica ELISA-DASI utilizando anticuerpos monoclonales específicos y con un enriquecimiento previo de la muestra en medio Wilbrink modificado y la técnica PCR cooperativa. Ambas fueron capaces de detectar menos de 100 células por ml y pueden ser aplicables a análisis masivos.

DETERMINACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, UTILIZANDO LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Determination of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains, using the polymerase chain reaction (PCR) technique.

M. ESTERIO, I. PEREZ Y J. AUGER.

Depto. de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas - U. de Chile. Casilla 1004 Santiago-Chile. E-mail: mesterio@abello.dic.uchile.cl

Con el objetivo de estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* agente causal de la Peste Negra del Nogal (*Juglans regia* L.), principal enfermedad que afecta a este cultivo, se procedió a analizar la composición de las cepas obtenidas desde material vegetal sintomático proveniente de distintos tejidos y de

distintas localidades de la zona central del país. Las cepas de *X. a.* pv. *juglandis* fueron sometidas a pruebas *in vitro* de resistencia al ion Cu²⁺, y caracterizadas molecularmente mediante la variante de PCR, Repetitive-PCR (rep-PCR). Para la obtención de los patrones genéticos de los aislados de *X. a.* pv. *juglandis*, se utilizaron los partidores ERIC1R, ERIC2 y BOX1R. Los patrones genéticos obtenidos mediante las pruebas moleculares, permitieron clasificar a las diferentes cepas de *X. a.* pv. *juglandis* en estudio en distintos grupos, de acuerdo a su nivel de resistencia al ion Cu²⁺, localidad, así como también con respecto al tejido infectado.

CARACTERIZACION ENZIMATICA DE FITOPLASMAS AISLADOS DE VIDES CHILENAS.

Enzymatic characterization of phytoplasma isolates from Chilean grapevines.

A. GAJARDO¹, S. BOTTI², J. MONTEALEGRE¹, A. BERTACCINI² y N. FIORE¹.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Casilla 1004, Santiago. Fono / fax (56-2) 6785726. E-mail nfiore@uchile.cl.

²Università di Bologna, DiSTA Patologia Vegetale.

Los fitoplasmas son agentes causales de variadas enfermedades en vid. Con el propósito de verificar la asociación entre los síntomas observados en predios chilenos y la presencia de estos patógenos, fueron analizadas mediante pruebas moleculares 41 plantas de vid provenientes de las Regiones V, VI, VII y Metropolitana. La identificación se realizó mediante la amplificación de secuencias específicas ubicadas en el operón de genes ribosomales de los fitoplasmas. Para la PCR se utilizaron los partidores universales P1/P7 y se procedió para "PCR anidada" con el par universal R16F2/R2 y/o los pares específicos de grupo ribosomal 16Sr R16(I)F1/R1 y R16(V)F1/R1. Posteriormente, los distintos aislados fueron caracterizados según sus perfiles de restricción enzimática (RFLP) mediante digestión con las enzimas *TruI*, *TaqI*, *RsaI*, *AluI*, *HhaI* y *TspI*. Este análisis permitió la identificación de fitoplasmas

pertenecientes a los grupos *Aster yellow* (16SrI subgrupos B y C), *Ash yellow* (16SrVII) y *Stolbur* (16SrXII subgrupo A), a veces encontrado en las plantas como infección mixta. En ningún caso se detectó "Flavescencia dorada". Los resultados obtenidos constituyen la primera indicación de la presencia en Chile de fitoplasmas de los grupos 16SrXII y 16SrVII, siendo este último detectado por primera vez a nivel mundial en vides. Proyecto FIA BIOT-01-A-13.

DETECCION MEDIANTE PCR-RFLP DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, AGENTES CAUSALES DE FUSARIOSIS EN TOMATE.

PCR-RFLP detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, causal agents of fusariosis in tomato. F. GONZALEZ³, M.A. PALMA¹, G. MOLINA³, E. MONTENEGRO² y R. OYARCE^{1,3}.

