

3143

33 pag.

634.7  
H 821  
1999

10 br

**FONTEC - CORFO**

**PROYECTO DE INNOVACION TECNOLOGICA**

**INFORME FINAL**

**CODIGO : 97 - 1124**

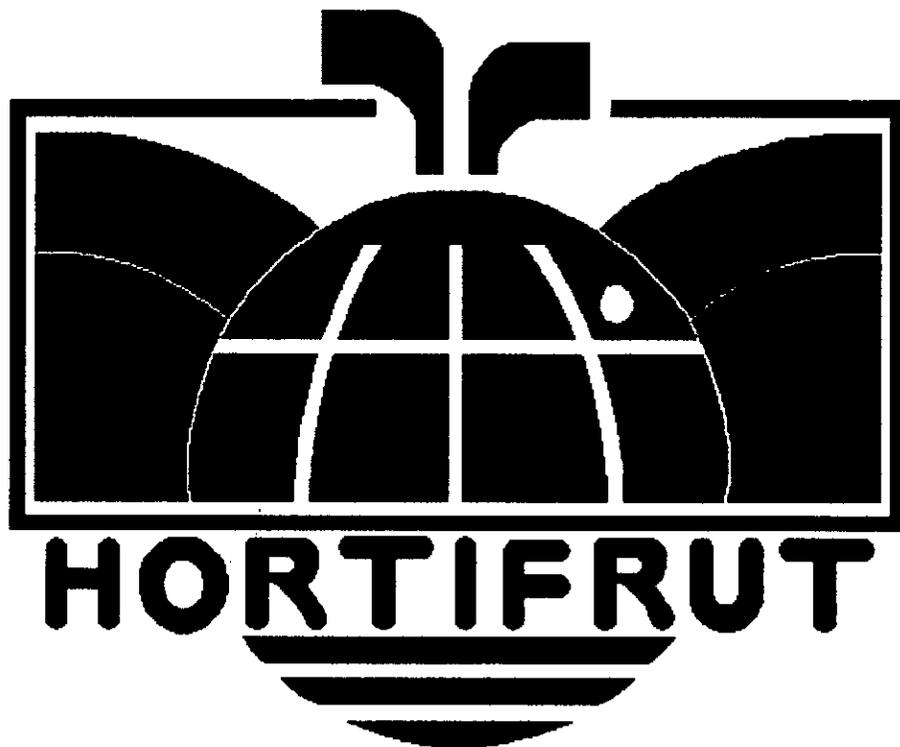
**PROYECTO : IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES  
(RAPD-Marker) PARA LA CERTIFICACION VARIETAL  
DE BERRIES**

**EMPRESA GESTORA : HORTIFRUT**

**FECHA DE ENTREGA : Septiembre 1999**

634.7  
H 821  
1999

**INFORME FINAL  
(PROYECTO DE INNOVACION TEGNOLOGICA)  
IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES  
(RAPD-Marker) PARA LA CERTIFICACION VARIETAL DE  
BERRIES ( CODIGO DEL PROYECTO : 97 - 1124 )**



**Berries a todo el Mundo  
Todos los días**

SEPTIEMBRE 1999.

14 SEP 1999

## PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por la incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas, toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compite con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

**FONTEC - CORFO**



## **INFORME FINAL**

**CODIGO PROYECTO: 97-1124**

**TIUTLO:**  
**IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD-Marker)**  
**PARA LA CERTIFICACIÓN VARIETAL DE BERRIES**

**ENTIDAD PATROCINADORA: HORTIFRUT S.A.**

**ENTIDADES EJECUTORAS: UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE**  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE**

**FECHA DE ENTREGA: 10 DE SEPTIEMBRE DE 1999**

## **A. RESUMEN EJECUTIVO**

Hortifrut S.A. representa la mayor empresa productora y exportadora de berries frescos en nuestro País. Cuenta con numerosos huertos propios, en tanto que también un número significativo de productores independiente exportan con Hortifrut S.A. Actualmente la empresa exporta aproximadamente el 50% de la producción nacional de berries.

Hortifrut S.A. tiene una producción anual que supera el millón y medio de plantas, con las cuales satisface las necesidades de sus propios huertos así como las necesidades de sus productores asociados. Para esto la empresa cuenta con un laboratorio de micropropagación, donde sistemáticamente implementa mejoras tecnológicas, que han elevado considerablemente la calidad de las plantas, especialmente en lo que se refiere a la calidad fitosanitaria y a los sistemas de identificación varietal. Estos aspectos tienen un fuerte impacto sobre los niveles de producción, sobre la calidad de las plantas y de la fruta y sobre el valor agregado al momento de la comercialización, dado que se trata de productos certificados.

Hortifrut S.A. a través de proyectos de innovación tecnológica ha implementado en su laboratorio de micropropagación todos los procedimientos necesarios para la identificación de berries mediante RAPD-Marker. Al mismo tiempo personal de la empresa ha sido capacitado en la Universidad de Santiago de Chile para la correcta ejecución de los procedimientos implementados. Con este tipo de tecnología la empresa podrá seleccionar inequívocamente cada una de las variedades que conforman su inventario de plantas madres.

## **B.- EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.- Descripción General del Proyecto**

El desarrollo de este proyecto permitió la implementación de un procedimiento para identificar variedades de Frambuesas y arándanos en los laboratorios de micropropagación de Hortifrut S.A.

En la actualidad Hortifrut S.A. produce más de un millón de plantas de frambuesas y arándanos, en tanto que permanentemente introduce nuevas variedades desde el extranjero para probar su potencial productivo bajo nuestras condiciones edafoclimáticas. Esto hace que Hortifrut S.A. sea la principal empresa productora de plantas berries en Chile. Lo anterior ha generado la necesidad de producir material idóneo debidamente certificado para minimizar errores por confusión o mala identificación de variedades. Este tipo de errores puede llegar a tener enormes repercusiones económicas si se consideran las cuantiosas inversiones en que debe incurrir la empresa o un productor al momento de implementar un huerto. Si eventualmente se trabaja con variedades no deseadas el problema será detectado sólo cuando el huerto entre en producción, con las pérdidas consiguientes.

