

CONVOCATORIA PROPUESTAS DE PROYECTOS 2013-2014

1. ANTECEDENTES GENERALES

Id de la propuesta: 544**1. Nombre de la Propuesta**

Generación y desarrollo de un sistema de detección múltiple de virus en vides

2. Características de la Propuesta

2.1. Sectores, Subsectores y Rubros de la Propuesta

Sector	Subsector	Rubro
Agrícola	Frutales Hoja Caduca	Viñas y Vides

2.2. La propuesta corresponde a una iniciativa de innovación en



Proceso



Producto

2.3. Principales líneas de temáticas de la Propuesta

Línea Temática
Biotecnología
Control Plagas y Enfermedades
Buenas prácticas agrícolas

2.4. La propuesta corresponde a una iniciativa de innovación en bien/servicio:



Privado

Público

3. Lugar donde se llevará a cabo la Ejecución Técnica de la Propuesta

Región	Provincia	Comuna
REGIÓN METROPOLITANA de SANTIAGO	SANTIAGO	Santiago

4. Duración de la Ejecución de la Propuesta: 36 mes(es)**5. Ejecutor de la Propuesta**

ANTECEDENTES GENERALES	
Tipo Entidad	Persona Juridica
Recuperación IVA (¿La entidad jurídica está afecta a	No afecta a IVA

I VA?)	
Nombre/Razón Social	AgriJohnson
Origen de Constitución	Chilena
RUT	
País	Chile
Región	REGIÓN METROPOLITANA de SANTIAGO
Provincia	MELIPILLA
Comuna	Curacaví
Localidad	
Dirección	
Teléfono Fijo	
Teléfono celular	
Fax	
E-mail	
Tipo de Entidad	Empresa (SA, EIRL, SPA, Ltda u otra)
Giro	Biotechnología y Fitopatología Agrícola y Forestal
Rango de Ventas	
Nº Trabajadores	3
Usuario INDAP	NO
Dirección WEB	
Reseña Ejecutor	AgriJohnson posee experiencia en proyectos en el área de la biotecnología agrícola y forestal, y además tiene interés en las aplicaciones biotecnológicas para el desarrollo de nuevos productos. El director de AgriJohnson es el Dr. Patricio Arce, quien es Profesor Asociado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile. Posee vasta experiencia en diversos ámbitos de la genética vegetal, biología molecular, Virología Vegetal en particular y fitopatologías en general. Participa actualmente en proyectos relacionados con Virología, como; efecto de las infecciones virales en la regulación de biosíntesis de flavonoides mediado por factores de transcripción Myb (FONDECYT 1100709), Genómica funcional en el estudio de infecciones virales en vid (Genoma -CORFO), NUCLEO MILENIO en Genómica funcional de plantas MIDEPLAN. El Dr. Arce se ha vinculado con la industria frutícola de exportación para solucionar diversos problemas y oportunidades mediante la aplicación de herramientas biotecnológicas. Ha dirigido más de 15 proyectos de investigación entre los que destaca la iniciativa Genoma Chile en vides, el Programa de Mejoramiento Genético en Vides de mesa del Consorcio de la Industria de la fruta, proyectos en el Consorcio de la Industria del vino, y Proyectos MILENIO, FONDEF, FIA, FONDECYT, entre otros. Además, fue el responsable técnico de proyectos previos que terminaron exitosamente con el logro de portainjertos transgénicos de cítricos resistentes a salinidad. Ha formado a 13 Doctores y más de 33 biólogos, bioquímicos, agrónomos y biotecnólogos. Tiene aceptada una patente en USA para la generación de frutos sin semilla, la que se está gestionando además en otros cinco países. Además tiene una patente nacional sobre la generación de semillas artificiales de <i>P. radiata</i> y otras tres solicitudes de patentes nacionales. Ha logrado desarrollar una importante red de contactos nacionales e internacionales que podrían estar interesados en la utilización y comercialización del sistema generado. El Dr. Arce apoyará tanto en el trabajo científico como también en la gestión comercial y la protección de la propiedad intelectual desarrollada. AgriJohnson Ltda. es una empresa nueva creada el 3 de Julio del año 2007 con un Giro amplio relacionado con la Biotecnología y Fitopatología Agrícola y Forestal. Cuenta con un moderno laboratorio de 160 m². Su laboratorio dispone de corriente trifásica y está equipado con tres cámaras de crecimiento in vitro, sala de preparación de medio, sala de cámaras de flujo laminar. Cuenta además

