

**FACULTAD DE  
CIENCIAS AGRONÓMICAS  
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO**

**TALLER DE TÍTULO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Evaluación de la presencia del virus *Cherry Leafroll* en huertos de nogal inglés (*Juglans regia*) en las principales zonas de producción de nuez en Chile.

JACQUELINE ANDREA MAULÉN TORO

QUILLOTA, CHILE

2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS Y DE LOS ALIMENTOS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

TALLER DE TÍTULO

Taller de Título presentado como parte de los requisitos para optar al título de  
Ingeniero Agrónomo

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS CHERRY LEAFROLL EN  
HUERTOS DE NOGAL INGLÉS (*JUGLANS REGIA*) EN LAS PRINCIPALES  
ZONAS DE PRODUCCIÓN DE NUEZ EN CHILE.**

JACQUELINE ANDREA MAULÉN TORO

APROBACIÓN

**Nombre**

**Firma**

Profesor Guía

Sr. RICARDO CAUTÍN M.  
Ingeniero Agrónomo, Dr.

\_\_\_\_\_

Quillota, septiembre 2018

## Índice de contenidos

1	Resumen .....	1
2	Definición del problema .....	1
3	Hipótesis:.....	1
4	Objetivo general:.....	2
5	Objetivos específicos:.....	2
6	Estado del arte .....	3
6.1	Antecedentes.....	3
6.2	Dispersión.....	4
6.3	Síntomas .....	4
6.4	Diagnóstico.....	5
6.5	Importancia.....	6
7	Metodología.....	8
7.1	Lugar de trabajo .....	8
7.2	Tomas de muestras.....	9
7.2.1	Organización muestreo.....	9
7.2.2	Selección de árboles para toma de muestras .....	9
7.2.3	Procedimiento toma y almacenamiento de muestras.....	9
7.2.4	Tiempo destinado a muestreo .....	10
7.2.5	Envío de muestras.....	10
7.3	Diagnóstico visual.....	11
7.3.1	Organización de muestreo.....	11
7.3.2	Procedimiento diagnóstico visual.....	11
7.3.3	Tiempo destinado a diagnóstico visual. ....	11
7.4	Procedimiento de laboratorio .....	12
8	Literatura citada.....	14

9	Plan de Trabajo .....	17
9.1	Etapa 1: Organización de las visitas .....	17
9.2	Etapa 2: Obtención de muestras.....	17
9.2.1	Región Metropolitana.....	17
9.2.1.1	Muestreo de ramillas en huertos de la región Metropolitana .....	17
9.2.1.2	Envío de muestras de la región Metropolitana a laboratorio .....	18
9.2.2	Región de Valparaíso .....	18
9.2.2.1	Muestreo de ramillas en huertos de la región de Valparaíso .....	18
9.2.2.2	Envío de muestras de la región de Valparaíso a laboratorio .....	18
9.2.3	Región de O'Higgins.....	18
9.2.3.1	Muestreo de ramillas en huertos de la región de O'Higgins .....	18
9.2.3.2	Envío de muestras de la región de O'Higgins a laboratorio .....	18
9.2.4	Región del Maule.....	18
9.2.4.1	Muestreo de ramillas en huertos de la región del Maule .....	18
9.2.4.2	Envío de muestras a laboratorio. ....	18
9.3	Etapa 3: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados .....	19
9.4	Etapa 4: Elaboración de informe 1 .....	19
9.5	Etapa 5: Diagnóstico visual.....	19
9.5.1.1	Región Metropolitana.....	19
9.5.1.2	Región de Valparaíso. ....	19
9.5.1.3	Región de O'Higgins.....	19
9.5.1.4	Región del Maule.....	19
9.6	Etapa 5: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados .....	19
9.7	Etapa 6: Elaboración de informe final .....	20
10	Carta Gantt .....	24
11	Resultados esperados.....	25

12	Organización .....	25
12.1	Cargos y funciones .....	25
12.2	Organigrama.....	28
12.3	Descripción de cargos .....	28
13	Presupuesto .....	30
13.1	Presupuesto total por cuenta (MM\$).....	30
14	Anexos:.....	32

## **1 Resumen**

En Chile, gran parte de la superficie plantada con nogal (*Juglans regia*) se encuentra sobre patrón de semilla, el cual es susceptible a distintas cepas de *Phytophthora sp.* En respuesta a esto, han surgido nuevos portainjertos que presentan ciertas resistencias y/o tolerancias ante patógenos. Entre los nuevos portainjertos, Paradox y Vlach se han comercializado en nuestro país. El problema que presentan ambos portainjertos es su hipersensibilidad al virus del enrollamiento de hoja del cerezo (*Cherry Leafroll virus*), que provoca la enfermedad del *blackline* en nogales ingleses injertados sobre estos patrones.

Chile no cuenta con estudios que descarten la presencia del virus en territorio nacional, por ello, este estudio propone la realización de una prospección a huertos de nogal ubicados en las principales zonas de producción de nuez en Chile. Esta prospección considera diagnóstico visual y análisis de muestras de ramillas mediante el método RT-qPCR.

## **2 Definición del problema**

En los últimos años, se han incorporado nuevos patrones de nogal en Chile, conocidos como Paradox y Vlach. Estos portainjertos al ser injertados con nogal inglés infectado con el virus *Cherry Leafroll* (CLRV-W), provocan una reacción de hipersensibilidad del patrón ante el virus, desarrollándose la conocida enfermedad del *blackline*. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de una franja necrótica en la zona de unión de injerto que al cabo de unos años provoca la muerte de la parte superior del árbol. Pese a la gravedad de esta enfermedad, Chile actualmente no cuenta con estudios que descarten la presencia del virus.

## **3 Hipótesis:**

El virus *Cherry Leafroll* está presente en material de nogal inglés establecido en las principales zonas de producción de nuez en Chile.

**4 Objetivo general:**

Evaluar la presencia del virus *Cherry Leafroll* en huertos de nogal inglés en las principales zonas de producción de nuez en Chile.

**5 Objetivos específicos:**

Evaluar la presencia del virus *Cherry Leafroll* en nogales ingleses injertados sobre portainjerto franco en las principales zonas de producción de nuez en Chile a través del análisis de ramillas por el método de RT-qPCR.

Evaluar la presencia del virus *Cherry Leafroll* en nogales ingleses sobre portainjerto Paradox o Vlach que no presenten síntomas de la enfermedad del *blackline*, en las principales zonas de producción de nuez en Chile, a través del análisis de ramillas por el método de RT-qPCR.

Realizar diagnóstico visual en la zona de unión variedad-portainjerto en nogales ingleses injertados sobre portainjerto Paradox o Vlach que presenten síntomas asociados a la enfermedad del *blackline*.

## 6 Estado del arte

### 6.1 Antecedentes

En Chile, casi la totalidad de la superficie plantada con nogal se encuentra sobre patrón de semilla *Juglans regia* (Vial *et al.*, 2016), el cual se ve muy afectado por distintas especies de *Phytophthora*. Para enfrentar esta problemática han surgido portainjertos como Paradox, el cual es un híbrido resultante de la fertilización de flores de nogal negro (*J. hindsii*) con polen de nogal inglés (*J. regia*). A su vez, han surgido patrones clonales de Paradox nombrados como Vlach, RX1 y VX211, los que además de presentar distintos niveles de tolerancia y/o resistencia a *Phytophthora* y otros patógenos, permiten obtener plantas más homogéneas (Vial *et al.*, 2016). En los últimos años, se han incorporado dos de estos patrones, Paradox y Vlach a la producción nacional. Desde el año 2011 las plantas de nogal comercializadas sobre Paradox han aumentado, llegando a un total de 22.601 plantas el año 2016. Por su parte el patrón Vlach empezó apenas a comercializarse el año 2015 alcanzando a esa fecha la suma de 2.340 plantas (AGV, 2016).

