

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Uso de elicitores como mecanismo de control sobre cáncer bacterial
causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en *Actinidia*
deliciosa.

PAULINA MARÍA SANHUEZA QUIJADA

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice

1. Definición del problema u oportunidad	1
2. Hipótesis	4
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos	4
4. Estado del arte.....	4
4.1. Caracterización de la planta del kiwi (Actinidia deliciosa).....	4
4.2. Situación e importancia del kiwi chileno a nivel mundial.....	5
4.3. Situación del kiwi en Chile	6
4.4. Cáncer Bacteriano del kiwi en Chile y el mundo.....	7
4.4.1. Agente causal	7
4.4.2. Factores predisponentes y factores de diseminación de la bacteriosis.....	7
4.4.3. Sintomatología asociada	8
4.4.4. Medidas de control.....	8
4.5. Elicitores Exógenos	9
4.5.1. Acibenzolar –S- Metil (ASM)	10
4.5.2. Fosfito de potasio.....	11
4.5.3. Quitosano	12
5. Metodología	12
5.1. Localización del estudio.....	12
5.2. Material vegetal.....	13
5.3. Obtención del inóculo	13
5.4. Aislamiento de la bacteria.....	14
5.5. Inoculación.....	14
5.6. Ensayo en campo	14
5.7. Obtención de muestras.....	16
5.8. Determinación de la actividad enzimática	17
5.9. Evaluación del desarrollo de la enfermedad.....	17
5.10. Diseño experimental, análisis estadístico y manejo de resultados	18
6. Bibliografía citada.....	20
7. Plan de trabajo.....	22
8. Resultados esperados	23
9. Organización de cargos y funciones.....	24

10. Presupuesto.....	25
11. Anexos	27
11.1. Anexo 1	27
11.2. Anexo 2	28
11.3. Anexo 3	29

Resumen

La enfermedad conocida como Cancro bacteriano del kiwi provocada por la bacteria *Pseudomonas syringae* patovar *actinidiae* (PSA) es causante de importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Hoy en día es uno de los factores limitantes al momento de establecer un huerto de kiwi en muchos países del mundo. Las estrategias de control adoptadas, que incluyen medidas preventivas como tratamientos químicos, no han tenido resultados resolutivos en la erradicación de la enfermedad. Actualmente existen enfoques innovadores que involucran el uso de inductores como activadores del sistema inmune de la planta. Estos productos aún se encuentran bajo evaluación. En el siguiente trabajo se evaluará el uso de inductores exógenos (elicitors) como herramienta de control contra el cáncer bacteriano en kiwi.

1. Definición del problema u oportunidad

Desde el año 2009 la industria mundial del kiwi (*Actinidia deliciosa*) se ha visto alarmada por una grave enfermedad conocida como Cancro bacteriano del kiwi provocada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*, señalada como PSA (Elorriaga et al., 2012). Gracias a los avances de la biología molecular, se ha podido conocer que la especie *Pseudomonas syringae* posee las razas o patovares *syringae* y el patovar *actinidiae*, siendo este último especialmente agresivo en el kiwi (Elorriaga et al., 2012). El Cancro bacteriano causado por PSA se reconoció por primera vez como un trastorno severo en Japón, a principios de la primavera de 1984, donde los síntomas aparecieron generalizados en troncos y ramas de huertos maduros de kiwi, con brotes recién emergentes durante la primavera y verano. La misma enfermedad también se describió en China durante 1984 y 1985, y pronto se extendió a otras regiones (Cameron et al., 2013). La enfermedad se informó posteriormente tanto en Italia como en Corea del Sur en 1994. Sin embargo, los huertos italianos no estuvieron altamente infectados hasta 2009 (Cameron et al., 2013). Siendo este último ataque epidémico el caso más virulento ocurrido en la historia mundial del cultivo (Elorriaga et al., 2012). Posteriormente al brote epidémico de Italia, esta bacteria fue detectada en Nueva Zelandia en noviembre de 2010 y el 21 de marzo de 2011 el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) publicó oficialmente que se había identificado su presencia en Chile, estableciéndose en agosto de 2011 el Programa de Control Oficial de la PSA en Chile (Elorriaga et al., 2012).

Como resultado de los brotes de PSA, muchos países con importantes industrias de cultivo de kiwi, como Nueva Zelandia, Italia, España, Portugal, Chile, Francia, Japón, China y Corea del Sur, sufrieron severas pérdidas económicas. Principalmente en Italia y Nueva Zelandia, donde las estrategias convencionales adoptadas no proporcionaron un control efectivo de la infección (Di Lallo et al., 2014). Además, se observó que el uso masivo de cobre y antibióticos puede promover resistencia (s) en el patógeno, un fenómeno bastante común en bacterias fitopatógenas; resistencia tanto a la estreptomycinina como al cobre. Hecho que ya se ha observado también para la PSA (Di Lallo et al., 2014). En Chile, la amenaza del patovar *actinidiae* ha concitado la preocupación de las autoridades fitosanitarias (i.e. SAG) y empresariales (i.e. Comité del Kiwi, Fedefruta y Asoex), creándose

la “Mesa del kiwi” como entidad de trabajo con representantes de estas instituciones junto a fitopatólogos y especialistas en el cultivo del kiwi, para desarrollar un esfuerzo mancomunado para la contención de esta enfermedad (Elorriaga *et al.*, 2012). Los huertos en que se ha identificado la PSA en Chile a la fecha, corresponden a las variedades Hayward, Summer, Jintao, Kiwi Kiss, además de machos polinizantes de las variedades Tomuri y Matua (Elorriaga *et al.*, 2012). Hasta el momento la zona de alto riesgo corresponde a la provincia de Linares, Región del Maule, principalmente por la asociación a la presencia mayoritaria de los casos positivos (Elorriaga *et al.*, 2012).

A la vez la situación comercial del kiwi chileno se ha visto profundamente afectada por el escenario internacional, producto de un exceso de oferta y una agresiva competencia. Bajo este mismo contexto, la industria nacional ha tenido una reacción rápida y unificada, generando estrategias de incremento para la mejora de la competitividad del kiwi chileno. Enfocado principalmente en obtener un producto uniforme y consistente en cuanto a calidad y condición, lo que permitirá ofrecer a los consumidores un kiwi que satisfaga las expectativas de los mercados internacionales y a los productores y exportadores ser parte de un rubro más competitivo y con proyección de futuro (Comité del kiwi, 2016).

