



*Don bases AOP  
T.O.H  
T.C.-NAC.*

## FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA CONVOCATORIA NACIONAL DE PROYECTOS 2013-14

### PLAN OPERATIVO

Nombre iniciativa:	Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides
Ejecutor:	Johnson y Medina Limitada (AgriJohnson)
Código:	PYT-2014-0040
Fecha:	27.03.2014

Loreley 1582 - La Reina  
Mesa Central  
Fono (56-2) 24313000  
Fax (56-2) 24313064  
E-mail: fia@fia.gob.cl  
www.fia.cl  
Santiago - Chile

OFICINA DE PARTES FIA	
RECEPCIONADO	
30 ABR 2014	
Fecha .....	10 <sup>50</sup>
Hora .....	10 <sup>50</sup>
Nº Ingreso .....	13195

## Tabla de contenidos

Tabla de contenidos .....	2
I. Plan de trabajo.....	3
1. Resumen del proyecto .....	3
2. Antecedentes de los postulantes.....	6
3. Configuración técnica del proyecto .....	8
4. Organización .....	34
5. Modelo de negocio (sólo para bienes privados).....	38
6. Indicadores de impacto .....	40
7. Costos Totales Consolidados .....	41
8. Anexos43	
II. Detalle administrativo .....	51

## I. Plan de trabajo

### 1. Resumen del proyecto

#### 1.1. Nombre del proyecto

Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides

#### 1.2. Sector, subsector, rubro del proyecto y especie principal, si aplica.

Sector	Agrícola
ASubsector	Frutales de Hoja Caduca
Rubro	Viñas y Vides
Especie (si aplica)	<i>Vitis vinifera</i>

#### 1.3. Identificación del ejecutor (completar Anexo 2).

Nombre completo o razón social	Johnson y Medina Limitada (AgriJohnson)
Giro	Biotecnología y Fitopatología Agrícola y Forestal
Rut	
Nombre completo representante legal	María Consuelo Medina Arévalo

#### 1.4. Identificación del o los asociados (completar Anexo 3 para cada asociado).

Asociado 1	
Nombre completo o razón social	---
Giro	---
Rut	---
Nombre completo representante legal	---

1.5. Período de ejecución

Fecha inicio	Abril 2014
Fecha término	Marzo 2017
Duración (meses)	36 meses

1.6. Lugar en el que se llevará a cabo el proyecto

Región(es)	Metropolitana de Santiago
Provincia(s)	Melipilla
Comuna(s)	Curacaví

1.7. La propuesta corresponde a un proyecto de innovación en (marcar con una X):

Producto <sup>1</sup>	X	Proceso <sup>2</sup>	X
-----------------------	---	----------------------	---

1.8. La propuesta corresponde a un proyecto de (marcar con una X):

Bien público <sup>3</sup>		Bien privado <sup>4</sup>	X
---------------------------	--	---------------------------	---

<sup>1</sup> Si la innovación se centra en generar un bien o servicio con características nuevas o significativamente mejoradas, es una innovación en producto.

<sup>2</sup> Si la innovación se focaliza en mejoras significativas en las etapas de desarrollo y producción del bien o servicio, es una innovación de proceso.

<sup>3</sup> Se entiende por bienes públicos, aquellos que mejoran o aceleran el desarrollo empresarial, no presentan rivalidad en su consumo, discriminación en su uso y tienen una baja apropiabilidad.

<sup>4</sup> Se entiende por bienes y/o servicios privados, aquellos bienes que presentan rivalidad en su consumo, discriminación en su uso y tienen una alta apropiabilidad. Tienen un precio de mercado y quien no paga su precio, no puede consumirlos.

1.9. **Resumen ejecutivo del proyecto:** indicar el problema y/u oportunidad, la solución innovadora propuesta, los objetivos y los resultados esperados del proyecto de innovación.

Una de las problemáticas que debe enfrentar la industria vitivinícola y los productores de uva es la incidencia de virosis. Gran protagonismo tienen estos parásitos obligados al afectar el desarrollo de la vid, los atributos del vino y el rendimiento de la producción; esto debido a alteraciones en la maduración, color, tamaño y contenido de azúcar en los frutos. En plantas infectadas se ha observado incluso incompatibilidad con portainjertos, un prematuro envejecimiento o la muerte de los viñedos.

Considerando la facilidad con que los virus se transmiten a través del material vegetativo, su control preventivo resulta fundamental. El costo de certificar y mantener plantas de vid libres de virus es alto, razón por la cual los viveristas y productores normalmente no adoptan esta medida.

Un nuevo sistema de detección múltiple de 18 virus diferentes que infectan a la vid, proporcionará al mercado una herramienta agrícola de gran valor, dado su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo costo, en comparación con las técnicas de detección viral utilizadas actualmente en nuestro país, ELISA y RT-PCR simple.

El objetivo de este proyecto es desarrollar e implementar un sistema de detección múltiple y simultáneo de virus en vid y establecer un banco de germoplasma libre de virus de distintas variedades y porta injertos de vid de interés comercial. Para ello se generarán partidores específicos a partir del genoma viral de 18 virus seleccionados y se validará el sistema con la detección viral en plantas visiblemente infectadas. Además, con esta herramienta se identificarán plantas libres de virus de las variedades viníferas Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc y Merlot y de las variedades para uva de mesa Red Globe, Thompson Seedless y Crimson Seedless con las cuales establecerá un Banco de Germoplasma libre de virus. Se espera además entregar este nuevo servicio de diagnóstico a nivel nacional y comercializar plantas libres de virus de las variedades de interés comercial mencionadas.

## 2. Antecedentes de los postulantes

2.1. Reseña del ejecutor: indicar **brevemente** la historia del ejecutor, cuál es su actividad y cómo éste se relaciona con el proyecto. Describir sus fortalezas en cuanto a la capacidad de gestionar y conducir proyectos de innovación

Tenemos vasta experiencia en gestión de proyectos biotecnológicos del tipo FONDEF, FONDECYT, CORFO, GENOMA, entre otros. Actualmente como empresa tenemos dos proyectos CORFO aprobados, uno para la producción de vides tetraploides y el otro para la generación de naranjas con bajo contenido de glucosa y alta expresión de esteviol. En todos ellos hemos cumplido con todos los aspectos relacionados con la administración financiera y administrativa del proyecto, como también técnica.

2.2. Reseña del o los asociados: indicar **brevemente** la historia de cada uno de los asociados, sus respectivas actividades y cómo estos se relacionan con el ejecutor en el marco del proyecto. Complete un cuadro para cada asociado.

Nombre de Asociado
--------------------

No tenemos asociados.
-----------------------

2.3. Reseña del coordinador del proyecto (completar Anexo 4).

### 2.3.1. Datos de contacto

Nombre completo	María Consuelo Medina Arévalo
Teléfono	
E-mail	

2.3.2. Indicar **brevemente** la formación profesional del coordinador, experiencia laboral y competencias que justifican su rol de coordinador del proyecto.

María Consuelo Medina, representante legal de Johnson y Medina Limitada (AgriJohnson) es Licenciada en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Posee más de 20 años de experiencia en el área de la biología molecular vegetal, el cultivo *in vitro* y regeneración de tejidos vegetales, transformación genética mediada por *Agrobacterium* y Biobalística en distintas especies tales como: *Arabidopsis thaliana*, Cítricos, Pino, Tomate, Manzana, Vid, entre otras.

Participa actualmente como investigadora asociada en proyectos relacionados a virología en Vid, tales como: FONDECYT 11007090 “Efecto de las infecciones virales en la regulación de la biosíntesis de flavonoides mediada por azúcares, por factores de transcripción MYB y el GENOMA 2 CORFO- Innova “Genómica funcional para el estudio de la interacción virus y vides”.

Tiene más de 20 publicaciones en revistas científicas, posee además experiencia en el manejo de plantas en invernadero, mejoramiento genético de vides, aclimatación de plantas, técnicas de biología molecular, detección de virus por Elisa y RT-PCR y clonación de genes y promotores.

