

ANEXO INFORME FINAL PROYECTO C-96-1-A-013

Metodología de muestreo.

Predios pilotos de muestreo.

Se eligieron 2 huertos con infestación de insectos en zonas representativas de la I, III, IV, V, R.M., VI y VII Región con el fin de realizar los muestreos. Cada uno de ellos se visitaron según el siguiente esquema:

Septiembre a Marzo: 2 visitas mensuales por predio seleccionado.

Abril y Mayo: 1 visita mensual

Julio y Agosto: 1 visita mensual

Para Arica se realizaron 2 visitas mensuales para toma de muestras. Los mapas de los predios fueron ya presentados en el Primer Informe Técnico y se adjuntan nuevamente. Los predios del valle de Azapa fueron modificados y su ubicación se adjunta también en este Informe.

Muestreo.

En estas visitas se tomaron muestras para analizar el tipo de plagas y su daño, evaluación de los enemigos naturales y su impacto en la población de las plagas.

En cada visita se muestreó 20 ramillas infestadas con conchuela negra u otros insectos. En la I Región fueron analizadas por la Universidad de Tarapacá y en la III y IV Región por INIA CRI Intihuasi. Las muestras de la V, R.M. y VI Región fueron analizadas en el CRI La Platina, al igual que de la VII Región que fueron enviadas a Santiago.

En laboratorio las muestras fueron colocadas en cámaras de recuperación de parasitoides (bajo condiciones de laboratorio). Las ramillas fueron mantenidas con algodón himedecido para evitar una desecación muy rápida. Luego de 15 días se recuperaron los parasitoides. Sobre las hojas de olivo se determinó también la presencia y daño de ácaros eriófidos.

Identificación y estudio taxonómico. Los parasitoides fueron identificados según la literatura recopilada y la clave presentada en el Manual de Manejo de Plagas del Olivo.

Parasitismo. Después de permanecer en la cámara de recuperación. Se tomó 100 conchuelas o escamas al azar, según sea el caso, se midió el parasitismo al encontrar el orificio de salida del parasitoide.

Fenología de conchuelas y escamas. Sobre 20 ramillas se determinó los estados fenológicos de la conchuela negra y otras escamas al momento del muestreo. Para conchuela estas se estimaron en I y II estadio, hembra joven (estado gomoso) y hembra madura oviponiendo.

Muestreo de insectos en olivares no pilotos. Se visitó otros olivares con el fin de detectar otros problemas además de los encontrados en los predios pilotos. Incluye muestreos de olivos para detectar la presencia de virus o viroides, labor que se continúa desarrollando.

Ensayo de control de conchuela mediante métodos alternativos a los tradicionales.

Ensayo 1. (Tercer y Quinto Informe Técnico), Al momento del proyecto se dispuso de los siguientes tratamientos con posibilidades de éxito en el control de la conchuela negra, la principal plaga del olivo: detergente aniónico y catiónico (ambos al 0.5%), aceite emulsible (1,5%), y caolina en 3 diferentes formulaciones. Este ensayo de manejo se realizó en la localidad de Lo de Lobos entre 1996 y 1999. Aplicación con pitón. 6 repeticiones y 1 árbol por repetición.

Aplicaciones: 3 aplicaciones por temporada

Ensayo 2. Aplicación de insecticidas bajo el sistema de riego por goteo. Se realizó en la localidad de Til-Til (1998-99, Quinto Informe Técnico) y en Vallenar (1998, Cuarto Informe Técnico).

Materiales y métodos :

Lugar : Til-Til. Parcela Los Litres . Propietario Benjamín Soto R.

Cultivar : Olivos. Altura aproximada de árboles, 2,5 m.

Tratamientos :

1. Confidor 350 al suelo, 4 cc por planta aplicados al gotero (en dos goteros). Regar primero y luego aplicar. Aplicación 11 de noviembre.
2. Confidor 350 al suelo, 4 cc por planta aplicados al gotero (en dos goteros). Regar primero y luego aplicar. Aplicación 18 de Diciembre.
3. Punto 75 WP al suelo, 2 gr por planta aplicados al gotero (en dos goteros). Regar primero y luego aplicar. Aplicación 11 de noviembre.
4. Punto 75 WP al suelo, 2 gr por planta aplicados al gotero (en dos goteros). Regar primero y luego aplicar. Aplicación 18 de Diciembre.
5. Detergente aniónico 0.5 %. Aplicación 18 de Diciembre.
6. Aceite Sunspray 2% al follaje. Aplicaciones: 18 de Diciembre, 6 de Enero y 22 de Enero.
7. Clorpirifos (Lorsban) 110 cc/hl mas Aceite 1.5 %. Aplicación 18 de Diciembre.
8. Testigo

Gasto de agua : 2 lts/árbol

Aplicación : Al suelo junto a los goteros o con motobomba de espalda hasta punto de goteo en los tratamientos al follaje.

Diseño : Completamente al azar. 8 tratamientos, 3 repeticiones y 2 plantas por repetición.

Evaluaciones : Se tomaron 5 ramillas de 20 cm de largo por parcela y se examinaron en laboratorio. Se realizó un recuento de las conchuelas vivas en las 5 ramillas y en 10 hojas.

Muestreo: Se realizó un muestreo de pre-aplicación y luego muestreos cada 15 días.

Ensayo3. Vallenar:

Fecha de aplicación: 25 de mayo 1998.,

Olivos de dos años de edad fuertemente atacados por conchuela negra.

4 árboles por tratamientos

Tratamientos (2):

1. Testigo

2. Imidacloprid aplicado a través del riego por goteo. 5 cc de Confidor 350 Sc

Evaluación a los 30 días de aplicado.

Predios muestreados y ubicación. Los mapas de ubicación se anexan.

Predios pilotos

REGION	PROVINCIA	SECTOR	PREDIO
I	Arica	Azapa	Sector bajo, km. 1,5. Campo Verde
I	Arica	Azapa	Sector medio, km 13, Las Riveras
I	Arica	Azapa	Sector medio-alto, km 23, Cerro Blanco
III	Huasco	Huasco Bajo	Sr. Carlos González
III	Huasco	Huasco-Freirina	El Mirador
IV	Elqui	Vegas-4 esquinas	Eduardo Godoy
IV	Limari	Cerrillos de Tamara	Israel León
V	San Felipe	Santa María	Lo Galdames, Sr. Sergio Cordero
V	San Felipe	Jahuel	El Zaino, Sr. Rogelio Cataldo
R.M.	Santiago	Colina	Centro de Estudios Tecnológicos (CET)
R.M.	Til-Til	Til-Til	El Sauce
R.M.	Til-Til	Til-Til	Camino San Antonio
VI	Rancagua	Lo de Lobos	Tipaume, Sr. Sergio Ramirez
VI	Coltauco	Cuesta de Idahue	Sr. Genaro Jara
VII	Curicó	Palquipudi-Rauco	Hijuela 5. Sr. Toribio Muñoz
VII	Talca	Peñaflor- Río Claro	Parcela 73 de Arnoldo Oliva

En una primera etapa se muestrearon en la I región los predios de Roxana Gardikic, Km 8 ½ Azapa y Sudlvoto Ordóñez, km 1 ½, Azapa.

Estudios virológicos o de viroides.

Metodología.

Origen del material. Se colectaron plantas de olivos mostrando disminuciones de crecimiento y malformación de hojas u hojas encorbadas o "Sickle leaf" provenientes de Arica y Copiapó (Figura 14). Estas muestras se sometieron a una serie de pruebas a fin de establecer el origen patológico del problema. A fin de detectar la presencia de virus se sometieron a la prueba de ARN de doble hebra, ELISA y microscopía electrónica. Su origen viroidal se investigó mediante la prueba de electroforesis de doble corrida y su origen fitoplasmal mediante PCR con partidores universales.

Prueba de ARN de doble hebra. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó macerando 3 a 4 g. de tejido en 8 ml de STE (1X (0.1M NaCl, 0.05M tris, 0.001 M EDTA, 0.01% DIECA). El extracto se colectó en un tubo de polietileno de alta densidad (50ml) y se agregó 1ml. de Sodio Lauril Sulfato (S.D.S.) de una solución al 10%, 0.5 ml. de Bentonita de una suspensión acuosa al 2%, y 9ml. de fenol saturado con STE 1X. El homogeneizado se mezcló vigorosamente por 30 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las muestras se centrifugaron a 8000 g. durante 15 min. a 4°C. Por cada 10 ml. de sobrenadante rescatado se le agregó 2,1 ml. de etanol 95%.

Para aislar los ácidos nucleicos se procedió de la siguiente manera: se prepararon dos porciones de 1 gr. c/u de celulosa (CF-11) por muestra, se agregó 25 ml. de STE 1X conteniendo 16% de EtOH y con esta suspensión se formaron dos columnas preparadas en jeringas de 20 ml. taponadas con lana de vidrio. La suspensión de celulosa se mezcló bien, colocándose en las columnas y se dejó fluir el exceso de STE/etanol. Posteriormente, se agregaron la muestra a la primera columna permitiendo que eluyera completamente descartando el eluido. En seguida, se lavó lentamente la columna con 40 ml. de STE 1X conteniendo un 16% de EtOH, descartándose dicha porción. Luego se agregaron 10 ml. de STE 1X pero esta vez se colectaron en un tubo de 50 ml, a la muestra recuperada se le agregó 2.1 ml de etanol 95%. Los mismos pasos se siguieron para la segunda columna,

agregando como muestra la solución obtenida en la primera columna, se lavó para finalmente agregar 6 ml de $1\times$, los que se colectan en un tubo de 50 ml.

Para precipitar los ácidos nucleicos a la muestra recolectada se le adicionó 0.5 ml de Acetato de Sodio 3M (ph 5.5) y 20 ml de EtOH 95%. Ellos se almacenaron por 2 horas como mínimo a -20°C , de esta manera se precipitaron los RNA de doble hebra. Finalmente las muestras se centrifugaron a 8.000 g. por 25 min., descartándose completamente el sobrenadante y dejando los tubos invertidos para secar el pellet.

Para evaluar las muestras se resuspendieron en 100 ul. de tampon muestra (buffer BE 20X 5ml, glicerol 20.0 ml., azul de bromofenol 0.01grs., agua destilada 75ml.). En algunos casos las muestras así preparadas se almacenaron indefinidamente a -20°C . Los ARN de doble hebra se analizaron en geles verticales (160mm de largo X 140mm de ancho y 1.5mm de espesor) al 6% de poliacrilamida preparado en buffer TAE. Las muestras normalmente se sometieron a electroforesis 3 a 4hrs, a 50-60mA, en tampón TAE 1X(0.04M TRIS, 0.02M NaAC-, 0.001M EDTA). Los geles se tiñeron con nitrato de plata.

Prueba ELISA. Para los efectos del procedimiento de la prueba serológica ELISA, en placas de poliestireno se colocaron 100 ul antígeno y se incubó a 4°C por toda la noche. Para la preparación del antígeno se procedió de la siguiente forma; 1-2 g de hojas se trituraron dentro de una bolsa plástica en solución de extracción (1:10 p/v) en tampón carbonato (0.014 M Na_2CO_3 , 0.0035 M NaHCO_3 , pH 9.6), el extracto se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos, colectándose el sobrenadante para cubrir los pocillos de las placas. En seguida, estas placas se lavaron 3 veces cada 5 minutos con solución de lavado PBS-T(8.0g NaCl, 0.2g KH_2PO_4 , 2,9g Na_2HPO_4 , 0,2g KCl y 0.02ml Tween-20 para 1Lt. de agua). Una vez terminado este periodo a las placas se les agregó BSA (bobine serum albumin) al 3% en PBS por dos horas a 36°C . Después de un lavado similar al anterior se adicionó inmunoglobulinas (1:1000 V/V) (Sanofi, Francia) específicas para la detection de los virus indicados en el cuadro 1, incubándose dos horas a 36°C . Posteriormente, se agregó un segundo antisuero producido en cabra, incubándose a 36°C durante dos horas. Finalmente, las placas se lavaron y se agregó (p-nitrofenilfosfato), Sigma 104) adicionándose a razón de img/ml de dietanolamina, pH 9.8. Lecturas a 405nm fueron realizadas a los 15, 30 y 60 minutos mostraron cambios en la intensidad de absorbancia en relación a los controles sanos.

Se consideró como muestra positiva aquella que presentaba una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos

Microscopía electrónica. Se colocó una grilla de malla 300, sobre una gota de extracto de planta infectada durante 3 min. Una vez seca, la grilla se colocó sobre una gota de contrastante (molibdato de amonio al 2% ó con kpt al 2%), durante 3 a 5 min. Posteriormente, se observaron bajo el microscopio electrónico (Zeiss, modelo EM 300).

