

INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	Johnson y Medina Limitada (Agrijohnson Ltda.)
Giro	Biotechnología y Fitopatología Agrícola y Forestal
Rut	
Representante Legal	María Consuelo Medina Arévalo

NOMBRE DEL PROYECTO: GENERACIÓN Y DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA LA DETECCIÓN MÚLTIPLE DE VIRUS EN VIDES

CODIGO: PYT-2014-0040

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: 1 Abril 2014 - 30 Abril 2017

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	María Consuelo Medina Arévalo
Rut	
Firma	

OFICINA DE PARTES 2 FIA RECEPCIONADO 06 FEB 2018
Fecha
Hora 10:46
Nº Ingreso 46829

I. RESUMEN EJECUTIVO

La industria del vino y la producción de uva de mesa de alta calidad se ven enfrentados a diversos problemas fitosanitarios durante el crecimiento de las plantas y la producción de fruta en los viñedos y parronales. Entre ellos, las enfermedades virales retardan la maduración de la fruta bajando el contenido de azúcar y aumentando la acidez, causan disminución en la producción y pueden inducir problemas de incompatibilidad de injertos. Los virus se propagan por agentes biológicos o de manera mecánica según su tipo, y la manera de combatirlos es la prevención.

En este contexto, la detección viral y la producción de plantas libres de virus son de gran importancia. El proyecto "Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides" bajo el código PYT-2014-040 consistió en el desarrollo e implementación de un sistema de detección múltiple y simultáneo de 15 virus diferentes que infectan a las vides y de la generación de un Banco de Germoplasma de variedades y portainjertos de vid libre de virus.

Durante el desarrollo del proyecto logramos la amplificación múltiple y simultánea de 14 virus aunque podemos detectar en forma separada los 15 virus que infectan la vid, de los cuales 8 son cuarentenarios y por tanto su análisis es requerido por el Servicio Agrícola y Ganadero en el material vegetal de importación. Con el desarrollo del proyecto, logramos validar un sistema de detección de virus que aminora los costos en comparación a las técnicas actuales de diagnóstico individual para cada uno de los virus ya sea mediante ELISA y/o RT-PCR convencional. Durante la ejecución del proyecto, a partir de los genomas virales, se diseñaron partidores para la amplificación de 15 virus mediante RT-PCR y se estandarizaron las condiciones de amplificación. El proyecto permitió a la empresa adquirir un secuenciador ABI PRISM 310 que facilita la detección confiable de la presencia viral mediante electroforesis capilar, lo que permite ofrecer el servicio de detección viral a productores y viveristas.

Durante el desarrollo del proyecto se aplicó el sistema de detección múltiple viral a plantas de diferentes variedades de campo, e invernadero. De este modo se validó el sistema de detección y además se seleccionaron variedades libres de virus para establecer un banco de germoplasma de plantas libres de virus. El proyecto permitió también la construcción de invernaderos para la propagación de material libre de virus, el cual será ofrecido a productores de uva de vino y mesa y viveros del país supliendo la falta de plantas certificadas para sanidad viral que actualmente existe en el país

II. TEXTO PRINCIPAL

1. RESUMEN PROYECTO

Las enfermedades virales son una causa principal de alteración de la calidad de la fruta y disminución de la productividad en viñedos y parronales. La presencia de virus causa retardo y desincronización de la maduración, disminución del color en las bayas tintas, disminución en la acumulación de azúcares y aumento de la acidez. El enrollamiento de las hojas, clorosis, rechazo de injertos y envejecimiento de las parras son también síntomas de enfermedades virales. Las infecciones virales son transmisibles por multiplicación vegetativa, de modo que se han masificado durante prácticas de propagación clonal de material infectado. Las plantas pueden además infectarse en el campo, por la infección vectores biológicos como nematodos o insectos. Debido a que no existen tratamientos para estas enfermedades, la detección temprana de virosis es fundamental para prevenir su trasmisión.

Actualmente el diagnóstico de enfermedades virales en la vid se realiza por ELISA, indexaje biológico y RT-PCR simple. Estas técnicas son costosas, poco específicas y no logran detectar concentraciones bajas de virus en material vegetal infectado. Además, es común que coexista más de un virus en un viñedo y que esté presente más de una infección en una planta de vid. Los síntomas son generales y no permiten asignar un virus específico causante de la enfermedad.

La secuenciación de los virus que infectan vides, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que simulen interacciones moleculares nos permitió proponer el desarrollo de una herramienta molecular para el diagnóstico por RT-PCR múltiple de 15 virus que infectan la vid. La electroforesis capilar, por otro lado, es una técnica que permite la identificación de fragmentos de manera clara, al utilizar partidores marcados con un fluoróforo. Es por ello, que el objetivo principal de nuestro proyecto PYT-2014-0040 fue el desarrollo de un sistema de detección múltiple y simultánea de los 15 diferentes virus que infectan a las vides mediante visualización por electroforesis capilar: GLRaV-1 (*Grapevine Leafroll associated Virus-1*), GLRaV-2 (*Grapevine Leafroll associated Virus-2*), GLRaV-3 (*Grapevine Leafroll associated Virus-3*), GLRaV-4 (*Grapevine Leafroll associated Virus-4*), GLRaV-7 (*Grapevine Leafroll associated Virus-7*), GVA (*Grapevine Virus A*), GVB (*Grapevine Virus B*), GFkV (*Grapevine Fleck Virus*), GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), RSPaV (*Rupestris Stem Pitting-associated Virus*), ArMV (*Arabis Mosaic Virus*), GLRaV (*Grapevine Leafroll associated Virus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*) y SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*).

Como primer paso, se amplificaron, clonaron y secuenciaron fragmentos virales a partir de plantas infectadas con 11 diferentes virus. Para los 4 virus restantes se recurrió a las bases de datos disponibles de genomas virales. De este modo se diseñaron 2 vectores que contienen la totalidad de las secuencias para 15 virus y constituyen el control positivo de la herramienta de diagnóstico. Se diseñaron partidores que amplifican fragmentos diferenciables por tamaño para cada uno de los virus. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción, hasta obtener

amplificación eficiente de 14 virus de manera múltiple y simultánea visualizados mediante electroforesis capilar utilizando partidores marcados. Por otro lado, la correcta visualización de los fragmentos virales en un gel de agarosa se logró para los 15 virus por separado, los 15 virus en 2 grupos de partidores (8 partidores y 7 partidores de manera simultánea, denominados Grupo SAG y Grupo Otros, respectivamente).

Posteriormente se ensayó el sistema de detección múltiple viral con muestras de campo e invernadero, logrando identificar plantas infectadas y plantas sanas. Se validó el sistema de detección ofreciendo el servicio de detección de virus a productores de uva de chicha del Valle de Curacaví.

La aplicación del sistema de diagnóstico viral permitió identificar plantas libres de virus con el cual se estableció un banco de germoplasma. Se cuenta con plantas libres de virus de variedades de uva de mesa Thompson Seedless, Red Globe y Melissa, variedades de vino Sauvignon Blanc, Merlot, Cabernet Franc, Chardonnay, Tintorera y País y portainjertos 110 Richter, Freedom, Harmony, Salt Creek. Durante el proyecto también se desarrolló y aplicó un procedimiento para el saneamiento de plantas infectadas que combina el cultivo de yemas con la aplicación de un agente químico, Ribavirina. El proyecto permitió la construcción de invernaderos para la propagación de material libre de virus permitiendo a la empresa ofrecer a productores y viveristas el servicio de saneamiento de plantas de variedades o clones importantes para la industria del vino o de la uva de mesa

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo principal del proyecto “Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides” consta en desarrollar e implementar un sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vid y establecer un Banco de Germoplasma libre de virus de distintas variedades de vid de interés comercial.

2.1. Objetivos específicos y resultados obtenidos

El proyecto “Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides” cuenta con 5 objetivos específicos determinados en la siguiente tabla:

Nº OE	Descripción del OE y Resultado Obtenido	% de Avance
1	<p>OBJETIVO: Diseñar y validar una técnica de PCR de detección múltiple y simultánea de 15 virus diferentes en vid, a partir de material vegetal infectado.</p> <p>RESULTADO: Se diseñó una herramienta de detección múltiple viral para 15 virus que infectan vides a partir de material infectado o con la información disponible en bases de datos para genomas virales. Se logra visualizar 14 virus en forma múltiple y simultánea y 15 virus en reacciones separadas. La técnica se validó analizando controles positivos y muestras vegetales de campo.</p>	98%
2	<p>OBJETIVO: 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.</p> <p>RESULTADO: Se estableció un banco de germoplasma de variedades de uva de mesa, uvas de vino y portainjertos libres de virus. La ausencia de virus en las variedades de vid y portainjertos se verificó con el sistema de detección múltiple de virus desarrollado a partir del Objetivo Específico 1.</p>	92%
3	<p>OBJETIVO: Entregar un servicio de diagnóstico y comercializar kits para la detección múltiple de 15 virus diferentes que infectan a la vid a nivel mundial.</p> <p>RESULTADO: Se entrega servicio de diagnóstico viral a productores de uva para vino y chicha. Se diseñó un prototipo de kit de diagnóstico viral para los 14 virus en forma simultánea (15 Virus en reacciones separadas) y un kit para los 8 virus requeridos por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).</p> <p>BRECHA: Se entregó un servicio gratuito de detección viral a productores. Se firmó un acuerdo de licenciamiento con Torre Verde</p>	49%

	Ltda. para comercializar los 4 servicios y productos derivados del proyecto: 1) Servicio de detección múltiple viral; 2) Venta de plantas libre de virus 3) Venta de Kit de detección múltiple viral 4) Saneamiento <i>in vitro</i> de plantas de vid infectadas. Mientras que contamos con una carta de interés por parte de AGDIA inc. sobre el kit de detección desarrollado.	
4	<p>OBJETIVO 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.</p> <p>RESULTADO: Se realizaron Charlas de Difusión a viñas, agricultores y viveristas. Se entregaron folletos informativos y se diseñó una página web para difundir los servicios de detección, saneamiento <i>in vitro</i> de virus, venta de kits y venta de plantas libres de virus.</p>	91.5%
5	<p>OBJETIVO: Comercializar plantas libres de virus, a nivel de viñas y viveros.</p> <p>RESULTADO: Se vendieron plantas de vid libres de virus a través de la empresa Torre Verde Ltda. que cuenta con giro comercial.</p>	100%

2.2. Impactos obtenidos

El desarrollo de este proyecto permitió generar una herramienta de detección para virus en vides que es más eficiente y económica que los sistemas de diagnóstico que existen actualmente, ya que permite detectar 15 virus de manera múltiple (14 en forma simultánea).

Igualmente, se generó un producto de interés para la industria de la uva de mesa. Debido al ingreso recurrente de nuevas variedades de esta tipología de vid al país, se elaboró un kit de diagnóstico específico para la detección de 8 virus cuarentenarios, que son de diagnóstico negativo obligatorio para permitir el ingreso de plantas de vid en el territorio nacional.

El proyecto permitió la compra de un secuenciador ABI PRISM – 310 para el análisis de la presencia de virus en las muestras de vid, permitiendo que la empresa pueda realizar el diagnóstico en vides y posteriormente ampliarlo a otras especies.

Durante el desarrollo del proyecto se conformó un Banco de germoplasma que incluye plantas de vid de mesa, de variedades de vino y portainjertos libres de virus. Una de las estrategias implementadas para alcanzar tal propósito, fue la aclimatación *in vitro* de plantas sanas y la implementación de metodologías de saneamiento de plantas infectadas con virus. El tratamiento implementado consiste en técnicas de embriogénesis somática y tratamiento con el antiviral ribavirina *in vitro*.

La empresa aportó al proyecto con la construcción de invernaderos con climatización para la producción de plantas. Estos serán utilizados para la propagación de material libre de virus.

La empresa, sus servicios y el apoyo de FIA para conseguirlos, se han dado a conocer mediante actividades de difusión como charlas informativas, distribución de folletos y página web.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS

3.1 Aspectos metodológicos detallados según objetivo

OBJETIVO ESPECIFICO 1: Diseñar y validar una técnica de PCR de detección múltiple y simultánea de 15 virus diferentes en vid, a partir de material vegetal infectado

1) Amplificación de fragmentos virales y síntesis de control positivo

Metodología efectiva: El primer objetivo consiste en diseño y desarrollo de un sistema de detección de manera múltiple y simultánea de los 15 diferentes virus que infectan a las vides: GLRaV-1 (*Grapevine Leafroll associated Virus-1*), GLRaV-2 (*Grapevine Leafroll associated Virus-2*), GLRaV-3 (*Grapevine Leafroll associated Virus-3*), GLRaV-4 (*Grapevine Leafroll associated Virus-4*), GLRaV-7 (*Grapevine Leafroll associated Virus-7*), GVA (*Grapevine Virus A*), GVB (*Grapevine Virus B*), GFkV (*Grapevine Fleck Virus*), GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), RSPaV (*Rupestris Stem Pitting-associated Virus*), ArMV (*Arabis Mosaic Virus*), GLRaV (*Grapevine Leafroll associated Virus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*) y SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*). Para ello, la propuesta original consideró la amplificación de los virus a partir de plantas infectadas, mediante la recolección de material en campo. Se utilizaron partidores específicos para la amplificación de los virus, lográndose la amplificación de 11 virus a partir de muestras infectadas de campo y muestras proporcionadas por el SAG (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GRkV, GFLV, ToRSV, RSPaV).

Problema	Adaptaciones y soluciones
<p>Dentro de las plantas analizadas, no se encontraron los 4 virus: ArMV, GRSLaV, TRSV, SLRSV, lo que corrobora su baja incidencia y ausencia de reporte en Chile.</p> <p>La mantención y multiplicación de plantas infectadas resulta lenta, dado el estado poco vigoroso de las plantas.</p>	<p>Se decidió hacer una búsqueda informática y síntesis de las 4 secuencias virales faltantes. Para mejorar la calidad y reproducibilidad del ensayo, evitando la dependencia de muestras infectadas, se clonaron y secuenciaron los fragmentos amplificados. Se sintetizaron 2 vectores de expresión con las secuencias virales que se usaron en lo adelante como controles positivos. El control positivo 1 contiene los fragmentos virales identificados a partir de material vegetal infectado, mientras que para el control positivo 2 se debió recurrir a las secuencias de ArMV, GRSLaV, TRSV y SRSV disponibles en las bases de datos genómicas (NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i>). La síntesis del control positivo se realizó con la empresa Epoch Life Science.</p>

2) Condiciones para la amplificación simultánea de múltiples virus

Metodología efectiva: Las condiciones de amplificación múltiple se definieron en reacciones de amplificación utilizando los controles positivos y los partidores diseñados y marcados al extremo 5' con el fluoróforo fluoresceína, permitiendo así la visualización de los productos de amplificación por electroforesis capilar. Se probaron diferentes condiciones de amplificación, comenzando por amplificaciones por grupos de virus y detección en geles de agarosa al 2,5%. Se obtuvieron resultados satisfactorios para la amplificación individual de 15 virus con la adición de BSA (0,16 mg/ml), DMSO, Tritón (0,1%) y KCl (50 mM). A su vez, la visualización de los fragmentos virales amplificados fue confirmada por electroforesis capilar en secuenciador ABI PRISM 310.

Problemas	Adaptaciones y Soluciones
Durante el desarrollo del proyecto se verificó que la secuencia genómica inicialmente reportada como virus GLRaV-8 no corresponde a un fragmento viral, sino que es una secuencia que forma parte del genoma mitocondrial de la vid. Así mismo, los virus inicialmente clasificados como GLRaV-5 y 6, fueron clasificados como cepas del virus GLRaV-4.	Dados los avances en la correcta identificación de las secuencias inicialmente reportadas como virus de vid, el mayor cambio metodológico fue la disminución de 18 a 15 virus a identificar. Esta modificación fue incluida en el plan operativo
Dificultades para la detección simultánea de los virus GVA y GFLV debido a similitud en los tamaños de amplificación.	Se modificó la secuencia de los partidores virales de GVA y GFLV para una mejor detección en material vegetal infectado. Esto generó un cambio en el tamaño del amplificado sin generar ajustes al proyecto. De acuerdo con el objetivo inicial de este proyecto, se recomienda la utilización de la electroforesis capilar por sobre la electroforesis en gel de agarosa visualización de los fragmentos.
Durante la lectura de amplificación con electroforesis capilar, se identificaron algunas discrepancias en el tamaño de secuencia de ToRSV y SLRSV.	Se debió disminuir de 2 nucleótidos el fragmento esperado de ToRSV a 417 bp, lo que no altera de ningún modo la identificación de los virus. Esto debido a que existe la posibilidad de pequeñas variaciones del amplificado por variaciones normales de los aislados virales. Para la visualización del virus SLRSV se disminuyó el tamaño del fragmento a 320 bp.

Dificultad en la detección de 15 fragmentos en forma simultánea.	En una reacción simultánea, se logra la detección de 14 fragmentos mediante visualización por electroforesis capilar. En caso de visualizar los 15 fragmentos en gel de agarosa, se recomienda realizar 2 reacciones de PCR con 8 y 7 partidores respectivamente.
--	---

OBJETIVO ESPECIFICO 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

1) Identificación de variedades y portainjertos libres de virus

Metodología efectiva: Se realizó un muestreo de plantas de campo de variedades de vino, de uva de mesa y portainjertos. Se realizaron los análisis de detección múltiple viral detectando variedades libres de virus, las que fueron introducidas y propagadas *in vitro*.

Para ello se requiere la recolección del material durante el periodo de crecimiento vegetativo, lo que se realizó sin dificultades.

Problemas	Adaptaciones y soluciones
En algunos casos, las variedades muestreadas resultaron positivas a algún virus.	Se realizó introducción <i>in vitro</i> de las plantas de las variedades comprometidas e infectadas. Se buscaron alternativas de saneamiento viral como tratamientos químicos (Ribavirina) combinado con cultivo de yemas. Para ello, luego del establecimiento <i>in vitro</i> de las plantas, se subcultivaron las yemas tomando explantes de 1 a 2 mm en medio con Ribavirina 100mg/L. Se desarrollaron plantas completas en el medio con antiviral, y una vez que alcanzaron un tamaño mayor a 7 cm, se repitió el procedimiento, cultivando las yemas de 1 a 2 mm en medio con Ribavirina 50mg/L. Una vez que las plantas alcanzaron un tamaño mayor a 7 cm, se cultivaron nuevamente en medio MS basal. Se corroboró la ausencia de virus con el sistema de detección múltiple viral.

2) Mantenimiento y multiplicación de plantas libres de virus

Metodología efectiva: La propagación *in vitro* es una herramienta efectiva y útil para la mantención del material libre de virus. Las plantas libres de virus se mantienen *in vitro* en medio de cultivo MS con adición de hormonas y en cámaras climáticas con las condiciones de temperatura y luz controladas. La propagación del material vegetal se realiza subcultivando

explantas en medios nuevos cada 2 meses. Las plantas se pueden aclimatar en invernadero para su crecimiento posterior en el campo.

Problemas	Adaptaciones y soluciones
No detectados	No fueron necesarias

OBJETIVO ESPECIFICO 3: Entregar un servicio de diagnóstico y comercializar kits para la detección múltiple de 15 virus diferentes que infectan a la vid a nivel mundial.

1) Desarrollo de kit de detección múltiple viral

Metodología efectiva: Se optimizaron las condiciones de amplificación logrando detectar 14 virus en forma simultánea. Para ello, se consideraron distintas diluciones del control positivo, de los partidores y de $MgCl_2$.

Se generaron dos prototipos de kit de detección múltiple viral, uno para 15 virus y otro para los 8 virus considerados como cuarentenarios por el SAG. Cada uno cuenta con un manual técnico e informativo, una Master Mix que incluye el Buffer 10x, $MgCl_2$ (50 mM) dNTPs (10 mM), BSA (0,16 mg/ml), DMSO, Tritón (1%), KCl (50 mM), Taq polimerasa; un Control interno que amplifica para el gen de la RUBISCO (487 bp), Agua desionizada y los pares de partidores respectivos a cada Kit de detección.

Paralelamente, para la validación del kit de detección se analizaron muestras de campo con el sistema de detección múltiple y con el servicio de análisis viral del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Para tal, se consideraron muestras de terreno de 2 variedades viníferas, 2 uvas de mesa y 3 portainjertos de vides. El análisis realizado con el sistema de detección múltiple consideró la amplificación múltiple de 14 virus de forma múltiple y simultánea y visualizados mediante electroforesis capilar. Además, solicitamos realizar análisis virales por el laboratorio Agrícola Lo Aguirre del SAG, lo que consideró la detección individual de 7 virus diferentes (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, ToRSV y GFLV).

Para el empaquetamiento del prototipo de kit de detección se diseñó un bosquejo de producto final: una caja de aproximadamente 20x20 cm con los pares de partidores en tubos liofilizados y rotulados con el nombre en acrónimo, los dos controles positivos (1 y 2) y el instructivo de uso. El desarrollo del empaquetamiento del prototipo de kit de detección múltiple no se logró en el tiempo estipulado debido a un atraso de la validación del kit. La estrategia para su introducción al mercado fue a mediante la consultora InnoScience Group a cargo de Sebastián Melin. Se realizó un estudio de mercado y evaluación económica para el ingreso al mercado de los 4 servicios ofrecidos por Agrijohnson Ltda, dentro de ellos la venta de kit de detección múltiple viral.

Problemas	Adaptaciones y soluciones
Es difícil la detección inequívoca de 15 virus en una sola reacción múltiple y simultánea en gel de agarosa.	Para una mejor visualización en gel de agarosa de los 15 fragmentos virales de tamaños similares, se diseñaron 2 reacciones de PCR con 8 y 7 partidores respectivamente Se logró detección múltiple y simultánea de los 14 virus mediante electroforesis capilar.
Empaquetamiento del prototipo de kit de detección múltiple	Se postulará a un proyecto CORFO prototipo que permita realizar el empaquetamiento de este desarrollo.

2) Servicio de diagnóstico

Metodología efectiva: Se entregó un servicio gratuito de detección múltiple viral a 2 productores de vino localizados en el Valle de Curacaví durante noviembre 2016. Se tomaron muestras de distintas variedades viníferas de campo con las siguientes características: 10 hojas por muestra, de tamaño mediano (aprox. 5 – 8 cm), de un estado fenológico entre floración y maduración, con un estado sanitario de las muestras visiblemente sanas o muestras con evidente sintomatología (enrollamiento y/o enrojecimiento de hojas). El período muestreo: entre Febrero – Mayo. Se consideraron estos criterios ya que existe una mayor prevalencia de virosis. Las muestras se conservaron en frío hasta su procesamiento en laboratorio. El análisis viral de dichas plantas de campo se realizó con el sistema de detección múltiple no simultánea para los 15 virus y los resultados fueron observados mediante gel de agarosa y electroforesis capilar. Los resultados fueron expuestos durante la charla de difusión con los productores de Chicha del Valle de Curacaví.

Para este nuevo desarrollo a la fecha no se ha realizado una encuesta de usabilidad del kit. Sin embargo, su precio es competitivo pues en una sola reacción se detectan todos los virus solicitados por el SAG lo que según la competencia requieren detectarse en forma individual por lo que su precio debe también multiplicarse por el número de virus a detectar. Un antecedente muy relevante es que el SAG ese año 2018, dejará de hacer detecciones de patógenos en sus dependencias y cerrará el servicio en la estación cuarentenaria Lo Aguirre. Los servicios SAG tanto para detección de patógenos como para cuarentena serán externalizados a empresas cuyo precio será estándar para diferentes patógenos y oferentes. Nuestra empresa Johnson y Medina Ltda. construyó dependencias para cuarentena tipo 2 (ex vitro) las que complementan las dependencias tipo 3 (in vitro) que ya tenía en gran parte al proyecto FIA. Gracias a este esfuerzo somos la única empresa en Chile que podrá a partir de Mayo cuando esta legislación opere dar este servicio de cuarentena según la nueva reglamentación. Parte de nuestro personal de la empresa está haciendo los cursos para ser reconocidos como contrapartes SAG, según la nueva normativa que inicia en Marzo de este año. Adicionalmente estamos haciendo las gestiones para que nuestros servicios de detección de virus y otros patógenos sean incorporados como oferentes al precio estándar definido por SAG por lo que todos los oferentes deberemos cobrar lo mismo según la nueva reglamentación y los usuarios elegirán su proveedor de servicios. En la actualidad fecha Nuestras nuevas

dependencias serán inauguradas el próximo mes y nuestra proyección basada en las solicitudes de servicios que nos están haciendo, es que en el corto plazo seremos el principal laboratorio dedicado a detección de patógenos de plantas en el país.

El proyecto no contempló encuestas u otro tipo de obtención de información referente a su uso. Sin embargo, su precio es competitivo a nivel comercial en el país.

Problema	Adaptaciones y soluciones
Johnson y Medina Limitada cuenta con giro para asesorías y desarrollo de tecnológicas, por lo que no puede directamente vender servicios y kits de detección múltiple.	Se entregó un servicio de detección múltiple viral gratuito a los productores del Valle de Curacaví concomitante a las actividades de Difusión. Se estableció un acuerdo de licenciamiento con la empresa Torre Verde Limitada, la cual cuenta con giro comercial. Se realizó transferencia de la tecnología de detección múltiple viral.

OBJETIVO ESPECIFICO 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

Metodología efectiva:

Se contactó a la Municipalidad de Curacaví que facilitó la lista de contactos de productores y viveristas de la zona quienes fueron invitados (8 productores y 5 viveristas) a una charla de difusión en dependencias de Agrijohnson Ltda.

Se contactó a dos grandes viñas: Santa Rita en Linderos, y Concha y Toro en Talca con las que se acordó realizar Charlas de difusión informativas en sus dependencias, las que fueron realizadas en 2016 y 2017. El medio de comunicación con la viña Santa Rita y Concha y Toro fue mediante teléfono y correo electrónico y ambas viñas se encargaron de difundir la invitación entre los trabajadores y viveristas estratégicos. Durante las charlas, se hizo entrega de los folletos informativos (1-2 por persona) y la difusión se realizó mediante presentación con diapositivas exponiendo la situación actual de las virosis en vides, el sistema de detección múltiple desarrollado y futuras proyecciones a nivel comercial del kit.

A nivel internacional, se realizó contacto académico con la Universidad de Cornell y se acordó realizar un curso práctico internacional de detección viral en dependencias de Agrijohnson en enero 2018. El curso contempló la participación de 15 alumnos de pregrado post grado del área biológica, ciencias vegetales, pre-medicina y pre-médicos veterinarios con previos programas de introducción a la biología molecular, cursos de español y reseña de Chile bajo un contexto vitivinícola.

Se diseñaron folletos informativos (100 folletos impresos) explicando la problemática actual de las virosis en las vides, los objetivos principales del proyecto, el posicionamiento de nuestro sistema de diagnóstico preventivo de virus y la generación de un Banco de Germoplasma de distintas variedades de vid libre de virus.

Se ha trabajado en el posicionamiento a nivel nacional e internacional de nuestro sistema de detección múltiple viral a través de la creación de una página web. En ella, damos a conocer el sistema de detección y los productos derivados del proyecto, tales como la venta del servicio de detección múltiple viral, la venta de plantas madres libres de virus de diferentes variedades de vid, la venta de Kit de detección múltiple viral y el servicio de saneamiento de virus de plantas de vid.

Problemas	Adaptaciones y soluciones
Necesidad de ampliar la difusión de los servicios de detección y multiplicación de plantas libres de virus	Se decidió contemplar dentro de los métodos de difusión la creación de la página web para divulgar el proyecto, los productos y servicios derivados de este. Adicionalmente se crearon tarjetas de presentación para ser entregadas en las visitas de campo, congresos o seminarios.

OBJETIVO 5: Comercializar plantas libres de virus, a nivel de viñas y viveros.

1) Obtención de plantas libres de virus

Metodología efectiva: Se generaron plantas libres de virus mediante las técnicas de embriogénesis somática, tratamiento químico con Ribavirina y propagación *in vitro* de aquellas plantas identificadas como negativas a 15 virus. Las plantas seleccionadas se propagan en forma masiva mediante cultivo *in vitro*.

2) Comercialización de plantas libres de virus

Metodología efectiva: Para la comercialización de plantas libres de virus se consideró entregar los trípticos informativos desarrollados durante el proyecto, tarjetas de contacto y difusión de la página web (<http://www.agrijohnson.cl/inicio/>) entre los contactos de Agrijohnson Ltda. que incluyen a Gerentes y Directores I+D+i de viñas productoras (15) y viveristas (9) del sector. La oferta propuesta a productores y viveristas han sido dos: 1) Venta de plantas (variedades viníferas, uva de mesa y portainjerto) libres de virus y 2) Saneamiento de plantas de vid de variedades viníferas, uva de mesa y portinjerto. La venta de plantas se puede solicitar mediante la página web (sección "Productos" y "Contactos"), por teléfono o directamente en las dependencias de Agrijohnson Ltda (Curacavi). Se comercializaron plantas libres de virus de la variedad Thompson Seedless (3 plantas) y de portainjerto 110Richter (2 plantas) a través de la empresa Torreverde Ltda. después de realizar el contrato de transferencia.

Problemas	Adaptaciones y soluciones
La empresa Johnson y Medina Limitada tiene un giro principal de Asesorías y Desarrollo de proyectos de investigación, por lo que la venta de plantas no se ajusta a su giro.	Se firmó un contrato de transferencia de los productos generados en el proyecto con la empresa Torre Verde Limitada, quien cuenta con el giro comercial. Por lo tanto, Torre Verde Ltda. se encargará de la comercialización de las plantas libres de virus.

3.2 Adaptaciones o modificaciones

Una de las modificaciones más relevantes del proyecto resultó ser la disminución de 18 a los 15 virus a detectar con nuestro sistema de detección múltiple viral. Esta diferencia se debió principalmente a los virus considerados al inicio del proyecto, tales como GLRaV-8 el cual resultó ser parte del genoma de la vid (**Anexo 20**) y los virus GLRaV-5 y GRLaV-6, considerados cepa del virus GRLaV-4. A su vez, para prevenir contaminación cruzada durante la preparación de las muestras, se decidió trabajar sin el control positivo, con reactivos de buena calidad (Invitrogen) y material con filtro estéril. Para asegurar que el material vegetal se encuentra integro, se utilizó un control interno que amplifica para la RUBISCO.

Durante la lectura de amplificación con electroforesis capilar, se identificaron algunas discrepancias en el tamaño de secuencia, siendo el caso de ToRSV y SLRSV (**Anexo 3, figura j y figura o**). Para el virus ToRSV se debió disminuir de 2 nucleótidos, mientras que para SLRSV se disminuyó el tamaño del fragmento a 320 bp. Estos cambios no generan problemas al momento de identificar los virus ya que corresponden a pequeñas y normales modificaciones de los aislados virales. Por otro lado, se modificaron las secuencias de los partidores de GVA y GFLV para mejorar la detección en el material vegetal infectado.

En vez de generar un control positivo con todos los fragmentos virales, se establecieron dos controles: el 'Control positivo 1' con los 11 fragmentos virales: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFKV, GFLV, ToRSV, RSPaV (**Anexo 5, panel A**) aislados y clonados a partir de material vegetal infectado y el 'Control positivo 2' con 4 fragmentos virales: ArMV, GRSLaV, TRSV, SLRSV (**Anexo 5, panel B**) no identificados a partir de material vegetal. Para este último caso, se atribuye la baja incidencia de estos virus o a la ausencia de ellos en las vides, por lo que se decidió utilizar las secuencias disponibles en los bancos de datos de genomas virales.

Originalmente se propuso establecer *in vitro* material vegetal negativo a la presencia de virus. Sin embargo, considerando la antigüedad de alguna de las plantas analizadas, encontramos mayoritariamente material infectado con los virus más comunes (GLRaV-2 y GLRaV3) (**Anexo 11**). Para asegurar la obtención de plantas libre de virus, es que se decidió optar por la técnica de embriogénesis somática (**Anexo 10, panel A**) la cual asegura la obtención de embriones *in vitro* libre de virus y por ende la generación de plantas limpias. Por otro lado, se consideró la

quimioterapia con el antiviral Ribavirina (**Anexo 10, panel B**), en donde se establecieron ápices meristemáticos de plantas *in vitro* en un medio con el compuesto antiviral. Se realizaron dos ciclos con Ribavirina (100 mg/L y 50 mg/L), luego las plantas fueron trasplantadas a medio MS y se dejaron crecer para corroborar la ausencia de virus con el sistema de detección múltiple viral desarrollado en el proyecto (**Anexo 9, panel C, figura h**).

Se diseñaron dos versiones de prototipo de kit de diagnóstico (**Anexo 14**): el Kit "SAG" en grado de detectar de manera múltiple los 8 virus requeridos por el SAG, y el Kit "15 virus" para la detección múltiple los 15 virus propuestos en el proyecto. Además, optamos por incluir una única solución de los pares de partidores no liofilizados, facilitando la preparación de la reacción de amplificación. Por lo tanto, los Kits deberán ser mantenidos en frío a -20 °C.