¹Laboratorio Regional SAG, V Región, Valparaíso. ²Laboratorio de Nematología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. ³Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso. Lab.biomolecular@uv.cl

El tomate es una de las hortalizas de mayor importancia económica en Chile. Enfermedades importantes de distribución mundial como las producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), que ha sido reportada en nuestro país y las producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) han adquirido gran relevancia por su difícil diagnosis. Actualmente estas formas especiales son determinadas por Test de Patogenicidad, técnica laboriosa que requiere de bastante tiempo lo que dificulta su detección oportuna. Debido a que las técnicas moleculares son metodologías rápidas y eficaces el objetivo de este trabajo fue detectar por PCR-RFLP a Fol y Forl, con el fin de controlar y certificar el ingreso o salida del país de éstos. Se amplificó el gen "Factor de Elongación 1- α " (EF1-a), en 68 cepas de *F. oxysporum* aisladas desde diversas localidades de la V Región y en 4 cepas patogénicas controles

importadas de Seminis EE.UU. Posteriormente por digestión con endonucleasa MseI se logró diferenciar a Fol y Forl de las cepas de *F. oxysporum* no patogénicas. Estos resultados fueron confirmados mediante Test de Patogenicidad, revelándose de esta manera la eficiencia de esta técnica.

OBTENCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DE PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*) TRANSFORMADAS CON GENES DE CAPSIDE DE DIFERENTES POTYVIRUS.

Transformation and characterization of tomato plants with coat genes from different potyvirus.

M. VALENZUELA, A. LE MENN y P. ROUSSELLE

UGAFL, INRA. Domaine St. Maurice, BP 94, 84143 Montfavet cedex, France. (33) 432.72.27.27/ 72.27.01,

aline.lemenn@avignon.inra.fr,
patrick.rouselle@avignon.inra.fr,
mvalenzuelao@yahoo.com

Dentro de un programa de investigación sobre la resistencia derivada del patógeno por medio de la inserción de genes « capsido » de diferentes potyvirus a través de la transformación genética del tomate vía *Agrobacterium tumefaciens*, se realizó un estudio sobre la regeneración de plantas y la integración de genes. Se evaluaron tres construcciones denominadas LMV, WMV y PVY, que portan los genes de capsido del virus del mosaico de la lechuga, el virus del mosaico de la sandía y el virus Y de la papa respectivamente. Estas tres construcciones portan el gen de resistencia a la kanamicina (nptII) y WMV porta igualmente el gen de la betaglucuronidasa (GUS). Las plantas transformadas T0 fueron caracterizadas por medio de citometría de flujo (análisis de la tasa de ploidia), test histoquímico GUS, PCR y Southern blot para el gen nptII, y test de germinación de semillas T1 sobre kanamicina. La caracterización de la totalidad de las plantas transformadas mostró un importante porcentaje de plantas tetraploides (32,92%). Entre las plantas diploides, el 51,72% fueron GUS (+),

y un
copi
de ti
la c
mul
de
mul
kan
ser

DI'
sol
Ge
C.
AN
INI
em

Th
pa
en
inf
pa
se
(R
de
de
ex
Pa
sel
me
toc
pr
co
an
los
Ut
pr
de
ag
ais
res
lot
co
res
M

Publicaciones nacionales
Artículos

En suelos con viñas y/o parrones se acumulan patógenos y nematodos que afectan específicamente a la vid. En caso de replante es aconsejable emplear plantas injertadas, pues son más resistentes a estos problemas.

A nivel mundial la vid es un hospedero natural de más de cuarenta virus diferentes. Los más diseminados son aquellos clasificados en el grupo de los nepovirus.

DECAIMIENTO DE VIDES:

Un mal sin nombre

En las últimas temporadas se han detectado sobrecrecimientos en la unión patrón-injerto en parras de Los Andes, San Felipe y Paine.

ING. AGR. NICOLA FIORE
ING. AGR. JAIME MONTEALEGRE

Facultad de Ciencias Agronómicas
Universidad de Chile

En las últimas tres temporadas de producción de uvas se ha observado un sobrecrecimiento exagerado en el punto de unión patrón-injerto que posteriormente ha gatillado el debilitamiento de las plantas. El problema se centra en Thompson Seedless injertada sobre patrones Freedom y Harmony y ha sido identificado como "Decaimiento de plantas injertadas".

Ya son cerca de 200 hectá-

reas plantadas con material proveniente principalmente de viveros, las que han sido afectadas en zonas como Los Andes, San Felipe y Paine.

Un problema similar, pero no idéntico, ha sido reportado en la variedad Red Globe por fitopatólogos de la U. de California (Davis), quienes concluyeron que la alteración se debe a Grapevine rootstock stem lesion associated virus (GRSLaV).