Uno de los factores limitante en cuanto a la competitividad de la industria del kiwi ha sido la presencia de la PSA en Chile. Esta enfermedad ha disminuido la superficie plantada en el país, debido al arranque de plantaciones, incidiendo en una baja productividad y rentabilidad del cultivo (Comité del kiwi, 2016)

Las industrias de kiwis en todo el mundo están involucradas en estrategias de control de la enfermedad coordinadas a nivel mundial para contener la pandemia y minimizar las pérdidas económicas para los productores. Éstas incluyen prácticas estrictas de sanidad en huertos, variedades resistentes a la enfermedad, fumigación programada de compuestos bactericidas, uso de inductores que activan el sistema inmune de la planta y el uso de opciones de control biológico, así como métodos confiables de detección (Di Lallo *et al.*, 2014). A nivel país se hizo necesario adoptar un control preventivo integrado. Este control incluye distintas medidas para evitar la enfermedad. Dentro de las medidas a tomar se encuentra el empleo de inductores de defensas internas de la planta. El empleo de este tipo de productos en primavera, verano y otoño se ha documentado como efectivo para contribuir a la prevención de la bacteriosis (Elorriaga *et al.*, 2012).

Los elicitores cumplen un rol como activadores de reacciones defensivas, sustancias que provocan la síntesis y acumulación de fitoalexinas estimulando el mecanismo de defensa de la planta para protegerse. Se puede decir que la aplicación de un elicitore actúa en la planta con el mismo principio de la vacunación; se activa el metabolismo de la planta y se hace más resistente en posteriores ataques que generan estrés. El uso de elicitores ha crecido por los beneficios que se desencadenan al utilizarlos en los cultivos (Intagri, 2017). En relación a los productos identificados como elicitores o bioestimulantes exógenos, existe actualmente una gama importante en el mercado, por lo cual es muy relevante poder contar con ratificación de uso mediante validaciones locales, a través de ensayos confiables que permitan verificar su efectividad (Comité del kiwi, 2016). Ante esta realidad este trabajo pretende aportar sobre el entendimiento e implicancia del uso de elicitores exógenos como herramienta de control frente a la bacteriosis del kiwi.

2. Hipótesis

El uso de elicitores incrementa los mecanismos de defensa en la planta, disminuyendo la incidencia de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en kiwi (*Actinidia deliciosa*), bajo condiciones de campo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación foliar de elicitores, sobre la eficacia en el control preventivo de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en plantas de kiwi, bajo condiciones de campo.

3.2. Objetivos específicos

Medir el efecto de la aplicación foliar de ASM, quitosano y fosfito de potasio, empleado a distintas dosis, sobre los niveles de actividad enzimáticas involucradas en las rutas biosintéticas de las fitoalexinas.

Evaluar el efecto de la aplicación foliar de ASM, quitosano y fosfito de potasio, empleado a distintas dosis, sobre la eficacia en el control preventivo de PSA en kiwi.

4. Estado del arte

4.1. Caracterización de la planta del kiwi (*Actinidia deliciosa*)

Planta trepadora de hoja caduca originaria de China, donde se desarrolló espontáneamente en una angosta franja de cerros y montañas entre los ríos Yang-tse y Xi del sur de este país. Conocido como *yang-tao*, que significa “fruta del río Yang”. Las plantas silvestres habitan mayormente en franjas en laderas de 800 a 1.000 msnm, en sitios con relativa humedad, áreas sombrías, semi-sombrías y en claros, cerca de arroyos, bajo la copa y al borde de bosques compuesto de árboles tanto de hoja perenne como de hoja caduca. Preferentemente en suelos oscuros ricos en humus, relativamente arenosos, con buena humedad, evitando suelos secos y arcillosos pesados (Comité del kiwi, 2010). Es

una planta dioica, su sexo femenino y sexo masculino se presentan en plantas separadas. Las plantas masculinas producen flores estaminíferas con ovario atrofiado, por ende, no producen fruta, aportando sólo con el polen para la producción de fruta en la planta femenina. La planta femenina presenta flores pistilíferas, es hermafrodita pero sus estambres producen polen estéril (Comité del kiwi, 1989). Fructifica en inflorescencias cimosas que nacen en las primeras 8 yemas axilares del brote del año, el cual se desarrolló sobre madera del año anterior (Bascuñana, 1989).

4.2. Situación e importancia del kiwi chileno a nivel mundial

Según el informe World Kiwifruit Review 2016, los principales productores mundiales son: China con más de 1,2 millones de toneladas anuales, seguido muy de lejos por Italia (484 mil toneladas) y Nueva Zelanda (404 mil toneladas). Chile, por su parte, se ubica en el cuarto lugar del ranking con cerca de 190 mil toneladas, sobrepasando a Grecia, con 160 mil toneladas, que ha venido creciendo a pasos agigantados en los últimos años (Cruzat, 2017). Es importante considerar que China es un gran productor, pero que hasta ahora no participa de las exportaciones mundiales, su mercado es local, sin embargo, en las últimas décadas las plantaciones de kiwi han crecido notablemente en su país, superando en demasía a Italia (Cruzat, 2014).

En el caso de las exportaciones, según el último informe del World Kiwifruit Review 2016, indica que Nueva Zelanda sigue siendo el mayor exportador de kiwi del mundo con 453 mil toneladas al 2015, seguido de Italia con 323 mil toneladas y Chile 181 mil toneladas al 2015, ubicando a Chile como tercer país exportador de kiwi a nivel mundial, seguido de Grecia con 105 mil toneladas al 2015 (Cruzat, 2017). La producción mundial de kiwis se transa en un alto porcentaje en los mercados internacionales, ya que los tres principales países productores (Italia, Nueva Zelanda y Chile) dedican la mayor parte de su producción a los mercados externos y son a la vez los principales exportadores a nivel mundial (Odepa, 2013). Las importaciones mundiales de kiwis están concentradas en los países del hemisferio norte, liderados por los países europeos, Lejano oriente, la Federación Rusa, y Estados Unidos. Recientemente también está cobrando importancia China. (Odepa, 2013)

4.3. Situación del kiwi en Chile

El kiwi fue una novedad frutícola a nivel mundial a partir del siglo XX, divulgándose su cultivo desde Nueva Zelanda a países del hemisferio norte como Italia, Francia, U.S.A entre otros. A nuestro país ingresa como planta en 1976, estableciéndose como cultivo ya en 1978. Logrando en estas tres décadas una adecuación progresiva, zonificándose consecuentemente con sus exigencias de suelo y clima.