Según Plan Operativo inicial, se consideró la difusión a través del desarrollo de folletos informativos y charlas explicativas con los productores de vino y uva de mesa y viveros. Sin embargo, consideramos la creación de una página web (**Anexo 19, panel A**) de acceso público para dar a conocer nuestro sistema de detección, los servicios y productos ofrecidos por Agrijohnson Ltda.

3.3 Protocolos y Métodos utilizados

Toma de muestras

Se tomó muestras considerando un pool de 10 hojas de vid por variedad (vinífera, uva de mesa o portainjerto) totalmente expandidas y de tamaño medio (aprox. 5 – 8 cm), estado fenológico de la planta: floración y maduración y con sintomatología viral como acumulación de antocianinas, enrojecimiento con venación verde, clorosis y/o enrollamiento foliar. Las plantas de campo se muestrearon en distintas localidades y predios de Chile (Valle de Casablanca, Valle de Curacavi, Valle Miraflores, zona de Los Andes) y fueron rotuladas para mantener la trazabilidad. La sintomatología viral es más evidente entre febrero y abril, por lo que se prefiere muestrear en este período del año. Para la toma de muestra de plantas *in vitro* se realizó en campana de flujo laminar para mantener la condición de esterilidad. Las muestras fueron mantenidas en frío (4 °C) por máximo 2 semanas para evitar que los metabolitos secundarios, presentes en el tejido vegetal, alteren el estado sanitario y fisiológico de las plantas. Posteriormente, se procesaron para la extracción del RNA total.

Extracción de RNA total

El material muestreado se pulverizó con la ayuda de mortero estéril y nitrógeno líquido. Posteriormente se procedió con la extracción de RNA total utilizando el protocolo de extracción descrito por Gambino (2014). Para tal, se pesó 200 mg de material vegetal pulverizado en tubos estériles (2 ml) en pesa analítica y agregando 800 ul de buffer CTAB con 16 ul de beta-mercaptoetanol precalentados a 65 °C. Los tubos se incubaron a 65 °C por 10 minutos, vortexando cada 3 minutos. Posteriormente, se agregó 800 ul de una solución de cloroformo isoamilico (24:1) vortexeando vigorosamente y centrifugando a 4 °C por 10 minutos a 11.000 x

g. Posteriormente se recuperó la fase sobrenadante en otro tubo estéril (1,5 ml) y se volvió a realizar el paso previo con el tubo con el tejido vegetal (tubo 2 ml). Luego, se agregó un volumen 0,5 de Cloruro de litio 10 M al tubo de 1.5 ml, mezclando por inversión e incubando en hielo por 30 – 60 minutos. Para rescatar el material genómico en forma de pellet, se centrifugó a 4 °C por 30 minutos a 21.000 x g y se agregó 500 ul de solución SSTE precalentado a 65 °C y vortexeado. Adicionalmente, se agregó 500 ul de cloroformo isoamílico (24:1), mezclando vigorosamente y centrifugando a 4 °C por 10 minutos a 11.000 x g. Luego, se recuperó la fase acuosa en un tubo estéril (1,5 ml) y se agregó un volumen 0,7 de isopropanol (a -20 °C) y volumen 0,1 de acetato de sodio 3 M pH 5.2, mezclando por inversión y centrifugación a 4 °C por 20 minutos a 21.000 x g. Finalmente, se agregó 500 ul de etanol al 70% (a -20 °C) y centrifugó a 4 °C por 5 minutos a 21.000 x g y se removió delicadamente el etanol. Se repitió este paso 2 veces hasta evaporar completamente el etanol del tubo, se agregó 20 ul de agua DEPC y se mezcló por inversión. La concentración e integridad de RNA se midió tomando 1 ul de solución en el NanoDrop-2000 para luego proceder con la síntesis del cDNA. Para ello, se realizó un ensayo de DNasa (Promega) para eliminar la presencia de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante: adición de 2 ug de ARN, 1 ul Buffer 10x, 2 ul DNasa RQ1 (100 U) y H₂O DEPC hasta un volumen de 10 ul e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego agregar 2 ul de buffer EDTA (25 mM) e incubación a 65 °C por 10 minutos para inhibir la enzima DNasa. Las muestras se pueden mantener a -20 °C o en hielo si se continúa con la síntesis de ADNc (retrotranscripción) utilizando la enzima Superscript II (Invitrogen): se realizan dos Mix, el Mix A (1 ul H₂O DEPC, 1 ul random primers (150 ng/ul) y 1 ul dNTPs) se agrega al tubo con el ARN total y tratado con la DNasa y se incuba a 65 °C por 5 minutos para luego mantener en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se agrega al tubo el Mix B (4 ul Buffer 5X RT, 2,5 ul DTT (01, M) y 0,5 Superscript II) y se incuba en el termociclador a 42 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos, 4 °C ∞ y luego a -20 °C. La integridad del cDNA se corroboró por medio de la amplificación del gen que codifica para la Actina (500 bp) y visualización en gel de agarosa al 2,5% utilizando un marcador de peso molecular de 100 bp. Una vez que las muestras resultan positivas al chequeo de integridad, se procedió con la amplificación múltiple de los 15 virus.

Clonación de fragmentos virales

Los virus identificados a partir de material infectado fueron clonados en vector de clonación (pCR®2.1-TOPO®) en células de *Escherichia coli* y luego secuenciados para verificar su especificidad y cepa viral. Para los virus no identificados a partir de plantas infectadas se procedió a utilizar las secuencias disponibles en los bancos de datos virales (NCBI). Con los virus clonados se establecieron dos Controles positivos, con 11 fragmentos y 4 fragmentos respectivamente, y permitiendo por lo tanto la amplificación 14 de los 15 virus en una misma reacción de PCR. En todos los análisis de diagnóstico se utilizó un control interno que amplifica para la RUBISCO para verificar la correcta amplificación.

Detección múltiple viral

Para llevar a cabo correctamente la amplificación múltiple viral se agregó 2 ul de cDNA de muestra, 14.4 ul de Master Mix, 0.5 ul de Control interno, 2 ul de cada uno de los partidores y agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 50 ul.

Para la amplificación múltiple viral de los 8 virus cuarentenarios se agregó 2 ul de cDNA de muestra, 8,7 ul de Master Mix, 0.5 ul de Control interno, 2 ul de cada uno de los partidores y agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 30 ul.

El volumen de reacción de los partidores fue determinado a 2 ul en modo que la concentración final en la reacción de amplificación se mantenga como se muestra en la siguiente tabla:

Virus	Concentración (nM)	Virus	Concentración (nM)
GLRaV-1	400	GfKV	720
GLRaV-2	480	GFLV	1400
GLRaV-3	640	ToRSV	880
GLRaV-4	400	RSPaV	1400
GLRaV-7	400	ArMV	480
GVA	600	GRSLaV	400
GVB	600	TRSV	640
		SLRSV	720

Para la reacción de amplificación se procedió con el siguiente programa: 95 °C por 5 minutos, repetir 30 ciclo a 95 °C por 35 segundos, 60°C por 1 minuto, y luego a 72 °C por 10 minutos.

Los resultados se visualizaron inicialmente por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% - 3% con buffer 6x de carga adicionado Gel Red™ (Biotum), utilizando el marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR o *Ladder 1 KB Plus* de New England Biolabs © Inc. Sucesivamente, para la visualización por electroforesis capilar, se incubaron los productos de amplificación con formamida a 95 °C por 2 minutos y se analizaron en el secuenciador. Se utilizó un marcador de peso molecular GeneScan-500-LIZ.

Los partidores se marcaron al extremo 5' con fluoresceína lo que permitió la visualización por electroforesis capilar. Esto no interfiere si la visualización se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa.

Saneamiento de plantas

Los virus se mueven entre las células vegetales a través de los plasmodesmos. Estas estructuras no están completamente desarrolladas en los meristemas, por lo que estas zonas se mantienen libres de virus. Por lo anterior, para sanear plantas, se introdujeron *in vitro* 10

esquejes (plantas) infectados para cada variedad considerada. Estos se hicieron crecer en medio MS a mitad de concentración con carbón activado. Una vez establecidas las plantas, se aislaron yemas y zonas del meristema de aproximadamente 1-2 mm. los que se cultivaron en un medio de quimioterapia que consiste en el medio MS anterior adicionando 0.5 mg/L Benciladenina y 100 mg/L del antiviral Ribavirina. Una vez que se desarrollaron plantas en este medio, se cultivaron nuevamente pequeños explantes de yemas de 1-2 mm en un medio con una segunda dosis de Ribavirina 50 mg/L. Una vez alcanzado los aprox. 5 – 7 cm de altura, se muestrearon 10 hojas para cada una de 10 plantas establecidas por variedad, bajo condiciones estériles en campanas de flujo laminar y se realizó el análisis múltiple para 15 virus de manera múltiple (visualización en electroforesis capilar) y en grupos de 3 partidores (visualización en gel de agarosa) para verificar la ausencia de infección viral.

Para el establecimiento de plantas libres de virus mediante embriogénesis somática se tomaron 30 - 40 yemas de 2 cm por variedad, se cultivaron en medio de inducción de callo PIV (Sales N&N, Vitamina MS, 6% sacarosa, 0,3% Gelzan, 4,5 uM 2,4-D y 8,9 uM BA, pH 5.8) y se mantuvieron a 26 °C por 3 meses a la oscuridad. Posteriormente, se transfirieron solo las yemas que generaron callos (~80%) a medio de proliferación G1SCA (Sales N&N, Vitamina MS, 6% sacarosa, 1% Bactoagar, 0,25% carbón activado, 10 uM NOA, 20 uM IAA y 1 uM BA, pH 5.8) y se mantuvieron en oscuridad a 28 °C por aproximadamente 4 - 8 semanas. Luego se traspasó el 90% de los callos embriogénicos por variedad a medio de germinación MG1 y se mantuvieron a luz tenue hasta alcanzar la etapa torpedo del desarrollo. Finalmente, se traspasaron 10 – 15 embriones (etapa torpedo) a medio MG2 para el desarrollo final y luego a medio MS/2 para el desarrollo final de la planta (Goussard y colbs., 2017; Gambino y colb., 2007).

Establecimiento de banco de germoplasma libre de virus

El establecimiento del Banco de Germoplasma de variedades de vid libre de virus se implementó a partir de plantas que resultaron libres de virus luego del análisis. Las variedades muestreadas en el campo que resultaron libres de virus con nuestro sistema de detección, fueron desinfectadas por 10 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% y 20 ul de tween-20, para luego introducir estacas *in vitro* para su propagación.

Las variedades y portainjertos cultivados *in vitro*, que resultaron negativas a la presencia de virus se mantuvieron *in vitro* bajo condiciones de temperatura y luz controlada. Se consideraron 10 – 15 explantes por variedad en cada ciclo de propagación y se continuó con dicho proceso para mantener un stock de plantas madres libre de virus. Se consideraron 2 frascos por variedad (aprox. 15 - 20 plántulas por variedad) para traspasarlas al Invernadero de producción cerrado con las condiciones climáticas controladas. Se consideró utilizar material estéril y nematicidas para controlar las posibles infecciones virales.

4- ACTIVIDADES PROGRAMADAS Y EJECUTADAS

Nº Actividad	Actividad Programada	Fecha programada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
3.8.1	Concretar contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico viral múltiple con la empresa internacional AGDIA	Abril 2014	---	Contamos con una carta de interés de la empresa AGDIA en el kit de detección múltiple para virus de la vid
1.1.2	Búsqueda de material infectado, en stock de plantas con virus o por sintomatología en campo	Junio 2014	Junio 2014	Cumplido según programa
1.1.3	Procesamiento de material infectado, extracción de ARN, síntesis de cADN y chequeo de integridad de cADN	Julio 2014	Noviembre 2014	La brecha se debió principalmente que el material vegetal se obtuvo del campo y las plantas de vid inician brotación en primavera (Sept 2014 en adelante).
1.2.4	Amplificación individual de 10 virus diferentes por RT-PCR	Diciembre 2014	Diciembre 2014	Cumplido según programa
1.2.5	Amplificación individual de 15 virus diferentes por RT-PCR	Julio 2015	Marzo 2017	La amplificación individual de los 15 virus se logró posterior a la fecha estipulada dado que para los virus ArMV, GRSLaV, TRSV y SLRSV se debió sintetizar las secuencias en un vector de expresión. Se utilizaron datos bibliográficos, debido a que no se encuentran datos de

N° Actividad	Actividad Programada	Fecha programada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
				detección de estos virus en el país. La efectividad de los partidores de dichos fragmentos fue comprobada mediante la amplificación con el control positivo 2.
1.3.6	Amplificación simultánea de 10 virus diferentes por RT-PCR	Septiembre 2015	Septiembre 2015	Cumplido según programa
1.3.7	Amplificación simultánea de 15 virus diferentes por RT-PCR	Enero 2016	Marzo 2017	La amplificación simultánea se logró con 14 virus a partir de los controles positivos visualizándolos mediante electroforesis capilar. La amplificación del virus SLRSV no se observó en los análisis múltiples. Para visualizar los fragmentos virales en gel de agarosa, se logra amplificación de 15 virus a partir de 2 grupos de partidores (8 y 7 partidores)
1.4.8	Amplificar y clonar en vector de expresión fragmentos virales correspondientes a 15 virus. Estableciendo un control positivo	Octubre 2015	Mayo 2016	El retraso de esta actividad se debió a que no fue posible clonar en vector de expresión los fragmentos virales de ArMV, GRSLaV, TRSV y SLRSV ya que no se identificaron a partir de material vegetal infectado. Para dar cumplimiento, se debió recurrir a las secuencias conservadas en bibliografía.
2.5.9	Recolección de material vegetal de las variedades seleccionadas desde campo	Enero 2016	Mayo 2015	Cumplido según programa
2.5.10	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas	Febrero 2016	Junio 2015	Cumplido según programa

Nº Actividad	Actividad Programada	Fecha programada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
	de las distintas variedades			
2.6.11	Establecimiento <i>in-vitro</i> de estacas de dos portainjertos	Febrero 2016	Junio 2015	Cumplido según programa
2.5.12	Análisis de plantas de distintas variedades seleccionadas con sistema de diagnóstico validado	Junio 2016	Diciembre 2016	El retraso del análisis de las variedades seleccionadas se debió al retraso en la optimización de las condiciones de amplificación que permitieron obtener un sistema de diagnóstico validado. La sensibilidad y especificidad del kit se realizó mediante las optimizaciones mencionadas de partidores y reactivos utilizados. Por otro lado, la validación de la sensibilidad, especificidad y eficacia del kit se realizó primero optimizando los parámetros de reacción con muestras de campo (3 tipos de variedades). Adicionalmente, se validó mediante el análisis de dichas muestras de campo con nuestro sistema de detección múltiple y por último también se consideró análisis individuales realizados por el Laboratorio Agrícola Lo Aguirre del SAG.
2.6.13	Análisis de plantas de portainjertos seleccionadas con sistema de diagnóstico validado	Junio 2016	Enero 2017	El retraso del análisis de las plantas de portainjertos seleccionadas se debió al retraso en la optimización de las condiciones de amplificación que permitieron obtener un sistema de diagnóstico validado. Adicionalmente, la validación del kit se llevó a cabo con muestras de campo (3 tipos de variedad) analizadas con nuestro sistema y con el servicio de análisis del

N° Actividad	Actividad Programada	Fecha progra- mada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
				Laboratorio Agrícola Lo Aguirre del SAG.
2.7.14	Replicación de plantas libres de virus, de las distintas variedades y portainjertos seleccionadas	Septiembre 2016	Septiembre 2016	Cumplido según programa
3.9.15	Detección viral en muestras de campo visiblemente infectadas	Mayo 2016	Enero 2017	El retraso en la detección se debió a lo siguiente: 1- Retraso en el establecimiento de un protocolo de extracción que permitiese obtener una buena calidad y cantidad de RNA viral a partir de muestras infectadas. 2- Retraso en la optimización de las condiciones de amplificación simultánea con 15 partidores virales.
3.10.16	Detección viral en muestras de clientes utilizando metodología de detección	Agosto 2016	Enero 2017	La actividad se completó en enero debido a que el material vegetal fue recolectado a un estadio de desarrollo más avanzado para la mejor detección viral.
3.12.17	Generación de un prototipo de kit de diagnóstico múltiple de virus en vid	Julio 2016	Febrero 2017	La optimización de las condiciones de PCR a partir de los controles positivos para la generación del kit de detección permitió distinguir 14 virus de forma simultánea mediante electroforesis capilar. Por otro lado, la visualización de los 15 fragmentos virales en gel de agarosa retrasó esta actividad, por lo que se decidió crear 2 reacciones de amplificación múltiple (8 y 7 partidores)

N° Actividad	Actividad Programada	Fecha programada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
3.11.18	Venta del servicio comercial de detección viral	Marzo 2017	—	<p>Se realizó un servicio de detección gratuito. La venta del servicio comercial de detección viral se estima realizar entre marzo y Junio del 2018 para entregar resultados que permitan al cliente elegir la mejor estrategia de mitigación de aquellas plantas que resulten positivas u optar por uno de nuestros servicios de venta de plantas libres de virus o saneamiento. Actualmente tenemos clientes interesados en el servicio e detección de virus, y durante el año 2018 lo pondremos en prueba. Una vez validado por nosotros en forma masiva lo pondremos a disposición de otros usuarios.</p>
3.13.19	Comercializar a escala piloto kits de diagnóstico múltiple de virus en vid	Marzo 2017	—	<p>Se diseñó un prototipo de kit de diagnóstico. Actualmente, contamos con un bosquejo de producto final que consta de una caja de aprox. 20x20 cm con los pares de partidores en tubos liofilizados y rotulados con el nombre en acrónimo, los dos controles positivos (1 y 2) y el instructivo de uso.</p> <p>El desarrollo del empaquetamiento y comercialización del prototipo de kit de detección múltiple no se logró en el tiempo estipulado debido a un atraso de la validación del kit. Para lograrlo, se planifica una estrategia de empaquetamiento e introducción en el mercado para inicio del</p>

N° Actividad	Actividad Programada	Fecha progra- mada	Fecha finalizada	Modificaciones o Brecha
				2019 apoyado por un proyecto Corfo.
4.14.20	Generación y entrega de folletos informativos sobre técnica de diagnóstico	Abril 2016	Diciembre 2016	El folleto informativo se diseñó con la información más reciente obtenida del sistema de detección múltiple viral y se entregó en charlas de difusión. El folleto se entrega en visitas recibidas en la empresa
4.15.21	Explicación de metodología de detección desarrollada en visitas de campo.	Enero 2017	Diciembre 2016	Cumplido según programa
5.16.22	Venta de variedades y portainjertos viníferas libres de virus.	Marzo 2017	Septiembre 2017	Se concretó venta de plantas con retraso respecto al plan

4 RESULTADOS DEL PROYECTO

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
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	Nº de material infectado con virus	15	15	Junio 2014	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se recolectó material vegetal con sintomatología viral proveniente del campo experimental de Agrijohnson Ltda., de las plantas entregadas por el SAG y de viñedos de Curacaví, Casablanca, San Felipe y Santa Cruz (Anexo 1, panel A). Las plantas fueron establecidas y propagadas <i>in vitro</i> para mantener un stock de plantas positivas a determinados virus (Anexo 1, panel B). En el sombreadero de Agrijohnson Ltda. se mantienen 10 plantas de cepa País infectadas con virus, 6 plantas de variedad Cabernet Sauvignon infectada con GLRaV-3 y 2 plantas de la misma variedad infectada con GLRaV-4.</p> <p>El material vegetal infectado sirvió para obtener las secuencias virales las cuales se utilizaron para establecer los controles positivos y de este modo evitar depender de material infectado. Para salvar el problema de la sobrevivencia de plantas infectadas y evitar contaminación con plantas sanas se establecieron controles positivos mediante la clonación de las secuencias virales obtenidas a partir de material infectado. Además, se mantiene el material viral obtenido a partir de las plantas SAG 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 entregadas por el SAG.</p> <p>Para los análisis posteriores, se extrajo el material genético de plantas infectadas (Chequeo integridad anexo 24).</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
<p>Anexo 1: Stock de material vegetal establecido in vitro infectado con sintomatología viral Anexo 24: Chequeo integridad cDNA a partir de retrotranscripción del RNA total de material vegetal infectado</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
1	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	10	10	Diciembre 2014	100%
					15	15	Marzo 2017	100 %
<p>Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.</p> <p>Se logró la amplificación individual de los 15 fragmentos virales propuestos en el Plan Operativo los cuales fueron visualizados ya sea por electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3, panel A) como por electroforesis capilar (Anexo 3, panel B).</p> <p>A partir del material infectado se logró amplificar y aislar 11 fragmentos correspondientes a: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFKV, GFLV, ToRSV y RSPaV (Anexo 2, panel A). De estos 11 virus se obtuvo la clonación en vector de clonación pCR®2.1-TOPO®, secuenciación y alineados con la secuencia viral disponible en los bancos de datos de los genomas virales utilizando el programa MUSCLE (Anexo 2, panel B) y. Se calculó el % de identidad de las secuencias virales identificadas y de este modo corroborar el virus. Esto permite a su vez entender la similitud de secuencia de los virus presentes en Chile con aquellos descritos en las bases de dato aislados en otros países.</p> <p>Por otro lado, los 4 virus (ArMV, GRSLaV y SLRSV) no identificados a partir de material vegetal infectado se amplificaron exitosamente a partir del control positivo. Anexo 22 muestra los 15 virus propuestos amplificados desde material vegetal o controles positivos, informados durante el desarrollo del proyecto.</p>								
<p>Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)</p> <p>Anexo 2: Virus identificados a partir de material vegetal y alineamiento de secuencias virales clonadas.</p> <p>Anexo 3: Amplificación individual de 15 fragmentos virales diferentes por RT-PCR</p> <p>Anexo 22: Amplificación individual de 15 fragmentos virales por RT-PCR en muestras a partir de diferentes fuentes</p>								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
1	3	Se logra la detección mediante PCR y de manera simultánea de una mayor cantidad de virus diferentes.	Detección simultánea de virus diferentes	Nº de virus diferentes detectados simultáneamente	10	10	Septiembre 2015	100%
					14	15	Marzo 2017	93%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se logró la amplificación simultánea de 14 virus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFkV, GFLV, ToRSV y RSPaV, ArMV, GRSLaV y TRSV. A partir del valor crudo arrojado por el secuenciador ABI PRISM 310 fue posible discriminar la dimensión del fragmento del virus GRLaV (317 bp) y del virus SLRS (320 bp). El detector del secuenciador es capaz de diferir de 2 nucleótidos del tamaño real del fragmento analizado, debido a que la detección de fluorescencia ocurre de dos nucleótidos en dos. Durante el análisis de los datos, se obtuvo un valor crudo de 319 bp correspondiente al virus GRSLaV (317 bp). Por otro lado, no se observó ningún valor de 318 bp, 320 bp o 322 bp, por lo que se descartó la amplificación del virus SLRSV (320 bp) durante la amplificación simultánea.</p> <p>La amplificación múltiple y simultánea se realizó primero con 10 fragmentos virales (Anexo 23) y luego con 14 (Anexo 4, panel A) a partir de los controles positivos con los pares de partidores virales marcados para su visualización por electroforesis capilar.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
Anexo nº 4: Amplificación múltiple simultánea de 14 fragmentos virales diferentes por RT-PCR. Amplificación de 15 fragmentos en 3 reacciones grupales								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
1	4	Se establece un control positivo mediante la amplificación y clonación en vector de clonación de fragmentos de todos los virus considerados en el proyecto.	Control positivo de los virus clonados.	Nº de fragmentos virales clonados.	15	15	Mayo 2016	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>A partir de la detección individual de los virus, se establecieron dos controles positivos denominados 'Control positivo 1' y 'Control positivo 2'.</p> <p>El Control positivo 1 contiene los 11 fragmentos virales identificados a partir de material infectado, los cuales fueron clonados en un vector de clonación, secuenciados y alineados con las secuencias disponibles en los bancos de datos de genomas virales- Esto permitió verificar la similitud de secuencia y establecer el control positivo (Anexo 5, panel A).</p> <p>El Control positivo 2 contiene los 4 fragmentos virales (ArMV, GRSLaV y SLRSV) que no se identificaron a partir de material infectado. Para ello, se decidió utilizar las secuencias disponibles en NCBI para sintetizar el segundo control positivo, (Anexo 5, B). La empresa Epoch Life Science se encargó de la síntesis de los controles positivos con las secuencias entregadas por nosotros.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
Anexo 5: Mapa de vectores que contienen fragmentos virales como controles positivos.								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
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	3	3	Septiembre 2016	100%
					6	6	Diciembre 2016	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se recolectó en el campo, material de distintas variedades viníferas y de mesa (Anexo 6) visiblemente asintomáticas y se establecieron <i>in vitro</i>. Las muestras fueron analizadas con nuestro sistema múltiple para evaluar su estado fitosanitario. Durante el desarrollo del proyecto seleccionamos 6 variedades viníferas/uva de mesa libres de virus con nuestro sistema de detección. Por otro lado, las variedades Thompson Seedless, Merlot, Chardonnay y Red Globe presentes en nuestro germoplasma, fueron validadas por el SAG, para 8 virus a disposición (Anexo 31, panel A) Thompson Seedless, Tintorera, Cabernet Franc, Chardonnay, Merlot y Flame (Anexo 6), obtenidas de campo, o mediante embriogénesis somática (Anexo 10, panel A) y mediante tratamiento con ribavirina (Anexo 10, panel B).</p> <p>Los fragmentos virales amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa y confirmados por electroforesis capilar con el secuenciador ABI PRISM-310 (Anexo 4, panel B) adquirido durante el proyecto.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
<p>Anexo nº 6: Establecimiento <i>in vitro</i> de estacas de variedades viníferas y uva de mesa Anexo nº 7: Variedades viníferas y uva de mesa libre de virus Anexo nº 10: Métodos de saneamiento viral en plantas de vid.</p>								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
2	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	2	2	Junio 2016	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>A partir del muestreo de portainjertos logramos identificar 2 portainjertos libres de virus correspondientes a Freedom y P1103. Adicionalmente, los portainjertos Kober, Harmony y Salt Creek presentes en nuestro germoplasma, fueron validadas por el SAG, para 8 virus a disposición (Anexo 31, panel A). (Se muestra un ejemplo de escrutinio en Anexo 8. Las muestras fueron analizadas con el sistema de detección múltiple viral (Anexo 8, panel B) los resultados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa. Se mantiene un stock <i>in vitro</i> de los portainjertos que resultaron libres de virus.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
Anexo nº 8: Análisis múltiple viral en diferentes portainjertos.								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
2	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 Cabernet Sauvignon	N° de clones libre de virus	3	5	Marzo 2017	60%
			Clones certificados libres de virus de la variedad Sauvignon Blanc	N° de clones libre de virus	1	5	Marzo 2017	20%
			Clones certificados libres de virus de la variedad Merlot	N° de clones libre de virus	4	5	Enero 2017	80%
			Clones certificados libres de virus de la variedad Red Globe	N° de clones libre de virus	2	5	Marzo 2017	40%
			Clones certificados libres de virus de la variedad Thompson Seedless	N° de clones libre de virus	5	5	Noviembre 2016	100%
			Clones certificados libres de virus de la variedad Crimson Seedless	N° de clones libre de virus	5	5	Marzo 2017	100%
			Clones certificados libres de virus del portainjerto 110 Richter	N° de clones libre de virus	5	5	Noviembre 2016	100%
			Clones certificados libres de virus del portainjerto 110 Richter	N° de clones libre de virus	5	5	Noviembre 2016	100%

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Logramos establecer un Banco de Germoplasma de variedades comerciales de vid y portainjertos libre de virus (**Anexo 9, panel A**).

Se obtuvieron clones libres de virus para todas las variedades y portainjertos propuestos Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Merlot, Red Globe, Thompson Seedless, Crimson Seedless y 110 Richter (**Anexo 9, panel B**). Se logró el 75% de los clones libres de virus propuestos al inicio de proyecto y además el portainjerto Salt Creek. Para obtener el material libre de virus se procedió a la técnica de Embriogénesis somática (**Anexo 10, Panel A**) y tratamiento con el antiviral Ribavirina (**Anexo 10, panel B**). Las variedades de Thompson Seedless, Merlot y Red Globe fueron analizadas por el servicio de diagnóstico ofrecido por el SAG (**Anexo 31, panel A**).

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Anexo 9: Clones libres de virus de variedades comerciales de vid y portainjertos.