El problema que presenta Paradox y sus híbridos, es su hipersensibilidad al virus del enrollamiento de la hoja del cerezo (CLRV) que provoca la enfermedad del *blackline* en nogales ingleses injertados sobre estos patrones. Esta enfermedad es causada por la cepa de este virus específica del nogal (CLRV-W), que infecta sistémicamente a *J. regia*, mientras que otras especies de *Juglans* como *J. hindsii* y el híbrido Paradox no son afectados. Lo anterior comprueba que la necrosis formada en la unión variedad-portainjerto que da el nombre a esta enfermedad, es el resultado de una reacción de hipersensibilidad de *J. hindsii* y Paradox frente al virus (Mircetich y Rowhani, 1983).

Según Reil *et al.* (1985), el primer reporte de la enfermedad fue en el condado de Contra Costa (California, Estados Unidos) en 1929. Se dice que posteriormente se habría dispersado hasta huertos de nogal que rodean la Bahía de San Francisco y hasta allí se habría limitado algunos años. Sin embargo, entre la década de 1950-1960, se reportó en los condados de San Joaquín, Stanislaus y Yolo. Según Mircetich *et al.* (1998), el virus se ha detectado en huertos de nogal desde el condado de Tehama hasta el condado de

Tulare, ocurriendo la incidencia más alta y el daño más grave en zonas costeras y valles inferiores de Sacramento y altos de San Joaquín.

## 6.2 Dispersión

En cuanto a su dispersión, la enfermedad es fácilmente transmisible por injerto, polen y semillas (Mircetich *et al.*, 1980; Mink, 1993). En estudios anteriores se ha demostrado que el virus del *blackline* se transmite fácilmente mediante injertos de nogales ingleses infectados a nogales ingleses sanos, sin embargo, no se transmite desde porciones del portainjerto (*J. hindsii* o Paradox) del árbol infectado a arboles sanos, comprobando que estos patrones son resistentes al virus (Mircetich *et al.*, 1980). Respecto a la propagación natural del virus mediante polen, Mircetich *et al.* (1980) observaron que existía una alta tasa de propagación natural de cultivares *Ashley* infectados a *Ashley* sanos y no existía propagación desde nogales *Ashley* infectados a *Hartley* sanos. Esto debido a que en *Ashley* el periodo de liberación de polen y su *peak* de floración difería en solo 3 días, mientras que el periodo de dispersión de polen de *Ashley* y el *peak* de floración de *Hartley* difería en 15 días, sugiriendo entonces que el polen está involucrado en la propagación del virus. En otro estudio Mircetich *et al.* (1998) polinizaron artificialmente flores sanas de nogal con polen infectado por CLRV-W y con polen libre del virus. Dentro de los resultados se obtuvo que aquellas semillas obtenidas de polen infectado y flores sanas contenían el virus, mientras que aquellas nueces resultantes del polen libre de virus y flores pistiladas sanas estaban libres. Los autores además argumentan que las plántulas de nogal inglés originadas de semillas infectadas, podrían no presentar síntomas visibles, por tanto, serían portadores asintomáticos del virus, pudiendo introducirlo silenciosamente en áreas no infectadas.

## 6.3 Síntomas

Los síntomas asociados a esta enfermedad son similares a los causados por otros patógenos, prácticas culturales inadecuadas, deficiencias nutricionales e incluso incompatibilidad de tejidos (Mircetich *et al.*, 1980), por lo que es fácil caer en confusiones o subestimar el problema. Los síntomas parten con crecimientos terminales deficientes, seguidos de clorosis foliar, caída de hojas, y defoliación prematura en la parte superior del árbol. En la medida que la enfermedad avanza se logra observar árboles con hojas pequeñas, amarillas y caídas y decaimiento general del individuo (Mircetich *et al.*, 1980). En etapas tempranas, la línea negra formada por la reacción de hipersensibilidad no es

continua. Esta necrosis se extiende gradualmente en la unión de la variedad y el portainjerto hasta circundar completamente al árbol. Aproximadamente luego de 2 a 6 años de completado el anillo, la parte superior del árbol muere (Mircetich *et al.*, 1998).

#### 6.4 Diagnóstico

Para realizar un correcto diagnóstico visual, se debe examinar cuidadosamente la unión de la variedad y el portainjerto, removiendo un trozo de corteza en varios puntos del perímetro de la unión y observando si se presenta una franja necrótica en la zona (Mircetich *et al.*, 1980). Cabe mencionar que este síntoma presenta una ligera variación si se trata de nogal inglés injertado sobre portainjerto *J. hindsii* o Paradox. En el primer caso, se observa una estrecha franja necrótica en la unión variedad-portainjerto, mientras que, en el segundo, se desarrolla una extensa necrosis de tejido después de la unión (Mircetich *et al.*, 1980).

Además del diagnóstico visual, una prueba convencional para el diagnóstico de individuos es el bioensayo. En este se inoculan plantas herbáceas con una solución del tejido a diagnosticar. Esta técnica resulta muy costosa y demandante de tiempo, requiriendo gran espacio y resultando ser poco práctica para el estudio de huertos comerciales (Mircetich *et al.*, 1998). Por otro lado, existen técnicas serológicas y moleculares. En un estudio los autores Borja y Ponz (1992) evaluaron los distintos métodos para la detección de CLRV en nogal: ELISA, hibridación Dot-blot y RT-PCR. ELISA en estudios anteriores ha demostrado no ser lo suficientemente sensible para estudios en huertos comerciales por la distribución errática y desuniforme del virus (Rowhani *et al.*, 1985). Este estudio no fue la excepción pues resultó ser el método menos sensible, entre los estudiados. Mientras ELISA logró detectar entre 2,5-1,25 ng de virus en muestras infectadas, Dot- blot logró detectar 0,3 ng y RT-PCR 5 pg, por lo que este último fue el método más sensible para la detección de CLRV-W. Otros autores como Werner *et al.*, (1997) y Wetzal *et al.*, (1993) también han señalado a RT-PCR como una técnica muy sensible y específica para la detección de virus.

PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica para amplificar exponencialmente secuencias de DNA específicas en un corto periodo de tiempo (Kuslich *et al.*, 2008). Cuando se necesita amplificar cadenas de RNA, se utiliza RT-PCR es decir la PCR de transcripción inversa. En esta técnica el RNA se transcribe de forma inversa en

DNA complementario (cDNA) utilizando una enzima transcriptasa inversa. Luego el cDNA sirve de molde para llevar a cabo la PCR convencional. En la PCR tradicional, primero, el DNA de doble cadena es desnaturalizado por calor. Luego los primers, que son específicos, se unen a las secuencias compatibles en el DNA de cadena simple. Después estos primers son extendidos por la DNA polimerasa en dirección 5' – 3', dando por resultado dos copias del DNA de doble cadena.

Para poder analizar el o los fragmentos de DNA obtenidos en la PCR, se utiliza comúnmente electroforesis en gel, la cual permite separar los fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno (Espinoza, 2007).

Una variación de este método es RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR); en este un reportero fluorescente se une a los amplicones producidos, permitiendo monitorear las copias de ADN cuando se están produciendo durante el proceso de amplificación. Este método tiene las ventajas de ser más rápido, sensible y específico a comparación del método tradicional (Fraga *et al.*, 2008).