	con un sistema de agua desionizada, cámaras de Flujo laminar, balanza, medidor de pH, refrigerador, autoclave, lector de ELISA y el equipamiento necesario para detectar mediante RT-PCR virus en vides. Además cuenta con un invernadero tecnificado con riego, calefacción e iluminación de 180 m2 y un sombreadero de 720 m2. También cuenta con un balón de gas a granel de 2000 m3 que surte la calefacción del laboratorio e invernadero.
DATOS REPRESENTANTE LEGAL	
Nombre	Consuelo
Apellido Paterno	Medina
Apellido Materno	Arévalo
RUT	
Cargo	Representante legal e investigador AgriJohnson Ltda

6. Coordinador Principal de la Propuesta

ANTECEDENTES GENERALES	
Tipo Entidad	Persona Natural
Nombre/Razón Social	AGRI JOHNSON LTDA
Apellido Paterno	Medina
Apellido Materno	Arévalo
Nacionalidad	Chilena
RUT	
Genero	Mujer
Fecha de Nacimiento	
Pais	Chile
Región	REGIÓN METROPOLITANA de SANTIAGO
Provincia	SANTIAGO
Comuna	Providencia
Localidad	
Dirección	
Teléfono Fijo	
Teléfono celular	
Fax	
E-mail	
Profesión/Oficio	Licenciada en Biología
ANTECEDENTES LABORALES	
Empresa	AgriJohnson
Cargo	Representante legal e investigador asociado
RUT	
Jefe(a) de hogar	SI
Etnia	S/C

7. Asociados de la Propuesta

2. CONFIGURACIÓN TÉCNICA

8. Resumen ejecutivo de la Propuesta

Las infecciones virales en vides son muy difíciles de controlar, generando un serio impacto en la disminución de la producción, retraso de la brotación y madurez del fruto, mala calidad de la uva, incompatibilidad con portainjertos, un prematuro envejecimiento y la muerte de los viñedos.

Debido a la extrema facilidad con que los virus se transmiten a través del material vegetativo, el control resulta fundamental. El costo de certificar plantas de vides libre de virus es alto, es por esto que los viveristas normalmente no adoptan esta medida. Se propone que el sistema de detección múltiple de virus proporcionará una nueva herramienta agrícola, debido a su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo costo, en comparación con las técnicas usadas actualmente ELISA y RT-PCR simple.

Se generará y evaluará un sistema de detección múltiple de virus a partir de secuencias virales específicas del genoma viral de los 18 virus de vid requeridos por el SAG. Se desafiará el sistema con plantas infectadas con más de un virus, con esta herramienta se obtendrán Bancos de Germoplasma, libre de virus. Los resultados esperados son el desarrollo de un sistema de detección múltiple de virus de manera comercial.

9. Problema y/u oportunidad.

Problema

Oportunidad



Oportunidad y Problema

9.1. Problema

Las infecciones virales en vides producen un serio impacto en la disminución del rendimiento, alteración en el color, sabor y deformación de las bayas, retraso en la maduración, aumento de la sensibilidad a otros patógenos, incompatibilidad del portainjerto y envejecimiento prematuro de la planta. Las pérdidas en promedio son de 10% pero pueden llegar al 70%. Los virus involucrados en el deterioro de la madera, llevan a una disminución en la producción de 20% ó 30%. Se estima que sólo el virus GFLV en España produce un 80% de disminución en la producción de uva de mesa, mientras que en Chile entre 5-10% llegando a un 90%. Aún así, las herramientas de detección usadas en Chile como ELISA y RT-PCR simple, son costosas y de baja eficacia.