Anexo 10: Métodos de saneamiento viral en plantas de vid

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
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	0	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se logró una carta de interés de la empresa internacional AGDIA en el desarrollo del sistema de detección múltiple viral en vid (Anexo 16, panel A). Licenciamiento internacional requiere la desvinculación financiera de cualquier ente estatal y por ello la aprobación del informe final.</p> <p>*A nivel nacional se firmó un contrato de licencia y transferencia tecnológica con Torre Verde Limitada (Anexo 16, panel B) para el uso en aplicaciones generadas en el proyecto "Generación y desarrollo de una plataforma de detección múltiple de virus en vides". Se adjunta en papel la copia de licenciamiento firmada ante notario. Esto permitirá a Torre Verde Ltda. Comercializar los 4 servicios y productos derivados del proyecto: 1) Servicio de detección múltiple viral; 2) Venta de plantas libre de virus de distintas variedades de vid; 3) Venta de Kit de detección múltiple viral; 4) Tratamiento de saneamiento <i>in vitro</i> de plantas de vid.</p> <p>El contrato entre Johnson y Medina Limitada y Torre Verde Limitada tiene una vigencia de 5 años a contar de la firma por ambas partes. Se considerarán los precios presentes en la evaluación económica del proyecto.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
<p>Anexo nº 16: Acuerdos de licenciamiento sobre Kit de detección múltiple viral (primera página) El contrato firmado ante notario se anexa en la versión en papel del presente informe.</p> <p>Anexo Contrato notarial</p>								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	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	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de muestras infectadas cuyos virus son detectados}}{\text{N}^\circ \text{ real de muestras infectadas de campo}} \times 100$	95% (controles positivos)	100% (50 muestras)	Abril 2017	95%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Para la obtención de la tasa porcentual de un sistema de detección múltiple viral exitosa se analizaron 29 plantas con sintomatología de infección viral siguiendo dos aproximaciones basadas en PCR: Sistema individual y Sistema de Detección Múltiple. Las plantas de vid analizadas provenían de distintos Valles de la Zona Central del país. Se consideró la localidad de Curacaví, el Valle de Casablanca, Valle los Naranjos, Valle de Miraflores y la zona de Los Andes. En particular, en el Valle de Casablanca se recolectaron muestras de 8 variedades de vid diferentes: Chardonnay, Merlot, Syrah, Sauvignon Blanc y cuatro variedades viníferas sin identificación y 1 portainjerto sin identificación. En el Valle los Naranjos, se recolectaron 5 muestras de las variedades Sultanina, Syrah, Moscatel Negro y Blanco, cepa País de dos productores distintos, uno de ellos pertenecientes a la Viña del Toro. En el Valle de Miraflores, se recolectaron 6 muestras viníferas: Merlot, Cabernet Sauvignon, Carmenere, Syrah, Sauvignon Blanc. Cabernet Franc. Mientras que, en la localidad de Los Andes se recolectó una planta País. Adicionalmente, se consideraron las 8 plantas infectadas entregadas por el SAG quienes no informaron la variedad, más bien solo el virus que portaban.</p> <p>De este modo se pudo comparar la eficiencia de nuestro sistema al momento de detectar un virus en la planta. A partir de estos resultados podemos concluir que logramos obtener un sistema de detección viral con una tasa porcentual exitosa del 95% (Anexo 11). Dejamos constancia que el número de muestras utilizadas no es el óptimo pues por tiempo y recursos no pudimos considerar adicionales. No obstante, seguimos trabajando con muestras provenientes de empresas las que nos permitirán ampliar significativamente el número muestral durante este año para validar nuestro desarrollo.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
Anexo 11: Tabla que indica tasa porcentual de éxito del sistema de detección múltiple viral								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	10	Entrega de un servicio validado de detección múltiple viral a viñedos o viveros.	Servicio de detección viral	N° de servicios validados	2	2	Enero 2017	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se realizó un servicio validado de detección múltiple viral con dos reacciones de amplificación (kit SAG y kit "adicional") y visualizados por gel de agarosa (Anexo 12, panel B) dos productores de uva vinífera para del Valle de Curacaví (Anexo 12). Ellos son el productor Juan Añasco (Fono +56 9 6226 7818), quien tiene su viña propia y Viña el Toro, a través del productor Julio Silva (chichajuliosilva@hotmail.com). En cada uno de los predios se tomaron muestras dirigidas contemplando las diferentes variedades presentes en el predio. Se tomaron 10 hojas frescas de plantas de vid en período de crecimiento, debido al período que se nos permitió realizar el muestreo. Se consideraron hojas que presentasen una sintomatología sana (prevalentes) y sintomatología viral (visiblemente no se observaron, algunas hojas presentaban tamaños menores y/ morfología diferente) y se mantuvieron en frío hasta su procesamiento. Los resultados fueron expuestos durante la charla de difusión realizada en Diciembre de 2016 (Anexo 17, panel A). A partir de los análisis realizados con nuestro sistema de diagnóstico, se obtuvieron resultados positivos para los productores, ya que gran parte de las plantas muestreadas resultaron negativas a la presencia viral.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)								
<p>Anexo 12: Servicio validado de detección múltiple viral a los productores del Valle de Curacaví</p> <p>Anexo 17: Difusión del sistema de detección múltiple viral: charlas y seminarios.</p> <p>Anexo 28: Productores contactados para difusión de productos y servicios</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	11	Comercialización del servicio de detección múltiple de 15 virus en vides a viveros y empresas del rubro.	Venta del servicio comercial de detección viral	N° de contratos o facturas de servicios realizados	0	1	---	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>La comercialización del servicio de detección de virus se encargará Torre Verde Limitada con quien se firmó un acuerdo de licenciamiento para la venta de los productos y servicios derivados del proyecto (Anexo 16, panel B). Torre Verde Ltda. Cuenta con el giro comercial para esto, no así Johnson y Medina Ltda. que posee un giro por asesorías y desarrollo de tecnologías (Anexo 26). El desarrollo del empaquetamiento y comercialización del prototipo de kit de detección múltiple no se logró en el tiempo estipulado debido a un atraso de la validación del kit. Para lograrlo, se planifica una estrategia de empaquetamiento e introducción en el mercado para el 2018 e inicio del 2019 a través de un proyecto Corfo.</p>								
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)								
<p>Anexo 16 B: Acuerdo de licenciamiento Kit de detección múltiple viral y servicios asociados Anexo Contrato notarial Anexo 26: Cotización servicio de detección múltiple de virus en vides a vivero</p>								

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	12	Prototipo de kit de diagnóstico múltiple de 15 virus en vid	Kit de diagnóstico múltiple generado	Nº de Kit	1	1	Febrero 2017	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Se optimizaron las condiciones de amplificación múltiple con los 15 partidores virales (Anexo 13) considerando distintas diluciones de los controles positivos (Anexo 13, panel A), optimización de los partidores virales (Anexo 13, panel B) y concentración de MgCl₂ (Anexo 13, panel C). Obtuvimos resultados satisfactorios con la adición de BSA (0,16 mg/ml), DMSO, Tritón (0,1%) y KCl (50 mM) como demostrado previo al proyecto con la amplificación múltiple de 7 partidores.</p> <p>Se desarrollaron dos kits de diagnóstico múltiple viral (Anexo 14) a partir de las optimizaciones de las condiciones de amplificación múltiple: Kit "SAG" y Kit "15 virus". El kit "SAG" contiene los partidores que amplifican para los 8 virus: requeridos en el control obligatorio de plagas solicitado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG): GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GfKV, GFLV, ToRSV. Por otro lado, el Kit "15 Virus" contiene los 15 partidores, de los cuales 14 se pueden amplificar de manera simultánea mediante visualización por electroforesis capilar (Anexo 4, panel A) y 15 de ellos se lograron amplificar de manera múltiple en 2 reacciones de amplificación múltiple (8 y 7 partidores) para la visualización en gel de agarosa (Anexo 4, panel C). Ambos Kits cuentan con los reactivos necesarios para la amplificación por RT-PCR y un instructivo para llevar a cabo correctamente la detección (Anexo 15).</p>								
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)								
<p>Anexo 13: Optimización de las condiciones de RT-PCR para la detección múltiple viral Anexo 14: Prototipo de Kit de diagnóstico múltiple viral en vides Anexo 15: Instructivo de uso para la detección múltiple viral</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	13	Comercialización a escala piloto de kits de diagnóstico múltiple de 15 virus en vid	Venta de kits de diagnóstico múltiple	N° de Kits vendidos	0	15		0%
<p>Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.</p> <p>Como se ha descrito anteriormente, la empresa Torre Verde Ltda. se encarga de la venta de Kits de diagnóstico múltiple de 14 virus en vid a productores y viveros (Anexo 16, panel B).</p> <p>Torre Verde Ltda. apuntará a la venta de Kits a nivel internacional focalizándose en el análisis mediante electroforesis capilar como planteado en la metodología del plan operativo. Para tal será necesario utilizar un secuenciador y un profesional capacitado para ello, situación poco común en los laboratorios nacionales.</p> <p>El desarrollo del empaquetamiento y comercialización del prototipo de kit de detección múltiple no se logró en el tiempo estipulado debido a un atraso de la validación del kit. Para lograrlo, se planifica una estrategia de empaquetamiento e introducción en el mercado para el 2018 e inicio del 2019.</p>								
<p>Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)</p>								
<p>Anexo 16B: Acuerdos de licenciamiento sobre Kit de detección múltiple viral Anexo Contrato notarial</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
4	14	Folleto informativo sobre servicio de detección múltiple viral en vid elaborado	Folleto Informativo	N° de folletos	100	100	Diciembre 2016	100%
<p>Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.</p> <p>Se diseñaron e imprimieron 100 folletos informativos en formato de tríptico (Anexo 18) explicando la técnica de diagnóstico múltiple viral, los servicios y productos derivados y ofrecidos por Agrijohnson Limitada. Los folletos fueron entregados durante todas las charlas de difusión para quedar a disposición de los productores y viveristas. Se entregaron en total 60 trípticos informativos al término del proyecto.</p> <p>Los trípticos disponibles (100 en total) se entregan en visitas de negocios de productores, exportadores y viveristas que acuden permanentemente a nuestras dependencias para evaluar posibilidades de servicios y otros negocios.</p>								
<p>Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)</p>								
<p>Anexo 18: Tríptico informativo del sistema de detección múltiple viral en vid</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)				% de avance a la fecha	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)		Fecha alcance meta
4	15	Difusión del nuevo sistema de detección múltiple viral en vid realizada a viñas o viveros	Visita de campo explicativa a productores.	N° de Visitas de campo	1	1	Marzo 2016	100%
					5	6	Abril 2017	83%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
<p>Durante el desarrollo del proyecto se llevaron a cabo 4 charlas de difusión a productores de uva de mesa y vino.</p> <p>Ellas fueron realizadas en dependencias de Agrijohnson (14 -12-16), Viña Concha y Toro, Centro de Investigación e Innovación de Viña Concha y Toro (20-12-16), Viña Santa Rita (23-3-2017) y Municipalidad de Curacaví (24-4-2017) (Anexo 17, panel A, Anexo 27). Además, el proyecto se expuso en el Congreso de "Innovación en el sector Hortofrutícola: una muestra sectorial de la Región Metropolitana" (Anexo 17, panel B).</p> <p>Para darnos a conocer y llegar a un mayor público es que se decidió crear una página web (Anexo 19, panel A) en donde se da a conocer sobre Agrijohnson Ltda., nuestro sistema de detección múltiple viral, los productos y servicios derivados de este y los resultados obtenidos. Además, se hicieron tarjetas de presentación para ser entregadas a los productores y viveros de Chile (Anexo 19, panel B).</p>								
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)								
<p>Anexo 16: Invitación a charla explicativa del sistema de detección múltiple viral Anexo n° 27: Registro de participantes a las charlas de difusión del sistema de detección Anexo 28 Productores y empresarios contactados para difusión de los servicios</p>								

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
5	16	Comercialización de plantas madre de distintas variedades o portainjertos certificadas libres de virus.	Venta de plantas certificadas libres de virus	N° plantas vendidas	0	1		0%
					0	500	28-9-17	100
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.								
Se concretó venta de 200 y 300 plantas de vid libres de virus.								
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)								
Anexo facturas								

5.1 Resultados parciales obtenidos

Durante la ejecución del proyecto obtuvimos resultados acordes a lo esperado, principalmente a desarrollar e implementar un sistema de detección múltiple viral en vides y a la generación de un Banco de Germoplasma de distintas variedades de vid libres de virus. Adicionalmente, para el sistema de detección se lograron amplificar de manera múltiple y simultánea 14 virus mediante visualización por electroforesis capilar como esperado según metodología planteada inicialmente, lo que da un 93% de efectividad en la reacción múltiple. Por otro lado, la visualización en gel de agarosa resulta menos definida, sobre todo para aquellos fragmentos virales de tamaños similares, por lo que para facilitar este obstáculo: realizar 2 reacciones de amplificación múltiple (8 y 7 partidores). Alternativamente, se logró detectar en 100% los 15 virus propuestos de manera individual.

Logramos obtener un sistema de diagnóstico múltiple viral eficiente al 95% al momento del análisis con muestras de campo, si se compara con la detección individual de cada uno de los virus.

La comercialización del servicio de detección múltiple viral, venta de plantas libres de virus y venta de kits de detección serán realizadas por Torre Verde Limitada quien cuenta con el giro comercial para la venta de servicios. Para ello se realizó un contrato de licenciamiento y transferencia de tecnología que permite a Torreverde comercializar el kit de diagnóstico, servicio de detección, servicio de limpieza y venta de plantas libres de virus.

5.2 Logro de Hitos.

Hito Crítico programado 1	
Concretar firma de un contrato o acuerdo de licenciamiento sobre kit de diagnóstico múltiple viral entre la empresa internacional AGDIA y Agrijohnson Limitada	
Avance Hito crítico	No Cumplido Se presenta licenciamiento con empresa nacional.
Fecha programada	Abril 2014
Fecha avance	Abril 2017
Explicación brecha	Se obtuvo una carta de interés de la empresa internacional AGDIA en la evaluación y uso del sistema de diagnóstico desarrollado por Agrijohnson Ltda (Anexo 16, Panel A). Además, se realizó un contrato de transferencia de la tecnología desarrollada entre Agrijohnson Ltda. Y Torre Verde Ltda., quien podrá comercializar el servicio de detección viral, la venta del Kit de detección viral, el servicio de saneamiento viral y comercialización de plantas libres de virus (Anexo 16, Panel B).

Hito Crítico programado 2	
Recolección de material vegetal con sintomatología viral	
Hito Crítico cumplido	Se recolectó material vegetal con sintomatología viral proveniente del campo experimental de Agrijohnson Ltda., de plantas facilitadas por el SAG y de viñedos de Curacaví, Casablanca, San Felipe y Santa Cruz (Anexo 1). Dicho material fue establecido y propagado <i>in vitro</i> para mantener un stock de plantas positivas a determinados virus. El material vegetal infectado sirvió para obtener las secuencias virales y con ello establecer un control positivo para el desarrollo del sistema de detección múltiple y simultánea de virus en las vides.
Fecha programada	Junio 2014
Fecha cumplido	Junio 2014

Hito Crítico programado 3	
Avance de estandarización del sistema de detección viral individual	
Hito Crítico cumplido	Se logró la amplificación individual de 4 fragmentos virales para diciembre del 2014 reportado en el informe técnico n° 2 (Anexo 22, panel A) correspondientes a GLRaV-4, GLRaV-7, GFLV y RSPaV. Durante el informe técnico n° 3 se logró amplificar los virus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GfKV y ToRSV (Anexo 22, panel B) Con estas detecciones se logra el cumplimiento de hito que propone un avance con detección de 10 virus en forma individual.
Fecha programada	Diciembre 2014
Fecha cumplido	Diciembre 2014
Explicación brecha	Este hito fue cumplido satisfactoriamente

Hito Crítico programado 4	
Avance de estandarización del sistema de detección múltiple y simultáneo viral en Vid	
Hito Crítico cumplido	Se obtuvo la amplificación múltiple y simultánea de 10 virus correspondientes a GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVB, GfKV, GFLV, ToRSV y RSPaV en la fecha esperada, lo que fue reportado en el informe 3. (Anexo 23). El hito propone la amplificación de 10 virus de forma simultánea, de modo que el hito se cumple en la fecha propuesta
Fecha programada	Septiembre 2015
Fecha cumplido	Septiembre 2015

Hito Crítico programado 5	
Obtención de controles positivos, como fragmento de DNA clonados en vector de expresión para cada uno de los 15 virus seleccionados	
Hito Crítico cumplido	Se obtuvieron los controles positivos para los 15 virus en evaluación. Durante el informe técnico n° 4 se informó la síntesis del 'Control positivo 1' (Anexo 5, panel A) con 11 fragmentos virales y en el informe 5 el 'Control positivo 2' (Anexo 5, panel B) con 4 fragmentos virales, permitiendo identificar los 15 virus propuestos en el proyecto. Los fragmentos virales del 'Control positivo 1' derivan de las secuencias virales identificadas a partir de material vegetal infectado. Mientras que las secuencias de DNA del 'Control positivo 2' se obtuvieron de los bancos de datos de los genomas virales disponibles.
Fecha programada	Octubre 2015
Fecha cumplido	Enero 2016
Explicación brecha	La recolección del material vegetal infectado permitió individualar 11 fragmentos virales (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GfKV, GFLV, ToRSV, RSPaV). Mientras que

	<p>los 4 virus correspondientes a ArMV, GRSLaV, TRSV, SLRSV no se pudieron amplificar a partir de material vegetal infectado, probablemente debido a su baja incidencia en Chile.</p> <p>Debido a ello, se recurrió a los bancos de secuencias para diseñar un control positivo que incluyera estas secuencias. Esto produjo un retraso. Sin embargo, el hito fue alcanzado dentro del plazo de la ejecución del proyecto.</p>
--	--

Hito Crítico programado 6	
Identificación de variedades de uva de mesa y/o vinífera de interés comercial libres de virus	
Hito Crítico cumplido	<p>El hito establece la identificación de 3 variedades de interés, libres de virus. Se aplicó la técnica de embriogénesis somática en la variedad Chardonnay (Anexo 10, panel A) para obtener material libre de virus lo cual fue verificado con nuestro sistema de detección múltiple viral (Anexo 7, figura a), en informe de avance 3. Posteriormente, se identificaron plantas de campo libre de virus, como las variedades viníferas Tintorera (Anexo 7, figura a) y Cabernet Franc (Anexo 7, figura c) y las variedades de uva de mesa Thompson Seedless (Anexo 7, figura a) y Flame (Anexo 7, figura b).</p> <p>Para contar con un mayor número de variedades de interés comercial se realizó un Tratamiento de quimioterapia con el antiviral Ribavirina (Anexo 10, panel B) del cual pudimos obtener a la variedad vinífera Merlot (Anexo 7, figura d) libre de virus.</p> <p>Todas las variedades que resultaron negativas a la presencia de virus fueron mantenidas <i>in vitro</i> en cámaras climáticas y un grupo de ellas aclimatadas en invernadero.</p>
Fecha programada	Abril 2016
Fecha cumplido	Junio 2016
Explicación brecha	<p>El cumplimiento de este hito considera contar con al menos 3 variedades libres de virus. El retraso fue debido principalmente a un retraso en la identificación de material vegetal de campo libre de virus. Para obtener algunas de las variedades libres de virus se recurrió a la generación de plantas por embriogénesis somática y se decidió iniciar un tratamiento con Ribavirina para la obtención de variedades de interés comercial libre de virus. El hito se alcanzó dentro del plazo de ejecución del proyecto.</p>

Hitos Crítico programado 7	
Análisis eficaz de plantas de campo que muestren sintomatología viral.	
Hito Crítico cumplido	Para el cumplimiento de este hito crítico se tomaron muestras de campo que presentasen sintomatología viral. Las muestras fueron procedas para ser analizadas con los 15 fragmentos virales mediante una amplificación individual y comparada con la amplificación múltiple de nuestro sistema de detección. A raíz de esto se logró una tasa porcentual del 95% de éxito, que refleja cuan eficiente es nuestro sistema de diagnóstico para la detección de uno o un grupo de virus respecto al diagnóstico viral individual (Anexo 11).
Fecha programada	Mayo 2016
Fecha cumplido	Octubre 2016
Explicación brecha	El retraso de este hito crítico se debió principalmente al procesamiento de las muestras y al retraso en la definición de las condiciones para el análisis de detección múltiple viral.

Hito Crítico programado 8	
Primera visita de campo a viñedo o vivero especializado	
Hito Crítico cumplido	Nuestra primera visita de campo se realizó a la Viña Concha y Toro, en el Centro de Investigación e Innovación (CII), localizado en Talca (Región del Maule) (Anexo 17, panel B). En ella, se dio a conocer nuestro sistema de detección múltiple viral en vid y los resultados exitosos obtenidos a raíz de este. Contamos con un público variado perteneciente a la misma Viña, otros viveros y empresas del rubro agrícola y biotecnológico vegetal.
Fecha programada	Marzo 2016
Fecha cumplido	Diciembre 2016
Explicación brecha	El motivo de retraso en el cumplimiento de este hito se relaciona con que quisimos dar a conocer el proyecto y presentar resultados avanzados de nuestro sistema de detección múltiple viral. Esperamos hasta tener mayor solidez acerca del uso y validación del sistema de detección. Las charlas realizadas durante el último periodo del proyecto resultaron a nuestro juicio positivas ya que nos permitió contar con mayor interés de parte de las viñas y viveros debido a los resultados expuestos. A raíz de las visitas de campo y difusión, logramos conocer las inquietudes y problemas de las viñas, que se focalizan principalmente en la obtención de plantas libres de virus.

Hito Crítico programado 9	
Primer servicio de detección múltiple viral en vid	
Hito Crítico cumplido	Se realizó un servicio validado de detección múltiple viral a las plantas de vid de los productores de chicha del Valle de Curacaví (Anexo 12). Dicho servicio se realizó de forma gratuita y los resultados se expusieron durante la charla de difusión realizada en la parcela experimental de Agrijohnson Ltda. En la cual ellos participaron (Anexo 17, panel A)
Fecha programada	Agosto 2016
Fecha cumplido	Octubre 2016
Explicación brecha	El retraso de este hito crítico se debió principalmente a que esperamos contar con material vegetal proveniente de diferentes viñedos para muestrear. Contactamos a la Ilustre Municipalidad de Curacaví quien nos facilitó el contacto con los productores y sus campos.

Hito Crítico programado 10	
Obtención de un prototipo de Kit de diagnóstico viral en vid	
Hito Crítico	No cumplido Se obtuvo un kit a optimizado a nivel de Prototipo
Fecha programada	Julio 2016
Fecha cumplido	Abril 2017
Explicación brecha	El retraso de este hito se debió al retraso en la optimización de las condiciones de PCR con los partidores que amplifican para los 15 fragmentos virales. A raíz de esto, fue posible amplificar de manera simultánea 14 virus (Anexo 4, Panel A) mediante visualización por electroforesis capilar. Por otro lado, la visualización en gel de agarosa se logró bajo dos condiciones: amplificación de los 15 virus de manera individual y en 2 reacciones de amplificación múltiple (8 y 7 partidores. Anexo 4, Panel C) Sin embargo, pudimos desarrollar un Kit robusto y confiable para los análisis de muestras de campo. El desarrollar dos tipos de Kits se debió a que notamos la gran demanda de algunos productores de vino a cumplir solo los requisitos establecidos por el SAG. De todas formas, enfatizamos en la detección de los 15 virus ya que los otros virus son capaces de causar daños similares a los cuarentenarios, y además pueden estar presentes en otras zonas geográficas.

Hitos Crítico programado 11

Venta de las primeras plantas de uva de mesa y/o vinífera libres de virus

Avance Hito Crítico Venta de plantas libres de virus**Fecha programada** Diciembre 2016**Fecha cumplido** Abril 2017**Explicación brecha**

El retraso en la consecución del hito se debió a las dificultades en obtención de un banco de germoplasma, lo que retrasó la masificación de plantas libres de virus. Hubo también retraso en la difusión del producto, lo que se ha mejorado con la actualización de la página web.

5.3 Evaluación económica

Los negocios considerados en la presente evaluación se dividen en 4; venta de plantas de vid, servicio de detección múltiple viral, venta de kit de detección múltiple viral internacional y saneamiento *in vitro* de plantas de vid infectadas con virus.

CÁLCULO DE INGRESOS

Los ingresos provendrán de las 4 fuentes descritas anteriormente. La **venta de plantas de vid** se divide en plantas para vinos, plantas para uva de mesa y portainjertos. Las plantas para vino incluyen; Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Chardonnay, Merlot y otros. Las plantas para uva de mesa se dividen en; Red Globe, Thompson, Flame, Crimson y otros. Los portainjertos incluyen las siguientes variedades; 110R, harmony, Freedom, Pulsen, Kober y otros.

Los volúmenes vendidos por año e ingresos de la venta de plantas para vino se resumen en la siguiente tabla, se asume un precio de venta de las plantas de \$17.000 para planta de 60 cm en maceta de 1 litro. En caso de plantas *in vitro* este valor corresponde al precio de 13 plantas (\$1.300 pesos por unidad). Aunque el precio de referencia de plantas libres de virus hoy es de \$5.000 en viveros y \$10.000 por el SAG, esta institución dejará de dar ese servicio y solo lo harán particulares. Adicionalmente, las plantas que hoy se venden libres de virus por viveros, son sólo para los 8 virus cuarentenarios SAG, por lo que estas plantas podrían tener alguno de los 7 virus que nuestro análisis si incluye y por consiguiente damos un servicio único en el país y por ende de mayor costo. Por último, los viveros comerciales que venden plantas libres de virus consideran un procedimiento al azar en que solo algunas plantas del universo son analizadas por el SAG y validadas como libres de virus. Nuestras plantas a vender a terceros el 100% son analizadas y no solo una proporción de estas. Este servicio también es único en Chile y por ello su costo.

Tabla 1: Venta de Plantas de Vinos e Ingresos (M\$)

VENTA PLANTAS VINOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cabernet Sauvignon (N° unidades)	160	160	320	320	320	320	320	320	320	320
Ingreso Cab. Sav. (\$)	2.720	2.720	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440
Sauvignon Blanc (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingreso Sav. Blanc (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Chardonnay (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingreso Chardonnay (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Merlot (N° unidades)	56	56	112	112	112	112	112	112	112	112
Ingreso Merlot (\$)	952	952	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904
Otros (N° unidades)	24	24	48	48	48	48	48	48	48	48
Ingreso Otros (\$)	408	408	816	816	816	816	816	816	816	816
Total Vinos (N° unidades)	400	400	800							
Total Ingresos Vinos	\$6.800	\$6.800	\$13.600							

Los volúmenes de venta e ingresos provenientes de las plantas para uva de mesa se resumen en la siguiente tabla, se asume un precio de venta de planta de 60 cm en maceta de 1 litro de \$17.000:

Tabla 2: Venta de Plantas de Uva de Mesa e Ingresos (M\$)

VENTA UVA DE MESA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Red Globe (N° unidades)	160	160	320	320	320	320	320	320	320	320
Ingreso Red Globe (\$)	2.720	2.720	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440
Thompson (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingreso Thompson (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Flame (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingreso Flame (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Crimson (N° unidades)	56	56	112	112	112	112	112	112	112	112
Ingreso Crimson (\$)	952	952	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904	1.904
Otros (N° unidades)	24	24	48	48	48	48	48	48	48	48
Ingreso Otros (\$)	408	408	816	816	816	816	816	816	816	816
Total Uva Mesa (N° unidades)	400	400	800							
Total Ingresos Uva de Mesa	\$6.800	\$6.800	\$13.600							

Los ingresos de la venta de portainjertos se resumen en la siguiente tabla, se asume un precio de venta de planta de 60 cm en maceta de 1 litro de \$17.000.

Tabla 3: Venta de Portainjertos e Ingresos (M\$)

VENTA PORTAINJERTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
110R (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingresos 110R (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Harmony (N° unidades)	240	240	480	480	480	480	480	480	480	480
Ingresos Harmony (\$)	4.080	4.080	8.160	8.160	8.160	8.160	8.160	8.160	8.160	8.160
Freedom (N° unidades)	80	80	320	320	320	320	320	320	320	320
Ingresos Freedom (\$)	1.360	1.360	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440
Pulsen (N° unidades)	160	160	320	320	320	320	320	320	320	320
Ingresos Pulsen (\$)	1.360	1.360	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440	5.440
Kober (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingresos Kober (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Otros (N° unidades)	80	80	160	160	160	160	160	160	160	160
Ingresos Otros (\$)	1.360	1.360	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720	2.720
Total Portainjertos (N° unidades)	640	640	1600							
Total Ingresos Portainjertos	\$10.880	\$10.880	\$27.200							

La siguiente fuente de ingreso proviene del **servicio de detección múltiple viral** que se divide en el servicio para el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de detección de 8 virus y el servicio de detección de 15 virus.

El precio del servicio de detección de 8 virus asciende a \$52.000 lo que significa un precio de \$6.500 por virus en la muestra analizada¹. El precio del servicio de detección de 15 virus corresponde a \$97.500, lo que también significa un precio de \$6.500 por virus. La siguiente tabla resume las cantidades vendidas e ingresos generados por año.

Es importante resaltar que cualquier tipo de servicios que ofrezcan Universidades que reciban financiamiento del Estado de Chile, no podrán continuar realizando actividades que implique lucro según la nueva ley aprobada en Enero de este año. Por lo anterior, el escenario de oferentes para servicios de detección de patógenos entre otros, en el corto plazo estará radicado en el país principalmente en empresas. Adicionalmente, el SAG según su nueva normativa de su institución, a partir de Marzo del 2018, será el ente que definirá los precios por detección de patógenos en plantas para oferente que deseen contar con la certificación de esta institución. AgriJohnson Ltda, se adecuará a este nuevo escenario y por consiguiente el precio que utilizará para sus proyecciones comerciales será el que defina el SAG, el que estimamos será cercano a los \$6.500 por muestra para un virus.

Tabla 4: Venta de Servicio de Detección de Virus e Ingresos (M\$)

VENTA SERVICIOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Servicio SAG (N° unidades)	120	120	300	300	300	300	300	300	300	300
Ingresos Servicio SAG (\$)	6.240	6.240	15.600	15.600	15.600	15.600	15.600	15.600	15.600	15.600
Servicio 15 virus (N° unidades)	8	8	20	24	24	24	24	24	24	24
Ingresos servicio 15 virus (\$)	780	780	1.950	2.340	2.340	2.340	2.340	2.340	2.340	2.340
Total Servicios (N° unidades)	128	128	320	324						
Total Ingresos Servicios	\$7.020	\$7.020	\$17.550	\$17.940						

¹ Actualmente el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) determina 8 virus y cobra 0.112 UTM por detección por ELISA por cada reacción, lo que significa \$5.230 por determinación. Los valores son al menos el doble si la determinación es mediante PCR. Similarmente la Universidad de Chile cobra 2.5 UF por 10 virus en 1 muestra, lo que significa cerca de \$6.500 por determinación.

Una tercera fuente de ingresos corresponde a la **venta de Kit de detección viral**, se asume un precio de venta del Kit de \$340.000 por unidad que es para análisis de 25 muestras o bien 200 reacciones (25 muestras por 8 determinaciones). La siguiente tabla resume los ingresos generados por año:

Tabla 5: Venta de Kits de Detección Viral e Ingresos (M\$)

VENTA DE KIT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kits vendidos (N° unidades)	10	10	20	50	50	50	50	50	50	50
Total Ingresos Kit	\$3.400	\$3.400	\$6.800	\$17.000						

La cuarta fuente de ingresos corresponde al **saneamiento de plantas de vid**, que se divide en el saneamiento de variedades y la venta de plantas saneadas. El precio por saneamiento asciende a \$680.000 por variedad lo que incluye la entrega de 40 plantas libres de virus. Lo que implica que el precio de venta de una planta saneada es de \$17.000.

La siguiente tabla resume los ingresos generado por concepto de esta línea de negocio. El precio de plantas saneadas de virus será similar al de venta de nuestras plantas libres de virus. Este servicio pensamos será principalmente para plantas que tengan royalties y por consiguiente los viveros representantes o particulares serán quienes soliciten este servicio. También será de interés para vides viníferas cuyas empresas productoras de vino consideren que tienen plantas de mucho valor o aspiren a formar su plantel con plantas certificadas. El número de 20 saneamientos por año se refiere a plantas a sanear las que podrían ser de una o más variedades.

Tabla 6: Venta Saneamiento de Plantas de Vid e Ingresos (M\$)

VENTA SANEAMIENTO DE PLANTAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Saneamiento variedades (N° unidades)	0	3	5	10	20	20	20	20	20	20
Ingresos Saneamiento Variedades (\$)	-	2.040	3.400	6.800	13.600	13.600	13.600	13.600	13.600	13.600
Plantas saneadas vendidas (N° unidades)	-	120	200	400	800	800	800	800	800	800
Ingresos Plantas saneadas (\$)	-	2.040	3.400	6.800	13.600	13.600	13.600	13.600	13.600	13.600
Total Ingresos Saneamiento Plantas	\$-	\$4.080	\$6.800	\$13.600	\$27.200	\$27.200	\$27.200	\$27.200	\$27.200	\$27.200

CÁLCULO DE EGRESOS

Los Costos de Operación se componen por Costos Fijos y Costos Variables. Los costos fijos mensuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7: Costos Fijos de Operación

COSTOS MENSUAL	FIJOS	MONTO	PARTICIPACIÓN	MONTO MENSUAL
Director General		1.700.00	10%	\$170.000
Asistente de Laboratorio		700.000	80%	\$560.000
Personal técnico		480.000	80%	\$384.000
Personal Adm., Contabilidad y Finanzas		650.000	30%	\$195.000
Insumos de laboratorio		300.000	100%	\$300.000
Web, hosting		70.000	100%	\$70.000
Internet, teléfono		50.000	100%	\$50.000
Artículos de aseo		30.000	100%	\$30.000
Electricidad		150.000	100%	\$150.000
Gas		50.000	100%	\$50.000
Caja chica		30.000	100%	\$30.000
Movilización		150.000	100%	\$150.000
Total				\$2.139.000

Se ha definido un Costo Variable unitario de producción por cada producto o servicio a vender. La siguiente tabla resume estos costos:

Tabla 8: Costos variables unitarios

COSTOS VARIABLES MENSUAL	MONTO UNIDAD
Planta Vino, Uva de Mesa y Portainjerto	\$517
Servicio SAG	\$26.000
Servicio 15 Virus	\$48.750
Kit de Detección Viral	\$68.000
Saneamiento	\$68.000
Planta saneada	\$8.500

Tabla 9: Costos variables anuales (M\$)

COSTOS VARIABLES ANUALES (\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Plantas vinos (\$)	206	206	413	413	413	413	413	413	413	413
Plantas Uva de mesa (\$)	206	206	413	413	413	413	413	413	413	413
Portainjertos (\$)	330	330	826	826	826	826	826	826	826	826
Servicio SAG (\$)	3.120	3.120	7.800	7.800	7.800	7.800	7.800	7.800	7.800	7.800
Servicio 15 Virus (\$)	390	390	975	1.170	1.170	1.170	1.170	1.170	1.170	1.170
Kit de Detección Viral (\$)	680	680	1.360	3.400	3.400	3.400	3.400	3.400	3.400	3.400
Saneamiento (\$)	-	204	340	680	1.360	1.360	1.360	1.360	1.360	1.360
Planta saneada (\$)	-	1.020	1.700	3.400	6.800	6.800	6.800	6.800	6.800	6.800
Total	4.934	6.158	13.828	18.103	22.183	22.183	22.183	22.183	22.183	22.183

Los Gastos de Administración y Ventas anuales incluidos en la evaluación se resumen en la tabla 10, se estima un gasto en insumos de oficina por \$2.400.000 anual durante el período de evaluación. Se estima un gasto del 20% de las contribuciones a pagar trimestralmente por las instalaciones actuales de la empresa AgriJohnson Ltda, esto equivale a \$176.000 anual. Similarmente, se estima un gasto anual del 20% del costo total de la patente municipal para operar, lo que suma \$26.000 anuales. Finalmente se estiman \$600.000 en otros gastos de administración y ventas.

