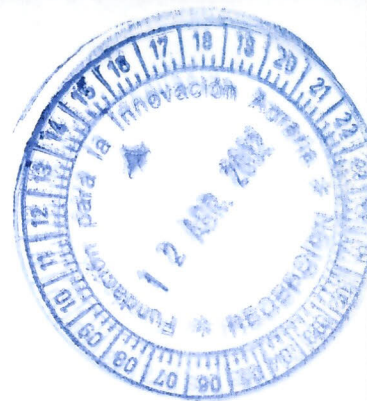




CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre " Actualización en el diagnóstico y detección de virus y organismos afines que afectan el cultivo de la Frutilla (*Fragaria* x *ananassa* D.)".

Código F01-1-BT-044

Entidad Responsable Postulante Individual Servicio Agrícola y Ganadero.

Coordinador Luis López Madrid, Unidad de Virología Agrícola, SAG.

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad) Alemania, Dossenheim.

Tipo o modalidad de Formación Pasantía

Fecha de realización 06 al 22 de octubre del 2001

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor
Ruperto Hepp Gallo	U. de Concepción	Profesor-Virólogo	
Luis López Madrid	Servicio Agrícola y Ganadero	Ing. Agrónomo-Virólogo	

Problema a Resolver: Implementar en nuestro país técnicas moleculares para el diagnóstico de virus y organismos afines que afectan el cultivo de la Frutilla.

Objetivos de la Propuesta

2. Antecedentes Generales: Los objetivos que se plantearon en un principio fueron alcanzados casi en su totalidad. Durante el tiempo de la pasantía en Alemania se pudo trabajar en directo con tres de los virus más importantes que se describen para frutilla; los cuales son el Strawberry Crinkle Virus, Strawberry Mottle Virus y el Strawberry Mild Yellow Edge Virus. Nosotros aportamos con 10 muestras provenientes de una colección de frutilla silvestre y cultivada, que se encuentra en la Facultad de Agronomía de la U. de Concepción y es propiedad del Dr. Hepp.

El trabajo consistió en trabajar todas nuestras muestras, mas unas que nos proporcionaron en el BBA y aplicar la metodología ya desarrollada para detectar estos tres virus.

Mediante este trabajo se logró identificar plantas que estaban infectadas con un virus en particular y en otros casos se determinó una infección de dos virus a la vez.



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

Los resultados obtenidos era imprescindible valorarlos en nuestro país; para lo cual se indexaron las plantas en cuestión en UC-5 y se logró poder separar estos tres virus en plantas individuales. En este momento se encuentran en jaulas anti-áfidos y se están multiplicando.

La semana antes del curso se probaron los partidores específicos para SMOV y SMYEV en estos controles enfermos y se logró un excelente resultado, los cuales fueron corroborados en el curso teórico-práctico realizado entre el 26 al 28 de Marzo del 2002.

Sobre la detección de fitoplasmas, en el centro que se visitó se encuentra una de las personas que más sabe en el mundo de ellos y que es el Dr. Semüller, con el cual se visitó la colección de fitoplasmas más grande en el mundo; los cuales se encontraban en Vinca y eran propagados y luego se realizaban de ahí todas las pruebas moleculares para poder caracterizar y secuenciar; también se pudo ver en vivo dos fitoplasmas que afectan frutillas y que son Green petal y Aster yellows fitoplasma. Con el se realizó una reunión con el fin de homologar las técnicas utilizadas en Alemania con respecto a las de Chile; lo cual fue muy enriquecedor, debido a lo que se utiliza en este momento en el país es lo que se utiliza en el mundo entero (PCR Nested con partidores universales del gen 16 Sr y 23S)

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
8 al 12/10	Extracción, purificación y amplificación para SMOV	Diagnosticar SMOV por PCR	BBA-Dossenheim
12/10	Charla sobre la situación fitosanitaria del cultivo de la frutilla en Chile. Descripción del SAG y su rol en la protección del patrimonio fitosanitario	Dar a conocer los virus presentes en Chile y como actúa el SAG para la prevención de enfermedades cuarentenarias	BBA-Dossenheim
15 al 19 /10	Extracción, purificación y amplificación para SCrV y SMYEV	Diagnosticar SCrV y SMYEV por PCR	BBA-Dossenheim
18/10	Visita a los invernaderos y a campo con el Dr. Semuller, luego en la tarde reunión de laboratorio.	Conocer la colección de fitoplasmas y ver síntomas en terreno. También comparar metodología de detección para fitoplasmas	BBA-Dossenheim