Tales características hacen que María Consuelo sea la persona indicada para la coordinación de este proyecto.

### 3. Configuración técnica del proyecto

3.1. **Identificar y describir** claramente el **problema y/u oportunidad** que da origen al proyecto de innovación, incluyendo antecedentes reales que lo respalden.

#### 3.1.1. Problema

Las infecciones virales en vides producen un serio impacto en un menor rendimiento, alteración en el color, sabor y deformación de las bayas, retraso en la maduración, aumento de la sensibilidad a otros patógenos, incompatibilidad con el portainjerto y envejecimiento prematuro de la planta. Las pérdidas productivas 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 utilizadas en Chile como ELISA y RT-PCR simple, son costosas y de baja eficacia.

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 de menor costo para la detección de virus.

Actualmente se utiliza para la detección de virus en cultivos de vides las técnicas de Indexaje Biológico, 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.

El tiempo y reactivos asociados a la realización de RT-PCR de forma individual, hace que esta metodología sea utilizada sólo de forma confirmatoria a ELISA.

La nueva metodología de diagnóstico que generaremos es un método más fiable para la detección de virus en vides, ya que entrega una alta sensibilidad, especificidad y velocidad de detección.

Nuestra metodología ofrece la identificación específica de 18 virus y permite por tanto la generación un banco de germoplasma de variedades comerciales libres de éstos para abastecer a productores y viveristas con plantas de calidad, considerando la poca disponibilidad en el mercado nacional de material vegetal libre de virus con una certificación confiable y detallada.

### 3.1.2. Oportunidad

La secuenciación de los virus que infectan vides, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que logren minimizar las interacciones deficientes de múltiples elementos en una misma reacción de PCR, entre otros, han permitido desarrollar una herramienta para detectar simultáneamente 18 virus diferentes que infectan a la vid en una misma reacción de PCR.

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

En nuestro laboratorio se hizo un análisis funcional de genes involucrados en infección viral (GLRaV-3) y se determinó que ésta 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 utilizada es menor a ELISA. Lo anterior se ve reflejado en la disminución de los costos y una mayor eficiencia. En el laboratorio ya contamos con la metodología para detectar al menos 7 virus de manera simultánea el desafío es llegar a detectar al menos 18 en una misma reacción de RT-PCR.

### 3.2. Describir la solución innovadora que se pretende desarrollar en el proyecto para abordar el problema y/u oportunidad identificado.

Para la detección de virus en vides, frecuentemente se usa el análisis por ELISA. Dentro de las desventajas de esta metodología, se encuentra 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, tal como es la metodología propuesta, posibilita la detección inequívoca de los virus presentes en Chile, con la considerable disminución de los falsos positivos y negativos.

Recientes estudios han demostrado la existencia de infecciones virales simultáneas, las cuales incluyen a los virus GFLV y variantes de éste (Vigne y cols., 2004), GLRaV 1 y GLRaV3 (Little y cols., 2001; Turturo y cols., 2005), GVA (Goszczyński y Jooste, 2003) y GVB (Shi y cols., 2004), También se han descrito infecciones simultáneas en otras especies frutales, como en cítricos

con el virus Citrus tristeza (Ayllón y cols., 2001; Rubio y cols., 2001) y para manzanos, con el virus Apple chlorotic leaf spot (Candresse y cols., 1995).

A raíz de lo anterior es de suma relevancia contar con una metodología que permita la detección simultánea de múltiples virus en muestras de tejido vegetal infectado, y que además disminuya los costos actuales asociados a la detección por ELISA, RT-PCR simple o el uso de plantas indicadoras.

La detección de 18 virus de manera individual tendría un costo altísimo, imposible de pagar por un productor mediano e inclusive grande, considerando además, que se requiere una muestra representativa de al menos el 10 % de las plantas que van a ser llevadas a campo.

Con la implementación 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 plantas que se encuentran en campo, para evaluar su estado fitosanitario. Esto generará un sistema de diagnóstico viral ausente actualmente en el país, tanto para vides como para otros frutales.

La innovación 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.

3.3. **Estado del arte:** Indicar qué existe en Chile y en el extranjero relacionado con la solución innovadora propuesta, indicando las fuentes de información que lo respaldan

3.3.1. En Chile

A consecuencia de la prolongada historia del cultivo, el uso de injertos y la reproducción clonal en 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 RT-PCR simple, debido a la falta de anticuerpos para algunos virus.

Existen otros laboratorios (INIA, Universidad de Chile, Insidegene y SAG) que llevan a cabo la detección viral de la misma forma mencionada anteriormente entregando además un servicio de detección viral a productores y viveros. Los elevados costos asociados a la metodología hacen que la detección de un virus en 100 muestras cueste alrededor de \$ 500.000. (SAG) tal precio varía según la empresa que realiza la detección y la cantidad de muestras y virus a analizar.

Nuestra empresa en asociación con Dr. Francisco Melo, diseñaron mediante herramientas bioinformáticas partidores específicos para 18 virus diferentes que infectan vides, 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 y simultánea de virus en frutales.

### 3.3.2. En el extranjero

Se han utilizado procedimientos para detectar 2 o 3 virus de vid al mismo tiempo (Minafra & Hadidi, 1994, La Notte y cols., 1997 y Nassuth et al, 2000). Por otro lado Dova & Katis (2003) usaron partidores degenerados para detectar virus de los géneros Vitivirus, Foveavirus y Losterovirus en el mismo mix de reacción.

En sudafrica, Faggioli & La Starza (2006) han reportado la detección de 8 virus en una reacción de RT-PCR en un programa de selección sanitaria y en Italia Giorgio Gambino y cols (2006) ha reportado la detección de 9 virus de forma simultánea, señalando que podrían ayudar a reducir costos, y que incluso podrían llegar a reemplazar el uso de técnicas como ELISA o ensayos de indexaje para estos virus.

El USDA (United States Department of Agriculture) asociado a la universidad de California de Davis, que es una de las instituciones responsables en EEUU de generar plantas de vides libre de virus, durante más de 20 años ha aplicado el procedimiento de detección viral, mediante ELISA y recientemente con RT-PCR simple.

Para 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) y el año 2013 en España se ha desarrollado un sistema múltiple para detectar 5 virus simultáneamente, mediante qRT-PCR; aunque aún no se implementa comercialmente (Lopez-Fabuel., 2013).

Sin embargo no se ha desarrollado ningún sistema que detecte lo que nosotros proponemos.

3.4. Indicar si existe alguna **restricción legal** (ambiental, sanitaria u otra) que pueda afectar el desarrollo y/o la implementación de la innovación y una propuesta de cómo abordarla.

3.4.1. Restricción legal

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 virus”, cumplan con las normas específicas de certificación de material de propagación de *Vitis spp.*, establecidas por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) de Chile, la cual fue actualizada en diciembre del año 2013 derogando la resolución N° 2.411, del 2007.

Nuestro sistema de diagnóstico considera los seis virus que el SAG solicita en el control obligatorio de plagas para entregar la certificación de vides libres de virus (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA y GVB) por lo que no tendremos ninguna restricción legal al respecto.

A fin de obtener los 18 virus propuestos en este proyecto, y dado que existe la posibilidad de que alguno de ellos no sea identificado en campo en plantas con sintomatología viral, proponemos la síntesis del fragmento de DNA viral a amplificar. Evitando de esta forma la importación de material vegetal infectado y las restricciones legales que ello conllevaría.

3.4.2. Propuesta de cómo abordar la restricción legal (de existir)

Aunque no tenemos restricciones legales, solicitaremos al SAG que verifique la limpieza viral de nuestras plantas libres de virus.

3.5. **Propiedad intelectual:** indicar si existen derechos de propiedad intelectual (patentes, modelo de utilidad, diseño industrial, marca registrada, denominación de origen e indicación geográfica, derecho de autor, secreto industrial y registro de variedades) **relacionados directamente** con el presente proyecto, que se hayan obtenido en Chile o en el extranjero (marque con una X).