Tabla 10: Gastos de Administración y Ventas

GASTOS DE ADMINISTRACIÓN Y VENTAS	MONTO ANUAL
Insumos de oficina	\$2.400.000
Contribuciones	\$176.000
Patente municipal	\$26.000
Otros gastos de admin. Ventas y comercialización	\$600.000
Total	\$3.202.000

CÁLCULO DE INVERSIONES

La inversión para el desarrollo del proyecto se estima en \$33.000.347, los primeros dos ítems de la tabla 11 fueron financiados por fondos del presente proyecto (FIA) y los siguientes ítems fueron financiados por la empresa AgriJohnson Ltda. El capital de trabajo corresponde a los recursos necesarios para que el proyecto opere durante 3 meses. La siguiente tabla resume las inversiones:

Tabla 11: Inversiones

INVERSIONES	MONTO ANUAL	FUENTE DE FINANCIAMIENTO
Termociclador	\$3.570.000	FIA
Transiluminador UV	\$1.443.470	FIA
Gabinete de bioseguridad	\$3.979.360	AgriJohnson
Secuenciador	\$4.890.021	AgriJohnson
Invernadero	\$14.395.496	AgriJohnson
Capital de Trabajo	\$4.722.000	
Total	\$33.000.347	

EVALUACIÓN ECONÓMICA

El horizonte de evaluación considerado para el negocio es de 10 años. Considera la entrada al mercado y generación de flujos a partir del primer año, en atención a la oportunidad que representa este conjunto de soluciones en el mercado.

Escenario

En el escenario propuesto, con una tasa de descuento de 12% se obtiene una **Tasa Interna de Retorno (TIR) de 43%** y un **Valor Actual Neto (VAN) de \$109.832.094**

A su vez, se realizó una evaluación económica sin proyecto, es decir considerando los valores actualmente disponibles en el mercado como se indica en la siguiente tabla:

Servicio	Entidades	Monto por servicio
Análisis de 100 muestras para la detección de 1 virus	SAG	\$500.000
Análisis de una muestra para la detección de 10 virus	Universidad de Chile	2.5 UF
Análisis de 1 muestra para la detección de 1 virus	SAG	0.112 UTM
Análisis de una muestra para la detección de 4 virus por PCR	INIA	\$7.000
Análisis de una muestra para la detección de 1 virus mediante técnica ELISA	INIA	\$9.250
Análisis de 1000 muestras para la detección de 1 virus mediante técnica ELISA	AGDIA	405 USD
Venta de planta libre de virus certificada	Vivero Agro UC	\$1.050

Para el Servicio de Saneamiento Viral para plantas de vides no existe actualmente una alternativa en el mercado nacional.

5.4 Análisis de impacto

Como resultado del desarrollo del proyecto “Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides” se generaron 4 productos: 1) Servicio de detección múltiple viral en plantas de vides; 2) Venta de plantas libres de virus; 3) Venta de Kit de detección múltiple viral; 4) Saneamiento *in vitro* de plantas de vid infectadas con virus y venta de las plantas generadas a raíz del tratamiento.

A raíz del desarrollo del proyecto logramos implementar un sistema de detección individual para los 15 virus que infectan a las vides mediante electroforesis (**Anexo 3**) y de manera simultánea 14 de ellos (**Anexo 4, panel A**). Este hecho es de gran relevancia ya que actualmente, los análisis se hacen en forma individual, resultando mucho más lentos. Antes de esta propuesta, la empresa en forma piloto lograba la detección de solo 7 virus en una reacción a la vez. Este nos permite ofrecer un nuevo servicio de detección más eficiente y rápido.

Igualmente, se generó un producto de interés para la industria de la uva de mesa. Debido al ingreso recurrente de nuevas variedades de esta tipología de vid al país, se elaboró un kit de

diagnóstico específico para la detección de 8 virus cuarentenarios, que son de diagnóstico negativo obligatorio para permitir el ingreso de plantas de vid en el territorio nacional (**Anexo 14**).

Con el financiamiento aportado por FIA, logramos materializar la compra del secuenciador ABI PRISM – 310 Genetic Analyzer, importado desde Estados Unidos. La adquisición del equipo de secuenciación marca una diferencia en la precisión y calidad del análisis de detección de virus en las muestras de vid mediante electroforesis capilar con respecto a las tecnologías convencionales como ELISA y RT-PCR asociadas a la electroforesis en gel. El secuenciador, nos permitirá en el futuro realizar detección de patógenos en otras especies, así como realizar otro tipo de análisis de identificación varietal, análisis de microsatélites, AFLP, detección de mutaciones, perfil de expresión génica, entre otros (**Anexo 4, panel B**).

Durante el desarrollo del proyecto se conformó un Banco de germoplasma que incluye plantas de vid de mesa, de variedades de vino y portainjertos, libres de virus. El sistema de detección desarrollado en la empresa nos permitió discriminar las plantas sanas de aquellas infectadas y al mismo tiempo adquirir experiencia en la generación de material libre de virus a partir de plantas infectadas mediante embriogénesis somática y tratamientos con Ribavirina. De hecho, a esta fecha contamos con el interés de productores de frutillas que solicitan cotizar servicios de detección de virus y de saneamiento viral en sus nuevas variedades (**Anexo 9 y 10**).

La empresa aportó al proyecto con la construcción de dos invernaderos con climatización para la producción de plantas y cuarentenas. El invernadero de producción será utilizado para la propagación de material libre de virus (**Anexo 25**).

La empresa, sus servicios y el apoyo de FIA para conseguirlos, se han dado a conocer mediante actividades de difusión como charlas informativas, distribución de folletos y página web de la empresa enfocado a dar a conocer el sistema de detección múltiple viral y los servicios de saneamiento (**Anexo 16, 17 y 18**).

Adicionalmente, durante el desarrollo del proyecto, se adquirieron nuevas capacidades y competencias científicas, técnicas y profesionales. La empresa realizará una capacitación de un profesional en Estados Unidos para la detección del virus Germinovirus que afecta las vides. Cabe destacar que este virus aún no se encuentra presente en Chile, por lo que es necesario contar con un sistema que permita su detección temprana el cual será desarrollado en AgriJohnson Ltda. Gracias a la capacitación del profesional. Se estima la incorporación de 2 profesionales a horario completo (JH) para realizar los servicios generados a partir del proyecto que luego serán comercializados por Torre Verde Ltda.

5 Fichas técnicas y análisis económico

Generamos una ficha técnica para la correcta amplificación de los 15 fragmentos virales a partir de la especie *Vitis vinífera*. En ella se incluyen una pequeña descripción de los virus que analiza nuestro kit de detección, así como los reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de detección, la concentración final de cada uno de los partidores virales en la reacción, el programa de amplificación y métodos de visualización. La ficha técnica generada permite realizar ya sea la amplificación simultánea de los 14 virus mediante electroforesis capilar y de los 15 virus de manera múltiple en dos o tres grupos de partidores para su visualización en gel de agarosa, como la de los 8 virus solicitados por el SAG en su control de plagas (**Anexo 15**). Posterior al término del proyecto, AgriJohnson Ltda. incluirá en su sistema de detección múltiple, el virus de la familia Germinovirus (Goussard, *et al.*, 2017) que está afectando de manera exponencial las vides de diversas áreas geográfica (Varma, 2004), para el cual contamos con colaboración de la Universidad de Cornell, Nueva York, USA.

6 PROBLEMAS ENFRENTADOS

Durante el desarrollo del proyecto tuvimos la contratación de 3 profesionales que formaron parte del equipo técnico en períodos diferentes. Los profesionales tuvieron acceso a toda la información del desarrollo técnico llevado a cabo por el colega precedente, sin embargo se produjeron retrasos en la fecha de obtención de resultados.

Para evitar contaminación de amplificación durante los análisis de muestras vegetales, se decidió encargar nuevos partidores virales, utilizar puntas con filtro, renovar los reactivos y no incluir el control positivo en los análisis. Es probable que la contaminación sea debida a una contaminación cruzada del control positivo con los partidores virales utilizados para la amplificación (**Anexo nº 19**). La verificación de la calidad de los partidores y ausencia de contaminación se realizó varias veces durante la realización del proyecto.

7 DIFUSIÓN

La difusión de los productos generados en el proyecto se realizó a través de charlas dirigidas a productores directamente relacionados con el rubro de la producción y comercialización de plantas de vid, productores de uva de mesa y grandes viñas (**Anexo 17**).

Se realizó una primera charla informativa en las dependencias de Agrijohnson Ltda. El 14 de Diciembre de 2016. En esta charla se incluyó información general acerca de los efectos de los patógenos virales en las vides, los requisitos de sanidad para el material de importación, las alternativas de diagnóstico y las posibilidades que ofrece la nueva plataforma de diagnóstico múltiple viral para vides desarrollada en el Proyecto PYT-2014-0040. Se realizó una visita a las dependencias de Agrijohnson Ltda., dando a conocer las facilidades técnicas e invernaderos. Los asistentes fueron agricultores y productores del Valle de Curacaví y María Pinto convocados a través de la Municipalidad de Curacaví (**Anexo 17, figura a**).

Con la intención de difundir los productos generados en el proyecto entre grandes empresas, se realizó una charla de difusión de los productos generados por el proyecto en la Viña Concha y Toro en Talca el 20 de Diciembre de 2016. Además de participantes pertenecientes a la viña, asistieron el Director Centro de Investigación e Innovación de Concha y Toro y su gerente de Innovación y Desarrollo. En esta charla también estuvieron presentes productores de Viveros Guillaume y Diagnofruit (**Anexo 17, figura b**).

Una tercera charla de difusión se realizó en dependencias de la Viña Santa Rita en Alto Jahuel el 22 de Marzo de 2017. Además de personal de la viña asistieron representantes de SAG y del Vivero Gessex (**Anexo 17, figura c**).

Por último, se realizó una charla de difusión abierta a pequeños agricultores y viñateros de la zona de Curacaví y Casablanca en la Municipalidad de Curacaví el 24 de Abril de 2017 (**Anexo 17, figura d**).

En todas estas ocasiones se entregó información en una presentación oral además de un informativo en papel, como tríptico con las ventajas del test de diagnóstico múltiple, saneamiento de plantas y material libre de virus. Durante la última etapa del proyecto se preparó una página <http://www.agrijohnson.cl/inicio/> que presenta a la empresa y los productos generados en el Proyecto PYT-2014-0040.

Además de las charlas comprometidas, se presentó un trabajo de difusión de la propuesta y avances del proyecto en el Congreso sobre Innovación Hortofrutícola organizado por Conicyt y el Gobierno Regional Metropolitano en Hotel Radisson Santiago el 1 de Octubre de 2014 (**Anexo 17, panel B**). Durante la ejecución del proyecto se realizó difusión de los productos conseguidos en el proyecto en visitas técnicas realizadas por alumnos del curso de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Chile en Junio de 2016 y 2017 y también por alumnos de la Facultad de Agronomía de la P. Universidad Católica de Chile en visitas en 2015 y 2016.

8 PRODUCTORES PARTICIPANTES

Antecedentes globales de participación de productores

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
RM	PRODUCTORES PEQUEÑOS	1	1		2
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES	0	0		0

Antecedentes específicos de participación de productores

NOMBRE		UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hàs	Fecha ingreso al proyecto
		Región	Comuna	Dirección Postal		
Torre Verde Limitada		RM	Curacaví	Parcela 16B Miraflores	1,1	30/03/2017

9 CONCLUSIONES

Con el desarrollo del proyecto se logró diseñar una herramienta de diagnóstico viral múltiple en vid mediante RT-PCR múltiple asociado al uso de partidores macados y electroforesis capilar.

El diagnóstico múltiple viral permitió identificar plantas libres de virus con las que se inició un banco de germoplasma de vides de uva de mesa, de vino y portainjertos libres de virus.

Se implementó un invernadero que junto a cámaras de crecimiento permite masificar plantas libres de virus de variedades o portainjertos de vid.

Así mismo, se entregó un servicio de diagnóstico a nivel piloto para productores de uva del Valle de Curacaví.

El avance del proyecto, la nueva tecnología de diagnóstico múltiple viral y el banco de germoplasma libre de virus, fueron dadas a conocer en charlas de difusión dirigidas a pequeños productores, viñas y viveros.

Se firmó un contrato de licencia y transferencia de tecnología con la empresa Torre Verde SA. Para la comercialización de los productos derivados del proyecto.

Se concretó la venta de plantas de vid libres de virus

Se realizó un análisis económico con valores ajustados y competitivos al mercado actual que proyecta valores auspiciosos por la venta de plantas y servicios.

10 RECOMENDACIONES

Visualización análisis de diagnóstico múltiple: Las recomendaciones de uso se especifican en el manual de uso para la correcta amplificación de los virus. A pesar que el sistema de detección múltiple y simultáneo desarrollado en este proyecto se enfoca en el uso de la técnica de electroforesis capilar que permita reducir el número y costo de reactivos asociados, para la visualización en gel de agarosa se recomienda realizar 2 reacción de amplificación múltiple (8 y 7 partidores).

Plantas libres de virus certificadas: para iniciar nuevas plantaciones con variedades de uva de mesa y de vino se recomienda utilizar plantas libres de virus que tengan certificación con nuestro sistema de detección múltiple viral.

11 ANEXOS

Anexo nº 1: Stock de material vegetal establecido *in vitro* infectado con sintomatología viral

Anexo nº 2: Virus identificados a partir de material vegetal y alineamiento de secuencias virales clonadas

Anexo nº 3: Amplificación individual de 15 fragmentos virales diferentes por RT-PCR

Anexo nº 4: Amplificación múltiple de 15 fragmentos virales diferentes por RT-PCR

Anexo nº 5: Mapa control positivo con los fragmentos virales

Anexo nº 6: Establecimiento *in vitro* de estacas de variedades viníferas y uva de mesa

Anexo nº 7: Variedades viníferas y uva de mesa certificadas libre de virus

Anexo nº 8: Análisis múltiple viral en diferentes portainjertos.

Anexo nº 9: Clones certificados libres de virus de variedades comerciales de vid y portainjertos

Anexo nº 10: Métodos de saneamiento viral en plantas de vid

Anexo nº 11: Tasa porcentual de éxito del sistema de detección múltiple viral

Anexo nº 12: Servicio validado de detección múltiple viral a los productores de Chicha del Valle de Curacaví

Anexo nº 13: Optimización de las condiciones de RT-PCR para la detección múltiple viral

Anexo nº 14: Prototipo de Kit de diagnóstico múltiple viral en vides

Anexo nº 15: Instructivo de uso para la detección múltiple viral

Anexo nº 16: Acuerdos de licenciamiento sobre Kit de detección múltiple viral

Anexo nº 17: Difusión del sistema de detección múltiple viral en visitas de campo.

Anexo nº 18: Tríptico informativo del sistema de detección múltiple viral en vid

Anexo nº 19: Difusión y posicionamiento en el mercado con el sistema de detección múltiple viral en vides

Anexo nº 20: Amplificación del "virus GLRaV-8" en muestras de vid

Anexo nº 21: Contaminación de partidores virales

Anexo nº 22: Amplificación individual de 15 fragmentos virales por RT-PCR obtenidos de diferentes fuentes: plantas infectadas o secuencias controles clonadas

Anexo nº 23: Amplificación múltiple y simultánea de 10 fragmentos virales

Anexo nº 24: Chequeo integridad cDNA a partir de retrotranscripción del RNA total de material vegetal infectado

Anexo nº 25: Invernadero de producción y cuarentenario

Anexo nº 26: Cotización servicio de detección múltiple de virus en vides a vivero

Anexo nº 27: Registro de participantes en charlas de difusión.

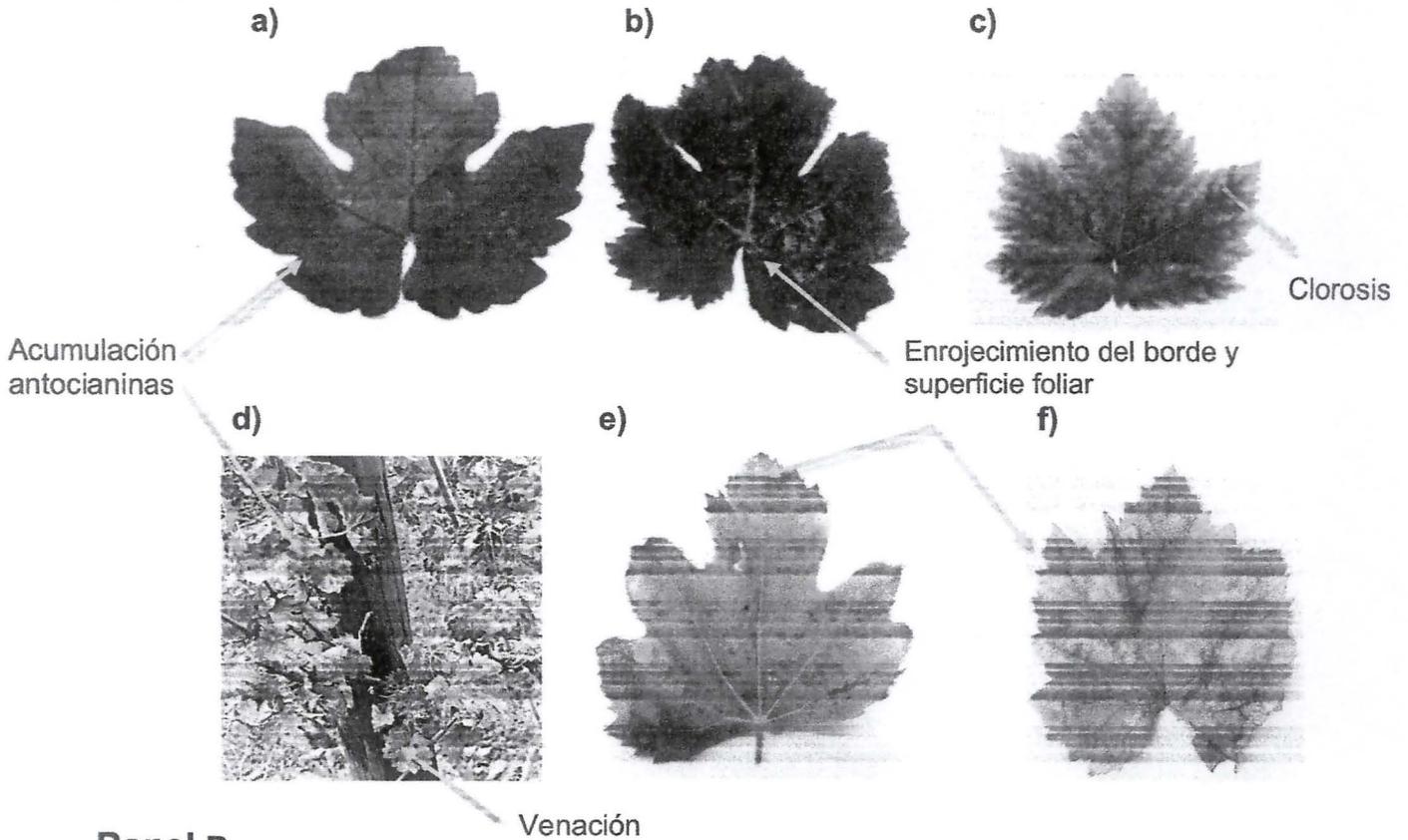
Anexo 28: Lista de productores y empresarios contactados para difusión de los servicios

Anexo 29: Facturas por venta de plantas de vid libres de virus

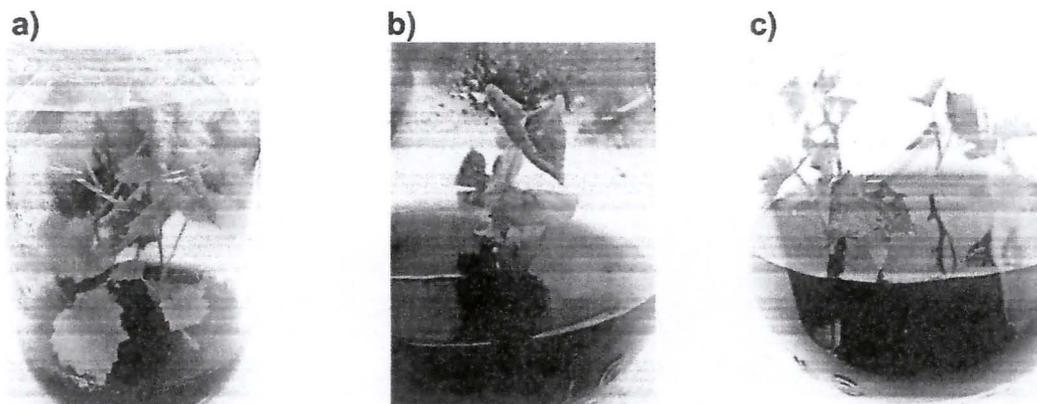
Anexo 30: Contrato de licenciamiento nacional firmado ante notario.**Anexo 31:** Análisis viral de variedades de vid por el Servicio Agrícola y Ganadero.

Anexo Nº 1

Panel A.



Panel B.



Stock de material vegetal establecido *in vitro* infectado con sintomatología viral.

En el **panel A** se observan muestras de hojas con sintomatología viral presentes en campo y en invernadero. **a)** Planta SAG (invernadero) presenta acumulación de antocianinas y venación verde. **b)** Planta SAG (invernadero) viene indicada como GVA positiva. **c)** Planta País (invernadero) con síntomas de clorosis al borde de la hoja, típicos del género *Nepovirus*. **d)** Cabernet Sauvignon (campo) presenta sintomatología de la especie GLRaV ya que se observa

una gran acumulación de antocianinas en la hoja (color rojizo) y venación marcada de color verde. Además, está señalada como GLRaV-3 positiva. **e)** Autumn Royal (campo), muestra una sintomatología típica del género Vitivirus (GVA, GVB o RSPaV) con enrojecimiento en el borde foliar. **f)** Muestra País (invernadero), presenta una coloración rojiza que parte desde el borde foliar al centro, una sintomatología característica del género Closterovirus. A partir de dichas plantas se extrajo el ARN para identificar la especie viral presente.

En el **panel B** se observan plantas con sintomatología viral *In-Vitro*, algunas de ellas no son capaces de sobrevivir a la infección, por lo que las réplicas de cada individuo son fundamentales. **a)** Variedad 110 Richter *in vitro* con notorio síntoma de enrollamiento de la hoja. **b)** Réplica de Salt Creek *in vitro* presenta algunas hojas con clorosis y enrollamiento. **c)** Variedad Elizabeth presenta un enrojecimiento al borde de la hoja indicada.

Anexo nº 2

Panel A

Virus	Virus identificado en material infectado	Clonado en vector de clonación
<i>GLRaV-1</i>	Si	Si
<i>GLRaV-2</i>	Si	Si
<i>GLRaV-3</i>	Si	Si
<i>GLRaV-4</i>	Si	Si
<i>GLRaV-7</i>	Si	Si
<i>GVA</i>	Si	Si
<i>GVB</i>	Si	Si
<i>GFkV</i>	Si	Si
<i>GFLV</i>	Si	Si
<i>ToRSV</i>	Si	Si
<i>RPSPaV</i>	Si	Si
<i>ArMV</i>	No	No
<i>GRSLaV</i>	No	No
<i>TRSV</i>	No	No
<i>SLRSV</i>	No	No
Total	11	11

Panel B

a)

```

Template      TTCAGCTTACTCTGGTCTCTATGGGGGTGAAAGAGGTGGTGGCATATGGGGACAAGAACC
GLRaV1-1     TTCAGCTTACTCTGGTCTCTATGGG GTGAAAGAGGTGATAGC ATAGGGGGACAAGAACC
*****

```

```

Template      AGATTCCGTTTCATCAACAGAGAGAAGACATTCGTGACTCCAAATGAAGC 109
GLRaV1-1     AATTCCGTTTCATCAACAGAGAGAAGACATTCGTGACTCCAAATGAAGC 109
* *****

```

b)

```
template      TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
LR2_Clone1    TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
LR2_Clone3    TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
LR2_Clone4    TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
LR2_Clone5    TACACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
LR2_Clone2    ATTACCTCTCGCAATGTTTATCACTGTGATTATGACTCTGCTTATGTAAAAATATTTTACA 60
                *****

template      AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
LR2_Clone1    AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
LR2_Clone3    AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
LR2_Clone4    AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
LR2_Clone5    AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
LR2_Clone2    AACCTTCCGGCCGCATTGGCCGCTAGTTCGTTCCGATCCGACATCTTTAACCTCCGTAATA 120
                *****

template      ACGCTGAAGATTACCGGTC 139
LR2_Clone1    ACGCTGAAGATTACCGGTC 139
LR2_Clone3    ACCCTGAAGATTACCGGTC 139
LR2_Clone4    ACGCTGAAGATTACCGGTC 139
LR2_Clone5    ACGCTGAAGATTACCGGTC 139
LR2_Clone2    ACGCTGAAGATTACCGGTC 139
                *****
```

c)

```
Template      TAACCACCATGAAGTTCATAGGGAACGTGAAGTTGTCCGACTTCACACCC
GLRaV3-53    TAACCACCATGAAGTTCATAGGGAACGTGAAGTTGTCCGACTTCACACCC
GLRaV3-101   TAACCACCATGAAGTTCATAGGGAACGTGAAGTTGTCCGACTTCACACCC
GLRaV3-11    TAACCACCATGAAGTTCATAGGGAACGTGAAGTTGTCCGACTTCACACCC
GLRaV3-61    TAACCACCATGAAGTTCATAGGGAACGTGAAGTTGTCCGACTTCACACCC
                *****

Template      AGGTGCGCAGCTATGATTTACATTGGAAAGCTCACCAAGGGGTGAAGCG
GLRaV3-53    A^GTGCGCAGCTATGATTTACATTGGAAAGCTCACCAAGGGGTGAAGCG
GLRaV3-101   A^GTGCGCAGCTATGATTTACATTGGAAAGCTCACCAAGGGGTGAAGCG
GLRaV3-11    A^GTGCGCAGCTATGATTTACATTGGAAAGCTCACCAAGGGGTGAAGCG
GLRaV3-61    A^GTGCGCAGCTATGATTTACATTGGAAAGCTCACCAAGGGGTGAAGCG
                * *****

Template      TACGTTTGTCCCCCACCAGTTAAAGGGTTTGCACGGCAGTACGCTGTTG
GLRaV3-53    TACGTTTGTCCCCCACCAGTTAAAGGGTTTGC^CGGCAGTACGCTGTTG
GLRaV3-101   TACGTTTGTCCCCCACCAGTTAAAGGGTTTGC^CGGCAGTACGCTGTTG
GLRaV3-11    TACGTTTGTCCCCCACCAGTTAAAGGGTTTGC^CGGCAGTACGCTGTTG
GLRaV3-61    TACGTTTGTCCCCCACCAGTTAAAGGGTTTGCACGGCAGTACGCTGTTG
                *****

Template      TCAGCGGCTCAGTCAGCGCGCTGAGAGGGGATGGTAAGAAGGCTTTGATG
GLRaV3-53    TCAGCGGCTCAGTCAGCGCGCTGAGAGGGGATGGTAAGAAGGCTTTGATG
GLRaV3-101   TCAGCGGCTCAGTCAGCGCGCTGAGAGGGGATGGTAAGAAGGCTTTGATG
GLRaV3-11    TCAGCGGCTCAGTCAGCGCGCTGAGAGGGGATGGTAAGAAGGCTTTGATG
GLRaV3-61    TCAGCGGCTCAGTCAGCGCGCTGAGAGGGGATGGTAAGAAGGCTTTGATG
                *****

Template      GAGGCAAGGACCTCAACTTCCGCAACTTCCGACGTGCTGATTTCCGACGT
GLRaV3-53    GAGGCAAGGACCTCAACTTCCGCAACTTCCGACGTGCTGATTTCCGACGT
GLRaV3-101   GAGGCAAGGACCTCAACTTCCGCAACTTCCGACGTGCTGATTTCCGACGT
GLRaV3-11    GAGGCAAGGACCTCAACTTCCGCAACTTCCGACGTGCTGATTTCCGACGT
GLRaV3-61    GAGGCAAGGACCTCAACTTCCGCAACTTCCGACGTGCTGATTTCCGACGT
                *****

Template      CGTATTCGAAGCTGTTTCTAATGC 274
GLRaV3-53    CGTATTCGAAGCTGTTTCTAATGC 274
GLRaV3-101   CGTATTCGAAGCTGTTTCTAATGC 274
GLRaV3-11    CGTATTCGAAGCTGTTTCTAATGC 274
GLRaV3-61    CGTATTCGAAGCTGTTTCTAATGC 274
                *****
```

d)

```

GLRaV4      TAAAGTTTCTGGATGCGAGTTCGGTCACTGAGTACTTCGGAAAAGGTACCGAACGTTTA
GLRaV4-1   TAAAGTTTCTGGATGCGAGTTCGGTCACTGAGTACTTCGGAAAAGGTACCGAACGTTTA
GLRaV4-3   TAAAGTTTCTGGATGCGAGTTCGGTCACTGAGTACTTCGGAAAAGGTACCGAACGTTTA
GLRaV4-4   TAAAGTTTCTGGATGCGAGTTCGGTCACTGAGTACTTCGGAAAAGGTACCGAACGTTTA
            *****
GLRaV4      ATAATGTAGTTAATACTACTAGTGCCTGCAAGCGATTACTGTTGTTAACCGTACCCG
GLRaV4-1   ATAATGTAGTTAATACTACTAGTGCCTGCAAGCGATTACTGTTGTTAACCGTACCCG
GLRaV4-3   ATAATGTAGTTAATACTACTAGTGCCTGCAAGCGATTACTGTTGTTAACCGTACCCG
GLRaV4-4   ATAATGTAGTTAATACTACTAGTGCCTGCAAGCGATTACTGTTGTTAACCGTACCCG
            *****
GLRaV4      CTTTGGCAACTTCTTGAGTGGCTTCTGTA 150
GLRaV4-1   CTTTGGCAACTTCTTGAGTGGCTTCTGTA 150
GLRaV4-3   CTTTGGCAACTTCTTGAGTGGCTTCTGTA 150
GLRaV4-4   CTTTGGCAACTTCTTGAGTGGCTTCTGTA 150
            *****

```

e)

```

GLRaV7      ATCACCATATATCCCAACGGAGATGGCAATTTATGATGATAAATTCCTTGTCCATAGGTT
GLRaV7-23  ATCACCATATATCCCAACGGAGATGGCAATTTATGATGATAAATTCCTTGTCCATAGGTT
GLRaV7-22  ATCACCATATATCCCAACGGAGATGGCAATTTATGATGATAAATTCCTTGTCCATAGGTT
GLRaV7-63  ATCACCATATATCCCAACGGAGATGGCAATTTATGATGATAAATTCCTTGTCCATAGGTT
            *****
GLRaV7      TGCCCGGAAACTTGTTCATCTTAAATCGGACAAATATACTATTTACTATGATCTGAAACG
GLRaV7-23  TGCCCGGAAACTTGTTCATCTTAAATCGGACAAATATACTATTTACTATGATCTGAAACG
GLRaV7-22  TGCCCGGAAACTTGTTCATCTTAAATCGGACAAATATACTATTTACTATGATCTGAAACG
GLRaV7-63  TGCCCGGAAACTTGTTCATCTTAAATCGGACAAATATACTATTTACTATGATCTGAAACG
            *****
GLRaV7      TTGGGTTGGTGTGATTCTTTGAATTTTGAAGAATAAGAGACAAATTAACCTAAATA
GLRaV7-23  TTGGGTTGGTGTGATTCTTTGAATTTTGAAGAATAAGAGACAAATTAACCTAAATA
GLRaV7-22  TTGGGTTGGTGTGATTCTTTGAATTTTGAAGAATAAGAGACAAATTAACCTAAATA
GLRaV7-63  TTGGGTTGGTGTGATTCTTTGAATTTTGAAGAATAAGAGACAAATTAACCTAAATA
            *****
GLRaV7      CAATACAATATTTCAGGACAAGCATCGTT
GLRaV7-23  CAATACAATATTTCAGGACAAGCATCGTT
GLRaV7-22  CAATACAATATTTCAGGACAAGCATCGTT
GLRaV7-63  CAATACAATATTTCAGGACAAGCATCGTT
            *****

```

f)

```

Teórico    -----CGTCTGAGGT--TTCTACTATATATATGATATTCAGTCTCCACCCATTTGAC
GVA-24     CCTCAICGTCTGAGGTCTATATATATATATGATATTCAGTCTCCACCCATTTGAC
            *****
Teórico    CCAAGTTCGGTAAACAGGAGTCTCGCCCGTTAGAGCTACTCTCCCTCTTTACAGAACCG
GVA-24     CCAAGTTCGGTAAACAGGAGTCTCGCCCGTTAGAGCTACTCTCCCTCTTTACAGAACCG
            *****
Teórico    TAGTCTATCGAGTTTATGACCGAAATACTACTGGACTTGCAGTCCCTATTGTTGTGCAT
GVA-24     TAGTCTATCGAGTTTATGACCGAAATACTACTGGACTTGCAGTCCCTATTGTTGTGCAT
            *****
Teórico    TATAGCACACACTTACACACATTCATGCGCCTAGCGCGCCTACGCTTAGCAAACGTGGA
GVA-24     TATAGCACACACTTACACACATTCATGCGCCTAGCGCGCCTACGCTTAGCAAACGTGGA
            *****
Teórico    CC
GVA-24     CC
            **