#### 6.5 Importancia

Dada la importancia y facilidad de dispersión de esta enfermedad en zonas productivas de nogal, Ozturk *et al.*, (2008) examinaron huertos de nogal en la cuenca de Lago Van en Turquía para determinar la incidencia de infecciones virales de *Plum Pox Virus* y *Cherry Leafroll Virus*. Cabe destacar que Turquía hasta ese año se configuraba como el cuarto mayor productor de nueces de nogal en el mundo, y allí radicaba la importancia de este estudio. En él, se inspeccionaron 151 huertos de nogal de distintos distritos de las provincias de Van y Bitlis. En cada huerto se colectaron muestras de tejido foliar de árboles sintomáticos y asintomáticos, para posteriormente ser ensayados por pruebas serológicas. Los resultados de las pruebas arrojaron que ninguna de las muestras colectadas estaba infectada por *Plum Pox Virus*, mientras que el 12,9% sí lo estaba con CLRV. Es de destacar, que por más baja que se muestre en un principio la incidencia de CLRV, esta no debe ser subestimada por la facilidad de propagación de este virus.

Chile actualmente se configura como el tercer mayor productor y segundo exportador de nueces en el mundo (USDA, 2017). Las zonas productivas se extienden desde la región de Coquimbo hasta la de Biobío completando un total de 35.277 hectáreas (Muñoz, 2016) de las cuales un 87% se concentra en las regiones Metropolitana, V, VI, y VII. Cabe

mencionar que gran parte de estas zonas se sitúan en lugares con influencia marina y valles interiores, siendo en general zonas de clima mediterráneo tal como en el caso de California, en que estas áreas son las con mayormente afectadas por la enfermedad.

Señalado lo anterior, es posible concluir que Chile poseería dos de los tres componentes del triángulo epidemiológico; las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y el hospedero. Sin embargo, no se puede descartar la presencia del agente causal en territorio nacional, dado que hasta la fecha no existen estudios que lo demuestren.

## 7 Metodología

### 7.1 Lugar de trabajo

El estudio comenzará en Junio de 2019, abarcando las regiones de Valparaíso, Metropolitana, de O'Higgins y del Maule. Estas regiones corresponden a las de mayor superficie de nogal en Chile (Muñoz, 2016) y en las que además se han comercializado plantas con portainjerto Paradox y Vlach a la fecha (Comunicación personal <sup>1</sup>; Comunicación personal <sup>2</sup>), ya sea para replante o nuevas plantaciones. Cabe mencionar que este estudio se replicará 2 temporadas para evitar cualquiera variación de resultados producto de condiciones no controlables.

En base a lo realizado por Guajardo *et al.* (2017), se seleccionarán 9 huertos por región, los que además de tener nogales con portainjerto franco, deben tener nogales sobre patrón Paradox o Vlach. La superficie que considerará este estudio será el 1% de las hectáreas totales con nogal de cada región, el que será distribuido en los 9 campos, por lo que la superficie a considerar por huerto en cada región será el indicado en la última columna del cuadro 1.

Cuadro 1. Superficie de toma de muestras por huerto según región.

Región	Superficie total (ha)	1% superficie (ha)	Superficie a estudiar por huerto (ha)
Metropolitana	14.120	142	15,7
Valparaíso	6.786	68	7,5
O'Higgins	5.527	56	6,2
Maule	4.367	44	4,8

<sup>1</sup>Vivero Angostura, 2018; <sup>2</sup>Vivero Natividad, 2018

## 7.2 Tomas de muestras

### 7.2.1 *Organización muestreo*

La toma de muestras será de ramillas a inicio de brotación (septiembre). El muestreo iniciará en la región Metropolitana y de Valparaíso simultáneamente, para luego desplazarse hasta las regiones de O'Higgins y del Maule. Para realizar los muestreos en estas regiones se contará con cuatro equipos de trabajo (dos por región), cada uno conformado por dos personas. La jornada laboral será de lunes a viernes, con 9 horas de trabajo, de las cuales, en el caso del muestreo en la región Metropolitana y de Valparaíso, aproximadamente 4 h se destinarán a coleccionar muestras y las otras serán utilizadas en desplazamientos e imprevistos. En el caso de los muestreos en la región de O'Higgins y del Maule, dado que los equipos de trabajo alojarán en una pensión cercana a los lugares de muestreo, se estimará que 5 horas se destinarán a muestreo y las restantes a desplazamientos e imprevistos.

### 7.2.2 *Selección de árboles para toma de muestras*

En cada hectárea se tomarán muestras de 8 árboles; 4 con portainjerto franco y 4 con patrón Paradox o Vlach. Los árboles con portainjerto franco serán seleccionados 1 cada 3 hileras, siendo la hilera de inicio seleccionada por el investigador. Una vez establecida la hilera de inicio, en ella se seleccionará el árbol número 4, en la siguiente hilera (avanzando cada 3) se seleccionará el árbol n°8, en la siguiente el árbol n° 12 y en la última, el árbol n° 16. En caso de que el árbol seleccionado no se encuentre o se trate de un individuo con portainjerto Paradox, se procederá a seleccionar el árbol siguiente. Por su parte, los nogales sobre portainjerto Paradox o Vlach, serán seleccionados a criterio del investigador.

### 7.2.3 *Procedimiento toma y almacenamiento de muestras*

Desde la copa de cada árbol se tomarán las muestras, obteniendo un total de 10 por individuo. Los árboles muestreados serán registrados por coordenadas GPS para su futura identificación y, además, para asegurar de que se trate del individuo muestreado, a cada árbol se le colocará una tarjeta de identificación por si el sistema de posicionamiento resulta no ser exacto.

Las muestras se tomarán con una tijera de podar marca Felco®, que será desinfectada con hipoclorito de sodio y alcohol antes y después de coleccionar cada muestra

(AGROCALIDAD, 2015). Las muestras serán envueltas en papel absorbente, dispuestas en una bolsa plástica con identificación y puestas en el menor tiempo posible bajo condiciones frías (SAG, 2004). Para mantener las muestras a baja temperatura se dispondrá de neveras plásticas marca Coleman® de 15 Litros con tres geles *Ice pack* suaves pequeños marca Coleman®.

#### *7.2.4 Tiempo destinado a muestreo*

Se estimará que cada equipo de trabajo tardará un aproximado de 30 minutos en muestrear los 8 árboles/ha, por lo que diariamente en la región Metropolitana y de Valparaíso muestrearán 8 ha y en la región de O'Higgins y del Maule 10 ha.

La región Metropolitana al tener 142 ha por muestrear, tardará un total de 9 días aproximadamente. En la región de Valparaíso se tomarán muestras desde 68 ha, por lo que tardaría 5 días aproximadamente. Inmediatamente después de que el equipo emplazado en la región de Valparaíso termine con sus muestreos, se desplazará hasta la región de O'Higgins, en donde se coleccionarán muestras de 56 ha, por lo que tardaría aproximadamente 3 días. Finalmente, una vez muestreada la región Metropolitana, este equipo se desplazará hasta la región del Maule que cuenta con 44 ha por muestrear, por lo que se demorará aproximadamente 3 días.

#### *7.2.5 Envío de muestras*

Al finalizar cada jornada de recolección de muestras, estas serán depositadas en una caja Aislapol con geles *Ice pack*. Cuando se trate de las regiones de Valparaíso y Metropolitana las muestras serán llevadas diariamente por cada equipo de trabajo hasta el laboratorio de Genética e Inmunología molecular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso emplazado en Curauma, región de Valparaíso. Cuando la colección de muestras sea en las regiones de O'Higgins y del Maule, estas serán llevadas diariamente hasta el laboratorio por una persona anexa al equipo de trabajo, a excepción del último día de trabajo de cada equipo. Es importante señalar que el laboratorio recibirá muestras todos los días de muestreo, las cuales serán analizadas diariamente por el método de RT-qPCR.