SI		NO	X
----	--	----	---

3.5.1. Si la respuesta anterior es **SI**, indique cuáles.

No existe en la actualidad ningún desarrollo similar en Chile o el extranjero

3.5.2. Declaración de interés: indicar si existe interés por resguardar la propiedad intelectual de la innovación que se desarrolle en el marco del proyecto (marcar con una X).

SI	X	NO	
----	---	----	--

3.5.3. En caso de existir interés especificar quién la protegerá. En caso de compartir el derecho de propiedad intelectual especificar los porcentajes de propiedad previstos.

Nombre institución	% de participación
Como Agrijhonson y Medina Limitada(No estamos seguros si patentaremos o mantendremos en secreto industrial nuestro desarrollo para que éste no sea copiado).	85%
Soluciones Bioinfoemáticas Ltda.	10% del valor de ventas del desarrollo y comercialización del kit o servicios prestados.
Agdia, Inc.	Se ofrecerá a AGDIA un 5% del valor de las ventas por licenciamiento para la producción y comercialización de kits.

3.5.4. Indicar si el ejecutor y/o los asociados cuentan con una política y reglamento de propiedad intelectual (marcar con una X).

SI		NO	X
----	--	----	---

3.6. Mercado directamente relacionado con la innovación propuesta (**responder sólo para bienes privados**)

3.6.1. Demanda: describir y dimensionar la demanda actual y/o potencial de los bienes y/o servicios vinculados al proyecto de innovación.

La superficie nacional utilizada para el cultivo de uva de mesa en Chile al 2011 fue de 53.850 Ha, distribuidas principalmente entre las regiones III y VII. 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. Todos estos viñedos son potenciales clientes, pero la demanda a corto plazo se centra en los lazos establecidos 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 libres 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.

La demanda anual para el INIA de análisis de virus en vid es de aproximadamente 1.500 muestras, en la Universidad de Chile es de aproximadamente 2.400 muestras, y se estima que en laboratorios independientes son unas 3.000 muestras anuales; la demanda potencial por análisis viral utilizando el kit de diagnóstico estará dada por todos los viñedos que actualmente están dispuestos a invertir en calidad de producción.

Se estima que la demanda de plantas libres de virus es de aproximadamente 300.000 ejemplares al año.

3.6.2. Oferta: Describir y dimensionar la oferta actual y/o potencial de los bienes y/o servicios que **compiten** con los con los vinculados proyecto al proyecto de innovación.

Existen en nuestro país laboratorios que realizan el servicio de detección de hasta 9 virus en vides (Bioscan, INIA, SAG entre otros), lo que corresponde a la mitad de detecciones propuestas en nuestra metodología, además de ser más eficaz, económico y confiable. 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 a encontrado algún proveedor de imparta el servicio de detección múltiple, siendo estos de suma importancia.

El costo asociado a diagnosticar virus en vid varía según la Institución que entrega el servicio, la cantidad de muestras y tipos de virus a analizar, por ejemplo: El laboratorio de la facultad de la facultad de Agronomía, de la Universidad de Chile cobra 2,5 UF por muestra de material lignificado (\$58.500 aproximadamente), considera el análisis de 10 virus es decir unos \$5.850 por el análisis de cada virus en cada muestra.

El SAG entrega el servicio de detección viral de 8 virus, cobrando 0,112 UTM por hasta 100 muestras, unos \$4.580 pesos aproximadamente por el análisis de cada virus por muestra. Si el número de muestras a analizar es mayor a 100, el costo asociado a la detección viral por muestra por cada virus es de 0,06 UTM es decir \$2.290 pesos.

Por otro lado el INIA cobra aproximadamente \$7.000 pesos por muestra, lo que incluye el análisis de 4 virus es decir unos \$1.750 pesos por muestra por cada virus, esto considerando el análisis de más de 1.000 muestras. El valor por unidad es de \$37.000 pesos, es decir \$9.250 por cada virus por muestra (tales valores corresponden al año 2009), servicios entregados con la técnica de ELISA.

Los kit de diagnóstico simple disponibles en el mercado corresponden a ELISA, su valor varía según el kit y número de reacciones comprado. Por ejemplo para la detección de sólo un virus el GFLV la empresa AGDIA ofrece un kit de detección para 1.000 muestras por USD 405, mientras que comprar sólo el anticuerpo sale USD 210, la duración de este kit es anual. A estos valores hay que sumar el costo por importación, y el tiempo que demora en llegar.

El vivero San Rafael, ubicado en los Andes, ofrece plantas libres de virus certificadas por Vivero Agro UC, no mencionan de qué virus se encuentra libre su material ni mediante qué técnica fue chequeado; el valor por ejemplar de cualquier variedad es de \$1.050 pesos.

Por otro lado algunas viñas están desarrollando iniciativas para contar con material propio libre de virus, tal es el caso de la Viña Santa Rita quien a desde el año 2006 comenzó un programa que tiene como resultado plantas libres de 7 virus. Se logra inferir por tanto que la infección por virus es una problemática actual que merece una atención y solución eficaz dado la incidencia en la producción.

### 3.8. Objetivos del proyecto

#### 3.8.1. Objetivo general<sup>5</sup>

Desarrollar e Implementar un sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vid y establecer un banco germoplasma libre de virus de distintas variedades de interés comercial.

#### 3.8.2. Objetivos específicos<sup>6</sup>

Nº	Objetivos Específicos (OE)
1	Diseñar y validar una técnica de PCR de detección múltiple y simultánea de 18 virus diferentes en vid, a partir de material vegetal infectado.
2	Establecer un banco de germoplasma de plantas de vid libres de virus de distintas variedades de interés comercial utilizando el sistema de detección múltiple viral.
3	Entregar un servicio de diagnóstico y comercializar kits para la detección múltiple de 18 virus diferentes que infectan a la vid a nivel mundial.
4	Difundir el servicio de detección múltiple viral y las diferentes variedades de vid libres de virus, a nivel de la industria de uva de mesa y vitivinícola nacional.
5	Comercializar plantas libres de virus, a nivel de viñas y viveros.

<sup>5</sup> El objetivo general debe dar respuesta a lo que se quiere lograr con el proyecto. Se expresa con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

<sup>6</sup> Los objetivos específicos constituyen los distintos aspectos que se deben abordar conjuntamente para alcanzar el objetivo general del proyecto. Cada objetivo específico debe conducir a uno o varios resultados. Se expresan con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

3.9. Resultados esperados e indicadores: Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico.

° OE	N° RE	Resultado Esperado <sup>7</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>8</sup>				
			Nombre del indicador <sup>9</sup>	Fórmula de cálculo <sup>10</sup>	Línea base del indicador <sup>11</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>12</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>13</sup>
1	1	Se obtiene el material infectado requerido para el desarrollo del sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vid.	Material infectado con virus.	N° de virus en el material infectado	7	18	Junio 2014
	2	Se logra la detección individual y mediante PCR optimizado de virus diferentes en muestras de tejido infectado	Detección viral individual	N° de virus diferentes detectados individualmente	7	10	Diciembre 2014
					7	18	Julio 2015
	3	Se logra la detección mediante PCR y de manera simultánea de una mayor cantidad de virus diferentes.	Detección simultánea de virus diferentes	N° de virus diferentes detectados simultáneamente	7	10	Septiembre 2015
					7	18	Enero 2016
4	Se establece un control positivo mediante la amplificación y clonación en vector de expresión de fragmentos de todos los virus considerados en el proyecto.	Control positivo de los virus clonados.	N° de fragmentos virales clonados.	0	18	Octubre 2015	

<sup>7</sup> Considerar que el conjunto de resultados esperados debe dar cuenta del logro del objetivo general del proyecto. Uno o más resultados pueden responder a un mismo objetivo específico.