```

g)

```
GVB_Clone4 TAGTGATGGGTTGTTTGATTACCATGTACCTGACTTTCCTAAGGGATTATTTTCGCTAAGAA 60
GVB_Clone5 ---TGATGGGTTGTTTGATTACCATGTACCTGACTTTCCTAAGGGATTATTTTCGCTAAGAA 57
GVB_Clone1 TAGTGATGGGTTGTTTGATTACCATGTACCTGACTTTCCTAAGGGATTATTTTCGCTAAGAA 60
GVB_Clone3 TAGTGATGGGTTGTTTGATTACCATGTACCTGACTTTCCTAAGGGATTATTTTCGCTAAGAA 60
template TAGTGATGGGTTGTTTGATTACCATGTACCTGACTTTCCTAAGGGATTATTTTCGCTAAGAA 60
*****

GVB_Clone4 AGGGGTACATACGAGTGTGCACCTCATTTCAGGCACACCCCTCACCCATGTTCAAAAATGAT 120
GVB_Clone5 AGGGGTACATACGAGTGTGCACCTCATTTCAGGCACACCCCTCACCCATGTTCAAAAATGAT 117
GVB_Clone1 AGGGGTACATACGAGTGTGCACCTCATTTCAGGCACACCCCTCACCCATGTTCAAAAATGAT 120
GVB_Clone3 AGGGGTACATACGAGTGTGCACCTCATTTCAGGCACACCCCTCACCCATGTTCAAAAATGAT 120
template AGGGGTACATACGAGTGTGCACCTCATTTCAGGCACACCCCTCACCCATGTTCAAAAATGAT 120
*****

GVB_Clone4 TGAAAATCATATTCCTTATAACATAGTTAGTCAATATGTAGATGACTCCACATTATTTGT 180
GVB_Clone5 TGAAAATCACATTCTTTATAATATAGTTAGTCAATATGTAGATGACTCCACATTATTTGT 177
GVB_Clone1 TGAAAATCACATTCTTTATAATATAGTTAGTCAATATGTAGATGACTCCACATTATTTAT 180
GVB_Clone3 TGAAAATCACATTCTTTATAATATAGTTAGTCAATATGTAGATGACTCCACATTATTTAT 180
template TGAAAATCACATTCTTTATAATATAGTTAGTCAATATGTAGATGACTCCACATTATTTGT 180
*****

GVB_Clone4 TAGTTGTAAGGAATCAAAGCTTAGGACCTTGTTTCATGAAAAGACCAACAAATCCTTGAG 240
GVB_Clone5 TAGTTGTAAGGAATCAAAGCTTAGGACCTTGTTTCATGAAAAGACCAACAAATCCTTGAG 237
GVB_Clone1 TAGTTGTAAGGAATCAAAGCTTAGGACCTTGTTTCATGAAAAGACCAACAAATCCTTGAG 240
GVB_Clone3 TAGTTGTAAGGAATCAAAGCTTAGGACCTTGTTTCATGAAAAGACCAACAAATCCTTGAG 240
template TAGTTGTAAGGAATCAAAGCTTAGGACCTTGTTTCATGAAAAGACCAACAAATCCTTGAG 237
*****

GVB_Clone4 CAATGTGACTCAATACAACAGGTTGGTCCACGCAAGGATGTGCTAAGATACACAGACCC 300
GVB_Clone5 CAATGTGACTCAATACAACAGGTTGGTCCACGCAAGGATGTGCTAAGATACACAGACCC 297
GVB_Clone1 CAATGTGACTCAATACAACAGGTTGGTCCACGCAAGGATGTGCTAAGATACACAGACCC 300
GVB_Clone3 CAATGTGACTCAATACAACAGGTTGGTCCACGCAAGGATGTGCTAAGATACACAGACCC 300
template CAATGTGACTCAATACAACAGGTTGGTCCACGCAAGGATGTGCTAAGATACACAGACCC 297
*****

GVB_Clone4 CGTAAGGGAGCTGGACATGGAGCATCTTGTCAAGCTATCTGAGCTATCCAAGAGAGCA 358
GVB_Clone5 TGTAAGGGAGCTGGACATGGAGCATCTTGTCAAGCTATCTGAGCTATCCAAGAGAGCA 355
GVB_Clone1 CGTAAGGGAGCTGGACATGGAGCATCTTGTCAAGCTATCTGAGCTATCCAAGAGAGCA 358
GVB_Clone3 CGTAAGGGAGCTGGACATGGAGCATCTTGTCAAGCTATCTGAGCTATCCAAGAGAGCA 358
template CGTAAGGGAGCTGGACATGGAGCATCTTGTCAAGCTATCTGAGCTATCCAAGAGAGCA 355
*****
```

h)

```
Template TTCACAACACAATCCAGAAGGATACGATCGCCTCCATCATTGCCGCCCTCAACCCCTT 60
GFKV-1 TTCACAACACAATCCAGAAGGATACGATCGCCTCCATCATTGCCGCCCTCAACCCCTT 60
GFKV-2 TTCACAACACAATCCAGAAGGATACGATCGCCTCCATCATTGCCGCCCTCAACCCCTT 60
*****

Template CCCTCACCCTCCTCCCTCACCCCTACCCCTACGCGCTCCCCCGCGCTGGCCCTCCGCC 120
GFKV-1 CCCTCACCCTCCTCCCTCACCCCTACCCCTACGCGCTCCCC CGCGCTGGCCCTCCGCC 120
GFKV-2 CCCTCACCCTCCTCCCTCACCCCTACCCCTACGCGCTCCCC CGCGCTGGCCCTCCGCC 120
*****

Template TCAACCAAGCCGGCATCCCGCCACTTCCTACGGCCACCAATCCCACCCCAACCAATCC 180
GFKV-1 TCAACCAAGCCGGCATCCCGCCACTTCCTACGGCCACCAATCCCACCCCAACCAATCC 180
GFKV-2 TCAACCAAGCCGGCATCCCGCCACTTCCTACGGCCACCAATCCCACCCCAACCAATCC 180
*****

Template ACAAGACCATTGAAACCCATCTCCTCCATGAGCATTGGGCCAACCGTGGGACTCTCCCGT 240
GFKV-1 ACAAGACCATTGAAACCCATCTCCTCATGAGCATTGGGCCAACCGTGGGACTCTCCCGT 240
GFKV-2 ACAAGACCATTGAAACCCATCTCCTCATGAGCATTGGGCCAACCGTGGGACTCTCCCGT 240
*****

Template CCACGGTCATGTTTCATGAAGAG 262
GFKV-1 CCACGGTCATGTTTCATGAAGAG 262
GFKV-2 CCACGGTCATGTTTCATGAAGAG 262
*****
```

i)

Teórico TGATAGAGAAGGTTTGCCTGGTTCCCTCCACACTTTCCCATTTAGTAGAGGTCCCACCATCC
 GFLV TGATAGATTAGTTTGCCTGGTTCCCTCCACTT--TCCCTTGTTAGGTCCCACCATCC
 ***** * ***** * ** *

Teórico TAATACTAGAACCACCCCTATTTCAACTCTTGCTTCAGGGGTCCCAGTAACCAGGCTTC
 GFLV TAATACTAGAACCACCCCTATTTCAACTCTAGCTTCAGGGGTCCCAATAACCAGGCTTC
 ***** * ***** *

Teórico CCTCAGCGCACACCACAACAGTATTACCCATCATAGTGGCTCTGAGTGTCTCCCTTGCA
 GFLV CCTCAGCGCACACACAACAGTATTACCCATCATATGGATCTGAGTGTCTCCCTTGCA
 ***** * ***** *

Teórico CCTGGGCTGGTGCACGGTACTGGCCACCGTTCGATAGTGCATGGAGCCAACGTGTGAC
 GFLV CCTGGGCTGGTGCACGGTACTGGCCACCGTTCGATAGTGCATGGAGCCAACGTGTGAC
 ***** * ***** *

Teórico GTAAAGTGCCAACTAA-
 GFLV GAAAGTGCCAACTAA
 * *****

j)

Teórica CGTCTCTGATGAGTTCATGGACGCTCTGCCCTTTTGTCTCTCCACTGGTATCGCACCA 60
 ToRSV CGTCTCTGATGAGTTCATGGACGCTCTGCCCTTTTGTCTCTCCACTGGTATCGCACCA 60
 ***** * *****

Teórica GGAAGAGGAACCAGAAATGGTTCCCTGCTGTGTTGGAAGCAGCAGATTCAGTTGGTATAT 120
 ToRSV GGAAGAGGAATCAAAATGGTTCCCTGCTGTGTTGGAAGCAGCAAATTCATTTGATGATAT 120
 ***** ** *****

Teórica CACCGAAGCCTTCTTTGATGACTTGGAAATGTGAGTCTTCTATGACTCATATTCTGATGA 180
 ToRSV CACCGAAGCCTTCTTTGATGACTTGGAAATGTGAGTCTTCTATGACTCATATTCTGATGA 180
 ***** **

Teórica AGAAGAAGCTGAGTGGGCTGAAGTGCCAAGGTGTAAGACTATGCTGAACTTTGCGCTTC 240
 ToRSV AGAAGAAGCTGAGTGGGCTGAAGTGCCAAGGTGTAAGACTATGCTGAACTTTGCGCTTC 240
 ***** *****

Teórica TCTTACTCTTCCGGGTGACGCCGAGGGGTACGTAAGTCTCAGGGGTTTTTTAAAACG 300
 ToRSV TCTCACTTTTGTGGGTGACGCCGAGGGGTACGTAAGTCTCACAATGACTTATTTCCGGCG 300
 *** ** * ***** * ** ** *

Teórica CCTTGTGACTTACCTTCACTCCTTCGAAGAGCCACTTTACTCTTCACGCGCCTTTTATAG 360
 ToRSV CCTTGTGGCTTACTTTCGGTCCCTCGAAGAGCCCTTACTCTTCACGCGCCTTTTATAG 360
 ***** ** * *****

Teórica CGTGAAGGTGAAGCCAGTTTATCGTCCCAAAAAATTTGAGGGACATATCGATTGTACCT 419
 ToRSV CGTGAAGGTGAAGCCAGTTTATCGTCCCAAAAAATTTGAGGGACATATCGATTGTACCT 419

k)

```

Teórica AGCTTCTCAAGGCATTAGTAGACTTAGAGGAAAGTCAGCACAAATTGTTCTCTTTCCGCA
RSPaV AGCTTCTCAAGGCATTAGTAGACTTAGAGGAAAGTCAGCACAAATTGTTCTCTTTCCGCA
*****

Teórica TGCCTGATAGAAGCAAAGAAAGGCTGATATCTTCTGGCATTACTTAAGTCCTTACAGTT
RSPaV TGCCTGATAGAAGCAAAGAAAGGCTGATATCTTCTGGCATTACTTAAGTCCTTACAGTT
*****

Teórica TCAGACCCCACTCACATCCAGTTTGTA AAAACTTTAGAAAATCACATTTTGTACAAATGTTT
RSPaV TCAGACCCCACTCACATCCAGTTTGTA AAAACTTTAGAAAATCACATTTTGTACAAATGTTT
*****

Teórica TACCTAGTTATCTTAATAATTCATTTTACTTTGTAGGAATCAAGGATTTTAAGTCGAGT
RSPaV TACCTAGTTATCTTAATAATTCATTTTACTTTGTAGGAATCAAGGATTTTAAGTCGAGT
*****

Teórica TCTTGAAAAGGAGGAATAAGGATCTCAGCTTGGTAGCACTCATAAATAGGTTTGTGACAA
RSPaV TCTTGAAAAGGAGGAATAAGGATCTCAGCTTGGTAGCACTCATAAATAGGTTTGTGACAA
*****

Teórica GTCGTGATGTTAGTAGGTATGGGCTCTGAGTTCGTTATAAGTTCTAGTGACAAATCAAGTC
RSPaV GTCGTGATGTTAGTAGGTATGGGCTCTGAGTTCGTTATAAGTTCTAGTGACAAATCAAGTC
*****

Teórica AGGTTGTCAGTAGAAAAGGGCATTGG
RSPaV AGGTTGTCAGTAGAAAAGGGCATTGG
*****

```

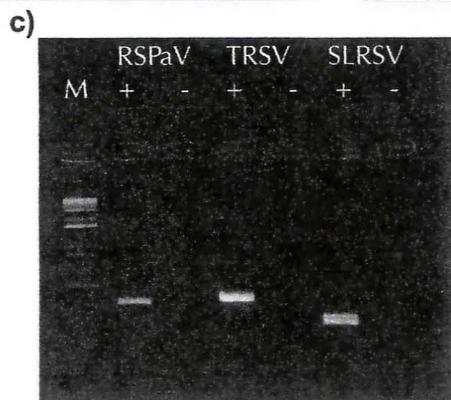
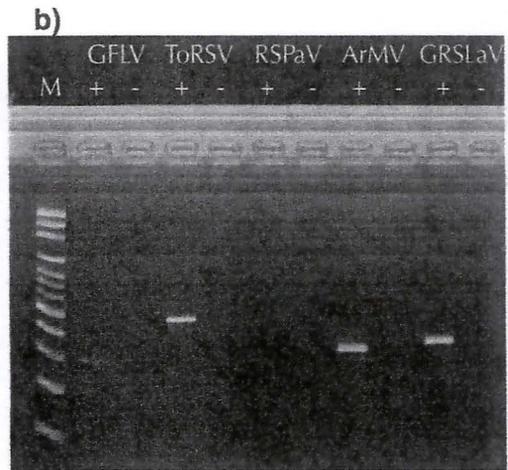
Virus identificados a partir de material vegetal y alineamiento de secuencias virales clonadas

En el **Panel A** se muestran los virus que fueron detectados a partir de material vegetal infectado (segunda columna), dichos fragmentos virales fueron clonados en un vector de clonación pCR®2.1-TOPO® en *Escherichia coli* (tercera columna). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmidial de los clones positivos los cuales fueron secuenciados para corroborar el virus identificado.

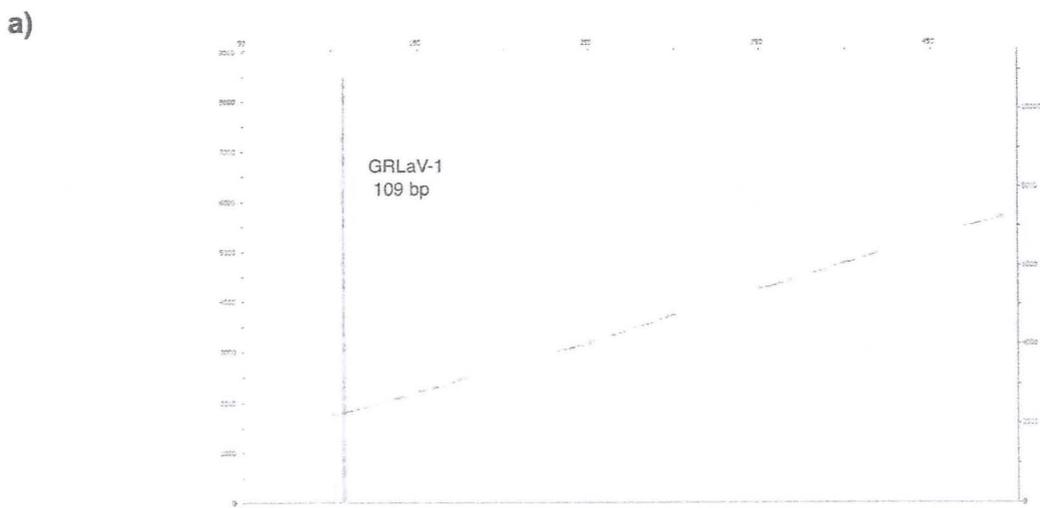
En el **Panel B** se muestra el alineamiento de las secuencias virales identificadas a partir de material vegetal infectado. Las secuencias fueron alineadas con las secuencias disponibles en la base de datos de NCBI calculando el % de identidad entre ambas. Se corroboró la secuencia viral de GLRaV-1 (**figura a**) con un 94% de identidad, GLRaV-2 (**figura b**) con un 98% de identidad, GLRaV-3 (**figura c**) con un 99% de identidad, GLRaV-4 (**figura d**) con un 95% de identidad, GLRaV-7 (**figura e**) con un 98% de identidad, GVA (**figura f**) con un 96,4% de identidad, GVB (**figura g**) con un 99% de identidad, GFkV (**figura h**) con un 97% de identidad, GFLV (**figura i**) con un 91,4% de identidad, ToRSV (**figura j**) con un 93% de identidad, RSPaV (**figura k**) con un 99% de identidad.

Anexo nº 3

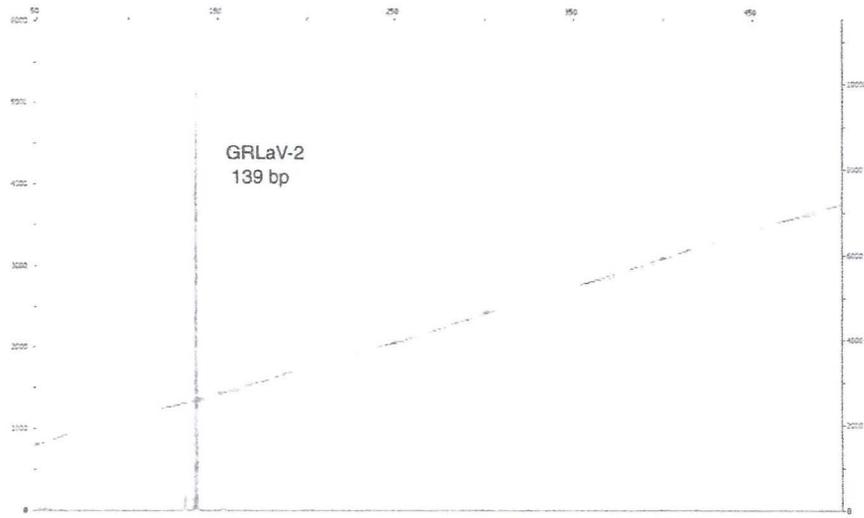
Panel A



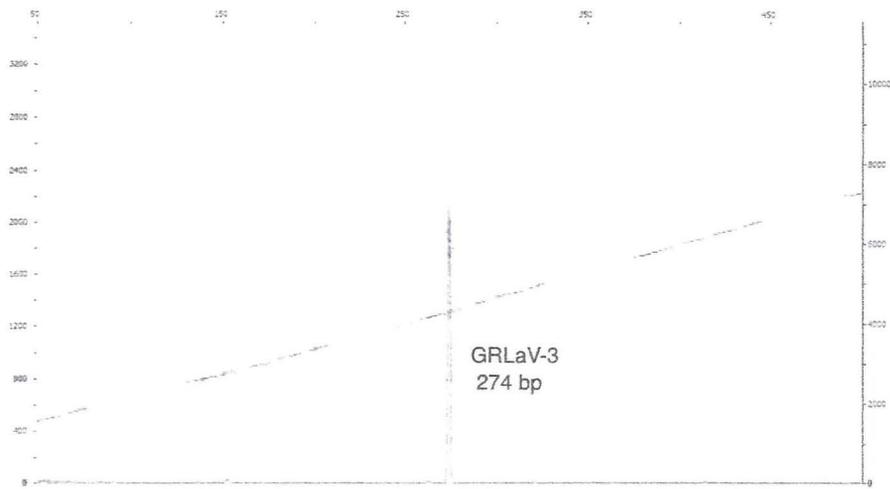
Panel B



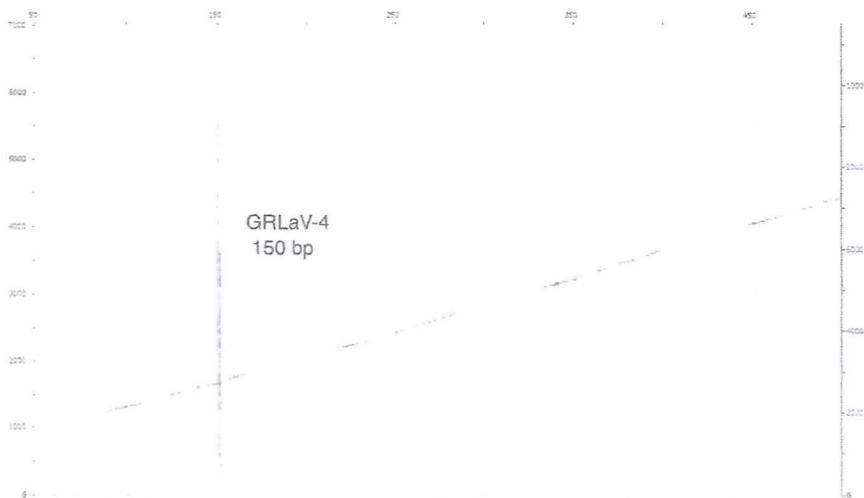
b)



c)



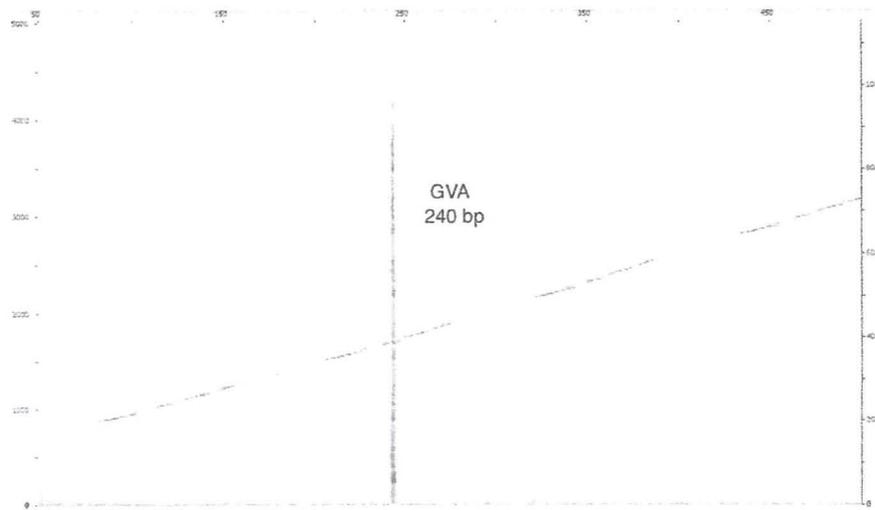
d)



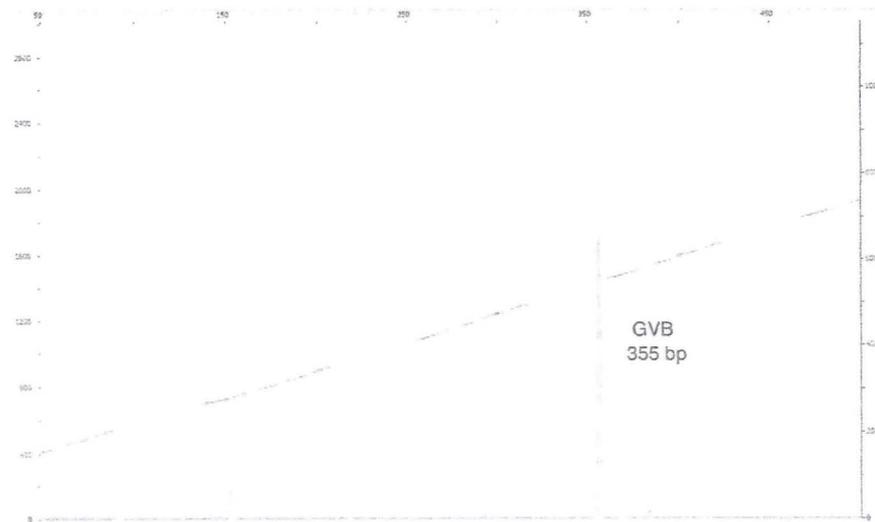
e)



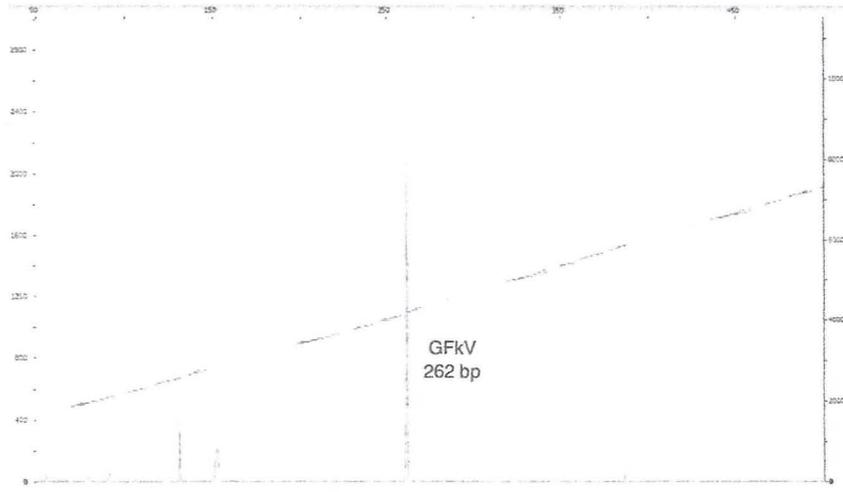
f)



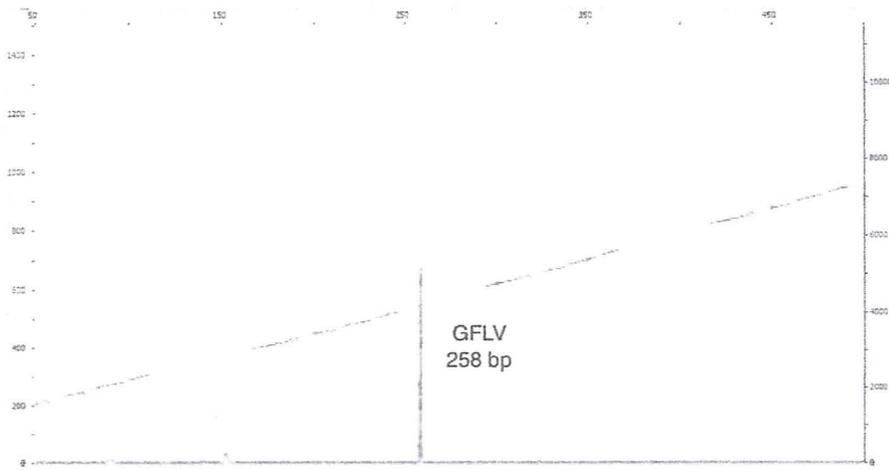
g)



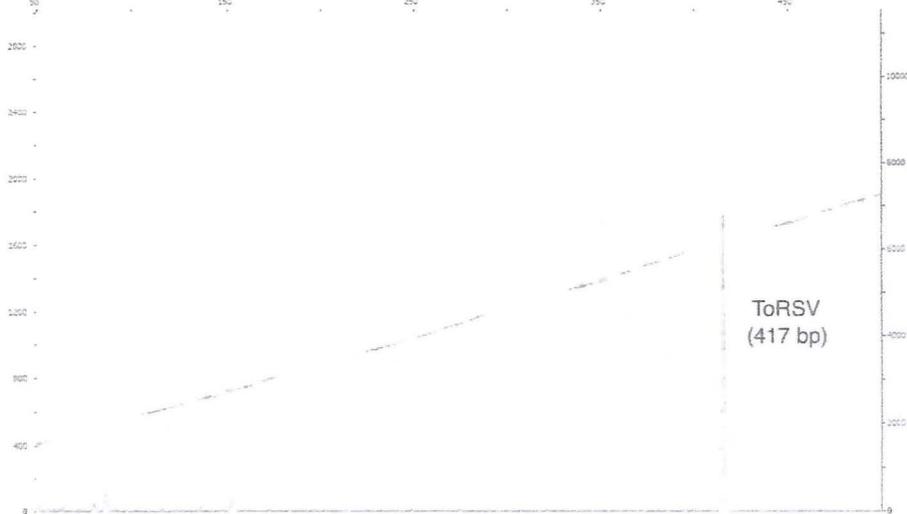
h)



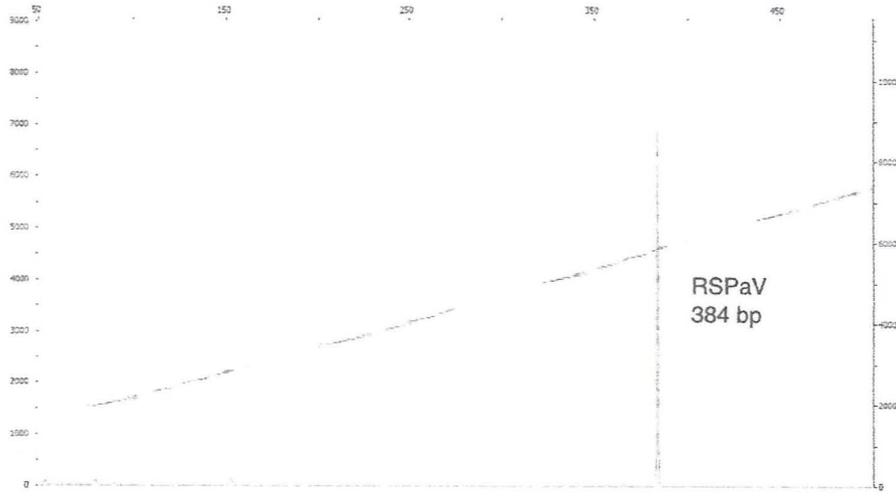
i)



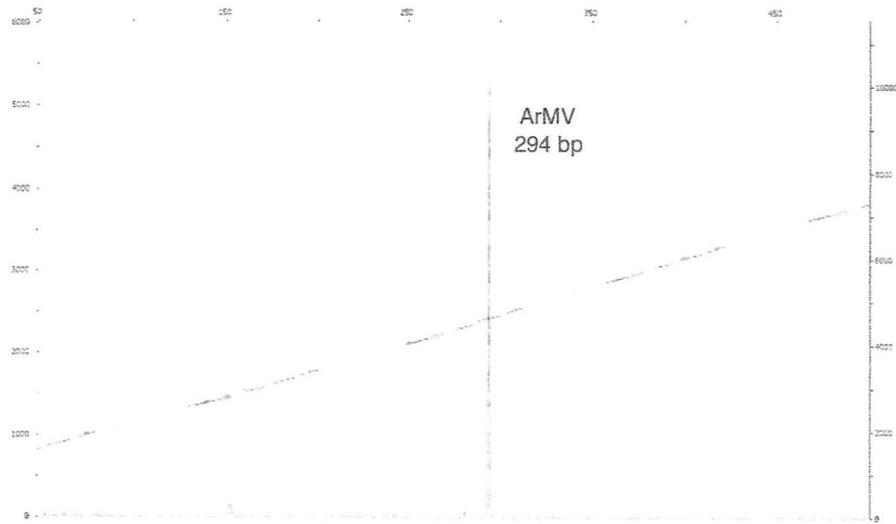
j)



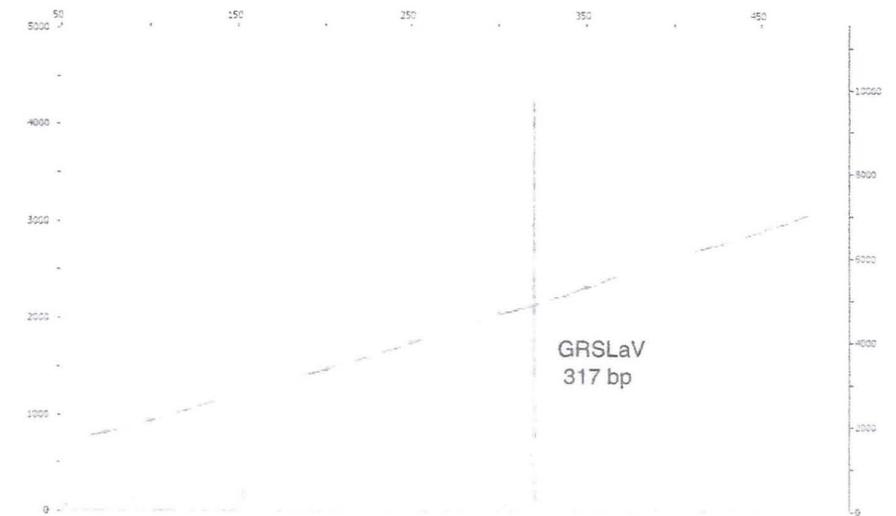
k)



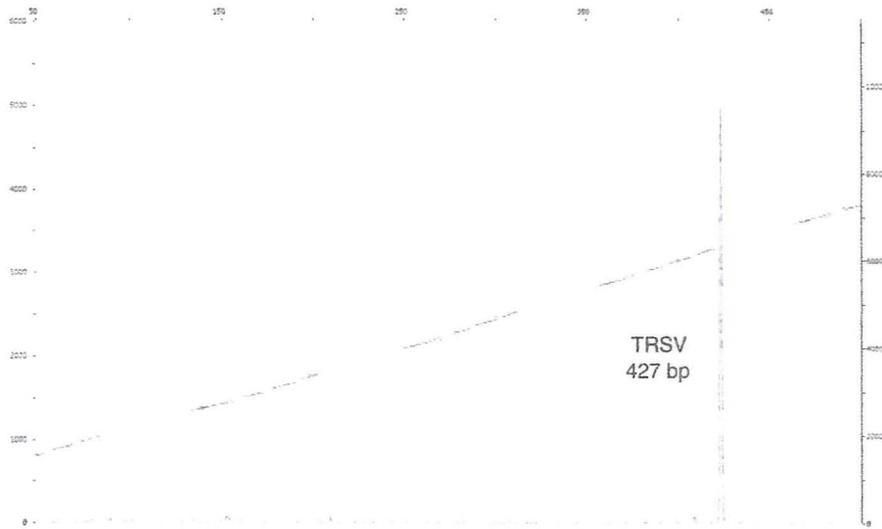
l)



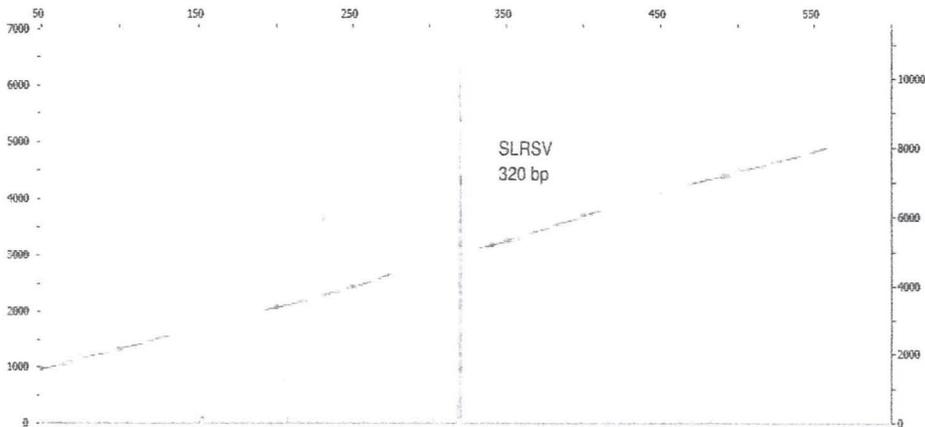
m)



n)



o)



Amplificación individual de 15 fragmentos virales diferentes por RT-PCR

Se realiza la amplificación individual por RT-PCR de los 15 fragmentos virales a partir de los controles positivos sintetizados, los cuales se observan por electroforesis en gel de agarosa y mediante electroforesis capilar. En el **Panel A** se observan los 15 fragmentos virales amplificados por RT-PCR y visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. En la **figura a)** se observa la amplificación de los virus: GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GVB (355 bp), GFKV (262 bp); en la **figura b)** se observa la amplificación de los virus: GFLV (258 bp), ToRSV (417 bp), ArMV (295 bp) y GRSLaV (317 bp); en la **figura c)** se observa la amplificación de los virus: RSPaV (384 bp), TRSV (427 bp) y SLRSV (320 bp).