En los años 80 Chile experimentó el boom del kiwi; a finales de los años 90 con la sobre oferta mundial de kiwi, Chile y el mundo apreció una de las crisis frutícolas más duras registradas en la historia. Arrancando casi un tercio de las 12 mil hectáreas que se encontraban en nuestro país (Comité del kiwi, 2010).

Actualmente, específicamente en los últimos 5 años la tendencia es a la baja, esta tendencia se ha mantenido. Cada año son más los productores que, debido a diversas razones, deciden abandonar el rubro para entrar a otros negocios. Esto queda demostrado en las cifras. Así, por ejemplo, en los últimos cinco años las exportaciones de esta especie han caído en cerca de 40.000 toneladas, llegando en la actualidad a alrededor de 180.000 (Odepa, 2016). Algo similar ha ocurrido con la superficie plantada, la que se estima ha disminuido en alrededor de 2.000 hectáreas en pocos años, llegando por estos días a cerca de 9.000 (Odepa, 2016). Las superficies arrancadas, corresponden a huertos viejos de más de 20 años con problemas de productividad y calidad de la fruta obtenida (Cruzat, 2016). La industria chilena del kiwi se encuentra en un momento complejo asociado al aumento de producción mundial, a los altos costos de producción incluidos los manejos sanitarios de PSA, a la necesidad de renovar huertos viejos, a la baja rentabilidad, a la competencia de mano de obra por otros cultivos, a la competencia por otras especies de mayor rentabilidad, todo lo cual genera un escenario de incertidumbre respecto del futuro de la especie, de la inversión en nuevas variedades o en la renovación de huertos. El mercado global está recibiendo más volúmenes, con más oferta de kiwi amarillo y rojo y con buenas calidades, lo que hace más exigente la competencia. Además, a nivel de huerto es necesario disponer de una mayor productividad por hectárea, con una especial preocupación en la calidad de la fruta. La competitividad de la industria del kiwi presenta una traba ante la presencia de la PSA en Chile. Exigencia de mayor rentabilidad al huerto para poder pagar un programa

contra la bacteriosis pudiendo aumentar entre un 10 y 20% el costo de producción producto de la enfermedad (Comité del kiwi, 2016)

4.4. Cáncer Bacteriano del kiwi en Chile y el mundo

4.4.1. Agente causal

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) es una bacteria gram negativa responsable del cancro bacteriano del kiwi (*Actinidia deliciosa* y *A. chinensis*) se aisló por primera vez en Japón en 1984 (Takikawa *et al.*, 1989), y poco después en Corea (Koh *et al.*, 1994) e Italia (Scortichini, 1994). El impacto económico sobre la producción mundial de kiwi de esas primeras ocurrencias fue relativamente limitado (Vanneste *et al.*, 2011). Sin embargo, el brote de PSA que comenzó en Italia en 2008, se extendió rápidamente por la mayoría de las regiones productoras de kiwis del mundo, representa una gran amenaza para la industria mundial del kiwi (Vanneste, 2012). Durante los 2 años que el patógeno estuvo presente en Nueva Zelandia, más del 60% del área plantada en kiwi se vió afectada (Kiwifruit Vine Health, 2012). Esta rápida diseminación puede ser atribuible a la virulencia del biovar 3 y a la escasez de productos disponibles para el control de bacterias patógenas de plantas en general, y de PSA en particular.

Según cifras de la FAO (2012), la producción mundial de kiwis registró una tasa anual de crecimiento de 7,9% hasta el año 2008, para luego caer drásticamente entre los años 2009 y 2012, lo que coincide con la aparición del virus PSA en el año 2008, virus que ha afectado a las plantaciones de los principales países productores y exportadores de kiwis.

La bacteria fue detectada en Chile el año 2011 en la zona de Linares, VII Región del Maule, provincia más afectada. Actualmente según el resumen nacional de avance de prospección de la enfermedad del SAG (2017), existe un total de 240 huertos positivos lo que equivale a 2.478 hectáreas acumuladas a la fecha.

4.4.2. Factores predisponentes y factores de diseminación de la bacteriosis

- ❖ Edad de la planta: Las plantaciones jóvenes de 1 a 6 años presentan mayor susceptibilidad a la enfermedad al ostentar mayor proporción de tejido succulento, también es posible ver en huertos adultos (Comité del kiwi, 2014)

- ❖ Suelo: Una mala condición de suelo para la planta la que condiciona un estrés para ella, tales como suelos arcillosos, con mal drenaje u alta pedregosidad (Comité del kiwi, 2014).
- ❖ Nutrición: Plantas con mayor concentración de nitrógeno, particularmente nitrógeno amoniacal, como consecuencia de fertilizaciones nitrogenadas exageradas o empleo de guano fresco y sin compostar (Comité del kiwi, 2014).
- ❖ Clima: La bacteria requiere primaveras con alta humedad (lluvia, neblinas, lloviznas) y temperatura cercana a los 20°C para su diseminación y multiplicación. El rango óptimo para el desarrollo de síntomas es entre 15 °C a 25 °C. La infección es favorecida temperaturas entre -0.5 °C y -2 °C, viento, granizo u otro factor que genere heridas (Sepúlveda, 2014)

La diseminación natural de la bacteria se produce por el viento y la lluvia los cuales son capaces de transmitir la bacteriosis a grandes distancias. Otros factores son: Plantas y/o material de propagación, herramientas de trabajo, desecho de material enfermo, zapatos, ropa de trabajo, maquinaria y vehículos y polen (SAG, 2013).