Transmisión mecánica a huéspedes herbáceos. Muestras de hojas de olivo con síntomas de hojas encorvadas se trituraron en tampón fosfato 0.01 M más 0.001% de dietilditiocarbamato (DIECA). El extracto se frotó con algodón sobre hojas de plantas indicadoras (Cuadro 2). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a temperatura ambiente hasta la observación de síntomas.

Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aislación de DNA se realizó de acuerdo a la metodología de Kirkpatrick y otros (1987). Para ello, 0.5 g. de tejido se incubaron durante 10 minutos en 6 ml de tampón de molienda (125 mM fosfato de potasio, 30 mM ácido ascórbico, 10% de sucrosa, 0.15% BSA, 2% PVP, pH 7.6). después de moler el tejido se agregó otros 8 ml de tampón. El homogeneizado se centrifugó a 4°C durante 4 minutos a 1.100 g. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 4°C durante 25 minutos a 14.600 g. El pellet se resuspendió en 1.5 ml de tampón de extracción a 60°C (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl, pH 8.0) y se incubó a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó igual volumen de la mezcla cloroformo/alcohol (24:1). Después de la centrifugación, la fase acuosa se precipitó con 2/3 de volumen de isopropanol a -20°C y centrifugado a 15.000 g. el pellet se lavó con etanol al 70%, secando al vacío y disolviendo el pellet en 100 µl de agua estéril. Finalmente, la preparación de digirió con 50 µg/ml de Rnase A durante 30 minutos a 37°C.

Para la realización de las pruebas de PCR se seleccionó un par de oligonucleótidos universales para la detección de MLO (Lee y otros, 1993) R16F2 5'-ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' y R16 R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'. Para la amplificación de DNA se agregaron 5 µl de DNA extraído a una mezcla de 35 µl de 0.5 µM de cada partidor, 100 µM de la 4 bases (dNTPs) y 1 unidad de Taq polimerasa. Se cubrió con aceite mineral y se sometió a un termociclador sujeto a 35 ciclos del siguiente procedimiento; 30 segundos de denaturación a 95°C, 45 segundos a 55°C, 30 segundos de

annealing a 55°C y un período de elongación de 30 segundos a 72°C. Durante el último ciclo la elongación se extendió a 90 segundos.

Para el análisis de los productos de amplificación se colocaron alicuotas de 10ul de reacción de PCR en un gel de electroforesis de 6% acrilamida en tampon TBE (89mM tris, 80mM ac. bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,3). Los geles fueron corridos a 70 volts durante aproximadamente 2 horas. Posteriormente, los geles se tiñeron con plata.

Resultados de ensayos de campo.

Resultados y discusión ensayo Lo de Lobos. Temporada 1997-98

A los 29 días de aplicados los tratamientos, el control de I y II estadio de la conchuela fue muy eficiente en los tratamientos con aceite 1.5 % y detergente aniónico puro al 0.5 % (Tabla 2). Al considerar los adultos (Tabla 3) no existe mucha diferencia entre los tratamientos y el testigo, a excepción del uso de la arcilla hidrofóbica M-96-018 quien presentó una población de adultos incluso mayor a todos los tratamientos. Estos resultados demuestran que las aplicaciones de aceite y detergente controlan bien los estdos, inmaduros de la conchuela, no así los adultos que se encuentran bien protegidos por la caparazón. Un control mas eficiente podría observarse mas adelante ya que los primeros estadios no podrían llegar adultos, por lo tanto la reducción de la población es paulatina en el tiempo. Esa fue la razón de realizar nuevos tratamientos, utilizando los mismos árboles en cada fecha de aplicación. Una nueva aplicación durante el mes de enero mostró resultados similares, con un buen control de estadios inmaduros (I y II) con aceite y detergente y control deficiente con las arcillas (Tabla 4). Aún con esta aplicación los adultos no presentan diferencias con el testigo (Tabla 5). Nuevos antecedentes se tendrán con una tercera aplicación que se realizó durante el mes de febrero y que aún está procesándose y en el período de tomas de muestras. Existen dos posibilidades de resultado final, la primera es que a pesar del excelente control de primeros estadios con aceite y detergente los pocos adultos que sobreviven son capaces de mantener la plaga en un nivel similar a un árbol sin aplicar. Esto debido a que en estos últimos árboles existe una gran mortalidad natural. La segunda posibilidad es que luego de varias aplicaciones se haga sentir el efecto de los aceites y detergentes. Esto podrá dilucidarse al final de los ensayos en la próxima temporada.

Conclusiones.

El aceite al 1.5 % y detergente aniónico puro al 0.5 % controlaron eficientemente los estados inmaduros de la conchuela, no así los adultos.

El efecto final de estos tratamientos podrán observarse al cabo de varias aplicaciones, incluso varias temporadas.

Tabla 2. Número de I y II estadios vivos de conchuela negra del olivo en ramilla de 15 cm. Incluye las 10 hojas superiores de la ramilla. Promedio de 5 ramillas por árbol. N = 6 árboles. Aplicación del 27.11.97.

Tratamiento	27.11.97	3.12.97	9.12.97	16.12.97	26.12.97
	Pre-aplicación	6 días	12 días	19 días	29 días
Testigo	0 a	12.0 a	82.3 a	268.5 a	386.1 b
Aceite 1.5 %	0.2 a	0.1 c	0.0 b	0.2 c	0.0 d
Detergente	0 a	1.5 bc	0.0 b	0.0 c	0.0 d
Arcilla M-96-018 *	0 a	8.3 ab	61.7 a	287.6 a	526.2 a
Arcilla M-97-002 *	0 a	2.0 bc	19.6 b	162.4 b	318.4 bc
Arcilla M-97-009 **	0 a	0.9 c	13.8 b	114.3 b	255.1 c

* hidrofóbica; ** hidrofílica

Tratamientos en columnas seguidos por la misma letra no son estadísticamente iguales al 5 % error

Tabla 3. Adultos vivos de conchuela negra del olivo en ramilla de 15 cm. Incluye las 10 hojas superiores de la ramilla. Promedio de 5 ramillas por árbol. N = 6 árboles. Aplicación del 27.11.97.

Tratamiento	27.11.97	3.12.97	9.12.97	16.12.97	26.12.97
	Pre-aplicación	6 días	12 días	19 días	29 días
Testigo	5.5 a	11.2 b	13.8 a	13.5 a	8.4 b
Aceite 1.5 %	9.2 a	4.0 c	7.2 abc	5.3 b	4.5 b
Detergente	1.2 a	5.7 bc	2.8 c	3.4 b	3.5 b
Arcilla M-96-018 *	6.3 a	18.3 a	12.2 a	10.9 ab	17.5 a
Arcilla M-97-002 *	9.4 a	5.2 bc	10.1 ab	10.1 ab	7.0 b
Arcilla M-97-009 **	5.6 a	6.6 bc	4.8 bc	5.2 b	4.2 b

* hidrofóbica; ** hidrofílica

Tratamientos en columnas seguidos por la misma letra no son estadísticamente iguales al 5 % error

Tabla 4. Número de I y II estadios vivos de conchuela negra del olivo en ramilla de 15 cm. Incluye las 10 hojas superiores de la ramilla. Promedio de 5 ramillas por árbol. N = 6 árboles. Aplicación del 14.01.98.

Tratamiento	14.01.98	19.01.98	26.01.98	2.02.98	12.02.98
	Pre-aplicación	5 días	12 días	19 días	29 días
Testigo	172.7 a	110.9 a	112.6 a	84.6 a	232.6 a
Aceite 1.5 %	87.3 b	0.3 b	27.4 cd	5.0 c	3.0 c
Detergente	0.0 c	0.2 b	2.4 d	0.0 c	0.0 c
Arcilla M-96-018 *	89.8 b	9.7 b	27.8 cd	51.9 b	197.0 ab
Arcilla M-97-002 *	132.8 ab	26.4 b	50.2 bc	52.1 b	181.6 ab
Arcilla M-97-009 **	68.7 b	12.1 b	70.7 b	41.1 b	156.2 b

* hidrofóbica; ** hidrofílica

Tratamientos en columnas seguidos por la misma letra no son estadísticamente iguales al 5 % error

Tabla 5. Adultos vivos de conchuela negra del olivo en ramilla de 15 cm. Incluye las 10 hojas superiores de la ramilla. Promedio de 5 ramillas por árbol. N = 6 árboles. Aplicación del 14.01.98.

Tratamiento	14.01.98	19.01.98	26.01.98	2.02.98	12.02.98
	Pre-aplicación	5 días	12 días	19 días	29 días
Testigo	4.6 a	4.9 abc	5.0 b	2.5 ab	1.5 b
Aceite 1.5 %	8.9 a	3.9 abc	2.9 b	1.3 b	3.0 b
Detergente	2.2 a	0.6 c	1.8 b	0.7 b	1.1 b
Arcilla M-96-018 *	6.0 a	6.3 ab	4.9 b	2.8 ab	14.2 a
Arcilla M-97-002 *	8.8 a	8.2 a	10.6 a	4.4 a	3.1 b
Arcilla M-97-009 **	3.0 a	3.5 bc	4.6 b	1.3 b	4.0 b

* hidrofóbica; ** hidrofílica

Tratamientos en columnas seguidos por la misma letra no son estadísticamente iguales al 5 % error

Resultados ensayo Vallenar.

En la Figura 13, se aprecia que el insecticida Imidacloprid aplicado al riego, fue eficientemente absorbido por la planta de olivo causando una amplia mortalidad de los distintos estadios de *Saissetia oleae*.

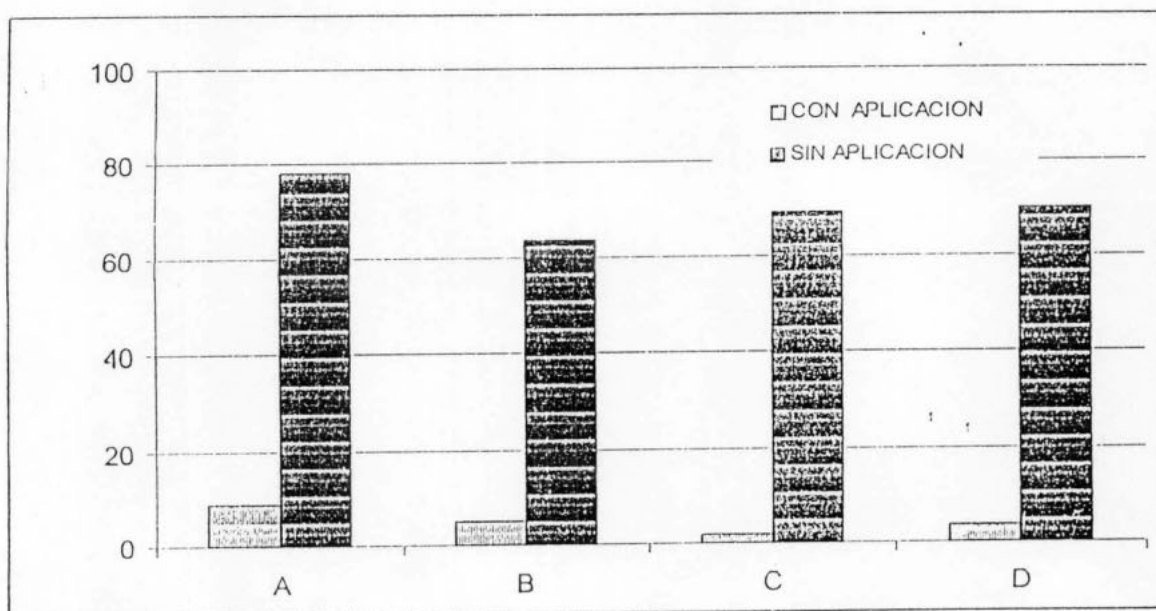


Figura 13. Efecto de Imidacloprid aplicado a través del riego por goteo sobre *Saissetia oleae*. Vallenar, 1998. Los tratamientos presentaron diferencias significativas de acuerdo al Test de Student.

Resultados y discusión ensayo Til-Til 1999.

En las figuras 14 y 15 se muestran la población de conchuela negra en ramillas y hojas respectivamente. Después de las aplicaciones la población de conchuela en ramillas bajó a niveles muy bajos, lo que también sucedió en el testigo, salvo en una fecha. Esta situación impide sacar conclusiones claras y se debe fundamentalmente a la dispersión variable de la plaga. Tampoco la comparación en hojas explica la acción de los insecticidas. La evaluación visual del ensayo indicó que todos los tratamientos fueron efectivos, y que el testigo tenía mayor infestación que no se reflejó en los muestreos por la razón mencionada anteriormente.

