



Fundación para la
Innovación Agraria
MINISTERIO DE AGRICULTURA

RESULTADOS Y LECCIONES EN

Plataforma para detección múltiple de virus en vides

AGRICULTURA SUSTENTABLE



Proyecto de innovación en
Región Metropolitana





1 3 8



RESULTADOS Y LECCIONES EN

Plataforma para detección múltiple de virus en vides



Proyecto de innovación en
Región Metropolitana

Valorización a diciembre de 2019



Agradecimientos

En la realización de este trabajo, agradecemos la colaboración de los profesionales e investigadores entrevistados y vinculados al proyecto “Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides”, y en especial la valiosa cooperación de:

- María Consuelo Medina, investigadora y coordinadora Banco de Germoplasma y Laboratorio Biología Molecular, de Johnson y Medina Limitada.
- Felipe Aquea Zeballos, Doctor en Ciencias Biológicas, mención Genética Molecular y Microbiología.
- Álvaro Vidal, bioquímico de Johnson y Medina Limitada.

Resultados y lecciones en

Plataforma para detección múltiple de virus en vides

Proyecto de innovación en Región Metropolitana

Serie **Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario**

FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

Registro de Propiedad Intelectual N° A-5548

ISBN 978-956-328-248-1

ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO

Sergio Lara Pulgar, consultor externo.

REVISIÓN Y EDICIÓN TÉCNICA DEL DOCUMENTO

Gabriela Casanova, Fundación para la Innovación Agraria.

FOTOGRAFÍAS

Archivo FIA, Archivo Guillermo Feuerhake

DISEÑO GRÁFICO Y EDICIÓN DE TEXTOS

Guillermo Feuerhake

Se autoriza la reproducción parcial de la información aquí contenida, siempre y cuando se cite esta publicación como fuente.

Presentación

La Fundación para la Innovación Agraria (FIA) es la agencia del Ministerio de Agricultura orientada a promover la cultura de la innovación en el sector silvoagroalimentario nacional. Para ello, la Fundación apoya con incentivos financieros (convocatorias de proyectos), información, capacitación y redes para innovar.

Fundamental para que los productores puedan innovar es contar con información relevante para tomar decisiones que les permitan acercarse de manera plausible al éxito de las iniciativas que realicen. Por su parte, los proyectos e iniciativas que se desarrollan bajo el alero de FIA generan resultados que representan un gran caudal de valioso conocimiento para el sector silvoagroalimentario nacional e internacional. Como toda innovación conlleva un riesgo, y tanto los resultados promisorios como aquellos de proyectos que no lograron alcanzar los objetivos esperados son puestos en valor por FIA, ya que ambos constituyen aprendizajes relevantes.

FIA desarrolló una metodología de valorización de resultados orientada a analizar la validez y potencial de aplicación de las experiencias, lecciones aprendidas y resultados de los proyectos al momento de su cierre. Es una metodología cercana a la de un estudio de viabilidad, compuesta de distintos análisis en los ámbitos comerciales, técnicos, de gestión, legal y/o financieros, dependiendo de la naturaleza del proyecto.

En este marco, el presente documento tiene el propósito de compartir con los actores del sector los resultados, experiencias y lecciones aprendidas del proyecto **“Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides”**. Este tuvo como objetivo desarrollar e implementar un sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vides, y establecer un banco de germoplasma libre de virus de distintas variedades y portainjertos de vid de interés comercial.

Espero que la información contenida en este documento se transforme en un insumo provechoso, especialmente para viveros y viticultores, que busquen mejorar y optimizar procesos de diagnóstico, saneamiento y certificación sanitaria de las vides de vino y uva de mesa, incorporando la innovación y agregando valor a sus producciones

Álvaro Eyzaguirre
Director Ejecutivo FIA

Contenidos

| | |
|--------------------|---|
| Presentación | 5 |
| Introducción | 9 |

| | |
|--|-----------|
| Sección 1. Resultados y lecciones aprendidas..... | 11 |
| 1. Antecedentes | 12 |
| 1.1. Situación de la viticultura en Chile | 12 |
| 1.2. Relevancia de las virosis en la viticultura..... | 15 |
| 2. Base conceptual de la tecnología | 22 |
| 2.1. Metodologías de diagnóstico viral | 22 |
| 2.2. Medios de control de virosis | 28 |
| 3. La innovación tecnológica | 32 |
| 4. El valor de la herramienta desarrollada | 36 |
| 5. Conveniencia económica para el productor..... | 38 |
| 6. Claves de viabilidad..... | 43 |
| 7. Asuntos por resolver | 45 |

| | |
|--|-----------|
| Sección 2. El proyecto precursor..... | 47 |
| 1. Tecnología utilizada y validada..... | 47 |
| 1.1. Diseño y validación de técnica PCR para detección múltiple y simultánea de virus en vid..... | 48 |
| 1.2. Establecimiento de banco de germoplasma de plantas de vid libres de virus | 52 |
| 1.3. Distribución de productos y servicios desarrollados en el proyecto | 55 |
| 1.4. Difusión de servicios de detección múltiple viral en la industria de uva de mesa y vitivinícola | 56 |
| 2. Estado de ejecución actual..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| Sección 3. El valor del proyecto precursor y aprendido | 59 |
|---|-----------|

| | |
|--------------------------------|----|
| Sección 4. Anexos | |
| 1. Bibliografía | 63 |
| 2. Entrevistas realizadas..... | 66 |



Introducción

La presente publicación pone en valor los resultados del proyecto **“Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides”**, iniciativa que fue apoyada y cofinanciada por FIA, con la finalidad de desarrollar una herramienta biotecnológica para diagnosticar de manera simultánea diversos virus que afectan a las vides, contribuyendo con ello al proceso de certificación sanitaria de las vides de vino y uva de mesa.

El presente documento está estructurado en tres secciones principales. La primera de ellas, **“Resultados y lecciones aprendidas”**, tiene como finalidad proveer una visión sistematizada del nuevo servicio o herramienta tecnológica que derivó de los resultados y aprendizajes generados en el proyecto ejecutado. En su desarrollo, esta visión contiene los elementos que permiten a los productores interesados apreciar si la opción responde a sus necesidades y permite mejorar o hacer más eficientes sus procesos productivos y de gestión.

La segunda sección consiste en la descripción del **“Proyecto precursor”**,¹ donde se ilustran las experiencias que condujeron a la validación y sistematización de la herramienta tecnológica evaluada, como forma de exponer el entorno, metodologías y aplicaciones prácticas que le dieron origen.

Finalmente, considerando el análisis realizado en la primera y segunda sección del documento, en una tercera, denominada **“Valor del proyecto”**, se resumen los aspectos más relevantes y determinantes del aprendizaje para la viabilidad futura de la innovación realizada.

Se espera que esta información, sistematizada en la forma de una **“innovación aprendida”**,² aporte a los interesados elementos clave respecto de los beneficios del uso o incorporación de nuevos servicios y herramientas tecnológicas desarrolladas

¹ **“Proyecto precursor”**: análisis de los resultados de proyectos orientados a generar un nuevo servicio o herramienta tecnológica. Este análisis incorpora la información validada del proyecto precursor, las lecciones aprendidas durante su desarrollo, los aspectos que quedan por resolver y una evaluación de los beneficios económicos de su utilización en el sector.

² **“Innovación aprendida”**: análisis de los resultados de proyectos orientados a generar un nuevo servicio o herramienta tecnológica. Este análisis incorpora la información validada del proyecto precursor, las lecciones aprendidas durante su desarrollo, los aspectos que quedan por resolver y una evaluación de los beneficios económicos de su utilización en el sector.

Resultados y lecciones aprendidas

El presente documento tiene el propósito de compartir con los actores del sector los resultados, experiencias y lecciones aprendidas a partir de la realización de un proyecto apoyado por la Fundación para la Innovación Agraria, que estuvo orientado a desarrollar una herramienta biotecnológica para diagnosticar de manera simultánea diversos virus que afectan a las vides, contribuyendo con ello al proceso de certificación sanitaria de las vides de vino y uva de mesa.

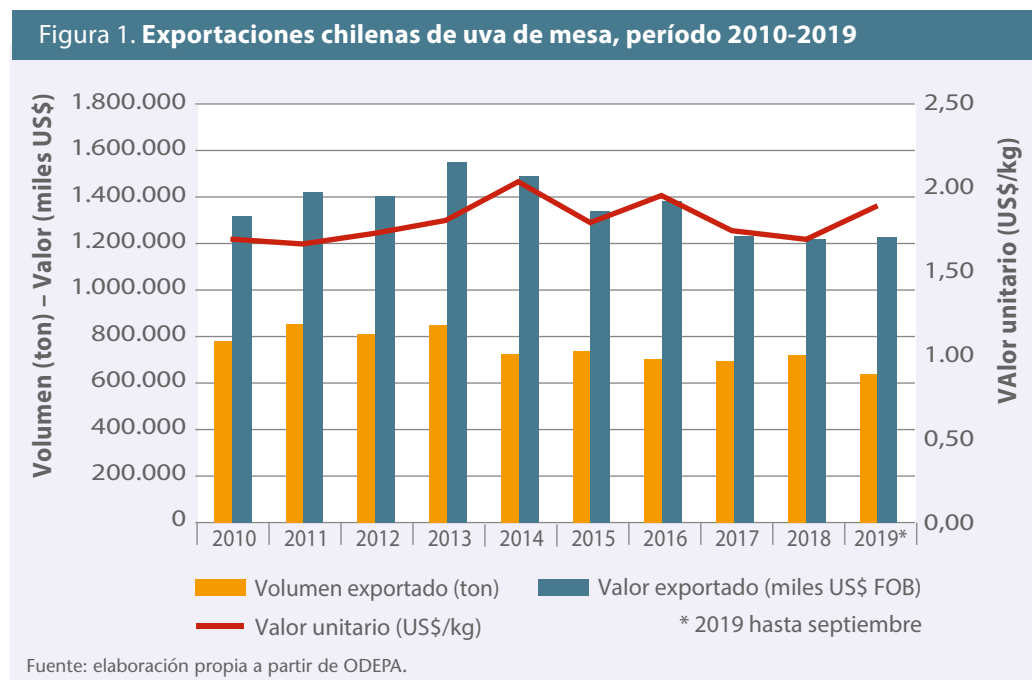


► 1. Antecedentes

1.1. Situación de la viticultura en Chile

El cultivo de la vid tiene una gran relevancia en la actividad agroexportadora de nuestro país. Por una parte, la uva de mesa es la principal especie frutícola plantada, ocupando una superficie que ha tendido a estabilizarse en los últimos años en un valor cercano a las 48.000 ha (aproximadamente 14% de la superficie frutícola nacional), lo que representa una caída de un 9% respecto a la superficie plantada en 2010, asociado principalmente a pérdida de competitividad de la industria (IQconsulting, 2019). Sus exportaciones ocupan el primer lugar en volumen, casi a la par con la manzana, pero en términos de valor alcanzan casi el 32% de las exportaciones frutícolas, lo que duplica a su competidora más cercana. Estas cifras posicionan a Chile como líder mundial en exportación de uva de mesa fresca.

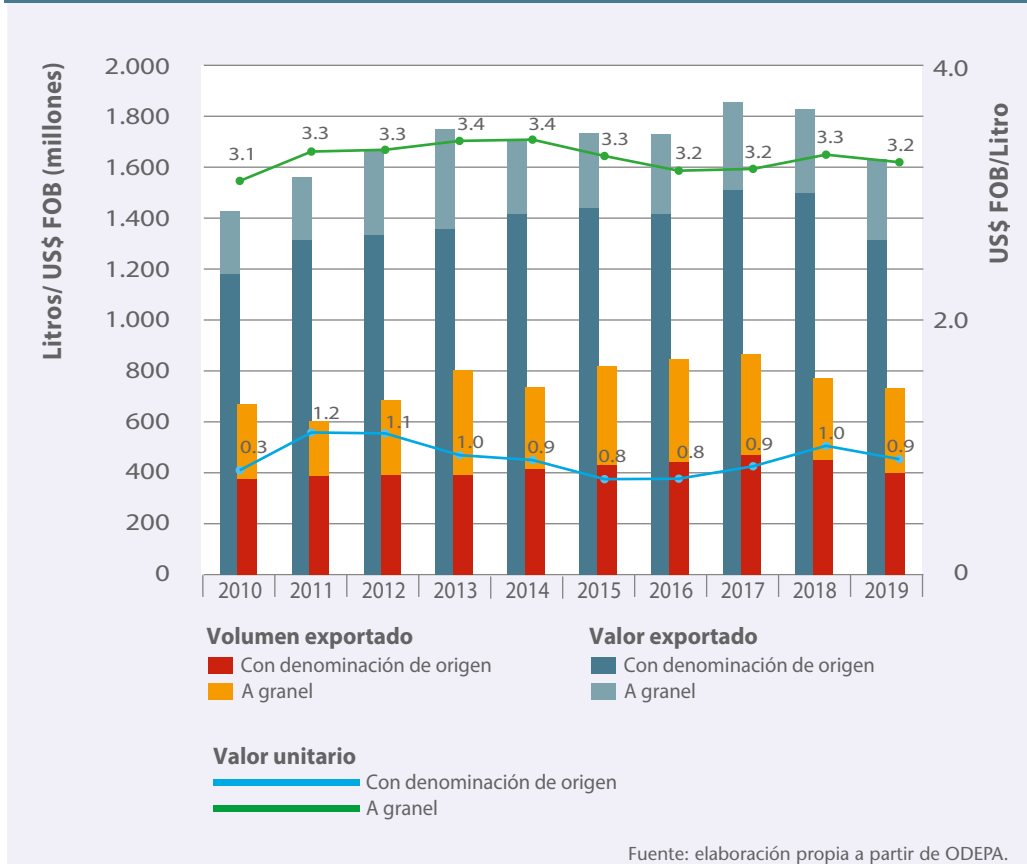
El volumen producido y exportado se ha visto reducido en los últimos años por disminución en la superficie y un período de baja en la producción mientras comienza rendir una parte de la superficie reemplazada con nuevas variedades más productivas y acordes a lo demandado en el mercado exterior.



La uva vinífera, por su parte, de acuerdo con el Catastro Vitícola Nacional del SAG, alcanza una superficie de 135.908 hectáreas en el año 2017, lo que representa una disminución del 16% respecto al año 2010. La producción de vino registrada por SAG fue de 1.188 millones de litros para el año 2018, volumen que ha tenido alzas y bajas durante la última década. Las exportaciones en esos diez años han experimentado algunas fluctuaciones, pero muestran

una tendencia de crecimiento promedio del 2 a 3% anual. El año 2018 se reportó un volumen exportado de 776 millones de litros y un valor total de 1.508 millones de dólares, de los cuáles el 59% del volumen y el 82% del valor corresponden a vino con denominación de origen.

Figura 2. Exportaciones chilenas de vino, período 2010-2019



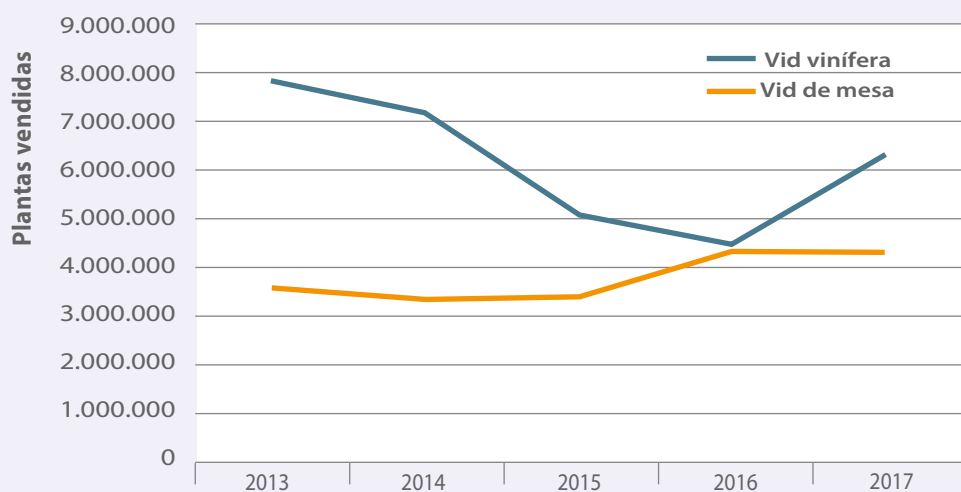
Como vemos, la viticultura es uno de los motores de las exportaciones agroalimentarias del país, alcanzando la uva y el vino un valor total exportado de 2.733 millones de dólares en el año 2018. Para lograr este desarrollo, el sector ha debido responder a la cambiante demanda de los consumidores de todo el mundo, lo que de forma más marcada en la uva de mesa implica un reemplazo de variedades antiguas por variedades más nuevas.

