

NOMBRE DEL PROYECTO

Prospección de Pierce's Disease y diagnóstico de *Xylella fastidiosa* mediante técnicas moleculares en vides (*Vitis vinifera* L.) en los principales valles productores de Chile

ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN

III a VIII regiones

INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.

AGENTE POSTULANTE RESPONSABLE DEL PROYECTO:

NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: Innovación y Tecnología Vitivinícola S.A. (VINNOVA)

INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN:

NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

RESUMEN DE COSTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO (\$).

COSTO TOTAL	M\$ 425.107,469	100%
APORTE FONDO	M\$ 260.000,000	61%
APORTE POSTULANTE	M\$ 165.107,469	39%

PROPÓSITO.

Abordar tres de los puntos mencionados en la vigilancia y defensa del patrimonio sanitarios, específicamente en lo que se refiere a determinar la situación sanitaria de las vides (*Vitis vinifera* L.) en Chile respecto de la enfermedad de Pierce (Pierce's Disease) y optimizar la metodología de detección de *Xylella fastidiosa* en coordinación con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), tomando como base metodologías existentes en el extranjero.

RESULTADOS ESPERADOS

1. Definir métodos de prospección más adecuados a las condiciones nacionales de la vitivinicultura, considerando que hasta la fecha no se han encontrado focos de Pierce's disease en Chile.
2. Optimizar la metodología de detección de *Xylella fastidiosa* en coordinación con el SAG, definiendo los protocolos y períodos de recolección del material a analizar más adecuados. Poner a disposición de la industria este servicio.
3. Lograr acreditación de nuestro laboratorio para desarrollar el servicio de detección de *Xylella fastidiosa*.
4. Elaborar estrategias de contención o mitigación de *Xylella fastidiosa* en conjunto con el SAG

FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO (EN MESES).

FECHA DE INICIO	1 de marzo de 2007
FECHA DE TÉRMINO	28 de febrero de 2011
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	48

BENEFICIOS DEL PROYECTO

Determinar la situación sanitaria de Chile respecto de la enfermedad de Pierce en vides (*Vitis vinifera* L.) en coordinación con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Desarrollar en conjunto con SAG una plataforma de diagnóstico que permita poner a disposición de la industria vitivinícola y el país una metodología de detección de *Xylella fastidiosa* optimizada la cual se ofrecerá como servicio, acreditando nuestro laboratorio ante el SAG.

Apoyo a la industria de vides para vinificación, mesa y pisco, al desarrollar estrategias ya sea de mitigación, en caso de detectar la presencia de *Xylella fastidiosa* en el territorio nacional, o bien de contención de la bacteria fuera de los límites territoriales de Chile, en caso de tener resultados negativos.

Incentivar el potencial existente de la industria vitivinícola nacional, favoreciendo el normal desarrollo de este rubro.

BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO

Productores, exportadores y profesionales, técnicos y trabajadores vitivinícolas que constituyen el rubro más importante de la actividad frutícola del país. Chile es el mayor exportador de uva de mesa para consumo fresco y el quinto en exportación de vinos a nivel mundial.

Productores y exportadores, profesionales técnicos y trabajadores de frutales sensibles al ataque de *Xylella fastidiosa*.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA

Coordinación de actividades

El proyecto propuesto se enmarca dentro de las actividades que Vinnova como Consorcio desarrolla, que es la de generar nuevas propuestas de innovación tecnológica y favorecer la difusión de éstas. De esta forma, la coordinación de actividades entre el equipo PUC, técnico responsable de la investigación y la gerencia de Vinnova son fundamentales para el adecuado cumplimiento de los propósitos. Se propone realizar reuniones internas del equipo de trabajo directo para direccionar las actividades y fijar plazos y metas de acuerdo a los resultados parciales. También se realizarán reuniones con la gerencia de Vinnova.

Compra y puesta en marcha de equipos

Actividad fundamental que determinará el éxito de las actividades principales del proyecto.

Viajes al extranjero

Los jefes de proyecto realizarán durante el primer año de proyecto una visita al Dr. Perring de la Universidad de California en Riverside y a otros centros tecnológicos con el fin de capacitarse y establecer contactos y que permitan obtener un cupo para que un profesional nuestro pueda acceder a los últimos protocolos de detección de *Xylella fastidiosa* y también de muestreos, además de intercambiar información entre universidades.

Optimización de Técnicas de detección de Xf en Chile

Una vez que estemos en conocimiento de técnicas de laboratorio, se plantea trabajar en forma coordinada con el SAG, entidad que hasta ahora ha sido la responsable de trabajar en la detección de Xf, con el fin de establecer la mejor metodología que permita cumplir de manera



confiable y eficiente con los objetivos de análisis de Xf.

Establecer Técnicas de muestreo de Xf en los valles productores ubicados entre las regiones tercera y octava, abarcando una superficie estimada de 150 mil hectáreas. La idea es que, conociendo los procedimientos utilizados en USA, país que YA tiene la enfermedad, se pueda establecer una metodología estadísticamente confiable que nos permita determinar claramente la situación sanitaria de Chile respecto de Pierce's Disease.