Para abordar este problema la empresa desarrollo el proyecto de innovación tecnológica titulado: IMPLEMENTACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD-Marker) PARA LA CERTIFICACIÓN VARIETAL DE BERRIES. Este proyecto permitió implementar procedimientos de biología molecular, específicamente la amplificación de secuencias genómicas de ADN utilizando partidores diseñados al azar, mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Este procedimiento permite diferenciar inequívocamente una variedad de otra, basándose en el polimorfismo genómico propio de las especies vegetales.

Para la implementación de estos procedimientos Hortifrut S.A. trabajó en conjunto con la Universidad de Santiago de Chile y La pontificia Universidad Católica de Chile. El desarrollo del proyecto tuvo una duración de 2 años y se logró la caracterización genómica de 10 variedades de Frambuesas y 5 variedades de Arándanos

### **2.- Objetivos técnicos y soluciones específicas**

Los objetivos técnicos alcanzados se pueden resumir en los siguientes tres puntos:

- Implementación de un sistema de identificación varietal para 5 variedades de arándanos y 10 variedades de frambuesas
- Adiestramiento del personal de Hortifrut S.A. en el desarrollo y manejo técnico de marcadores moleculares (RAPD-Marker) para la identificación de variedades de berries
- Documentación fotográfica de los patrones de RAPD-Marker característico de las variedades antes mencionadas.

A través de estos tres objetivos específicos, al interior de la empresa, se podrán mejorar los siguientes aspectos:

- La homogeneidad de plantas y frutas de Berries en Arándanos y Frambuesas a exportar por el uso de plantas con certificación varietal
- La reducción de los costos de producción dado que minimiza pérdidas por concepto de utilización de plántulas de bajo rendimiento, lo que finalmente tendrá un fuerte impacto en la calidad y volumen de producción por unidad de superficie
- Proporciona las herramientas necesarias para garantizar o certificar genuinidad varietal, lo que incrementa el valor agregado de los productos en el mercado
- Dado que los procedimientos desarrollados son básicamente los mismos para hacer selección varietal de otras especies vegetales, la metodología implementada, puede irradiar rápidamente a otros sectores agroindustriales, lo que contribuirá con la reconversión del agro en nuestro país

### 3.- Tipo de innovación y ventaja

La implementación de marcadores moleculares, en el proceso de identificación varietal de berries, constituye una importante innovación tecnológica en los laboratorios de Hortifrut S.A.

La tecnología implementada es importante al momento de optimizar los niveles de producción así como la calidad de la fruta, cuestión que tiene finalmente un fuerte impacto en la rentabilidad de los cultivos, sólo a modo de ejemplo la adecuada selección, mediante marcadores moleculares, de variedades de *Pinus radiata* en Nueva Zelandia ha permitido incrementar en un 30% la producción de madera, algo similar ha ocurrido con algunas especies de *Eucaliptus* en Australia, Nueva Zelandia y Brasil.

Dado que la domesticación de los arándanos como especies cultivables es reciente no existen todavía estadísticas claras con respecto a los incrementos en la productividad, sin embargo la utilización de Marcadores moleculares (RAPD-Marker), permite seleccionar ejemplares que reúnen características específicas en relación con un objetivo determinado, como por ejemplo variedades que produzcan frutos con un tamaño determinado o regularidad en el tamaño de los frutos, variedades con mejores propiedades post-cosecha, variedades más tardías o más tempranas que permitan la comercialización de los frutos frescos en períodos de precios altos, por ejemplo en el mes de Abril en el mercados norteamericano, variedades resistentes a patógenos o a determinadas condiciones agroclimáticas, etc. En general la incorporación de esta tecnología proporciona a las empresas hortofrutícolas una poderosa herramienta para optimizar el manejo de sus cultivos y minimizar riesgos y pérdidas inherentes al uso de plantas de variedades equivocadas o simplemente plantas de bajo rendimiento. El manejo conveniente de todos estos aspectos proporciona a la empresa poderosas herramientas para mantener su liderazgo en la producción y comercialización de berries a nivel nacional e internacional.



## C. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

La metodología más relevante que se utilizó durante la implementación del proyecto se resume a continuación, en tanto que el plan de trabajo desarrollado se incluye en un anexo a la forma de una carta Gantt.

### Procedimientos generales para la purificación de ADN

**Material biológico:** uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, al momento de seleccionar el material biológico, dice relación con el contenido de carbohidratos y polifenoles. A mayor edad mayor es el contenido de ambos polímeros. Los carbohidratos en general co-precipitan con el ADN dificultando la manipulación de las preparaciones, sin embargo el mayor problema es que afectan la migración del ADN sobre los geles de agarosa. Esto afecta negativamente la reproducibilidad del procedimiento.

Los polifenoles en general también co-precipitan con el ADN, pero estos a diferencia de los carbohidratos son inhibidores de la enzima Taq Polimerasa, de tal forma que en presencia de este polímero la eficiencia de la amplificación disminuye. Por lo anterior es altamente recomendable que el material foliar a utilizar sea lo más joven posible

**Limpieza de los utensilios:** es absolutamente necesario limpiar cuidadosamente el o los morteros con abundante agua y jabón, eventualmente es recomendable remojar los utensilios durante una hora con cloro. Posteriormente se deben flamear adecuadamente para evitar cualquier posibilidad de contaminación o mezcla de ADN proveniente de plantas diferentes. En teoría la amplificación de secuencias nucleotídicas mediante la reacción de polimerasa en cadena es extremadamente sensible, de tal forma que fácilmente se pueden obtener patrones de bandedo que no corresponden a los patrones de referencia. Las mismas precauciones se debe tener con las tijeras y pinzas utilizadas en la manipulación del material foliar.

