

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



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

**TALLER DE TÍTULO
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Protección cruzada como método de defensa frente al virus del
enrollamiento de la vid

PIERINA PEIRANO BOLELLI

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice

1	Resumen	1
2	Definición de problema y oportunidad	2
3	Hipótesis.....	4
4	Objetivo general	4
5	Objetivos específicos	4
6	Estado del arte	5
6.1	Cultivo de la vid	5
6.2	Cultivo de vid vinífera a nivel mundial	5
6.2.1	Producciones mundiales.....	5
6.2.2	Superficies de vides del mundo	5
6.2.3	Exportaciones e importaciones.....	5
6.3	Cultivo de la vid vinífera en Chile.....	6
6.3.1	Superficie nacional cultivada	6
6.3.2	Producción nacional de vino	6
6.3.3	Exportaciones de Chile	6
6.4	Enfermedades de la vid	7
6.5	Virus del enrollamiento de la vid	7
6.5.1	Sintomatología asociada a la enfermedad	7
6.6	Transmisión del virus.....	9
6.7	Situación de Chile.....	9
6.8	Manejo actual de la enfermedad.....	9
6.9	Protección cruzada	9
6.9.1	Protección cruzada en vid.....	10
7	Metodología.....	11
7.1	Obtención de material vegetal y crianza	11
7.2	Aislados de GLRaV-3	11
7.2.1	Obtención e identificación de las cepas	11
7.2.2	Evaluación de la patogenicidad de las cepas virales	12
7.3	Inoculación con cepas virales sobre plantas de vid.....	12
7.4	Diagnóstico de virus	13
7.4.1	Comparación fenotípica	13

7.4.2	Pruebas de diagnóstico molecular	13
8	Bibliografía.....	14
9	Plan de trabajo	16
10	Carta Gantt	19
11	Resultados Esperados	20
12	Organización.....	20
12.1	Cargos y funciones.....	20
12.2	Organigrama.....	22
13	Presupuesto	23
13.1	Presupuesto total por cuenta	23
13.2	Presupuesto total por año.....	24
14	Anexos.....	25
14.1	Procedimiento general de protección cruzada	25
14.2	Presupuesto recursos humanos	26
14.3	Presupuesto subcontratos	26
14.4	Presupuesto misiones tecnológicas.....	27
14.5	Presupuesto gastos de difusión	27
14.6	Presupuesto inversión	27
14.7	Presupuesto gastos de administración	27
14.8	Presupuesto gastos operacionales	28

1 Resumen

El virus del enrollamiento de la vid ataca tanto a la salud íntegra de la planta como a la calidad de la fruta, siendo así el virus más relevante para el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.). Enfermedad presente en casi todos los países del mundo, es causada por un complejo de asociados, siendo el asociado número 3 (GLRaV-3) la cepa más predominante y severa.

La eficacia de la protección cruzada y su uso como mitigación contra enfermedades virales ha sido comprobada y eficaz en distintos cultivos, ante lo cual, este método es una posible oportunidad para el control de esta enfermedad que genera efectos perjudiciales en la vid. Para tal fin se obtendrá material viral atenuado y agresivo de viñedos aledaños a la zona, posterior a la obtención de este material, se realizará la inoculación sobre plantas certificadas de vid y así desafiar el mecanismo de resistencia adquirido para poder determinar y conocer la eficiencia de la cepa atenuada mediante protección cruzada. Para corroborar y evaluar el procedimiento, será evaluado tanto fenotípicamente, expresado por la coloración roja y el enrollamiento de las hojas como también se corroborará a nivel molecular en pruebas de laboratorio (RT-PCR) y así determinar la presencia o ausencia del virus. Para concluir estos procesos realizados en campo y en laboratorio, se dispondrá la información obtenida sobre la eficiencia de la cepa atenuada como método de protección contra la cepa agresiva que genera sintomatología negativa en la planta

2 Definición de problema y oportunidad

El panorama vitivinicultor para Chile se ve favorecedor debido al potencial climático que posee el país, variable de norte a sur, posee desde climas mediterráneos como también zonas frías idóneas para cultivar distintas variedades.

Chile ha ido aumentando su producción y su superficie cultivada con vides viníferas, en 1930 se catastraron 79.000 hectáreas de vid para producción de vino, y el catastro vitivinícola 2016 informa la presencia de 145.873 hectáreas (SAG, 2016). Casi doblando la superficie nacional cultivada, por ende, Chile ha encontrado un área agrícola en la cual se puede desempeñar con un alto potencial productivo. Con respecto a la producción, en los últimos 10 años ésta se ha duplicado (ODEPA, 2018). Referente a las exportaciones, Chile ha llegado a ser el cuarto país exportador de vino a nivel mundial, con 1.969 millones de dólares (USD) (ODEPA, 2018), sobrepasando a Argentina, Australia, Estados Unidos los cuales son fuertes competidores para el país en términos productivos.

Sin embargo, la vid se ve seriamente afectada ya sea por enfermedades criptogámicas como oídio, pudrición gris y enfermedades de la madera como también por enfermedades virales (Bettiga, 2013). Dentro de éstas destacan el virus del enrollamiento de la vid (GLRaV) y el virus de la hoja en abanico de la vid (GFLV). De estos dos, el más dañino y perjudicial para la fruta en términos de composición química y física, es el virus del enrollamiento (Martelli, 2012), *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) es conocido mundialmente en la viticultura como uno de los virus más importantes que deterioran a la vid (*Vitis vinífera* L.) y a su fruta (Martelli, 2012). Al menos 9 virus serológicamente distintos están asociados a *leafroll disease* (GLRaV-1 a GLRaV-9), todos pertenecientes a la familia *Closteroviridae*, género *Ampelovirus*, a excepción de GLRaV - 2 que está clasificado en el género *Closterovirus* y GLRaV - 7 en el género recientemente reconocido *Velarivirus* (Naidu *et al.*, 2015).

El asociado 3 es el más severo de los mencionados e implica grandes pérdidas económicas, debido al menor rendimiento y menor calibre presente en la fruta (Lee *et al.*, 2009), y además, se esparce rápida y eficazmente, por dos métodos principalmente;

transmisión por vectores de la familia Pseudococcidae (Tsai *et al.*, 2008), o ya sea por material vegetal infectado con el virus (Martinson *et al.*, 2008).