Por lo general, los estudios de la distribución geográfica y progresión de la enfermedad de Pierce se basan en censar visualmente todas las plantas de un viñedo infectado, o en el uso de protocolos de muestreo en áreas de un viñedo aparentemente sanas que se encuentran a una distancia determinada de plantas sintomáticas. Estos últimos métodos han sido desarrollados por el grupo de trabajo del Dr. Perring de la Universidad de California, Riverside. Debido a que hasta ahora en Chile no se ha descrito la presencia de plantas sintomáticas, durante la prospección que se realizará entre la III y VIII Regiones, se utilizarán protocolos de muestreo similares a los desarrollados por el Dr. Perring, quien será consultado para optimizar el diseño de nuestro protocolo de muestreo. Finalmente, las plantas seleccionadas durante la prospección serán georeferenciadas utilizando tecnología GPS (global positioning system) y sus coordenadas serán registradas.

Viajes de prospección

La prospección de *Xylella fastidiosa* se realizará entre la III y VIII Regiones, en viñedos comerciales de las empresas asociadas a VINNOVA y en parronales de uva de mesa seleccionados especialmente para este propósito, también se consideran 2 visitas a Isla de Pascua, lugar donde se detectó el vector más importante de la enfermedad, con el fin de recolectar material vegetal con mayores probabilidades de estar infectadas. La recolección de muestras vegetales se llevará a cabo entre los meses de Noviembre y Febrero, en los que la población de bacterias se encuentra en su máxima expresión en los brotes de plantas infectadas. La selección del material vegetal, así como la distribución espacial del muestreo, se realizarán siguiendo las recomendaciones disponibles en la literatura especializada actual. Particularmente, estudios realizados en California (EE.UU.) indican que la selección de cinco hojas basales de brotes diferentes es el método de muestreo más eficiente para la detección de la bacteria en plantas infectadas (Park *et al*, 2006).

Detección de *Xylella fastidiosa*

Las hojas recolectadas se llevarán al laboratorio donde sus pecíolos y venas serán preparados para ser sometidos a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus iniciales en inglés, en que se usarán “primers” diseñados específicamente para la detección de *X. fastidiosa*. Esta técnica fue descrita inicialmente para la detección de *X. fastidiosa* por Minsavage *et al* (1994) y ha sido modificada con posterioridad para mejorar su eficiencia y sensibilidad. La metodología de PCR es preferible a otras técnicas de inmunodetección, como ELISA, debido a que comparativamente PCR es un método más rápido, eficiente y sensitivo. Específicamente, se ha descrito que la prueba de PCR es cerca de 100 veces más sensible que ELISA cuando existe una baja concentración de la bacteria en la muestra vegetal. Esto es de particular importancia para la prospección de la bacteria en Chile, considerando que todas o la mayor parte de las muestras analizadas deberían resultar libres de la bacteria, y en tal caso es recomendable utilizar la prueba con mayor sensibilidad y que otorgue el mayor grado de confianza en los resultados negativos de la prueba (ausencia de *X. fastidiosa*).

Visita de experto extranjero

Con el fin de consolidar las técnicas definidas como parte de las actividades del proyecto, se considera la visita de un experto extranjero especialista en el muestreo y detección de *Xylella fastidiosa* que apruebe o oriente las investigaciones.

Estrategias de contención o mitigación

Se plantea establecer en conjunto con el SAG las estrategias más adecuadas de acuerdo a los resultados obtenidos. En caso de obtener muestras positivas, definir el grado de dispersión de la enfermedad realizando monitoreos permanentes en las zonas aledañas.

Acreditación del laboratorio en la detección de *Xylella fastidiosa*

Una vez montada la técnica de detección, se busca apoyar al SAG en el diagnóstico de Xf mediante la acreditación como laboratorio de servicio.

Difusión y transferencia

Uso de plataforma de Vinnova para organizar seminarios y charlas de divulgación de la propuesta y sus alcances.



Todas las actividades están orientadas a obtener los resultados o metas propuestas. Durante el primer año se busca capacitar a los profesionales y técnicos con el fin de definir en primera instancia los métodos de prospección más adecuados a las condiciones nacionales de la vitivinicultura e iniciar el desarrollo de protocolos para diagnosticar Xf.

Al año 2, la metodología de detección deberá estar implementada en primera instancia, igual que el procedimiento de muestreo. En este año se considera el apoyo técnico de un especialista norteamericano.

Los años 3 y 4 servirán para consolidar las metodologías desarrolladas, en conjunto con SAG y las actividades estarán orientadas a cumplir con los requerimientos de esta entidad para lograr la acreditación de nuestro laboratorio para desarrollar el servicio de detección de *Xylella fastidiosa*. También, de acuerdo a los resultados obtenidos en el diagnóstico, cooperaremos con el SAG en la elaboración de estrategias de contención o mitigación de *Xylella fastidiosa*.

Referencias

Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456-461

Francis M, Lin H, Cabrera-La Rosa J, Doddapaneni H, EL Civerolo (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* **115**:203-213

Oliveira AC, Vallim MA (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **92**: 1048-1054

Schaad NW, Opgenorth D, Gauth P (2002) Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* **92**: 721-728

Park Y-L, Perring TM, Krell RK, Farrar CA, Gispert C (2006) Spatial distribution of Pierce's disease in the Coachella Valley: Implications for sampling. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**: 220-225