### Materiales necesarios para la purificación de ADN:

<u>Solución 2X CTAB</u>	<u>200 ml</u>
2% CTAB	4 gr CTAB
100mM Tris-HCl pH 8.0	20 ml 1M Tris-HCl pH 8.0
20mM EDTA pH 8.0	8 ml 0.5M EDTA pH 8.0
1.4M NaCl	16.4 gr NaCl
1% PVP (40.000)	2 gr PVP (40.000)
Agregar inmediatamente antes de utilizar beta-mercaptoetanol 1:1000	

<u>Solución 5% CTAB</u>	<u>100 ml</u>
5% CTAB	5.0 gr CTAB
0.7 M NaCl	4.1 gr NaCl

<u>Cloroformo/isoamilalcohol</u>	<u>250 ml</u>
Cloroformo	240 ml
Isoamilalcohol	10 ml



Isopropanol

75% Etanol

Solución tampón TE

10 mM Tris-Cl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

100 ml

1 ml 1M Tris-HCl pH 8.0

0.2 ml 0.5 M EDTA

Solución RNasaA

RNasaA 10 mg/ml en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM. Esta solución debe ser incubada durante 15 minutos a 100°C (15 minutos en agua hirviendo).

**Purificación de ADN genómico:** para la obtención de ADN genómico de alto peso molecular se procede de la siguiente forma:

- 1.- 1gr de hojas se macera vigorosamente en un mortero hasta obtener una pasta. Esto asegura la ruptura por completo de la pared celular, lo que permite una mejor recuperación del ADN.
- 2.- El macerado se homogeneiza en 15 ml de Buffer de extracción (BE; 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.7M NaCl, 10 mM EDTA, 1%(w/v) CTAB, 1% 2-mercaptoetanol). Se mezcla con una pipeta de boca ancha para evitar romper el ADN
- 3.- La suspensión debidamente tapada se incuba durante 30 min. a 65 °C agitando ocasionalmente
- 4.- Enfriar la solución sin que precipite el CTAB (la temperatura no debe ser inferior a 15 °C). Agregar 15 ml Cloroformo-octanol (24:1). Agitar hasta formar una emulsión.
- 5.- Centrifugar durante 10 min. a 8000 rpm a 20°C, para separar en dos fases
- 6.- Remover la fase superior (fase acuosa que contiene el ADN). Se debe evitar arrastrar proteínas presentes en la interfase
- 7.- Adicionar 1/10 vol. CTAB (10% CTAB en NaCl 0.7 M), esto es aproximadamente 1.5 ml. y repetir la extracción con cloroformo-octanol
- 8.- Remover nuevamente la fase acuosa, evitando arrastrar material desde la interfase, trasvasiandola a un tubo que permita centrifugar a 2000 rpm.
- 9.- Agregar 1 vol. de Buffer de Precipitación (BP; 50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 1%CTAB, mezclar suavemente y dejar reposar por 30 min. hasta que se forme el precipitado
- 10.- El precipitado es colectado por 10 min. de centrifugación a 2000 rpm, evitando que el pellet se seque o que se compacte demasiado, esto facilita su posterior disolución



11.- El ADN puede ser posteriormente dializado o lavado mediante precipitaciones sucesivas con etanol

**Procedimientos generales para la amplificación de ADN mediante PCR**

**Amplificación de ADN:** para amplificar secuencias al azar a partir de ADN genómico se utilizó el siguiente procedimiento:

1.- En tubos Eppendorf (0.5 ml) se agrega la siguiente mezcla:

Agua estéril	30ul
Buffer de amplificación*	10ul
Mezcla de nucleótidos 1.25mM (dNTP)	16ul
Partidor	100 pmoles
Templado	200 pmoles

completar con agua estéril hasta 100ul

\*Composición del Buffer (10X):

- 500 mM KCl
- 100 mM Tris-HCl pH 8.3
- 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1% Gelatina.

2.- La mezcla anterior se cubre con aceite mineral para impedir la evaporación. Posteriormente se calienta 5 min. a 95°C para denaturar completamente el ADN.

3.- Cuando la temperatura de la mezcla comienza a decrecer aproximadamente a 94°C se agregan 0.5 ul de Taq DNA polimerasa (en esta etapa frecuentemente es necesario centrifugar brevemente a 12000 rpm para asegurarse que la enzima efectivamente alcanza la solución

4.- La temperatura debe decrecer hasta que alcance la temperatura de hibridación. Posteriormente la temperatura se eleva hasta alcanzar los 72°C, temperatura óptima para la enzima Taq DNA polimerasa. Cada uno de estos ciclos es realizado automáticamente en un termociclador. Normalmente para cada muestra se realizan 30 ciclos de acuerdo con el siguiente programa de amplificación:

Ciclo	Denaturación	Hibridación	Polimerización
Primer ciclo	5 min. 95°C	1 min. 48°C	1 min. 72°C
30 ciclos de	1 min. 94°C	1 min. 50°C	1 min. 72°C



**Análisis de los productos de PCR:** Los productos de PCR, dado que son fragmentos carentes de extremos cohesivos, pueden ser analizados directamente sobre geles de Agarosa al 1.6% en presencia de Bromuro de etidio. Para esto se tomarán 5 ul de la mezcla de amplificación descrita anteriormente y se aplican sobre un gel de agarosa para separar los fragmentos por electroforesis. En estas condiciones se pueden visualizar los patrones de fragmentos de ADN directamente bajo luz ultravioleta. Los patrones de fragmentos de ADN obtenidos para el genoma de cada variedad frente a cada uno de los partidores fueron documentados fotográficamente para su posterior análisis.