4.4.3. Sintomatología asociada

En ramas y troncos al principio de la primavera aparece abundante exudado de color anaranjado oxidado asociados a los canchales y heridas que se forma en las ramas o en el tronco de las plantas infectadas. En botones y flores se produce un marchitamiento o atizamiento de las flores con la consecuencia de pérdida del fruto. En las hojas, durante el verano es posible visualizar manchas necróticas de color marrón oscuro con un halo clorótico de color amarillo. En el caso de los frutos ocurre un colapso debido a la muerte de las ramas afectadas (SAG, 2013)

4.4.4. Medidas de control

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) se considera uno de los patógenos globales más devastadores del kiwi (*Actinidia* spp.) (Vanneste 2012) y como la mayoría de los patógenos bacterianos, las opciones de control efectivas para la PSA son limitadas, y los pilares del control son actualmente los productos que contienen antibióticos (principalmente estreptomycin) o metales pesados (principalmente cobre) (Reglinski *et al*, 2013). Las desventajas del uso de estos productos incluyen fitotoxicidad o por el hecho de

que no está autorizado su uso en algunos países (e.g. antibióticos en Europa), acumulación de metales pesados en el suelo y desarrollo de resistencia. En lo que respecta a Chile se ha realizado investigaciones para reducir la cantidad de cobre utilizada por hectárea para el control de la bacteria, de tal manera de no contaminar suelos y no generar una carga de cobre que interactúe sobre el ecosistema, aplicando menos dosis para evitar la fitotoxicidad que se produce con las aplicaciones y dosis elevadas y no dañar la planta (Comité del kiwi, 2017). Esto ha llevado en el contexto mundial a un programa específicamente de Nueva Zelanda para incluir medidas de control a largo plazo y más sostenibles que incluyan educación frente a la resistencia, el desarrollo control biológicos eficaces y el uso de elicitors en programas de control integrado para inducir temporalmente las defensas del huésped (Wurms *et al.*, 2017). Existe actualmente una serie de elicitors potenciales de resistencia del huésped disponibles en el mercado. Uno de los elicitors más efectivos en ensayos de invernadero en *A. chinensis* y *A. deliciosa* es acibenzolar-S-metil [ASM], vendido bajo los nombres de Bion® o Actigard® (Syngenta) producto nuevo en nuestro país y que está bajo evaluación.

4.5. Elicitors Exógenos

Las plantas desarrollan frente a los organismos patógenos mecanismos de defensas muy complejos y variados. Estos mecanismos pueden ser constitutivos o inducibles. Los inducibles se pueden activar sistémicamente en células y tejidos alejados, adquiriendo la inmunidad fisiológica de la planta. En este sentido, el resultado es la inducción conocida como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y con ello, de un conjunto de proteínas y compuestos de defensa que incluyen enzimas involucradas en la vía de síntesis de los fenilpropanoides, Fenilalanina amonio liasa (PAL); Peroxidasas (PO), glicoproteínas, relacionadas con el reforzamiento de la pared celular, glucanasas y quitinasas que hidrolizan las paredes celulares de los hongos.

La idea de acelerar la respuesta de la planta mediante la aplicación de inductores de resistencia sistémica resulta atractiva y se presenta como una alternativa biológica, ambiental y comercialmente viable frente a la creciente necesidad de disminuir el uso de plaguicidas químicos en el control de agentes causantes de plagas. Por lo tanto, la demanda

social de elicitors de respuestas de defensa de las plantas y compatibles con el medio ambiente, es cada vez mayor.

En síntesis, los elicitors se definen como una molécula química que puede estimular mecanismos de defensa asociados con la respuesta de defensa de las plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas de plantas u otros organismos, así como a partir de preparados biológicos de origen vegetal o análogos producidos sintéticamente (Lyon y Newton 2000).

Al igual que la mayoría de los patógenos bacterianos, las opciones de control son limitadas, pero los elicitors pueden reducir la enfermedad significativamente, particularmente aquellos que inducen la vía del ácido salicílico (SA). Acibenzolar-S-methyl (ASM), un análogo de SA, es uno de los elicitors más efectivos para el control de PSA. En un estudio realizado en Nueva Zelanda, la aplicación de ASM condujo a la regulación positiva de la fenilalanina amoniaco liasa (PAL), una proteína de respuesta inducida por hipersensibilidad. La expresión génica elevada se correlacionó con la disminución de la expresión de la enfermedad, apoyando la hipótesis de que las plantas tratadas con inductores están preparadas para reaccionar más rápidamente y / o fuertemente a los patógenos (Wurm *et al.*, 2017)

4.5.1. Acibenzolar –S- Metil (ASM)

ASM pertenece al grupo químico benzotiadiazol y funciona como un análogo funcional del ácido salicílico. Ha demostrado una buena eficacia contra enfermedades bacterianas, incluida la mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*) y la mancha bacteriana (*P. syringae* pv. *Tomato*) en tomate (Louws *et al.*, 2001), la niebla del peral y del manzano (*Erwinia amylovora*) en manzanas (Bastas y Maden, 2007), pera (Spinelli *et al.*, 2006) y membrillo (Bastas y Maden, 2007) y tizón foliar de *xanthomonas* (*X. axonopodis* pv. *Allii*) en cebollas (Gent y Schwartz, 2005). Sin embargo, aunque los elicitors pueden ser muy efectivos en condiciones controladas, la respuesta del huésped puede ser muy variable en el campo, lo que genera dudas sobre su potencial para el manejo de la enfermedad. Los factores genéticos y ambientales de la planta pueden afectar los

beneficios y costos relativos de la resistencia inducida (Cipollini y Heil, 2010; Walters et al., 2011) y es necesario comprender mejor estas interacciones dinámicas para facilitar un uso más eficaz de los elicitores para el control de la enfermedad.

El uso exitoso de elicitores requiere un conocimiento profundo de los mecanismos y genes implicados en el modo de acción porque la eficacia en condiciones de campo puede variar con el cultivar, el tiempo y la frecuencia de aplicación y la fenología del cultivo (Walters *et al.*, 2011) A pesar de la importancia del control de ASM para PSA en kiwi, hay poca información publicada sobre su modo de acción molecular, con solo un estudio publicado hasta la fecha que examina las respuestas inducidas por ASM de cinco genes de defensa de kiwi (Cellini *et al.*, 2014).