### 7.3 Diagnóstico visual

#### 7.3.1 *Organización de muestreo*

El diagnóstico visual se iniciará a fines de noviembre en la región Metropolitana para después realizarse en la región de Valparaíso, O'Higgins y del Maule. Estará a cargo de 1 equipo de trabajo conformado por dos personas (ingenieros agrónomos), cuya jornada laboral será de 9 horas de lunes a viernes.

#### 7.3.2 *Procedimiento diagnóstico visual*

Se inspeccionarán visualmente nogales de más de 2 años con portainjerto Paradox o Vlach, llegando a un máximo de 50 árboles examinados por superficie en estudio de cada huerto. Aquellos nogales que presenten síntomas de la enfermedad del *blackline* como clorosis foliar, hojas pequeñas, acortamiento de entrenudos y decaimiento general, se les examinará la unión de injerto, removiendo un trozo de corteza y observando si se presenta una franja necrótica en la zona (Mircetich *et al.*,1980). Para ello se cortará con una navaja un cuadrado de aproximadamente 2 x 5 cm en la zona de unión de la variedad y el patrón y se retirará la corteza para visualizar el estado de la unión. Cabe señalar que, de presentarse tejido necrótico en la unión de injerto, se tomarán muestras de ramillas para ser analizadas por RT-qPCR y comprobar la presencia del virus.

#### 7.3.3 *Tiempo destinado a diagnóstico visual.*

Bajo el supuesto de que el máximo de árboles a muestrear por superficie mostrase síntomas, se estimará que la remoción de corteza demorará aproximadamente 2 minutos por árbol, tardando 1,67 h en inspeccionar 50 árboles. Si se considera que en la región Metropolitana y de Valparaíso se destinarán solo 4 h por jornada en inspeccionar, abarcarían un total de 119 árboles por día, por lo que tardaría aproximadamente 4 días en inspeccionar 450 árboles (50 árboles en cada uno de los 9 predios a inspeccionar por región) en cada una de estas regiones. Por otro lado, en el caso de la región de O'Higgins y del Maule, el equipo de trabajo alojará en cada región, por tanto, puede aumentar el tiempo destinado a inspección a 5 h por día, por lo que avanzaría un aproximado de 150 árboles/ día tardando 3 días por región.

#### 7.4 Procedimiento de laboratorio

En un tubo Eppendorf de tapa rosca de 2 mL se depositarán 0,4 mg de muestra, 0,4 g de perlitas de zirconio y 500 uL de Trizol®. Los tubos serán llevados al homogeneizador SpeedMill PLUS, a 6500 rpm por 7 minutos, posterior a esto se agregarán 600 uL de cloroformo y se llevará hasta el agitador Vortex durante 30 segundos. Seguidamente se debe centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Luego se tomará la fase acuosa y se llevará a columnas de extracción de ARN en donde se seguirá el protocolo de OMEGA (2012) para realizar la extracción del ARN utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Total RNA Kit I. (Comunicación personal <sup>3</sup>).

Para la síntesis de cDNA se cuantificará el RNA extraído con NanoDrop 1000 en donde se utilizarán para la síntesis 2000 ng. Cabe señalar que primero se debe eliminar el DNA contaminante, por lo que se utilizará un tratamiento con RQ1 RNase-Free DNase de PROMEGA. Para la síntesis de cDNA se utilizará la enzima M-MLV Reverse Transcriptase, donde se usarán 10 uL del producto de la reacción anteriormente mencionada, más 0,5 µg de *primer* Random Primers. Luego se incubará a 70°C por 5 minutos y se llevará a hielo en donde se agregará 5 µl de buffer de reacción de cDNA 5X, 5 µl de DNTP's 10mM, 1 µl de M-MLV RT, 11 µl de primer y 3 µl de H<sub>2</sub>O. Posteriormente esto se incubará a 42°C por 60 minutos y se almacenará a -80°C hasta su utilización (Comunicación personal<sup>3</sup>).

Para realizar PCR es necesario contar con los *primers* específicos a la secuencia del virus (Promega, 2014). Según lo señalado por MPI (2008), los cebadores específicos del virus CLRV-W corresponden a los *primers* llamados CLVR-3 y CLRV-5 cuyas secuencias son 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3' y 5'-TGGCGACCGTGTAACGGCA-3', respectivamente.

En este estudio se utilizará el sistema GoTaq® 1-Step RT-qPCR que es un sistema reactivo para el análisis cuantitativo de ARN mediante un protocolo de PCR en tiempo real de transcripción inversa en un paso (Promega, 2014). Cada sistema contiene GoTaq qPCR Master mix, GoScript RT Mix, colorante de referencia CXR y agua libre de nucleasas (Promega, 2014). Para realizar el PCR en tiempo real se procederá a realizar el protocolo según el fabricante con la excepción de que no se utilizará GoScript RT Mix y se utilizará 1 µl de cDNA (Comunicación personal<sup>3</sup>).

<sup>3</sup> Fabián Henríquez, Biólogo e investigador en Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Las reacciones serán realizadas en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , siendo los volúmenes de reactivos a utilizar, los siguientes: 10  $\mu\text{L}$  de GoTaq qPCR Master Mix, 2 $\mu\text{L}$  de cada *primer*, y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, además de adicionar agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. Cabe señalar que todo esto debe ser realizado sobre hielo (Promega, 2014).

Luego de hacer cada adición, se mezclarán las combinaciones suavemente con la pipeta llevando los componentes hacia arriba y abajo. Seguidamente se depositará cada reacción en los pocillos de la placa de PCR, la cual también se encontrará sobre hielo. Se cubrirá cada placa con un sello de placa óptica, para después centrifugarlas por un minuto y llevarlas hasta el termociclador para tiempo real, ya preparado (Comunicación personal <sup>3</sup>).

El termociclador a utilizar será Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System y se debe configurar con los siguientes ciclos:

Etapa	N° de ciclos	Programación
1. Transcripción reversa	1	$\geq 37^{\circ}\text{C}$ por 15 min
2. Inactivación de RT/ Activación en caliente	1	$95^{\circ}\text{C}$ por 10 min
3. Pasos qPCR	40	
a. Desnaturalizar		$95^{\circ}\text{C}$ por 10 seg
b. Templar		$60^{\circ}\text{C}$ por 30 seg
c. Extender		$72^{\circ}\text{C}$ por 30 seg

Durante la realización de estos ciclos se monitoreará la amplificación en tiempo real usando el software CFX Maestro <sup>TM</sup> en un computador. Cabe destacar que se considerarán como resultados positivos aquellos valores de Ct hasta 30 (Comunicación personal <sup>3</sup>).

<sup>3</sup> Fabián Henríquez, Biólogo e investigador en Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

## 8 Literatura citada

Agrocalidad. 2015. Instructivo de toma de muestra para el laboratorio de biología molecular-diagnóstico vegetal. Laboratorio de biología molecular. Disponible en <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/laboratorios/biologia-molecular/instructivo-toma-de-muestra-vegetal-laboratorios-agrocalidad.pdf>. Leído el 12 de mayo de 2018

AGV. 2016. Anuario viveros 2016: Plantas frutales, Vides y plantines de hortalizas comercializados en Chile. 174 p. Asociación de viveros de Chile, Santiago, Chile. Disponible en <http://www.viverosdechile.cl/media/uploads/Anuario-Viveros-2016.compressed.pdf>. Leído el 11 de noviembre de 2017.