Para resumen cronológico de las actividades implementadas durante el desarrollo del proyecto, ver carta Gantt en las páginas siguiente

**PLAN DE TRABAJO (CARTA GANTT)**



Id	Nombre de tarea	tri 4 1997		tri 1 1998			tri 2 1998			tri 3 1998			tri 4 1998			tri 1 1999			tri 2 1999			tri		
		sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul
24	Identificación de genomas individuales de Arándano y Frambuesa																							
25	Informe de avance N° 3																							
26	Adiestramiento de personal de la empresa																							
27	Correlación entre c/u de las variedades y los patrones de bandeó																							
28	Confección de documento resumen con patrones carac. de cada variedad																							
29	Análisis general de resultados y publicaciones																							
30	Informe de avance N° 4 y final																							

◆ 10/03

Proyecto:  
Fecha: 1/09/97

Tarea		Resumen		Progreso resumido	
Progreso		Tarea resumida			
Hito	◆	Hito resumido	◇		



## **D.- RESULTADOS**

En este último informe y final se incluyen, además de un resumen de los procedimientos implementados durante el desarrollo del proyecto, los resultados correspondientes a las siguientes actividades en concordancia con la carta Gantt:

- 26.- Adiestramiento del personal de la empresa**
- 27.- Correlación entre cada una de las variedades y los patrones de bandeo**
- 28.- Confección de documento resumen con los patrones característicos de cada variedad**
- 29.- Análisis general de resultados y publicaciones**

En esta última etapa se concretó el adiestramiento del personal de Hortifrut S.A. y además se completó la transferencia tecnológica a los laboratorios de la empresa.

La implementación de los marcadores moleculares por parte del personal de Hortifrut S.A. en sus propios laboratorios, bajo la supervisión de personal de la Universidad de Santiago de Chile y de la Pontificia Universidad Católica de Chile, permitió transferir con éxito la tecnología. No obstante lo anterior, dado que los laboratorios de las unidades ejecutoras no son exactamente iguales a los laboratorios de Hortifrut S.A. y a la gran variabilidad que normalmente presentan este tipo de marcadores entre un laboratorio y otro, se observaron cambios en los patrones de bandeo obtenidos, en relación con los patrones de bandeo documentados en el Informe N°3. Finalmente se consideraron como patrones definitivos aquellos que resultaron iguales tanto en los laboratorios de las unidades ejecutoras como en los laboratorios de Hortifrut S.A.

### **Descripción de las actividades desarrolladas**

#### **26.- Adiestramiento del personal de la empresa**

Personal de la empresa se capacitó en los laboratorios de ambas unidades ejecutoras en cada uno de los procedimientos. En los laboratorios de Hortifrut S.A. se implementaron en detalle los procedimientos anteriormente descritos, donde se capacitó a la jefa del laboratorio de micropropagación y al profesional a cargo. La capacitación consistió en verificar, mediante la utilización de marcadores moleculares, la genuinidad de algunas variedades micropropagadas y otras provenientes del campo. Estos resultados se incluyen en el punto 28.

#### **27.- Correlación entre cada una de las variedades y los patrones de bandeo**

Como se mencionó anteriormente la correlación definitiva entre cada una de las variedades y los respectivos patrones de bandeo, se estableció con aquellos patrones que efectivamente fueron reproducibles en los laboratorios de Hortifrut S.A. dado que finalmente es la empresa la usuaria de los marcadores. En este punto cabe destacar, nuevamente, que los marcadores implementados pueden variar considerablemente de un laboratorio a otro, de tal forma que los marcadores definitivos a correlacionar y con los que además se confeccionará el documento resumen descrito en el punto 28, equivalen a aquellos marcadores que resultaron similares en los laboratorios de las unidades ejecutoras y en los laboratorios de Hortifrut S.A.. Un resumen

de las variedades versus los patrones de bandeo característicos se encuentran resumidos en el punto 28.

**28.- Confección de documento resumen con los patrones característicos de cada variedad**

El documento resumen confeccionado en esta sección proporciona fotografías que muestran cada uno de los marcadores moleculares implementados, dispuestos de tal forma que pueda establecerse por simple inspección visual una comparación de los patrones de bandeo característicos para cada una de las variedades individualizadas. Con este fin los patrones se muestran sobre un mismo gel y no sobre geles separados.

**Pauta para la identificación de las 10 Variedades de Frambuesas**

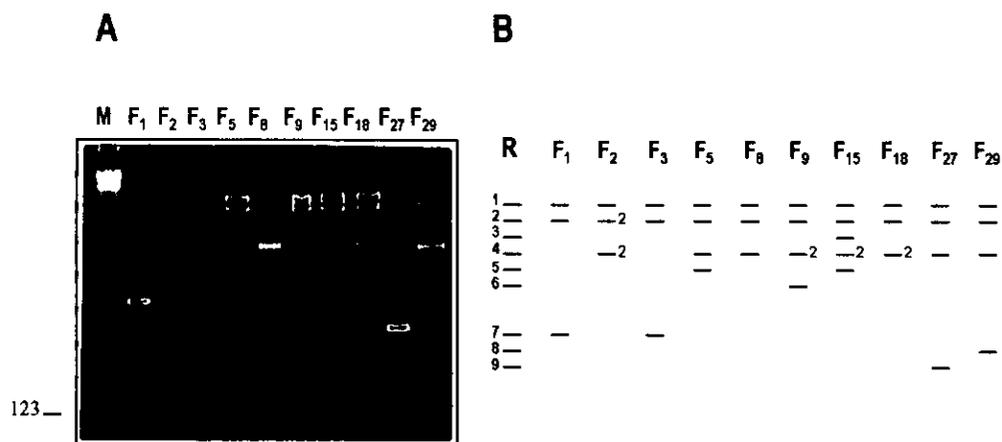
Las variedades de frambuesas pueden ser claramente identificadas con el partidor número 582. Las únicas variedades que presentan ambigüedades entre si son las variedades F1 y F2. Estas variedades sin embargo, son claramente discriminadas por el partidor 592, de tal forma que los patrones característicos para cada variedad se pueden resumir de la siguiente forma:

Variedad	Patrón de bandeo Partidor 582 (Fig.1)	Patrón de bandeo Partidor 592 (Fig.3)
F <sub>1</sub>	1-2-7	5
F <sub>2</sub>	1-2-4 (bandas 2y 4 dobles)	
F <sub>3</sub>	1-2-7	3-5
F <sub>5</sub>	1-2-4-5	
F <sub>8</sub>	1-2-4	
F <sub>9</sub>	1-2-4-6 (banda 4 doble)	
F <sub>15</sub>	1-2-3-4-5 (banda 4 doble)	
F <sub>18</sub>	1-2-4 (banda 4 doble)	
F <sub>27</sub>	1-2-4-9	
F <sub>29</sub>	1-2-4-8	