Además de afectar la cantidad y la calidad de la pro-

ducción de las vides, hay que recordar que los virus pueden inducir incompatibilidad entre el portainjerto y la variedad.

En el marco del proyecto financiado por FIA, "Elaboración de un sistema confiable para la detección y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid", se investigó el origen de estos síntomas mediante técnicas serológicas (ELISA) y biomoleculares (RT-PCR) para la detección de los virus de mayor relevancia económica. También se consideró la eventual presencia de hongos y bacterias como posibles agentes responsables.

Investigación

El uso de plantas injertadas en el cultivo de la uva de mesa es una herramienta de reciente introducción en Chile que no está ajena a problemas relacionados, en sus orígenes, a un manejo agronómico insuficiente y a la presencia de patógenos, particularmente virus, en el material de propagación.

De este modo, no es de extrañar que los análisis practicados hayan arrojado resultados positivos a los virus Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2), Grapevine fleck virus (GFKV), Grapevine virus A (GVA) y GRSLaV.

GLRaV-2 y GFKV fueron los más frecuentes, tanto en ejemplares con síntomas como en testigos (sin síntomas), sin mayores diferencias entre los injertados sobre Freedom o Harmony. GVA se detectó sólo en plantas sobre Harmony y el porcentaje de infección de

GRSLaV fue bajo.

A la luz de los resultados se podría pensar en GLRaV-2 y GFKV como los responsables del "Decaimiento de plantas injertadas". Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de infección entre plantas con síntomas y testigos no son importantes para sindicarlos, con certeza, como responsables directos de la alteración. De este modo, este problema no parece tener una clara relación con tales virus.

En algunas de las muestras se determinó la presencia de los hongos *Verticillium dahliae* y *Fusarium* spp. aislados de la zona necrótica en la unión patrón-variedad. Se trata de patógenos oportunistas que se desarrollan debido al estado general de estrés que presentan las plantas y que sin lugar a dudas contribuyen, junto con los virus, a que las condiciones de las vides



Los síntomas

Esta alteración se manifiesta como un exceso de crecimiento del tejido vegetal en el punto de la unión patrón-injerto, con necrosis interna e incompleta conexión entre los elementos conductores del portainjerto y de la variedad. En muchos casos esto conduce a un menor desarrollo e, incluso, a la muerte de la planta. Con cierta frecuencia la variedad presenta un buen desarrollo, pero el diámetro del tronco del portainjerto es más reducido y su sistema radical es insuficiente para satisfacer la demanda de nutrientes y agua.

La manifestación de los síntomas comienza durante los primeros 2-4 meses posteriores a la plantación, entre fines de primavera y verano. Es decir, con plantas de 6 a 8 meses de edad desde el momento del injerto.

detectó la presencia de *Agr. bacterium vitis*, que produce tumores en el cuello, ramas parte aérea de la vid.

Cabe señalar que en las tres temporadas en estudio se ha observado que cerca del 90% de las plantas afectadas ha podido superar la crisis. El porcentaje de pérdida se relaciona en parte con plantas muertas y aquellas de menor tamaño respecto del resto del patrón, lo que implica sombreamiento y falta de luz para un normal desarrollo.

En opinión de los agricultores afectados, la recuperación es tal que la planta logra un desarrollo vegetativo aceptable y, además, su nivel de producción no difiere en más de 20 por ciento respecto de vides sanas, con la perspectiva que la brecha se pueda ir reduciendo con el tiempo.

Medidas

Ya que no existen evidencias de incompatibilidad genética en vid, la búsqueda del origen del problema se debe orientar hacia patógenos menos comunes o desconocidos, sin olvidar aspectos concernientes a la técnica de injertación y al manejo de las plantas en los huertos comerciales. Por ejemplo,

TATTERSALL COMERCIAL S.A.
DISTRIBUIDOR DE MAQUINARIA AGRICOLA

GASPARDO

GAMA

MASCHIO

YOMEL

SEMBRADORAS CULTIVADORES SEGADORAS

NEBULIZADORES PULVERIZADORES GARRETTILLAS

TRITURADORAS ROTOVATORAS ROTOFRESADORAS

ESPARCIDORES DE ABONO

ADENAS DISTRIBUIDORES DE:
RICHGER: Embudadoras de Grano
CESTAR: Tolvas Autocargables
FEYFE: Silos Graneros
SIXCOM: Bolsas de Silos
GHERARDI: Sembradoras Cero Labranza de maíz.