Borja, M., F. Ponz. 1992. An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *Journal of Virological Methods* 36: 73-83.

Espinoza, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica PCR. p. 517-539. In E.Eguiarte and X. Aguirre (Eds.) *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, Mexico.

Fraga, D., T. Meulia, S. Fenster. 2008. Real-Time PCR. p. 10.3.1-10.3.34. In S. Gallagher and E. Wiley (eds.). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., USA.

Gallagher, S. 2008. Overview of Electrophoresis. p. 7.1.1-7.1.6 . In S. Gallagher and E. Wiley (eds.). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., USA.

Guajardo, J. 2017. Root and Crown rot of walnut in Chile. 30 p. Tesis Magíster en Ciencias Agronómicas y Ambientales. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.

Kulsich, D., B. Chui, T. Yamashiro. 2008. Overview of PCR. p. 10.2.1-10.2.31. In S. Gallagher and E. Wiley (eds.). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., USA.

Mink, G. 1993 Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology* 31:375-402.

Mircetich, S., R. Sanborn, D. Ramos .1980. Natural spread, graft-transmission, and possible etiology of walnut blackline disease. *Phytopathology* 70: 962-968.

Mircetich, S., A. Rowhani, E. Civerolo, D. Ramos.1998. Blackline disease. p. 233-241. In D. Ramos (eds.). *Walnut production manual*. University of California, California, USA.

Mircetich, S., A. Rowhani. 1984. The relationship of Cherry Leafroll Virus and blackline disease of english walnut trees. *Phytopathology* 74(4): 423-428.

Muñoz, M. 2016. Boletín frutícola. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Disponible en <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiNGU0ZDcyZjAtYTThmNS00YjE2LTlkOGMtNmViOGM2MmVmNGRiliwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCI6ImMiOjR9>. Leído el 1 de octubre de 2017.

MPI. 2008. Post-Entry Quarantine Testing Manual. 27 p. Plant Health and Environment Laboratory Investigation and Diagnostic Centres and Response. Ministry for Primary Industries, Auckland, New Zealand.

OMEGA. 2012. Product Manual E.Z.N.A. Total RNA Kit I. OMEGA bio-tek. Disponible en <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/R6834-Total-RNA-Mini-Kit-I-Combo-Online.pdf>. Leído el 26 de mayo de 2018.

Ozturk, M., H. Sipahioglu, M. Ocak, M. Usta. 2008. Cherry Leafroll Virus in *Juglans regia* in the lake Van basin of Turkey. *Plant Pathology* 90: 75-79.

PROMEGA. 2014. Manual técnico del sistema GoTaq® 1-Step RT-qPCR. Disponible en <https://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/gotaq-onestep-rt-qpcr-system-protocol/>. Leído el 26 de mayo de 2018.

Reil, W., G. Rowe, D. Ramos, S. Mircetich.1985. Incidence of walnut blackline disease in California's comercial orchards. *California agricultura* 39: 21-24.

Rowhani A., S. Mircetich, R. Shepherd, J. Cucuzza. 1985. Serological detection of Cherry Leafroll Virus in English Walnut Trees. *Phytopathology* 70: 48-52.

SAG. 2004. Manual de procedimientos para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación. Disponible en

[https://www2.sag.gob.cl/Agricola/manual\\_propagacion/semillas/capitulos/capitulo%206%20semillas.pdf](https://www2.sag.gob.cl/Agricola/manual_propagacion/semillas/capitulos/capitulo%206%20semillas.pdf). Leído el 11 de mayo de 2018.

USDA. 2017. Tree Nuts: World markers and trade. Disponible en <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/TreeNuts.pdf>. Leído el 22 de octubre de 2017.

Vial, J., V. Bianchini, E. Puentes, J. Rodirño, F. Chulak. 2016. Phytophthora: Problema de raíz. Asociación gremial de productores y exportadores de nueces de Chile (ChileNut), Santiago, Chile.

Werner, R., H. Muhlbach, C. Buttner. 1992. Detection of Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. Eur. J. For. Path. 27: 309-3018.

Wetzel, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro, J. Dunez. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. Journal of Virological Methods 39 (1–2): 27-37.

## 9 Plan de Trabajo

Para la correcta realización del estudio se debe efectuar un plan de trabajo el cual permita planificar y hacer las gestiones pertinentes para cumplir con los objetivos establecidos, de modo de llevar un orden y organización de las tareas por realizar.

Este proyecto se replicará 2 temporadas por lo que cada etapa se realizará en la temporada 2019 y 2020.

### 9.1 Temporada 1

#### 9.1.1 *Etapa 1: Organización de las visitas*

Esta etapa comprende como primera sub etapa la coordinación y realización de reuniones con viveros de nogales y Chilenut, para ubicar a los productores de nogal en cada región. Esta tarea demorará 19 días.

La segunda sub etapa es el contacto con los productores de nogal para coordinar las visitas. Esta etapa demorará 20 días.

La tercera sub etapa corresponde a la obtención herramientas, materiales y arriendo de vehículos necesarios para realizar los muestreos e inspección visual en cada una de las regiones, además de la coordinación de alojamiento en la región de O'Higgins y del Maule para cada equipo de trabajo. Esta tarea demorará 20 días.

#### 9.1.2 *Etapa 2: Obtención de muestras*

La segunda etapa comprende la visita a los 9 predios por región para la obtención de las muestras biológicas que serán analizadas. En esta etapa cada equipo de trabajo deberá llevar 2 tijeras de podar marca Felco®, 1 nevera marca Coleman® con 3 geles *Ice pack* suaves pequeños marca Coleman® y 1 caja Aislapol con 3 geles *Ice pack* suaves pequeños marca Coleman® por cada día de muestreo. Esta etapa se llevará a cabo en septiembre de 2019.

##### 9.1.2.1 *Región Metropolitana*

###### 9.1.2.1.1 *Muestreo de ramillas en huertos de la región Metropolitana*

El muestreo iniciará en septiembre y considerará una superficie de 142 ha prorratedas en 9 huertos. El muestreo tardará aproximadamente 9 días.

#### *9.1.2.1.2 Envío de muestras de la región Metropolitana a laboratorio*

Las muestras compiladas en cada día de muestreo serán depositadas en cajas Aislapol de 10 L con geles *Ice pack*, y llevadas hasta el laboratorio de Genética e Inmunología molecular de la PUCV.

#### *9.1.2.2 Región de Valparaíso*

##### *9.1.2.2.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región de Valparaíso*

El muestreo en esta región iniciará al mismo tiempo que en la región Metropolitana, y considerará una superficie de 68 ha prorrateadas en 9 huertos. Tardará aproximadamente 5 días.

##### *9.1.2.2.2 Envío de muestras de la región de Valparaíso a laboratorio*

Las muestras compiladas en cada día de muestreo se embalarán y llevarán diariamente hasta el laboratorio de genética e inmunología molecular de la PUCV.

#### *9.1.2.3 Región de O'Higgins*

##### *9.1.2.3.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región de O'Higgins*

Una vez terminado el muestreo en la región de Valparaíso, los equipos se trasladarán hasta la región de O'Higgins. Las ha abarcadas serán 56, por lo que la labor tardará aproximadamente 3 días.

##### *9.1.2.3.2 Envío de muestras de la región de O'Higgins a laboratorio*

Las muestras reunidas en cada día serán depositadas en una caja *Aislapol* de 10 L con geles *Ice pack*, y serán llevadas hasta el laboratorio por una persona anexa al equipo de trabajo emplazado en la región. Solo el último día las muestras serán llevadas por el equipo de trabajo.