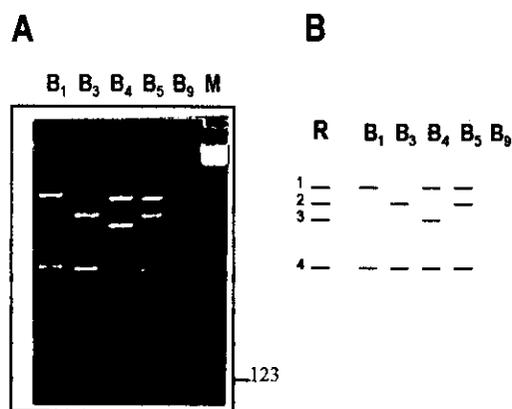
**Pauta para la identificación de 5 variedades de Arándanos**

Las variedades de Arándanos al igual que las variedades de frambuesas son claramente identificadas mediante la utilización del partidor 582. Sin embargo, la variedad B<sub>9</sub> genera un patrón poco intenso, el cual puede ser claramente discriminado con el partidor 592. Los patrones para identificar cada una de las variedades de arándanos son los siguientes:

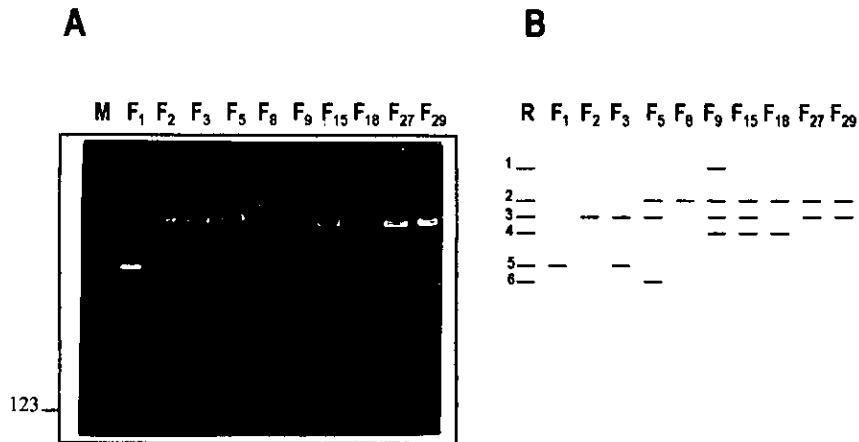
Variedad	Patrón de bandeo Partidor 582 (Fig.2)	Patrón de bandeo Partidor 592 (Fig.4)
B <sub>1</sub>	1-4	
B <sub>3</sub>	2-4	
B <sub>4</sub>	1-3-4	1-4-5
B <sub>5</sub>	1-2-4	1-5
B <sub>9</sub>		4



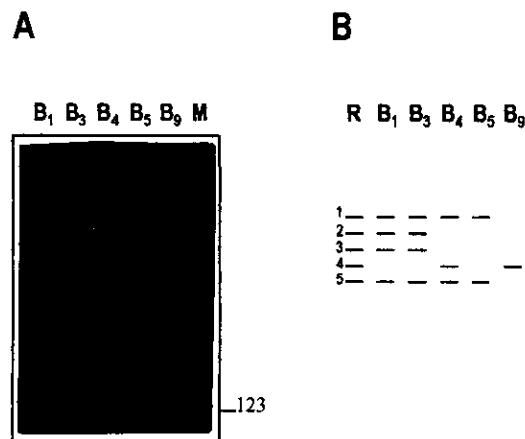
**Figura 1.-** A: gel de Agarosa al 1.6% mostrando la amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico de frambuesas, mediante PCR. El ADN proviene de las variedades F1, F2, F3, F5, F8, F9, F15, F18, F27 y F29. M: corresponde al marcador de peso molecular 123-leader (las bandas son múltiplos de 123). El partidor utilizado es el número 582. B: Esquema donde se resumen las bandas más representativas para la diferenciación de variedades de frambuesas. R: bandas de referencias enumeradas. El número 2 al lado de la banda indica que esta es doble.



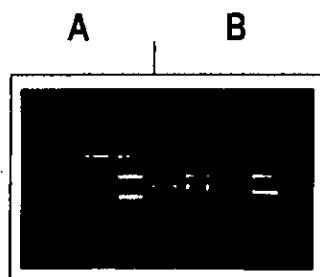
**Figura 2.-** A: gel de Agarosa al 1.6% mostrando la amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico de Arándanos, mediante PCR. El ADN proviene de las variedades B1, B3, B4, B5 y B9. M: corresponde al marcador de peso molecular 123-leader (las bandas son múltiplos de 123). El partidor utilizado es el número 582. B: Esquema donde se resumen las bandas más representativas para la diferenciación de variedades de Arándanos. R: bandas de referencias enumeradas



**Figura 3.-** A: gel de Agarosa al 1.6% mostrando la amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico de frambuesas, mediante PCR. El ADN proviene de las variedades F1, F2, F3, F5, F8, F9, F15, F18, F27 y F29. M: corresponde al marcador de peso molecular 123-leader (las bandas son múltiplos de 123). El partidor utilizado es el número **592**. B: Esquema donde se resumen las bandas más representativas para la diferenciación de variedades de frambuesas. R: bandas de referencias enumeradas



**Figura 4.-** A: gel de Agarosa al 1.6% mostrando la amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico de frambuesas, mediante PCR. El ADN proviene de las variedades F1, F2, F3, F5, F8, F9, F15, F18, F27 y F29. M: corresponde al marcador de peso molecular 123-leader (las bandas son múltiplos de 123). El partidor utilizado es el número **592**. B: Esquema donde se resumen las bandas más representativas para la diferenciación de variedades de frambuesas. R: bandas de referencias enumeradas



**Figura 5.-** Gel de Agarosa al 1.6% mostrando la amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico de Arándanos, mediante PCR. El ADN proviene de variedades Arándanos cultivados in vitro que se encuentran actualmente en proceso de caracterización(A). B: amplificados obtenidos a partir de ADN genómico proveniente de Arándanos cultivados en campo (en proceso de identificación)



## **Resultados obtenidos en el laboratorio de Hortifrut S.A**

En esta sección se incluye una foto que muestra la calidad de los patrones de bandeo que actualmente se están obteniendo en el laboratorio de Hortifrut S.A. Cabe señalar que en este caso se analizan variedades que no fueron incluidas en las 5 variedades que inicialmente se identificaron (B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> y B<sub>9</sub>) ver figura 5.