4. Resultados Obtenidos:

Los resultados obtenidos en la pasantía, son los siguientes:

- El laboratorio de virología del SAG podrá implementar el diagnóstico de SMoV y SMYEV mediante la técnica de PCR.
- Por medio de esta pasantía, se pudo corroborar que la técnica utilizada para la detección de fitoplasmas que afectan el cultivo de la frutilla, entre otras, es la que se utiliza a nivel mundial; por lo tanto, nuestro Servicio esta siendo capaz de asegurar una confiabilidad en el diagnóstico de fitoplasmas.
- El poder haber estado en los laboratorios del BBA-Alemania, nos dio la posibilidad de aprender la técnica de diagnóstico de fitoplasmas, mediante indexing en Vinca a través de cuscuta; a su vez, aprender a reconocer diferentes tipos de síntomas provocados por estos patógenos en esta especie.
- Todos los conocimientos adquiridos y las técnicas implementadas, también estarán disponible en el laboratorio de virología de la Facultad de Agronomía, U. de Concepción.

5. Aplicabilidad:

La aplicabilidad de todos los conocimientos adquiridos, ya esta siendo posible. En el curso dictado se pudo aplicar la técnica de PCR y PCR-Nested para el diagnóstico de fitoplasmas. También se trabajo con SMov y SMYEV mediante RT-PCR, obteniendo buenos resultados.

Nuestro laboratorio junto con el Subdepartamento de Vigilancia Fitosanitaria de nuestro Servicio este año (2002) realizara una prospección en las zonas de Melipilla y Cañete, con el fin de poder determinar los virus presentes en el cultivo de la frutilla en estas zonas. Las técnicas para diagnóstico serán: ELISA, Indexing en plantas indicadoras y PCR.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empleadora	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
BBA-Dossenheim	Dr. Wilhelm Jelkmann	Virólogo	49-6221-8680520	Schwabenheimer Str. 101. D-69221 Dossenheim.	Wilhelm.Jelkmann@urz.uni-heidelberg.de
BBA-Dossenheim	Dr. Jeremy Thompson	Virólogo	49-6221-8680521	Schwabenheimer Str. 101. D-69221 Dossenheim	Jeremy.Thompson@urz.uni-heidelberg.de
BBA-Dossenheim	Dr. Erich Semüller	Virólogo	49-6221-85238	Schwabenheimer Str. 101. D-	erich.seemueler@urz.uni-

				69221 Dossenheim	heidelberg.de
LOEWE Biochemicals GmbH	Dr. Renate Loewe	Empresaria - Bioquímica	49-8104- 61620	Mühlweg 2a D-82054. Sauerlach	Loewe.bioche micals@t.onli ne.de

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar:

Uno de los puntos relevantes que quedarían por abordar, es poder visitar de nuevo este centro de investigación, cuando haya terminado el proyecto; debido a que todavía queda por abordar otros tres virus, como son SCrV, SVBV y SPMYEV.

Además, uno de los objetivos es crear un kits para la detección de cinco virus a la vez, mediante PCR y que por el momento la técnica mas usada y en algunos disponible es el indexaje en plantas indicadoras.

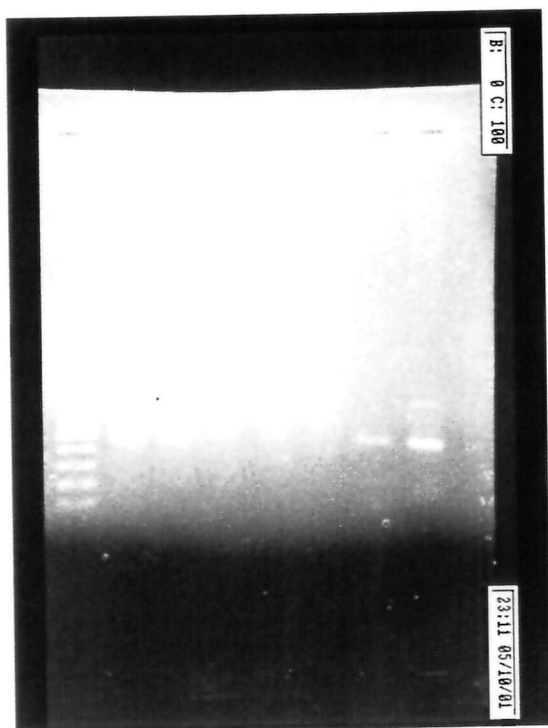
8. Resultados adicionales:

Dentro de los resultados adicionales obtenidos por medio de esta pasantía, debe considerarse la prospección que realizara el SAG en las zonas de Melipilla y Cañete, para ver el estado fitosanitario del cultivo de la frutilla en Chile; de la especie cultivada y la nativa.