4.5.2. Fosfito de potasio

Los fosfitos son compuestos resultantes de la reacción del ácido fosforoso con iones de metales alcalinos como el K, Ca, Mg y Na, considerados como fuente importante de nutrimentos para los cultivos. Los fosfitos de potasio se caracterizan por ser más solubles en agua y móviles en la planta, tanto en sentido ascendente como descendente, que los fosfatos (PO₄). Se obtiene a partir de fosfato de origen mineral (Monsalve *et al.*, 2012)

Conociendo estas ventajas Thizy *et al.*, 1997, al evaluar el ácido fosforoso y los fosfitos como una fuente de fósforo en cítricos, descubrieron la eficiencia del fosfito de potasio en el control de *Phytophthora palmivora*, agente causal de la gomosis de los cítricos. También otro estudio del fosfito de potasio es usado como fungicida para el control de pseudohongos de la clase Oomycetes. A partir de entonces, diferentes trabajos han confirmado la eficiencia del fosfito de potasio en el control de esta clase de fitopatógenos en diferentes cultivos (Monsalve *et al.*, 2012)

Demostrando su poder como potenciador de la activación del sistema inmunológico de la planta y bioestimula el crecimiento de ésta y tiene un gran efecto sistémico en la planta, corriendo por el torrente floemático casi en forma inmediata. Pudiendo inducir las mismas respuestas que los elicitores bióticos (Pieterse *et al.*, 2009)

4.5.3. Quitosano

Es un polisacárido obtenido a partir de la quitina extraída del exoesqueleto de los crustáceos. Es capaz de estimular e inducir reacciones de defensa en algunas plantas, sensibilizándolas para responder más rápidamente al ataque de patógenos (Corsi *et al*, 2016).

Entre las sustancias cuya inducción se ve favorecida por la presencia de quitina y/o quitosano, así como también muchos de sus derivados, se incluyen las fitoalexinas: pisantina, risitina, orchinol, genistein, etc; proteínas relacionadas a la patogénesis; Ligninas (Lárez, 2008); la lignificación en hojas dañadas (Pearce y Ride, 1982) o intactas (Moerschbacher *et al.*, 1986); generación de peróxido de hidrógeno (Lee *et al.*, 1999).

Otros estudios más recientes con quitosano en plantas de kiwi inoculadas con PSA dejaron al descubierto un aumento significativo en el nivel de expresión de las proteínas PR (proteínas antimicrobianas, relacionadas con la señalización de defensa) (Corsi *et al*, 2016).

5. Metodología

5.1. Localización del estudio

El estudio se realizará en el Fundo La Pitra, huerto de kiwi positivo a la enfermedad ubicado en Longaví, provincia de Linares, Región del Maule. Huerto ubicado en el área reglamentada de PSA por el SAG, considerando el status cuarentenario de la plaga.

Se solicitará al SAG autorización para obtener, almacenar, manipular y multiplicar aislados de PSA y de las muestras vegetales infectados con ésta, mediante la resolución exenta de la División de Protección Agrícola y Forestal del SAG. La entidad pertinente procederá a realizar una previa evaluación y verificación de las condiciones de bioseguridad que ofrezca el recinto a usar, de manera que se minimice la posibilidad de dispersión. Medidas que serán tomadas para esta investigación.

5.2. Material vegetal

Se trabajará con plantas de kiwi de la variedad Hayward de 10 años de edad, tratada con manejos agronómicos homogéneos, distribuidas a un marco de plantación de 4,5 x 2,5 m.

Las muestras a evaluar o cualquier otro tipo de residuo generado en el desarrollo de los ensayos serán tratados de la siguiente forma:

- a. Restos vegetales se pondrán en bolsas de alta densidad y deberán incinerarse.
- b. Placas Petri, puntas, contra muestras o cualquier otro elemento, incluso suelo o sustrato, que pudiera tener contaminación bacteriana, serán esterilizados.
- c. Se llevará un registro del material eliminado, considerando tipo de material, cantidad y fecha de eliminación (SAG, 2016)

5.3. Obtención del inóculo

El inóculo se obtendrá de cepas de PSA obtenidas desde el campo. Se realizará una selección de plantas enfermas con sintomatología asociada para la toma de muestras de material infectado. La toma de muestras consistirá en ramas con zonas de avance de ataque bacteriano, con exudación rojiza en madera y/o presencia de canchales, ramas entre

40 a 60 cm tomados de dos sectores distintos de la planta, desde el extremo apical de cada rama. Se procederá a reservar en bolsas plásticas para llevar hasta laboratorio, para su posterior análisis.

5.4. Aislamiento de la bacteria

Una vez obtenido la muestra infectada con el inóculo del campo. Se recibe y esteriliza el material infectado, obteniendo la muestra a partir de la zona de avance de la rama. Sembrando por agotamiento de estrías en un medio selectivo MBK en una placa Petri. Esta placa es llevada bajo luz ultravioleta donde se seleccionan las colonias fluorescentes, sembrando las colonias aisladas, purificando así la bacteria. La identificación de esta se realizará a través de técnicas moleculares (PCR). Y finalmente se procederá a multiplicar la bacteria ya identificada como PSA, para preparar el inóculo que será utilizado en campo.

5.5. Inoculación

Se utilizará una suspensión de PSA de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. Se realizará una herida cortando una hoja completamente desarrollada con una tijera embebida en la solución bacteriana.

5.6. Ensayo en campo

Se evaluarán tres distintas dosis para cada tipo de elicitor (Cuadro 1). Los elicitores a utilizar serán Acibenzolar-S-metilo (ASM), comercializado como Bion® de Syngenta®, fosfito de potasio (Fosfight 40-20®), y quitosano (Biorend®). La forma de aplicar será foliar a través de una bomba espalada con capacidad de 15 litros de capacidad, en primavera a mediados de septiembre, momento en que el follaje se encuentra activo y las hojas extendidas. Las plantas tratadas con agua se usarán como testigo. Además, se incluirán plantas no inoculadas a modo comparativo. Es decir, existirán dos testigos: inoculado (Testigo inoculado) y no inoculado (Testigo absoluto), ambos tratados solo con agua.