<sup>8</sup> Los indicadores son una medida de control y demuestran que efectivamente se obtuvieron los resultados. Pueden ser tangibles o intangibles. Siempre deben ser: cuantificables, verificables, relevantes, concretos y asociados a un plazo.

<sup>9</sup> Indicar el nombre del indicador en forma sintética.

<sup>10</sup> Expresar el indicador con una fórmula matemática.

<sup>11</sup> Completar con el valor que tiene el indicador al inicio del proyecto.

<sup>12</sup> Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar en el proyecto.

<sup>13</sup> Indicar la fecha en la cual se alcanzará la meta del indicador de resultado.

OE	Nº RE	Resultado Esperado <sup>7</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>8</sup>				
			Nombre del indicador <sup>9</sup>	Fórmula de cálculo <sup>10</sup>	Línea base del indicador <sup>11</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>12</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>13</sup>
2	5	Obtención de variedades de interés comercial libres de virus, incluyendo viníferas y de uva de mesa.	Variedades de vides certificadas libres de virus	Nº de variedades libre de virus	0	3	Abril 2016
					0	6	Junio 2016
	6	Obtención de portainjertos de vides de interés comercial libres de virus	Portainjertos de vides certificados libres de virus	Nº de portainjerto libre de virus	0	2	Junio 2016
	7	Obtención de un Banco de germoplasmas de clones libres de virus para las variedades comerciales de vid y los portainjertos considerados en el proyecto.	Clones certificados libres de virus de variedad Canernet Sauvignon	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus de la variedad Sauvignon Blanc	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus de la variedad Merlot	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus de la variedad Red Globe	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus de la variedad Thompson Seedless	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus de la variedad Crimson Seedless	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
			Clones certificados libres de virus del portainjerto 110 Richter	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016
	Clones certificados libres de virus del portainjerto 110 Richter	Nº de clones libre de virus	0	5	Septiembre 2016		

OE	Nº RE	Resultado Esperado <sup>7</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>8</sup>				
			Nombre del indicador <sup>9</sup>	Fórmula de cálculo <sup>10</sup>	Línea base del indicador <sup>11</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>12</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>13</sup>
3	8	Contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico múltiple viral firmado por la empresa internacional AGDIA	Contrato o acuerdo de transferencia o licenciamiento de kit	Nº de acuerdo o contratos.	0	1	Abril 2014
	9	Detección viral eficaz en muestras de campo infectadas utilizando sistema de detección múltiple viral	Tasa porcentual de detección múltiple viral exitosa en muestras de campo	Nº de muestras infectadas cuyos virus son detectados x 100 / Nº real de muestras infectadas de campo	0	100% (50 muestras)	Mayo 2016
	10	Entrega de un servicio validado de detección múltiple viral a viñedos o viveros.	Servicio de detección viral	Nº de servicios validados	0	1	Agosto 2016
	11	Comercialización del servicio de detección múltiple de 18 virus en vides a viveros y empresas del rubro.	Venta del servicio comercial de detección viral	Nº de contratos o facturas de servicios realizados	0	100	Marzo 2017
	12	Prototipo de kit de diagnóstico múltiple de 18 virus en vid	Kit de diagnóstico múltiple generado	Nº de Kit	0	1	Julio 2016
	13	Comercialización a escala piloto de kits de diagnóstico múltiple de 18 virus en vid	Venta de kits de diagnóstico múltiple	Nº de Kits vendidos	0	15	Marzo 2017

o OE	Nº RE	Resultado Esperado <sup>7</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>8</sup>				
			Nombre del indicador <sup>9</sup>	Fórmula de cálculo <sup>10</sup>	Línea base del indicador <sup>11</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>12</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>13</sup>
4	14	Folleto informativo sobre servicio de detección múltiple viral en vid elaborado	Folleto Informativo	Nº de folletos	0	100	Abril 2016
	15	Difusión del nuevo sistema de detección múltiple viral en vid realizada a viñas o viveros	Visita de campo explicativa a productores.	Nº de Visitas de campo	0	1	Marzo 2016
					0	6	Enero 2017
5	16	Comercialización de plantas madre de distintas variedades o portainjertos certificadas libres de virus.	Venta de plantas certificadas libres de virus	Nº plantas vendidas	0	1	Diciembre 2016
					0	500	Marzo 2017

3.10. Indicar los hitos críticos para el proyecto.

Hitos críticos <sup>14</sup>	Resultado Esperado <sup>15</sup> (RE)	Fecha de cumplimiento (mes y año)
Concretar firma de un contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico múltiple viral entre la empresa internacional AGDIA y Agrijhonson y Medina Limitada	Contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico múltiple viral firmado por la empresa internacional AGDIA	Abril 2014
Recolección de material vegetal con sintomatología viral.	Se obtiene el material infectado requerido para el desarrollo del sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vid (18 virus).	Junio 2014
Avance de estandarización del sistema de detección viral individual.	Se logra la detección individual y mediante PCR de virus diferentes en muestras de tejido infectado (10 virus).	Diciembre 2014
Avance de estandarización del sistema de detección múltiple y simultáneo viral en Vid	Se logra la detección, mediante PCR y de manera simultánea de virus diferentes (10 virus)	Septiembre 2015
Obtención de controles positivos, como fragmento de DNA clonados en vector de expresión para cada uno de los 18 virus seleccionados.	Se establece un control positivo mediante la amplificación y clonación en vector de expresión de fragmentos de todos los virus considerados en el proyecto (18 virus)	Octubre 2015
Identificación de variedades de uva de mesa y/o vinífera de interés comercial libres de virus	Obtención de variedades de interés comercial libres de virus, incluyendo viníferas y de uva de mesa (3 variedades).	Abril 2016

<sup>14</sup> Un hito representa haber conseguido un logro importante en el proyecto, por lo que deben estar asociados a los resultados de éste. El hecho de que el hito suceda, permite que otras tareas puedan llevarse a cabo.

<sup>15</sup> Un hito puede estar asociado a uno o más resultados esperados y/o a resultados intermedios.

Hitos críticos <sup>14</sup>	Resultado Esperado <sup>15</sup> (RE)	Fecha de cumplimiento (mes y año)
Análisis eficaz de plantas de campo que muestren sintomatología viral.	Detección viral eficaz en muestras de campo infectada utilizando sistema de detección múltiple viral.	Mayo 2016
Primera visita de campo a viñedo o vivero especializado.	Difusión del nuevo sistema de detección múltiple viral en vid en visitas de campo realizadas a viñas o viveros.	Marzo 2016
Primer servicio de detección múltiple viral en vid.	Entrega de un servicio validado de detección múltiple viral a viñedos o viveros.	Agosto 2016
Obtención de un prototipo de Kit de diagnóstico viral en vid.	Prototipo de kit de diagnóstico múltiple de 18 virus en vid.	Julio 2016
Venta de las primeras plantas de uva de mesa y/o vinífera libres de virus	Venta de plantas certificadas libres de virus a viñas o viveros (1 planta).	Diciembre 2016

3.11. Método: identificar y describir los procedimientos que se van a utilizar para alcanzar cada uno de los objetivos específicos del proyecto (máximo 8.000 caracteres para cada uno).

**Método objetivo 1: Diseñar y validar una técnica de PCR de detección múltiple y simultánea de 18 virus diferentes en vid, a partir de material vegetal infectado.**

Nuestra metodología se basa en el uso de 19 pares de partidores que específicamente detectan a los virus 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 y Grapevine rootstock stem lesion associated virus, además de la enzima RUBISCO utilizada como control interno de integridad.

Estos partidores tienen en el extremo 5' el fluoróforo fluoresceína, lo que permite que los productos a amplificar sean visualizados por medio de la técnica 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.

Es necesario realizar la optimización del uso de múltiples partidores en una reacción de PCR. Hasta el momento con la detección de 7 virus de forma simultánea, hemos estandarizado parámetros tales como, adición de DMSO, BSA 0.16 mg/ml, Tritón 0.1% y KCl 50mM se espera evaluar el comportamiento de la reacción de amplificación cuando se utilicen los 19 pares de partidores simultáneamente.