Para responder a esta creciente demanda por nuevas variedades, se ha desarrollado una pujante industria de viveros frutales. La ley obliga a los viveros y tenedores de plantas a inscribirse en un registro de viveristas administrado por el Servicio Agrícola y Ganadero. Conforme a este registro, en Chile existen 273 viveros de vides, de los cuales 91 declaran contar exclusivamente con esta especie. La Asociación Gremial de Viveros de Chile (AGV) reúne a los principales viveros comerciales del país, y se estima que sus socios producen cerca del 95% de las plantas frutales y el 100% de variedades protegidas. La organización

publica un anuario donde se informan las tendencias del sector, las que son un reflejo de la actividad agrícola.

En su Anuario 2018, AGV presenta información de 8 viveros de uva de mesa y 8 de uva vinífera. Los antecedentes presentados permiten apreciar el cambio de tendencia en la uva de mesa al analizar las variedades más vendidas. Mientras que en 2013 la variedad Red Globe era por lejos la más demandada, con cerca de 1,2 millones de plantas y 35% del total, al 2017 se había reducido a 23.512 plantas vendidas. En contraparte, al 2017 la delantera la llevaban las variedades protegidas Three cv Sweet Celebration® y Sheegene 20 Allison®, que en conjunto alcanzan 1 millón de plantas vendidas, equivalente al 24% del total. En la uva vinífera la tendencia no ha experimentado variaciones tan marcadas: el Cabernet Sauvignon sigue siendo la variedad más vendida, aunque entre 2013 y 2017 redujo su participación en las ventas del 35% al 23%, alcanzando 1,4 millones de plantas vendidas en 2017. Las variedades que le siguen en importancia son Merlot y Sauvignon Blanc, que en igual período aumentaron su participación en las ventas del 13% al 17%, y de un 7% al 12%, respectivamente.

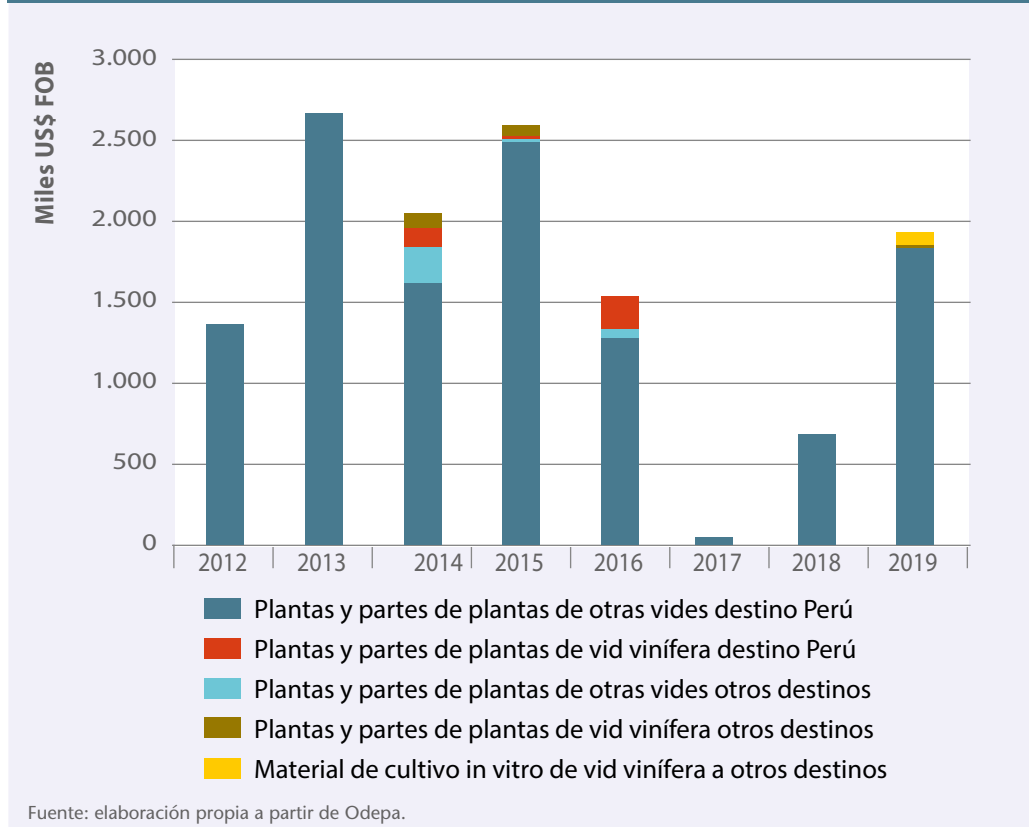
Figura 3. Venta de plantas de vides en principales viveros, período 2013-2017



Fuente: elaboración propia a partir de AGV.

Debido a que existen en Chile viveros con altos estándares de calidad, y al reconocido patrimonio fitosanitario de nuestro país, en los últimos años ha tomado auge la exportación de material de propagación de plantas frutícolas. Al respecto las vides se han visto representadas principalmente por la exportación de plantas injertadas al mercado peruano, impulsado por el acelerado crecimiento de la uva de mesa en dicho país. El máximo valor exportado se obtuvo el año 2013, donde se superaron los 2,5 millones de dólares exclusivamente por plantas injertadas a Perú, luego de lo cual ha habido algunos tímidos avances en los mercados de Ecuador, India y Argentina. A este último país se ha realizado la única exportación de material *in vitro* de vid vinífera.

Figura 4. Valor de exportaciones de plantas y partes de plantas de vides, 2012-2019



Así como existen viveros comerciales con altos estándares de calidad, se describe también un grupo de viveristas más tradicionales que dominan la técnica de producir plantas de buen aspecto y vigor, pero carecen de tecnología y no responden a las tendencias de nuevas variedades; y otro grupo de pequeños viveristas, difícil de cuantificar, cuyas operaciones se realizan al margen de los registros oficiales. La calidad de las plantas comercializadas por esta vía es deficiente y su sanidad dudosa, por lo cual constituyen un riesgo para la introducción de plagas y enfermedades en los viñedos (ODEPA, 2002). Por otra parte, existe una fracción indeterminada de viticultores que propagan sus propias plantas, lo cual tampoco queda reflejado en las estadísticas.

En términos generales, tenemos: una industria vitícola altamente dinámica, con una demanda creciente de nuevas variedades en uva de mesa como condición casi ineludible para mantener su posición competitiva; una industria vitivinícola algo más conservadora en términos de variedades, pero tendiendo a la diversificación de cepas; y una industria viverística que apuesta por subir sus estándares de calidad para el mercado interno y externo. Por lo tanto, existe una tendencia a la producción y comercialización de plantas de alta calidad, tanto en su autenticidad varietal como en su condición sanitaria. En consecuencia, toda herramienta tecnológica orientada a mejorar y garantizar la condición sanitaria de las plantas resulta un aporte para el sector productivo.

1.2. Relevancia de las virosis en la viticultura

Dentro de los factores que alteran la productividad y calidad de la fruta están los distintos patógenos que atacan a la vid. Entre los problemas fitopatológicos de mayor relevancia a nivel mundial están las enfermedades causadas por virus, identificándose más de 60 agentes virales que atacan a la vid. El género *Vitis* presenta una alta susceptibilidad a este tipo de patógenos, tanto por características intrínsecas del cultivo como por su amplia distribución en diferentes áreas geográficas y agroclimáticas, y por su medio de propagación vegetativa, principal forma de transmisión de virus, viroides y fitoplasmas. Por ello es que la vid tiene una tendencia a adquirir y mantener estos agentes infecciosos, los que además son transmitidos a través de vectores como nemátodos e insectos (Fiore *et al*, 2015).

Los virus son agentes infecciosos visibles solo al microscopio electrónico, están formados por una envoltura esencialmente proteica y contienen un solo tipo de ácido nucleico, que en el caso de los principales virus de las vides es RNA de hebra simple. Dado que carecen de una estructura celular y metabólica propia, requieren de una célula hospedera a la cual introducen su material genético para su replicación. Los virus son capaces de alterar las funciones fisiológicas normales de las plantas al interferir en la regulación de la fotosíntesis, la respiración, las actividades enzimáticas, el balance hormonal, el transporte floemático,³ y el metabolismo de los azúcares y del nitrógeno. A causa de ello, generan diversos efectos adversos sobre la producción del viñedo, como reducción de cantidad y calidad de producción, reducción del ciclo productivo del viñedo, modificación de la composición de los mostos, reducida capacidad rizógena⁴ del material de propagación, reducido prendimiento de los injertos, reducción de la resistencia a factores abióticos⁵ y bióticos,⁶ decaimiento progresivo y muerte de plantas (Fiore *et al*, 2015). En consecuencia, impactan negativamente a toda la industria vitícola, afectando la productividad y competitividad de productores de uva de mesa, vino y viveros.

Desde los primeros indicios de virosis en la década del 60', en nuestro país han sido detectados la mayoría de los virus que son mencionados en la literatura mundial. Los estudios de diagnóstico, distribución y prevalencia de las virosis son importantes porque permiten establecer cuán extendidas están ellas en una región determinada, y cuáles virus se encuentran en mayor o menor proporción. Esta información, en conjunto con factores epidemiológicos, tales como tipos de vectores, medios de diseminación, severidad de síntomas, entre otros, permiten definir con mayor precisión los impactos productivos de

³ De *floema*: tejido vegetal constituido por los vasos o conductos que transportan la savia elaborada.

⁴ Capacidad de formación de raíces.

⁵ Los factores abióticos dentro de la biología y la ecología son los factores no biológicos, entre los más importantes podemos encontrar: el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el oxígeno y los nutrientes.

⁶ Los factores bióticos son los organismos vivos que influyen la forma de un ecosistema. Pueden referirse a la flora y la fauna de un lugar y sus interacciones.

estas enfermedades, favoreciendo así que los agricultores y los organismos oficiales puedan tomar medidas de prevención y control (Herrera, 2014).

A continuación se hace una reseña de las características de algunas virosis que afectan a las vides, basándose en el conjunto de virus que fueron considerados para el diagnóstico en el proyecto precursor.

- **Complejo del enrollamiento foliar** (*Grapevine Leafroll associated Virus*): causada por diversas entidades virales que incluyen al género *Closterovirus* (GLRaV-2), *Ampelovirus* (GLRaV-1, -3, -4) y *Velarivirus* (GLRaV-7), siendo GLRaV-1, 2 y 3 los más frecuentes. Los síntomas son: enrollamiento hacia el envés de las hojas, con leve amarillamiento en variedades de uva blanca y enrojecimiento en las de uva tinta; racimos más pequeños con bajo contenido en azúcares y mayor acidez, y decoloración parcial o total de bayas en variedades tintas. La disminución de producción alcanza un promedio del 10%, pudiendo llegar al 60 o 70%. Se disemina a través de insectos, cóccidos y pseudocóccidos (conchuelas y chanchitos blancos). Se considera la enfermedad más diseminada en el mundo (Fiore *et al*, 2015).
- **Complejo de la madera rugosa**: se manifiesta sobre todo en plantas injertadas, provocando disminución del vigor de las plantas, decaimiento generalizado y atraso en la brotación. En el punto de injerto pueden aparecer síntomas de canales o grietas que reducen la funcionalidad de los tejidos conductores. Puede causar disminución de rendimiento de un 20 a 30%, a nivel de vivero genera menor producción de madera y raíces, reducción del porcentaje de prendimiento de los injertos, e incluso muerte de las plantas. Se relaciona con los siguientes virus:
 - *Grapevine Virus A* (GVA), causante del síndrome “*Kober stem grooving*”.
 - *Grapevine Virus B* (GVB), causante del síndrome “*Corky bark*”.
 - *Grapevine Rupestris Stem Pitting-associated Virus* (GRSPaV).



Enrollamiento y enrojecimiento foliar en una variedad de uva tinta (Fiore, 2015).



Efecto de daño en madera por GRSPaV (<http://wine.wsu.edu>)



- **Lesión del patrón de uva de mesa:** causada por *Grapevine rootstock stem lesion associated virus* (GRSLaV) del género *Closterovirus*. Produce decaimiento y muerte de plantas jóvenes de la variedad “Red Globe”, por la inducción de incompatibilidad entre el patrón y el injerto. El síntoma característico es un engrosamiento en la zona de injerto, acompañado de necrosis y grietas irregulares (Camacho, 2005). GRSLaV es ahora considerado una cepa de GLRaV-2 y está designado como *Grapevine leafroll associated virus-2 Redglobe* (GLRaV-2RG) (Alkowni *et al*, 2011).
- **Jaspeado de la vid:** causada por *Grapevine Fleck Virus* (GFkV), del género *Maculavirus*. GFkV está latente en *Vitis vinifera* pero induce síntomas foliares específicos en *Vitis rupestris* (Fiore, 2018). Las hojas jóvenes y de edad intermedia presentan manchas cloróticas y translúcidas en las nervaduras de tercer y cuarto orden. Cuando el moteado es abundante, las hojas pueden llegar además a deformarse. Se aloja en el floema de la planta, restándole vigor y afectando especialmente a las raíces (Fernández, 2013). Se ha comprobado que disminuye el porcentaje de prendimiento de los injertos en *Vitis rupestris* y otros de sus híbridos. Se transmite por vectores y por multiplicación vegetativa.
- **Degeneración o deformación infecciosa:** causada por virus pertenecientes a la familia Secoviridae. El principal agente es el *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), y puede producir dos síndromes: “hoja en abanico” y “mosaico amarillo” en hojas y brotes, así como también ramas anormales, entrenudos excesivamente cortos o irregulares, y crecimiento en zigzag. Las pérdidas de producción pueden ser de un 5 a 10%, reportándose hasta un 90%; la calidad de la fruta se ve afectada por una disminución en el contenido de azúcar y acidez titulable, y se reduce significativamente la vida productiva de viñedos. Se trasmite a través de la multiplicación de plantas enfermas, por injerto y por nemátodo *Xiphinema index* (Madariaga, 2017).



Síndrome de mosaico amarillo por GFLV
(Madariaga, 2017)

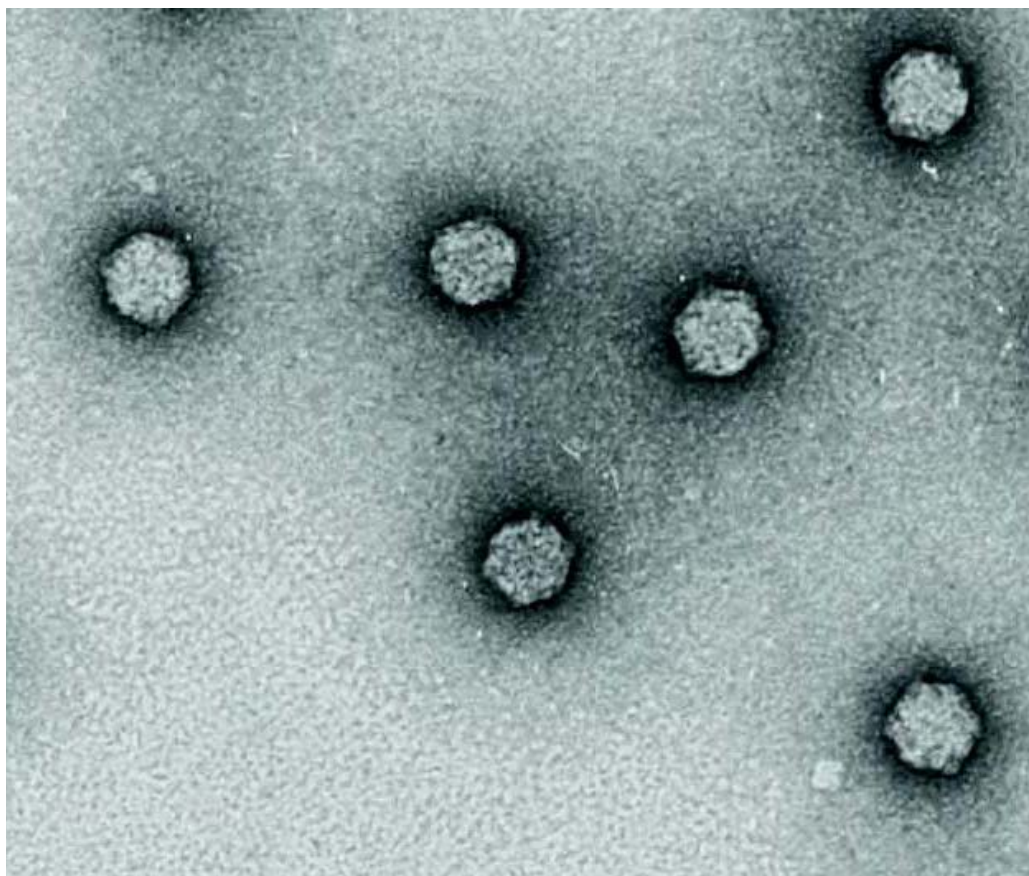


Jaspeado de la vid por GFkV
(Fernández, 2013)

- **Virus de la mancha anular del tomate:** *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV) del género *Nepovirus*. No produce síntomas evidentes, pero causa declinamiento progresivo con fuertes pérdidas en los rendimientos a partir del segundo año de plantación. En Chile se han descrito prevalencias de un 8,0 a 14,4%. Es un virus muy versátil, tiene un amplio rango de huéspedes entre plantas herbáceas y leñosas; se transmite por material de propagación infectado, por medio de la semilla en un gran número de malezas y se disemina de planta a planta a través de nemátodos vectores (Herrera, 2014).
- **Virus del Mosaico Arabis:** *Arabid Mosaic Virus* (ArMV) del género *Nepovirus*. Los síntomas más comunes incluyen moteado y punteado de la lámina de las hojas, junto a deformaciones y aclaramiento de venas secundarias. Muchas veces las infecciones son latentes y la planta no muestra mayores síntomas. Se disemina por los mismos mecanismos que ToRSV, por lo cual puede mantenerse en gran variedad de plantas silvestres y cultivadas (Herrera, 2014).
- **Virus de la mancha anular del tabaco:** *Tobacco Ringspot Virus* (TRSV), forma parte de los *Nepovirus* que causan el síndrome de decaimiento en las vides de Norteamérica. Los síntomas son similares a aquellos causados por ToRSV. Es transmitido principalmente por nemátodos (Monis, J., 2006).
- **Virus de la mancha anular de la fresa:** *Strawberry Latent Ringspot Virus* (SLRSV), *Nepovirus*, que junto a GFLV, ArMV y otros en Europa, son denominados degenerativos con síntomas tipo “fanleaf” (Herrera, 2014).