9.2. Justificar la relevancia del problema identificado

Considerando la importancia del cultivo de vid en Chile y el alto grado de contaminación viral de los viñedos chilenos, detectándose mayormente desde 3 a 7 virus a la vez por planta; es que se hace prioritario contar con un método eficaz y económico para la detección de virus. Actualmente lo que se utiliza para la detección de virus en cultivos de vides es ELISA y RT-PCR simple. Algunas desventajas de ELISA son la incapacidad de detectar virus en título bajo, ausencia de anticuerpos para algunos virus importantes, la dificultad de producción de reactivos y la detección se demora al menos 2 días. Mientras que el PCR múltiple es un método más fiable para la detección de virus en vides, debido a su alta sensibilidad, especificidad y velocidad.

9.3. Oportunidad

La secuenciación de los virus que infectan vides, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que minimicen las interacciones deficientes de múltiples reacciones en una misma reacción de PCR, han generado la oportunidad de contar con una herramienta para detectar múltiples virus de vides en una misma reacción de PCR.

Se considera oportunidad que la industria nacional vinífera apunte a incrementar las ventas locales a US\$840 millones y casi duplicar las exportaciones a US\$3.000 millones para fines de esta década. Y en conjunto con la creciente demanda de uva fresca de mejor calidad, impulsan a nuestro país a mejorar estos productos para mantener su liderazgo, invirtiendo en herramientas biotecnológicas competentes para la industria.

9.4. Justificar la relevancia de la oportunidad identificada

En nuestro laboratorio se hizo un análisis funcional de genes involucrados en infección viral (GFLV) y se determinó que esta afecta la maduración de la baya, disminuyendo la acumulación de azúcares y la biosíntesis de antocianinas presentes en *Vitis vinifera* (Vega y cols., 2011). Traduciéndose estos resultados en pérdidas económicas sustanciales, en los viñedos infectados.

La ventaja de RT-PCR múltiple es que la detección se obtiene en menos de 4 horas y la cantidad de muestra es menor a ELISA. Lo anterior se ve reflejado en la disminución de los costos y una mayor eficiencia.

En el laboratorio contamos con la metodología para detectar al menos 7 virus a la vez y el desafío es llegar a detectar al

menos 18 en una misma reacción de PCR.

10. Solución innovadora de la Propuesta

Para la detección de virus en vides, frecuentemente se usa el análisis por ELISA dentro de las desventajas se encuentran que los anticuerpos disponibles han sido desarrollados en los países donde los virus fueron detectados, generalmente EEUU, Israel y Holanda, entre otros; y no necesariamente considerando las cepas virales que se encuentran en nuestro país, el tiempo necesario para la obtención de resultados es mucho mayor que el PCR y aún así es menos sensible que este.

La utilización de un sistema de detección basado en la identificación de los ácidos nucleicos virales posibilita la detección inequívoca de los virus presentes en Chile, con la considerable disminución de los falsos positivos y negativos por esta técnica

Por consiguiente, para utilizar una planta sana, ya sea generada por un vivero, traída de exportación del extranjero o autogenerada por el propio productor, se debería realizar la certificación de limpieza viral para al menos los 18 virus que indica el SAG.