Lo anterior pone de manifiesto la capacidad del laboratorio de Hortifrut S.A. no sólo para utilizar los marcadores implementados, sino también para ampliar independientemente de las unidades ejecutoras el número de variedades caracterizadas lo que finalmente le permitirá completar en forma autónoma la identificación de todas sus variedades y eventualmente la prestación de servicios a otras empresas y productores independientes.

### **29.- Análisis general de resultados y publicaciones**

Esta actividad pretendió evaluar en términos generales los resultados obtenidos, especialmente al momento de establecer claramente cual de todos los patrones obtenidos experimentalmente representan mejor un genotipo determinado. Como se discutió anteriormente es posible obtener varios patrones de fragmentos distintos entre si con un mismo partidor. Esto depende de numerosas variable de las cuales algunas se pueden controlar en un laboratorio determinado, en tanto que en otro laboratorio no. Un buen ejemplo de esto lo constituye la variable cantidad de ADN en las preparaciones a caracterizar . En relación con esto las concentraciones de ADN pueden ser precisamente establecidas en los laboratorios de las Unidades Ejecutoras, en tanto que esto en los laboratorios de Hortifrut S.A. resulta más difícil. Esta situación nos llevó a seleccionar aquellos patrones de fragmentos que presentan una menor variabilidad frente a los cambios en la concentración del ADN templado. De igual forma hay pequeñas diferencias en la calidad del ADN genómico obtenido en los laboratorios de Hortifrut S.A. en relación con el ADN genómico obtenido en las Unidades Ejecutoras, cuestión que también afecta los patrones de bandeo. En este sentido se hizo un análisis general de todos los patrones de bandeo y se seleccionaron aquellos que presentan una mayor similitud entre los obtenidos en las Unidades Ejecutoras y los obtenidos en los Laboratorios de Hortifrut S.A. Los resultados finales fueron establecidos con los criterios antes mencionados y se encuentran resumidos en el documento resumen descrito en el punto 28 del presente Informe

En cuanto a la divulgación de los resultados se puede agregar que resultados parciales de este proyecto fueron presentados el año pasado en el Quinto Congreso nacional de Biotecnología de Talca, en tanto que actualmente se encuentra en preparación un artículo en el cual se publicaran todos los resultados mencionados anteriormente en una revista científica.



## **E- IMPACTOS ECONÓMICOS**

El impacto económico de este proyecto es cuantioso si se considera que permite la identificación y micropropagación de plantas elite (de alto rendimiento económico), lo que eleva la cantidad y calidad de la producción. Además permite la comercialización de productos certificados. Esto significa un incremento en el valor agregado de nuestros productos, especialmente atendiendo a la tendencia de los principales mercados de destino para las exportaciones de berries, cuyos niveles de exigencia en cuanto al producto crecen sistemáticamente.

Técnicamente en la actualidad existen problemas en nuestro país para la correcta identificación de variedades de plantas económicamente importantes o simplemente verificar genuidad varietal. En términos generales, aún cuando existe el conocimiento científico, Chile no cuenta con ninguna instancia (nadie ofrece el servicio) que permita abordar esta problemática, debido a esto el sector hortofrutícola se encuentra desprovisto de la tecnología necesaria para verificar que efectivamente las especies que cultivan corresponden a la variedad deseada (por lo general variedades compradas en el extranjero) y de la tecnología necesaria para realizar programas propios de mejoramiento de sus recursos genéticos que les permitan mantener un buen nivel tecnológico con respecto a la competencia internacional.

Otro aspecto importante de considerar asociado al desarrollo de los Marcadores Moleculares, es la facilidad con que puede irradiar esta tecnología hacia otras especies frutales y hacia otros sectores de nuestra economía, como lo es por ejemplo el sector forestal, y en el futuro próximo será de gran ayuda frente a la eventual reconversión de la agricultura en vastos sectores de nuestro país, donde sistemáticamente se irán reemplazando cultivos de baja rentabilidad por cultivos tecnológicamente más desarrollados fuertemente competitivos en el contexto internacional.

Lo anterior es especialmente importante a la luz de las cada vez más exigentes condiciones del mercado especialmente en el marco de acuerdos internacionales tales como el MERCOSUR, Comunidad Económica Europea, Comunidad Asiática y próximamente al NAFTA, lo que no sólo necesariamente exigirá a las empresas del sector certificar sus productos sino que en general elevar considerablemente su nivel de competitividad.

(ANEXO N°1)

**RESUMEN DE ACTIVIDADES DESARROLLADAS  
PROYECTO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA**

**FECHA: 10 DE SEPTIEMBRE DE 1999**

**1.- ANTECEDENTES GENERALES**

**CÓDIGO PROYECTO : 97-1124**

**TÍTULO PROYECTO :  
IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD-Marker) PARA LA  
CERTIFICACIÓN VARIETAL DE BERRIES**

**EMPRESA : HORTIFRUT S.A.**

**INFORME DE AVANCE: INFORME FINAL**

**2.- CUADRO RESUMEN DE ACTIVIDADES**

**2.1. ACTIVIDADES PROGRAMADAS (según carta Gantt)**

- 26.- Adiestramiento del personal de la empresa**
- 27.- Correlación entre cada una de las variedades y los patrones de bandeo**
- 28.- Confección de documento resumen con los patrones característicos de cada variedad**
- 29.- Análisis general de resultados y publicaciones**

Dado que este informe equivale al **INFORME FINAL** del proyecto se incluye además un resumen del total de la actividades desarrolladas a la forma de carta Gantt

**2.2. ACTIVIDADES EFECTIVAMENTE DESARROLLADAS**

Durante la implementación del proyecto se desarrollaron todas las actividades programadas

(ANEXO N°3)

## IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

CÓDIGO DEL PROYECTO : 97-1124

TÍTULO DEL PROYECTO :

**IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD-Marker) PARA LA  
CERTIFICACIÓN VARIETAL DE BERRIES**

EMPRESA : HORTIFRUT S.A.