Adicionalmente a los problemas mencionados y descritos anteriormente causados por *leafroll disease*, la única manera de erradicar el virus, es reemplazar los viñedos infectados por una plantación limpia de vides, esto hace referencia al uso de material vegetal tanto porta injerto como injerto posean una certificación libre de virus (Martinson *et al.*, 2008). No obstante, un viñedo libre de GLRaV - 3 puede infectarse nuevamente debido a su transmisión por vector de manera semipersistente por *Planococcus* sp. (Golino *et al.*, 2002).

Debido a lo descrito anteriormente, para cerciorarse de evitar una infección viral de GLRaV - 3 y tener un viñedo libre de infecciones virales que perdure en el tiempo es mediante una adquisición de resistencia o tolerancia por parte de la planta. Ante esto, se ha experimentado para seleccionar una cepa atenuada de este virus, que fue descrita en el 2009 por Habili, esta cepa fue analizada en *Vitis vinifera* cv. *Crimson Seedless* en la zona occidental de Australia. Este estudio se realizó con el propósito de analizar el desarrollo fenotípico de la cepa atenuada del virus en la uva de mesa.

Como se ha descrito y realizado anteriormente en otros tipos de virus, como en *Citrus tristeza virus* (CTV), las cepas atenuadas de virus son eficaces para realizar protección cruzada en plantas y así evitar una infección viral futura (Ziebell y MacDiarmid, 2017). Por lo cual se evaluará una estrategia para adquirir resistencia a *leafroll disease* en vid mediante una cepa atenuada de *Grapevine leafroll associated virus 3*, este mecanismo debe ser eficiente para el control de la enfermedad ya mencionada y así obtener una planta libre de virus.

3 Hipótesis

Existe una cepa atenuada del virus del enrollamiento de la vid (GLRaV-3) capaz de generar una respuesta eficiente ante una cepa agresiva debida a un mecanismo de protección cruzada en *Vitis vinifera*.

4 Objetivo general

- Evaluar la eficacia de la cepa atenuada de *Grapevine leafroll-associated Virus 3* como mecanismo de resistencia en *Vitis vinifera* contra una cepa agresiva del virus del enrollamiento de la vid.

5 Objetivos específicos

- Obtener e identificar al menos una cepa viral atenuada y una agresiva de *Grapevine leafroll-associated Virus 3*.
- Evaluar la patogenicidad o virulencia en plantas de vid libre de enfermedades
- Realizar pruebas de protección cruzada y seleccionar las plantas que lograron adquirir el mecanismo de resistencia de manera eficiente.

6 Estado del arte

6.1 Cultivo de la vid

Vitis vinifera L., o mejor conocida como vid europea, es una especie perteneciente a la familia *Vitaceae*. Los ejemplares de esta familia son arbustos trepadores y leñosos (no autosoportante), con zarcillos opuestos a las hojas (Martínez de Toda, 1991). *Vitis vinifera* es una planta caducifolia, con brotes mixtos, produciendo inflorescencias hermafroditas que llegan a ser racimos con bayas. Originaria de Asia, es la variedad cosmopolita por excelencia para la producción de vinos. Su distinción con la uva de mesa es debido a un tema genético varietal y por los sistemas de conducción empleados en su producción.

6.2 Cultivo de vid vinifera a nivel mundial

6.2.1 *Producciones mundiales*

Acorde a las estadísticas anuales de la FAO, al año 2014 se señala que se produjeron 29,1 millones de ton. Los principales productores de vino en el mundo son Francia, Italia, España, seguidos por Estados Unidos, China y Argentina. Cabe destacar que Chile se posiciona en el séptimo lugar (FAO, 2014).

6.2.2 *Superficies de vides del mundo*

En el año 2017, se declararon las siguientes dimensiones de viñedos en distintos países del mundo. En las áreas a mencionar se incluyen viñedos y predios que producen uva pero con distintos fines comerciales, ya sea uva para vino, consumo en fresco o pasas.

España presenta la mayor cantidad de hectáreas, al año 2016 se declararon 975.000 hectáreas aproximadamente, China le sigue con 847.000 ha, sin embargo este país destina solamente el 12% de su producción a vinos. En tercer y cuarto lugar se encuentra Francia con 785.000 ha e Italia con 690.000 ha, que al igual que España, un alto porcentaje de su producción (99% y el 85% respectivamente) de uvas es destinada a vinificación (OIV, 2017).

6.2.3 *Exportaciones e importaciones*

Según la OIV, al año 2016 se estima que se comercializaron 104.000.000 de hectolitros, los principales exportadores a nivel mundial corresponden a España (22,9 millones de hectolitros), Italia (20,6 millones de hl), Francia (14,1 millones de hl), en cuarto lugar se

encuentra Chile (9,1 millones de hl) y Australia se posiciona quinto a nivel mundial (7,5 millones de hl).

Con respecto a las importaciones, Alemania, Reino Unido y Estados Unidos son los principales importadores de vino, estos países importan 14, 13,5 y 11,2 millones de hectolitros respectivamente. En menores cantidades se encuentra Francia con 7,9 millones de hl y China con 6,4 millones de hl (OIV, 2017).

6.3 Cultivo de la vid vinifera en Chile

6.3.1 *Superficie nacional cultivada*

Al año 2016, la superficie nacional dedicada a uvas viníferas y pisqueras fue de 137.374,93 y 8.498,65 hectáreas, respectivamente. Existe un total de 145.873,58 ha (SAG, 2016). De este total destinado a uva para vino, un 74% (101.269,80 ha) corresponde a variedades tintas y el 26% (36.105,13) restante corresponde a cepas blancas.

6.3.2 *Producción nacional de vino*

Acorde al informe de producción de vinos 2017 del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), en dicho año se produjeron 949.205.801 litros. Del total declarado, un 84,8% (805.061.414) pertenece a vinos con denominación de origen, 11,6% (110.329.802) corresponde a vinos sin denominación de origen y un 3,6% (33.814.585) a vinos elaborados a partir de uva de mesa.