Tattersall COMERCIAL
y su Red de Distribuidores

SANTIAGO/ 3623030 • MELIPILLA/ 8323250 • RANCAGUA/ (72) 220907 • CURICO/ (75) 381458
LINARES/ (73) 218050 • CHILLAN/ (42) 264915 • TEMUCO/ (45) 211548 • PUERTO VARAS/ (65) 234802

MATERIAL VEGETAL

En Chile se venden vides calificadas como "standard"; es decir, procedentes de plantas madres vigorosas y sin enfermedades detectables visualmente.

SÍNDROME

El decaimiento de la vid se manifiesta como un sobrecrecimiento en el punto de unión patrón-portainjerto y un menor desarrollo posterior de las plantas.

PÉRDIDAS

Se ha observado que el 10% de las plantas no se recupera y las que sí lo hacen bajan su producción en 20%.

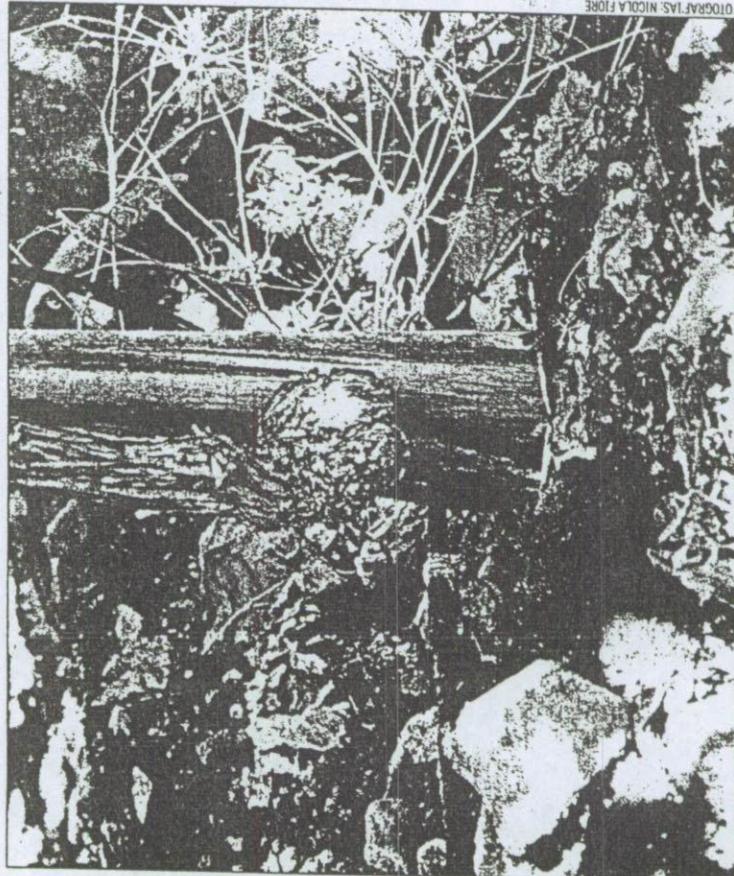
MANEJO

La única medida posible de adoptar es la prevención. Es decir, es necesario confirmar el prendimiento del injerto antes de realizar la plantación.

una excesiva fertilización puede causar un fuerte desarrollo de la variedad (muy vigorosa) y no del portainjerto (generalmente menos vigoroso) produciéndose un desbalance entre ambos.

Por otra parte, no existe suficiente información para afirmar o no la conveniencia de seguir cultivando las vides que se "recuperan".

De este modo, en el intertanto, los esfuerzos del agricultor se deben dirigir a prevenir que el problema ocurra; es decir, averiguar el buen prendimiento del injerto de las plantas antes de realizar el trasplante a terreno.



FOTOGRAFÍAS NICOLA FIORE

CRECIMIENTO DISPAR. — La variedad presenta un buen desarrollo, pero el diámetro del tronco del portainjerto es más reducido. Así, el sistema radical no satisface la demanda de nutrientes y agua.

Los virus

Mediante Elisa se estudió: Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll associated virus 1, 2 y 3 (GLRaV-1, GLRaV-2 y GLRaV-3), Tomato ringspot virus (ToRSV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB) y Grapevine fleck virus (GFKV).