Todos los virus anteriores han sido detectados en alguna oportunidad en Chile, aunque algunos están en baja proporción o no generan daños productivos relevantes, así como también es común la coexistencia de distintos virus en una misma planta o en una misma plantación. Según datos reportados por la empresa ejecutora del proyecto, en laboratorios privados se ha registrado que más del 25 % de las plantas en Chile estaban infectadas por 5 virus a la vez, llegando incluso hasta 11 virus. Debe recordarse que diversos virus pueden causar síntomas semejantes, por lo cual sin un diagnóstico de laboratorio no es posible determinar qué virus exactamente está presente en un viñedo.

A partir de los distintos estudios realizados en Chile a lo largo de los últimos años, puede concluirse que los virus están ampliamente distribuidos en todas las zonas de cultivo de la vid, incluyendo plantaciones de uva de mesa, uva vinífera y viveros. Dado que cada estudio tiene alcances territoriales y metodológicos particulares, los resultados observados presentan un alto grado de variación, tanto en los porcentajes totales de infección como en la prevalencia de cada virus en particular. En su trabajo de 2015, Herrera hace una revisión de los diversos estudios realizados en Chile, concluyendo que puede estimarse que las infecciones virales fluctúan entre un 10 y 20% entre las regiones de Coquimbo y del Maule,



Grapevine fanleaf virus, GFLV. Foto M. Fuchs, NY State IPM Program at Cornell University.

y que los géneros de virus más prevalentes son los *Ampelovirus* (GLRaV), seguido de los *Nepovirus* (GFLV, ArMV, ToRSV) y finalmente los virus *Vitivirus*, asociados al síndrome de la madera rugosa (GVB, GVA, RSPaV).

La información disponible en Chile indica que desde el punto de vista epidemiológico se encuentran todos los factores que permiten las condiciones para que los virus se dispersen constantemente a nuevas zonas no contaminadas. Por una parte, existe un gran flujo de plantas contaminadas provenientes de viveros, las cuales introducen los virus a los nuevos huertos (infección primaria), y por otra, la presencia de vectores en los campos que permiten ir contaminando sucesivamente a otras plantas sanas (infección secundaria) (Herrera, 2014).

Existen otros virus que afectan a las vides y que no se encuentran en Chile, por lo que de acuerdo a la normativa sanitaria son de carácter cuarentenario, siendo requisito para la internación que cualquier material vegetal se encuentre libre de ellos. Esto incluye los virus *Tomato black ring virus* (TBRV), *Raspberry ringspot virus* (RRSV), *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV), *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) y *Grapevine vein clearing virus* (GVCV).

► 2. Base conceptual de la tecnología

2.1. Metodologías de diagnóstico viral

Dado que no existen medios directos para eliminar o combatir los virus en vegetales, los métodos de detección e identificación de virus son críticos para el manejo de las enfermedades virales. Estos deben ser los más convenientes, efectivos, específicos y rápidos, y son reconocidos como el instrumento básico de la virología vegetal (Gonzalez-Garza, 2017).

La sintomatología producida por los virus en las plantas enfermas fue la primera forma de detectar e identificar los virus que las afectaban, que fueron nombrados de acuerdo a la sintomatología que producían. Sin embargo, tempranamente se constató que variantes de un mismo virus podían producir síntomas muy diferentes; que muchos virus diferentes producían síntomas muy similares; que plantas con virosis podían ser asintomáticas, y que las plantas también presentaban síntomas similares a virosis como respuesta a condiciones climáticas, nutricionales, infecciones por patógenos no virales, o daños por insectos, ácaros o nematodos. A pesar de ello, la observación de síntomas sigue siendo una herramienta útil para aplicar en campo y puede servir como orientación para realizar diagnósticos por otros medios.

En la actualidad los medios más utilizados por laboratorios e instituciones relacionadas con la sanidad vegetal incluyen técnicas como indexaje biológico, ELISA y PCR, siendo esta última la tecnología sobre la cual se basa el proyecto precursor.

La técnica de **indexaje biológico** es utilizada para diagnosticar patógenos a través de su transmisión a hospederos sensibles, los que sometidos a condiciones ambientales controladas pueden o no manifestar síntomas, indicando de esta forma la presencia o ausencia de un patógeno (SAG, 2017).

La **prueba de ELISA** (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) se clasifica como una técnica serológica en la cual un antígeno inmovilizado, originado por una planta infectada, se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo de señal (SAG, 2017). Es la técnica más utilizada en diagnóstico viral por su sencillez, bajo costo y buena sensibilidad, aunque tiene dificultades para detectar virus en título bajo.

La técnica de **PCR**, *Polimerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico, mediante ciclos térmicos diferenciados en una solución con diversos reactivos (SAG, 2017). Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar o copiar hebras de ADN, proceso realizado en tres etapas:

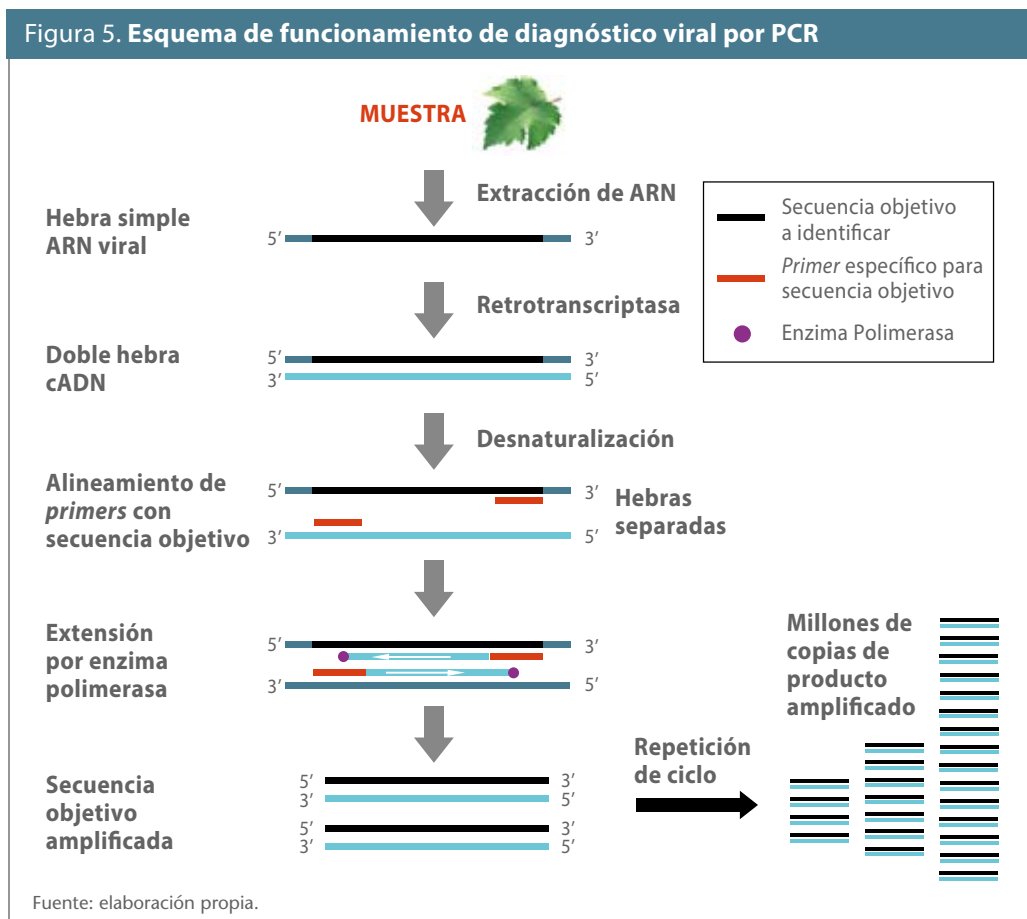


- Desnaturalización a alta temperatura para separar las dos hebras del ADN. Una vez separadas, cada hebra sirve como molde para su replicación o copiado en la etapa siguiente.
- Anillado o hibridación de los dos *primers*⁷ a su secuencia complementaria en las dos hebras de ADN. Los *primers* o partidores son secuencias genómicas cortas, diseñadas para activar el proceso de copiado limitándolo a una región específica. Cada *primer* se acopla con la hebra de ADN en una posición específica que le es complementaria según la secuencia de nucleótidos con los que fue diseñado, dando la señal para que la enzima polimerasa realice la elongación.
- Extensión o elongación del *primer*: la enzima ADN polimerasa reconoce la señal dada por los partidores acoplados, sintetizando la cadena complementaria a la hebra molde utilizando como materia prima los nucleótidos presentes en la solución. De este modo, se obtienen copias de la región objetivo del ADN, las que a su vez sirven de molde para repetir el ciclo.

Los elementos que se necesitan para realizar PCR son: un molde de ADN, enzima polimerasa termoestable (por ejemplo: Taq polimerasa), nucleótidos que servirán como “ladrillos” para sintetizar las secuencias copiadas, *primers* o partidores, cofactores (MgCl₂ y otros) y un equipo termociclador que permite programar con precisión las temperaturas y duración de cada etapa. La temperatura del proceso es muy importante y debe ser ajustada de acuerdo a las características específicas del análisis. Como referencia, las temperaturas secuenciales pueden ser de 95 °C, 55 °C y 72 °C para las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente.

⁷ Un partididor, cebador, iniciador o *primer* es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los nuevos ciclos, por lo que repitiendo los primeros tres pasos 30 o 40 veces en un termociclador automático, la cantidad de nuevas hebras de ADN amplificadas suman millones (230 o 240 copias de la secuencia objetivo). Generalmente no se realizan más ciclos ya que se agotan los reactivos y se alcanza una meseta en la generación de producto. En el caso de los virus ARN, la PCR tiene un paso previo, que es retrotranscribir la hebra de ARN en ADN complementario, mediante la utilización de enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Una vez transcrito en ADN complementario, el proceso continúa como PCR convencional. A esta variante se le conoce como RT-PCR (González-Garza, 2017).

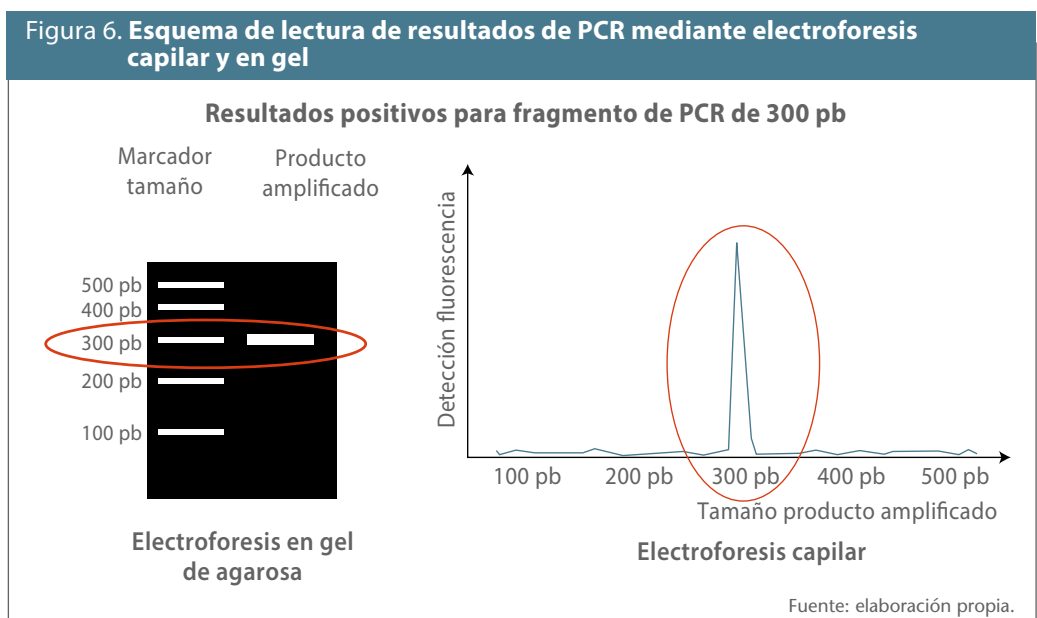


Para utilizar PCR o RT-PCR se requiere tener conocimiento de al menos una parte de la secuencia del genoma del virus, para poder diseñar los *primers* complementarios a esa secuencia. Los avances de la investigación genómica han permitido secuenciar una gran cantidad de virus, por lo cual se dispone de enormes bases de datos que son analizadas mediante herramientas bioinformáticas, con el fin de identificar secuencias genómicas específicas para cada virus y conservadas para los distintos aislados de un mismo virus. Una vez identificadas estas secuencias se pueden sintetizar los *primers* para ser utilizados en las pruebas de PCR.

La lectura del resultado de una prueba de PCR se hace a través de la visualización de los productos obtenidos después de una serie de ciclos de amplificación. Dado que los *primers* amplifican una secuencia determinada con un tamaño específico (medido en pares de bases o pb), el diagnóstico se considera positivo si se logra visualizar un fragmento del tamaño esperado. Habitualmente, los resultados de una reacción de PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa. En esta técnica se dispone una matriz de gel a la que se le aplica una corriente eléctrica que impulsa los fragmentos de ADN, migrando de forma diferenciada según su tamaño. Se incluye un estándar o marcador de peso molecular para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR. Los fragmentos de la misma longitud forman una banda en el gel, que se puede identificar a simple vista al teñirlo con un pigmento con afinidad al ADN.

En el proyecto, además de la visualización en gel de agarosa, se utilizó la técnica de electroforesis capilar, donde los productos de PCR son expuestos a un campo eléctrico a través de un capilar muy fino que permite la migración diferencial de las moléculas según su tamaño. Para la detección diferencial, los fragmentos son marcados por fluoróforos durante el proceso de PCR, marcas que son detectadas por un láser de argón que las excita a diferentes longitudes de onda, produciendo espectros de emisión diferenciables (Magaña *et al*, 2009). El resultado de un diagnóstico se interpreta como positivo si aparece una señal de fluorescencia en el tamaño esperado según el fragmento buscado.