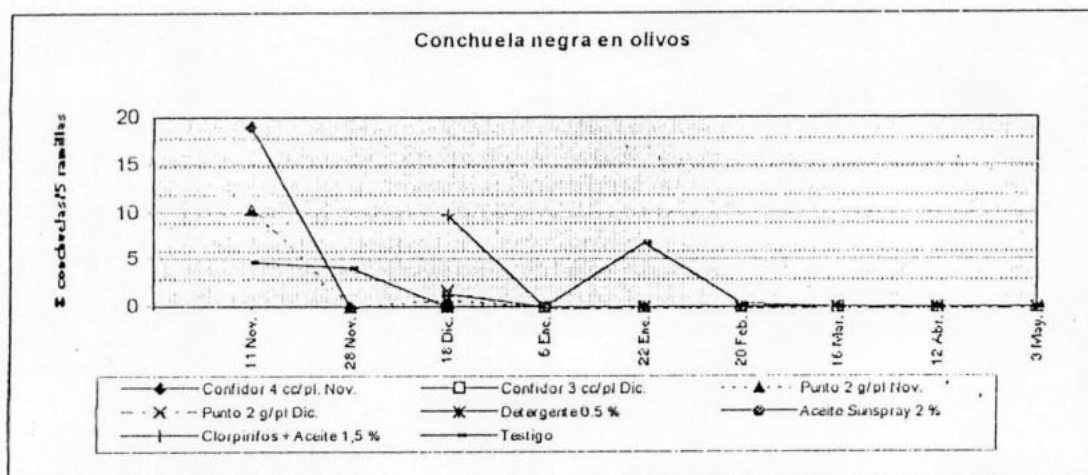


Figura 14. Población de conchuela negra (*Saissetia oleae*) en ramillas de olivos. Til-Til, 1999

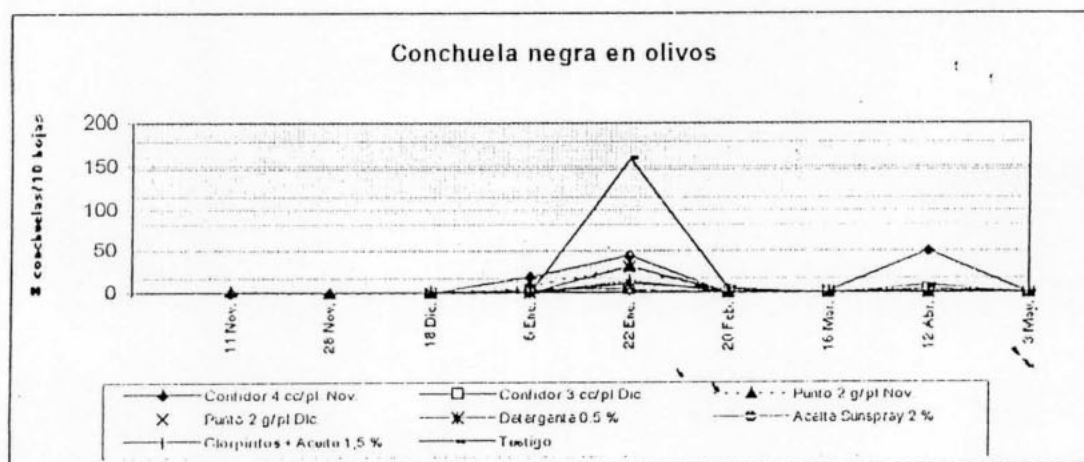


Figura 15. Población de conchuela negra (*Saissetia oleae*) en hojas de olivos. Til-Til, 1999

Resultados y discusión ensayo Lo de Lobos 1998-99.

La figura 16 muestra la evolución de I y II estadio en ramillas y hojas de olivo. Se observa que el testigo mostró una significativa mayor población de conchuela negra a partir del mes de enero. Los tratamientos de aceite, detergente y arcilla mostraron altos niveles de control. Al mes de marzo los tratamientos con caolina continuaron mostrando un nivel reducido de conchuela. El control de aceite y detergente coincide con los resultados de temporadas anteriores y los árboles se observan con menor nivel de fumagina. Especialmente el tratamiento con detergente mostró árboles limpios y con frutos de aceituna, lo que no se observó en los otros tratamientos. El huerto usado para estos ensayos está altamente infestado con conchuela lo que explica la falta de fructificación. En el caso de conchuelas adultas (Figura 17) el testigo mostró las mas altas poblaciones, excepto en dos fechas de muestreo (¿error de muestreo?). El detergente, salvo en una fecha, mostró niveles reducidos. El aceite y las arcillas también mostraron en general un nivel bajo de conchuelas. Hay que anotar que ni aceite, ni detergentes o caolinas son capaces de controlar los adultos. El efecto de todos ellos se debe notar luego de varias aplicaciones.

A pesar que los datos mostraron un control de conchuela con caolinas, los árboles se encontraron cubiertos por fumagina. Los datos de temporadas anteriores mostraron un pobre efecto de estos productos lo que contrasta con los resultados presentados en esta oportunidad. Un mejor panorama del real aporte de las caolinas podría tenerse después de otras temporadas de estudio.

Conclusiones. El detergente y el aceite muestran nuevamente promisorios resultados en el control de la conchuela. Estos se visualizan marcadamente después de dos temporadas de uso.

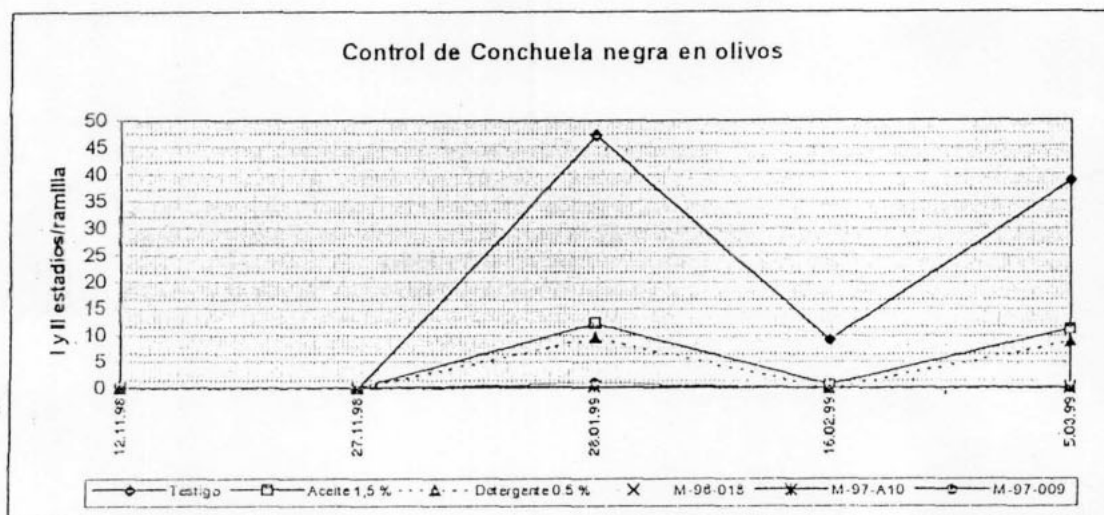


Figura 16. Población de *Saissetia oleae* (primeros estadíos) en olivos. Lo de Lobos. 1998-99

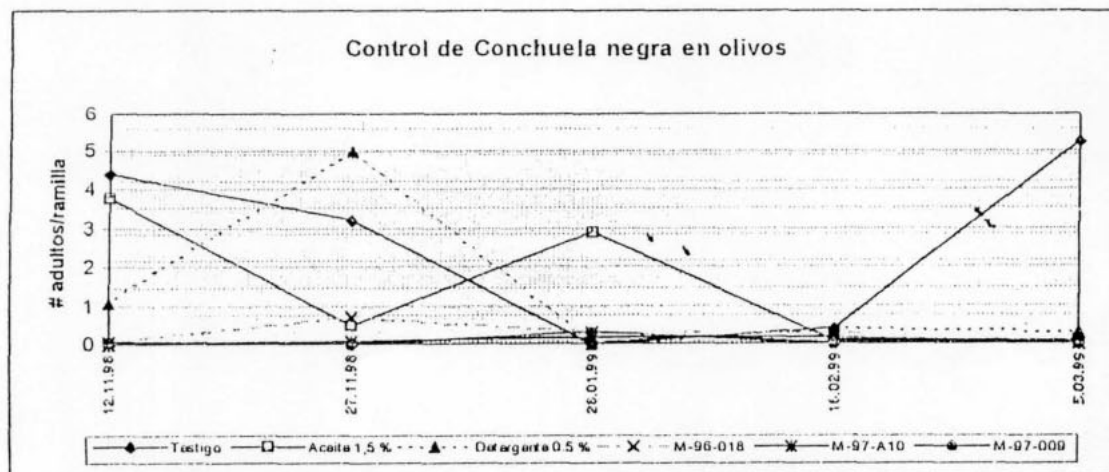


Figura 17. Población de *Saissetia oleae* (adultos) en olivos. Lo de Lobos. 1998-99

Situación de huertos de olivos no incluidos en los muestreos habituales.

De manera de conocer el estado sanitario de otros huertos de olivo se visitaron varios de ellos para realizar un análisis visual y evaluar en laboratorio aquellas muestras que pudieran dar mayor información. A continuación se presentan por zona:

- Vallenar, La Compañía (Predio INIA), III Región. Presencia de conchuela negra, conchuela hemisférica, escama blanca de la hiedra y chanchito blanco de cola larga. Se detectó la presencia de ácaros eriófidos y *Brevipalpus*. Se detectó un ataque de hormiga fuego, *Solenopsis gayi*, atacando follaje y frutos lo que solo se había observado anteriormente en árboles de cítricos. Esta especie es de origen chileno y puede presentarse luego de levantar la flora nativa para la plantación de frutales.
- Los Olivos, Limarí, de agricultor Bartolomé Labarca, IV Región. Presenta las cuatro primeras especies nombradas en el párrafo anterior.
- Los Choros, Elqui, de agricultor David Albiña, IV Región. Presenta una importancia de plagas similar a las anteriores y con las mismas especies. Se agrega la presencia de la conchuela acanalada de los cítricos, *Icerya purchasi*. En este huerto hay aproximadamente 84 % de árboles con fumagina, lo que indica la importancia de las plagas chupadoras.

Til-Til. Región Metropolitana. (12.3.98). Aproximadamente el 10% de los olivares de esta área tiene algún tipo de manejo, sea fertilización, riego o manejo sanitario. Muchos de ellos están asociados a tunaletas lo que dificulta el manejo general.

- Predio de Mario Escobar, Fundo San Antonio. Este huerto posee riego por taza y no se realizan aplicaciones de insecticidas ni fertilización. El nivel de plagas es relativamente bajo, con presencia de conchuela negra en focos. No se encontraron ácaros eriófidos. Se observó muchas hojas torcidas las cuales pueden corresponder a presencia de virus o de ácaros eriófidos. Sin embargo, estos últimos no fueron encontrados en las muestras. Presencia de ramillas muertas por escolito.
- Predio de Benjamín Soto, Fundo Los Litres. Riego por taza y algunos sectores con riego por goteo. Fertilización durante las dos últimas temporadas. Se ha aplicado insecticida (Parathion mas aceite) durante el mes de enero. Se presenta un intenso

ataque de conchuela negra con presencia de fumagina focalizado en algunos árboles, pero el estado sanitario puede considerarse como de alta infestación. Poca sintomología de hojas torcidas, pero sin detección de ácaros. Presencia de ramillas muertas por escolito.

- Predio de Callejón 2, Propiedad de la familia Aguirre. Riego por taza y goteo. Aplicaciones habituales de insecticidas. Presencia de conchuelas en focos y de ácaros eriófidos. Presencia de ramillas muertas por escolito.
- Fundo Tapihue. En buena condición sanitaria con presencia de hojas torcidas. No se encontró eriófidos ni conchuelas. Se realizan aplicaciones insecticidas. Presencia de ramillas muertas por escolito.
- Vivero El Parronal, Buin. Monitoreo de enfermedades, específicamente Verticilosis y ojo de papagayo, *Spilocaea oleagina*, virosis y plagas. Solo se encontró unas pocas plantas con manchas cloróticas cuyo análisis fitopatológico mostró la presencia de *Alternaria* de importancia secundaria.

VI Región (17.03.98).

- Fundo Santa Amelia de Pichidegua. Huerto de 60 años de edad, injertado hace 30 años. Buen nivel tecnológico, con aplicaciones aéreas de pesticidas contra conchuela negra. Se encontraron muy pocas conchuelas y algunos eriófidos. Presencia de ramillas muertas por escolito.