Para la detección de los 11 virus restantes es necesario realizar una búsqueda de material infectado en campo la que se llevará a cabo en la parcela experimental de AgriJohnson ubicada en Curacaví o en algún viñedo cercano a la región metropolitana. Para la recolección de las muestras se considerará la sintomatología asociada a cada una de las virosis, se espera identificar 6 plantas con la sintomatología esperada, tomándose al menos 3 réplicas de cada planta y rotulando claramente su procedencia.

La recolección será a final de temporada entre los meses de marzo a mayo, considerando que en esta fecha la sintomatología de las virosis es más evidente. Las muestras recolectadas se mantendrán en frío hasta que sean procesadas para extracción de ARN, seguido de síntesis de cADN, chequeo de integridad de cADN por medio de la amplificación del gen que codifica para la enzima RUBISCO.

Se procederá a detectar cada uno de los 11 virus de forma individual, con partidores específicos, el producto amplificado se clonará y secuenciará para verificar su especificidad y cepa viral.

En el caso de no encontrar algún virus, se procederá a sintetizar un fragmento viral específico que sea amplificado por nuestros partidores.

Con los virus clonados se establecerá un control positivo con el fin de validar esta técnica de diagnóstico, amplificando simultáneamente los 18 virus en una misma en una sola reacción de PCR, los 18 fragmentos amplificados se visualizarán como picks de intensidad de fluorescencia emitida en la electroforesis capilar.

Esta metodología consta de controles internos que descartan ruido entregando por tanto resultados fiables. Se pondrá a prueba nuestra metodología analizando plantas de campo que muestren sintomatología viral.

**Método objetivo 2: Establecer un banco de germoplasma de plantas de vid libres de virus de distintas variedades de interés comercial utilizando el sistema de detección múltiple viral.**

Para establecer el Banco de Germoplasma de plantas de vid libres de virus, se seleccionarán seis variedades de importancia económica para nuestro país, dentro de ellas y utilizadas en la industria vitivinícola con la mayor superficie cultivada, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc y Merlot ; por otro lado, considerando las variedades de uva de mesa con mayor exportación registrada en el periodo Enero-Mayo 2013, se seleccionarán Red Globe, Thompson Seedless y Crimson Seedless.

Además se seleccionaran los portainjertos 110 Richter y Harmony dada su conocida adaptabilidad a distintos ambientes estresantes tales como sequía y salinidad.

De cada una de las variedades y portainjertos escogidos se colectarán al menos 40 estacas juveniles desde campo que se observen asintomáticas, seguido de un proceso de desinfección se procederá a su establecimiento *in vitro*.

Luego de un mes, se espera obtener 15 plantas por variedad y portainjertos, las cuales serán analizadas con la metodología

de detección múltiple de viral, utilizando además el control positivo para los 18 virus.

A las plantas que no presenten reacción PCR múltiple positivo, se solicitará su evaluación y certificación por el SAG. En el caso que no encontremos plantas libres de los 18 virus, se establecerá un sistema de saneamiento viral por termoterapia en aquellas plantas con la menor frecuencia de virus.

De las plantas libres de virus obtenidas se procederá a realizar una replicación *in vitro* (5 clones) para lograr establecer el Banco de Germoplasma. Considerando que este stock madre de plantas libres de virus se mantendrá *in vitro* no hay riesgo de infecciones virales debido que no se encuentran en el medio (MS) los vectores que transmiten las infecciones virales.

Éstas 30 plantas libres de virus se mantendrán con sub-cultivo mensual en medio basal MS. De forma paralela se llevarán a un invernadero cerrado réplicas de cada una de ellas con el fin de mantener un stock de las plantas madres libres de virus de las distintas variedades y portainjertos seleccionados para su comercialización.

El sustrato para las plantas que se encuentren en invernadero será autoclavado y además será tratado con nematicida, para evitar posibles infecciones virales.

Se repetirán análisis de detección viral, de manera periódica, a todas las plantas madres generadas, para garantizar así un material de primer nivel.

**Método objetivo 3: Entregar un servicio de diagnóstico y comercializar kits para la detección múltiple de 18 virus diferentes que infectan a la vid a nivel mundial.**

Los fragmentos clonados y secuenciados, de cada uno de los 18 virus identificados individualmente, serán respaldados en bacterias y almacenados a -20 grados, con el fin de resguardar los controles positivos.

El servicio de detección múltiple viral será acordado en forma directa con el cliente, estableciendo la cantidad de muestras a analizar, considerando los requerimientos de éste último tales como identificar el estado fitosanitario de su viñedo o vivero, etc.

La cantidad de muestras acordadas serán tomadas de forma azarosa, o dirigida según las necesidades del cliente, si éste último lleva sus muestras al laboratorio, se le entregarán bolsas selladas que permitan su correcta rotulación. Es importante considerar que las muestras vegetales, una vez recolectadas, deben permanecer a no más de 4°C, para realizar los procedimientos de extracción de ARN de forma adecuada.

Seguida de la extracción de ARN se sintetizará cADN y se evaluará su integridad, amplificando el gen que codifica para la enzima RUBISCO para tales fines.

Se procederá luego a realizar el PCR múltiple que permite la detección de 18 virus diferentes, en cada muestra, contando además con una muestra de control positivo, control no infectado y un control técnico. Así, tendremos la certeza de que el virus detectado en la muestra problema efectivamente se encuentre.

Tal procedimiento se llevará a cabo para cada una de las muestras solicitadas por el cliente.

Por otro lado, para el desarrollo de un kit comercial de detección múltiple viral es de suma importancia contar con el control positivo generado, ya que será incluido en el prototipo del Kit y debe ser guardado a -20°C.

Se desarrollará un manual con los requerimientos técnicos necesarios para llevar a cabo la detección, tales como Termociclador, reactivos para la realización de un RT-PCR, electroforesis capilar e indicaciones de cómo utilizar los reactivos que irán con el kit de diagnóstico.

Si el cliente no tiene acceso a la metodología de electroforesis capilar, y para que este parámetro no sea un impedimento se implementará la visualización de la detección viral en un gel de agarosa al 4%.

Es decir un mismo kit comercial servirá para ambas metodologías, previa realización de modificaciones en la cantidad de partidores utilizados por reacción: para una muestra a analizar se harán dos reacciones de PCR múltiple cada una con la detección de 9 virus más en control interno de la enzima RUBISCO.

Los partidores contenidos en el Kit serán rotulados como Grupo I y Grupo II, clasificados así acorde al tamaño del amplificado

para la correcta visualización en un Gel de Agarosa.

Entonces el Kit como prototipo será una caja de 20x 20 cm que contiene 19 pares de partidores liofilizados (rotulados GI 1-10 y GII 11-20) un instructivo utilización y explicación de qué virus se puede detectar con cada partidador, además del control positivo que debe ser guardado a -20.

Se evaluará además la posible transferencia o acuerdo de licenciamiento del kit de detección viral a otras empresas nacionales o internacionales para su masificación (AGDIA Inc.).

**Método objetivo 4: Difundir el servicio de detección múltiple viral y las diferentes variedades de vid libres de virus, a nivel de la industria de uva de mesa y vitivinícola nacional.**

Para la difusión del servicio de detección múltiple viral en vid se utilizarán los contactos establecidos durante los 15 años de experiencia en el rubro de la fitopatología de vides en Chile.

Además se desarrollarán folletos informativos de la técnica de diagnóstico, una vez que validado el sistema, éstos incluirán información sobre los 18 virus a detectar, tiempo estimado del resultado y costos asociados al servicio. Los folletos serán entregados personalmente en viñas y viveros, también se publicarán artículos en revistas electrónicas relacionadas con el sector agrícola y fitosanitario tales como Red-Agrícola y Revista El Campo, entre otras.