En la figura siguiente se muestra un esquema de visualización de resultados mediante electroforesis en gel de agarosa y electroforesis capilar, para un fragmento de tamaño esperado de 300 pb.⁸

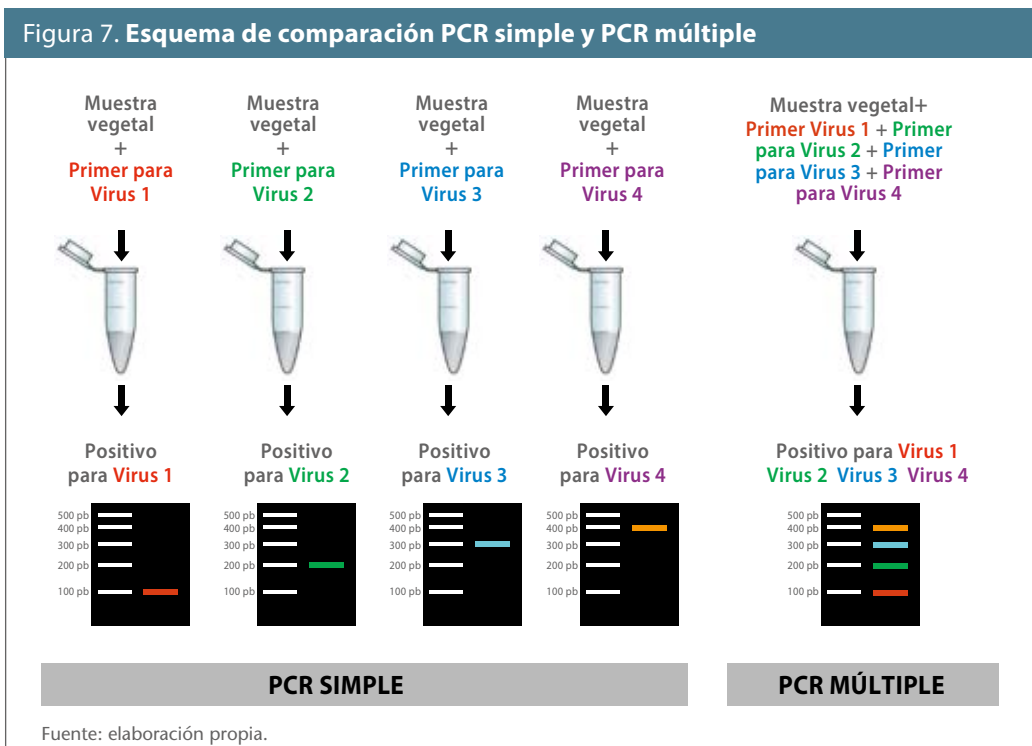


⁸ El pb de cada número en el marcador indica cuántos pares de bases tiene el fragmento de ADN.

La electroforesis capilar ha demostrado ser un método eficiente, rápido y económico, con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea en forma automatizada, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, con bajos niveles de error (Magaña *et al*, 2009).

La prueba de PCR, en términos generales, por su rapidez, sensibilidad y especificidad es considerada superior a ELISA en el diagnóstico de las enfermedades virales de los vegetales, aunque limitada por su mayor costo.

La metodología desarrollada en el proyecto precursor se basa en el mismo principio de RT-PCR, pero **integrando en una misma reacción un set de partidores o primers para detectar a un conjunto de virus simultáneamente**. Esta técnica se ha estudiado desde hace varias décadas y se implementa de forma comercial en diagnóstico de virus y otras aplicaciones de medicina humana.



Ante la diversidad de virus que afectan a las plantas, uno de los desafíos de la fitopatología durante los últimos años ha sido la implementación de métodos de detección polivalentes o múltiples, ya que estos contribuyen a la reducción de costos, mayor eficiencia y rapidez. Existen diferentes enfoques, basados en diferentes principios bioquímicos. De ellos, la RT-PCR multiplex (mRT-PCR) es la técnica que cuenta con mayores referencias y estudios publicados, demostrando su efectividad, mayor rapidez y economía que las pruebas simples, dado que al ser una sola reacción se reducen los costos de material, mano de obra y tiempo (Pallás *et al*, 2018).

La técnica se basa en el mismo principio de PCR, pero utilizando un conjunto de secuencias objetivo y de *primers* de acuerdo a los patógenos que se busque identificar en forma simultánea. Los productos amplificados pueden ser visualizados y diferenciados por su tamaño en gel de agarosa.

Un aspecto clave para mRT-PCR es el diseño de los partidores, que debe tener en cuenta las siguientes consideraciones (Shen *et al*):

- Longitud de la secuencia: por lo general, se usan cebadores de longitud corta, en el rango de 18-22 bases. Secuencias cortas pueden ser poco específicas, mientras que secuencias muy largas dificultan la hibridación y afectan el rendimiento de la prueba.
- Temperatura de fusión: se utilizan *primers* con una temperatura de fusión o *melting* similar, generalmente entre 55 °C y 60 °C. Si las temperaturas de fusión son muy diferentes puede producirse fusión preferencial de algunas secuencias.
- Especificidad: los *primers* deben ser capaces de hibridar secuencias específicas para cada virus buscado, de modo de no generar reacciones cruzadas, ya que al producirse la reacción en un mismo tubo existe competencia entre las secuencias objetivo y los partidores.
- Evitar la formación de dímeros de *primer*: se debe verificar que las secuencias entre distintos partidores no sean complementarias entre sí, ya que en la mezcla de reacción se producirían amplificaciones inespecíficas (unión de *primer-primer* en lugar de *primer*-secuencia objetivo).
- Tamaño de los productos amplificados: los amplicones⁹ o productos amplificados por PCR deben tener tamaños que permitan su diferenciación por electroforesis.

La sensibilidad de esta técnica está influenciada por el número de objetivos a detectar, principalmente debido a la cantidad de diferentes pares de *primers* presentes. Sánchez-Navarro *et al* (2005) demostraron que el uso de una mezcla de 5 pares de partidores no afecta el límite de detección de mRT-PCR, mientras que 7 pares sí lo afectaban, es decir, disminuye la sensibilidad. La mayor parte de las reacciones múltiples reportadas en la literatura científica describen la detección de 2 a 5 patógenos por reacción. El mayor número de virus reportado alcanza a 9, precisamente realizado en vides (Gambino y Gribaudo, 2006). Algunas de las limitaciones de la técnica se han superado mejorando la calidad de los procedimientos de extracción de ácido nucleico, los productos obtenidos y/o las diferentes modalidades de la tecnología de PCR.

⁹ Un amplicón se define como el conjunto de secuencias obtenidas de cada PCR individual.

Una variante de la PCR convencional es la técnica de **PCR en Tiempo Real**, PCR cuantitativa o qPCR, que combina la amplificación de ADN y la visualización en un único proceso, grabando la acumulación de ADN marcado con fluorescencia. Con esto se obtiene mayor precisión y sensibilidad que en PCR convencional (González-Garza, 2017). Mediante esta variante se reportan al menos tres estudios con detección simultánea de 4 y 5 virus en vides.

Si bien no constituyen un medio diagnóstico de rutina, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (*Next-generation sequencing* o *Deep sequencing*) permiten a través de diferentes plataformas y preparaciones de plantillas la detección rápida y simultánea de todas las secuencias genómicas conocidas o desconocidas presentes en una muestra. Por lo tanto, en combinación con la bioinformática, es una herramienta muy poderosa para detectar la etiología de una enfermedad cuando esta es desconocida, y tiene el potencial de ser utilizada en el futuro para el diagnóstico rutinario de virus de plantas. Hasta ahora varias limitaciones, como el alto costo del método, han impedido su adopción más amplia en el diagnóstico (Varveri *et al*).

2.2. Medios de control de virosis

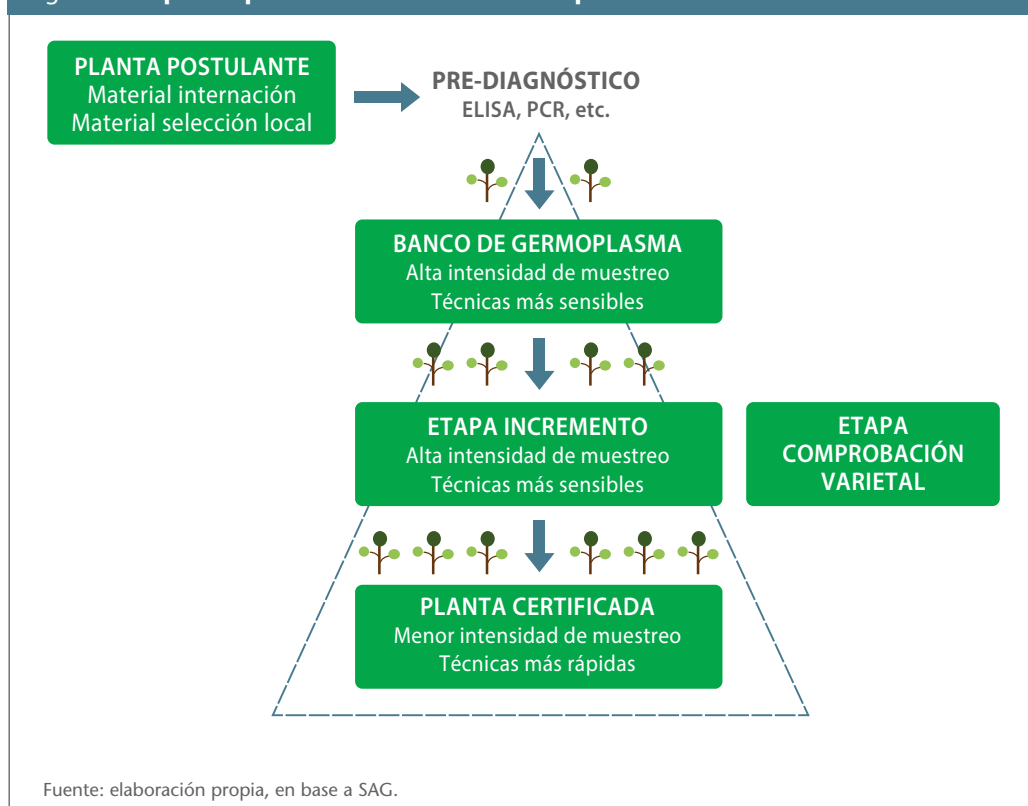
Las medidas de control de las virosis se basan exclusivamente en la prevención de la introducción de la infección en un terreno y su posterior diseminación. Para ello es fundamental que, ya sea en el establecimiento de una nueva plantación o bien en el replante, se use material de propagación de sanidad comprobada, libre de las principales enfermedades.

Este material puede provenir de viveros con programas de selección y certificación sanitaria, y/o con aplicación de técnicas de saneamiento. Respecto a los programas de certificación, son una herramienta utilizada en numerosos países para dar mayores garantías de calidad a los agricultores, se encuentran bien establecidos y se están tomando medidas para la armonización entre países.

En Chile se encuentra en operación el Programa de Certificación de Plantas Frutales, bajo la supervisión del SAG, y tiene por objetivo asegurar la calidad genética y sanitaria de los materiales de propagación. Ello implica establecer esquemas fitosanitarios para aquellas plagas presentes en el país que el SAG ha determinado que deben controlarse a nivel de viveros, y para las plagas cuarentenarias presentes bajo control oficial. Para el caso de la vid, en el marco del Programa, debe asegurarse que los materiales postulantes al sistema estén libres de los virus GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA y GVB, verificados a través de ELISA o PCR en laboratorio oficial del SAG o en laboratorios privados acreditados específicamente para este programa (SAG, 2019).

Este Programa es de carácter voluntario, y a través de él se busca fomentar la utilización de plantas con calidad genética y sanitaria controladas, permitiendo que dichas plantas expresen su máximo potencial productivo.

Figura 8. Esquema proceso de certificación de plantas frutales



Un paso crucial en la producción de material vegetal certificado es la selección de stocks limpios y probados con virus que se propagarán vegetativamente. Sin embargo, no siempre es fácil identificar tales plantas. En algunos casos, la mayoría de ciertas variedades de vid probadas están infectadas por varios virus, por lo que la aplicación de técnicas de saneamiento es necesaria para obtener material vegetal saludable. A continuación se indican algunas técnicas de saneamiento viral utilizadas en vides.

Termoterapia: es la metodología aplicada con mayor frecuencia en los protocolos de saneamiento. Consiste en cultivar plantas *in vitro* o *in vivo* gradualmente a temperaturas moderadamente altas durante un cierto período de tiempo, dentro de los límites de supervivencia de cada especie. La termoterapia, sola o en combinación con otras técnicas, se ha aplicado con éxito en saneamiento contra los virus más recurrentes (Maliogka *et al*, 2015).

Embriogénesis somática: formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión a través del manejo de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento. El tejido utilizado puede ser seleccionado a partir de hojas, tallos, secciones de hipocotilo,

pétalos, meristemos apicales, ovarios y embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de anteras. Los explantes se cultivan en un medio inductor de callos y, unos meses después, los callos se transfieren a un medio de diferenciación para la generación de embriones somáticos. Este método, en teoría, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de automatizar el proceso, y los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, entre otros factores (Freire, 2003).

Quimioterapia: su aplicación es más reciente, pero ha dado buenos resultados en la eliminación de virus en material *in vitro*, especialmente de los virus más resistentes a otros medios de saneamiento. El método se basa en la administración *in vitro* de compuestos químicos que muestran actividad antiviral para los explantes, los cuales generalmente provienen de medicamentos utilizados contra los virus humanos (Maliogka *et al*, 2015).



Clones de plantas libres de virus obtenidas por embriogénesis somática y quimioterapia (proyecto precursor).

Las medidas mencionadas, que combinan técnicas de diagnóstico y saneamiento, deben ser complementadas con el aislamiento del material de propagación para evitar la introducción de virus desde el ambiente. Posteriormente, a nivel de campo, también existen diversas medidas que el agricultor puede tomar para reducir la diseminación de las enfermedades y disminuir el impacto económico que ello puede significar. La aplicación de un programa integral de manejo sanitario debe incluir las siguientes medidas (Walton *et al*, 2010):

- Monitorear constantemente el predio para detectar plantas con sintomatología viral (hojas enrolladas o enrojadas, alteraciones de la madera). Existen virus latentes que pueden tardar varios años en mostrar síntomas, por lo que no es posible asumir la ausencia de virus basado en la ausencia de síntomas visuales en las plantas.
- Complementar la observación de síntomas con la detección de virus en laboratorios calificados.
- Aplicar prácticas rutinarias para el control de vectores, como chanchitos blancos y nemátodos que diseminan los virus dentro del predio.
- Controlar malezas que pueden servir como reservorio natural a algunos virus.



- Identificar zonas infestadas o de “alto riesgo” dentro del viñedo, dejando para el final del programa de trabajo las labores en ese sector. Esto podría ayudar a evitar la propagación a otras zonas.
- Mantener la limpieza de equipo, maquinaria y herramientas, evitando transportar restos vegetales de un sector a otro.
- Evaluar conveniencia de arrancar plantas infectadas por virus, según edad del viñedo y nivel de infección. En caso de extraer las plantas, asegurarse de retirar la mayor parte del sistema radicular y una a dos plantas alrededor de las infectadas para reducir el riesgo de diseminación secundaria desde la fuente original.
- Compostar o destruir de manera segura los desechos vegetales contaminados.

Ninguna medida por sí sola puede dar garantías de mantener un predio libre de virus, pero aplicadas racionalmente y de manera conjunta a lo largo de la cadena productiva entregan grandes posibilidades de mantener estos patógenos bajo control y evitar el daño económico a la actividad.

► 3. La innovación tecnológica

La base conceptual de la detección de virus por PCR múltiple se encuentra establecida y ha sido aplicada en diversos estudios, donde se ha logrado detectar hasta 9 virus en vides, de forma simultánea.

En base a los estudios previos, y apoyándose en la creciente disponibilidad de bases de datos de secuenciación genómica viral, el proyecto se propuso ampliar el número de virus a detectar simultáneamente en una sola reacción, manteniendo adecuados estándares de sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, la innovación desarrollada por el proyecto podría calificarse como incremental, pues amplía y mejora una tecnología existente.

La búsqueda de métodos efectivos, rápidos y sensibles para la detección de virus en plantas es una necesidad en el sector productivo, que se ha manifestado con mayor intensidad en los países que cuentan con programas bien establecidos de certificación del material vegetal, en operación desde hace décadas. Con tal propósito, constantemente se investigan nuevos métodos o mejoras de los ya existentes.

El diseño de una prueba de PCR múltiple requiere una importante inversión de tiempo para los procedimientos de optimización, donde deben adaptarse y ajustarse diversos factores como diseño de partidores, temperatura de fusión y alineamiento, componentes de la reacción, controles internos y externos, entre otros. Asimismo, la susceptibilidad a errores de ejecución y de contaminación hace necesaria una formación especializada del personal que ejecutará los análisis. Estas dificultades se acrecientan en la medida en que la técnica aumenta el número de virus a detectar, razón por la cual no se utiliza en forma rutinaria.

Tanto en nuestro país como en el extranjero, en forma rutinaria se siguen utilizando ELISA y RT-PCR convencionales para la detección de virus, tanto en laboratorios privados como en las instituciones oficiales de control fitosanitario.