6.3.3 *Exportaciones de Chile*

Al año 2017 se exportaron 477,2 millones de litro de vino embotellado, comercializado a 3,19 dólares (USD) por litro, dando un total de 1.520,2 millones de dólares (USD) (ODEPA, 2018). Por otro lado, el vino a granel en el año 2017 fue comercializado a 0,86 dólares (USD) por litro, y se exportó un total de 393,9 millones de litros, generando un ingreso de 340,1 millones de dólares (USD) (ODEPA, 2018). Chile exporta vino embotellado principalmente a China, Japón y Reino Unido. Con respecto al vino a granel, los principales países destino de este producto son: Estados Unidos, China y Reino Unido.

6.4 Enfermedades de la vid

El crecimiento y desarrollo de la vid se puede ver deteriorado por varios agentes externos, ya sean fitopatógenos o plagas entomológicas. Con enfoque al primer grupo mencionado, existen diversos hongos a los cuales *V. vinifera* es sensible, principalmente enfermedades criptogámicas como *Botrytis cinerea* y *Erysiphe necator*, causantes de pudrición gris y oídio, respectivamente. Estos dos afectan mayoritariamente a la fruta, causando estragos en períodos de vendimia. Por otro lado, enfermedades fungosas que causan enfermedad de la madera o muerte de brazos, se encuentran principalmente *Botryosphaeriaceae*, familia de ascomicetos, que generan daños a la planta e inciden directamente en su crecimiento y vida (Bettiga, 2013)

Con respecto a las enfermedades virales que atacan a este cultivo, se encuentran: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) o virus de la hoja en abanico de la vid, que presenta un fenotipo mal formante foliar, estas adquieren una forma similar a un abanico acompañada de clorosis. También se encuentra *Grapevine fleck virus* (GFkV) o virus jaspeado de la vid, sus síntomas también son deformaciones foliares acompañadas de clorosis irregular. Un virus de importancia mundial es *Grapevine leafroll-associated virus*, con distintos asociados que causan problemas a nivel de fruta como vida útil de la planta (Bettiga, 2013). En este último se hará énfasis sobre su sintomatología y cómo se ha sobrellevado la enfermedad en los últimos años.

6.5 Virus del enrollamiento de la vid

Enfermedad constituida por 9 asociados serológicamente distintos entre sí y pertenecientes a distintos géneros virales. *Grapevine leafroll-associated virus 3* es una especie del género *Ampelovirus*, familia *Closteroviridae*. Es el asociado más severo y dañino en las plantas, siendo así el agente causal más importante del virus del enrollamiento de la vid. Las partículas de este virus son filamentos flexuosos con una forma helicoidal, y su genoma es una sola hebra de ARN en sentido positivo (Naidu *et al.*, 2015).

6.5.1 *Sintomatología asociada a la enfermedad*

Además de los síntomas fenotípicos foliares mencionados anteriormente, se produce una alteración química interna, afectando el rendimiento de la planta y la composición química de la uva.

Pérdidas de rendimiento: Comparativamente hablando, las vides infectadas con GLRaV – 3 tienen una pérdida de rendimiento del 40% comparado con las vides sanas. Esto se ve reflejado principalmente en los kilos por planta producidos, en los racimos por planta, en el peso de la baya y en la materia seca de estas mismas. El largo del racimo, su peso y la cantidad de bayas por racimo demostró una diferencia asimismo, sin embargo, estadísticamente los datos son similares. Con respecto al número de brotes se vio reducido en un 31% con respecto a vides sanas, el largo de brotes en vides infectadas cesó un mes antes que vides libres de GLRaV-3, peso de poda y la lignificación de sarmientos fue considerablemente reducida en vides infectadas comparadas con vides sanas (Endeshaw *et al.*, 2014).

Diferencias químicas en las bayas: De igual manera se ve reflejada una alteración de los compuestos químicos presentes dentro de la fruta, principalmente la cantidad de sólidos solubles totales, plantas infectadas con GLRaV – 3 presentan un 43% menos de gramos por litro por vid (Endeshaw *et al.*, 2014). La acidez titulable también presenta una disminución en las vides infectadas, en contraste con lo anterior los compuestos fenólicos como antocianinas y fenoles no se vieron reducidos significativamente (Endeshaw *et al.*, 2014). Por otro lado, la uva en su composición química presenta tres ácidos: cítrico, málico y tartárico. No obstante, solamente el ácido málico y tartárico son los que se buscan en mayor concentración en la uva para llevar a cabo las fermentaciones correspondientes de manera deseable. Complementando lo dicho anteriormente, el ácido cítrico es indeseable ya que es sustrato para las bacterias acéticas, por ende, no se busca en altas concentraciones en la uva. En plantas infectadas, se analizó el mosto obtenido de uvas y se vio en aumento el ácido cítrico y los otros dos ácidos en disminución, por ende, perjudica la calidad potencial del vino (Montero *et al.*, 2016).

Diferencias en fotosíntesis e intercambio gaseoso: Acerca del intercambio gaseoso, se estudiaron 4 variantes: fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y dióxido de carbono intercelular (CO₂). La fotosíntesis neta se vio disminuida cuantiosamente en plantas infectadas comparado con plantas sanas, asimismo con la conductancia estomática y la transpiración. Sin embargo, el CO₂ intercelular se vio en aumento en los meses que finaliza el verano, aumentando hacia el otoño (Endeshaw *et al.*, 2014).

6.6 Transmisión del virus

Todos los asociados correspondientes a *Grapevine leafroll virus* se propagan por injertos previamente infectados y por su unión con el porta injerto (Martinson *et al.*, 2008). Además de ocurrir vía material vegetal, en algunos asociados la infección viral ocurre por vectores pertenecen a la familia *Pseudococcidae* y a la superfamilia *Coccoidea*. Se ha descubierto que de la familia *Pseudococcidae*; *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti), *Pseudococcus viburni* (Signoret), *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn), y *Planococcus ficus* (Signoret) son vectores semipersistentes del virus (Martinson *et al.*, 2008; Golino *et al.*, 2002). Acorde a las investigaciones de Tsai *et al.* (2008), *Planococcus ficus* pierde su infectividad a los 4 días después de haber adquirido el virus en su organismo.