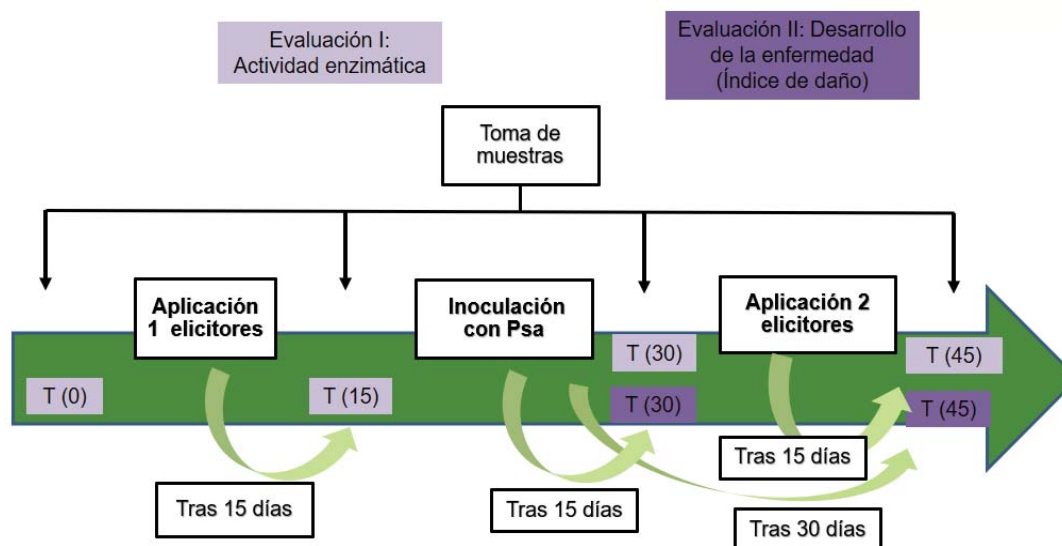
Cuadro 1: Tratamientos y dosis aplicación foliar de elicitores

	Tratamientos	Inoculación	Elicitor	Dosis
T. absoluto	T00	No	No (Sólo agua)	0,1 L
T. inoculado	T0	Si	No (Sólo agua)	0,1 L
Elicitor 1	T1	Si	ASM	0,1 g/L
	T2	Si	ASM	0,2 g/L
	T3	Si	ASM	0,4 g/L
	T4	Si	ASM	0,8 g/L
Elicitor 2	T5	Si	Quitosano	10 ml/L
	T6	Si	Quitosano	20 ml/L
	T7	Si	Quitosano	40 ml/L
	T8	Si	Quitosano	80 ml/L
Elicitor 3	T9	Si	Fosfito de potasio	1,25 ml/L
	T10	Si	Fosfito de potasio	2,5 ml/L
	T11	Si	Fosfito de potasio	5 ml/L
	T12	Si	Fosfito de potasio	10 ml/L

Fuente: Elaboración propia, 2018

La aplicación de los tratamientos se realizará previo a la inoculación con PSA (aplicación 1) y posterior a ésta (aplicación 2), como se muestra en el Cuadro 2, teniendo un intervalo de 45 días entre cada aplicación.

Cuadro 2: Aplicación de los tratamientos



Muestra: 10 hojas/planta

Fuente: Elaboración propia, 2018

5.7. Obtención de muestras

Se deberá identificar claramente a que tratamiento corresponde cada árbol. De éstos se tomarán muestras de 10 hojas por planta para cada uno de los tratamientos los cuales serán obtenidas en campo en distintos momentos, para distintas evaluaciones (Cuadro 2).

Para la evaluación de la actividad enzimática de la planta, se tomarán las muestras en los tiempos:

T0 → Sin aplicación

T15 → Posterior a la aplicación 1

T30 → Posterior inoculación con PSA

T45 → Posterior a la aplicación 2

Para la evaluación del desarrollo de la enfermedad, medido como índice de daño (ID), se tomarán las muestras en los tiempos:

T30 → Posterior inoculación con PSA

T45 → Post inoculación con PSA y aplicación 1 + aplicación 2

5.8. Determinación de la actividad enzimática

La primera evaluación se determinará la actividad enzimática de la planta a través de espectrofotometría realizando las lecturas de la absorbancia a 595 nm. Las muestras foliares serán procesadas para la extracción de enzimas, analizadas en Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB. La cual medirá la actividad de enzimas: Fenilalanina aminio liasa (PAL), Quitinasas, Peroxidasa (PO) y Polifenol oxidasa (PPO). Los resultados serán medidos en Unidades de Act. Enzimática / concentración de proteína (mg/mL) = U de enzimas/mg proteína. Método descrito por Bradford (1976); Protocolo en base a Fernández *et al.* y Solórzano *et al.* (2008).

5.9. Evaluación del desarrollo de la enfermedad

A través de una escala de daño se considerará la condición de cada muestra foliar de una escala de 0 a 5, en donde 0 es la hoja en estado sano, y 5 estado de mayor severidad de daño, hoja totalmente afectada (marchitamiento) (Ver Cuadro 3).

Cuadro 3: Escala de daño

Valor	Estado	Porcentaje (%)	Síntomas superficie de la hoja
0	Sana	0	Sin síntomas
1	Incipiente	> 10	Manchas necróticas
2	Leve	> 10 - 25	Lesiones necróticas
3	Moderado	25 - 50	Las lesiones necróticas manchas en la superficie de la hoja
4	Severo	> 50	Lesiones necróticas repartidas
5	Muy severo	> 80	Totalmente afectada (Marchitamiento)

Fuente: Elaboración propia, 2018

Los síntomas serán evaluados usando el Índice de daño (ID) correspondiente al porcentaje de área foliar afectada por manchas necróticas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{\sum (n \times v)}{N \times V} \times 100$$

n: Número de hojas por grado

v: Grado de severidad (0,1,2,3,4)

N: Rango máximo de la escala

V: Número total de hojas

5.10. Diseño experimental, análisis estadístico y manejo de resultados

Se utilizará un diseño estadístico por bloques con tratamientos completamente al azar, donde los tratamientos son los distintos tipos elicitor (ASM, quitosano y fosfito de potasio) empleado a diferentes dosis c/u. El factor será el tipo de elicitor, la unidad experimental la planta de kiwi, la unidad de análisis serán las muestras foliares, la variable respuesta será la actividad enzimática y el índice de daño.