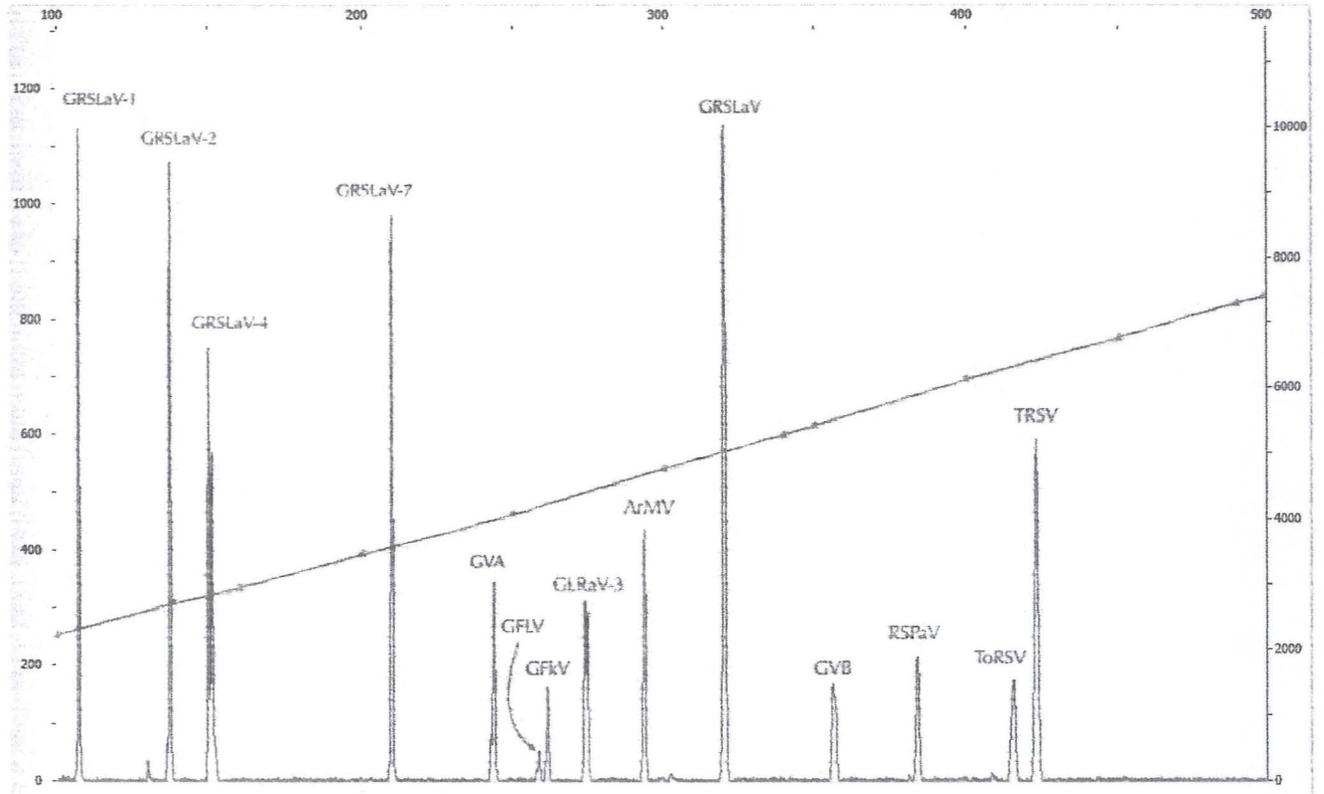
En el **Panel B** se observan los 15 fragmentos virales amplificados individualmente por RT-PCR con partidores marcados con fluoróforo y visualizados por electroforesis capilar mediante el análisis de fragmentos con el secuenciador ABI PRISM 310. Se observa la amplificación de a)

GLRaV-1 (109 bp); **b**) GLRaV-2 (139 bp); **c**) GLRaV-3 (274 bp); **d**) GLRaV-4 (150 bp); **e**) GLRaV-7 (209 bp); **f**) GVA (240 bp); **g**) GVB (355 bp); **h**) GFkV (262 bp); **i**) GFLV (258 bp); **j**) ToRSV (417 bp); **k**) RSPaV (384 bp); **l**) ArMV (295 bp); **m**) GRSLaV (317 bp); **n**) TRSV (427 bp); **o**) SLRSV (320 bp).

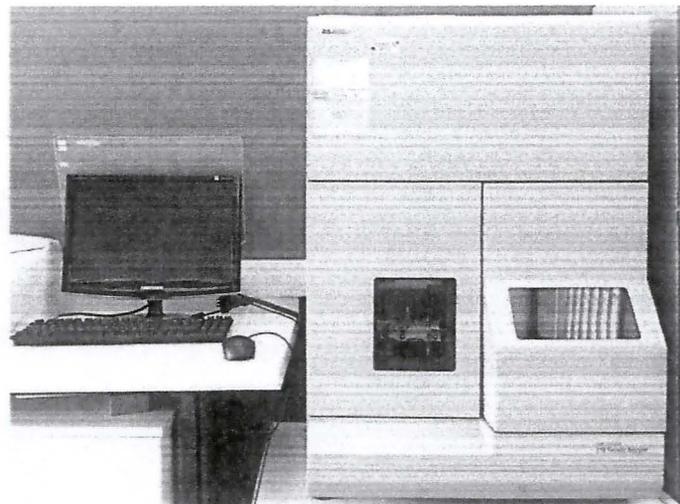
Los fragmentos virales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% utilizando el marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR y por electroforesis capilar utilizando el marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ (Thermofisher).

Anexo nº 4

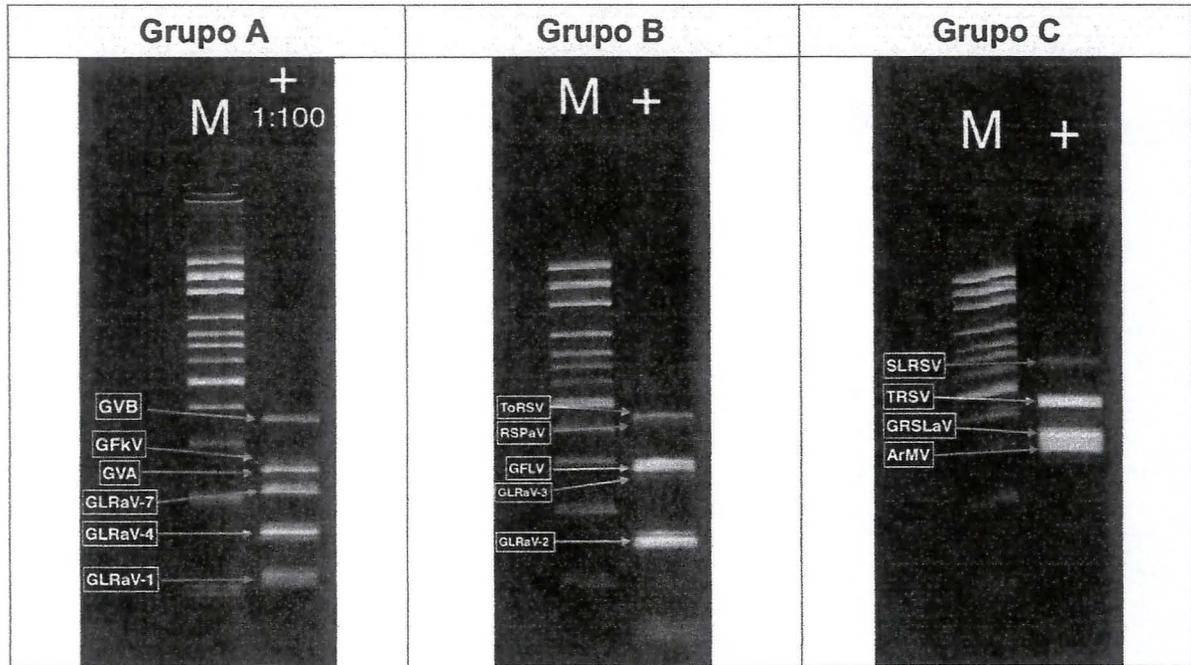
Panel A



Panel B



Panel C



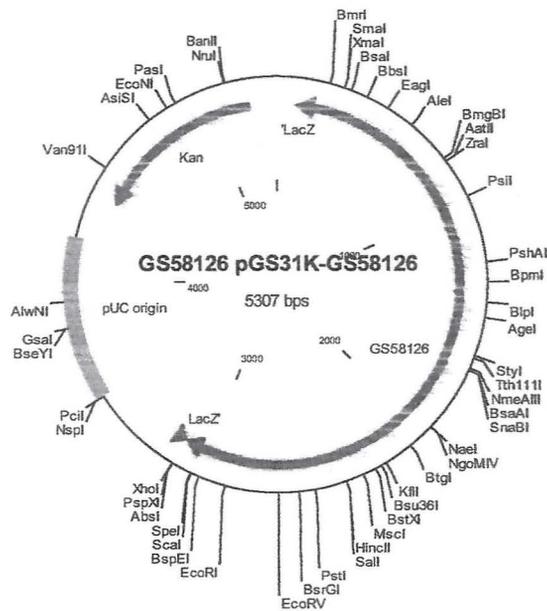
Amplificación múltiple de 14 fragmentos virales diferentes por RT-PCR

En el **Panel A** se observa la amplificación múltiple y simultánea por PCR de 14 fragmentos virales y visualizados por electroforesis capilar. Se logra la amplificación de GRSLaV-1 (109 bp), GRSLaV-2 (139 bp), GRSLaV-4 (150 bp), GVA (240 bp), GFLV (258 bp), GFkV (262 bp), GRSLaV-3 (274 bp), ArMV (295 bp), GRSLaV (317 bp), GVB (355 bp), RSPaV (384 bp), ToRSV (417 bp), TRSV (427 bp). La visualización de la amplificación por RT-PCR fue mediante electroforesis capilar utilizando el marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ (Thermofisher).

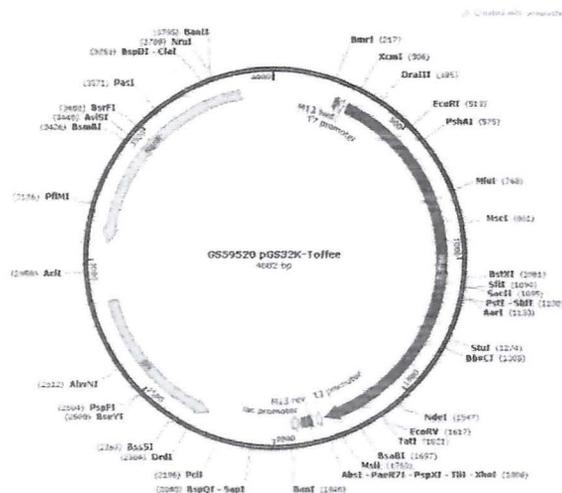
En el **Panel B** se observa el secuenciador ABI PRISM-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) adquirido durante el proyecto. El equipo fue comprado e importado desde Estados Unidos.

En el **Panel C** se muestra la amplificación múltiple de los 15 virus en set de 3 grupos de partidores (Grupo A, Grupo B y Grupo C) y visualizados por electroforesis en gel de agarosa. En el Grupo A se observa la amplificación de los fragmentos virales GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GFkV (262 bp) y GVB (355 bp). En el Grupo B se muestra la amplificación de los fragmentos virales GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GFLV (258 bp), ToRSV (419 bp) y RSPaV (384 bp). En el Grupo C se observa la amplificación de los fragmentos virales ArMV (295 bp), GRSLaV (317 bp), TRSV (427 bp) y SLRSV (320 bp).

Anexo nº 5
Panel A



Panel B



Mapa de vectores que contienen controles positivo con los fragmentos virales

El control positivo se estableció mediante la síntesis de dos vectores de expresión con las secuencias virales aisladas y clonadas en vector de clonación pCR®2.1-TOPO® en células de *Escherichia coli*. En el **Panel A** se muestra el mapa del control positivo 1 correspondiente al vector de expresión pGS31k (5307 bp) con las secuencias virales de GLRaV-1, GLRaV- 2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GfKV, GFLV, ToRSV y RSPaV. En el **Panel B** se muestra el mapa del control positivo 2 correspondiente al vector de expresión pGS32k (4002 bp) con los fragmentos virales de ArMV, GRSLaV, SLRSV y TRSV. Las secuencias virales presentes en el Control positivo 2 fueron obtenidas a partir de la literatura debido a que no se identificaron en material vegetal infectado. Las secuencias fueron sintetizadas por Epoch Life Science y presentan resistencia a antibiótico para su selección.

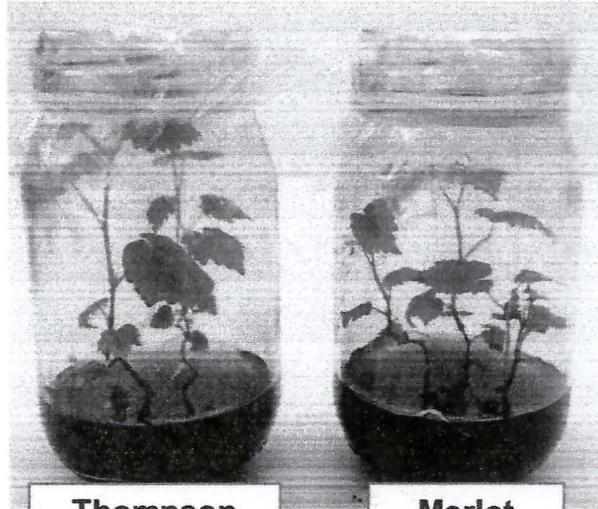
Anexo n° 6

Figura a)



Chardonnay
Univiveros

Figura b)



Thompson

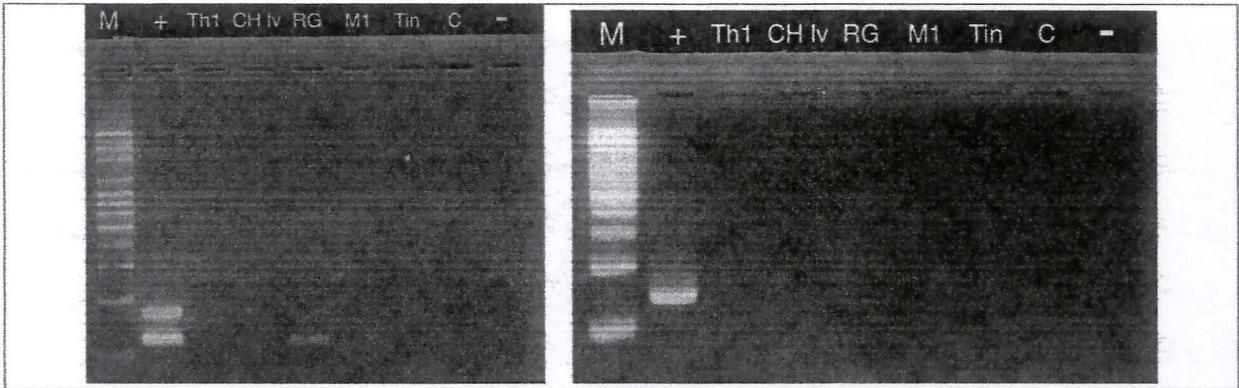
Merlot

Establecimiento *in vitro* de estacas de variedades viníferas y uva de mesa

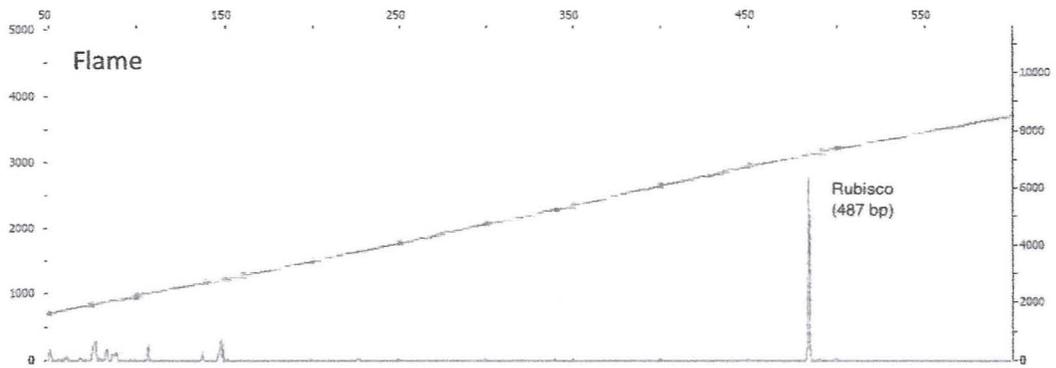
Se seleccionaron y recolectaron plantas en campo sin sintomatología en la parcela experimental de Agrijohnson Ltda. (**figura a**), como Chardonnay proveniente de Univiveros. Posteriormente se establecieron *in vitro* en medio MS de estacas de distintas variedades viníferas y de uva de mesa (**figura b**), se muestran a modo de ejemplo la variedad de mesa Thompson Seedless y la variedad vinífera Merlot.

Anexo nº 7

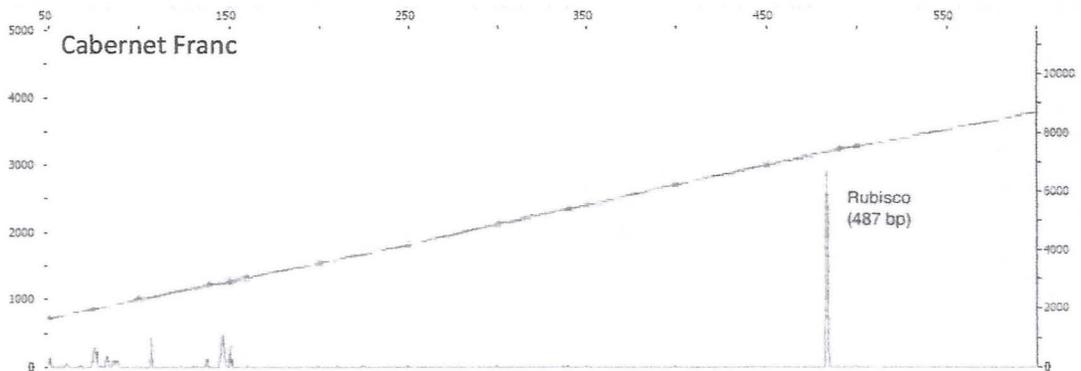
a)



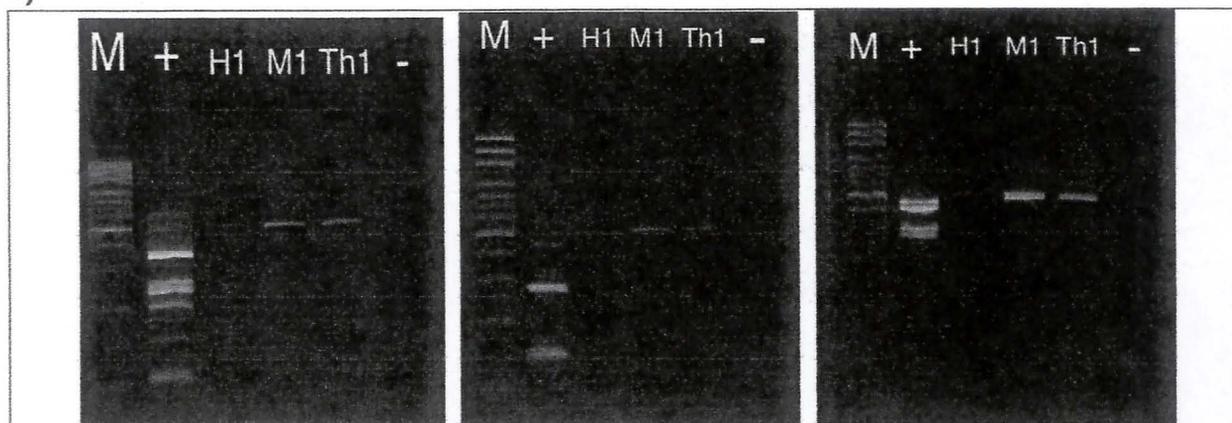
b)



c)



d)



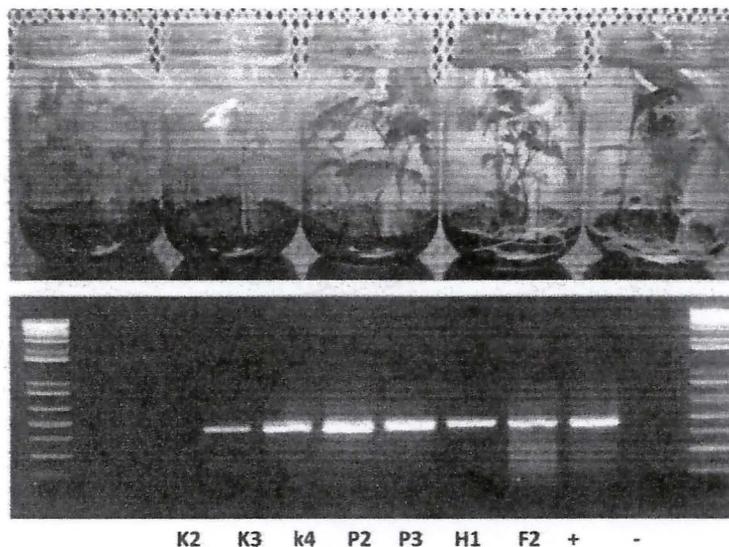
Variedades viníferas y uva de mesa certificadas libre de virus

En el **Panel A** se muestra la recolección de material vegetal de las variedades seleccionadas desde campo. A modo de ejemplo se muestra el estado viral de diferentes variedades de vid establecidas *in vitro* o provenientes de campo se evaluó con el sistema de detección múltiple viral. A partir de ello logramos identificar 6 variedades libres de virus: Thompson Seedless, Chardonnay, Tintorera, Cabernet Franc, Merlot y Flame. En la **figura a)** se observa el análisis de detección viral en muestras *in vitro* a partir del cual se identifica a la variedad Thompson Seedless (*Th1*), Chardonnay obtenida de embriogénesis somática (*Ch Iv*) y Tintorera (*Tin*) libre de virus. A la izquierda se observa el análisis con los virus GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GFkV (262 bp) y GVB (355 bp), mientras que a la derecha se observa el análisis con los virus GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GFLV (258 bp), ToRSV (417 bp) y RSPaV (384 bp). La amplificación por RT-PCR fue observada por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. En la **figura b)** se observa el análisis de la variedad **Flame** la cual se encuentra libre de virus. El análisis se realizó amplificando los 15 virus de manera simultánea y un control interno que amplifica para la Rubisco (487 bp), los resultados fueron visualizados por electroforesis capilar. En la **figura c)** se observa el análisis de detección viral de la variedad Cabernet Franc la cual resulta libre de virus. La amplificación por RT-PCR se realizó utilizando de manera simultánea los 15 partidores virales más un control interno para la Rubisco (487 bp) los cuales fueron visualizados por electroforesis capilar. En la **figura d)** se observa el análisis de detección viral de muestras *in vitro* previamente tratadas con ribavirina. De ello se observa la ausencia de virus en la variedad vinífera Merlot y uva de mesa Thompson Seedless. A la izquierda se observa el análisis con los virus GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GFkV (262 bp) y GVB (355 bp), al medio se observa el análisis con los virus GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GFLV (258 bp), ToRSV (417 bp) y RSPaV (384 bp), mientras que a la derecha se observa el análisis con los virus ArMV (295 bp), GRSLaV (317 bp), TRSV (427 bp) y SLRSV (320 bp). La amplificación por RT-PCR fue observada por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

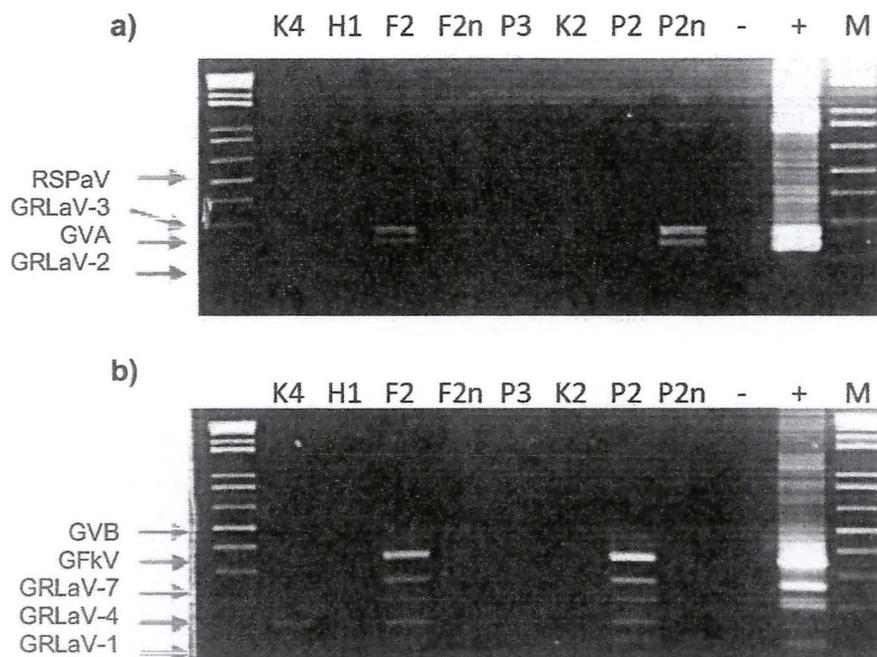
Se utilizó un marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR para la electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, mientras que para la electroforesis capilar se utilizó un marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ (ThermoFisher).

Anexo nº8

Panel A



Panel B



Análisis múltiple viral en diferentes portainjertos.

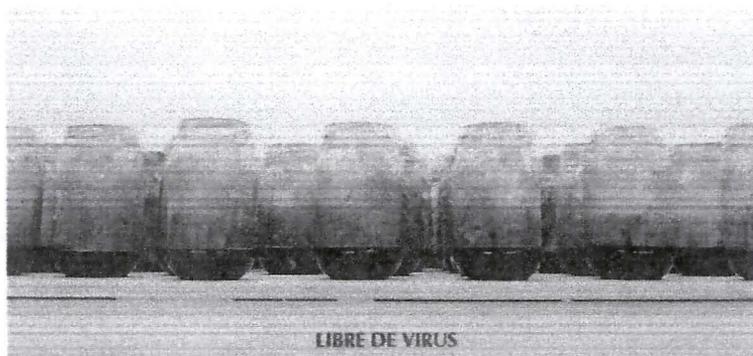
Panel A: se analizaron distintos portainjertos establecidos *in vitro* de las variedades: Kober (K4 y K2), Harmony (H1), Freedom (F2, F2n) y P1103 (P2, P2n, P3) y se obtuvo su ADNc. En el **Panel B** se observa la amplificación de distintos virus los cuales fueron subdivididos en dos

grupos. En la **figura A** se observan las reacciones de PCR del Grupo A con los virus GLRaV-2 (139 pb), GLRaV-3 (274 pb), GVA (240 pb) y RSPaV (384 pb), mientras que en la **figura B** se observan reacciones de PCR con los virus GLRaV-1 (109 pb), GLRaV-4 (150 pb), GLRaV-7 (209 pb), GFkV (262 pb) y GVB (355 pb). A partir de estos resultados es posible observar que Kober 4 (*K4*) presenta los virus GLRaV-4, 7 y GFkV; Harmony 1 (*H1*) los virus GLRaV-4 y GLRaV-7; Freedom 2 (*F2*) presenta GLRaV-1, GLRaV-4, GLRaV-7, GFkV, GVB, GLRaV-3 y GVA; Freedom 2n (*F2n*) no presenta virus; P1103 (*P3*) no presenta ningún virus; P1103 – 2 (*P2*) presenta GLRaV-1, GLRaV-4, GLRaV-7, GFkV, GVB, GLRaV-3 y GVA; P1103-2n (*P2n*) presenta los virus GLRaV-3 y GVA.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y se utilizó como marcador de peso molecular *Ladder 1 KB Plus* de New England Biolabs ® Inc.