6.7 Situación de Chile

Un estudio realizado por Fiore *et al.* (2008) en distintas regiones de Chile, demuestra los siguientes porcentajes de infección en los viñedos con los asociados -1, -2, -3. Con respecto al primer asociado (GLRaV – 1) 89 de 2181 plantas están infectadas (4,08%). Para el segundo asociado (GLRaV – 2), 368 de 2479 plantas presentan la infección (14,84%) y para el asociado más severo, GLRaV – 3, 134 de 2170 plantas contienen el virus (6,17%).

6.8 Manejo actual de la enfermedad

Un material vegetal limpio y certificado es lo que se ha establecido en la mayoría de los países vitivinicultores, esto con el fin de producir, mantener y distribuir vides sanas, evitando así la propagación de la enfermedad entre viñedos (Martinson *et al.*, 2008).

El uso de pesticidas para controlar a los vectores puede ser útil, sin embargo su eficiencia no es ciento por ciento efectiva (Golino *et al.*, 2002). Sin embargo las prácticas culturales para controlar la enfermedad aún no están definidas y es un tema de contingencia actual este tópico (Martinson *et al.*, 2008).

6.9 Protección cruzada

La protección cruzada hace referencia a la protección que entrega una cepa atenuada de un virus a una planta susceptible a la variedad infecciosa del mismo virus.

Este método ha demostrado ser una técnica eficiente para proteger cultivos de las cepas más severas, tales como virus mosaico amarillo de la calabaza (ZYMV), virus de la

mancha anular de la papaya (PRSV), virus de la tristeza de los cítricos (CTV), entre otros (Ziebell y MacDiarmid, 2017). Este último, pertenece a la familia Closteroviridae, al igual que el virus del enrollamiento de la vid (Naidu *et al.*, 2015).

Sin embargo, la protección cruzada no es aceptada ampliamente debido a los efectos colaterales que pudiese inducir este método, como una infección aún más severa debido a mutaciones en la variante atenuada (Agrios, 2006).

Esta técnica consiste la replicación del virus, al generar una doble hebra de RNA se estimula a la planta que posee el inóculo de la cepa atenuada y asimismo la producción de enzimas tipo DICER, cortando las hebras en fragmentos más pequeños de RNA, la hebra anti sentido queda asociada al sistema enzimático RISC. Sistema de reconocimiento y degradación de agentes externos a la planta (Ziebell y MacDiarmid, 2017; Ratcliff *et al.*, 1999).

La cepa atenuada debe estar estudiada y es exigido que sea más débil que la infecciosa, además de ser estable genéticamente, evitando así que mute a una cepa infecciosa causando así daños en la planta. Además, la cepa atenuada no debe interactuar de manera negativa con otros virus, evitando así generar una sinergia entre estas y aumentar el daño en el organismo (Ziebell y MacDiarmid, 2017).

6.9.1 *Protección cruzada en vid*

Según Basso *et al.* (2016) la protección cruzada en vides es una posible estrategia eficiente para el control de enfermedades virales transmitidas por vectores o por material vegetal infectado. El uso de cepas atenuadas asintomáticas generan buenos resultados si se manejan adecuadamente (Ziebell y MacDiarmid, 2017).

7 Metodología

Los siguientes ensayos serán realizados en el Laboratorio de Fitopatología y Estación Experimental La Palma, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, dependencias ubicadas en Quillota, Región de Valparaíso.

7.1 Obtención de material vegetal y crianza

Las muestras de material vegetal a utilizar corresponden a la especie *Vitis vinifera*, previamente testeadas para legitimar que estén libres de virus y correspondientes a la variedad. La variedad que se utilizará será *Pinot Noir*, debido a que esta planta presenta antocianinas en su metabolismo que dan la coloración roja y además el envero es anticipado con respecto a otras variedades tintas, ante lo cual los síntomas foliares de la enfermedad son fáciles de visualizar y captar a la brevedad.

Debido a que estas plantas serán la base de los ensayos a realizar, deben ser criadas bajo condiciones controladas, evitando cualquier tipo de estrés que pueda sufrir (lumínico, hídrico, climático y topográfico), además prevenir y evadir enfermedades y plagas que puedan alterar el desarrollo del cultivo.

7.2 Aislados de GLRaV-3

7.2.1 *Obtención e identificación de las cepas*

Para el material viral, se obtendrán al menos dos cepas atenuadas y una cepa infecciosa de *Grapevine leafroll associated virus 3*. La recolección de este material se realizará en los viñedos del valle de Casablanca en cuarteles en los cuales la enfermedad esté presente.

La cepa agresiva se obtendrá de plantas de vid en las cuales esta enfermedad persista por al menos dos ciclos productivos correlativos. Por otro lado, los aislados atenuados se

obtendrán de plantas asintomáticas aledañas a vides que presenten la sintomatología asociada al virus.

Se rotularán los contenedores que porten el material viral, con respecto a su sintomatología *in situ*, es decir, denominarlo según la expresión fenotípica del virus en el viñedo, esto así para diferenciarlos y evitar confusiones en laboratorio. Cada una de estas cepas y su genotipo será analizado por la prueba de diagnóstico molecular RT-PCR para cerciorarse de que correspondan al virus y a dicho asociado.

7.2.2 *Evaluación de la patogenicidad de las cepas virales*

Una vez recuperado de los viñedos el material viral, se procederá a corroborar el grado de virulencia y así identificarlos según la sintomatología que producen para asignarlos como atenuado o agresivo. Esta labor se realizará inoculando en las plantas sanas de vid las cepas rescatadas en viñedo, para esto cada planta será inoculada solamente con un tipo de cepa. Se inocularán 5 plantas por cada cepa, 5 con la cepa agresiva y 5 plantas por cada una de las cepas que en campo se presentaban como atenuadas.