En general, las técnicas de PCR son más sensibles, específicas y rápidas que ELISA. Esta prueba presenta problemas de sensibilidad cuando hay bajas concentración de virus y distribución irregular en los tejidos del huésped, pero tiene menor costo que la técnica PCR. A su vez, la variante PCR en Tiempo real supera a la PCR convencional. La visualización por electroforesis capilar aporta también mayor sensibilidad y rapidez que la electroforesis en gel de agarosa, ya que puede detectar diferencias de tamaño de 1 o 2 nucleótidos en una secuencia, y además puede ser automatizada.

Los métodos de Indexaje Biológico, utilizados frecuentemente por los organismos oficiales en programas de certificación, presentan una alta eficiencia diagnóstica, pero requieren mantener un banco permanente de plantas indicadoras e implican la retención prolongada del ma-



terial a evaluar, por lo cual resulta inconveniente desde el punto de vista del tiempo. A pesar de ello, sigue siendo un método ampliamente utilizado.

En nuestro país el Servicio Agrícola y Ganadero, a través de la Resolución Exenta N° 6315 de 2019, establece las plagas y métodos de detección que corresponden específicamente al material de propagación de la vid, como parte del Programa de Certificación de plantas frutales.

Cuadro 1. Plagas de control y medios de diagnóstico en Programa de Certificación de vides

| Enfermedad | Agente Causal | Técnicas de Diagnóstico |
|--|--|---|
| Degeneración infecciosa | <i>Grapevine fan leaf virus</i> (GFLV) | <ul style="list-style-type: none"> • Indexaje Biológico • q-PCR o PCR Tiempo Real • ELISA • RT-PCR • Otro método reconocido internacionalmente |
| Complejo del Enrollamiento Foliar | <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1) <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2) <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3) | |
| Complejo de la Madera Rugosa | <i>Kober Stem Grooving - Grapevine virus A</i> (GVA) <i>Corky Bark - Grapevine virus B</i> (GVB) | |

Fuente: Servicio Agrícola y Ganadero.

Los 6 virus que exige el Programa de Certificación están incluidos en la técnica de diagnóstico múltiple desarrollada por el proyecto. Sin embargo, por tratarse de una variante distinta de los métodos establecidos, debe ser validado previamente por el SAG para autorizar su utilización en el marco del Programa.

En la medida en que la metodología desarrollada sea aprobada por el SAG, y se verifique que su sensibilidad, especificidad y rendimiento general sea igual o superior a lo existente, quedaría disponible para los viveros interesados. Actualmente están registrados en Chile 273 viveros



que propagan vides, 91 que declaran a la vid como su única especie vegetal, 9 viveros afiliados a la Asociación Gremial ChileViveros y solo 1 vivero de vides certificado en el Programa.¹⁰

Al margen del Programa de Certificación, cualquier vivero de vides o productor de uva de mesa o vino es un potencial usuario del servicio de diagnóstico viral, con el fin de identificar el agente causal en plantas sospechosas, seleccionar plantas sanas para propagación, eliminar material contaminado y tomar las medidas generales de manejo de las virosis. En estos casos, el oferente del servicio no requiere contar con acreditación del SAG.

El costo por análisis y la rapidez en la entrega de resultados sería un factor clave para generar preferencia por sobre otros oferentes del servicio. A la fecha, en Chile existen dos laboratorios privados acreditados en el Programa de Certificación¹¹ y otros oferentes fuera del Programa, como INIA y Universidad de Chile, entre otros.

Puesto que la investigación en fitopatología viral, especialmente en el ámbito de la genómica, se encuentra en constante avance, los métodos de diagnóstico deben ir adaptándose a los nuevos antecedentes. Los trabajos basados en *deep sequencing* generan una mayor información sobre las secuencias genómicas de los patógenos, lo que implica identificar nuevos virus, nuevas variantes o reclasificar virus existentes. Por lo tanto, las nuevas técnicas deben estar en permanente actualización. Asimismo, las técnicas pueden ser mejoradas u optimizadas para mejorar su desempeño.

Durante el proyecto se realizó un contrato de licenciamiento con una empresa nacional para la comercialización de los servicios, resguardando la confidencialidad de los aspectos críticos del proceso. Cabe señalar que, al solicitar la acreditación con el Servicio Agrícola y Ganadero, deben proporcionarse todos los antecedentes para que la institución pueda validar la técnica; sin embargo, estos no son divulgados sin el consentimiento del postulante, por lo cual también en ese caso puede mantenerse la confidencialidad.

Con respecto a la tecnología de saneamiento viral mediante embriogénesis somática y quimioterapia, ésta ya se encuentra descrita y ha sido aplicada, por lo cual en el proyecto se adaptaron y validaron las técnicas para establecer un protocolo efectivo de saneamiento. Tanto viveros como viticultores podrían hacer uso de este servicio, especialmente tratándose de variedades de alto valor que se busque conservar. Las plantas saneadas por el ejecutor del proyecto forman un banco de germoplasma de variedades comerciales libres de virus, disponibles para su comercialización a productores y viveristas.

¹⁰ Vivero Guillaume, San Fernando, Región de O'Higgins. <<http://guillaume.cl/>>

¹¹ Apablaza y Santalices Ltda. - AYSLAB y Pinto Piga Seeds S.A.

► 4. El valor de la herramienta desarrollada

Contar con herramientas efectivas y económicas para el diagnóstico de virus permite que esta práctica pueda extenderse en los viveros y viticultores. Al realizar diagnósticos de laboratorio, es posible contar con información objetiva sobre los agentes causantes de una determinada sintomatología o detectar patógenos en plantas aparentemente sanas, lo que permite tomar medidas adecuadas de control. Esto es especialmente crítico cuando se inicia una nueva plantación, ya que iniciar un proyecto de largo plazo con material contaminado tiene enormes consecuencias económicas para el productor.

La viticultura nacional sigue siendo uno de los principales rubros agroexportadores. Sin embargo, en la uva de mesa se vive una época compleja producto de la creciente competencia en el mercado internacional. La mayor parte de los países exportadores han ido reemplazando las variedades más antiguas por nuevas variedades, más productivas, con mejor postcosecha y con características organolépticas apreciadas en los mercados. Nuestro país no está ajeno a esta tendencia, siendo casi una obligación para mantener la competitividad. Es por ello que se realizan fuertes inversiones en material de nuevas variedades, con mayores precios, que en muchos casos incluyen royalties por variedades protegidas.

El replante de nuevas variedades en el mismo terreno implica necesariamente el uso de plantas injertadas, las que también tienen un costo más elevado que las plantas francas. Por lo tanto, la inversión en la renovación del material es muy significativa en términos económicos, y cualquier patología o condición que no permita desplegar todo su potencial productivo, en rendimiento, calidad y longevidad, puede hacer la diferencia entre el éxito o el fracaso del proyecto.

Como una manera de conservar los aspectos fitosanitarios y de calidad en la vid, al momento de renovar plantaciones se tiende a utilizar plantas injertadas para evitar el problema del replante, que requiere de tratamientos químicos del suelo de alto costo, como la aplicación de bromuro de metilo, cuyo uso además se encuentra cuestionado. Sin embargo, junto con las plantas injertadas han aparecido características fenotípicas diferentes a las conocidas: por ejemplo, incompatibilidad mecánica entre el portainjerto y la variedad, lo cual se ha relacionado con la presencia de virus. No obstante, esto no debe ser necesariamente consecuencia de problemas sanitarios, y podría deberse a la natural reacción de la injertación entre dos plantas diferentes; en este contexto, se requiere profundizar el conocimiento del uso de los portainjertos, a fin de llegar a identificar en forma precisa el origen de dichas manifestaciones fenotípicas.

Las pérdidas productivas causadas por los virus son muy variables, dependiendo del tipo y número de virus presentes, y de otros factores propios de cada viñedo. Como se ha mencionado, estudios han estimado en cerca de un 10% la prevalencia de virosis en las vides, siendo



más frecuentes los virus causantes del complejo de enrollamiento foliar, que en promedio causa pérdidas de rendimiento de un 10 a 20 %, pero que pueden llegar a ser muchísimo más altas. Si bien hace un par de décadas un agricultor podría haber convivido con un 10 a 20 % de menor productividad, hoy en día, con el incremento de los costos y las exigencias de los mercados, esta situación puede ser insostenible.

Por lo tanto, para iniciar un nuevo proyecto o replantar en un proyecto existente, es fundamental utilizar plantas libres de enfermedades, especialmente de aquellas producidas por virus y organismos afines a los virus, como los fitoplasmas, cuyo control radica exclusivamente en la prevención. Las técnicas de diagnóstico son los únicos medios objetivos para evaluar el material, seleccionar las plantas sanas y desechar el material contaminado, a fin de evitar la propagación de enfermedades en el país.

Dado que no todos los virus tienen los mismos medios de diseminación, identificar su presencia permite a productores, investigadores y organismos de protección fitosanitaria conocer de mejor forma su dinámica de distribución, tomando medidas epidemiológicas para su control.

El servicio de saneamiento desarrollado en el proyecto se orienta principalmente a viveros y agricultores, para plantas de alto valor que requieran ser protegidas y propagadas.

En consecuencia, contar con material libre de virus permite a los viveros ofrecer un producto de mejor calidad, y a los agricultores alcanzar el potencial de rendimiento y calidad para sus viñedos. Considerando la importancia de la uva de mesa y la industria vinícola para el país, así como la creciente exportación de material de propagación, el impacto económico de un programa integral de control de virus es muy significativo.

► 5. Conveniencia económica para el productor

El beneficio directo para el sector productivo (agricultores y viveros) de contar con la nueva herramienta de diagnóstico desarrollada en el proyecto, se relaciona con el menor costo de detección dado por el carácter múltiple de la prueba. Es decir, en una misma reacción se detectan múltiples virus, en lugar de realizar distintas reacciones por cada virus analizado. Esto genera ahorro en reactivos, enzimas, equipos y mano de obra especializada en laboratorio, lo que se traduce en una tarifa proporcionalmente más baja que los valores de mercado actuales.

Si consideramos como referencia los valores de análisis en laboratorio oficial del SAG, el costo por análisis viral en una muestra alcanza a 0,112 UTM, que a valor de diciembre 2019 equivale a \$ 5.557. Si se realizan pruebas para los 6 virus obligatorios del Programa de Certificación, y considerando un total de 100 muestras, se obtiene un costo total de \$ 3.334.665. Los valores de lista asignados para el servicio de detección por la empresa ejecutora alcanzan a \$ 20.000 por análisis múltiple, es decir, que incluye los 6 virus solicitados, lo que en 100 muestras totaliza \$ 2.000.000. Por lo tanto, **en 600 análisis realizados se obtiene un ahorro de \$ 1.334.665**. En ambos casos, tanto en laboratorio oficial como en el servicio privado, se consideran descuentos por número de muestras.

Ahora bien, como ya se mencionó, el beneficio para el sector productivo consiste en utilizar el diagnóstico viral en laboratorio como una herramienta dentro de un programa integral de sanidad, que incluya mecanismos de selección de material sano, eliminación de material infectado, medidas de prevención de la introducción y diseminación de virosis, y otros medios de diagnóstico de primera línea como la inspección visual. Por lo tanto, el uso de técnicas más eficientes y sofisticadas solo tiene sentido cuando son parte de una estrategia general, ya sea a nivel de viveros como de agricultores, siendo un Programa Oficial de Certificación el marco en el cual normalmente esta estrategia se pone en práctica.

Como ya se ha dicho con anterioridad, el impacto productivo de las infecciones virales es muy variable, y en ocasiones cuesta diferenciarlo de otras condiciones patológicas o de manejo. A pesar de ello, en Chile y en el mundo existen numerosos reportes que constatan la gran importancia del control de los virus en el rendimiento y la calidad del producto, alertando sobre la necesidad de abordar decididamente su control. A partir de la información recopilada por Fiore (2011), se presenta el siguiente resumen de los impactos productivos registrados de diversas virosis en vides:

- En plantas con síntomas visibles, infectadas por GLRaV-1, GLRaV-2 y GVA, se ha observado una reducción de producción del 23% en promedio, con una disminución del contenido en azúcares del 5%.
- El virus GFLV provoca pérdidas de producción que varían entre un 5% a 10 %, pudiendo llegar hasta un 90%.

- Los virus GLRaVs generan una pérdida promedio de producción de un 10%, pero que puede llegar a un 60% o 70%.
- Los virus involucrados en el complejo de la “Madera rugosa” (GVA, GVB, GRSPaV) producen disminución de producción de un 20 a 30%.
- El virus GFkV es muy frecuente en todas las áreas de producción de la vid, pero es difícil definir el nivel de daño causado debido a su estado latente. Se ha demostrado que causa una disminución del porcentaje de éxito de los injertos, limita la producción de raíces y reduce el vigor de las plantas.
- Las infecciones virales en plantas que no presentan síntomas causan una disminución anual de productividad del 5%.

La certificación de plantas representa un aumento considerable de costos para los viveros, no solo por las tarifas a cancelar por la supervisión o los análisis, sino además por costos indirectos asociados a la mantención de infraestructura de aislamiento para las distintas etapas productivas de la planta certificada y la necesidad de establecer planteles madre. Se ha estimado que esto puede representar entre un 10 a 20% adicional al precio de la planta corriente para carozos, pomáceas y cítricos, y hasta un 40% en vides (Müller y Mártiz, 2011). Sin embargo, hasta la fecha el Programa de Certificación ha tenido una muy baja penetración en el mercado, y de acuerdo a diversas fuentes de la industria de viveros no se ha verificado un aumento de los precios de las plantas certificadas en relación a las plantas corrientes.

En consecuencia, no existen suficientes antecedentes para evaluar la rentabilidad de contar con plantas sanas en el sistema productivo nacional, aunque sí es posible hacer una estimación de ella. Para modelar esta situación, se tomará como referencia una plantación de uva de mesa bajo parámetros estándar que se ve en la decisión de iniciar su proyecto con plantas certificadas o con plantas corrientes, con riesgo de contaminación viral. En el primer caso, y asumiendo que se tomen las medidas de prevención de infección secundaria, las plantas desarrollan todo su potencial productivo. En el segundo caso, existe un riesgo variable de que las plantas tengan contaminación viral, y que esto genere un impacto variable sobre el rendimiento. En un escenario base, consideremos un 10% de probabilidad de contaminación y un 10% de impacto sobre el rendimiento, lo que genera un riesgo ponderado del 1%. Con este daño probable, el productor debiera decir cuánto estaría dispuesto a pagar por contar con plantas de sanidad certificada, entendiendo esto como un “seguro” contra daños. En el cuadro siguiente se presentan los parámetros de la evaluación, que considera solo los valores diferenciales relevantes para el análisis, por lo cual se omiten deliberadamente inversiones y costos que no varían entre la situación “sin proyecto” (plantas corrientes) y “con proyecto” (plantas certificadas).

Cuadro 2. Parámetros para evaluar rentabilidad de uso de plantas certificadas en uva de mesa

| Parámetro | Valor | Unidad |
|----------------------------|-------|-----------------------|
| Precio planta corriente | 2,0 | US\$/planta |
| N° plantas | 1.143 | Plantas/ha |
| Producción kg/ha | 1.000 | Cajas 8,2 kg año 2 |
| | 3.000 | Cajas 8,2 kg año 3 |
| | 4.000 | Cajas 8,2 kg año 4-10 |
| Merma producción por virus | 1 % | 1 % |
| Costo variable | 2,79 | US\$/caja |
| Precio uva | 7,0 | US\$/caja |

Fuente: elaboración propia.

Bajo estos parámetros, se calcula cuál es el máximo nivel de sobreprecio en el valor de la planta certificada que un productor estaría dispuesto a pagar para alcanzar la misma rentabilidad que si usara plantas corrientes; es decir, que la rentabilidad incremental al utilizar planta certificada sea igual a cero. Este valor se consigue con un sobreprecio del 29%, lo que equivale a elevar el precio por planta de US\$ 2,0 a US\$ 2,6.