Por otro lado se realizarán visitas de campo explicativas sobre este nuevo sistema de detección viral en viñas y viveros a definir, logrando así captar así nuevos clientes. Ofreceremos además nuestro servicio al Consorcio de la Fruta con quienes trabajamos en otros proyectos y a la viña Concha y Toro.

La difusión del Banco de Germoplasma de plantas de vid libres de 18 virus, se realizará de forma paralela al sistema de diagnóstico.

**Método objetivo 5: Comercializar plantas libres de virus, a nivel de viñas y viveros.**

La venta de variedades libres de virus se realizará en forma directa. Se espera obtener una cartera de clientes que haga la solicitud de plantas certificadas libres de 18 virus con anticipación. A partir del stock de invernadero se replicarán las plantas necesarias de las variedades viníferas, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Merlot y de uva de mesa, Red Globe, Thompson Seedless y Crimson Seedless.

Cada planta llevará una etiqueta con el nombre de la empresa Johnson y Medina Limitada (AgriJohnson), mostrando que se encuentra libre de 18 virus y además certificada por el SAG libre de 6 virus. En cada entrega de material vegetal libre de virus, se le indicará al productor o viñedo las medidas que puede realizar para prevenir futuras infecciones virales.

El valor de cada planta libre de virus será el equivalente a un 50% del costo asociado a comprarla en la UC Davis, EE UU (90 dólares por Estaca).

3.12. Carta Gantt: Indicar las actividades a llevar a cabo en el proyecto, asociándolas a los objetivos específicos y resultados esperados e indicando su secuencia cronológica.

N° OE	N° RE	N° AC	Actividades	Año 2014											
				Trimestre											
				Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic		
3	8	1	Concretar contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico viral múltiple con la empresa internacional AGDIA				x								
1	1	2	Búsqueda de material infectado, en stock de plantas con virus o por sintomatología en campo				x	x	x						
1	1	3	Procesamiento de material infectado, extracción de ARN, síntesis de cADN y chequeo de integridad de cADN					x	x	x					
1	2	4	Amplificación individual de 10 virus diferentes por RT-PCR										x	x	x
													x	x	x

N° OE	N° RE	N° AC	Actividades	Año 2015											
				Trimestre											
				Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic		
1	2	5	Amplificación individual de 18 virus diferentes por RT-PCR	x	x	x	x	x	x	x					
1	3	6	Amplificación simultánea de 10 virus diferentes por RT-PCR							x	x	x			
1	3	7	Amplificación simultánea de 18 virus diferentes por RT-PCR										x	x	x
1	4	8	Amplificar y clonar en vector de expresión fragmentos virales correspondientes a 18 virus. Estableciendo un control positivo.							x	x	x	x		
2	5	9	Recolección de material vegetal de las variedades seleccionadas desde campo											x	x
2	5	10	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas de las distintas variedades												x
2	6	11	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas de dos portainjertos												x

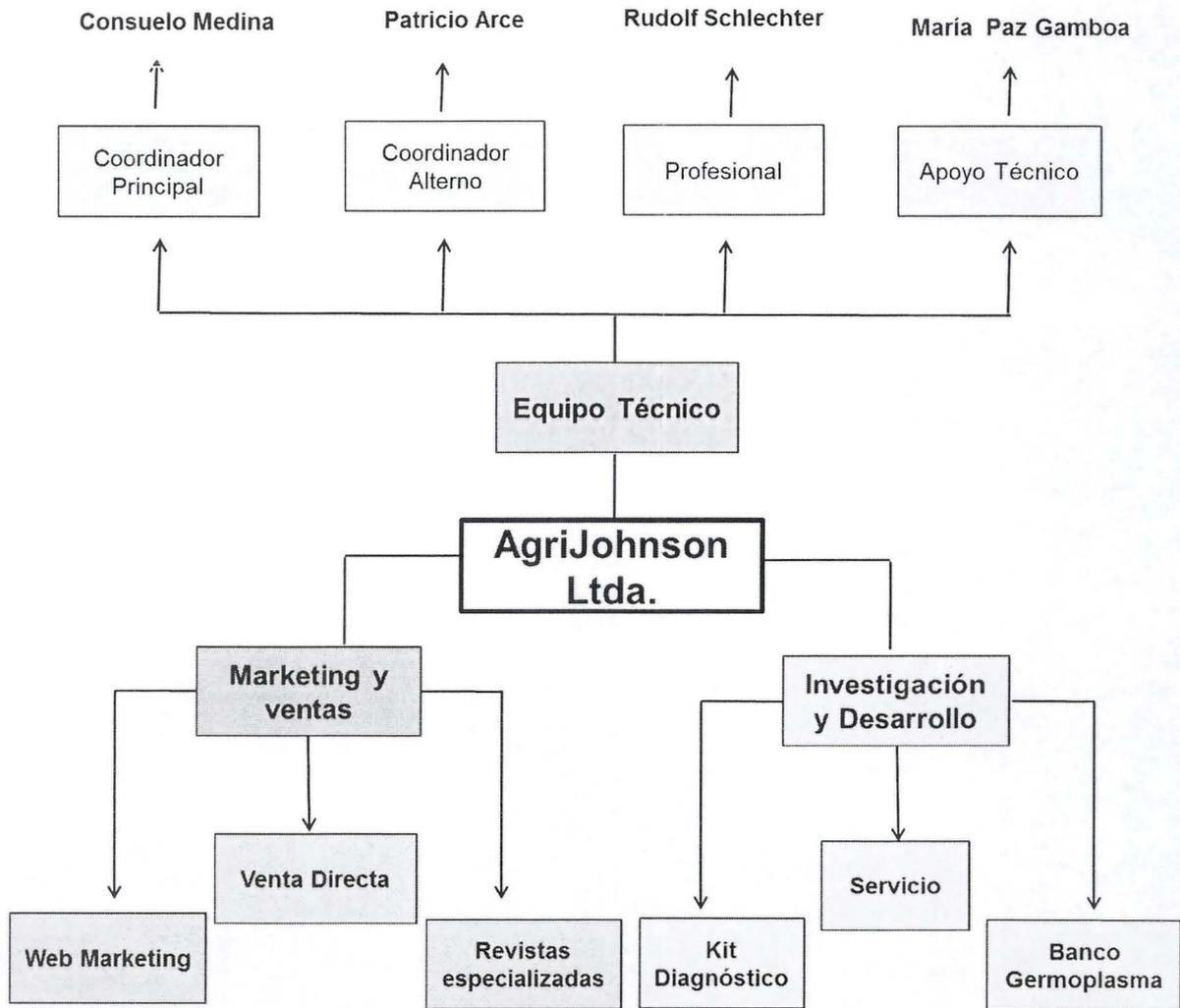
Nº OE	Nº RE	Nº AC	Actividades	Año 2016												Año 2017				
				Trimestre												Trimestre				
				Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic			Ene	Feb	Mar		
1	3	7	Amplificación simultánea de 18 virus diferentes por RT-PCR	x																
2	5	9	Recolección de material vegetal de las variedades seleccionadas desde campo	x																
2	5	10	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas de las distintas variedades	x	x															
2	6	11	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas de dos portainjertos	x	x															
2	5	12	Análisis de plantas de distintas variedades seleccionadas con sistema de diagnóstico validado	x	x	x	x	x	x											
2	6	13	Análisis de plantas de portainjertos seleccionadas con sistema de diagnóstico validado	x	x	x	x	x	x											
2	7	14	Replicación de plantas libres de virus, de las distintas variedades y portainjertos seleccionadas.						x	x	x	x								
3	9	15	Detección viral en muestras de campo visiblemente infectadas		x	x	x	x												
3	10	16	Detección viral en muestras de clientes utilizando metodología de detección.					x	x	x	x									
3	12	17	Generación de un prototipo de kit de diagnóstico múltiple de virus en vid		x	x	x	x	x	x										
3	11	18	Venta del servicio comercial de detección viral											x	x	x	x	x	x	x
3	13	19	Comercializar a escala piloto kits de diagnóstico múltiple de virus en vid								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	14	20	Generación y entrega de folletos informativos sobre técnica de diagnóstico	x	x	x	x													
4	15	21	Explicación de metodología de detección desarrollada en visitas de campo.			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
5	16	22	Venta de variedades y portainjertos viníferas libres de virus.											x	x	x	x	x	x	x