Anexo nº 9

Panel A



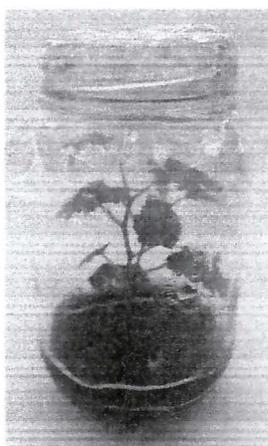
Panel B

a)



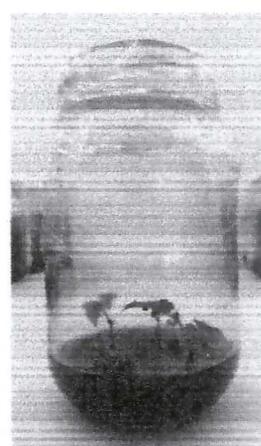
Cabernet Sauvignon

b)



Sauvignon Blanc

c)



Merlot

d)



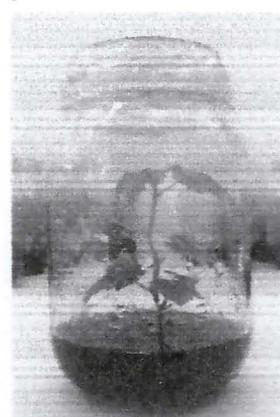
Red Globe

e)



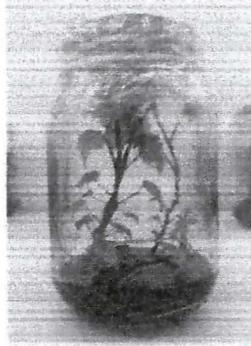
Thompson Seedless

f)



Crimson Seedless

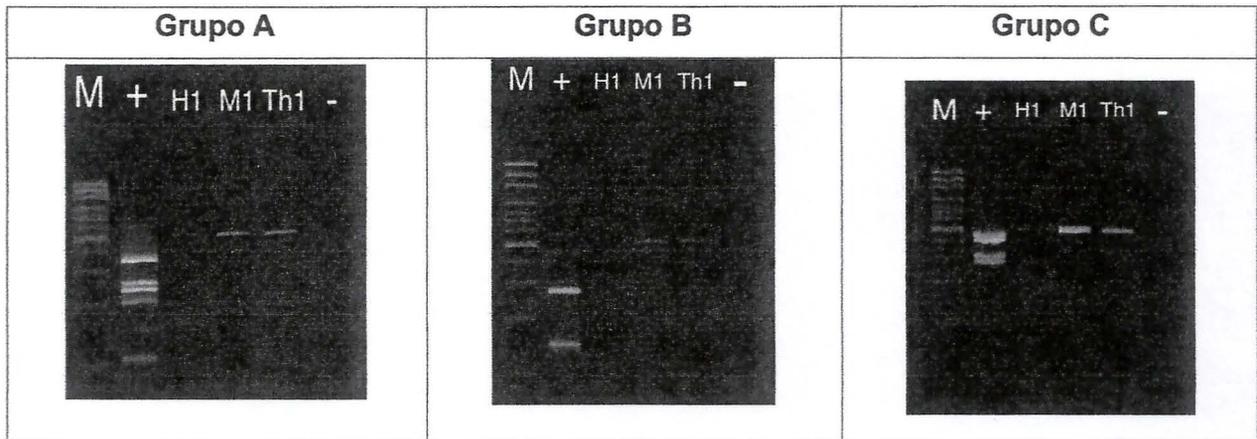
g)



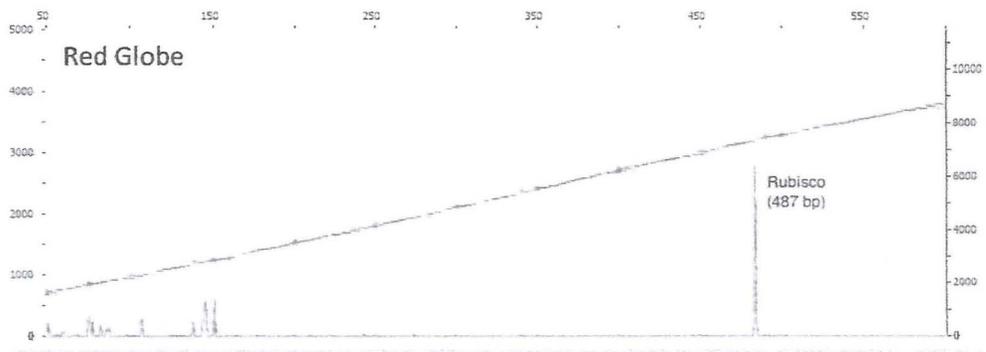
Panel C

110 Richter

h)



i)



Clones certificados libres de virus de variedades comerciales de vid y portainjertos

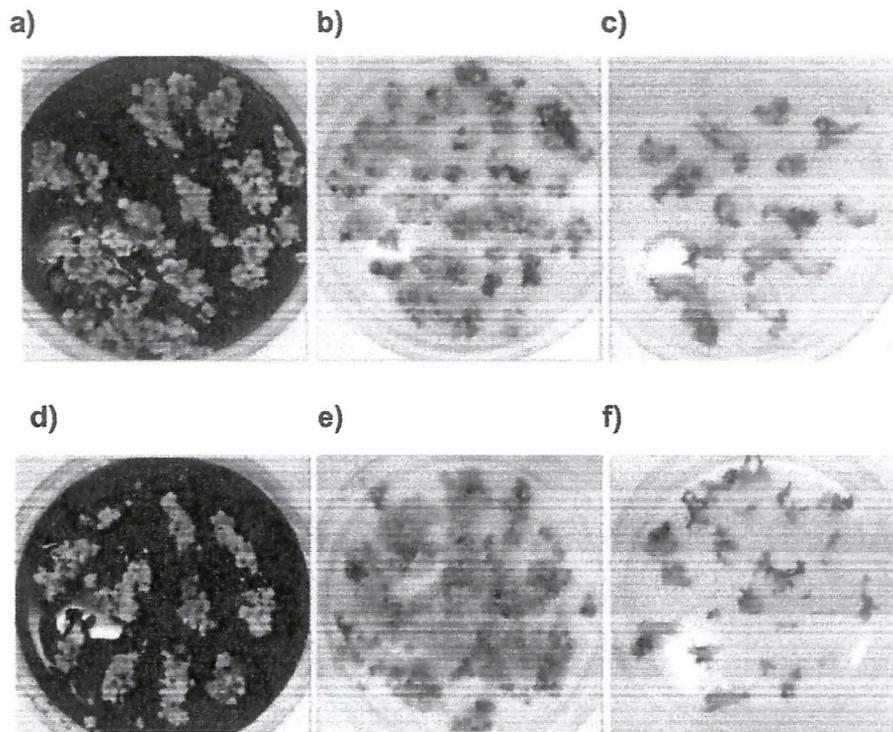
En el Panel A se muestra el Banco de germoplasma con un stock de plantas madres de variedades comerciales y portainjertos libres de virus.

En el **Panel B** se observan los clones libres de virus de Cabernet Sauvignon (**a**), Sauvignon Blanc (**b**), Merlot (**c**), Red Globe (**d**), Thompson Seedless (**e**), Crimson Seedless (**f**) y 110 Richter (**g**).

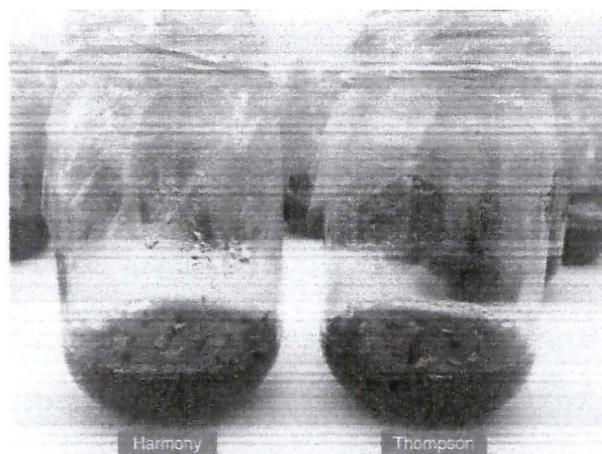
En el **Panel C** se muestran los análisis de detección realizadas a las plantas obtenidas de campo, tratadas mediante la técnica de embriogénesis somática y tratamiento con ribavirina. A modo de ejemplo se ilustra en la **figura h**) el análisis de las variedades tratadas con Ribavirina: portainjerto Harmony (*H1*), variedad uva de mesa Thompson (*Th*) y variedad vinífera Merlot (*M1*), en donde se observa la ausencia de virus. La amplificación se llevó a cabo en tres grupos de partidores: Grupo A que amplifica para GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GFkV (262 bp) y GVB (355 bp); Grupo B que amplifica para GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GFLV (258 bp), ToRSV (417 bp) y RSPaV (384 bp); Grupo C que amplifica para ArMV (295 bp), GRSLaV (317 bp), TRSV (427 bp) y SLRSV (320 bp). En todos los grupos de partidores se utilizó un control interno que amplifica para la Rubisco (487 bp), los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y se utilizó como marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR. Mientras que en la **figura i**) se muestra el análisis múltiple y simultáneo de los 15 virus y el control interno de la Rubisco (487 bp) de la variedad Red Globe tratada con Ribavirina. A partir de estos resultados es posible observar la ausencia de virus y de la correcta amplificación del control interno. El resultado fue observado por electroforesis capilar utilizando como marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ (Thermofisher).

Anexo nº 10

Panel A



Panel B



Métodos de saneamiento viral en plantas de vid

Se optaron por dos estrategias para la obtención de plantas libres de virus. En el **Panel A** se muestra la técnica de embriogénesis somática, conocida por la ausencia de virus a nivel meristemático y por lo tanto de la planta en crecimiento. Se observa el proceso de diferenciación

de embriones de la variedad Chardonnay (**figura a), b), c)**) y portainjerto 110 Richter (**figura d), e), f)**) mediante el cultivo en distintos medios: **figura a) y d)** medio G1SCA que permite la proliferación de embriones en oscuridad; **figura b) y e)** medio MG1 para la germinación de embriones en luz tenue hasta alcanzar la etapa torpedo de desarrollo; **figura c) y f)** medio MG2 para el desarrollo final para luego ser traspasados individualmente a medio MS/2.

En el **Panel B** se observa el tratamiento con el antiviral Ribavirina. Se muestra como ejemplo el portainjerto Harmony y la variedad uva de mesa Thompson Seedless.

Anexo nº 11

Tabla 1

PROCEDENCIA DE PLANTAS	MUESTRA INDICADORA / MUESTRA DE CAMPO	VIRUS DETECTADO INDIVIDUALMENTE	VIRUS DETECTADO MULTIPLEX
SAG	1	GLRaV-2, GVB	GLRaV-2 GVB
	2	GLRaV-3	GLRaV-3
	3	GLRaV-1 GLRaV-3	GLRaV-1
	4	GLRaV-2	GLRaV-2
	5	GLRaV-2	GLRaV-2
	6	GLRaV-2	GLRaV-2
	7	GLRaV-2 GVB	GLRaV-2 GVB
	8	GLRaV-2 GFkV	GLRaV-2 GFkV
VI REGIÓN (cepa País)	9	Negativa	Negativa
	10	Negativa	Negativa
	11	RSPaV	RSPaV
	12	RSPaV GFkV	RSPaV GFkV
	13	RSPaV GFkV	RSPaV GFkV
	14	RSPaV GFkV	RSPaV GFkV
	15	Negativa	Negativa

CURACAVI	16	Negativa	Negativa
	17	Negativa	Negativa
	18	Negativa	Negativa
	19	Negativa	Negativa
	20	Negativa	Negativa
	21	Negativa	Negativa
	22	Negativa	Negativa
	23	Negativa	Negativa
	24	Negativa	Negativa
	25	Negativa	Negativa
	26	Negativa	Negativa
	27	Negativa	Negativa
	28	Negativa	Negativa
	29	Negativa	Negativa
TOTAL MUESTRAS POSITIVAS A INFECCIÓN	12	12	100%
TOTAL DE DETECCIÓN	19	18	95%

Tasa porcentual de éxito del sistema de detección múltiple viral (SDMV)

A continuación, se muestra una tabla resumen de los virus detectados en plantas indicadoras y en plantas de campo, en donde se muestra una tasa de éxito del 95% de nuestro sistema múltiple respecto al sistema individual. Dicha diferencia se destaca en la muestra número tres. Durante el proyecto, se logró la amplificación de los 15 fragmentos virales con el sistema múltiple versus los 15 detectados individualmente a partir de los controles positivos, lo que indica un 100% de detección. Para este estudio, se consideraron muestras con y sin sintomatología viral principalmente, siendo el enrollamiento foliar y acumulación de antocianinas remarcando nervatura foliar las más comunes entre las plantas analizadas. Aunque el número de muestras iniciales para esta estimación no es muy grande, esperamos durante el 2018 seguir completando y validando el SDMV.

Anexo nº 12

Panel A

a)

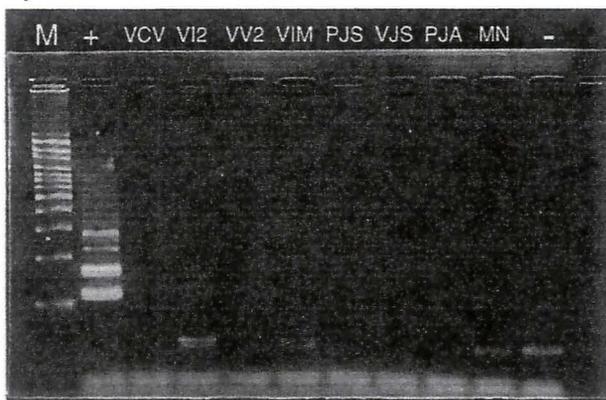


b)

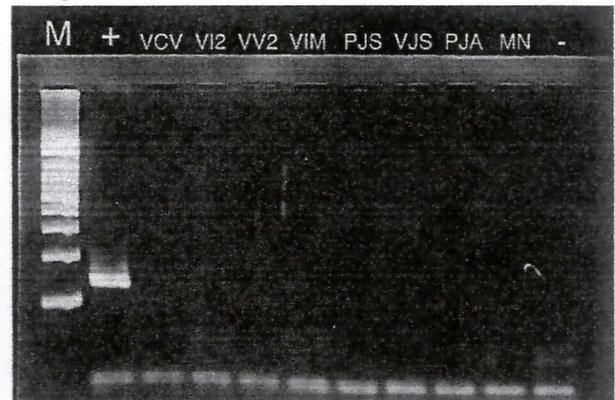


Panel B

c)



d)



Servicio validado de detección múltiple viral a los productores de Chicha del Valle de Curacaví

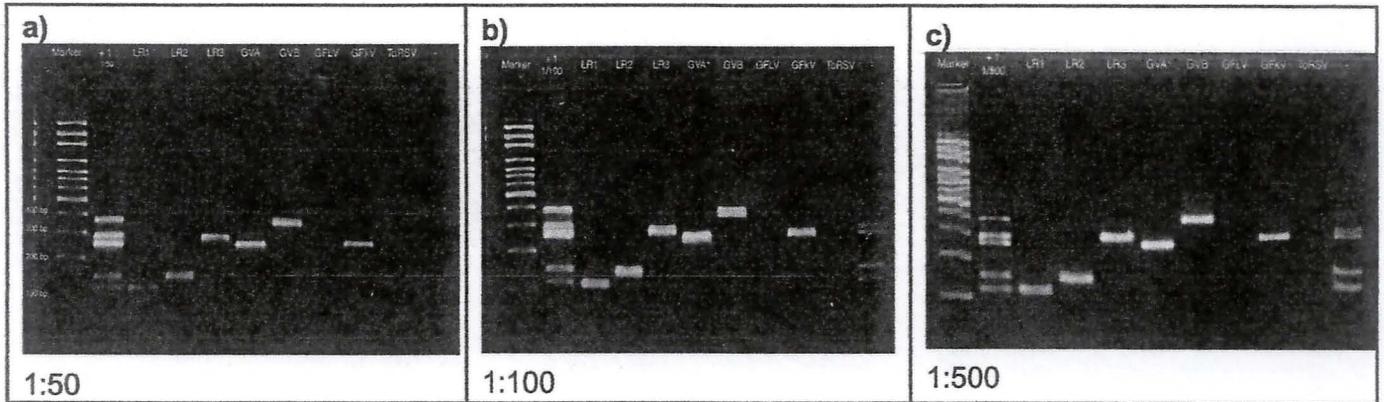
Se realizó un servicio gratuito a los productores del Valle de Curacavi. En el **Panel A** se muestra las plantas a partir de las cuales se realizó el muestreo azaroso de dos distintos productores de Chicha. En la **Imagen a)** se observa el muestreo de vides (Merlot) de la Viñas productoras del Valle de Casablanca. En la **Imagen b)** se muestra la variedad Moscatel Blanco presente en la Viña el Toro del productor Julio Silva en el Valle los Naranjos. Las muestras se guardaron en frío en bolsas plásticas herméticas, rotuladas con el nombre de la variedad, localidad y fecha del muestreo.

En el **Panel B** se muestran los análisis de detección múltiple viral de dichas muestras. En la **figura c)** se consideró el análisis de los virus GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVA (240 bp), GFkV (262 bp) y GVB (355 bp). Mientras que en la **figura d)** se

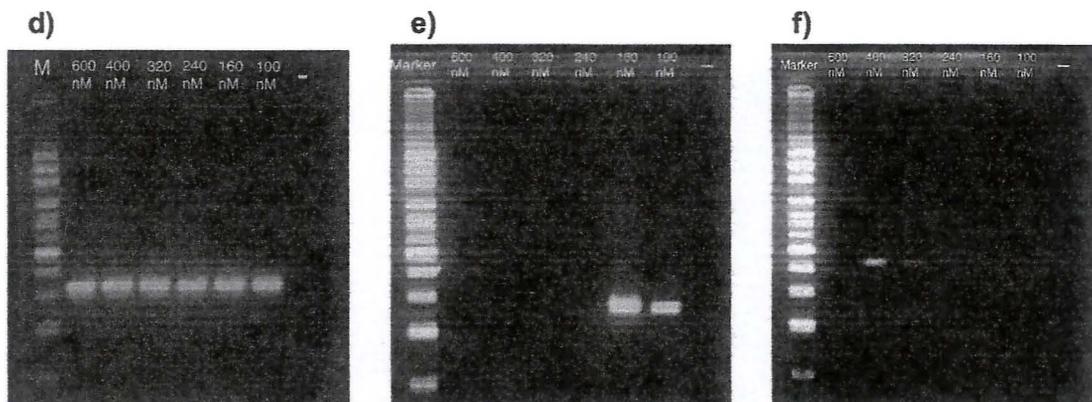
observan el análisis con los virus GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GFLV (258 bp), ToRSV (417 bp) y RSPaV (384 bp).

Anexo nº 13

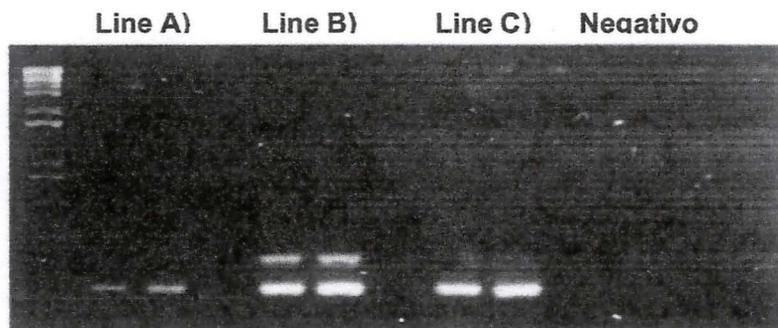
Panel A



Panel B



Panel C



Optimización de las condiciones de RT-PCR para la detección múltiple viral

Se definió el límite inferior de detección de los controles positivos los cuales fueron purificados a partir de las colonias positivas a la clonación en *Escherichia coli*. Para ello, se realizaron 3 diluciones de los Controles positivos de: a) 1:50, b) 1:100 y c) 1:500. En el **Panel A** se muestra

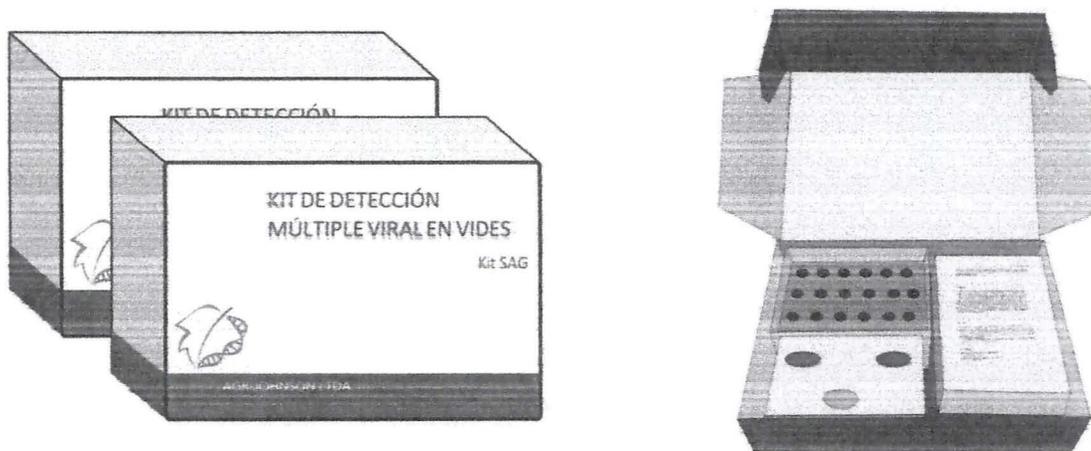
la amplificación de los virus GRLaV-1 (109 bp), GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GVA (240 bp), GVB (355 bp), GFLV (258 bp), GFkV (262 bp), ToRSV (417 bp) a partir del Control positivo 1 en 3 diluciones seriales (1:50, 1:100, 1:500). Se observa una buena resolución de detección en la dilución 1:50 y 1:100, sin embargo, se prefiere utilizar esta última para los análisis de diagnóstico viral ya que compromete una menor contaminación en las otras muestras.

En el **panel B** se muestra la optimización de la concentración de los fragmentos virales de GRSLaV (**d**), GFLV (**e**) y ToRSV (**f**). Dicha optimización se realizó para cada partidor viral y se consideró el límite inferior de detección.

En el **panel C** se muestra la optimización de la concentración de $MgCl_2$ a distintas concentraciones de partidores virales, para determinar la mejor especificidad de estos con el templado (en este caso se utilizó el control positivo). Para ello, se analizaron los virus GVA (240 bp) y GVB (355 bp). En las **lines A**) se consideró una concentración de magnesio de 2,6 mM y una concentración de partidor de 200 nM, a partir de la cual se observa una leve amplificación de GVA. En las **lines B**) se consideró una concentración de magnesio de 2,6 mM y una concentración de partidor de 600 nm, en donde se observa la amplificación intensa de GVA y GV. En las **lines C**) se consideró una concentración de magnesio de 3 mM y una concentración de partidor de 400 nM en donde solo se observa GVA. A raíz de estos resultados la concentración óptima de magnesio resultó ser 2, 6 mM. La concentración de Buffer, dNTPs, BSA, KCl, DMSO y Tritón se mantuvieron para todos los PCR realizados.

Los fragmentos virales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% utilizando el marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR.

Anexo nº 14



Prototipo de Kit de diagnóstico múltiple viral en vides

A partir de las optimizaciones de las condiciones de RT-PCR y de los partidores virales se establecieron las bases para generar un prototipo del Kit de detección múltiple viral. Se diseñó un prototipo del Kit "SAG" el cual contiene los 8 partidores para los virus que el Servicio Agrícola y Ganadero solicita para el control obligatorio de plagas: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV, GFLV, ToRSV. Además, desarrollamos el diseño del prototipo del Kit "15 virus" el cual contiene los 15 partidores virales: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFkV, GFLV, ToRSV, RSPaV, ArMV, GRSLaV, TRSV, SLRSV.

Ambos Kits vienen con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación por RT-PCR, tales como un Master Mix, el control interno para la RUBISCO y los 15 pares de partidores marcados con fluoróforo y rotulados. Los resultados obtenidos con el Kit "SAG" podrán ser observados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% o por electroforesis capilar. Mientras que el Kit "15 virus" se recomienda la electroforesis capilar para una correcta visualización de los resultados.

Los reactivos deberán ser mantenidos al interno del Kit a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para no afectar la efectividad de éstos.



KIT DE DETECCIÓN MÚLTIPLE DE VIRUS EN VIDES (AGRIJOHNSON LTDA.)

DESCRIPCIÓN

El Kit de Detección Múltiple Viral en vides permite analizar la presencia o ausencia de virus en material vegetal de vid (hojas o estacas) de forma rápida y eficiente. El Kit fue diseñado para detectar fragmentos virales utilizando la metodología de electroforesis capilar mediante secuenciador o mediante electroforesis con gel de agarosa. El sistema de detección múltiple viral está diseñado para detectar de manera simultánea 15 virus que infectan a las vides: GLRaV-1 (*Grapevine Leafroll associated Virus-1*), GLRaV-2 (*Grapevine Leafroll associated Virus-2*), GLRaV-3 (*Grapevine Leafroll associated Virus-3*), GLRaV-4 (*Grapevine Leafroll associated Virus-4*), GLRaV-7 (*Grapevine Leafroll associated Virus-7*), GVA (*Grapevine Virus A*), GVB (*Grapevine Virus B*), GFkV (*Grapevine Fleck Virus*), GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*), ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*), RSPaV (*Rupestris Stem Pitting-associated Virus*), ArMV (*Arabid Mosaic Virus*), GLRaV (*Grapevine Leafroll associated Virus*), TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*) y SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*).

SABIAS QUE...

En Chile, el cultivo de vid (*Vitis vinifera*) es considerado uno de los más importantes en la industria vitivinícola y frutícola para la producción de uva de mesa y uva vinífera. El nivel de superficie comercial cultivada a nivel nacional y el número de exportaciones al año posiciona a esta especie entre los primeros lugares respecto a las frutas frescas. Sin embargo, entre los productores de uva es conocida la elevada incidencia de virosis, principal causal de alteraciones de la maduración, tamaño, color y contenido de azúcar en las bayas, ocasionando de este modo un grave daño a nivel productivo.

Actualmente AgriJohnson Ltda. se posiciona como empresa líder en el diagnóstico, con la presentación del kit de detección múltiple para los 15 virus que afectan a las vides.

REACTIVOS INCLUIDOS

Contamos con dos Kits de detección viral los que incluyen:

- Master Mix (100 reacciones)
- Par de partidores RUBISCO (100 uM) – Control interno
- Agua desionizada (1.5 mL)

Reactivos	Kit 15 virus (15 pares de partidores)		Kit SAG (8 pares de partidores)
	Partidores virales	GLRaV-1	GFLV
GLRaV-2		ToRSV	GLRaV-2
GLRaV-3		RSPaV	GLRaV-3
GLRaV-4		ArMV	GVA
GLRaV-7		GRSLaV	GVB
GVA		TRSV	GfKV
GVB		SLRSV	GFLV
GfKV			ToRSV

*Todos los partidores Forward se encuentran marcados con fluoróforo FAM al extremo 5'

Tamaño fragmentos virales

Virus	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-7	GVA	GVB	GfKV
Tamaño fragmento (bp)	109	139	274	150	209	240	355	262
Virus	GFLV	ToRSV	RSPaV	ArMV	GRSLaV	TRSV	SLRSV	
Tamaño fragmento (bp)	258	419	384	295	317	427	320	

Concentración de reacción partidores virales

Virus	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-7	GVA	GVB	GfKV
Concentración (nM)	400	480	640	400	400	600	600	720
Virus	GFLV	ToRSV	RSPaV	ArMV	GRSLaV	TRSV	SLRSV	
Concentración (nM)	1400	880	1400	480	400	640	720	



REQUISITO DE EQUIPAMIENTO (no incluidos)

- > Termociclador
- > Secuenciador para análisis de fragmentos (metodología electroforesis capilar) o Cámara de electroforesis (metodología electroforesis en gel de agarosa)
- > Transiluminador UltraVioleta

REQUISITOS MATERIAL VEGETAL A ANALIZAR

Para un correcto análisis de detección, se recomienda realizar la toma de muestra de forma azarosa o dirigida en caso de una infección visible (acumulación excesiva de antocianinas, moteado o enrollamiento de hoja, clorosis, venación, entre otras). A su vez, se recomienda realizar la toma de muestras por la mañana de material vegetal joven. Toda muestra deberá estar rotulada con su nombre variedad, fecha, localidad, dueño/empresa.

PROCEDIMIENTO RT-PCR (Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction)

1. Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, mezclar bien y centrifugar. Mantener en hielo hasta su uso.

	Kit 15 virus (μ l)	Kit SAG (μ l)
<i>Volumen Final</i>	50	30
cDNA	2	2
Master Mix	14,4	8,7
Control Interno	0,5	0,5
GLRaV-1	2	2
GLRaV-2	2	2
GLRaV-3	2	2
GLRaV-4	2	-
GLRaV-7	2	-
GVA	2	2
GVB	2	2
GFKV	2	2
GFLV	2	2
ToRSV	2	2
RSPaV	2	-
ArMV	2	-
GRSLaV	2	-
TRSV	2	-
SLRSV	2	-
Agua	<i>Hasta volumen final</i>	



Programa de RT-PCR

95° por 5 minutos
95° por 35 segundos
60° por 1 minuto
72° por 2 minutos
72° por 10 minutos
4° por ∞

} 30 ciclos

Visualización productos de PCR

- Electroforesis en gel de agarosa 2,5 – 3%
- Electroforesis capilar

Tecnología desarrollada en AgriJohnson Limitada en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular, con financiamiento de Fundación para la Innovación Agraria (FIA) bajo proyecto PYT-2014-0040.

Distribución y venta bajo licencia de AgriJohnson Limitada, Torre Verde Limitada y AGDIA inc. International.



Instructivo de uso para la detección múltiple viral

Se desarrolló un manual de instrucciones con los requerimientos técnicos necesarios para el correcto análisis de detección múltiple viral en vides. En el instructivo de uso se señalan los reactivos incluidos en el Kit, tales como la Master Mix, el control interno para la RUBISCO y los partidores marcados con fluoróforo y rotulados. Además, se indican las condiciones y concentraciones para la amplificación por RT-PCR y los equipos necesarios para llevar a cabo el diagnóstico y la visualización de los resultados. Nuestro Kit de detección ofrece la posibilidad de utilizar la metodología por electroforesis en gel de agarosa o por electroforesis capilar sin la necesidad de recurrir a otro reactivo o Kit.

Adicionalmente, se señalan los 15 virus a detectar con nuestro sistema y una reseña de ellos.



Agdia Incorporated • 52642 County Road 1 • Elkhart IN • 46514 • USA
Toll Free 800-622-4342 • Fax 514-264-2615 • 1-574-264-2153 • www.Agdia.com

December 2, 2014

Dear Mr. Patricio Arce-Johnson,

I attached a signed copy of your letter to this agreement indicating interest by Agdia to participate in the grape vine detection method proposed.

Per previous correspondence, the test can detect pathogens identified in the following table:

Virus name	Abbreviation	Detected to date
Grapevine Leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	x
Grapevine Leafroll-associated virus 2	GLRaV-2	x
Grapevine Leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	x
Grapevine Leafroll-associated virus 4	GLRaV-4	x
Grapevine Leafroll-associated virus 5	GLRaV-5	x
Grapevine Leafroll-associated virus 6	GLRaV-6	
Grapevine Leafroll-associated virus 7	GLRaV-7	x
Grapevine Leafroll-associated virus 8	GLRaV-8	x
Grapevine virus A	GVA	
Grapevine virus B	GVB	x
Grapevine Fanleaf virus	GFLV	
Grapevine Fleck virus	GFKV	x
Grapevine Rootstock Stem Lesion-associated virus	GRSLaV	
Arabis Mosaic virus	ArMV	
Rupestris Stem Pitting-associated virus 1	RSPaV-1	
Tobacco Ringspot virus	TRSV	x
Tomato Ringspot virus	ToRSV	x
Strawberry Latent Ringspot virus	SLRSV	

We are interested in reviewing your test methods and evaluating your test with local samples. Please advise on future steps to help us in your endeavor.

International Business Development Leader

Anexo nº 17

Panel A

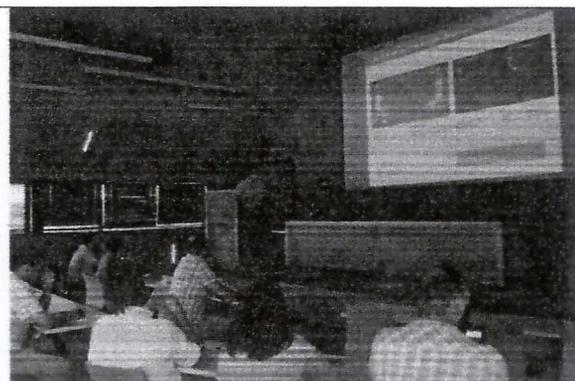
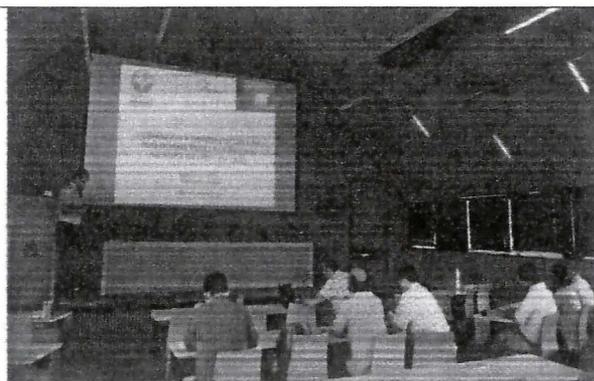
a)

Charla de difusión productores de Chicha Curacaví



b)

Charla de difusión Concha y Toro



c)

Fundación para la
Innovación Agraria

AgriJohnson Ltda.

INVITACIÓN

La Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y Johnson y Medina Ltda. invitan a usted a la charla de **“Detección múltiple de virus presentes en vides”** que se enmarca en el proyecto **“Generación y desarrollo de una plataforma de detección múltiple viral en vides”**.

La actividad se realizará el día 22 de Marzo de 2017 a las 10:00 horas, en el Centro de Eventos de Viña Santa Rita, ubicado en Calle Camino Padre Hurtado 0695, Alto Jahuel, comuna de Buin.