Por su mayor sensibilidad la prueba RT-PCR se dirigió a confirmar los patógenos identificados con más frecuencia mediante Elisa: GLRaV-2, GVA, GVB y GFKV. Como también para la detección de Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) y Grapevine rootstock stem lesion associated virus (GRSLaV), para los cuales no se dispone de kit de Elisa.

Entre los hongos se investigó la presencia *Agrobacterium vitis*, que produce tumores en el cuello, ramas y parte aérea de la vid.

DATOS CLAVE	CARACTERÍSTICAS	CLASIFICACIÓN	TRANSMISIÓN
	Son organismos procariontes más pequeños que las bacterias, carentes de pared celular y forma definida.	Está basada en el ADN ribosomal 16S y se distinguen 15 grupos subdivididos a su vez en subgrupos.	Principalmente por insectos vectores. También por material vegetativo (estacas o yemas) y cúscura.

FITOPLASMAS EN VIDES:

Pequeños grandes enemigos

Estudio detectó en Chile un grupo de estos patógenos que está adquiriendo características epidémicas en algunas áreas de Europa.

ANDRÉS ACEVEDO FARIAS

El de fitoplasma no es un concepto de amplio dominio en los campos chilenos. El grueso de los agrónomos habrá oído hablar de estos agentes infecciosos, similares a las bacterias, en alguno de sus cursos de fitopatología; pero de ahí a toparse con ellos en el campo... De hecho, siguen siendo agentes bastante desconocidos para el agro nacional. Más aún, a nivel mundial es poco y nada lo que se sabe sobre sus reales capacidades fitopatógenas.

Sin saberlo, muchos viticultores han convivido con estos patógenos, entre otras razones, ya que su sintomatología se confunde fácilmente con la de los virus, especialmente los que causan enfermedades del tipo "leafroll". A medida que los medios de diagnóstico han evolucionado hacia técnicas moleculares queda de manifiesto su presencia en los viñedos y parronales del país.

Un mal mundial

Fronte a la incertidumbre de este panorama, el proyecto FIA, "Elaboración de un sistema confiable para la determinación y caracterización de virus y fitoplasmas que afectan a la vid", liderado por los investigadores de la Universidad de Chile Jaime Montealegre y Nicola Fiore, consideró una pequeña prospección en campos entre las regiones V y VII para verificar la asociación entre síntomas característicos

IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMA

Región	Fitoplasma	Virus asociados	Variedad
V	16SrXII-A	GfKv, GLRaV-1/2, GFLV, GVA	Autumn Royal
	16SrXII-A	GfKv, GLRaV-2	Thompson Seedless
RM	16SrI-C	ninguno	Petit Syrah
	16SrI-C	ninguno	Carmenere
	16SrVII	ninguno	Carmenere
	16SrVII	GLRaV-3	Merlot
	16SrI-C	n.d.	n.d.
VI	16SrI	ninguno	Carmenere
	16SrI-C	n.d.	Chardonnay
	16SrI-C +		
VII	16SrVII	ninguno	Carmenere
	16SrI	ninguno	Carmenere
	16SrVII	n.d.	Chardonnay
	16SrVII	GfKv, GLRaV-2	Merlot
	16SrVII +		
	16SrI-B	GVA, GLRaV-1, GfKv	Syrah
16SrXII	ninguno	Cabernet Sauvignon	

Datos preliminares.

Los análisis virológicos se realizaron para: GFLV; GLRaV-1, 2, 3; GfKv, GVA y GVB; GRSPaV; ToRSV; ArMV y SLRV.

EL MERCURIO

de amarilletes de la vid y la presencia de fitoplasmas.

Se analizaron 51 plantas de vid sintomáticas que manifestaban hojas con láminas enrolladas, endurecidas y total o parcialmente amarillas en las variedades blancas y rojizas en las tintas. También lignificación irregular de sarmientos, decaimiento y, en casos severos, muerte de plantas.