### 3.13. Actividades de difusión programadas

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
05/2015	Parcela Curacaví	Charla explicativa	15-30	Productores de uva de mesa y viníferas	Correo electrónico
09/2015	Viña Valle de Casa Blanca	Visita de Campo	20-30	Productores de uva de mesa y viníferas	Correo electrónico
05/2016	Viña en Valle San Fernando	Visita de Campo	40-50	Productores de uvas viníferas	Correo electrónico
09/2016	Viña Santa Rita	Visita de Campo	15-30	Productores de Vino	Correo electrónico
05/2017	Viña Concha y Toro	Visita de Campo	15-30	Productores de uvas viníferas	Correo electrónico
09/2017	Parcela Curacaví	Charla de Divulgación	40-50	Productores de uva de mesa y viníferas	Revista del Campo

## 4. Organización

### 4.1. Organigrama del proyecto



4.2. Describir claramente la función de los participantes en la ejecución del proyecto

Nombre entidad	Función en la ejecución del proyecto
Ejecutor	Johnson y Medina Limitada (AgriJohnson) realizará las funciones de Coordinación, administración, Gestión comercial y protección de la propiedad intelectual generada en el proyecto.

4.3. Describir las responsabilidades del equipo técnico en la ejecución del proyecto, utilizar el siguiente cuadro como referencia para definir los cargos. Además, completar los Anexos 4 y 5.

1	Coordinador principal
2	Coordinador alternativo
3	Profesional <sup>16</sup>
4	Profesional de apoyo y técnico <sup>17</sup>
<5	Mano de obra

Nº cargo	Nombre integrante equipo técnico	Formación/Profesión	Empleador	Describir claramente la función en el proyecto
1	María Consuelo Medina Arévalo	Licenciada en Biología	Johnson Medina Limitada y	Encargada de la coordinación y administración del proyecto. Entrega de Informes y difusión.
2	Jorge Patricio Arce Johnson	Dr. En Ciencias Mención Ingeniería Genética Vegetal	Johnson Medina Limitada y	Participación del desarrollo técnico del proyecto, gestión comercial y protección de la propiedad Intelectual a implementar
3	Rudolf Schlechter	Licenciado en Bioquímica	Johnson Medina Limitada y	Análisis de resultados de técnica electroforesis capilar. Preparación de Informe de resultados.
4	Por definir (NN)	Bioquímico, Biólogo	Johnson Medina Limitada y	Apoyo procesamiento de muestras y manejo de equipo de técnica electroforesis capilar.
4	María Paz Gamboa	Técnico Agrícola	Johnson Medina Limitada y	Recolección y procesamiento de muestras, adquisición de insumos, cultivo in vitro de vid.

<sup>16</sup> Personal que forma parte del equipo técnico principal del proyecto.

<sup>17</sup> Personal administrativo y técnico que no conforma el equipo principal del proyecto.

Si corresponde, indique las actividades del proyecto que serán realizadas por terceros<sup>18</sup>.

Actividad	Nombre de la persona o empresa a contratar
Análisis de Laboratorio: contramuestra ELISA.	Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)
Análisis foliar de laboratorio nutrición mineral.	Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)
Análisis histológicos de tejidos vegetales.	Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)

---

<sup>18</sup> Se entiende por terceros quienes no forman parte del equipo técnico del proyecto.

## 5. Modelo de negocio (responder sólo para bienes privados)

5.1. Elaborar el modelo de negocio que permita insertar en el mercado los bienes y/o servicios vinculados al proyecto de innovación.

Para elaborar el modelo de negocio, responda las siguientes preguntas:

¿De quién será el negocio que deriva del proyecto de innovación? (máximo 600 caracteres)
El negocio principal será de nuestra empresa quien dará el servicio de detección de virus a productores, viveros y empresarios del rubro en Chile. También pretendemos licenciar a terceros en el extranjero específicamente en USA la producción y comercialización del kit de diagnóstico múltiple. Adicionalmente generaremos plantas libres de virus las que comercializaremos.
¿Quiénes son los clientes? (máximo 600 caracteres)
Los principales clientes son los productores de uva de vino y mesa del país. También productores de plantas, es decir grandes viveros del país.
¿Cuál es la propuesta de valor? (máximo 1.000 caracteres)
Los beneficios ofrecidos en nuestro proyecto, permiten aminorar los costos asociados a la detección individual de virus, además de que el consumidor podrá conocer el estado fitosanitarios de sus plantas. Incluso podrá adquirir plantas libres de virus de las seis variedades con mayor relevancia comercial en nuestro país.
¿Cuáles son los canales de distribución? (máximo 600 caracteres)
Canal de distribución directo desde la empresa a los productores del rubro en Chile, con siderando el servicio de detección múltiple viral y la venta de plantas libres de virus. Para la distribución en USA lo haremos mediante un acuerdo con la empresa AGDIA. Con ella estamos acordando el servicio de detección viral utilizando el kit desarrollado por nosotros para lo cual, se firmará un acuerdo en dos etapas. Inicialmente tendremos un acuerdo de participación e interés en el kit que terminaremos de desarrollar en el marco de este proyecto. Una vez desarrollado y evaluado la funcionalidad del Kit, firmaremos el acuerdo comercial de uso en USA del mismo. De este modo AGDIA comercializará en USA el Kit desarrollado por nosotros. Para ello, nosotros les enviaremos el listado de partidores utilizados, les transferiremos el protocolo de extracción de ácidos nucleicos de vides y además las condiciones de amplificación y verificación por electroforesis capilar. Así AGDIA evaluará en sus dependencias y con material vegetal colectado en USA la validez del kit desarrollado.
¿Cómo será la relación con los clientes? (máximo 1.000 caracteres)
Estamos conectados a la industria de la fruta específicamente a ASOEX, Productores de uva y el Consorcio del Vino y los Consorcios de la fruta. El proyecto de mejoramiento genético de vides de ASOEX se desarrolla en dependencias de Johnson y Medina Limitada, por ello podremos en terreno realizar los análisis de detección viral cuando corresponda. También al consorcio y otras empresas viveros y productores,

nosotros les venderemos plantas libres de virus y plantas madres. No está en la estrategia comercial de Johnson y Medina Ltda, la venta del kit a otros usuarios nacionales.

¿Cómo se generarán los ingresos? (máximo 1.000 caracteres)

Por venta de servicios de detección de virus principalmente, venta de plantas madres libres de virus y venta de kits de diagnóstico múltiple.

¿Quiénes serán los proveedores? (máximo 600 caracteres)

Nos autoabasteceremos a partir de material propio del banco de germoplasma. Para la reacción de PCR nos proveeremos de productos de BIOSCAN S.A con quienes obtenemos precios preferenciales para los insumos de biología molecular. Para el desarrollo del kit los primers los sintetizaremos en Invitrogen USA empresa que además de las secuencias nucleotídicas los marca con el fluoróforo FAM en el extremo 3' para su resolución mediante electroforesis capilar.

¿Cómo se generarán los costos del negocio? (máximo 1.000 caracteres)

Los costos son los gastos asociados con la detección de virus, producción de plantas y personal asociado a ello.

En general en casi todas las actividades comerciales hay un margen de un 100% es decir el doble del costo de producción es el precio por venta de plantas. En la venta de plantas madres el margen es de un poco superior dado que hay economía de escala y es un material muy escaso en el país que se utilizará para generar más plantas. En la tabla 6 indicadores de impacto se define más precisamente los costos del proyecto.