#### *9.1.2.4 Región del Maule*

##### *9.1.2.4.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región del Maule*

Una vez terminado el muestreo en la región Metropolitana, los equipos serán enviados hasta esta región. Se considerarán 44 ha, por lo que tardarán aproximadamente 3 días en obtener todas las muestras.

##### *9.1.2.4.2 Envío de muestras a laboratorio.*

Las muestras recopiladas en cada jornada de muestreo se depositarán en cajas *Aislapol* de 10 L con geles *Ice pack* y serán llevadas hasta el laboratorio por una persona anexa al

equipo de trabajo emplazado en la región. Solo el último día de recolección de muestras, estas serán llevadas por el equipo de trabajo emplazado en terreno.

#### *9.1.3 Etapa 3: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados*

Las muestras recibidas diariamente en el laboratorio serán analizadas mediante el método RT-qPCR que tarda un tiempo total de 3,5 horas en obtener resultados. Esta etapa durará todo el tiempo de muestreo abarcado por las 4 regiones, ya que en la medida que lleguen muestras al laboratorio, estas serán analizadas.

#### *9.1.4 Etapa 4: Informe n°1 temporada 1*

Elaboración de informe n°1 a partir de los resultados entregados por el laboratorio.

#### *9.1.5 Etapa 5: Diagnóstico visual*

En noviembre, cuando los árboles se encuentren en activo crecimiento, se inspeccionarán visualmente aquellos con portainjerto Paradox o Vlach, llegando a un máximo de 50 árboles examinados por superficie en estudio de cada huerto, por lo que independiente de la superficie que se trate, el límite de inspección siempre será el mismo. Nogales que presenten alguna sintomatología asociable al virus del *blackline* se les examinará la unión de injerto, removiendo un trozo de corteza. De encontrarse el síntoma característico de la enfermedad del *blackline*, se tomarán muestras de ramillas y se llevarán hasta laboratorio.

##### *9.1.5.1 Región Metropolitana.*

La inspección visual en la región metropolitana tardará aproximadamente 4 días.

##### *9.1.5.2 Región de Valparaíso.*

La inspección visual en la región de Valparaíso tardará 4 días aprox.

##### *9.1.5.3 Región de O'Higgins.*

La inspección visual en esta región demorará un estimado de 3 días.

##### *9.1.5.4 Región del Maule.*

La inspección visual demorará aproximadamente 3 días.

#### *9.1.6 Etapa 6: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados*

Esta etapa se extenderá todo el tiempo abarcado por el diagnóstico visual en las 4 regiones y en la medida que lleguen las muestras al laboratorio estas serán analizadas y

se obtendrán los resultados. Los resultados serán entregados el día 17 de diciembre de 2019.

#### *9.1.7 Etapa 7: Informe n°2 temporada 1*

A partir de los resultados del diagnóstico visual y el muestreo de árboles asintomáticos se elaborará un informe compilando todos los resultados obtenidos. Además, se realizará el cierre contable de dicha temporada. Esta tarea demorará 30 días.

### 9.2 Temporada 2

#### *9.2.1 Etapa 1: Organización de visitas*

La primera sub etapa corresponde al contacto con los productores de nogal para coordinar las visitas. Esta tarea demorará 20 días.

La segunda sub etapa se refiere a la obtención de los materiales necesarios para realizar los muestreos e inspección visual en los nogales en cada región. Además, considera la coordinación de los arriendos de vehículos y alojamiento. Esta tarea tardará 20 días.

#### *9.2.2 Etapa 2: Obtención de muestras*

La segunda etapa abarca la visita a los 9 predios por región para la obtención de las muestras de ramillas. En esta etapa cada equipo de trabajo deberá contar con 2 tijeras de podar, y deberán llevar 1 nevera con 3 geles *Ice pack* y 1 caja Aislapol con 3 geles *Ice pack* por cada día de muestreo. Esta etapa se llevará a cabo en septiembre de 2020.

##### *9.2.2.1 Región Metropolitana*

###### *9.2.2.1.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región Metropolitana*

El muestreo iniciará en septiembre y considerará una superficie de 142 ha prorrateadas en 9 huertos. El muestreo tardará aproximadamente 9 días.

###### *9.2.2.1.2 Envío de muestras de la región Metropolitana a laboratorio*

Las muestras compiladas en cada día de muestreo serán depositadas en cajas Aislapol de 10 L con geles *Ice pack*, y llevadas hasta el laboratorio de Genética e Inmunología molecular de la PUCV.

### *9.2.2.2 Región de Valparaíso*

#### *9.2.2.2.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región de Valparaíso*

El muestreo en esta región iniciará el mismo día que en la región Metropolitana, y considerará una superficie de 68 ha prorrateadas en 9 huertos. Tardará aproximadamente 5 días.

#### *9.2.2.2.2 Envío de muestras de la región de Valparaíso a laboratorio*

Las muestras compiladas en cada día de muestreo se embalarán y llevarán diariamente hasta el laboratorio de genética e inmunología molecular de la PUCV.

### *9.2.2.3 Región de O'Higgins*

#### *9.2.2.3.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región de O'Higgins*

Una vez terminado el muestreo en la región de Valparaíso, los equipos emplazados en la región se trasladarán hasta la región de O'Higgins. Las ha abarcadas serán 56, por lo que la labor tardará aproximadamente 3 días.

#### *9.2.2.3.2 Envío de muestras de la región de O'Higgins a laboratorio*

Las muestras reunidas en cada día serán depositadas en una caja *Aislapol* de 10 L con geles *Ice pack*, y serán llevadas hasta el laboratorio por una persona anexa al equipo de trabajo emplazado en la región. Solo el último día las muestras serán llevadas por cada equipo de trabajo.

### *9.2.2.4 Región del Maule*

#### *9.2.2.4.1 Muestreo de ramillas en huertos de la región del Maule*

Una vez terminado el muestreo en la región Metropolitana, los se trasladarán hasta esta región. Se considerarán 44 ha, por lo que el equipo tardará aproximadamente 3 días en obtener todas las muestras.

#### *9.2.2.4.2 Envío de muestras a laboratorio.*

Las muestras recopiladas en cada jornada de muestreo se depositarán en cajas *Aislapol* de 10 L con geles *Ice pack* y serán llevadas hasta el laboratorio por una persona anexa al equipo de trabajo emplazado en la región. Solo el último día de recolección de muestras, estas serán llevadas por el equipo de trabajo emplazado en terreno.

### 9.2.3 *Etapa 3: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados*

Las muestras recibidas diariamente en el laboratorio serán analizadas mediante el método RT-qPCR que tarda un tiempo total de 3,5 horas en obtener resultados. Esta etapa durará todo el tiempo de muestreo abarcado por las 4 regiones, ya que en la medida que lleguen muestras al laboratorio, estas serán analizadas.

### 9.2.4 *Etapa 4: Informe n°1 temporada 2*

Elaboración de informe n°1 de la segunda temporada de muestreos a partir de los resultados entregados por el laboratorio.

### 9.2.5 *Etapa 5: Diagnóstico visual*

En noviembre, se inspeccionarán visualmente nogales sobre portainjerto Paradox o Vlach, llegando a un máximo de 50 árboles examinados por superficie en estudio de cada huerto. Árboles que presenten alguna sintomatología asociable al virus del *blackline* se les examinará la unión de injerto, removiendo un trozo de corteza. De encontrarse el síntoma característico de la enfermedad del *blackline*, se tomarán muestras de ramillas y se llevarán hasta laboratorio.