Una vez realizados los inóculos y transcurrido el tiempo necesario para que la planta rebrote, se procede a visualizar la sintomatología foliar, primordialmente la presencia de moteado rojizo y enrollamiento, principales síntomas de esta enfermedad. Acorde a como se presente la planta (asintomática o sintomática) se clasificará la cepa según su grado de patogenicidad distinguiendo así las cepas virales agresivas de las atenuadas.

7.3 Inoculación con cepas virales sobre plantas de vid

Se utilizarán 20 plantas de vid por cada cepa atenuada encontrada. Cuando estas alcancen el metro de altura, se podarán para estimular el desarrollo de nuevos brotes; al realizar esta operación, un grupo de 10 plantas serán inoculadas vía injerto con la cepa atenuada y las otras 10 restantes serán destinadas para fines comparativos.

Después de que el nuevo tejido crezca y genere brotes, del grupo de 10 plantas ya injertadas con la cepa atenuada recibirán un nuevo inóculo correspondiente al de la cepa agresiva. Así desafiando el mecanismo de protección de la planta que se adquirió mediante la cepa atenuada. Las 5 plantas restantes permanecerán solamente con la cepa atenuada pertinente a su grupo.

Con fin comparativo se dejarán 10 plantas sin inóculo, de las cuales 5 serán posteriormente inoculadas solamente con la cepa agresiva obteniendo así un testigo positivo. Finalmente, las 5 plantas restantes no se inocularán, designadas como testigo negativo.

7.4 Diagnóstico de virus

7.4.1 *Comparación fenotípica*

Realizados los inóculos correspondientes a cada ensayo se observará si las plantas adoptaron el mecanismo de protección cruzada. Esto se corroborará con el testigo negativo, si al menos una de las cepas atenuadas no presentase la sintomatología asociada al virus demostrada en el testigo positivo, quiere decir que adquirió de manera eficaz el mecanismo de protección cruzada, por ende tolerará la enfermedad y no se verá afectada cuando una cepa agresiva del virus la infecte.

7.4.2 *Pruebas de diagnóstico molecular*

Para realizar un diagnóstico aún más preciso y corroborar la eficacia del mecanismo, se procederá a identificar el genoma viral presente en plantas con el tratamiento de protección cruzada. El diagnóstico se basará en la prueba molecular RT-PCR para así corroborar de manera tangible la presencia o ausencia de la cepa infecciosa. Esta prueba consiste en la transcripción del ARN de forma inversa en ADN complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa. A este ADN se le unen los primers, que comienzan a generar la amplificación del material genético, la ADN polimerasa incorpora nucleótidos a lo largo de la cadena en sentido 5' - 3', generando así copias de la molécula de ADN original para su identificación.

8 Bibliografía

Agrios, G. (2006) Fitopatología. 838p. 2ª. ed. Limusa, México D.F, México.

Basso, M. F., Fajardo, T. V., & Saldarelli, P. (2017). Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1).

Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11(3), 242-295.

Bettiga, L. (2013). Grape pest management. 609p. 3ª ed. University of California, Estados Unidos.

Endeshaw, S. T., Sabbatini, P., Romanazzi, G., Schilder, A. C., & Neri, D. (2014). Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc. *Scientia Horticulturae*, 170, 228-236.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. FAOSTAT production of wine, Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD/visualize>

Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A. M., & Zamorano, A. (2008). Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 125-130.

Golino, D., Sim, S., Gill, R., & Rowhani, A. (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56(6), 196-201.

Habili, N., Cameron, I., & Randles, J. (2009). A mild strain of Grapevine leafroll-associated virus 3 is present in desirable clones of Crimson seedless table grapes in Western Australia.

International Organization of Vine and Wine (OIV). 2017. 2017 World Vitiviniculture Situation, OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>

Lee, J., & Martin, R. R. (2009). Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and-3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir: Phenolics. *Food Chemistry*, 112(4), 889-896.

Maree, H. J., Almeida, R. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., ... & Naidu, R. A. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 4, 82.

Martelli, G. P. (2012). Grapevine virology highlights 2010–2012. In: Proceedings of the 17th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (pp. 13–32). Davis, California, USA: ICVG.

Martínez de Toda, F., (1991) *Biología de la vid: fundamentos biológicos de la viticultura*. 346p. Madrid, España: Mundi Prensa.

Martinson, T. E., Fuchs, M., Loeb, G., & Hoch, H. C. (2008). Grapevine leafroll: An increasing problem in the Finger Lakes, the US and the world. *Finger Lakes Vineyard Notes*, 6, 6-11.

Montero, R., Mundy, D., Albright, A., Grose, C., Trought, M. C. T., Cohen, D., Bota, J. (2016). Effects of Grapevine Leafroll associated Virus 3 (GLRaV-3) and duration of infection on fruit composition and wine chemical profile of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Food Chemistry*, 197, 1177–1183.

Naidu, R. A., Maree, H. J., & Burger, J. T. (2015). Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 613–634.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (2018). Boletín del Vino, febrero 2018. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/02/Boletin-vino-febrero-2018.pdf>

Pearson, R. C., Goheen, A. C., & Gadoury, D. M. (1989). Compendium of Grape Diseases. *Mycologia*, 81(1), 176.

Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., & Baulcombe, D. C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant Cell*, 11(7), 1207-1215.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2017. Catastro vitícola nacional 2016. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/catastro-vides-2017.pdf>

Tsai, C. W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K. M., & Almeida, R. P. P. (2008). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98(10), 1093-1098.

Ziebell, H., & MacDiarmid, R. (2017). Prospects for engineering and improvement of cross-protective virus strains. *Current opinion in virology*, 26, 8-14.

9 Plan de trabajo

El proyecto consistirá de 3 etapas:

I. Etapa I:

Desarrollada en dependencias de la PUCV como también en viñedos de la zona de Casablanca, esta etapa consiste en la compra y preparación de la estructura a utilizar y la recolección de material viral como vegetal.

I.1. Compra de equipos e insumos:

Primer paso, consiste en el encargo y compra de materiales para el sombreadero, equipos de laboratorio e insumos para llevar a cabo el proyecto. Duración: 45 días.

I.2. Construcción de sombreadero:

Posterior a la compra de materiales, se procederá a construir el sombreadero, estructura donde se realizarán los ensayos. Duración: 45 días.