Cuadro 3. Evaluación de flujos económicos estimados para el uso de plantas certificadas en reemplazo de plantas corrientes en uva de mesa

| Ítem | Año 0 | Año 1 | Año 2 | Año 3 | Año 4 a 10 |
|---|--------|-------|-------|--------|------------|
| Sin proyecto (plantas corrientes) | | | | | |
| Producción (cajas) | | 0 | 990 | 2.970 | 3.960 |
| Costo variable (US\$) | | 0 | 2.762 | 8.286 | 11.048 |
| Ingresos (US\$) | | 0 | 6.930 | 20.790 | 27.720 |
| Inversión plantas (US\$) | 2.286 | | | | |
| <i>Flujo neto sin proyecto (US\$)</i> | -2.286 | 0 | 4.168 | 12.504 | 16.672 |
| Con proyecto (plantas certificadas) | | | | | |
| Producción (cajas) | | 0 | 1.000 | 3.000 | 4.000 |
| Costo variable (US\$) | | 0 | 2.790 | 8.370 | 11.160 |
| Ingresos (US\$) | | 0 | 7.000 | 21.000 | 28.000 |
| Inversión plantas (US\$) | 2.956 | | | | |
| <i>Flujo neto con proyecto (US\$)</i> | -2.956 | 0 | 4.210 | 12.630 | 16.840 |
| Flujo incremental (US\$) | -670 | 0 | 42 | 126 | 168 |
| VAN (US\$/ha; Tasa Desccto. 12%; 10 años): 0 | | | | | |

Fuente: elaboración propia.

Este resultado debe interpretarse de modo que cualquier sobreprecio en una planta certificada que sea menor al 29%, es rentable para el agricultor. En este caso, cualquier valor entre US\$ 2,0 y US\$ 2,6 por planta. Se hace notar que este escenario solo contempla 10 años de evaluación; si se proyecta la evaluación a la vida útil de un viñedo (15, 20 o 25 años) los beneficios son superiores.

Cuadro 4. Estimación de valores máximos admitidos en el costo de plantas certificadas de acuerdo a niveles de daño productivo en uva de mesa

| Reducción rendimiento | Pérdida producción Año 2 (cajas/ha) | Pérdida producción Año 3 (cajas/ha) | Pérdida producción Año 4-10 (cajas/ha) | % Máximo sobreprecio planta certificada | Precio máximo planta certificada (US\$/planta) |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|--|
| 5 % | 50 | 150 | 200 | 147 % | 4,9 |
| 10 % | 100 | 300 | 400 | 293 % | 7,9 |
| 15 % | 150 | 450 | 600 | 440 % | 10,8 |

Fuente: elaboración propia.

El cuadro anterior muestra de manera evidente que, a mayores niveles de reducción del rendimiento, la tolerancia al sobreprecio de las plantas certificadas crece en forma proporcional. Para una merma en rendimiento del 15 %, lo cual es totalmente consistente con los estudios realizados en Chile (y que puede llegar a ser mucho mayor), sería rentable utilizar plantas certificadas en reemplazo de plantas corrientes incluso a valores de US\$ 10,8 por planta.

Lo anterior se ha estimado solo considerando la pérdida de productividad; si a eso se agregara el componente de calidad (menor precio de la uva de mesa de menor calidad y problemas en la vinificación de la uva vinífera) y longevidad (menor vida útil de plantas infectadas), el efecto se multiplica.

Análisis similares se han realizado en otros países para evaluar programas sanitarios. Por ejemplo, en la costa norte de California, en Estados Unidos, un estudio determinó que el programa de control del virus GLRaV-3 ha permitido que los productores que plantan material libre de ese virus obtengan un beneficio adicional de US\$ 0,17/planta o US\$ 554/ha. Una adopción al programa del 100% en la región se traduciría en un beneficio de US\$ 22,5 millones al año, aproximadamente el 2,7% de los ingresos de la uva vinífera en la zona. Según los registros de la entidad administradora, ese programa para un solo virus ha presentado una relación beneficio/costo de más de 10:1 (Fuller *et al*, 2019).

Si se analiza el efecto de la menor productividad causada por las infecciones virales sobre un caso particular, podemos tomar como ejemplo un pequeño o mediano agricultor que produce uva de mesa Red Globe con destino a exportación. Para estimar el resultado se

considera una producción base de 3.200 cajas por hectárea, lo que puede verse reducido en 5%, 10% o 15% dependiendo del nivel de contaminación viral. Con la producción en plena capacidad, suponiendo un año promedio con precios de US\$ 7,0 por caja, se obtiene un margen neto por hectárea de US\$ 1.584. Con presencia de virus que reducen el rendimiento en un 5%, el margen neto cae casi a la mitad, mientras que con un 10% de reducción el margen resultante equivale a un 11% del margen en plena producción. Ya con un 11% de reducción de productividad el margen neto se hace igual a cero, y con un 20% de reducción el resultado es negativo.

Cuadro 5. Efecto de la disminución de rendimiento productivo en el margen neto de una explotación de uva de mesa Red Globe

| Reducción de producción | | - | 5 % | 10 % | 20 % | |
|----------------------------------|------------|---------|----------|----------|----------|--------|
| Producción total (cajas/ha) | | 3.200 | 3.040 | 2.880 | 2.560 | |
| Ítem | US\$ /caja | US\$/ha | US \$/ha | US \$/ha | US \$/ha | |
| Egresos | | | | | | |
| Mano de obra s/cosecha | | 3.200 | 3.200 | 3.200 | 3.200 | 3.200 |
| Maquinarias | | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| Energía eléctrica | | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| Fertilizantes | | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 |
| Pesticidas | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Administración | | 1.400 | 1.400 | 1.400 | 1.400 | 1.400 |
| Cosecha | 0,7 | | 2.240 | 2.128 | 2.016 | 1.792 |
| Costo/ha antes de packing | | | 11.440 | 11.328 | 11.216 | 10.992 |
| Mano de obra embalaje | 0,6 | | 1.920 | 1.824 | 1.728 | 1.536 |
| Materiales | 1,3 | | 4.160 | 3.952 | 3.744 | 3.328 |
| Transporte | | 288 | 288 | 288 | 288 | 288 |
| Frío | | 928 | 928 | 928 | 928 | 928 |
| Otros costos | | 2.080 | 2.080 | 2.080 | 2.080 | 2.080 |
| Costo packing | | | 9.376 | 9.072 | 8.768 | 8.160 |
| Costos totales | | | 20.816 | 20.400 | 19.984 | 19.152 |
| US\$/caja | 7,0 | | | | | |
| Ingresos | | | 22.400 | 21.280 | 20.160 | 17.920 |
| Margen neto por ha | | | 1.584 | 880 | 176 | -1.232 |

Fuente: elaboración propia a partir de FIA 2009 e INDAP 2018.

► 6. Claves de viabilidad

La aplicabilidad de la tecnología desarrollada depende de algunos factores técnicos propios del ejecutor que deben ser mejorados para que el servicio pueda ser competitivo en el mercado. El principal de estos factores es la validación estadística de los resultados, puesto que durante el proyecto se realizó una optimización metodológica y de diseño de la técnica, pero la aplicación en campo realizada en su etapa final no alcanzó una amplia cobertura. Dado que se trata de un análisis múltiple, precisamente la prueba requiere ser desafiada con muestras con infecciones múltiples, en distintas combinaciones, y con muestras sospechosas pero que no presenten síntomas. Con esta información, respaldada por un número de casos estadísticamente representativo y con resultados contrastados con otra técnica de referencia, podrían obtenerse indicadores cuantitativos de eficiencia en su rendimiento.

La validación de la técnica, incluyendo una eventual acreditación formal ante el SAG como herramienta válida para el Programa de Certificación Sanitaria, permitiría que este servicio fuera puesto en el mercado a disposición de los interesados, donde la relación entre beneficios y costos comparado con las técnicas vigentes (ELISA y PCR) determinaría su éxito.

Sin embargo, existen otros factores más estructurales que de manera indirecta influyen en la demanda por este tipo de servicios. En primer lugar, los usuarios directos de la tecnología serían los viveros, principalmente como parte del Programa de Certificación; pero como ya se ha señalado, este programa instalado en Chile desde hace más de una década no ha logrado difundirse masivamente entre los viveristas. A la fecha existen solamente 3 viveros certificados, y solo uno de ellos vende plantas de vid. Por lo tanto, en estricto rigor, tan solo 1 vivero está obligado en la actualidad a hacer detección viral en laboratorio. Dado que la certificación es voluntaria, en el resto de los viveros no certificados la realización de pruebas de laboratorio no es una práctica generalizada, siendo realizada principalmente por las empresas más grandes y con mayor orientación comercial.

Estudios realizados en el país han demostrado la presencia de niveles relevantes de infecciones virales en plantas madres de viveros de frutales y vides (Herrera, 2014). De este modo, la probabilidad de infección primaria de las plantaciones al incorporar plantas infectadas desde los viveros es muy alta. En la situación actual de la industria de uva de mesa existe una alta presión por el recambio varietal, que lleva a una alta demanda de plantas, sin discriminar por calidad. A consecuencia de esto se estima que se comercializa un porcentaje cercano al 30% de plantas de mala calidad, incluyendo calidad sanitaria (Cuneo y Tamayo, 2019).

Por lo tanto, en la práctica los productores no están demandando plantas libres de virus, lo que implica que los viveros no cuentan con incentivos para producir estas plantas, por lo cual no se verifica una alta demanda de análisis virales.

Profundizando en los factores que causan esta compleja situación, existe un consenso en que la toma de conciencia sobre las enfermedades virales en los viñedos ha sido relativamente reciente. Si bien se ha difundido información acerca de la importancia de las virosis en la productividad y rentabilidad, todavía no se aprecia la implementación de estrategias frontales para combatirlas en la mayoría de los predios. Por lo general son las grandes empresas integradas verticalmente, con mayor énfasis en las viñas, las que están implementando programas integrales de sanidad que incluyen la prevención y manejo de las virosis. Ejemplo de ello es el Programa Wise, de Viña Santa Rita, que realiza diagnóstico viral por RT-PCR desde los planteles madres, tanto de variedades como de portainjertos, y en plantas terminadas (francas o injertadas), si detectan alguna sintomatología relacionada a virus.

Los viveros que se han certificado y que realizan análisis virales como parte del programa no han logrado generar un mayor valor a sus plantas, puesto que la mayoría de los agricultores no está dispuesto a pagar un mayor precio por ellas.

Todo esto lleva a un círculo vicioso donde la falta de incentivos no permite romper con la inercia, por lo cual se siguen utilizando plantas corrientes con mala sanidad, que introducen virus en las plantaciones. Y dado que además muchos agricultores no toman las medidas necesarias para controlar las infecciones ya introducidas, estas se diseminan dentro y fuera de su plantación, perpetuando el problema. Todo esto pone al sector productivo en una encrucijada, ya que en las condiciones actuales de mercado la industria no puede sostener las pérdidas relacionadas a plantas que no logran el potencial productivo prometido por los programas de mejoramiento.

De acuerdo a lo planteado por Müller y Mártiz (2011), mientras no exista una intervención directa del Estado en el sistema de certificación será difícil lograr un uso masivo de este tipo de plantas en la instalación y replante de plantaciones.

La autoridad puede impulsar un programa de certificación mediante distintas estrategias:

- Darle carácter de obligatoriedad, en atención a su carácter crítico para la industria nacional por tratarse de enfermedades destructivas y de diseminación explosiva. Los sistemas de certificación de vides en países como Estados Unidos, Canadá y Australia son voluntarios, mientras que en Europa es obligatorio (Golino *et al*, 2017). La Directiva 2002/11 del Consejo de la Unión Europea dictó que los Estados miembros dispondrán que los materiales de multiplicación de la vid puedan comercializarse solo si han sido validados oficialmente en algunas de las etapas del proceso de certificación, prohibiendo la producción de portainjertos de categoría “estándar” o no certificados a partir de enero de 2005. Sin embargo, una certificación obligatoria como esta no es fácil de imponer en Chile mientras no existan problemas fitosanitarios catastróficos, como sí ocurrió en Europa.

- Generar incentivos o subsidios, para cubrir el mayor costo de la planta certificada y hacerla competitiva frente a la planta corriente. Müller y Mártiz (2011) señalan que los subsidios pueden ser directos al productor, para compensar los costos adicionales de comprar plantas certificadas; o indirectos, reduciendo o eliminando tarifas de análisis a viveros o haciéndose cargo de la mantención del reservorio o banco de germoplasma.

En base a la situación actual, no parece existir una decisión real de parte de la industria ni del Estado respecto del valor de la certificación, que justifique mayores inversiones en un sistema de producción de plantas que proporcione mayor seguridad desde el punto de vista sanitario y genético.

► 7. Asuntos por resolver

Como se mencionó anteriormente, la acreditación del ejecutor con la autoridad sanitaria pertinente (Servicio Agrícola y Ganadero), tanto con los métodos convencionales como por la prueba múltiple, sería el mecanismo oficial para respaldar la solidez de la técnica desarrollada. Para ello, en primer lugar, el oferente debe acreditarse en el contexto del Programa de Certificación de Plantas Frutales del SAG, pues no existe otro mecanismo para que la institución acredite laboratorios en diagnóstico viral en plantas. Debe cumplirse, en consecuencia, con los requisitos generales indicados en el “Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos” y requisitos específicos indicados en el “Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales”. En el caso de la vid, los análisis pertinentes para el diagnóstico de virus son ELISA y RT-PCR, en los 6 virus obligatorios para el Programa de Certificación (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB y GFLV).

Posterior a ello, el laboratorio debe validar la nueva técnica presentando los antecedentes metodológicos de la prueba desarrollada, incluyendo aislados virales utilizados, muestras realizadas, diluciones, estudios de sensibilidad y especificidad, y comparación con técnicas vigentes, entre otros aspectos. La metodología propuesta no es divulgada por el SAG sin aprobación del laboratorio.

El servicio de diagnóstico puede ser realizado por un laboratorio sin acreditación ni fiscalización del SAG. Solo para los viveros que están en el Programa de Certificación es obligatorio realizar los diagnósticos en laboratorios acreditados para ese efecto.

Sin perjuicio de lo anterior, para prestar el servicio de diagnóstico debería proporcionarse al cliente la información técnica que garantice la robustez y fiabilidad de la técnica, de acuerdo a parámetros normalmente utilizados para este tipo de servicios.

Los parámetros fundamentales para evaluar una prueba son la sensibilidad y especificidad. En el transcurso del proyecto, la sensibilidad fue cuantificada de acuerdo al límite inferior de detección de la prueba, en una serie de diluciones seriadas, obteniéndose resultados con una dilución de los controles positivos de 1:100.

Respecto a la especificidad, esta hace referencia a la capacidad del método de detectar una secuencia genómica propia del virus buscado. Esto se logra mediante una adecuada selección y diseño de partidores, los que no deben presentar homología cruzada entre distintos virus, y con una secuencia conservada entre las distintas variantes de cada virus. Lo anterior se verificó mediante la secuenciación de los productos amplificados por PCR, que tuvieron coincidencia superior al 91% con las secuencias virales correspondientes.

Adicionalmente, se requiere evaluar el desempeño de la prueba diagnóstica midiendo la sensibilidad y especificidad con un mayor número de pruebas de campo. Estos atributos pueden cuantificarse a partir de observaciones empíricas realizadas con la prueba evaluada, en relación a una prueba confirmatoria de referencia ("*gold standard*"). De estos análisis confirmatorios se obtiene la proporción de verdaderos casos positivos y negativos, y de falsos casos positivos y negativos, con lo cual se puede estimar la sensibilidad y especificidad en términos de porcentaje de acierto.

Para lograr esto se requiere un número importante de muestras con presencia de los distintos virus objetivo y en distintas combinaciones, de modo que la prueba logre demostrar su rendimiento en una variedad de situaciones. Esto no se logró durante el proyecto, ya que las muestras obtenidas en campo no presentaban todos los virus en estudio.

El análisis de muestras reales es fundamental para el caso de plantas sin síntomas de infección viral, pero positivas a un virus o a varios virus en simultáneo. La validación de este punto es esencial para la selección de portainjertos, los cuales pueden ser portadores asintomáticos que expresan los virus 2 o 3 años después.

Superados estos aspectos, la técnica contaría con mayor respaldo casuístico para validar su solidez metodológica, lo que sumado al menor costo y mayor rapidez la pondrían por delante de las pruebas actualmente utilizadas.

El proyecto precursor

► 1. Tecnología utilizada y validada

El proyecto “Generación y desarrollo de una plataforma para la detección múltiple de virus en vides” tuvo una duración de 3 años, finalizando en abril de 2017. Su objetivo fue desarrollar e implementar un sistema de detección múltiple y simultánea de virus en vides y establecer un banco de germoplasma libre de virus de distintas variedades y portainjertos de vid de interés comercial.

Se estructuró en torno a los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar y validar una técnica de PCR de detección múltiple y simultánea de 18 virus diferentes en vid a partir de material vegetal infectado.
2. Establecer un banco de germoplasma de plantas de vid libres de virus de distintas variedades de interés comercial, utilizando el sistema de detección múltiple viral.
3. Entregar un servicio de diagnóstico y comercializar kits para la detección múltiple de 18 virus diferentes que infectan a la vid a nivel mundial.
4. Difundir el servicio de detección múltiple viral y las diferentes variedades de vid libres de virus, a nivel de la industria de uva de mesa y vitivinícola nacional.
5. Comercializar plantas libres de virus, a nivel de viñas y viveros.