#### 9.2.5.1 *Región Metropolitana.*

La inspección visual en la región metropolitana tardará aproximadamente 4 días.

#### 9.2.5.2 *Región de Valparaíso.*

La inspección visual en la región de Valparaíso tardará 4 días aprox.

#### 9.2.5.3 *Región de O'Higgins.*

La inspección visual en esta región demorará un estimado de 3 días.

#### 9.2.5.4 *Región del Maule.*

La inspección visual demorará aproximadamente 3 días.

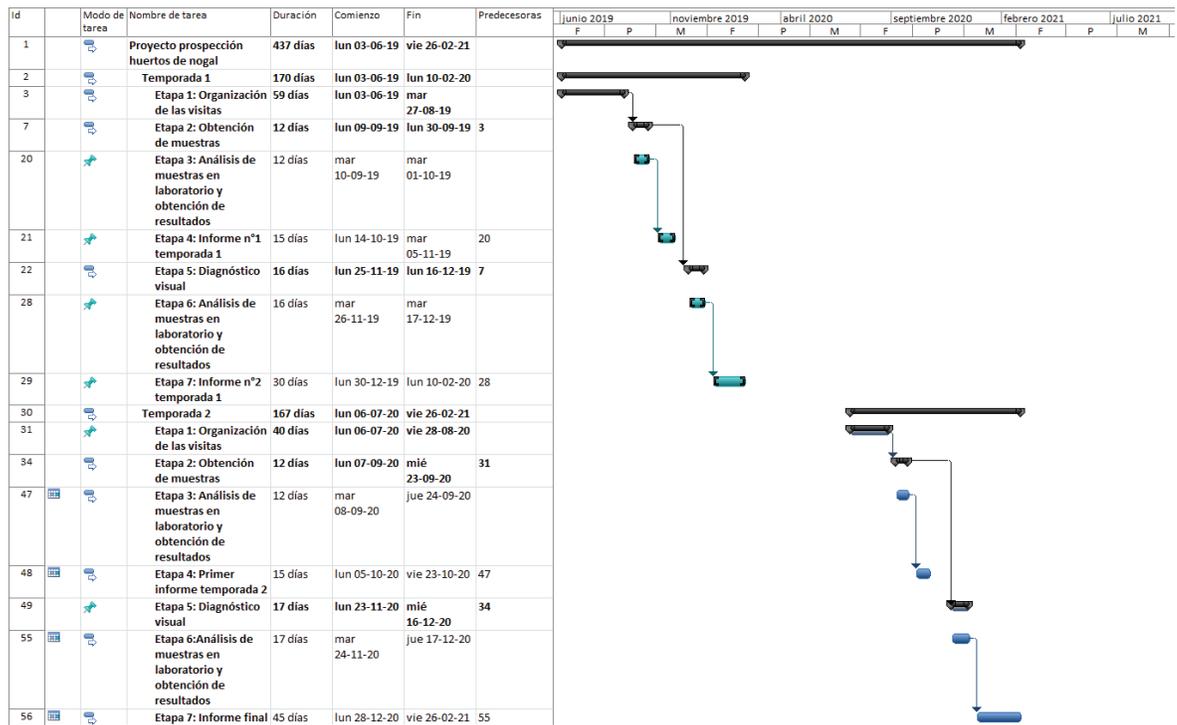
### 9.2.6 *Etapa 6: Análisis de muestras en laboratorio y obtención de resultados*

Esta etapa se extenderá todo el tiempo abarcado por el diagnóstico visual en las 4 regiones y en la medida que lleguen las muestras al laboratorio estas serán analizadas y se obtendrán los resultados. Los resultados serán entregados el día 17 de diciembre de 2020.

### *9.2.7 Etapa 7: Informe final*

A partir de los informes realizados la primera temporada y los resultados obtenidos la segunda temporada, se comprobará si se cumple la hipótesis propuesta. A partir de estos resultados se elaborará un informe final con el objetivo de exponer los resultados obtenidos. Este informe estará listo el día 26 de febrero de 2021. Además, en esta etapa se realizará el cierre contable del proyecto.

### 10 Carta Gantt



## 11 Resultados esperados

- A partir del muestreo para evaluar la presencia del virus *Cherry Leafroll* en huertos de nogal ubicados en las principales zonas de producción, se confirma la existencia del virus en territorio nacional.
- En árboles que presenten síntomas asociables a la enfermedad del *blackline* se encuentra la línea negra en la unión de injerto y se confirma la presencia del agente causal por medio del análisis de muestras por RT-qPCR.
- La técnica RT-qPCR resulta ser una técnica efectiva, sensible, y rápida para la detección del virus *Cherry Leafroll*.

## 12 Organización

### 12.1 Cargos y funciones

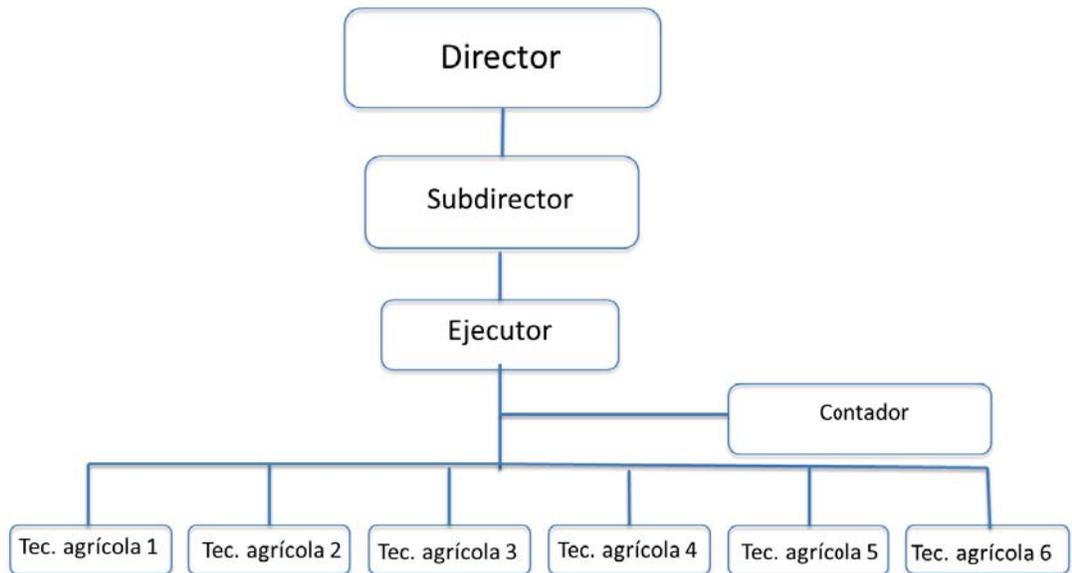
Nombre del	Formación/grado	Cargo en el	Funciones (N°)	Costo del	Aporte FONDO
------------	-----------------	-------------	----------------	-----------	--------------

profesional	académico	proyecto		personal (MM\$)	CONCURSABLE (MM\$)
Ricardo Cautín	Ingeniero Agrónomo con doctorado en Fisiología Frutal	Director	Supervisión de labores Comunicación y orientación	2.56	
Catalina Bórquez	Ingeniero agrónomo master en ciencias agronómicas y ambientales	Subdirectora	Supervisión de labores. Comunicación y orientación. Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región Metropolitana y del Maule y de realizar diagnóstico visual en todas las regiones en estudio.	5.60	5.60
Jacqueline Maulén	Ingeniero agrónomo	Ejecutora	Coordinación de labores para la realización del estudio. Compra de herramientas y materiales para el estudio. Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región de Valparaíso y de O'Higgins y de realizar diagnóstico visual en todas las regiones en estudio. Elaboración y entrega de informe de resultados obtenidos.	8.0	8.0
N.N 1	Técnico agrícola	Personal de	Participación en	0.36	0.36