Conclusión general. Las localidades del norte como la III y IV Región poseen una composición de plagas diferente a las Regiones de mas al sur. La conchuela negra es común para todas las Regiones, pero en el norte se agrega la escama blanca, chanchito blanco de cola larga y conchuela hemisférica. Su importancia relativa depende de los huertos en particular. La escama blanca y chanchitos blancos se encuentran infestando hojas y frutos. En estos últimos producen una deformación y decoloración. Se encontró hasta un 4.5 % de frutos infestados por escama blanca. La importancia de cada una de ellas depende del huerto en particular. Entre la V y VII Región es mas común encontrar la conchuela negra del olivo con abundante fumagina en aquellos huertos infestados. El escolito del olivo se observa con frecuencia, pero sin importancia económica de la IV Región al sur. Los ácaros eriófidos han

sido detectados en huertos de todas las localidades, pero tampoco parecen ser importantes como plagas.

Muestreo para detecciones de virus y viroides en predios no incluidos en el muestreo habitual.

Como se indica en las siguientes tablas, solo se ha detectado viroides

Predios muestreados para detectar presencia de viroides

Región	Pedio	A/B *
I	1	4/8
III	2	4/4/
III	3	0/4
Metropolitana	4	0/6
Metropolitana	5	1/1
V	6	5/9

(*) A: Plantas con reacción positiva
B: Total de plantas analizadas

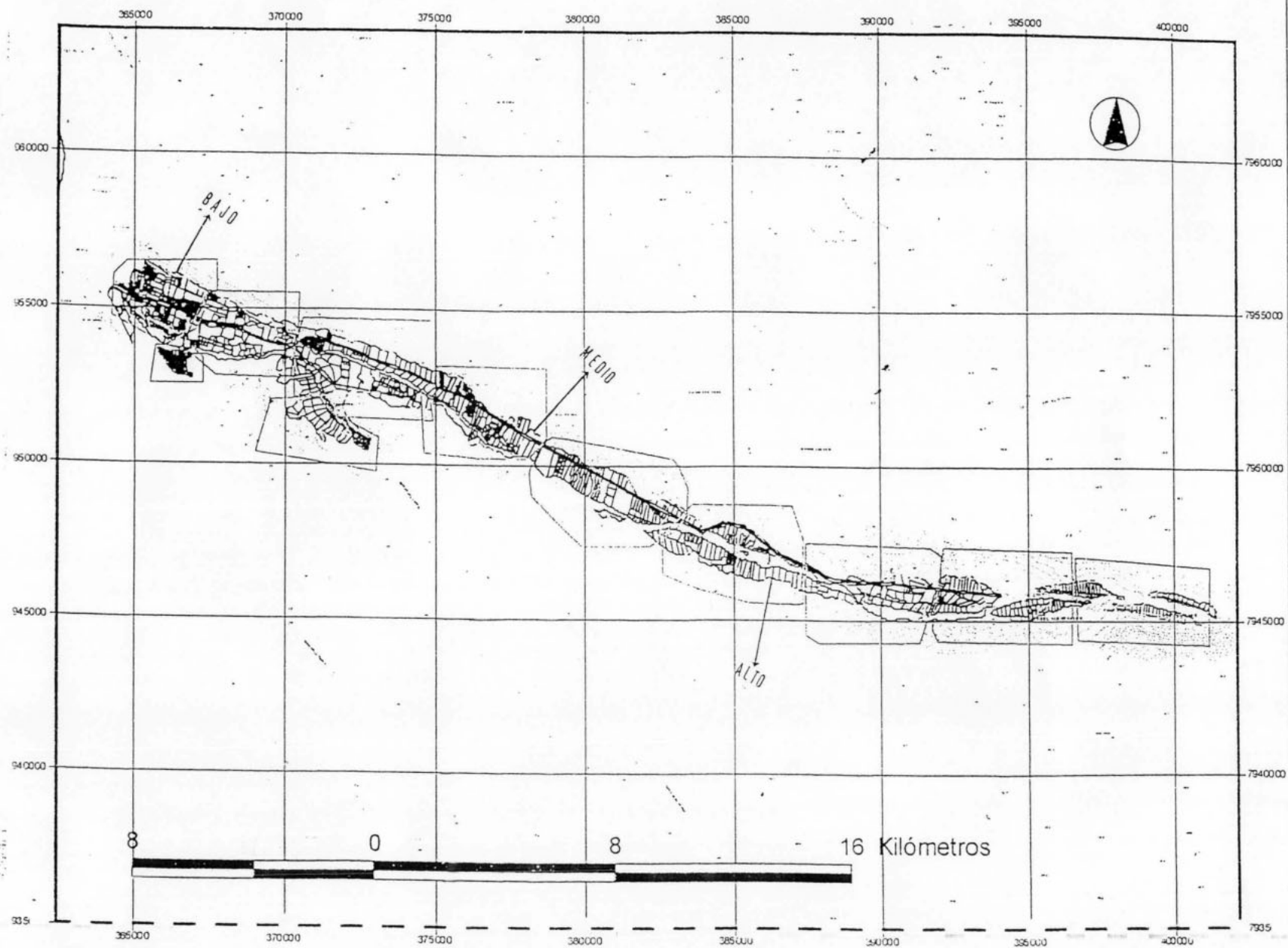
Predios muestreados para detectar presencia de virus

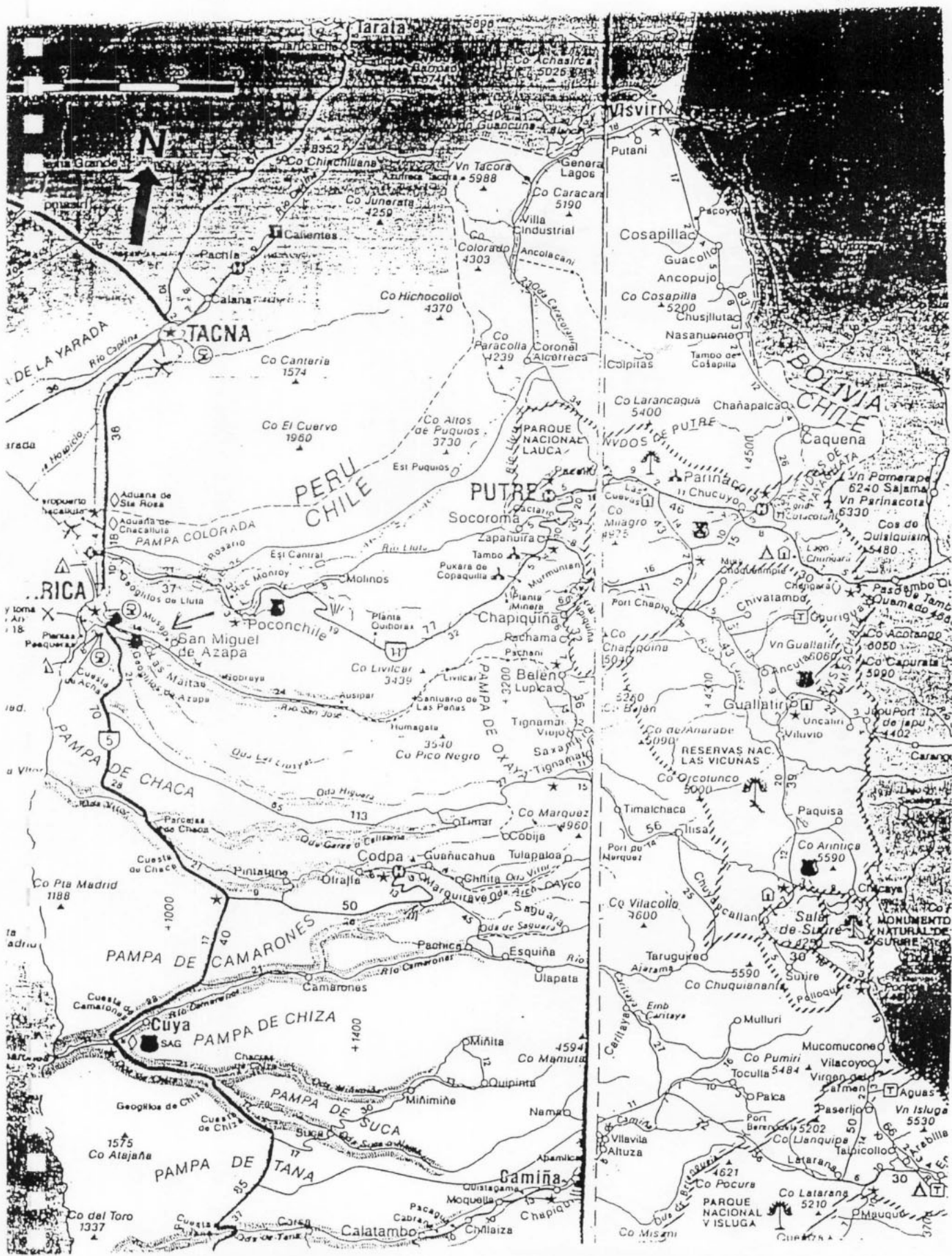
Región	Pedio	A/B *
I	1	0/8
III	2	0/4
III	3	0/4
Metropolitana	4	0/6

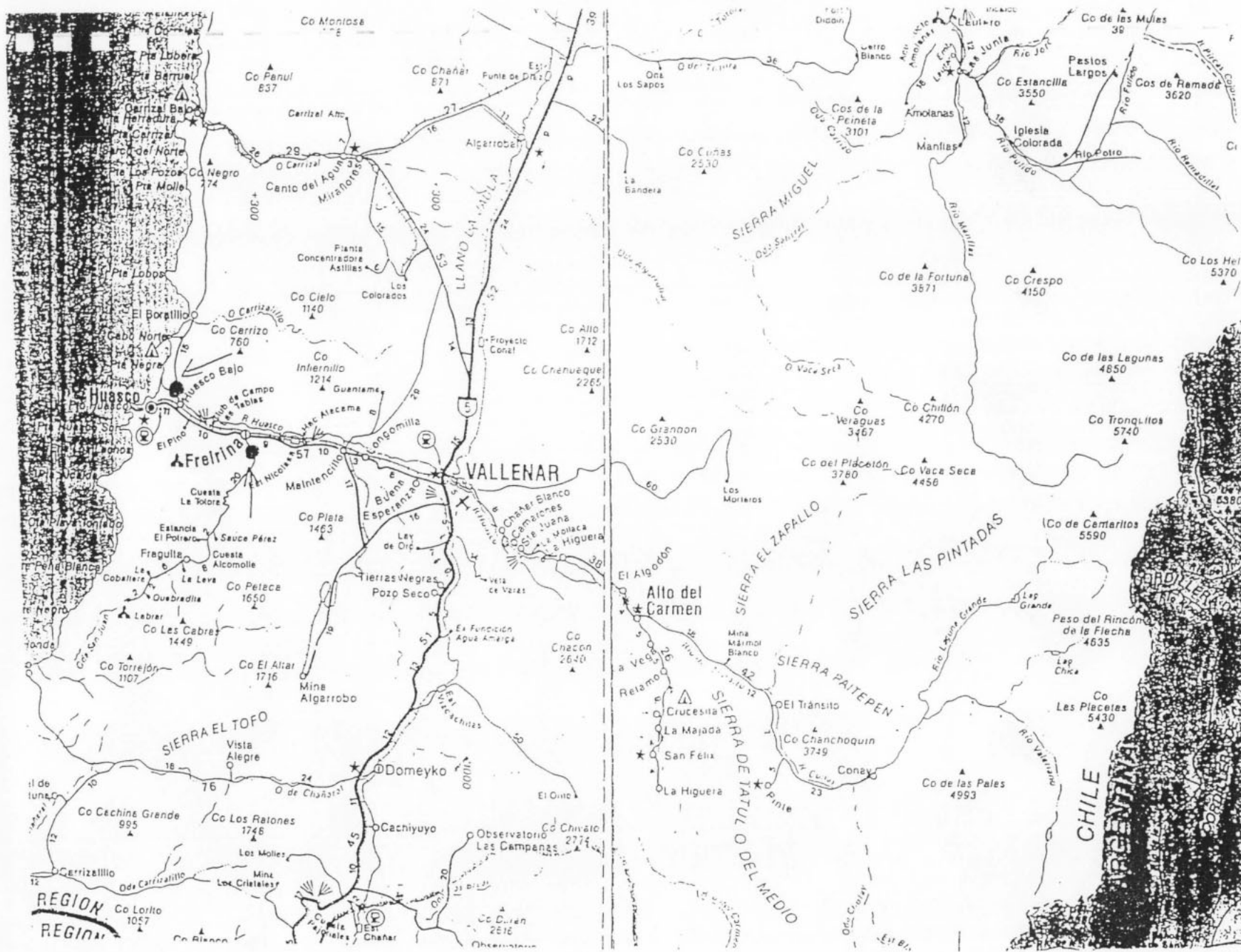
(*) A: Plantas con reacción positiva
B: Total de plantas analizadas