Cada uno de los objetivos específicos se desarrolló de acuerdo a la metodología que se desarrolla a continuación.

1.1. Diseño y validación de técnica PCR para detección múltiple y simultánea de virus en vid

Para el desarrollo de este objetivo se colectó material vegetal con sintomatología viral proveniente del campo experimental del ejecutor, de viñedos de la zona de San Felipe, Santa Cruz, Curacaví y Casablanca, y de plantas aportadas por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG). Estas plantas fueron establecidas y propagadas *in vitro* para mantener un stock permanente de plantas positivas a los distintos virus para contar con material para los ensayos.

A las muestras de material colectado se les realizó diagnóstico viral mediante PCR individual, utilizando partidores previamente seleccionados y diseñados para cada virus. Mediante esta técnica se identificaron 11 virus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7, GVA, GVB, GFkV, GFLV, ToRSV y RSPaV. Los fragmentos virales amplificados mediante PCR fueron clonados para posteriormente extraer el material genético amplificado para ser enviado a secuenciar a un laboratorio externo, con el fin de chequear las secuencias obtenidas con lo reportado en bases de datos para dichos virus.¹²

Utilizando un software de bioinformática se obtuvo el grado de alineamiento de las secuencias, que alcanzaron los valores de:

- GLRaV-1: 94 % de identidad
- GLRaV-2: 98 % de identidad
- GLRaV-3: 99 % de identidad
- GLRaV-4: 95 % de identidad
- GLRaV-7: 98 % de identidad
- GVA: 96,4 % de identidad
- GVB: 99 % de identidad
- GFkV: 97 % de identidad
- GFLV: 91,4 % de identidad
- ToRSV: 93 % de identidad
- RSPaV: 99 % de identidad

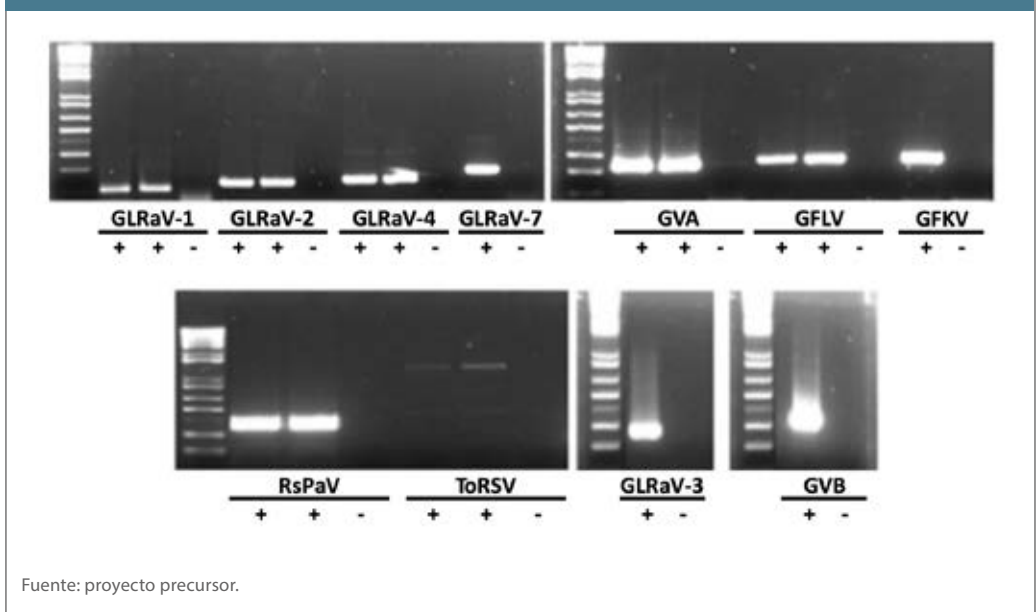
Con estos resultados se verificó que los partidores utilizados para detectar cada virus presentan una alta especificidad, la cual se refleja en el alto grado de coincidencia entre la secuencia amplificada de cada virus y la secuencia reportada en bases de datos internacionales. Al mismo tiempo, cada fragmento tiene un tamaño distinto (medido como número de pares de bases), por lo cual pueden ser claramente diferenciados al visualizarlos en gel de agarosa o por electroforesis capilar.

¹² NCBI, National Center for Biotechnology Information, entidad perteneciente a los servicios de salud pública de Estados Unidos, que almacena y actualiza secuencias genómicas de más de 200.000 organismos, con información de laboratorios de todo el mundo.

Estas 11 secuencias virales fueron integradas en un solo vector, el que fue utilizado como **Control Positivo N°1** para la prueba PCR múltiple. Es decir, esta secuencia agregada se utiliza en cada análisis de PCR múltiple verificándose que siempre debe resultar positivo a los 11 virus que incluye; de este modo se garantiza que la prueba alcanza los niveles mínimos de sensibilidad para detectar a los 11 virus en forma simultánea.

Lo anterior puede apreciarse en forma gráfica en las figuras siguientes. En la primera, los fragmentos virales contenidos en el control positivo son visualizados como bandas brillantes en gel de agarosa, donde migran de forma diferenciada de acuerdo a su tamaño, el cual es señalado por un marcador de peso molecular a la izquierda de cada gel.

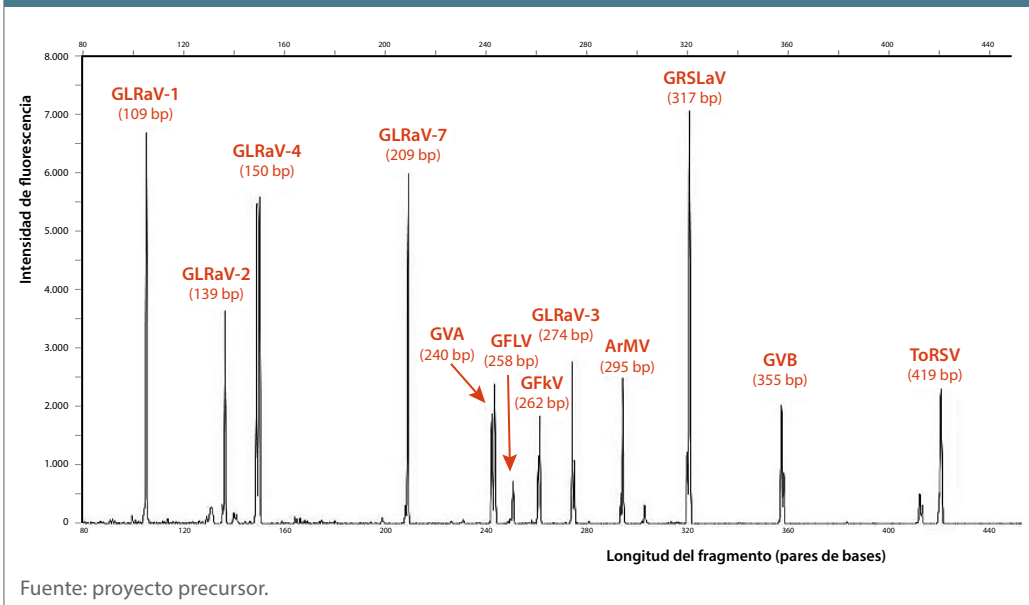
Figura 9. Control positivo con amplificación de virus visualizados en gel de agarosa



La visualización de los fragmentos virales amplificados fue confirmada por electroforesis capilar en secuenciador ABI Prism 310. Esto es posible ya que los partidores diseñados con la secuencia específica para cada virus están marcados en un extremo con el fluoróforo fluoresceína, lo que permite la visualización de los productos de amplificación por electroforesis capilar, y no altera su lectura en gel de agarosa convencional.

En la figura siguiente se visualizan en forma simultánea los distintos fragmentos virales por electroforesis capilar, donde se muestran como peaks de fluorescencia en la posición que corresponde según su longitud.

Figura 10. Control positivo con amplificación simultánea de virus visualizados mediante electroforesis capilar



Los virus ArMV, GRSLaV, TRSV y SLRSV no fueron detectados en las muestras analizadas, por lo cual para diseñar un control positivo fue necesario construir un vector con las secuencias de esos virus a partir de lo registrado en las bases de datos internacionales. De este modo, se diseñó el **Control Positivo N° 2**, que sumado al anterior permiten tener un control para 15 virus en una prueba simultánea.

Cabe señalar que, durante el desarrollo del proyecto, se detectó en la literatura que el virus GLRaV-8 ya no era considerado como un virus, sino que se descubrió que formaba parte del genoma ribosomal de la vid. Por lo tanto, esta secuencia de 172 pb fue utilizada como **control interno** de la técnica, es decir, que siempre debe estar presente aún en muestras sin presencia de virus. Se descubrió también que los virus identificados como GLRaV-5 y GLRaV-6 corresponden a cepas del virus GLRaV-4. Por lo tanto, considerando la eliminación de estas 3 secuencias originalmente consideradas, el total de virus a analizar bajó de 18 a 15.

Una vez establecidos los controles positivos, la técnica debió ser optimizada para que opere correctamente en el diagnóstico simultáneo. Para ello, se ajustaron diversos factores, como la concentración de partidores, la temperatura a la cual los partidores se hibridan o aparean con la secuencia diana (temperatura de *melting*), y la concentración de cloruro de magnesio, que influye en la actividad de la enzima polimerasa.

La sensibilidad, expresada como el límite inferior de detección de la prueba, se ajustó mediante diluciones seriales de los controles positivos, realizando PCR múltiples a partir de diluciones de 1:50, 1:100 y 1:500 de cada control positivo como templado, resultando la dilución 1:100 la que entrega la mejor visualización.

Durante el proyecto se adquirieron los reactivos necesarios y un equipo secuenciador ABI Prism 310, utilizado para la visualización de los amplificados de PCR por electroforesis capilar, con un nivel de precisión que permite diferenciar 2 nucleótidos del tamaño del fragmento analizado. Con estos equipos y materiales, en conjunto con la optimización de la técnica, el laboratorio quedó en condiciones de realizar los análisis múltiples en muestras de campo.



Equipo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (fotos sitio web de proveedor)

Finalmente, se logró la amplificación eficiente de 14 virus de manera simultánea, utilizando visualización mediante electroforesis capilar; mientras que la correcta visualización en gel de agarosa se logró para los 15 virus en dos grupos de partidores.

En definitiva, la metodología de diagnóstico simultáneo se diseñó para identificar los siguientes virus:

- Complejo del enrollamiento foliar (*Grapevine Leafroll associated Virus*):
 - GLRaV-1
 - GLRaV-2
 - GLRaV-3
 - GLRaV-4
 - GLRaV-7
- Lesión del patrón de uva de mesa
 - GRSLaV (*Grapevine rootstock stem lesion associated virus*)
- Complejo de la madera rugosa:
 - GVA (*Kober stem grooving - Grapevine Virus A*)
 - GVB: (*Corky bark - Grapevine Virus B*)
 - RSPaV (*Rupestris Stem Pitting-associated Virus*)
- Jaspeado de la vid, degeneración infecciosa:
 - GFkV (*Grapevine Fleck Virus*)

- Deformación infecciosa
 - GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*),
- Virus de la mancha anular del tomate:
 - ToRSV (*Tomato Ringspot Virus*):
- Virus del mosaico arábico
 - ArMV (*Arabis Mosaic Virus*)
- Virus de la mancha anular del tabaco
 - TRSV (*Tobacco Ringspot Virus*):
- Virus de la mancha anular de la fresa
 - SLRSV (*Strawberry Latent Ringspot Virus*).

Para validar la metodología se hicieron algunos análisis comparados entre la técnica múltiple y el diagnóstico por PCR individual realizado por laboratorio oficial de SAG. En un ensayo comparativo se tomaron muestras de 7 variedades previamente clasificadas como libres de virus mediante PCR múltiple, las que posteriormente fueron analizadas mediante PCR simple en el Laboratorio Agrícola del SAG para 8 virus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFLV, ToRSV y RRSV. El 100 % de las muestras fueron confirmadas como negativas.

Otro ensayo de validación se realizó recolectando 29 muestras de plantas con síntomas virales, las que fueron analizadas mediante PCR múltiple y PCR simple en el laboratorio SAG. De ellas se encontraron 17 muestras negativas a todos los virus, con 100 % de coincidencia de ambos análisis. De las 12 muestras positivas a algún virus, el diagnóstico fue concordante en 11 de 12 muestras (92%), habiendo solo una muestra donde el método múltiple detectó 1 virus mientras que el análisis individual mostró dos. Si se evalúa solo a nivel de muestras con más de un virus en simultáneo, el diagnóstico múltiple coincidió en 4 de 5 muestras (80%). Del total de 19 virus detectados individualmente en 12 muestras, el método múltiple detectó 18 de 19 (95%).

1.2. Establecimiento de banco de germoplasma de plantas de vid libres de virus

Para el establecimiento de un stock de plantas de vid libres de virus, se realizaron dos procedimientos paralelos:

- Recolección de plantas asintomáticas de portainjertos y distintas variedades de uva de vino y mesa, diagnóstico viral y selección de plantas negativas.
- Saneamiento de plantas positivas a virus mediante embriogénesis somática, desinfección con antiviral y confirmación mediante diagnóstico viral.

Se colectaron en campo plantas durante el período de crecimiento vegetativo sin síntomas evidentes de infección viral (enrollamiento foliar, clorosis, pigmentación rojiza hojas, entre

otros), a las cuales se les aplicó técnica de PCR múltiple para confirmar ausencia de los 15 virus en estudio. Una vez confirmado el estado sanitario, las plantas fueron desinfectadas y se extrajo estacas para su propagación *in vitro* en medio de cultivo con adición de hormonas, bajo condiciones de temperatura y luz controlada. Se utilizaron 10 a 15 explantes por variedad en cada ciclo de propagación, continuándose el proceso para mantener un stock de plantas madres libre de virus. Las plantas propagadas se fueron traspasando a un invernadero de producción cerrado, con condiciones climáticas controladas, todo bajo medidas de esterilidad y con uso de nematicidas para prevenir posibles infecciones virales mediadas por vectores. Las plantas aclimatadas en invernadero posteriormente pueden traspasarse a campo para su crecimiento.

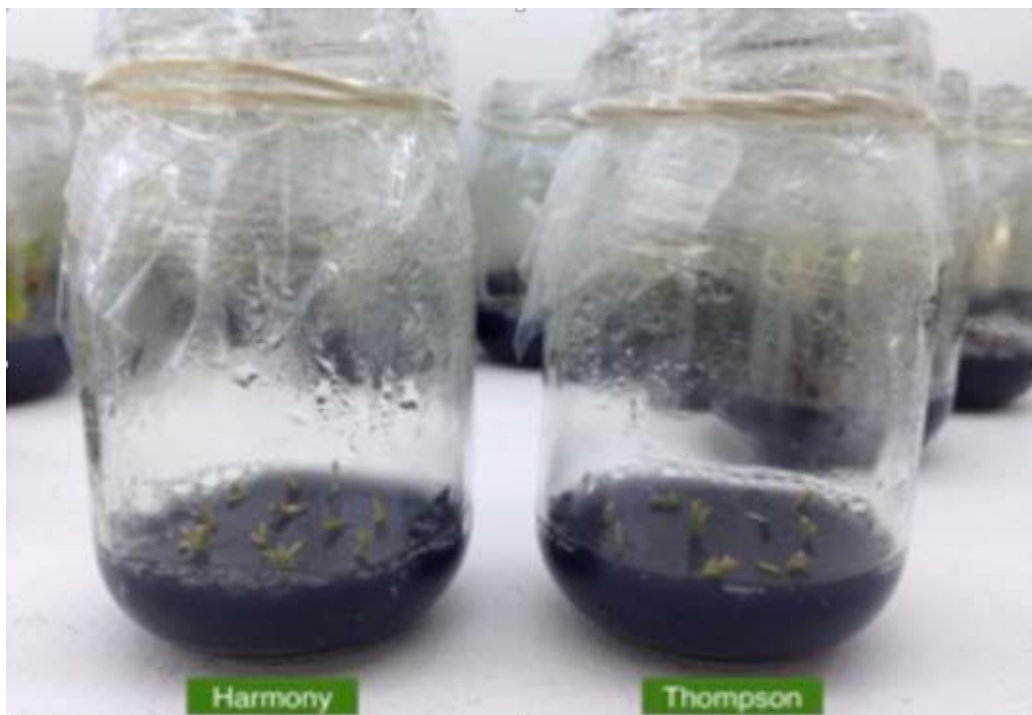
Las plantas colectadas y propagadas en condición libre de virus incluyen variedades viníferas como Chardonnay, Merlot, Tintorera, Cabernet Franc; y variedades de uva de mesa como Thompson Seedless y Flame.