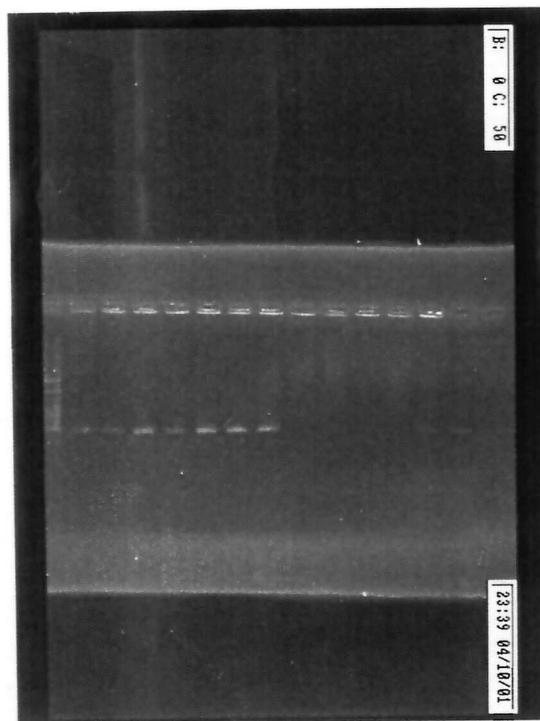
9. Material Recopilado:

Tipo de Material	Nº	Caracterización (título)
CD	1	FOTOS DE SÍNTOMAS DE VIRUS Y FITOPLASMAS
CD	2	FOTOS DE LABORATORIO
FOTOGRAFIA	1,2	RESULTADOS (+) EN ALEMANIA PARA SMoV Y SMYEV
FOTOGRAFIA	3,4	RESULTADOS (+) EN CHILE SMoV Y SMYEV
FOTOGRAFIA	1	RUPERTO EN EL BBA
	2	VISTA GENERAL DEL EDIFICIO
	3	HUERTO EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO
	4	JEREMY THOMPSON Y RUPERTO HEPP
	5	LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
	6	LABORATORIO DE ELECTROFORESIS
	7	VISTA DE LOS INVERNADEROS
	8	PLANTA UC-5 POSITIVA A SMoV
	9	UC-5 POSITIVA SMoV
	10	UC-5 POSITIVA A SCrV
	11	UC-5 POSITIVA A SCrV
	12	UC-5 INFECTADA CON 3 AISLADOS DE SMYEV
	13	JAULA DE CRIANZA DE PULGONES DE LA FRUTILLA
	14	POTENTILLA sp. USADA PARA LA CRIANZA DE PULGONES
	15	DR. SEMÜLLER INDICANDO SÍNTOMAS DE FITOPLASMAS
	16	SÍNTOMAS DE FITOPLASMAS EN UC-4
	17	TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS A TRAVEZ DE CUSCUTA
	18	"ESCOBA DE BRUJAS" CAUSADA POR FITOPLASMAS