I.3. Obtención del material viral en campo:

Para poder obtener los aislados necesarios que se requieren, se recurrirá a recolectar este material en los viñedos de Casablanca. Este proceso conlleva a la recolección de material viral atenuado e infeccioso. Duración: 60 días.

I.4. Obtención de material vegetal:

Simultáneo a la recolección de los inóculos, se realiza un encargo de plantas a vivero. Se pedirán por encargo un lote de plantas al vivero Guillaume Chile S.A para obtener plantas certificadas. Duración: 60 días.

II. Etapa II:

Consiste en establecer las plantas en el sombreadero, realizar inoculaciones correspondientes a las plantas de vid y desafiar el mecanismo de resistencia adquirido, además de realizar los ensayos adecuados para corroborar el mecanismo de protección.

II.1. Establecimiento de plantas en macetas:

Proceso que consiste en establecer las plantas bajo el sombreadero. Duración 30 días.

II.2. Desarrollo de plantas bajo condiciones controladas:

Todos los manejos requeridos para que las plantas se desarrollen sin ningún estrés. Duración: 95 días.

II.3. Inicio de inoculaciones:

Antes de que las plantas comiencen a brotar, se les inoculará con la cepa atenuada y 3 meses después, se volverán a inocular con la cepa atenuada (si les corresponde). Duración: 105 días.

II.4. Obtención de datos según fenología

Cuando comience la brotación de plantas, se observará la fenología foliar para determinar en primera instancia los resultados del mecanismo de protección cruzada. Duración: 90 días.

II.5. Pruebas de laboratorio (RT-PCR):

Para corroborar los resultados fenológicos, se realizarán pruebas a todas las plantas para poder confirmar la presencia o ausencia del virus mediante el equipo de RT-PCR. Duración: 30 días.

III. Etapa III:

Por último, la etapa III consiste en la obtención de datos corroborados por laboratorio y el análisis de éstos. Además, comprende la evaluación y corroboración del mecanismo adquirido, posterior a esto, la emisión del informe y difusión de resultados del proyecto.

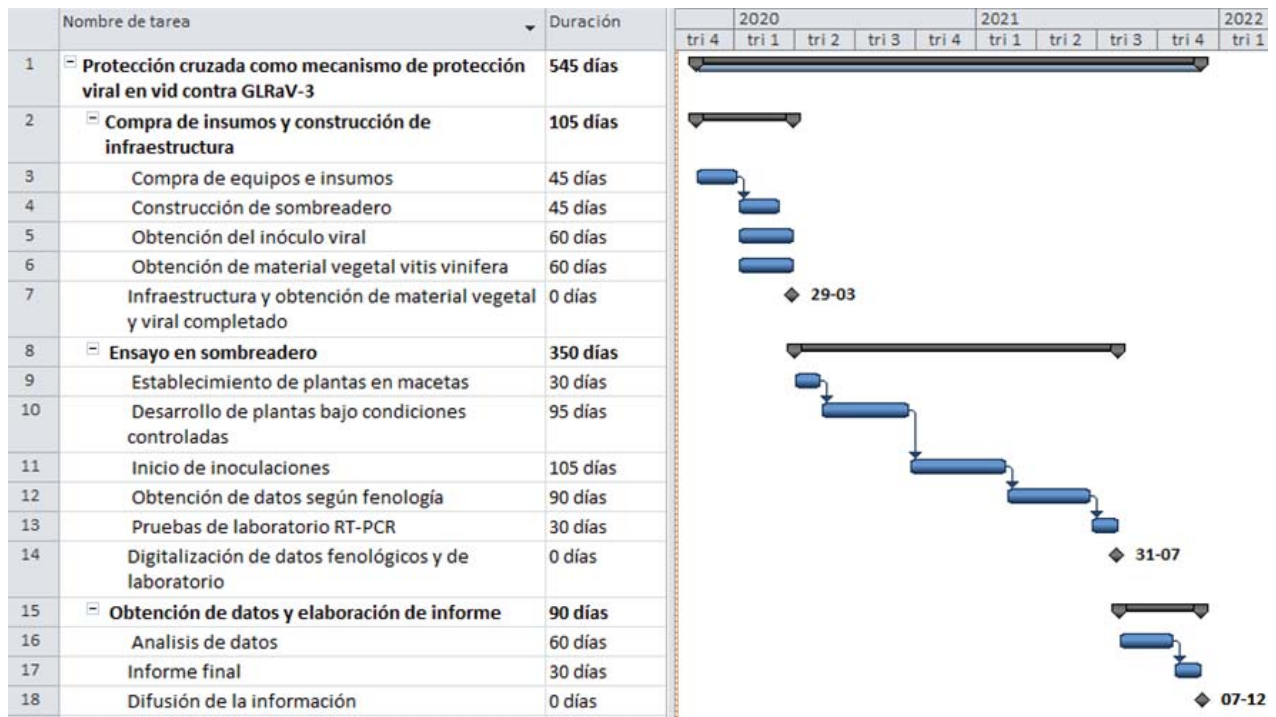
III.1. Análisis de datos

Se procede a realizar un análisis con los datos obtenidos en campo como en laboratorio, corroborando la correlación entre estos dos datos. Duración: 60 días.

III.2. Informe final

Una vez terminado el análisis de datos, se procede a realizar el informe final del proyecto, en el cual se registrarán los resultados obtenidos durante el proyecto. Duración: 30 días.