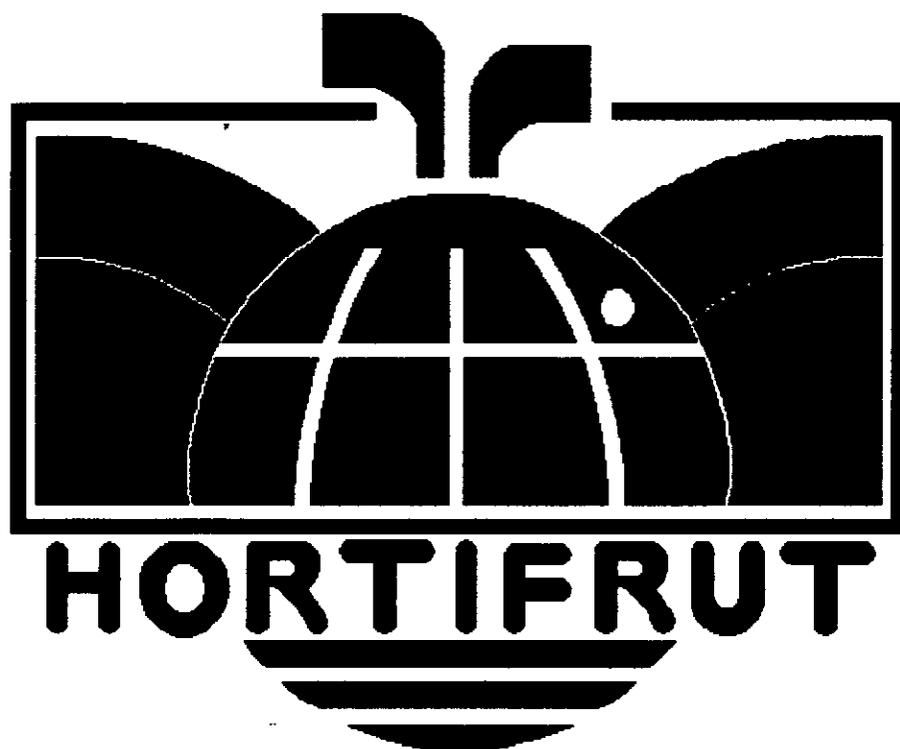
### IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto corresponden a la identificación, de 10 genomas (variedades) de Frambuesa y 5 genomas (variedades) de Arándano, mediante la utilización de marcadores moleculares. Estos procedimientos se encuentran ya implementados en el laboratorio de Hortifrut S.A. y actualmente la empresa ya los está utilizando en la verificación de la genuidad varietal de plantas en algunos huertos.

La empresa sistemáticamente ampliará sus bases de datos en relación con la caracterización de la totalidad de las variedades que dispone. Esto significa la caracterización varietal de Moras, Zarza parrillas, entre otros berries comercializados por la empresa.

Mediante la utilización de los procedimientos antes mencionados le empresa certificará la producción de plantas de berries independientemente si estas son utilizadas en sus propios huertos o si son suministradas a productores independientes. Actualmente Hortifrut S.A. es la única empresa nacional que puede resolver técnicamente problemas de genuidad varietal, lo que la hace la empresa proveedora de plantas de berries más confiable del mercado.

**INFORME FINAL**  
**ANEXO Nº 2 (PROYECTO DE INNOVACION TEGNOLOGICA)**  
**IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES**  
**(RAPD-MARKER) PARA LA CERTIFICACION VARIETAL DE**  
**BERRIES CODIGO DEL PROYECTO : 97 - 1124**



**Berries a todo el Mundo**  
**Todos los días**

INFORME FINAL

CODIGO DEL PROYECTO : 97 - 1124

TITULO DEL PROYECTO :

IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD-Marker)  
PARA LA CERTIFICACION VARIETAL DE BERRIES

---

ENTIDAD PATROCINADORA : HORTIFRUT S.A.

ENTIDAD EJECUTORA : UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

FECHA DE ENTREGA : 10 DE SEPTIEMBRE DE 1999

ANEXO N° 2

**CONTROL DE AVANCE FINANCIERO**  
(Proyectos de Innovación Tecnológica)

1.- DATOS GENERALES

Título del Proyecto	IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES	
CODIGO 97-1124	PARA LA CERTIFICACION VARIETAL DE BERRIES	
Total de Informes	4	
Informe a Revisar	4	

COSTO TOTAL (\$)	
(Al 10 de Septiembre de 1999)	15.830.000
-Personal de Investigación	2.100.000
-Personal de Apoyo	8.100.000
-Servicios, Mat. y Otros	1.110.000
-Uso de Bienes de Capital	4.520.000
-Adq. de Bienes de Capital	0

FONDOS A RENDIR (\$)	
	6.815.000
UNIV. DE SANTIAGO DE CHILE	6.815.000

TOTAL EGRESOS (\$)	
(Al 10 de Septiembre de 1999)	22.645.000
COSTO TOTAL	15.830.000
FDOS. ENTREGADOS	6.815.000

ANEXO N° 1 PERSONAL DE DIRECCION Y DE INVESTIGACION

PERSONAL DE INVESTIGACION	GASTOS \$
Responsable de Gestión: Sra. Marcela Zuñiga Lara periodo Marzo 99 a Agosto 1999 (6 meses) c/u M\$350.	2.100.000
TOTAL ACUMULADO	2.100.000