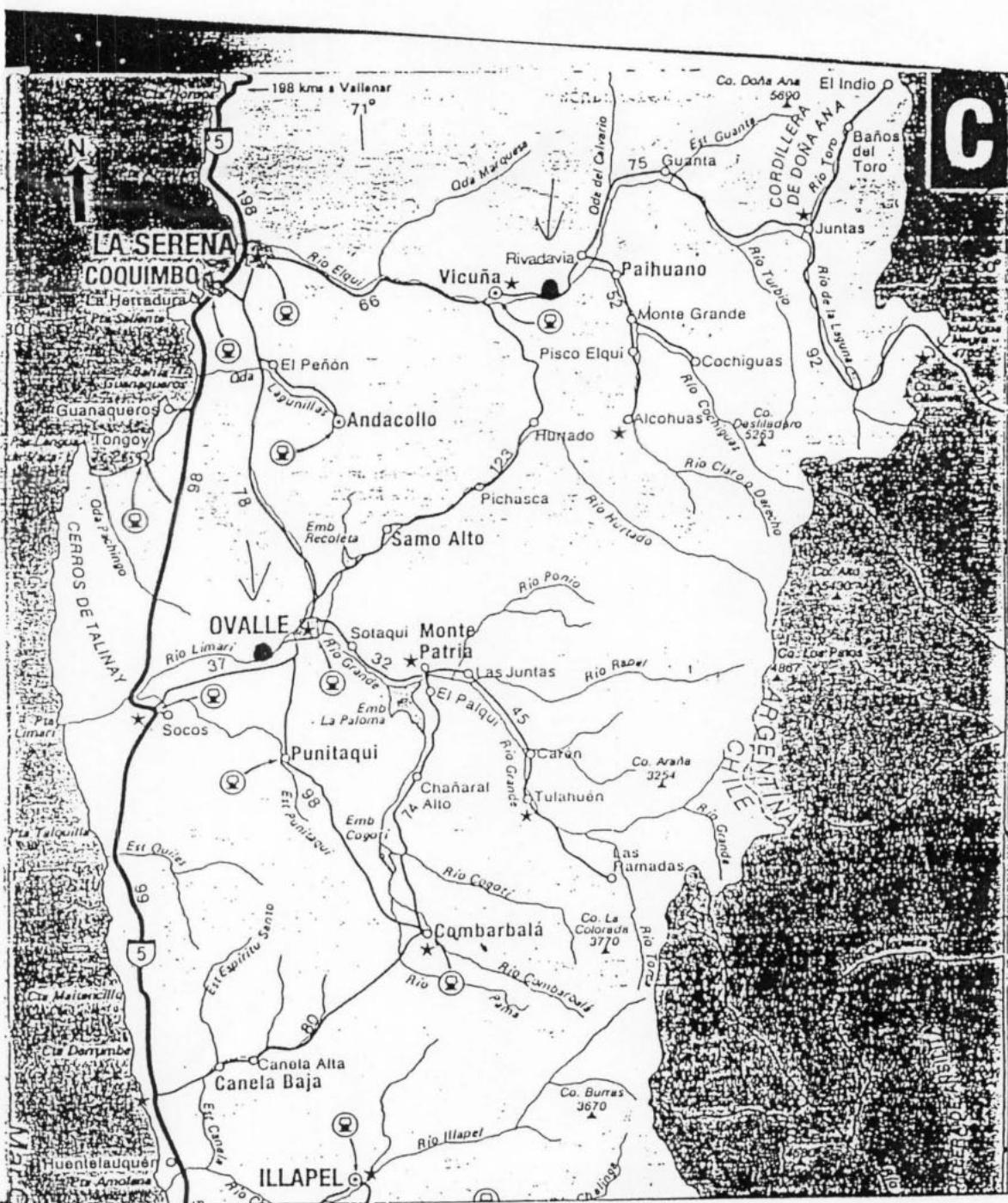
UBICACIÓN DE PREDIOS PILOTOS.

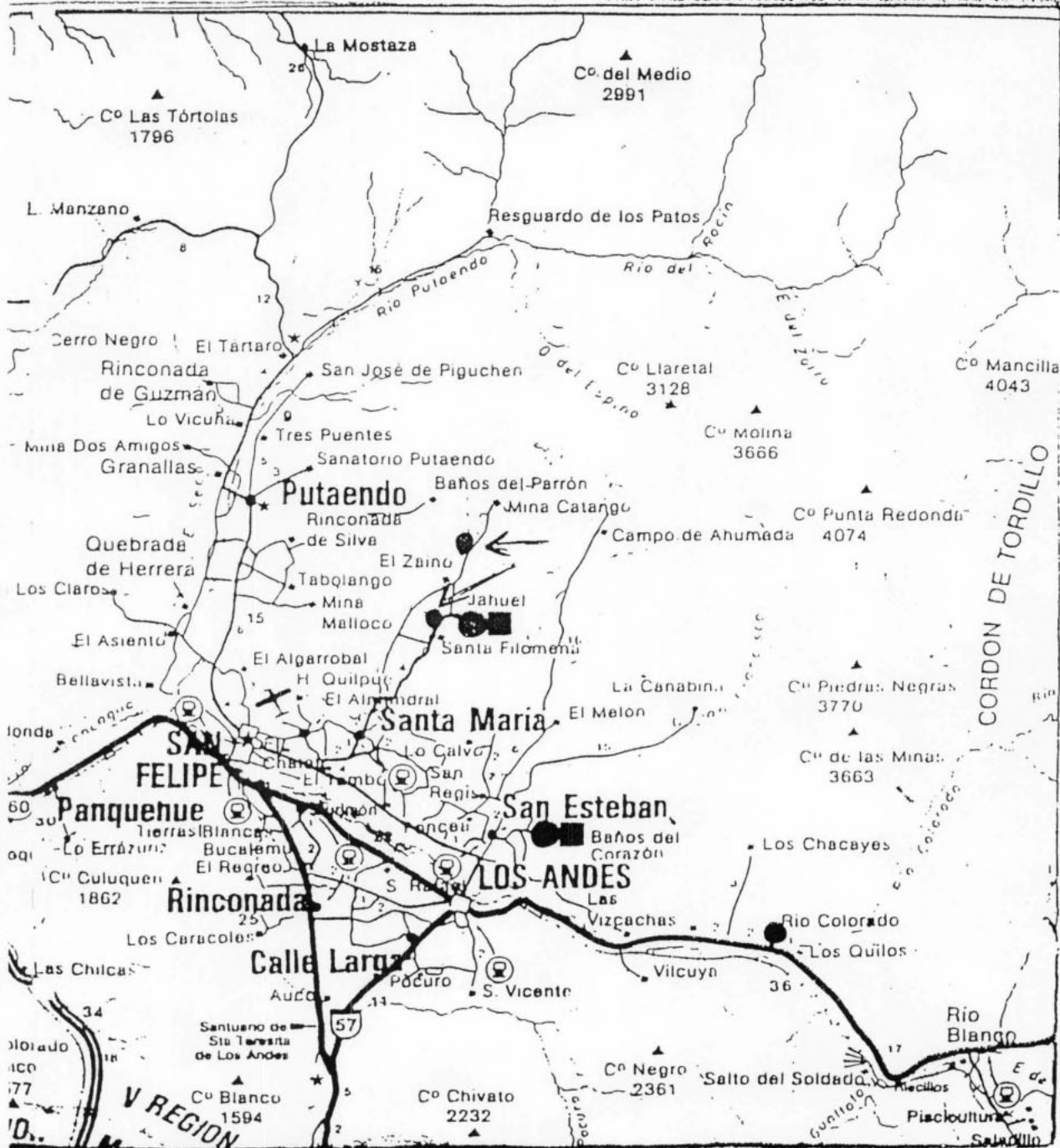
Proyecto Denominación de Origen de la Aceituna UTA-FDI