10 Carta Gantt

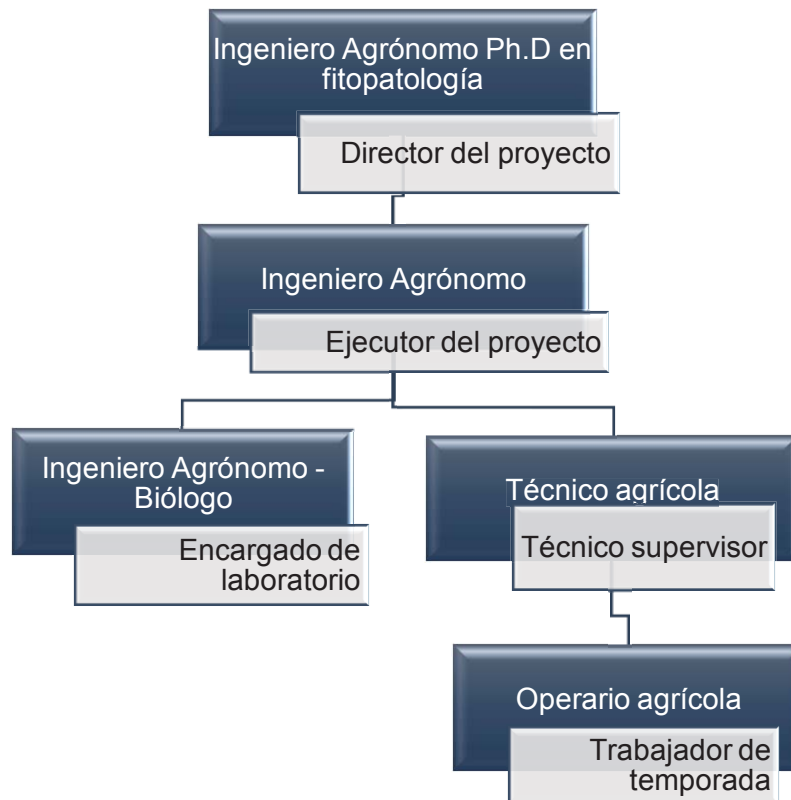


11 Resultados Esperados

Objetivo específico	Resultado esperado
Obtener e identificar al menos dos cepas virales atenuadas y una agresiva de <i>Grapevine leafroll-associated Virus 3</i> .	Genomas virales con distintas cualidades referentes a la patogenicidad de estas conocido
Evaluar la patogenicidad o virulencia en plantas de vid libre de enfermedades.	Comportamiento patogénico de las cepas sobre plantas de vid certificadas evaluado.
Realizar pruebas de protección cruzada y seleccionar las plantas que lograron adquirir el mecanismo de resistencia de manera eficiente.	Efectividad del mecanismo de resistencia adquirido por las plantas conocida

12 O
 rgani
 zació
 n
 12.1 C
 argos
 y
 funci
 ones

Cargo dentro del proyecto	Formación o grado académico	Funciones	Costo del personal (MM\$)	Aporte fondo concursable (MM\$)
Director del proyecto	Ingeniero agrónomo, PhD. en fitopatología	Dirección global del proyecto, contribución a elaboración de informe, organización de labores y toma de decisiones mayores	25	16,25
Ejecutor del proyecto	Ingeniero agrónomo	Supervisión y ejecución del proyecto. Toma de decisiones menores	18,75	12,2
Técnico superior	Técnico agrícola	Supervisión de injertación, mediciones en invernadero, y encargado del desarrollo de las plantas	1,35	0,9
Trabajador de temporada	Operario agrícola	Trabajos de mano de obra o labores rutinarias, injertación, riego, establecimiento de plantas.	2,4	1,5

12.2 Organigrama

13 Presupuesto

13.1 Presupuesto total por cuenta

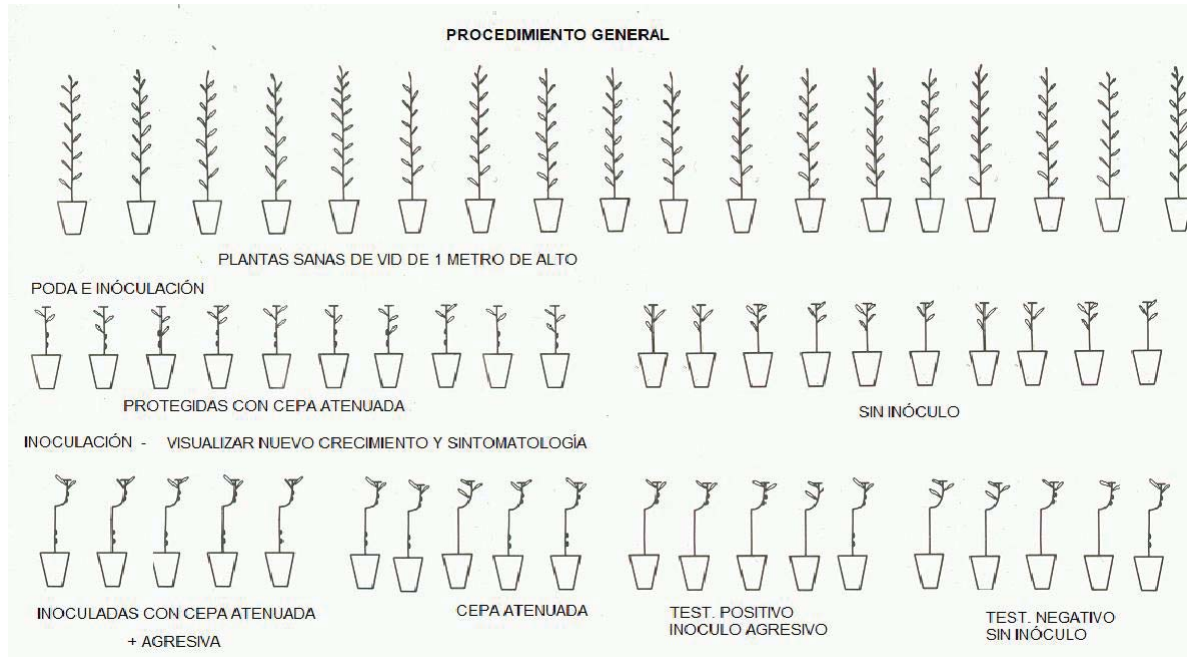
Cuenta	Fondo concursable (MM\$)	Empresa (MM\$)		Total (MM\$)
		Pecuniario	No pecuniario	
Recursos Humanos Totales	30,88	16,63		47,51
Subcontrato	9,71		5,23	14,94
Misiones Tecnológicas	3	3		6
Difusión	0,25		0,094	0,38
Gastos de inversión	1,33	0,71		2,04
Gastos operacionales	2,44	1,32		3,82
Gastos administrativos	3,35	1,80		5,15
Subtotal				79,84
Imprevistos (5%)				3,99
Total				83,83
Porcentaje de aporte	67%	33%		