## 6. Indicadores de impacto

6.1. Seleccionar el o los indicadores de impacto que apliquen al proyecto y completar el siguiente cuadro:

Selección de indicador <sup>19</sup>	Indicador	Descripción del indicador <sup>20</sup>	Fórmula de indicador	Línea base del indicador <sup>21</sup>	Meta del indicador al término del proyecto <sup>22</sup>	Meta del indicador a los 3 años de finalizado el proyecto <sup>23</sup>
X	Ventas	Ventas de plantas madres de vid libres de virus	\$/año	0	\$12.500.000 (500 plantas)	\$ 50.000.000 25.000 plantas
X	Ventas	Servicio Detección de virus	\$/año	0	\$6.000.000 (100 servicios)	\$60.000.000 (1.000 servicios)
X	Ventas	KIT de diagnóstico múltiple	\$/año	0	\$ 10.687.500 (15 kits)	53.437.500 (75 kits)
X	Costos	Plantas madres de vides certificadas libres de virus	\$/unidad	45.000/ unidad	15.000/unidad	15.000/unidad
X	Costos	Servicio Detección de 18 virus	\$/unidad	6.000/muestra	2.500/ muestra	2.500/muestra
X	Costos	KIT de diagnóstico para 18 virus	\$/unidad	No existe	437.000/kit	437.000/kit
	Empleo		Jornadas hombre/año	0	852	1420

- El valor de cada planta libre de virus corresponde a 25.000 pesos, el cual corresponde a un 50 % menos del valor en USA.

- El valor de un kit de detección viral corresponde a 1500 USD, considerar que un kit de detección

<sup>19</sup> Marque con una X, el o los indicadores a medir en el proyecto.

<sup>20</sup> Señale para el indicador seleccionado, lo que específicamente se medirá en el proyecto.

<sup>21</sup> Completar con el valor que tiene el indicador al inicio del proyecto.

<sup>22</sup> Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al final del proyecto.

<sup>23</sup> Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al cabo de 3 años de finalizado el proyecto.

por ELISA para un virus y con una duración de un año tiene un valor de 405 USD.

- Indicador empleo refleja las jornadas hombre/año de tres trabajadores, luego aumentan dado la contratación de dos más

## 8. Anexos

### Anexo 1. Cuantificación e identificación de beneficiarios directos<sup>24</sup> de la iniciativa

Género	Masculino		Femenino		Subtotal
	Pueblo Originario	Sin Clasificar	Pueblo Originario	Sin Clasificar	
Productor micro-pequeño	0	3		2	5
Productor mediano-grande	0	10		0	10
Subtotal	13		2		15
Total					15

<sup>24</sup> Se entiende por beneficiarios directos quienes reciben los recursos del proyecto y/o se apropian de los resultados de este. Estos pueden ser empresas del sector agroalimentario y forestal u otros.

**Anexo 2.** Ficha identificación del postulante ejecutor

Nombre completo o razón social	Johnson y Medina Limitada	
Giro / Actividad	Biotecnología y Fitopatología Agrícola y Forestal	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	X
	Personas naturales	
	Universidades	
	Otras (especificar)	
Banco y número de cuenta corriente del postulante ejecutor para depósito de aportes FIA		
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores	3	
Usuario INDAP (sí / no)	No	
Dirección postal (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax	-	
Teléfono celular	-	
Email		
Dirección Web	-	
Nombre completo representante legal	María Consuelo Medina Arévalo	
RUT del representante legal		
Profesión del representante legal	Licenciada en Ciencias Biológicas.	
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Coordinador y Administrador del proyecto	
Firma representante legal		

**Anexo 3.** Ficha identificación de los asociados: no participa ningún asociado

**Anexo 4.** Ficha identificación coordinador y equipo técnico. Esta ficha debe ser llenada por el coordinador y por cada uno de los profesionales del equipo técnico.

**Coordinador principal de proyecto**

Nombre completo	María Consuelo Medina Arévalo
RUT	
Profesión	Lic. Cs. Biológicas
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Jhonson y Medina Limitada
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Investigador Adjunto
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	-
Teléfono celular	
Email	
Firma	

### Coordinador Alterno

Nombre completo	Jorge Patricio Arce Johnson
RUT	
Profesión	Dr. En Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Johnson y Medina Limitada
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor Asociado
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	-
Teléfono celular	
Email	
Firma	

### Profesional del equipo técnico

Nombre completo	Rudolf Otto Schlechter Stecher
RUT	
Profesión	Licenciado en Bioquímica
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Jhonson y Medina Limitada
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Asistente de Investigación
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	-
Teléfono celular	
Email	
Firma	

## Anexo 5. Currículum vitae de los integrantes del equipo técnico

Presentar el currículum vitae de cada profesional integrante del equipo técnico que no cumpla una función de apoyo. El mismo **debe presentarse en el siguiente formato y no debe superar las 2 hojas**.

CURRICULUM VITAE	
<b>IDENTIFICACIÓN POSTULANTE</b>	
Apellido paterno:	Medina
Apellido materno:	Arévalo
Nombres:	María Consuelo
Correo electrónico personal:	
Teléfono particular (casa, celular):	
<b>TÍTULOS PROFESIONALES</b>	
Título profesional: Licenciatura en ciencias biológicas.	1987 Pontificia Universidad Católica de Chile
<b>POST TITULO / OTROS</b>	
Titulo (Indicar sólo aquellos con certificados).	Ingreso (mm,aaaa)
	Egreso (mm,aaaa)
	Fecha de Título (dd,mm,aaaa)
	Duración (número de semestres)
	Institución
<b>CAPACITACIÓN (en los últimos 5 años y que tengan relación con su rol en el proyecto)</b>	
<b>EXPERIENCIA LABORAL (Indicar todas las instituciones en las que se desempeñó en los últimos 10 años)</b>	
Cargo: Investigador Asociado	Institución o Empresa: Pontificia Universidad Católica
	Área de desempeño: Biología molecular Vegetal, Transformación genética de plantas y cultivo In-Vitro.
	Desde: 2008
	Hasta: Actual.
<b>Principales Funciones: Investigador Asociado y Administración de Proyectos.</b>	
<b>OTROS</b>	
Idiomas (Indicar nivel de dominio –básico, intermedio, avanzado- en idioma hablado y escrito) :	Inglés, Avanzado. Francés: Intermedio.
Manejo de Herramientas Computacionales (Indicar nivel de dominio):	Manejo de Office Intermedio.

CURRICULUM VITAE	
<b>IDENTIFICACIÓN POSTULANTE</b>	
Apellido paterno:	Arce
Apellido materno:	Johnson
Nombres:	Jorge Patricio
Correo electrónico personal:	
Teléfono particular (casa, celular):	
<b>TÍTULOS PROFESIONALES</b>	
Título profesional:	1982
Profesor de Ciencias Naturales y Biología	Pontificia Universidad Católica de Chile
Licenciado en Ciencias biológicas	1984, Pontificia Universidad Católica.
<b>POST TITULO / OTROS</b>	
Dr. En Ciencias mención ingeniería Genética de plantas	Ingreso (mm,1990)
	Egreso (mm,1994)
	Fecha de Título (dd,mm,1994 )
	Duración (8 semestres)
	CINVESTAV- Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, México
<b>CAPACITACIÓN (en los últimos 5 años y que tengan relación con su rol en el proyecto)</b>	
Nombre curso o seminario:	Institución o Empresa:
<b>EXPERIENCIA LABORAL (Indicar todas las instituciones en las que se desempeñó en los últimos 10 años)</b>	
Cargo: Profesor Asociado	Institución o Empresa: Pontificia Universidad Católica.
	Área de desempeño: Virología Molecular Vegetal. Transformación de Plantas y Genómica Vegetal en Vides.
	Desde: 2008
	Hasta: Actual.
<b>Principales Funciones: Profesor Asociado e investigador.</b>	
<b>OTROS</b>	
Idiomas (Indicar nivel de dominio –básico, intermedio, avanzado- en idioma hablado y escrito) :	Inglés Avanzado
Manejo de Herramientas Computacionales (Indicar nivel de dominio):	Office Nivel Intermedio