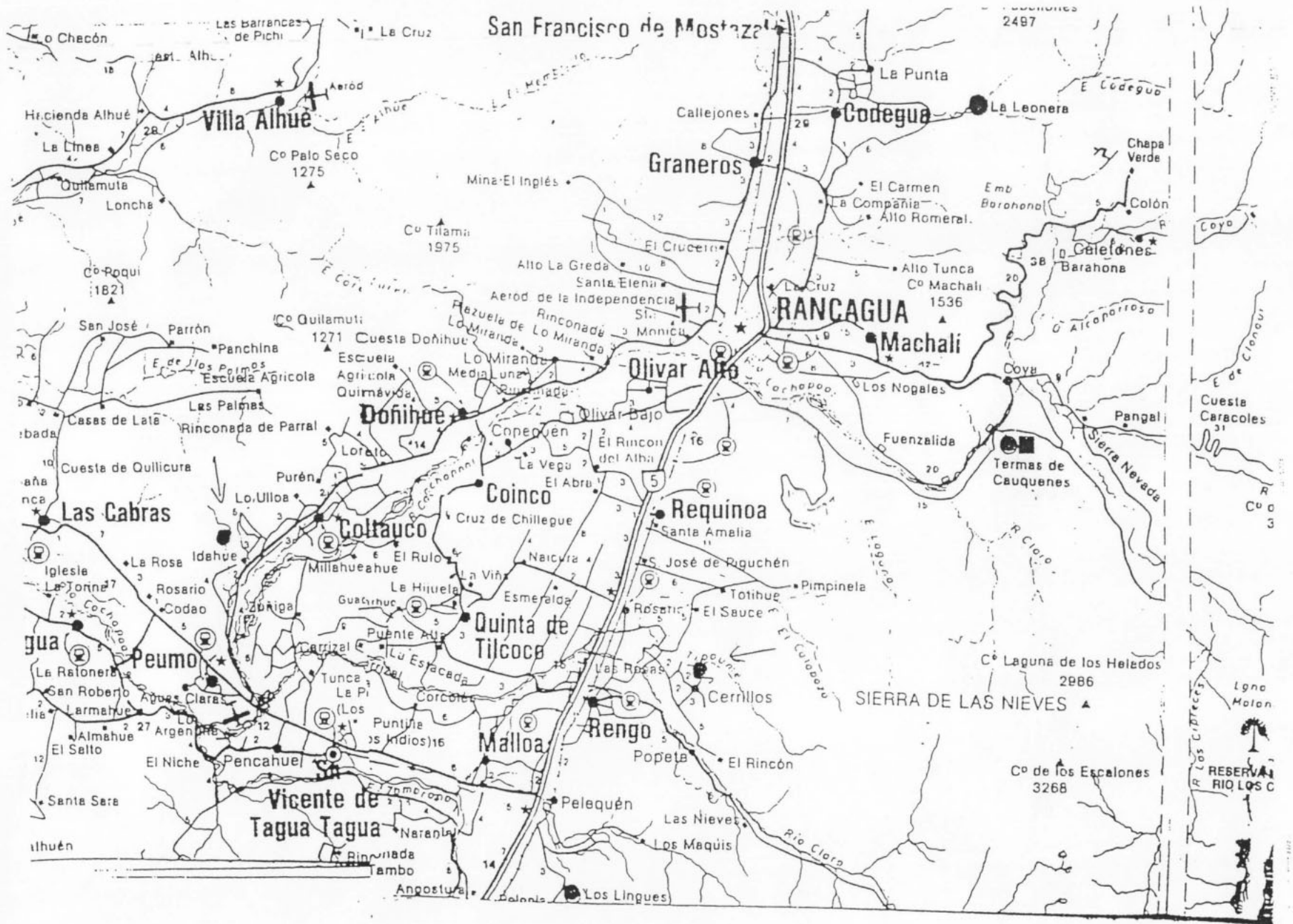


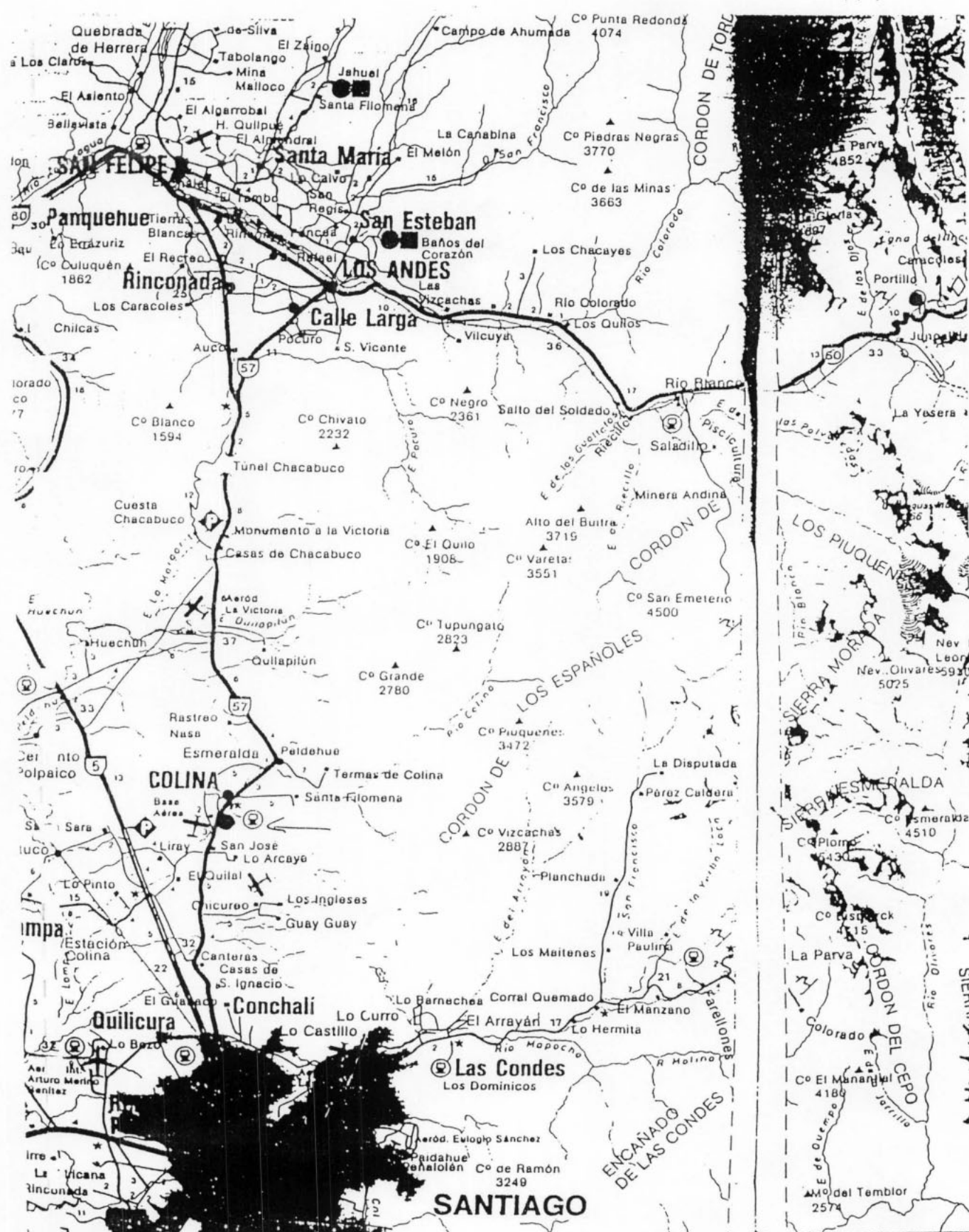












DETECCIÓN DE UN ORGANISMO TIPO VIROIDE EN OLIVOS (*Olea europaea* L.) CON SÍNTOMAS DE MALFORMACIÓN DE HOJAS¹

Detection of viroid like-organism on olive plants (*Olea europaea* L.)
with sickle leaf symptoms

Guido Herrera M.² y Mónica Madariaga V.²

ABSTRACT

A series of tests were conducted on samples from North and Central regions of Chile in order to identify the pathological agent causing sickle leaf symptoms. The plants were tested using double strand RNA, ELISA, mechanical transmission to herbaceous hosts and electron microscopy to identify virus organisms, double run gel electrophoresis to identify viroids and PCR to detect phytoplasm like organisms. Virus or phytoplasms could not be identified, and double run electrophoresis results suggested the presence of viroids in samples showing sickle leaf symptoms.

Key words: *Olea europaea*, virus, phytoplasm.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.) en Chile se concentra entre la I y III regiones, con más del 75% del total de hectáreas plantadas en el país. En el valle de Azapa, con más de 1.200 hectáreas plantadas, la mayor parte del material genético corresponde al cv. "Azapa", que probablemente proviene de la variedad Sevillana, el cual se ha propagado vegetativamente constituyendo una población relativamente homogénea. En los últimos años se han introducido nuevas variedades (Sotomayor, 1994), con el objeto de desarrollar el cultivo en la zona bajo la perspectiva de la exportación de aceitunas.

En la zona norte, la falta de antecedentes respecto de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, hace necesario investigar la incidencia de estos factores en el desarrollo de las plantas y sus efectos en la variabilidad de la producción. Los antecedentes mundiales (Barba, 1993) indican que las plantas de olivo se ven afectadas por una serie de alteraciones, tales como detención de crecimiento, malformación de hojas, amarillez y hojas encorvadas (sickle leaf), algunas de las cuales han sido atribuidas a problemas de origen viral.

Específicamente, el síntoma de hoja encorvada en olivo ha sido descrito en Italia y Portugal (Thomas, 1958); las hojas con esta malformación presentan además reducción de tamaño y amarillez. Se observa también una reducción en el crecimiento de las ramas y reducción en la fruta producida. En Chile, la hoja encorvada se encuentra en olivares de la zona norte y central. El agente causal de esta malformación es desconocido, aunque se ha logrado transmitir experimentalmente de plantas enfermas a otras sanas mediante injertación (Waterworth y Monroe, 1975).

¹Recepción de originales: 10 de diciembre de 1998.
Trabajo financiado en parte, por el proyecto FIA N° C96-1-A013.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
E-mail: gherrera@platina.inia.cl

En diferentes regiones del mundo se han detectado varios virus afectando los cultivos de olivos, pero ninguno de ellos ha sido asociado a síntomas en particular. Entre los virus detectados están: Arabis mosaic virus (ArMV) (Savino *et al.*, 1979); Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (Marte *et al.*, 1986); Cherry leaf roll virus (CLRV) (Savino y Gallitelli, 1981); Cucumber mosaic virus (CMV) (Savino y Gallitelli, 1983); Olive latent virus 1 (OLV1) (Gallitelli y Savino, 1985) y Olive latent virus 2 (OLV2) (Grieco *et al.*, 1992). Recientemente, Faggioei y Barba (1995) describieron otro virus de naturaleza filamentososa denominado Olive vein yellow virus (OVYV).

Los viroides son microorganismos que sólo han sido encontrados en las plantas, y que, a diferencia de los virus, no tienen un capsómero de proteínas. Los viroides consisten en una hebra de ácido ribonucleico circular, que se puede replicar y transmitir en forma independiente de una planta a otra (Hannold, 1993). Algunos de ellos son importantes patógenos de cultivos, tales como el "Potato spindle tuber viroid (PSTVd)" en papa y "Avocado sunblotch viroid (ASBVd)" en paltos. La identificación específica de ellos requiere de una detallada comparación de la secuencia de bases entre el viroide a identificar y los ya conocidos (Hannold, 1993).

Aún no se conocen los efectos que los virus y viroides tienen en los aspectos agronómicos del cultivo del olivo (propagación, producción y susceptibilidad a otros factores bióticos y abióticos), pero el uso de material libre de estos microorganismos parece una forma adecuada de prevenir el efecto de estos patógenos en las plantas propagadas. En Chile, normalmente el olivo se propaga mediante el sistema de estacas, permitiendo que patógenos tipo virus, viroides y fitoplasmas se perpetúen en el cultivo.

Considerando la presencia de plantas de olivo con detención de crecimiento, malformación de hojas y hojas encorvadas en las zonas norte y central de Chile, la presente investigación tuvo

por objetivo determinar la posible naturaleza patológica de estos problemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material. Se colectaron muestras de plantas de olivos (*Olea europaea* L.) que mostraban disminución de crecimiento y malformación de hojas u hojas encorvadas (sickle leaf) (Figura 1) y muestras de plantas sanas provenientes de Arica, Copiapó y Santiago.

Estas muestras se sometieron a una serie de pruebas a fin de establecer el origen patológico del problema. Con el objeto de detectar la presencia de virus se sometieron a la prueba del ácido ribonucleico de doble hebra viral (ARNdh), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), microscopía electrónica y hospederos diferenciales. Su origen viroidal se investigó mediante la prueba de electroforesis de doble corrida y su origen fitoplasmal mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores universales.

Prueba de ARNdh. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó macerando 3 a 4 g de tejido

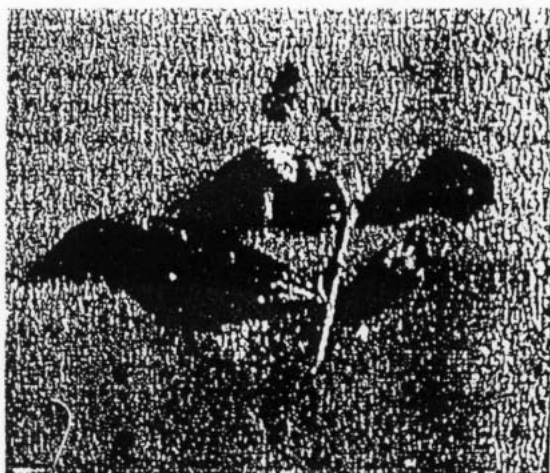


Figura 1. Síntomas de encorvamiento de la hoja (sickle leaf) en plantas de olivo.

Figure 1. Symptoms of sickle leaf in olive plants.

en 8 mL de STE 1X (0,1M NaCl; 0,05 M tris 0,001 M EDTA; 0,01% DIECA). El extracto se colectó en un tubo de polietileno de alta densidad (50 mL) y se agregó 1 mL de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) de una solución al 10%, 0,5 mL de bentonita de una suspensión acuosa al 2 %, y 9 mL de fenol saturado con STE 1X. El homogeneizado se mezcló vigorosamente por 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron a 8.000 g durante 15 min a 4°C. Por cada 10 mL de sobrenadante rescatado se le agregó 2,1 mL de etanol 95%.

Para aislar los ácidos nucleicos se procedió de la siguiente manera: se prepararon dos porciones de 1 g cada una de celulosa (CF-11) por muestra, se agregó 25 mL de STE 1X (100 mM TrisCl, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) conteniendo 16% de etanol y con esta suspensión se formaron dos columnas preparadas en jeringas de 20 mL taponadas con lana de vidrio. La suspensión de celulosa se mezcló bien, colocándose en las columnas y se dejó escurrir el exceso de STE/etanol. Posteriormente, se agregó la muestra a la primera columna permitiendo que escurriera completamente. Enseguida, se lavó lentamente la columna con 40 mL de STE 1X, conteniendo un 16% de etanol, descartándose dicha porción. Luego, se agregaron 10 mL de STE 1X, pero esta vez se colectaron en un tubo de 50 mL. A la muestra recuperada se le agregó 2,1 mL de etanol 95%. Los mismos pasos se siguieron para la segunda columna, agregando como muestra la solución obtenida en la primera columna, agregando finalmente 6 mL de STE 1X, los que se colectan en un tubo de 50 mL.

Para precipitar los ácidos nucleicos, a la muestra recolectada se le adicionó 0,5 mL de acetato de sodio 3 M (pH 5,5) y 20 mL de etanol 95%. Se almacenaron por 2 h como mínimo a -20°C, de esta manera, se precipitaron los ácidos nucleicos de doble hebra. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8.000 g por 25 minutos, descartando completamente el sobrenadante y dejando los tubos invertidos para secar el pellet.

Para evaluar las muestras, se resuspendieron en 100 µL de tampón muestra TAE (24,2 g tris; 5,71 mL de EDTA 0,5 M en 100 mL de agua). En algunos casos, las muestras así preparadas se almacenaron indefinidamente a -20° C. Los ARN de doble hebra se analizaron en geles verticales (160 mm de largo por 140 mm de ancho y 1,5 mm de espesor) al 6% de poliacrilamida preparado en buffer TAE. Las muestras normalmente se sometieron a electroforesis 3 a 4 h, a 50-60 mA, en tampón TAE 1X (0,04 M tris; 0,02 M NaCl; 0,001M EDTA). Los geles se tiñeron con nitrato de plata.

Prueba ELISA. Para los efectos del procedimiento de la prueba serológica ELISA, en placas de poliestireno se colocaron 100 µL de antígeno y se incubó a 4° C durante 16 h. Para la preparación del antígeno, se procedió de la siguiente forma: 1-2 g de hojas se trituraron dentro de una bolsa plástica en solución de extracción (1:10 peso:volumen (p:v)) en tampón carbonato (0,014 M Na₂CO₃; 0,0035 M NaHCO₃, pH 9,6), el extracto se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 min, colectándose el sobrenadante para cubrir los pocillos de las placas con 100 µL, incubando durante 16 h a 6°C. Enseguida, estas placas se lavaron 3 veces cada 5 min con solución de lavado PBS-T (8 g NaCl; 0,2 g KH₂PO₄; 2,9 g Na₂HPO₄; 0,2 g KCl y 0,02 mL Tween-20 para 1 L de agua).