		terreno	equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región Metropolitana y del Maule.		
N.N.2	Técnico agrícola	Personal de terreno	Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas a región Metropolitana y del Maule	0.36	0.36
N.N.3	Técnico agrícola	Personal de terreno	Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región Metropolitana y del Maule	0.36	0.36
N.N.4	Técnico agrícola	Personal de terreno	Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región de Valparaíso y O'Higgins.	0.24	0.24
N.N.5	Técnico agrícola	Personal de terreno	Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región de Valparaíso y O'Higgins.	0.24	0.24
N.N.6	Técnico agrícola	Personal de terreno	Participación en equipo de trabajo a cargo de extraer muestras de ramillas en la región de Valparaíso y O'Higgins.	0.24	0.24
N.N.7	Contador auditor	Contador	Confeción de	0.36	

			flujo de fondos y situación financiera del proyecto		
--	--	--	--	--	--

## 12.2 Organigrama



## 12.3 Descripción de cargos

**Director:** Es el encargado de supervisar las labores realizadas y el correcto funcionamiento global del proyecto. Su dedicación al proyecto será de un 20%.

Subdirector: Su principal función es subrogar al director del proyecto. Además, participa en grupos de trabajo presentes en terreno. Su dedicación al proyecto será de un 70%.

Ejecutor: Es el encargado de la realización del proyecto, abarcando desde lo más básico a lo más complejo de este. Está ocupado de la compra de herramientas y materiales, arriendo de vehículos, coordinación de alojamiento de los grupos de trabajo, coordinación de reuniones, selección de huertos a incluir en el estudio, coordinación de las visitas a los predios con los productores, contacto directo con los productores, participación en grupos de trabajo presentes en terreno, y elaboración de informes. Este trabajo requiere tiempo completo y su dedicación al proyecto será 100%.

Contador: Encargado de llevar la situación financiera del proyecto y hacer el cierre contable de cada temporada. Su dedicación al proyecto será de 5%.

Técnico agrícola 1, 2 y 3: Son técnicos que forman parte de los dos equipos de trabajo encargados de la recolección de muestras en la región Metropolitana y del Maule. Además deben transportar las muestras hasta el laboratorio cuando se encuentren en la región Metropolitana. El trabajo de cada uno se extiende por 13 días por lo que su porcentaje de dedicación por mes es de 60%.

Técnico agrícola 4, 5 y 6: Forman parte de los dos equipos de trabajo encargados de la recolección de muestras en la región de Valparaíso y O'Higgins. Además, deben llevar las muestras recolectadas hasta el laboratorio cuando se encuentren en la región de Valparaíso. Su trabajo se extiende por 8 días por lo que su porcentaje de dedicación por mes es de 40%.

### 13 Presupuesto

#### 13.1 Presupuesto total por cuenta (MM\$)

	Cuenta	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA		Total(MM\$)
			Pecuniario	No pecuniario	
A.	Total Recursos Humanos	30.8		5.12	35.92
B.	Total Subcontratos	77.86	51.9	-	129.76
C.	Total Capacitación	-	-	-	-
D.	Total Misiones Tecnológicas	-	-	-	-
E.	Total Difusión	1.99			1.99
F.	Total Gastos de Inversión	0.6	-	-	0.6
G.	Total Gastos de Operación	20.95	-	-	20.95
H.	Total Gastos de Administración	-	-	0.72	0.72
	Porcentaje de Aporte (%)	69.6%	27.32%	3.07%	
<b>TOTAL(MM\$)</b>		<b>132.2</b>	<b>51.9</b>	<b>5.84</b>	<b>189.94</b>

### 1. PRESUPUESTO TOTAL POR AÑO (MM\$)

	<b>Cuenta</b>	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Total(MM\$)</b>
A.	Total Recursos Humanos	15.4	15.4	30.8
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>	2.56	2.56	5.12
B.	Total Subcontratos	64.88	64.88	129.76
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
C.	Total Capacitación			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
D.	Total Misiones Tecnológicas			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
E.	Total Difusión		1.99	1.99
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
F.	Total Gastos de Inversión	0.6		0.6
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
G.	Total Gastos de Operación	10.95	10	20.95
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			
H.	Total Gastos de Administración			
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>	0.36	0.36	0.72
	<b>Total(MM\$)</b>			184.1
	<i>Pecuniario</i>			
	<i>No Pecuniario</i>			5.84

**14 Anexos:**

Presupuestos:

Recursos humanos	Salario/mes	Dedicación mensual al proyecto	Meses a contratar	Total proyecto
Director proyecto	\$ 1.600.000	20%	8	\$ 2.560.000
Subdirector proyecto	\$ 1.000.000	70%	8	\$ 5.600.000
Ejecutor proyecto	\$ 1.000.000	100%	8	\$ 8.000.000
Técnico agrícola 1 (RM-Maule)	\$ 600.000	60%	1	\$ 360.000
Técnico agrícola 2 (RM-Maule)	\$ 600.000	60%	1	\$ 360.000
Técnico agrícola 3 (RM-Maule)	\$ 600.000	60%	1	\$ 360.000
Técnico agrícola 4 (Valpo-O'Higgins)	\$ 600.000	40%	1	\$ 240.000
Técnico agrícola 5 (Valpo-O'Higgins)	\$ 600.000	40%	1	\$ 240.000
Técnico agrícola 6 (Valpo-O'Higgins)	\$ 600.000	40%	1	\$ 240.000
			Total	\$17.960.000

Operación	Total
Celular	\$ 183.960
Plan celulares	\$ 359.820
Arriendo vehículos	\$ 2.274.328
Alojamientos	\$ 746.098
Viajes	\$ 6.502.160
Implementos toma de muestras	\$ 887.142
TOTAL	\$10.953.508

Inversión	Cantidad	Precio	Precio total
GPS	4	\$ 149.990	\$ 599.960

Subcontratos	Cantidad	Precio	Precio total
Análisis muestras			\$64.583.333
Transporte muestras Región O'Higgins y Maule	3	100.000	\$ 300.000
		Total	\$64.883.333

Administración	Salario/mes	Dedicación al proyecto	Meses a contratar	Total proyecto
Apoyo administrativo	\$ 900.000	5%	8	\$ 360.000

Difusión	Cantidad	Precio	Precio total	precio +iva
Salón Monticello	1	\$ 720.000	\$ 720.000	\$ 856.800
Coffee break	100	\$ 6.200	\$ 620.000	\$ 737.800
Amplificación salón	1	\$ 225.000	\$ 225.000	\$ 267.750
Data show	1	\$ 105.000	\$ 105.000	\$ 124.950
			Total	\$ 1.987.300

Item	Año 1	Año 2	TOTAL
Recursos humanos	\$17.960.000	\$ 17.960.000	\$ 35.920.000
Subcontratos	\$64.883.333	\$ 64.883.333	\$129.766.666
Difusión	0	\$ 1.987.300	\$ 1.987.300
Inversión	\$ 599.960	\$ -	\$ 599.960
Operación	\$10.953.508	\$ 9.997.836	\$ 20.951.344
Administración	\$ 360.000	\$ 360.000	\$ 720.000
	\$94.756.801	\$ 95.188.469	\$189.945.270

Total proyecto	\$189.945.270
Imprevistos (5%)	\$ 9.497.264
<b>TOTAL</b>	\$199.442.534