Según los costos actuales que tiene la detección de un virus, ya sea por ELISA, RT-PCR simple o uso de plantas indicadoras. Y considerando que varios estudios recientes han demostrado infecciones simultáneas en plantas donde incluso existen variantes de éstos, incluyendo el virus GFLV (Vigne y cols., 2004), GLRaV 1 y GLRaV3 (Little y cols., 2001; Turturo y cols., 2005), GVA (Goszczynski y Jooste, 2003) y GVB (Shi y cols., 2004). Incluso se han descrito este tipo de infecciones simultáneas en cítricos, como ocurre con el virus Citrus tristeza (Ayllón y cols., 2001; Rubio y cols., 2001) y para manzanas, con el virus Apple chlorotic leaf spot (Candresse y cols., 1995) La detección de 18 virus tendría un costo altísimo, imposible de pagar por un productor mediano e inclusive grande. Además se debe considerar que se requieren análisis de detección viral en al menos el 10 % de las plantas que van a ser llevadas a campo. Con la generación del sistema de detección múltiple de virus, los costos disminuirían considerablemente, dejando accesible a los productores el análisis de cada una de las plantas a utilizar en una nueva plantación o de las plantas que están en campo, para evaluar su estado fitosanitario. Esto generará un sistema de detección de virus ausente actualmente en el país, tanto para vides como para otros frutales.

La investigación propuesta, sobre detección de virus en vides contempla el generar un sistema de detección múltiple de al menos 18 virus en forma simultánea e identificar plantas sanas para generar un Banco de Germoplasma. El sistema de detección, servirá como herramienta para definir zonas en que la incidencia de virus es muy alta y áreas en las que la prevalencia del virus sea menor, con esa información se podrá constituir un registro actualizado del material presente en el propio país.

Con el conocimiento generado, se podrá definir los virus más importantes de vides en Chile y el método de saneamiento y detección ad-hoc para ellos.

11. Estado del arte de la innovación propuesta

11.1. Estado del arte de la solución innovadora en Chile

Como consecuencia de la prolongada historia del cultivo, el uso de injertos y la reproducción clonal en la viticultura, es que las vides son conocidas por ser hospederas de un gran número de virus. Según cifras entregadas por una empresa chilena del rubro (Bioscan) asegura que más del 25% de las plantas en Chile están infectadas por 5 virus a la vez, e incluso hay plantas infectadas con 11. Esta empresa detecta patógenos virales de vides, mediante ELISA y la complementa con PCR simple, debido a la falta de anticuerpos para algunos virus.

Nuestro laboratorio en asociación con Dr. Francisco Melo, diseñaron mediante herramientas bioinformáticas partidores específicos para los 18 virus de vides indicados por el SAG, eligiendo los que producían una menor interacción entre ellos, para minimizar los dímeros de partidores, entre otros factores. El sistema de detección ha sido utilizado por nuestro laboratorio y nos ha permitido detectar entre uno a siete virus presentes en una misma reacción, demostrando la funcionalidad del sistema desarrollado de múltiple detección. Somos los pioneros en Chile, en desarrollar un sistema de detección múltiple de virus en frutales.

11.2. Estado del arte de la solución innovadora en el extranjero

Minafra y Hadidi (1994), La Nette et al., (1997), y Nassuth et al (2000) han usado procedimientos para detección múltiple de 2 o 3 virus de vides. Dovas and Katis (2003) usaron partidores degenerados para detectar virus en general de Vitivirus, Foveavirus, and Closterovirus en el mismo tubo de reacción. En sudafrica, Faggioli and La Starza (2006) han reportado la detección de 8 virus en una reacción de RT-PCR en un programa de selección sanitaria y Giorgio Gambino and Ivana Gribaudo (2006) en Italia han reportado la detección de 9 virus de forma simultánea, señalando que

podrían ayudar a reducir los costos, y podrían reemplazar el uso de técnicas como ELISA o ensayos de indexaje para estos virus.

El USDA asociado a la universidad de California de Davis, es una de las instituciones responsables de EEUU, de generar plantas de vides libre de virus. Ellos durante más de 20 años han aplicado el procedimiento de detección de virus, mediante ELISA y recientemente con RT-PCR simple en que detectan los ácidos nucleicos del virus. Para el caso de la detección de virus que infectan vides, se han descrito diversos métodos para la detección de un sólo virus a la vez mediante RT-PCR (Zhang y cols., 1998; Nakaune y cols., 2006; Al Rwahnih y cols., 2012) Este año en España se ha desarrollado un sistema múltiple para detectar 5 virus simultáneamente, mediante qRT-PCR; aún no se implementa comercialmente (Lopez-Fabuel, 2013).