Una vez terminado este período, a las placas se les agregó BSA (Bovine Serum Albumin) al 3% en PBS por 2 h a 36° C. Después de un lavado similar al anterior, se adicionó inmunoglobulinas (1:1000 volumen/volumen (v/v)) (obtenidas en Sanofi, Francia) específicas para la detección de los virus indicados en el Cuadro 2, incubándose 2 h a 36° C. Posteriormente, se agregó un segundo antisuero producido en cabra, incubándose a 36°C durante 2 h. Finalmente, las placas se lavaron y se agregó sustrato (p-nitrofenil-fosfato, Sigma 104) adicionándose a razón de 1 mg/mL de dietanolamina, pH 9,8. La evaluación de las reacciones ELISA se realizaron en un lector de placas ELISA (Biotek, modelo 312e)

a 405 nm, midiendo la absorbancia cada 15, 30 y 60 min. Se consideró como muestra positiva, sólo aquella que presentaba una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos.

Microscopía electrónica. Se colocó una grilla de malla 300, sobre una gota de extracto de planta infectada durante 3 min. Una vez seca, la grilla se colocó sobre una gota de contrastante (molibdato de amonio al 2% ó con KPT (fosfortungstato de potasio) al 2%), durante 3 a 5 min. Posteriormente, se observó bajo el microscopio electrónico marca Zeiss, modelo EM 300.

Transmisión mecánica a hospederos herbáceos. Muestras de hojas de olivo con síntomas de hojas encorvadas se trituraron en tampón fosfato 0,01 M más 0,001% de dietilditiocarbamato (DIECA). El extracto se frotó con algodón sobre hojas de plantas indicadoras (Cuadro 3). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (temperatura entre 18° C y 22° C) durante un período de 30 días, al cabo de los cuales, se evaluó la presencia de síntomas.

Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aislación de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo a la metodología de Kirkpatrick *et al.* (1987). Para ello, 0,5 g de tejido se incubaron durante 10 min en 6 mL de tampón de molienda (125 mM fosfato de potasio; 30 mM ácido ascórbico; 10% de sacarosa; 0,15% BSA; 2% polivinilpirrolidone (PVP); pH 7,6). Después de la incubación el tejido se molió agregando otros 8 mL de tampón. El homogeneizado se centrifugó a 4° C durante 4 min a 3.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 4° C durante 25 min a 8.000 rpm. El pellet se resuspendió en 1,5 mL de tampón de extracción CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM tris-HCl; pH 8,0) a 60° C durante 30 min. Posteriormente se agregó igual volumen de la mezcla cloroformo/alcohol (24:1 v/v). Después de la centrifugación, la fase acuosa se precipitó con 2/3 de volumen de isopropanol a -20° C y se centrifugó a

11.000 rpm; el pellet se lavó con etanol al 70%, secando al vacío y disolviendo el pellet en 100 µL de agua estéril. Finalmente, la preparación de digirió con 50 µg/mL de Rnasa A durante 30 min a 37° C.

Para la realización de las pruebas de PCR se seleccionó un par de oligonucleótidos universales para la detección de fitoplasma (Lee *et al.*, 1993) R16F2 5'-ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' y R16R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'. Para la amplificación de ADN se agregaron 5 µL de ADN extraído a una mezcla de 35 µL de 0,5 µM de cada partidor, 100 µM de la 4 bases (dNTPs) y 1 unidad de Taq polimerasa. Se cubrió con aceite mineral y se sometió a un termociclador (Thermolyne, modelo AMPLITRON II) sujeto a 35 ciclos: 1 min de desnaturalización a 94° C, 2 min a 50° C, 3 min a 72° C de extensión y un periodo de elongación final de 72° C durante 10 min.

Para el análisis de los productos de amplificación se colocaron alícuotas de 10 µL de reacción de PCR en un gel de electroforesis de 6% acrilamida en tampón TBE (89 mM tris; 80 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA; pH 8,3). Los geles fueron corridos a 70 volts durante aproximadamente 2 horas. Posteriormente los geles se tiñeron con plata.

Prueba electroforética de doble corrida. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó triturando en un mortero de porcelana 0,5 g de hojas en presencia de tampón de extracción (tris HCl 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2%). El extracto se mezcló con 0,5 mL de cloroformo saturado con fenol y mercaptoetanol 0,01 mL. Luego, en tubos eppendorf se centrifugaron durante 15 min a 8.000 rpm. En seguida, se colectó el sobrenadante, se adicionaron 0,5 mL de cloroformo y se centrifugó durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo conteniendo 0,1 vol de 3 M de acetato de sodio, pH 5,2. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó agregando 2 vol de etanol, seguido por incubación a -20° C durante 1 h.

Después de centrifugar durante 15 min a 8.000 rpm, el pellet se secó al vacío y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril. Las muestras se corrieron en un gel conteniendo 5% poliacrilamida (0,12% bisacrilamida; 0,12% de TEMED) en un tampón electroforético (44,5 mM tris; 44,5 mM ácido bórico; 1,25 mM de EDTA y 4 M de urea) y 0,07% de persulfato de amonio. Los bolsillos del gel se llenaron con una mezcla de 10 µL de muestra, 10 µL de tampón electroforético doblemente concentrado y trazas de xileno-cianol. La primera corrida se realizó en condiciones nativas a 15-18°C en 44,5 mM de tampón electroforético usando 500 V y alrededor de 30 mA. La corrida se detuvo cuando los colorantes corrieron unos 5 cm, lo cual tomó 1 h. Posteriormente, el gel cubierto con papel plástico se sometió a un baño de 60°C durante 5 min, que corrido nuevamente con la polaridad invertida, se detuvo cuando los colorantes llegaron al borde de los bolsillos de gel, lo cual tomó aproximadamente 1 h. El gel se fijó durante 15 min en 10% de etanol y 1% de ácido acético. Luego, se sumergió 1 h en 10 mM de AgNO₃, seguido de dos lavados de agua durante 1 min. Finalmente, el gel se reveló en una mezcla de 375 mM de NaOH y 2,3 mM de formaldehído.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados con las diferentes pruebas a las cuales fueron sometidas las muestras, las que indicaron que en la prueba de ARN de doble hebra y microscopio electrónico no se encontraron organismos tipo virus; esto sugiere que los virus no estarían involucrados como causa de los síntomas observados en las plantas. Asimismo, los resultados con la prueba de PCR utilizando partidores universales para la detección de fitoplasma también fueron negativos, descartándose la presencia de estos organismos como agentes causales. Sin embargo, en forma consistente, las pruebas de electroforesis de doble corrida para la detección de viroides fueron positivas (Figura 2) en muestras de olivos provenientes de Arica, Copiapó y Santiago con síntomas de hojas encorvadas. Estas reacciones fueron negativas con seis muestras colectadas en la zona central con ausencia de sintomatología. Este resultado, y la ausencia de otros organismos tipo virus y fitoplasma, sugieren que el posible agente causal de los síntomas que presentan las plantas podría ser un viroide.

Cuadro 1. Reacción de muestras de olivo con (Arica y Copiapó) y sin (Santiago) síntomas de encorvamiento de hoja a las pruebas de ARN de doble hebra, electroforesis de doble corrida, reacción en cadena de la polimerasa y microscopía electrónica

Table 1. Reaction of olive samples with (Arica and Copiapó) and without (Santiago) sickle leaf symptoms to double strand RNA, double run electrophoresis, polymerase chain reaction and electron microscopy tests

Prueba virológica	Patógeno a detectar	Origen de las muestras ¹											
		Arica				Copiapó				Santiago			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
RNA de doble hebra	virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electroforesis doble corrida	viroide	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	fitoplasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopía electrónica	virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Cuatro muestras distintas por localidad.

+: reacción positiva.

-: reacción negativa.

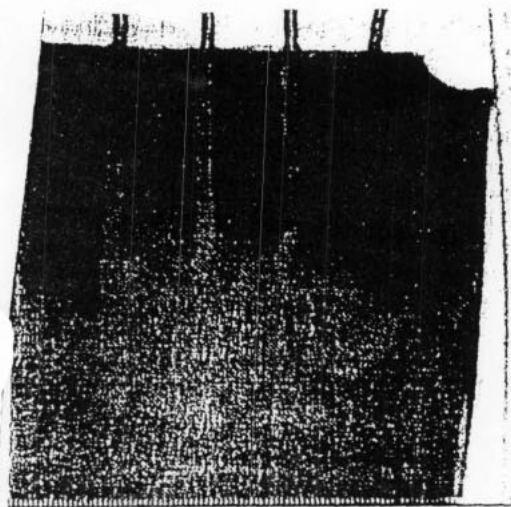


Figura 2. Diferenciación de viroides basados en electroforesis de doble corrida. Bandas 1, 2, 3 y 4 muestras de olivos con síntomas de encorvamiento de hojas; banda 5 control sano.

Figure 2. Viroid detection by double run electrophoresis. Band 1, 2, 3 and 4 olive samples with sickle leaf symptoms; band 5 healthy control.

La ausencia de virus detectada en las plantas infectadas, fue corroborada con la prueba ELISA (Cuadro 2) a lo menos para 8 diferentes virus. Todas las pruebas fueron negativas para los virus CMV, ArMV, CLRV, SLRSV, RRSV, Potyvirus en general y los nepovirus TomRSV

y GFLV. Asimismo, todas las transmisiones mecánicas a hospederos diferenciales no mostraron transmisión de agentes tipo virosos (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

La disminución parcial de crecimiento en plantas de olivo, malformación de hojas y diferentes grados de amarillez, se reconocen como de posible etiología viral (Barba, 1993). Barba (1993) menciona a SLRV, CLRV, CMV, Olive latent virus 1 y 2 como presentes en olivos, pero a ninguno de ellos se les ha asociado a síntomas determinados. Particularmente, el síntoma de hoja encorvada o "sickle leaf" fue descrito en California en 1958 (Thomas, 1958), y estudiado posteriormente por Waterworth y Monroe (1975). Estos últimos determinaron que el síntoma es transmisible por injertación a plantas sanas. Esto descarta que esta malformación se deba a factores nutricionales, fisiológicos u otro orden. No obstante, dichos autores encontraron que el agente transmisible no es transmitido mecánicamente a hospederos herbáceos, y mediante microscopía electrónica no encontraron virus o fitoplasmas involucrados en las plantas afectadas. Los mismos autores no investigaron el factor viroide como posible causante de los síntomas observados en las plantas.

Cuadro 2. Reacción de muestras de olivos afectadas con encorvamiento de hojas en prueba ELISA para 8 diferentes virus

Table 2. Reaction of olive samples affected with sickle leaf symptoms by ELISA against 8 virus antiserum

Nº Muestra	Antisueros ¹							
	CMV	ArMV	CLRV	SLRSV	RRSV	POTYVIRUS	TomRSV	GFLV
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-

¹CMV: Cucumber mosaic virus; ArMV: Arabis mosaic virus; CLRV: Cherry leaf roll virus; SLRSV: Strawberry latent ringspot virus; RRSV: Raspberry ringspot virus; TomRSV: Tomato ringspot virus; GFLV: Grape fan leaf virus.

Cuadro 3. Reacción de hospederos diferenciales a la infectación con muestras de olivos afectados con encorvamiento de hoja¹

Table 3. Reaction of herbaceous hosts to the infection with olive samples affected with sickle leaf symptoms

Muestra Nº	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nicotiana cleveelandi</i>	<i>Nicotiana melagosiophum</i>	<i>Chenopodium quiona</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Gomphrena globosa</i>
1	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
2	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
3	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5
4	0/10	0/13	0/17	0/40	0/25	0/5

¹Plantas con síntomas/Total plantas inoculadas.

La presente investigación corrobora los resultados de Waterworth y Monroe (1975), en el sentido de no encontrar elementos de juicio para asociar los síntomas a virus o fitoplasmas. Mediante la prueba ELISA se cubrió un amplio rango de virus pertenecientes a los grupo nepovirus, cucumbervirus y potyvirus. Con el fin de ampliar más el rango de detección de posibles virus involucrados en los síntomas descritos se utilizó la prueba de ARN de doble hebra que cubre la detección de la mayor parte de los virus con ARN como ácido nucleico. Todas las pruebas resultaron negativas. Por otro lado, las transmisiones a hospederos herbáceos que incluyeron los típicos hospederos de virus pertenecientes al grupo de nepovirus y que alcanzaron a 6 especies y más de 440 inoculaciones, en ninguna planta se obtuvieron resultados positi-

vos. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo y de acuerdo a las electroforesis de doble corrida, sugieren que el posible agente asociado a los síntomas de encorvamiento de hojas en olivo podría ser un viroide.