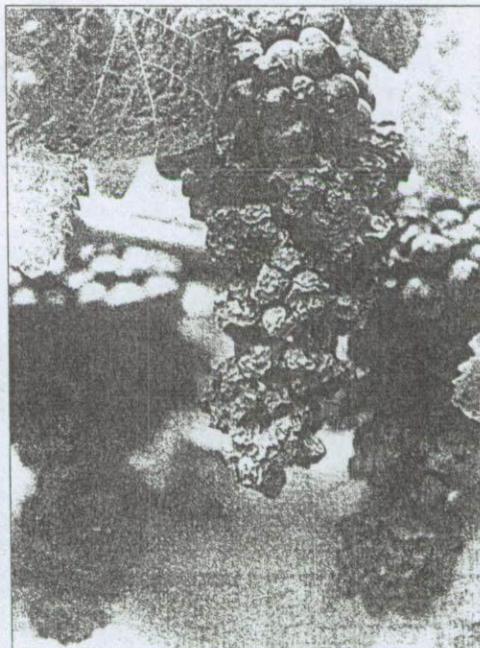
El estudio consideró amplificación génica y análisis de perfiles resultantes de restricción enzimática (PCR/RFLP), lo que permitió identificar 15 muestras positivas a fitoplasmas (ver recuadro).

Los resultados dan cuenta de la identificación por primera vez en Chile de los grupos 16SrI, 16SrXII y 16SrVII. El último grupo nunca antes

había sido encontrado en viñedos a nivel mundial.

El grupo 16 SrXII-A está asociado a la enfermedad epidémica Bois noir o madera negra, la cual se presenta desde hace tiempo en los territorios vitícolas europeos. Según comenta la especialista de la Universidad de Bologna Assunta Bertaccini, esta enfermedad —transmitida por *Hyalesthes obsoletus*— está asumiendo en algunas áreas características epidémicas, por lo cual es objeto de estudios epidemiológicos para evitar que sus daños puedan alcanzar la magnitud de los provocados por la flavescencia dorada.

La flavescencia dorada es la fitoplasmosis más importante a nivel mundial. En Europa ha alcanzado niveles de epidemia. Por ejemplo, en

**Síntomas**

Su presencia se manifiesta como aborto floral, amarillez generalizada, parcial lignificación de los sarmientos, hojas enrolladas como triángulo, bayas con menos gusto, hojas y venas de coloración rojiza, cambio en la textura de las hojas, bayas deshidratadas.

1995 en la zona de Piacenza/Pavia en Italia se detectó una reducción de 50% de la producción con el cierre de algunas bodegas. La repetición de esta situación en el tiempo llevó a decretar su control obligatorio a partir de 2000. Por ejemplo, en las zonas donde está difundida se efectúan monitoreos y tratamientos contra el vector —

el langostino *Scaphoideus titanus*—, y en las zonas focos además son arrancadas las viñedos que presenten sintomatología sospechosa.

Chile está libre de este último mal, sin embargo, Bertaccini recalca que todas las fitoplasmosis de la vid pueden volverse epidémicas tras la mínima variación de factores como clima, prácticas culturales y variedades usadas. Además, la introducción de elementos foráneos, como nuevos insectos, puede poner en peligro el ecosistema del viñedo.

Medidas urgentes

Se puede decir que los estudios en esta materia recién están comenzando en el país, por lo que existen muchas interrogantes por responder,

como por ejemplo, cuál es el vector de los grupos identificados hasta el momento. Sin embargo, es necesario acelerar el tranco para que no se repita la experiencia europea en los viñedos nacionales.

Aunque actualmente, según señala Fiore, parece ser de extrema gravedad lo que está ocurriendo a la cepa Merlot, con deshidratación de bayas que se acentúa acercándose a la cosecha.

"Los daños por pérdida de fruta ocasionados este año han sido considerables para varios productores. Los análisis preliminares realizados en los laboratorios indican a los fitoplasmas como los responsables de lo que está ocurriendo en Merlot", sostiene Fiore.

En un taller organizado por el Departamento de Producción Agrícola y Sanidad Vegetal de la Universidad de Chile se llegó a la conclusión de la urgencia de determinar la incidencia de la presencia de enfermedades causadas por estos agentes en las diferentes regiones geográficas de Chile; capacitar a profesionales y técnicos de campo en el reconocimiento de sus principales síntomas; e invertir en investigación a fin de evitar la diseminación de los fitoplasmas presentes y aquellos que eventualmente pudieran detectarse a futuro.

En el intertanto, frente a la pregunta de cómo manejar el problema, Assunta Bertaccini indica que hay que chequear el material de propagación a nivel de viveros, eliminar las plantas sintomáticas previa confirmación en laboratorio, producir material libre de fitoplasmas (control molecular en el tiempo de las plantas madres), y control adecuada de los eventuales vectores.