Para mayor información y confirmar su participación por favor contactar al (+56) 9 9077 3716 o al e-mail: catalina.pavez.mina@gmail.com, gleal@santarita.cl

d)



Fundación para la
Innovación Agraria



AgriJohnson Ltda.

INVITACIÓN

La Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y Johnson y Medina Ltda. invitan a usted a la charla de **“Detección múltiple de virus presentes en vides”** que se enmarca en el proyecto **“Generación y desarrollo de una plataforma de detección múltiple viral en vides”**.

La actividad se realizará el día 24 de Abril de 2017 a las 9:00 horas, en el Salón Municipal de la Ilustre Municipalidad de Curacaví, ubicado en Avenida Ohiggins 1305, Curacaví, Región Metropolitana

Para mayor información y confirmar su participación por favor contactar al (+56) 9 9077 3716 o al e-mail: catalina.pavez.mina@gmail.com, turismodecuracavi@gmail.com

Panel B

GENERACIÓN Y DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA LA DETECCIÓN MÚLTIPLE DE VIRUS EN VIDES (*Vitis vinifera* L.)

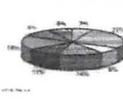
Rudolf Schlechter*, C. Santibáñez, F. Melo, C. Medina, F. Arce-Johnson*

AgriPharm Ltda., Fruticultura, Santiago, Chile
Departamento de Genética Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
*Presente: AgriJohnson

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las infecciones víricas en vides provocan un serio impacto en la producción. Las pérdidas productivas en promedio son de 10% pero pueden llegar hasta un 70%. Por otro lado, los virus involucrados en el deterioro de la madera llevan a una disminución en la producción de 20% a 30%. Aún así, las herramientas de detección utilizadas en Chile como ICGA y RT-PCR simple son costosas y de baja eficacia.

Actualmente, 55 distintos virus de tipo ARN pertenecientes a 7 familias y 20 géneros han sido identificados en vides. Los virus pertenecientes al género de Neguvirus son los más diseminados. Dentro de este género están los virus GFLV (Grape Fan Leaf Virus), GRV (Grapevine Mosaic Virus), GRSV (Grapevine Latent Ring Spot Virus), TRSV (Tobacco Ring Spot Virus) y TRV (Tobacco Ring Spot Virus), entre otros. Por otro lado, los virus tipo GLRaV (Grape Leaf Roll associated Virus) causantes del enrollamiento de la hoja se han asignado a los géneros Chlorovirus y Ampelivirus. Por último, existen otros virus que producen el síntoma del "cuello de la videna rugosa", los cuales pertenecen al género Nepovirus, como GVA (Grapevine Virus A), GVB (Grapevine Virus B) y al género Foveavirus como es el caso del virus RSPaV (Rust Petiole associated Virus).



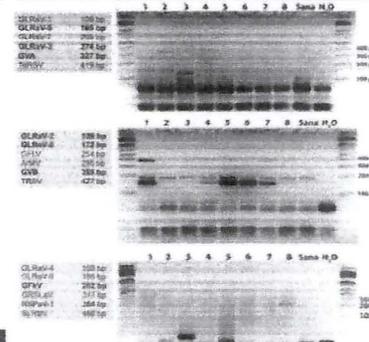
A consecuencia de la prolongada historia del cultivo, el uso de injertos y la reproducción clonal en viticultura, es que las vides son conectadas por ser hospedadoras de un gran número de virus. Según cifras entregadas por una empresa chilena del rubro (Bioscan SA), más del 25% de las plantas en Chile están infectadas por 5 virus a la vez, e incluso plantas infectadas con 11.

El objetivo de este trabajo es generar una plataforma basada en la técnica de RT-PCR múltiple para la detección simultánea de hasta 18 virus que infectan vides y así entregar, por un lado, un nuevo servicio de diagnóstico a nivel nacional y por otro, comercializar plantas libres de virus de variedades de interés comercial. Los virus que serán detectados por este sistema son: GLRaV-1 a 8, GFLV, GVA, GVB, AMV, TRSV, TRV, TORV, RSPaV y GRSLaV.

METODOLOGÍA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CONCLUSIONES

Mediante el uso de esta tecnología se pudo identificar los virus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-8, GVB, GFLV, TORV y TRSV lo cual resulta una herramienta prometedora para la detección de virus en vides, ya que las muestras utilizadas habían sido catalogadas previamente con la presencia de 3 virus, sin embargo, se pudieron detectar otros con este sistema. No obstante, se requiere todavía estandarizar esta técnica en función de las condiciones de PCR, ya que variaciones en ésta afectarían positiva y/o negativamente en la amplificación de más o menos fragmentos virales.

FINANCIAMIENTO

PROYECTO FIA PYT-2014-0040 Y AGRIOJOHNSON LTDA.

LITERATURA

Martelli (2003), Martelli y cols. (1993), Fuchs (2007), Bonavia y cols. (1997), Vigne y cols. (2004)

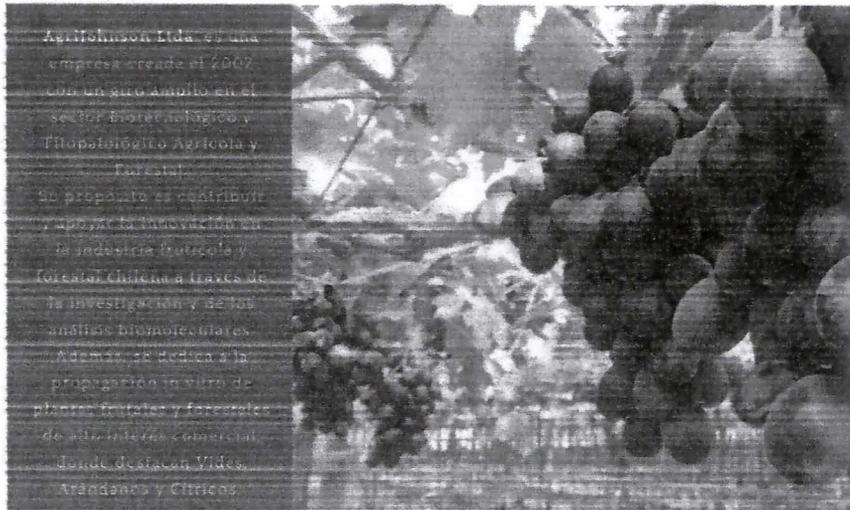
Difusión del sistema de detección múltiple viral

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron 4 charlas informativas del sistema de detección múltiple viral (**Panel A**) y participación en Congreso de “Innovación en el sector Hortofrutícola: Una mirada al sector de la Región Metropolitana” (**Panel B**). En las charlas informativas se dio

a conocer la situación actual de las virosis en las vides, las pérdidas de calidad y producción asociadas a estas, la importancia de contar en el mercado con un sistema de detección múltiple viral en vides, los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto y nuestro Banco de Germoplasma libre de virus. En las **imágenes a)** se muestra la charla de difusión realizada en AgriJohnson Ltda. destinada a productores del Valle de Curacaví el 14 de diciembre de 2016. En las **imágenes b)** se muestra la charla realizada en el Centro de Investigación e Innovación de la Viña Concha y Toro, ubicado en Talca, el 20 de diciembre de 2016. En la **imagen c) y d)** se adjunta la invitación para las charlas de la Viña Santa Rita y Municipalidad de Curacaví respectivamente.

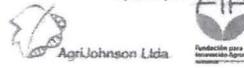
En el **panel B** se muestra el panel informativo donde se expuso el proyecto FIA PYT-2014-0040 del sistema de detección múltiple de virus en vides, realizado en el Hotel Radisson Plaza en Octubre del 2014.

Anexo nº 18



AgriJohnson Ltda. es una empresa creada el 2007 con un giro amplio en el sector biotecnológico y Fitopatológico Agrícola y Forestal. Su propósito es contribuir a apoyar la innovación en la industria frutícola y forestal Chilena a través de la investigación y de los análisis biomoleculares. Además se dedica a la propagación in vitro de plantas forestales y frutícolas de alto interés comercial donde destacan Vides, Arándanos y Citricos.

Unión Mieraflores, Parcela 168 - Mieraflores - Curacaví, Km. 35
+56 (2) 2474 6370
johnsonymedina@gmail.com



Detección múltiple viral en Vid

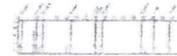
AgriJohnson participa en numerosos proyectos biotecnológicos financiados por CORFO, FIA, FONDEF, FONDECYT, entre otros. Dentro de ellos destaca el programa de mejoramiento genético de vides y frutales menores, generación de nuevas variedades de alto interés comercial, así como el desarrollo de sistemas de detección y prevención de plagas y enfermedades que afectan a dichas plantas. La empresa cuenta con un moderno laboratorio de 160 m², donde nuestro personal científico realiza análisis biomoleculares, identificación de especies vegetales y análisis de secuenciación. Además, posee tres cámaras de crecimiento en las cuales se mantienen plantas in vitro.

SITUACIÓN

Las plantas de vid se caracterizan por ser hospedadoras de un gran número de virus a causa del uso de injertos y propagación clonal de material infectado. Actualmente, más del 25% de las plantas presentes en el país se encuentran infectadas por numerosos virus.

PROYECTO

El proyecto FIA PYT-2014-0040 denominado "Generación y desarrollo de un sistema de detección múltiple viral en vides" tiene como propósito la identificación simultánea de los principales virus que afectan las vides.



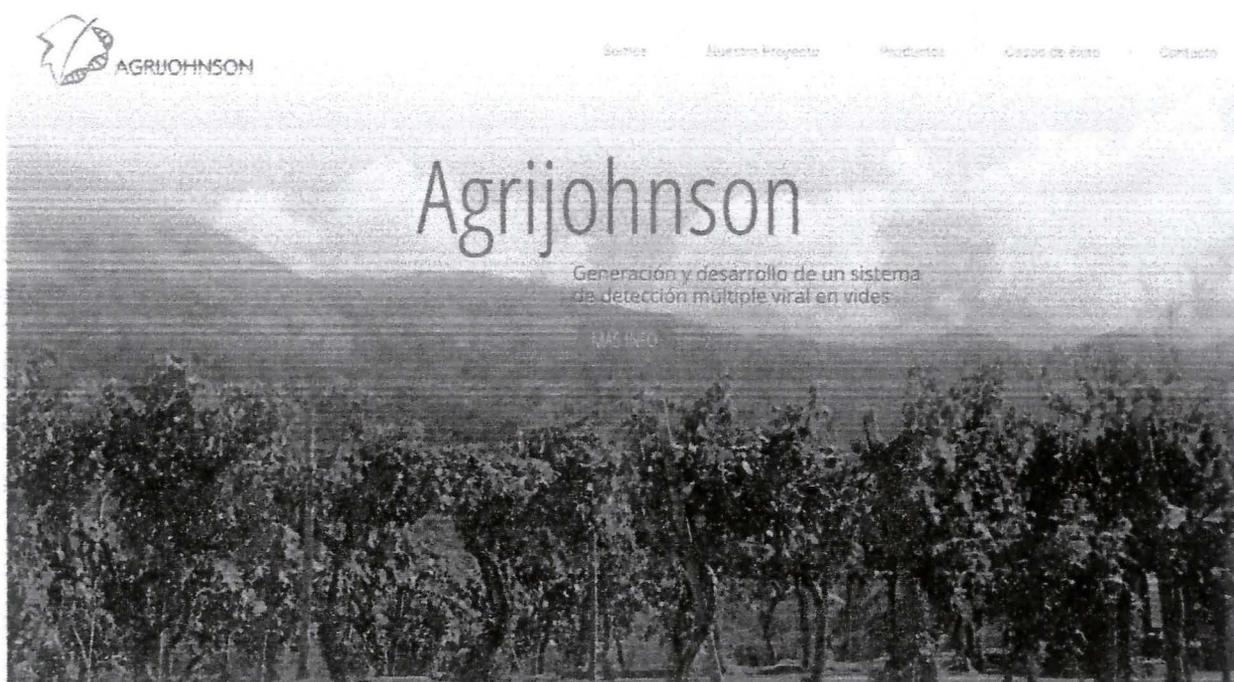
Nuestro sistema de detección considera los 6 virus que el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) solicita en el control obligatorio de plagas para entregar la certificación de vides libres de virus (GLFV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA y GVB). Adicionalmente, somos capaces de identificar otros 9 virus que afectan las vides con menor frecuencia (GLRaV-4, GLRaV-7, GFkV, RSPaV, ToRSV, TRSV, ArMV, GRSLaV, SLRSV). Además, tenemos como objetivo establecer un banco de germoplasma libre de virus de distintas variedades de uva de interés comercial, a través del sistema de detección múltiple viral. AgriJohnson Ltda. se propone entregar un servicio de diagnóstico viral eficaz y a bajo costo para pequeños y grandes productores de uva de mesa y vitivinícola nacional.

Tríptico informativo del sistema de detección múltiple viral en vid

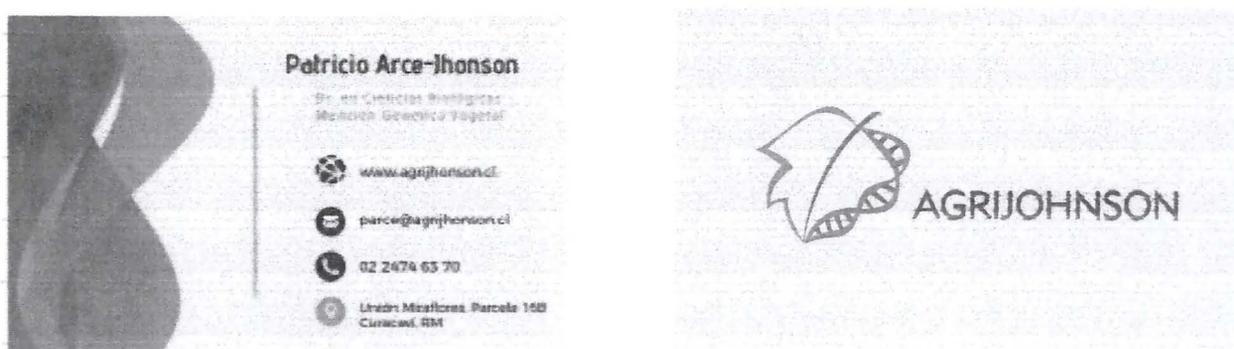
Durante las charlas de difusión se entregaron trípticos informativos enmarcados en nuestro proyecto de generación de una plataforma de detección simultánea de virus en vides. A través de los trípticos daremos a conocer nuestra empresa Johnson y Medina Ltda., la situación actual de los virus en las vides y sobre nuestro sistema de detección múltiple viral en vides.

Anexo nº 19

Panel A



Panel B

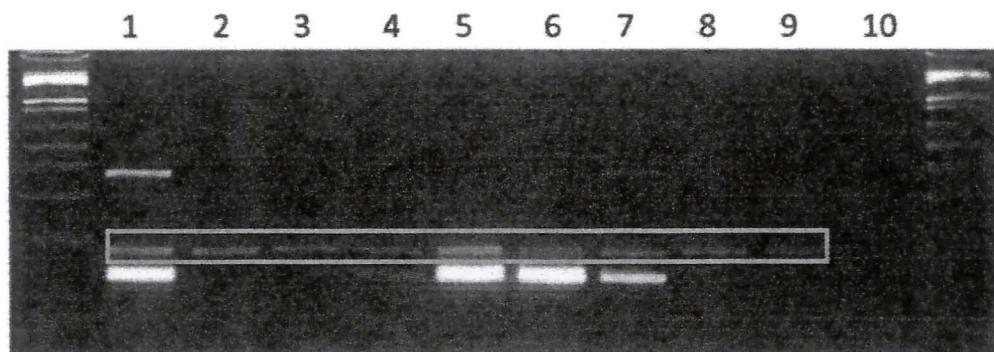


Difusión y posicionamiento en el mercado con el sistema de detección múltiple viral en vides

Para difundir y llegar a un mayor público, se decidió diseñar una página web (<http://www.agrijohnson.cl/>) (**Panel A**) en la cual se explica la técnica del sistema de detección múltiple viral en vides desarrollado durante el proyecto. Además, damos a conocer los 4 servicios derivados de nuestro proyecto: Servicio de detección para virus requeridos por el "SAG" o para la detección de los "15 virus"; Venta de plantas libres de virus de variedades viníferas, de uva de mesa y portainjertos; Venta de Kit de detección múltiple viral en vides; Saneamiento *in vitro* de plantas de vid de las diferentes variedades.

En el **Panel B** ilustramos las tarjetas de presentación con la finalidad de ser entregadas durante las charlas de difusión, visitas en campo o congresos/seminarios del rubro. De esta manera los clientes podrán quedar en contacto con AgriJohnson Limitada para la venta de servicios y productos ofrecidos.

Anexo nº 20



Amplificación del “virus GLRaV-8” en muestras de vid

Se observa un PCR utilizado para la detección viral en las muestras SAG (1- 8), un control de planta no infectado (9) y un control negativo (10), utilizando 6 partidores simultáneamente que permiten detectar los virus: GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-8 (172 bp), GFLV (258 bp), ArMV (295 bp), GVB (355 bp) y TRSV (427 bp).

En el rectángulo verde se observa una amplificación constante de un fragmento de 172 bp que corresponden al virus GLRaV-8. A raíz de este resultado, logramos identificar que el virus GLRaV-8 ya no era clasificado como un virus, sino que, correspondía al genoma ribosomal de la vid. Este resultado nos permite utilizar la amplificación de este virus como un control interno de nuestra técnica. Se utilizó como marcador de peso molecular *Ladder 1 KB Plus* de New England Biolabs © Inc.

Anexo nº 21



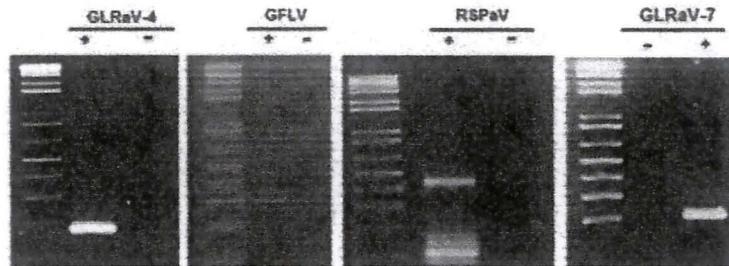
Contaminación de los partidores virales

Para identificar la fuente de contaminación durante los análisis de diagnóstico viral, se decidió realizar un ensayo con los controles negativos. Para esto, se llevó a cabo una amplificación individual de los 15 partidores virales con el templado representado por agua ultra pura DNasa, RNase and Protease Free (HYCLONE). Se utilizaron nuevos reactivos (B10x, MgCl₂, dNTPs, BSA, DMSO, Tritón, KCl, Taq polimerasa) para descartar una contaminación por parte de estos. En la **figura** se observa la amplificación de los virus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFLV, ToRSV, RSPaV, ArMV, GRSLaV, TRSV, SLRSV. Se observa contaminación en los partidores virales GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFLV ya que se observa una banda del tamaño del fragmento viral de cada uno de estos. Mientras que para los virus GFLV, ToRSV, RSPaV, ArMV, GRSLaV, TRSV y SLRSV no se observan bandas a los tamaños esperados, es más, se observan los dímeros de primers bajo los 100 bp confirmando que los partidores no encontraron un templado donde amplificar.

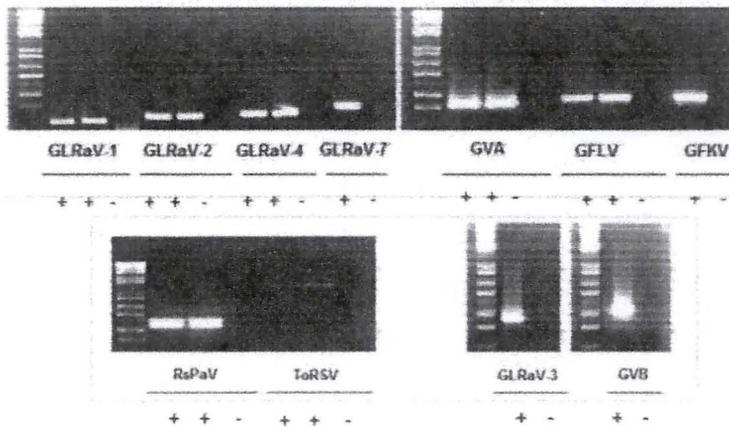
Los fragmentos virales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% utilizando el marcador de peso molecular 100 bp DNA MW Marker, VWR.

Anexo nº 22

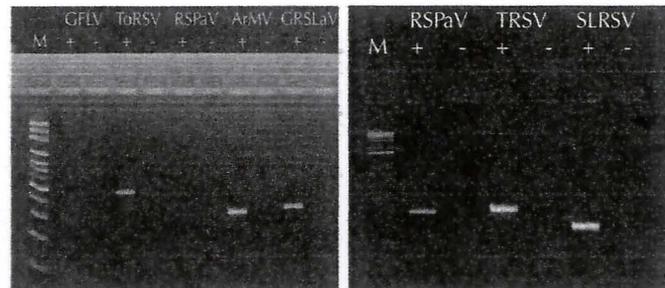
Panel A



Panel B



Panel C

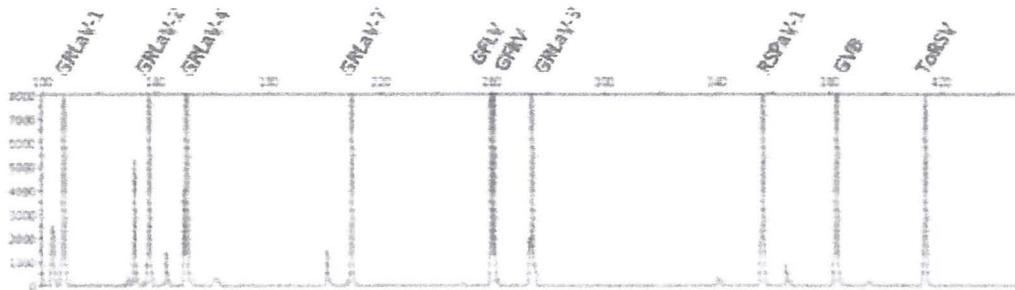


Amplificación individual de 15 fragmentos virales por RT-PCR obtenidos de diferentes fuentes: plantas infectadas o secuencias controles clonadas

La amplificación individual de los 15 fragmentos virales a partir de material vegetal infectado o de controles positivos sintetizados se obtuvo durante el desarrollo del proyecto. En el **panel A** se observan las primeras amplificaciones individuales de los virus GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GFLV (258 bp) y RSPaV (384 bp). En el **Panel B** se observa la amplificación individual de los virus GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GVA (240 bp), GVB (355 bp), GFKV (262 bp), ToRSV (417 bp) y de los ya amplificados anteriormente. En el **panel C** se observa la amplificación individual de los virus ArMV (295 bp), GRSLaV (317 bp), TRSV (427 bp) y SLRSV (320 bp). Los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% utilizando como marcador de peso molecular Ladder Perfect DNA™ 1 Kbp,

Nonagon y 100 bp DNA MW Marker, VWR (Panel C).

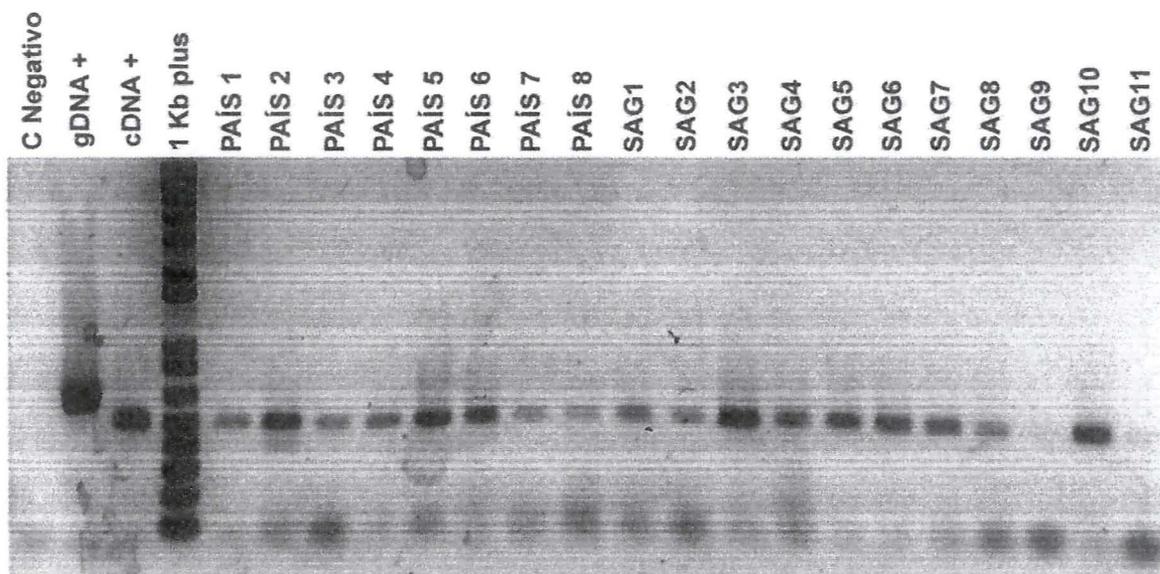
Anexo nº 23



Amplificación múltiple y simultánea de 10 fragmentos virales

En la **figura** se muestra la amplificación de 10 fragmentos virales: GLRaV-1 (109 bp), GLRaV-2 (139 bp), GLRaV-3 (274 bp), GLRaV-4 (150 bp), GLRaV-7 (209 bp), GVB (355 bp), GFLV (262 bp), ToRSV (417 bp) y RSPaV (384 bp). Los fragmentos fueron visualizados por electroforesis capilar utilizando como marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ (Thermofisher).

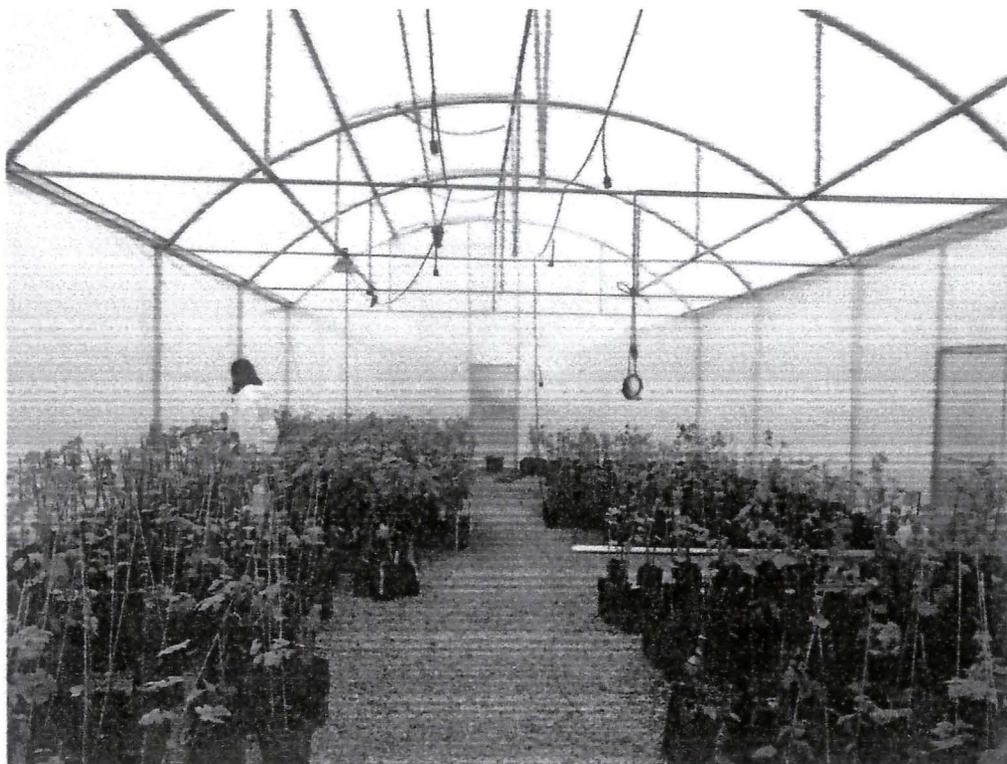
Anexo nº 24



Chequeo integridad cDNA a partir de retrotranscripción del RNA total de material vegetal infectado

Integridad de cDNA. Amplificación de gen *VvActin1* para evaluación de la integridad de cDNA. Carriles 1, 2 y 3 corresponden a control negativo del PCR, DNA genómico y cDNA, respectivamente. Muestras de vides infectadas de variedad País (carriles 5-12) y vides entregadas por SAG (carriles 13-23). Los resultados fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se utilizó como marcador de peso molecular Ladder Perfect DNA™ 1 Kbp, Nonagon.

Anexo nº25



Invernadero de producción y cuarentenario

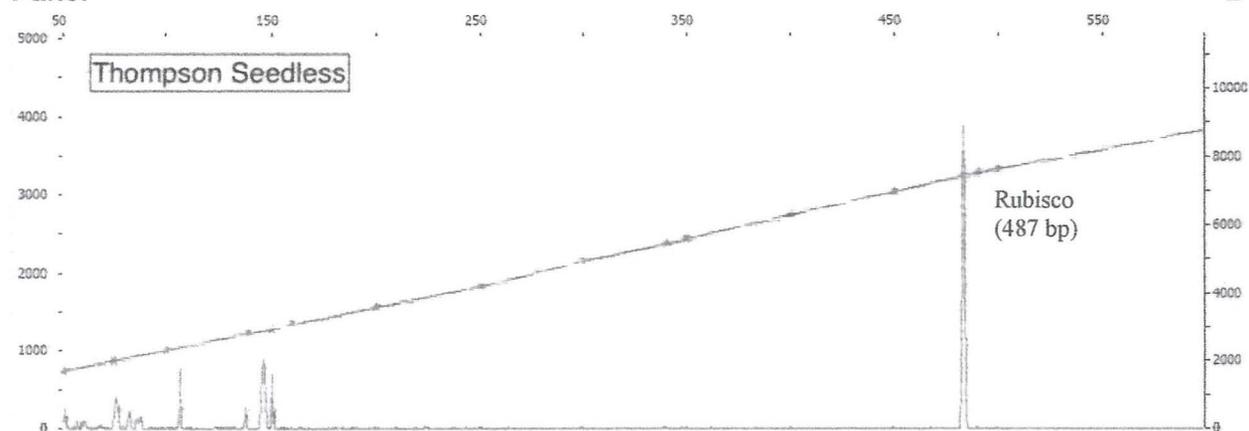
Durante el desarrollo del proyecto se construyó un invernadero de producción en donde se mantienen las plantas libres de virus bajo condiciones climáticas controladas. A un costado del invernadero de producción se encuentra el invernadero de cuarentena, separado por una puerta y panel de policarbonato.

Anexo 31:

Panel A

Numero Informe	Nombre especialista	Variedad analizada	Nombre Variedad analizada	Condición muestra o Diagnóstico
66220-6	Exequiel Vergara Diaz	Uva de mesa	Thompson 1	Negativo
66257-6	Exequiel Vergara Diaz	Uva de mesa	Red Globe	Negativo
66260-6	Exequiel Vergara Diaz	Vinífera	Merlot	Negativo
66262-6	Exequiel Vergara Diaz	Vinífera	Chardonnay	Negativo
66265-6	Exequiel Vergara Diaz	Portainjerto	Kober	Negativo
66290-6	Exequiel Vergara Diaz	Portainjerto	Harmony	Negativo
66276-6	Exequiel Vergara Diaz	Portainjerto	Salt Creek	Negativo

Panel

**B**

Análisis viral de variedades de vid por el Servicio Agrícola y Ganadero

Se analizaron muestras de campo de 7 variedades de vid diferentes: Thompson Seedless, Merlot, Chardonnay, Red Globe, Kober, Harmony y Salt Creek presentes en nuestro germoplasma. En el **Panel A** se alistan las muestras analizadas por el servicio de diagnóstico viral ofrecido por el Laboratorio Agrícola Lo Aguirre del SAG. Para tal, el análisis consideró los 8 virus disponibles: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFLV, ToRSV y RRSV. Se entregó un pool de 10 hojas de cada variedad para ser analizadas mediante técnica de PCR. Los resultados reflejan un diagnóstico negativo para los virus analizados en cada variedad. En el **panel B**, a modo de comparación, se observa la variedad Thompson Seedless proveniente de campo y analizada con el sistema de detección múltiple con los 15 virus, mostrando asimismo un resultado negativo a la presencia de virus

12 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R., & Gribaudo, I. (2007). Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1), 79-83.

Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-525.

Goussard, P. G., Wiid, J., & Kasdon, G. G. F. (2017). The effectiveness of in vitro somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 12(2), 77-81.

Sapag Chain, N. (2008). Preparación y evaluación de proyectos.

Varma, A., & Malathi, V. G. (2003). Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142(2), 145-164.