13.2 Presupuesto total por año

Cuenta	Año 1	Año 2	Año 3	Total (MM\$)
Recursos Humanos Totales				
Pecuniario	23,107	22,65	1,75	47,51
No Pecuniario				
Subcontrato				
Pecuniario				
No Pecuniario	9,61	3,48	1,85	14,94
Misiones Tecnológicas				
Pecuniario	4	2		6
No Pecuniario				
Difusión				
Pecuniario				
No Pecuniario			0,38	0,38
Gastos de inversión				
Pecuniario	2,04			2,04
No Pecuniario				
Gastos operacionales				
Pecuniario	3,82			3,82
No Pecuniario				
Gastos administrativos				
Pecuniario	2,89	2,09	0,174	5,15
No Pecuniario				
Subtotal				79,84
Imprevistos (5%)				3,99
Total				83,83

14 Anexos

14.1 Procedimiento general de protección cruzada



Fuente: elaboración propia, 2018.

14.2 Presupuesto recursos humanos

RECURSOS HUMANOS				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Ingeniero Agrónomo PhD	mes	25	\$ 1.000.000	\$ 25.000.000
Ingeniero Agrónomo*	mes	25	\$ 750.000	\$ 18.750.000
Técnico Agrícola	mes	3	\$ 450.000	\$ 1.350.000
Operario agrícola	mes	8	\$ 301.000	\$ 2.408.000
Total				\$47.508.000

14.3 Presupuesto subcontratos

SUBCONTRATOS				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Arriendo de oficina	Mes	25	\$ 125.000	\$ 3.125.000
Arriendo de laboratorio de fitopatología	Mes	6	\$ 300.000	\$ 1.800.000
Arriendo de camioneta	Día	75	\$ 40.000	\$ 3.000.000
Arriendo de uso de suelo EE	Mes	18	\$ 180.000	\$ 3.240.000
Análisis de secuenciación a Corea	Unidad	4	\$ 123.000	\$ 492.000
Gastos de envío DHL	Unidad	4	\$ 70.000	\$ 280.000
Instalación completa sistema de riego	Unidad	1	\$ 3.000.000	\$ 3.000.000
Total				\$ 14.937.000

14.4 Presupuesto misiones tecnológicas

GASTOS MISIONES TECNOLÓGICAS				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Asistencia congreso internacional	Unidad	3	\$ 2.000.000	\$ 6.000.000
Total				\$ 6.000.000

14.5 Presupuesto gastos de difusión

GASTOS DIFUSIÓN				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Arriendo de sala	Unidad	1	\$ 180.000	\$ 180.000
Servicio de banquetera	Unidad	1	\$ 150.000	\$ 150.000
Distribución de folletos	5000 folletos	1	\$ 50.000	\$ 50.000
Total				\$ 380.000

14.6 Presupuesto inversión

GASTOS DE INVERSIÓN				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Sombreadero	Metro cuadrado	150	\$ 12.000	\$ 1.800.000
Notebook HP	Unidad	1	\$ 199.990	\$ 199.990
Impresora HP	Unidad	1	\$ 39.990	\$ 39.990
Total				\$ 2.039.980

14.7 Presupuesto gastos de administración

GASTOS DE ADMINISTRACIÓN				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Gastos de agua	Mes	25	\$ 49.000	\$ 1.225.000
Gastos de luz	Mes	25	\$ 50.000	\$ 1.250.000
Limpieza	Mes	25	\$ 30.000	\$ 750.000
Gastos de telefonía	Mes	25	\$ 45.000	\$ 1.125.000
Materiales y muebles de oficina	Pack	1	\$ 800.000	\$ 800.000
Total				\$ 5.150.000

14.8 Presupuesto gastos operacionales

GASTOS DE OPERACIONES				
Ítem	Unidad	Cantidad	Valor unitario	Total (CLP)
Tijeras de podar	Unidad	2	\$ 5.990	\$ 11.980
Tijeras para injertar	Unidad	1	\$ 22.990	\$ 22.990
Sustrato para macetas	80 litros	15	\$ 13.500	\$ 202.500
Etiquetas	Unidad	100	\$ 100	\$ 10.000
Toner 664 HP	Unidad	2	\$ 9.990	\$ 19.980
Plantas de vid	Unidad	70	\$ 2.500	\$ 175.000
Agua destilada	5 litros	5	\$ 2.590	\$ 12.950
Guantes de nitrilo	50 Unidades	1	\$ 3.250	\$ 3.250
Bencina	Litro	500	\$ 685	\$ 342.500
Hipoclorito de sodio (10%)	Litro	5	\$ 1.350	\$ 6.750
Placas de PCR	Unidad	1	\$ 37.200	\$ 37.200
Agarosa	Unidad	4	\$ 40.000	\$ 160.000
Gel red	Unidad	4	\$ 80.000	\$ 320.000
Alcohol 95%	Litro	5	\$ 3.500	\$ 17.500
Guantes de jardín	Par	3	\$ 3.500	\$ 10.500
Kit buffer + enzimas + minucias + nucleótidos	Pack	1	\$ 97.000	\$ 97.000
Primers	Unidad	5	\$ 20.000	\$ 100.000
Retro transcriptasa	Unidad	3	\$ 93.000	\$ 279.000
Macetas	Unidad	60	\$ 1.875	\$ 112.500
Kit de extracción	Pack	4	\$ 400.000	\$ 1.600.000
Bolsas	100 Unidades	2	\$ 1.000	\$ 2.000
Algodón	Kilo	3	\$ 8.990	\$ 26.970
Tubos Eppendorf estériles	500 unidades	2	\$ 9.990	\$ 19.980
Varillas de agitación estériles	Unidad	5	\$ 2.300	\$ 11.500
Toalla nova	Unidad	15	\$ 450	\$ 6.750
Papel tisú	Unidad	15	\$ 800	\$ 12.000
Contenedor plástico	Unidad	10	\$ 990	\$ 9.900
Peaje	Unidad	93	\$ 2.000	\$ 186.000
Total				\$ 3.816.700