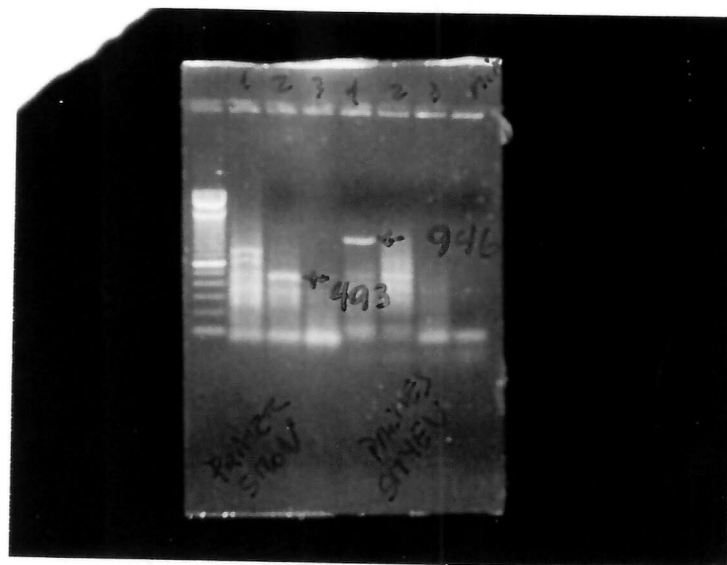
1



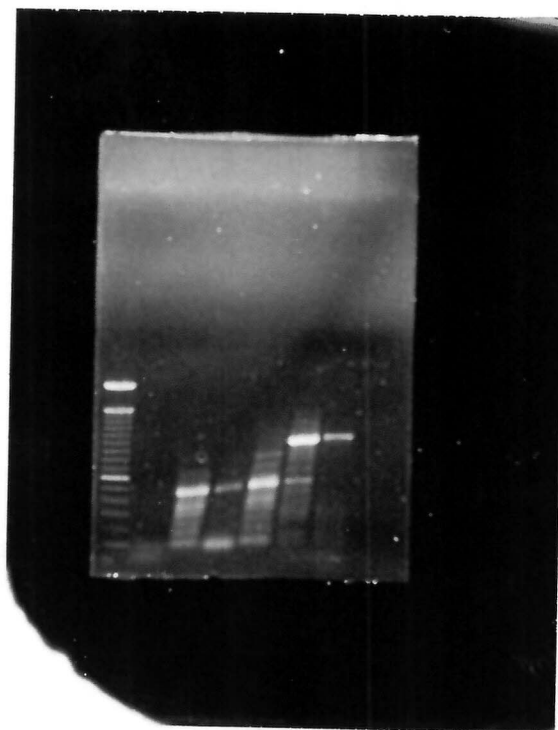
2



3



4



1



2



3



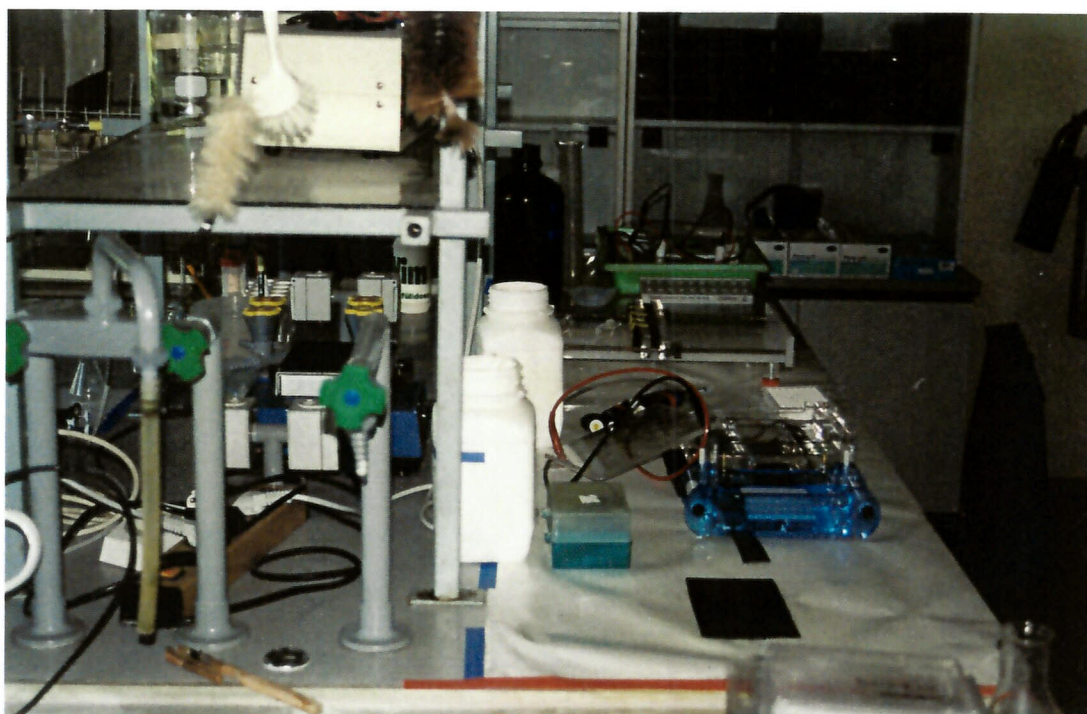
4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

_____ muy difícil _____ sin problemas _____ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

***bueno _____ regular _____ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

***amplia y detallada _____ aceptable _____ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

***bueno _____ regular _____ malo

e. Recomendaciones : No tenemos recomendaciones al respecto.