ANEXO N° 2 PERSONAL DE APOYO

PERSONAL DE INVESTIGACION	GASTOS \$
INGENIERO AGRONOMO : Sr. Guillermo Giachinno periodo Marzo 99-Agosto 99 (6 meses) M\$798.	4.788.000
ANALISTA: Sr. Exequiel Vergara Diaz periodo Marzo 99-Agosto 99 (6 meses) M\$222.	1.332.000
ANALISTA: Srta. Corina Rosales periodo Marzo 99-Agosto 99 (6 meses) M\$180.	1.080.000
ANALISTA: Sra. Lily Tombotti periodo Marzo 99-Agosto 99 (6 meses) M\$150	900.000
TOTAL ACUMULADO	8.100.000

ANEXO N° 3 SERVICIOS, MATERIALES Y OTROS

SERVICIOS, MATERIALES Y OTROS	GASTOS \$
<p>SERVICIO DE ADMINISTRACION Sra. Jorge Mesias ( Marzo 99 a Agosto 1999 6 meses )</p> <p>SERVICIO DE SECRETARIA Sra. Susana Porra ( Marzo 99 a Agosto 1999 6 meses )</p>	<p>900.000</p> <p>210.000</p>
TOTAL ACUMULADO	1.110.000

ANEXO N° 4 USO DE BIENES DE CAPITAL EXISTENTES

USO DE BIENES DE CAPITAL EXISTENTES	GASTOS \$
Uso de Invernadero y Vivero con Riego Periodo Marzo 99-Agosto 99 (6 meses)	1.200.000
Vehiculo de la Empresa ( 2 Viajes)	170.000
Uso de camara de Flujo Laminar	150.000
Uso sala de crecimiento ( 6 meses )	600.000
Uso de Laboratorio de la Empresa ( 6 meses )	1.800.000
Plantas de variedades Seleccionadas	600.000
<b>TOTAL ACUMULADO</b>	<b>4.520.000</b>

FONDOS ENTREGADOS (USACH)

FONDOS ENTREGADOS	GASTOS \$
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE  Cuarta cuota del Proyecto N° 97-1124	6.815.000
TOTAL ACUMULADO	6.815.000

DETALLE MENSUAL DE GASTOS DEL PROYECTO EN PESOS :  
 IMPLEMENTACION DE MARCADORES MOLECULARES  
 PARA LA CERTIFICACION VARIETAL DE BERRIES COD.: 97-1124  
 (Fecha de Rendición 10.09.1999)

PARTIDAS DE COSTO	ITEM	PPTTO. INICIAL	USACH	TOTAL HORTIFRUT			TOTAL ACUMULADO
				NETO	I.V.A.	TOTAL	
PERSONAL	1ER.INF	5.652.000	3.552.000	2.100.000		2.100.000	5.652.000
INVESTIGACION	2DO.INF	5.652.000	3.552.000	2.100.000		2.100.000	5.652.000
	3ER.INF	5.652.000	3.552.000	2.100.000		2.100.000	5.652.000
	4TO.INF	5.652.000	3.552.000	2.100.000		2.100.000	5.652.000
SUB TOTAL		22.608.000	14.208.000	8.400.000	0	8.400.000	22.608.000
PERSONAL DE APOYO	1ER.INF	7.800.000	0	7.550.000		7.550.000	7.550.000
	2DO.INF	7.800.000	0	7.477.777		7.477.777	7.477.777
	3ER.INF	7.800.000	0	8.100.000		8.100.000	8.100.000
	4TO.INF	7.800.000	0	8.100.000		8.100.000	8.100.000
SUB TOTAL		31.200.000	0	31.227.777	0	31.227.777	31.227.777
SERV. MAT. Y OTROS	1ER.INF	8.650.000	4.300.000	73.578	13.244	86.822	4.386.822
	2DO.INF	4.325.000	4.275.000	1.359.064	190.633	1.549.697	5.824.697
	3ER.INF	2.163.000	3.263.000	1.468.720	64.568	1.533.288	4.796.288
	4TO.INF	2.162.000	3.263.000	1.110.000		1.110.000	4.373.000
SUB TOTAL		17.300.000	15.101.000	4.011.362	268.445	4.279.807	19.380.807
USO DE BIENES DE CAPITAL	1ER.INF	4.363.000	0	4.420.000		4.420.000	4.420.000
	2DO.INF	4.363.000	0	4.520.000		4.520.000	4.520.000
	3ER.INF	4.362.000	0	4.005.000		4.005.000	4.005.000
	4TO.INF	4.362.000	0	4.520.000		4.520.000	4.520.000
SUB TOTAL		17.450.000	0	17.465.000	0	17.465.000	17.465.000
ADQ. DE BIENES DE CAPITAL	1ER.INF	10.600.000	7.000.000	1.259.789	226.762	1.486.551	8.486.551
	2DO.INF	0	0	2.102.451	378.441	2.480.892	2.480.892
	3ER.INF	0	0	108.574	19.543	128.117	128.117
	4TO.INF	0	0	0		0	0
SUB TOTAL		10.600.000	7.000.000	3.470.814	624.746	4.095.560	11.095.560
TOTAL		99.158.000	36.309.000	64.574.953	893.191	65.468.144	101.777.144

REPRESENTANTE LEGAL HORTIFRUT S.A.

COLEGIO DE CONTADORES  
 REG. N.º 10.000  
 CATEGORIA N.º 1  
 Carlos Durán Contreras

CONTADOR

2.3 Comentarios (USO EXCLUSIVO FONTEC)

La información que respalda la presente rendición se encuentra disponible en el Departamento de Contabilidad de la empresa para cualquier consulta o revisión por parte de FONTEC u otro organismo fiscalizador.

Declaro bajo juramento que los datos contenidos en esta Declaración de Gastos son verídicos. Asimismo, declaro conocer las disposiciones relativas a sanciones en caso de suministrar informaciones incompletas, falsas o erróneas.

Nombre y Firma Representante  
Legal

COLEGIO CONTADORES  
REG. N.º 1234  
JUAN CARLOS GONZALEZ  
Contador

Nombre y Firma Ejecutivo Proyectos