Los bloques corresponderán a las 4 hileras que se les aplicará los elicitores en las diferentes concentraciones y conteniendo cada una los 14 tratamientos, estas hileras se separarán por una hilera buffer. Se sortearán al azar que árbol corresponde a cada tratamiento, los cuales estarán separados por 3 plantas buffer dentro de la hilera (Figura 1)

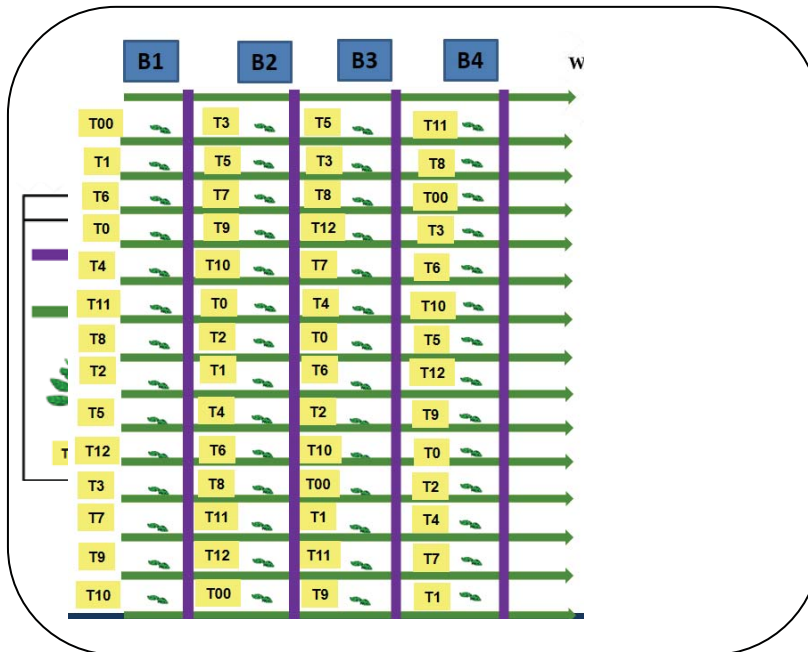


Figura 1: Diseño físico del experimento

Los datos serán analizados mediante una prueba de varianza ANDEVA, para la evaluación de índice de daño se realizará una prueba de Krukal-Wallis, y test de separación de medias de Tukey para la determinación de la actividad enzimática, ambos a una confianza de 95% ($\alpha= 0,05$).

Los datos obtenidos y posteriormente procesados serán expuestos en un informe final, en donde se detallará cada detalle del desarrollo del proyecto.

6. Bibliografía citada

- Agrios G. 2005. Plant Pathology 5th edition Oxford: Academic, Press, 2005, 948p.
- Alghisi, P., and Favaron, F. 1995. Pectin-degrading enzymes and plant parasite interaction. European Journal Plant Pathology N°101: 365-375.
- Álvarez, M., Andrade, O., Besoain, X., Latorre B., Lolas, M., Morales, A., Parodi, P., Philippi, I., Rustom, A. 1989. Fungicidas y Nematicidas, avances y aplicabilidad. 216p. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Angarita AS. R. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Revista Manejo Integrado de Plagas 6: 4-11.
- Annis, S. L., Goodwin, P.H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. European Journal Plant Pathology N° 103: 1-14.
- Apablaza G. 1999. Patología de Cultivos Epidemiología y Control Holístico. Ediciones Universidad Católica de Chile. pp. 155-157
- Cameron, A. y V, Sarojini. 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*: chemical control resistance mechanisms and posible alternatives. Journal Plant pathology. N°1 (63): 1-11. Auckland, New Zealand.
- Comité del kiwi. 2012. Manual de prevención y contención de bacteriosis para el kiwi chileno. 17p. Comité del kiwi. Federación de Productores de fruta de Chile. Asociación de exportadores de Chile. Santiago, Chile.
- Comité del kiwi. 2016. Industria del kiwi requiere de una nueva estrategia para enfrentar complejo escenario mundial. Disponible en <http://comitedelkiwi.cl/noticias/610-industria-del-kiwi-requiere-de-una-nueva-estrategia-para-enfrentar-complejo-escenario-mundial.html>. Leído el 14 de octubre del 2017.
- Comité del kiwi. 2016. Resumen de la Temporada Kiwi Chileno. 34 p. Federación de Productores de fruta de Chile. Asociación de Exportadores de Chile. Disponible en http://www.comitedelkiwi.cl/images/stories/kiwireport/2016/KiwiReport_final_temporada_2016.pdf. Leído el 13 de octubre de 2017.
- Di Lallo, G., M, Evangelisti., F, Mancuso., P, Ferrante., S, Marcelletti., A, Tinari., F, Superti., L, Migliore., P, D'Addabbo., D, Frezza., M, scortichini. Y M.C, Thaller. 2014. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. Journal of Basic Microbiology. N° 54: 1-12. Roma, Italia.
- De Torres-Zabala M.T., Bennett M.H., Truman W.H., Grant M.R. (2009) Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host–pathogen conflict and moulds plant defence responses. Plant Journal, 59, 375–386.

Ferrante P., Scortichini M. (2010) Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology*, 59, 954–962.

INTAGRI. 2017. La inducción de defensa en las plantas a través de elicitores. *Seria fitosanidad* n° 92, 6 p. Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura. México.

Reuck, E. 2010. Análisis de la competitividad de Chile en la exportación de kiwi fresco. 116p. tesis de ingeniero civil industrial. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Portalfrutícola, 2016. Chile: Claves del explosivo aumento de la superficie de frutales en Ñuble. Disponible en <https://www.portalfruticola.com/noticias/2016/07/29/chile-claves-del-explosivo-aumento-de-la-superficie-de-frutales-en-nuble/>. Leído el 14 de octubre del 2017

Vanneste J.L. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa): a threat to the New Zealand and global kiwifruit industry. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40, 265–267.