12. Restricciones legales

Para dar cumplimiento a los objetivos del proyecto, se hace necesario que los productos obtenidos con la culminación del mismo: 'Sistema de detección múltiple de virus en vides' y "Plantas de vides certificadas libres de vides", cumplan con las normas específicas de certificación de material de propagación de Vitis spp., establecidas por el Servicio Agrícola Ganadero de Chile.

13. Mercado.

13.1. Demanda

La superficie nacional utilizada para el cultivo de uva de mesa en Chile al 2011 fue de 53.850Ha, distribuidas principalmente entre las regiones III y VII. Y cuenta con 14 sectores vinícolas, desde el Valle de Elqui hasta el valle del Bio-Bio, pero principalmente se centra su producción en 5 zonas del centro del país. Todas estas viñedos son potenciales clientes, pero la demanda masa corto plazo se centra en el los lazos establecido con el Consorcio de la fruta, la asociación de exportadores de fruta y la viña Concha y Toro.

Hay un plan propuesto por la industria del vino que apunta a incrementar las ventas locales a US\$840 millones y casi duplicar las exportaciones a US\$3.000 millones, al 2020, convirtiendo a Chile en el principal exportador de vino del Nuevo Mundo. La competitividad y la creciente demanda de uva fresca y vinos de mejor calidad, impulsan a nuestro país a mejorar estos productos para mantener su liderazgo. Es así como un análisis confiable y eficaz, de que los parronales de vides estén libre de virus es sumamente importante, debido a que se han detectado pérdidas en la producción que van desde 5-10% llegando a alcanzar un 80%. Considerando estos datos, en Chile estarían comprometidas alrededor de 43.080Ha, produciéndose una pérdida estimada de 650 mil toneladas de uva de mesa, correspondiente a US\$1044 millones anuales.

13.2. Oferta

En nuestro país existen 3 laboratorios que realizan el servicio de detección de virus en vides (Bioscan, Insidegene e INIA), pero nuestro sistema de detección propuesto es más eficaz, económico y confiable. Debido a que estos laboratorios se han centrado en la detección mediante ELISA, indexaje y sólo se usa RT-PCR convencional como complemento a ELISA, en algunos casos.

Como se indicó anteriormente, en Sudáfrica, ya se ha reportado la detección de 8 virus en una reacción de RT-PCR para un programa de selección sanitaria y en Italia han reportado la detección de 9 virus de forma simultánea. En el mercado internacional no existen sistemas comerciales de detección múltiple para virus de vides; existen sólo publicaciones y en Chile, no se ha encontrado algún proveedor que imparta estos servicios, siendo estos de suma importancia.

14. Objetivos de la Propuesta

14.1. Objetivo General

Generar y evaluar un sistema de detección múltiple de virus de vides, para contribuir al proceso de certificación de vides de vino y uva de mesa.

14.2. Objetivos Específicos (OE)

N°	Objetivo Específico
1	Desarrollo y evaluación de la técnica de PCR múltiple para detección de virus de vides provenientes de recolección de material vegetal Nacional y de Bancos de Germoplasma internacional.
2	Análisis de plantas de vides, utilizando sistema de detección y establecimiento de Banco Germoplasma de plantas libres de virus.

3	Desarrollo de protocolos con trazabilidad de detección múltiple de virus.
4	Difusión de los resultados a la industria de uva de mesa y vitivinícola.

15. Etapas de la Propuesta

N°	Etapas
1	Diseñar un sistema de detección múltiple de virus en vides a partir de secuencias específicas del genoma viral.
2	Selección y recolección de material vegetal Nacional y de Bancos de Germoplasma internacional con sintomatología viral.
3	Generar controles positivos de virus y analizar éstos por secuenciación.
4	Generar las condiciones experimentales óptimas para el funcionamiento de este nuevo sistema. Estandarización.
5	Análisis fitosanitario de plantas de vides en campo, mediante PCR múltiple.
7	Seminario y desarrollo de material explicativo.
8	Publicación en revistas divulgativas y/o especializadas.