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	+		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa	+		
Reserva en hoteles	+		
Cumplimiento del programa y horarios	+		

11. Conclusiones Finales

Las conclusiones finales se pueden resumir en cuatro puntos:

- Es indispensable poder acceder a técnicas de alta confiabilidad, como son las técnicas moleculares, aprendidas en Alemania.
- En Chile es posible reproducir estas mismas técnicas para el diagnóstico de virus que afectan la frutilla.
- La posibilidad de acceder a capacitación, por medio de entidades como el FIA; es un gran aporte, ya que entidades gubernamentales como el SAG, disponen de presupuestos escasos para estas actividades.
- Es un gran aporte para el país, poder contar con un laboratorio de referencia en la Universidad de Concepción, que cuenta con las mismas técnicas que el SAG.

12. Conclusiones Individuales:

RUPERTO HEPP GALLO

Conclusiones a la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Wilhelm Jelkmann, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim, Alemania (octubre 8 al 19, 2001).

El objetivo de la pasantía se cumplió de acuerdo a lo programado. En el laboratorio del Dr. Jelkmann se trabajó en la detección de los principales virus de la frutilla, mottle y mild yellow edge, mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en muestras de frutilla colectadas en Alemania como en frutilla silvestre blanca colectadas en la zona de Contulmo, Octava Región. Se probaron para cada virus los cebadores que habían diseñado los Dr. Jelkmann y Thompson y que daban los mejores resultados de detección con muestras infectadas provenientes de Europa. También se usaron diferentes tipos de polimerasa para determinar cuál de ellas daba los resultados más confiables. En las muestras provenientes de Contulmo se pudo detectar ambos virus, lo que corroboró resultados preliminares de injerto en plantas indicadoras. Pero además, los resultados indicaron que los cebadores preparados para los virus presentes en Europa también eran capaces de detectarlos en muestras provenientes del sur de Chile, lo que hace que ellos puedan ser usados sin problemas para detectar tanto razas europeas como chilenas de los mismos virus, si es que son razas diferentes.

Gracias al Dr. Jeremy Thompson, post-doc del Dr. Jelkmann, pudimos realizar las detecciones de estos virus con sus cebadores, intercambiando conocimientos sobre la técnica y discutiendo los resultados obtenidos.

En esta visita se contactó además al Dr. Seemüller, eminencia mundial en enfermedades de frutales producidas por fitoplasmas, y para los cuales también se usa la técnica PCR en su detección, quien no tuvo reparos en dedicar un día completo para hablarnos de su trabajo y mostrarnos su colección de fitoplasmas, única en el mundo.

La pasantía fue todo un éxito, y esto se reflejó en el seminario y curso que ofrecimos posteriormente aquí en el país. Las puertas quedaron abiertas para futuros contactos e intercambios.

LUIS LOPEZ MADRID:

De acuerdo a los objetivos propuestos, yo puedo concluir en forma satisfactoria la pasantía realizada a los laboratorios del BBA-Alemania.

Con los conocimientos adquiridos se podrá diagnosticar, a lo menos, tres virus con técnicas moleculares; los que anteriormente solo podían ser diagnosticados por técnicas biológicas que dependían de las condiciones del invernadero y la experiencia de la persona que interpretaba los resultados. En este momento, el SAG es capaz de proporcionar a los viveristas, que pertenecen al Programa de Certificación de Plantas, y a los exportadores un alto grado de confiabilidad en los resultados que ellos requieren para poder contar con material vegetal sanitariamente libre de virus conocido.

Por el momento, no es posible dar a conocer las secuencias de los partidores que fueron utilizados en Alemania, debido a que todavía no son publicados; pero este año serán presentados a la comunidad científica y por ende, a todo el mundo.

Fecha: 12/04/2002

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: LUIS LOPEZ MADRID