CONCLUSIONES

La ausencia de organismos tipo virus, de acuerdo a prueba de ARN de doble hebra, ELISA y microscopía electrónica, ausencia de organismos tipo fitoplasma, considerando la reacción negativa a PCR con partidores universales y los resultados positivos a las pruebas de electroforesis de doble hebra, sugieren una asociación de los síntomas de encorvamiento foliar o "sickle leaf" en olivo a un organismo tipo viroide.

RESUMEN

Muestras de plantas de olivo (*Olea europaea* L.) provenientes de la zona norte y central de Chile se sometieron a una serie de pruebas a fin de establecer la naturaleza del posible agente causal de la malformación de hojas u hojas encorvadas ("sickle leaf"). Las plantas se sometieron a la prueba de ARN de doble hebra, ELISA, transmisión a plantas hospederas herbáceas y microscopía electrónica para determinar la presencia de virus, electroforesis de doble corri-

da para la detección de viroides y PCR para identificar posibles fitoplasmas. Todas las pruebas demostraron la ausencia de organismos tipo virus y fitoplasmas. Sólo se lograron resultados positivos con la prueba de electroforesis de doble corrida sugiriendo la presencia de viroides en las plantas con síntomas de hojas encorvadas.

Palabras claves: *Olea europaea*, virus, fitoplasma.

LITERATURA CITADA

- BARBA, M. 1993. Viruses and virus-like diseases of olive. Bulletin EPPO 23: 493-497.
- FAGGIOLI, F. AND BARBA, M. 1995. An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea* L.). Acta Horticulturae 386: 593-597.
- GALLITELLI, D. AND SAVINO, V. 1985. Olive latent virus 1. A single RNA spherical virus isolated from olive in Apulia. Annals of Applied Biology 106: 295-303.
- GRIECO, F.; MARTELLI, G.; SAVINO, V. AND PIAZZOLLA, P. 1992. Properties of olive latent 2. Rivista di Patologia vegetale 2: 125-136.
- HANNOLD, D. 1993. Diagnostic methods applicable to viroids. In: Plant virus diseases. Mathews R.E.F. (Ed.) CRC Press. London, UK. p. 295-314.
- KIRKPATRICK, B.; STENGER, D.; MORRIS, T. AND PURCELL, A. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. Science 238: 197-200.
- LEE, I.; HAMMOND, R.; DAVIS, R. AND GUNDERSEN, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organism. Phytopathology 83: 834-842.
- MARTE, M.; GADANI, F.; SAVINO, V. AND RUGINI, E. 1986. Strawberry latent ringspot virus associated with a new diseases of olive in central Italy. Plant Diseases 70: 171-172.
- SAVINO, V.; BARBA, M.; GALLITELLI, D. AND MARTELLI, G. 1979. Two nepovirus isolated from olive in Italy. Phytopathology Mediterranea 18: 135-142.
- SAVINO, V. AND GALLITELLI, D. 1981. Cherry leaf roll virus in olive. Phytopathology Mediterranea 20: 202-203.
- SAVINO, V. AND GALLITELLI, D. 1983. Isolation of cucumber mosaic virus from Olive in Italy. Phytopathology Mediterranea 22: 76-77.
- SOTOMAYOR, E. 1994. Establecimiento de un banco de olivo en el valle de azapa. Simiente 64: 40.
- THOMAS, H. 1958. Sick leaf of olive. Plant Diseases Reporter 42: 1154.
- WATERWORTH, H. AND MONROE, R. 1975. Graft transmission of sick leaf disorder. Plant Diseases Reporter 59: 366-367.



FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA
MINISTERIO DE AGRICULTURA

Santiago, 03 Ago. 1998
UP- 783

Señor
Ernesto Prado
Coordinador Proyecto FIA
CRI La Platina INIA
Santiago

Ref.: Solicitud incorporación U. Tarapacá y realización
análisis de virus - Proyecto C-96-I-A-013

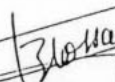
De mi consideración:

Junto con saludarle, comunico a Ud. que esta Dirección ha aceptado su solicitud planteada en la carta con fecha 23 de junio del presente respecto a incorporar a la Universidad de Tarapacá para la realización de los muestreos en la zona de Arica, y los análisis para la detección de virosis del proyecto "Manejo integrado de plagas en olivos".

Ambas actividades deben financiarse con reitemizaciones del monto aprobado del proyecto y presentarse los ítems de gastos con el detalle del costo en cada caso.

El ejecutor debe incorporar estos nuevos gastos en la reformulación de los costos y flujo de gastos solicitados anteriormente con el objetivo de readecuar financieramente el proyecto.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,


Francine Brassard
Directora Ejecutiva (S)
Fundación para la Innovación Agraria





Sra. Carolina Palacios
Sra. M.J. Etchegaray
Sr. René Martorell
Archivo AP



Santiago, 16 de septiembre de 1998

Sr
HÉCTOR VARGAS
Instituto de Agronomía
Universidad de Tarapacá
Casilla 6-D
ARICA

Estimado Héctor :

Como conversamos en mi reciente visita a Arica tengo un Proyecto FIA que debe producir un Manual de Control Integrado de Plagas en Olivo. Dicho proyecto contempla un muestreo de plagas en olivos en la I Región para conocer su fenología e importancia. Como lo conversamos dicho muestreo podría realizarse por ustedes.

Las actividades serían las siguientes:

Muestreo de las plagas del olivo en a lo menos 2 lugares de muestreo. Como los insectos pueden estar en diferentes predios, los lugares de muestreo pueden adaptarse a su presencia.

Para las plagas debe estimarse el porcentaje de parasitismo y recuperar los parásitos. La identificación la pueden realizar ustedes o enviar las muestras a La Platina, y eventualmente estas pueden enviarse al extranjero.

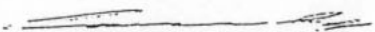
En la edición de manual estarán por supuesto como co-autores los participantes del Instituto.

Cualquier otra información importante de verter en el Manual (control, etc.) también es bienvenida.

Las actividades deben iniciarse ahora y hasta abril de 1999. Para tal efecto les puedo cancelar una suma de \$3.500.000 a pagar en dos cuotas (de \$1.750.000 cada una) contra envío de factura. La primera cuota de inmediato y la segunda en febrero de 1999.

Por favor, factura a nombre de : Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santa Rosa 11610, La Pintana, RUT 61.312.000-9. Por concepto de Estudio de Plagas en Olivo en la I Región, Proyecto FIA Olivos. Envíala a mi nombre para yo tramitarla.

Atentamente,


ERNESTO PRADO C.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN LA PLATINA
SANTA ROSA 11610, PARAD. 33, LA PINTANA - TEL.: 5417223 - FAX: 5417667 - CASILLA 439/3 - SANTIAGO DE CHILE

**UNIVERSIDAD DE TARAPACA – FACULTAD DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE RECURSOS AMBIENTALES**

PRA-FAGRON N° 037/00.

Arica, julio 14 de 2000

Dr.

ERNESTO PRADO C.

Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA

Fax: (2) 5417667

Santa Rosa 11610

La Platina

SANTIAGO

Estimado Dr. Prado:

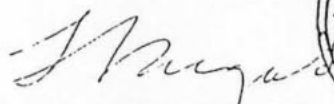
Respecto a su comunicación de fecha 13 de Julio del presente año, puedo informar a Ud. que, efectivamente, las tareas entomológicas encargadas a través de su Proyecto FIA se efectuaron bajo la modalidad de Prestación de Servicios; el acto administrativo interno y su respectivo proyecto fueron oficializados mediante Resolución Exenta VRA. N° 00.292/98, el 10 de diciembre de 1998.

El estudio entomológico consideró las siguientes actividades:

1. Muestreo de plagas del olivo en tres localidades del valle de Azapa:
 - 1.1. Sector Bajo: Km. 1.5, Campo Verde. Predio Sr. Fernando Osorio B.
 - 1.2. Sector Medio: Km. 13, Las Riveras, Predio Sr. Domingo Baluarte V.
 - 1.3. Sector Medio-Alto: Km. 23, Cerro Blanco, Predio Sr. Víctor Caqueo.
2. Observaciones de laboratorio y estimación del parasitismo.
3. Recuperación de parásitos e identificación.
4. Envío de muestras e informes de avance.
5. Escribir e ilustrar lo referente a plagas del olivo en la I Región, como co-autores del Manual de Manejo Integrado del Olivo.

Las tareas sucintamente descritas fueron cumplidas mediante la modalidad de Prestación de Servicios y Asistencia Técnica, para lo cual la Universidad recibió la suma de \$3.500.000.- (tres millones quinientos mil pesos). Se prefirió este *modus operandi* para evitar el largo proceso que involucra para la Universidad la tramitación, aprobación y firma de un Convenio inter-institucional.

Saluda atentamente a Ud.,


HECTOR VARGAS CARREÑO



UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ
FACULTAD DE AGRONOMÍA

HVC/ycj.

c.c.: Sr. Decano FAGRON.
Programa Recursos Ambientales.
Proyecto Estudio Plagas Olivo.
Archivo.
Adj.: Copia Res. Ex. VRA N° 00.292.98.
Croquis sectores muestreo.

PROYECTO DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS

Uso Interno
 COD.INT.:
 C.COSTO : 9607

A. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO.

A.1. NOMBRE DEL PROYECTO : Estudio de plagas del olivo en la I Región.Proyecto FIA Olivos.

...2. TIPO DE PROYECTO (Seleccione con una X un tipo de actividad)

☐

DOCENTE

☒INVESTIGACION Y
DESARROLLO☐

SOCIAL

☐

CULTURAL

3. USUARIO DEL PROYECTO

NOMBRE : Instituto de Investigaciones Agropecuarias

RUT : _____

DIRECCION : _____

FONO : _____ FAX : _____

4. UNIDAD EJECUTORA : Instituto de Agronomía5. RESPONSABLE UNIDAD EJECUTORA : Eugenio Doussoulín Escobar6. JEFE DEL PROYECTO : Héctor Vargas Carreño7. PLAZO DEL PROYECTO : 1200 HORASFECHA INICIO : 01 / 11 / 98FECHA TÉRMINO : 30 / 04 / 99

B. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

- Determinar las plagas más importantes del olivo y sus enemigos naturales en distintos sectores del valle de Azapa.

C. RESUMEN DEL PROYECTO.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) está ejecutando un proyecto financiado por el Fondo de Innovación Agraria (FIA), que dice relación con el estudio y detección de las plagas más importantes y sus enemigos naturales en el país.

El Instituto de Agronomía a través de su grupo de entomólogos ha comprometido la participación en dicho proyecto, abordando la temática fitosanitaria del olivo en el valle de Azapa.



OFICIALIZA PROYECTO DE PRESTACION DE SERVICIOS
Y ASISTENCIA TECNICA: "ESTUDIO DE PLAGAS DEL
OLIVO EN LA I REGION PROYECTO FIA OLIVOS."

RESOLUCION EXENTA VRA.Nº0.0.292/98.-

Arica, 10 de diciembre de 1998.-

Con esta fecha la Vicerrectoría Académica de la Universidad de Tarapacá,
ha expedido la siguiente Resolución:

VISTOS:

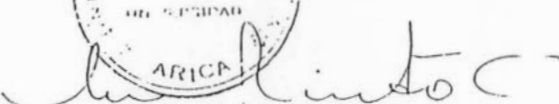
Lo dispuesto en el D.F.L. N°150, de 11 de diciembre de 1981, del
Ministerio de Educación Pública; Decreto Exento N°00.220/95, de 10 de marzo de 1995;
Decreto Exento N°00.634/95 de 18 de mayo de 1995; los antecedentes adjuntos;
Decreto Exento N°00.669/98 de 20 de julio de 1998; Decreto Exento N°00.670/98 de
20 de julio de 1998 y las facultades que me confiere el Decreto Exento N°00.1173/97
de 13 de noviembre de 1997.

RESUELVO:

Oficialízase proyecto de prestación de servicios y asistencia
técnica: "ESTUDIO DE PLAGAS DEL OLIVO EN LA I REGION PROYECTO FIA
OLIVOS", que consta de cinco hojas rubricadas por la Secretaria de la Universidad.

Unidad Ejecutora : INSTITUTO DE AGRONOMIA
Fecha de Ejecución: 01/11/98 AL 30/04/99
Jefe del Proyecto : SR. HECTOR VARGAS CARREÑO
Plazo del Proyecto : 1200 HRS.

Regístrese, comuníquese y archívese.
Por orden del Rector.



MANUELA PINTO CASTILLO
Secretaria de la Universidad
CDM/MPC/iar.-



CLAUDIO DIAZ MELENDEZ
Vicerrector Académico