16. Metodo

Para el desarrollo del sistema de detección múltiple de virus en vid, se acudió al Laboratorio del Dr. Francisco Melo (PUC), donde se proporcionaron todas las herramientas bioinformáticas necesarias para este propósito. Se seleccionaron los partidores óptimos para el diseño de un PCR múltiple para detectar los virus que infectan vides. Como secuencias objetivo se utilizaron 18 genomas de los ARN virales de Grapevine Fanleaf Virus, Arabis Mosaic Virus, Strawberry Latent Ringspot Virus, Tomato Ringspot Virus, Tobacco Ringspot Virus, Grapevine Leafroll asociado 1 al 8, Rupestris Stem Pitting, Kober Stem Grooving, Corky Bark, Grapevine fleck virus, Grapevine rootstock stem lesion associated virus, siendo estos los virus que exige el SAG para la certificación de vides, además se utilizaron partidores para amplificar Rubisco, utilizandose como control interno. Los partidores obtenidos fueron sintetizados en el extremo 5' con el fluoróforo fluoresceína. Los productos amplificados serán visualizados usando la técnica de electroforesis capilar. En ésta, los fragmentos pasan a través de un capilar, donde son separados por su tamaño. Luego, el ordenador entrega el tamaño e intensidad de fluorescencia de cada fragmento amplificado. El sistema de detección utilizado, cuenta con controles positivos y negativos que permiten verificar, si el procedimiento de detección fue realizado correctamente, lo que aminora posible falsos positivos o negativos que el protocolo experimental pudiera generar. Hasta el momento se han detectado 7 virus a la vez, en nuestro laboratorio. Los restantes se amplificarán desde plantas positivas para el virus, se clonarán y secuenciarán para verificar mediante alineamiento contra la base de datos de NCBI, que los virus encontrados son los correctos y así se detectará si es la misma u otra cepa, ya identificada. Se realizará un protocolo de trazabilidad y control fitosanitario que pueda dejar registro de la reproducibilidad del método generado, para detectar la presencia o ausencia de patógenos virales utilizando el método de detección múltiple.

Al adecuar el sistema de detección y certificación de plantas de vides, se considerará una etapa de divulgación tecnológica. En esta se realizará un seminario durante el segundo año de proyecto.

17. Modelo de Negocio

El mercado objetivo son los productores de uva de mesa y vino, viñas productoras de plantas y viveros que las comercialicen. Nosotros ofreceremos el servicio al Consorcio de la fruta, con quienes trabajamos en otros proyectos y a la Viña Concha y Toro.

El servicio y producto que nosotros ofreceremos será:

- Servicio de detección de virus en vides mediante RT-PCR múltiple.

- De ser necesario en vista de una amplia demanda, se evaluará la venta del kit de detección múltiple de virus.

Los canales de distribución serán revistas agrícolas como “El campo” y “Red agrícola”; y se utilizarán los contactos establecidos durante 15 años de experiencia en el rubro de fitopatología de vides en Chile.

La relación con los clientes será directa, se irán a buscar las muestras a sus predios y se analizarán en nuestras dependencias. En el caso de la venta del kit, la distribución será indirecta.

Los proveedores de insumos serán Bioscan, BioLabs, Biosigma y Merck. Por lo tanto el abastecimiento de productos necesarios para la puesta en marcha del proyecto es seguro.

Los ingresos serán generados mediante el análisis de muestras de vides, brindando la certificación de las plantas

analizadas. Si la demanda es alta se implementará un kit de detección y éste se venderá a las empresas que lo requieran. Los gastos serán en personal capacitado, insumos, almacenaje de muestras, traslados para ir a buscar las muestras, difusión, obtención de material genético con virus y análisis de electroforesis capilar.