Plantas colectadas libres de virus: Thompson y Merlot.

Dado que en algunos casos se obtuvieron plantas de campo que tras el diagnóstico resultaron positivas a uno o más virus (GLRaV-2 y GLRaV3 son los más comunes), y también como una forma de obtener un mayor volumen de plantas sanas, se desarrolló un protocolo de saneamiento de plantas infectadas. Para ello, se utilizaron técnicas de embriogénesis somática y quimioterapia con antivirales.

Este procedimiento consistió en que, luego del establecimiento *in vitro* de las plantas, se subcultivaron ápices meristemáticos tomando explantes de 1 a 2 mm en un medio con el antiviral Ribavirina y hormona Benciladenina. En este medio, con condiciones controladas de temperatura, luminosidad y nutrientes, se desarrollaron plantas completas. Una vez que alcanzaron un tamaño mayor a 7 cm, se repitió el procedimiento cultivando yemas de 1 a 2 mm en medio con antiviral. Una vez que esta nueva generación de plantas alcanza un tamaño mayor a 7 cm, se cultiva nuevamente, obteniéndose plantas cuya sanidad es verificada mediante diagnóstico viral múltiple y que posteriormente pueden ser propagadas. Mediante esta metodología se obtuvieron plantas de variedad Chardonnay, Merlot, Harmony y Thompson Seedless.



Variedades Harmony y Thompson en medio MS tratadas con Ribavirina (proyecto precursor).

Las variedades de uva de mesa Thompson Seedless y Red Globe, uvas viníferas Merlot y Chardonnay, portainjertos Kober, Harmony y Salt Creek, diagnosticadas como libres de virus por método múltiple, fueron validadas por el SAG dando resultados negativos para 8 virus (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFLV, ToRSV y TRSV).

Como resultado final se obtuvo un banco de germoplasma con plantas libres de virus de las variedades viníferas País, Chardonnay, Merlot, Tintorera, Cabernet Franc; variedades de uva de mesa Red Globe, Melissa, Crimson Seedless, Thompson Seedless y Flame; y portainjertos 110 Richter, Freedom, Kober, Harmony, RPV-457, P1103 y Salt Creek.

Durante el proyecto se habilitaron cámaras de crecimiento e invernaderos para la propagación de material libre de virus, con lo cual las plantas pueden continuar su desarrollo manteniendo su condición sanitaria.

De este modo, la empresa dispone de plantas libres de virus para su distribución, y se encuentra preparada para brindar el servicio de saneamiento de plantas para quienes lo requieran.



Invernadero para mantención de plantas libres de virus (proyecto precursor).

1.3. Distribución de productos y servicios desarrollados en el proyecto

Una vez optimizada la técnica de diagnóstico múltiple, en un período de marcha blanca se entregó servicio de diagnóstico viral gratuito a dos viñas del Valle de Curacaví.

Se diseñó un prototipo de kit, que no llegó a comercializarse durante el proyecto, para el diagnóstico viral de 14 virus en forma simultánea y 15 virus en reacciones separadas; y un

segundo kit con partidores solo para 8 virus priorizados (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV, GFLV, ToRSV). El kit diseñado contiene los pares de partidores marcados con fluoróforo en tubos liofilizados y rotulados, los dos controles positivos, un master mix, control interno para verificar integridad del material genético, y el instructivo de uso.

El ejecutor estableció un acuerdo de licenciamiento con una empresa externa para la comercialización de plantas libres de virus, kit de diagnóstico y para la prestación del servicio de diagnóstico. A través de este acuerdo, en la última etapa del proyecto se comercializaron 500 plantas y portainjertos libres de virus, con el 100% de las plantas diagnosticadas por el método múltiple.

1.4. Difusión de servicios de detección múltiple viral en la industria de uva de mesa y vitivinícola

En el curso del proyecto se realizaron diversas actividades enfocadas en viticultores y viveristas para difundir la metodología, sus características y ventajas, y para enfatizar la importancia de la prevención de las virosis en el cultivo de la vid.

Pequeños, medianos y grandes viticultores pudieron visitar las instalaciones de la empresa ejecutora, para conocer en forma directa las instalaciones, equipo y procesos necesarios para obtener y mantener plantas libres de virus. Otras actividades de difusión se realizaron en las instalaciones de importantes viñas, dentro y fuera de la Región Metropolitana.

Los productos y servicios desarrollados durante el proyecto fueron puestos a disposición del público a través de la página web www.agrijohnson.cl.



Charla de difusión a viticultores (proyecto precursor).

► 2. Estado de ejecución actual

Actualmente la empresa ejecutora se encuentra utilizando la técnica de diagnóstico múltiple en sus procesos internos de análisis y saneamiento de plantas. Aún no se han puesto en el mercado los servicios de diagnóstico múltiple, saneamiento de plantas o kit de diagnóstico.

La experiencia desarrollada por la empresa permitió fortalecer sus capacidades e incorporar equipamiento y protocolos que se han aplicado exitosamente en los proyectos biotecnológicos, de mejoramiento genético y fitopatología que realizan, tanto en vides como en otras especies.

Plataforma para la detección múltiple de virus en vides y otros frutales

AgriJohnson Ltda.
www.agrijohnson.cl

- Ofrecemos el servicio de detección múltiple y simultáneo de 15 virus diferentes que infectan a las vides y otros frutales.
- Detección en plantas campo, vivero y cultivo in vitro.
- Apoyamos la generación de un Banco de Germoplasma de variedades y portainjertos de vid libre de virus.

Servicio acorde a RESOLUCIÓN SAG no 7605 del 08 Diciembre de 2013

información y contacto: +56 9 96795909
servicios@agrijohnson.cl

Fuente: Revista *Red Agrícola*. Julio 2018.

El valor del proyecto precursor y aprendido

El proyecto logró desarrollar un protocolo integral para el diagnóstico de 14 virus que afectan a las vides en una sola reacción, y para 15 virus en dos reacciones, utilizando la técnica de PCR o Reacción de Polimerasa en Cadena. Este resultado es pionero a nivel mundial, ya que no se reportan análisis múltiples que hayan alcanzado un número tan alto de patógenos.

La técnica fue optimizada durante el desarrollo del proyecto, para mejorar su desempeño y resolver aquellos aspectos que usualmente constituyen cuellos de botella en los análisis múltiples. Los estándares de diseño utilizados permiten alcanzar niveles de sensibilidad y especificidad que hacen de esta prueba una alternativa competitiva frente a los métodos convencionales de ELISA y PRC individual, con el beneficio de un menor costo y menor tiempo de entrega de resultados.



La prueba fue testeada en terreno con muestras de campo. Sin embargo, no se ha realizado un número suficiente de análisis comparados con los métodos de referencia que permitan dar una validación estadística a sus resultados.

Se validó también un protocolo de saneamiento de plantas infectadas mediante el cultivo *in vitro* de explantes y tratamiento con agentes antivirales, lo que genera plantas comprobadamente libres de virus. Con ello se obtuvo un banco de plantas sanas a disposición de los agricultores.

Los resultados del proyecto fueron expuestos y difundidos a profesionales, viveristas y viticultores, tanto de uva de mesa como vinífera. La tecnología despertó el interés de las empresas; sin embargo, hasta la fecha no se ha concretado en una demanda real por servicios.

Esta aparente falta de interés por realizar detección viral en las vides pone de manifiesto una debilidad estructural en la industria vitícola, que es la falta de programas sanitarios integrales dirigidos a la prevención de las enfermedades virales. Pese a los numerosos estudios realizados sobre el impacto económico de las virosis, tanto en Chile como en el extranjero, no se aprecia que se haya internalizado de manera concreta y masiva en los productores la importancia del control de estos patógenos. En consecuencia, solo algunos productores y algunos viveros cuentan con programas sistemáticos de selección de material libre de virus, por lo que no hay una demanda relevante para tecnologías más sofisticadas de diagnóstico.

Para revertir esta situación se requiere una mayor vinculación de los productores con la comunidad académica y científica, de modo de incrementar el conocimiento de los equipos técnicos y asesores sobre las herramientas para el manejo de las enfermedades virales, a nivel de prevención, mitigación y saneamiento. También se requiere el esfuerzo del Estado para promover el uso de material libre de virus, entendiendo que la sanidad vegetal es un bien público que debe ser resguardado en beneficio de todo el sector productivo, especialmente si se considera la enorme importancia de la uva de mesa y el vino en la agricultura nacional.

Anexos

Anexo 1. Bibliografía

Anexo 2. Entrevistas realizadas

ANEXO 1. Bibliografía

- Alkowni, R., Zhang, YP., Rowhani, A. *et al.* 2011. Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of grapevine leafroll-associated virus 2. *Virus Genes*, Volume 43, Issue 1, pp 102–110.
<https://doi.org/10.1007/s11262-011-0607-7>
- Asociación de Viveros de Chile AGV, 2018. Anuario Viveros 2018: Plantas Frutales, Vides y Plantines de Hortalizas Comercializados en Chile.
<https://www.viverosdechile.cl/media/uploads/Anuario-Viveros-2018.pdf>
- Camacho, A. 2005. Saneamiento de la vid cv. Red globe del virus asociado a la lesión del patrón de uva de mesa (GRSLaV) mediante termoterapia y cultivo de tejidos. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile.
http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/101786/camacho_a.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- CEE. 2002. Directiva 2002/11/CE del Consejo, de 14 de febrero de 2002, por la que se modifica la Directiva 68/193/CEE referente a la comercialización de los materiales de multiplicación vegetativa de la vid y se deroga la Directiva 74/649/CEE. Consejo de la Unión Europea.
<http://data.europa.eu/eli/dir/2002/11/oj>
- Cuneo I. y M. Tamayo. 2019. Raíces, elección de portainjerto y calidad de plantas de vid. En: *Revista Redagráfica* N° 104, julio 2019, pp 60-63.
- Fernández, R. 2013. Virosis en la vid. Servicio ATRIA, Vino de Calidad de Cangas.
<http://www.vinosdeasturias.es/doc/Virosis%20en%20la%20vid.pdf>
- FIA. 2009. Resultados y Lecciones en Detección y Caracterización de Virus y Fitoplasmas en Vid.
- Proyecto de Innovación entre IV Región de Coquimbo y VII Región del Maule. Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario N° 31. Fundación para la Innovación Agraria
https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75545_archivo_01.pdf
- Fiore N. 2011. Virus y vid: se han identificado más de 60 virus que infectan a la vid. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal. En: *Revista Redagráfica* N° 39, julio 2011, pp 26.
- Fiore N., A. Zamorano, C. Abarca, N. Quiroga y A. Pino. 2015. Diagnóstico y saneamiento de virus, viroides y fitoplasmas que afectan a la vid. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal. En: *Revista Redagráfica* N° 71, julio 2015, pp 52-57.

- Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, Nº 4: 195 - 209, octubre - diciembre, 2003.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263>
- Fuller, K., J. Alston, D. Golino. 2019. Economic Benefits from Virus Screening: A Case Study of Grapevine Leafroll in the North Coast of California. *Am. J. Enol. Vitic.* 70:2 (2019).
<http://ncpngrapes.org/files/254762.pdf>
- Golino, D., M. Fuchs, M. Al Rwahnih, K. Farrar, A. Schmidt, and G. Martelli. 2017. Chapter 28. Regulatory Aspects of Grape Viruses and Virus Diseases: Certification, Quarantine, and Harmonization. In: B. Meng *et al.* (eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_28
- Gonzalez-Garza, R. 2017. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2017, Vol. 35, Nº 3, pp. 591-610.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n3/2007-8080-rmfi-35-03-00591.pdf>
- Herrera, G. 2014. Virus en carozos, pomáceas y vides: 40 años de estudios e investigaciones en Chile. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA Nº 289. 168p.
<http://www.biocea.cl/wp-content/uploads/2015/08/Virus-Guido-Herrera-INIA.pdf>
- INDAP. 2018. Fichas productivas para la AFC - Región de Valparaíso - 2019-2020. Área Los Andes, Uva de Mesa Red Globe. Instituto de Desarrollo Agropecuario.
<http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/fichas-t%c3%83%c2%a9cnicas-afc-2018-2019/valparaiso/los-andes/uva-de-mesa.xlsx?sfvrsn=2>
- IQConsulting. 2019. Anuario Mercado de Uva de Mesa, Temporada 2018/2019.
- Madariaga M. 2017. Virología – Virus en frutales: Deformación infecciosa de la vid. INIA La Platina, Ficha Técnica Nº 21.
<http://www.inia.cl/wp-content/uploads/FichasTecnicasSanidadVegetal/Ficha%2021%20Deformacion%20infecciosa%20de%20la%20vid.pdf>
- Maliogka, V., G. Martell., M. Fuchs y N. Katis. 2015. Chapter six - Control of Viruses Infecting Grapevine. In: *Control of Plant Virus Diseases Vegetatively-Propagated Crops*. Edited by Gad Loebenstein, Nikolaos I. Katis. *Advances in Virus Research*. Volume 91, 2015.
<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>
- Magaña, J., Arenas-Sordo, M. & R. Gómez. 2009. Capillary electrophoresis, a new diagnostic tool. *Revista Médica de Chile*, 137(7), 946-956.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000700014>
- Monis, J. 2006. Determinación de las enfermedades de la vid causadas por virus. Parte II. *Revista Enología* Nº 3 Año III, junio 2006.
http://www.juditmonis.com/Espanol/grapevine_viruses_parte%20II%20spa%20Revista%20Enologia.pdf

- Müller, V., y J. Martiz. 2011. La certificación hoy. ¿Cuánto nos importa la calidad de plantas? *Agronomía y Forestal UC* 42:28-31.
http://agronomia.uc.cl/component/com_sobipro/Itemid,232/fid,218.660/sid,87/task,download.file/
- ODEPA. 2002. *Visión Perspectiva del Sector Frutícola Chileno. Tomo III. Realizado para ODEPA por Trace Ltda. Consultores.*
<https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/publica/Tomo-III.pdf>
- ODEPA, 2016. *Evolución de los frutales. Parte I: Viveros. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Enero de 2016.*
<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/01/Viveros2015.pdf>
- Pallás V., Sánchez-Navarro J. and James D. 2018. Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. *Front. Microbiol.* 9:2087.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087>
- SAG. 2017. *Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales. Servicio Agrícola y Ganadero.*
https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/instructivo_tecnico_para_el_diagnostico_de_virus_y_viroides_en_tejido_vegetal_para_el_programa_de_certificacion_de_plantas_frutales.pdf
- SAG. 2019. *Resolución Exenta N° 6315/2019. Establece Resolución de Certificación de material de propagación de vides (*Vitis* spp.) y deroga Resolución N° 7605 de 2013. Servicio Agrícola y Ganadero.*
- Shen Z., W. Qu, W. Wang, Y. Lu, Y. Wu, Z. Li, X. Hang, X. Wang, D. Zhao and C. Zhang. 2010. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11: 143.
<https://dx.doi.org/10.1186%2F1471-2105-11-143>
- Varveri C., V. Maliogka, T. Kapari-Isaia. 2015. Chapter one - Principles for Supplying Virus-Tested Material. In: *Control of Plant Virus Diseases Vegetatively-Propagated Crops.* Edited by Gad Loebenstein, Nikolaos I. Katis. *Advances in Virus Research.* Volume 91, 2015.
<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.004>
- Walton V., A. Dreves, P. Skinkis, C. Kaiser, M. Buchanan, R. Hilton, B.R. Martin, S. Castagnoli, and S. Renquist. 2010. *Prevención y manejo del virus del enrollamiento de la hoja y de los piojos harinosos en viñedos del estado de Oregon. EM 8990-S January 2010. Oregon State University.*
<https://ir.library.oregonstate.edu/downloads/9z9030205>

ANEXO 2. Entrevistas realizadas

En la elaboración de este documento y su validación técnica, se utilizó información obtenida de entrevistas realizadas a las siguientes personas:

| Nombre | Cargo |
|--|---|
| María Consuelo Medina, Felipe Aquea y Álvaro Vidal | Equipo Ejecutor proyecto precursor, AgriJohnson. |
| Exequiel Vergara | Encargado Virología Laboratorio Agrícola Lo Aguirre, Servicio Agrícola y Ganadero. |
| Nicola Fiore | Académico, Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile. |
| Maritrini Lapuente y Daniela Valenzuela | Gerente General y Encargada Proyectos y Desarrollo, Asociación de Viveros de Chile. |
| Héctor Acevedo | Gerente Comercial, Vivero Guillaume. |
| Natalia Torres | Responsable Quality Assurance & I+D, Vivero Agromillora. |

138