7. Plan de trabajo

tarea	Nombre de tarea	Duración	Comienzo	Fin	f. recurs
	▲ Uso de elicitors como control preventivo contra PSA	491 días	lun 01-07-19	lun 17-05-21	
	▲ Año 1	293 días	lun 01-07-19	mié 12-08-20	
	Compra de insumos	5 días	lun 01-07-19	vie 05-07-19	
	Implementación del diseño experimental	2 días	lun 08-07-19	mar 09-07-19	
	Muestreo pre tratamiento y diagnóstico general	2 días	mié 03-07-19	jue 04-07-19	
	▶ Obtención del material vegetal infectado (I)	2 días	mié 10-07-19	jue 11-07-19	4
	▲ Aislamiento de la bacteria	42 días	vie 12-07-19	lun 09-09-19	6
	Aislamiento del inóculo	10 días	vie 12-07-19	jue 25-07-19	
	Purificación y multiplicación del inóculo	10 días	vie 26-07-19	jue 08-08-19	9
	Identificación molecular por técnica PCR	5 días	vie 09-08-19	jue 15-08-19	10
	Conservación de inóculo	17 días	vie 16-08-19	lun 09-09-19	11
	▲ Ensayo en campo (I)	190 días	jue 18-07-19	jue 09-04-20	8
	▲ Aplicación de elicitors (I)	39 días	lun 09-09-19	jue 31-10-19	
	Comienzo de tratamientos con elicitors	21 días	lun 09-09-19	lun 07-10-19	8
	▶ Análisis de la actividad enzimática (I)	120 días	jue 18-07-19	jue 02-01-20	15
	Inoculación de plantas en campo	120 días	mié 25-09-19	mar 10-03-20	
	▲ Evaluación de desarrollo de la enfermedad(I)	90 días	vie 25-10-19	jue 27-02-20	19
	Determinación índice de daño	120 días	vie 25-10-19	jue 09-04-20	
22	▲ Análisis de datos (I)	205 días	jue 31-10-19	mié 12-08-20	13
23	▲ Año 2	221 días	lun 13-07-20	lun 17-05-21	
24	▶ Obtención del material vegetal infectado (II)	2 días	lun 13-07-20	mar 14-07-20	
26	▲ Aislamiento de la bacteria	42 días	mié 15-07-20	jue 10-09-20	24
27	Aislamiento del inóculo	10 días	mié 15-07-20	mar 28-07-20	
28	Purificación y multiplicación del inóculo	10 días	mié 29-07-20	mar 11-08-20	27
29	Identificación molecular por técnica PCR	5 días	mié 12-08-20	mar 18-08-20	28
30	Conservación de inóculo	17 días	mié 19-08-20	jue 10-09-20	29
31	▲ Ensayo en campo (II)	158 días	mié 09-09-20	vie 16-04-21	26
32	▶ Aplicación de elicitors (I)	44 días	mié 09-09-20	lun 09-11-20	
37	Inoculación de plantas en campo	120 días	mié 30-09-20	mar 16-03-21	
38	▲ Evaluación de desarrollo de la enfermedad(II)	90 días	vie 30-10-20	jue 04-03-21	37
39	Determinación índice de daño	120 días	lun 02-11-20	vie 16-04-21	
40	Análisis de datos (II)	21 días	lun 19-04-21	lun 17-05-21	31
41	Informe Final	30 días	mié 09-12-20	mar 19-01-21	40

8. Resultados esperados

El presente trabajo pretende conseguir como resultado general obtener que, la aplicación exógena de ASM, Quitosano y Fosfito de potasio, disminuya de manera efectiva el desarrollo de cancro bacteriano del kiwi, actuando como activadores de la respuesta de defensa de la planta, al incrementar los niveles de PO, PPO, PAL y quitinasas en las plantas tratadas, en comparación con las plantas sin tratar.

También, y de acuerdo con sus objetivos específicos se pretende conseguir dos resultados esenciales:

Objetivo asociado	específico	Resultados esperados
Objetivo 1:		Cuantificación del efecto de los distintos elicitores y respectivas dosis, en los niveles de actividad enzimáticas involucrados en los mecanismos de defensa de la planta.
Objetivo 2:		La eficacia de los distintos elicitores según distintas dosis en la disminución del desarrollo del cancro bacteriano en plantas de <i>A. deliciosa</i>

La suma de los resultados esperados pretende consolidar el entendimiento de las reacciones hipersensibles y como estas pueden ser utilizadas como una alternativa amigable para el control de enfermedades, por medio de la estimulación de la fisiología del árbol. Resultando en un beneficio tanto para el productor desde el punto de vista técnico y económico.

Generando ratificación del uso de productos identificados como elicitores, mediante validaciones locales, a través de ensayos confiables que permitan verificar su efectividad como prácticas que potencian la naturaleza del árbol y no deriven en prácticas inciertas.

9. Organización de cargos y funciones

- Director del proyecto - Asesor

Grado académico: Ingeniero Agrónomo

El profesional a cargo estará encargado de dirigir, analizar, guiar y contribuir al proyecto, sumado a su rol de representante legal entre la empresa y el ejecutor del proyecto.

- Ejecutor del proyecto

Grado académico: Ingeniero Agrónomo

El profesional a cargo estará encargado de ejecutar, supervisar y responsable de la toma de decisiones respecto del proyecto

- Bioquímico, químico analista, biólogo o afín

Su rol estará destinado como apoyo de laboratorio en la metodología técnica, determinación analítica, recolección y tabulación de datos en conjunto y cooperación del Ingeniero Agrónomo.

- Jornal de campo

Apoyo en campo para realizar tratamientos en campo

- Estadístico

Estará a cargo de la realización de la metodología estadística, tratamiento e interpretación de los datos.

10. Presupuesto

Los recursos necesarios para ejecutar el proyecto alcanzan la suma total de \$61.319.378 CLP, cuyo detalle se compone de Costos de recursos humanos, Costos de inversión, Gastos de inversión y Gastos de operación, incluido un 5% de imprevistos (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4: Presupuesto total por cuenta y aportes sobre ellas.

PRESUPUESTO GENERAL POR CUENTA PROYECTO DURACIÓN 18 MESES						
Cuenta	FONDO CONCURSABLE (CLP)	APORTE EMPRESA		TOTAL (CLP)	Total(MM\$)	Porcentaje del total (%)
		Pecuniario	No pecuniario			
Total Recursos Humanos	\$30.400.000	\$0	\$216.000	\$30.616.000	\$30,6	50
Total Subcontratos	\$7.360.000	\$2.593.249	\$13.674.351	\$23.627.600	\$23,9	39
Total Gastos de Inversión	\$187.500	\$16.000	\$64.300	\$267.870	\$0,3	0,4
Total Materiales e Insumos	\$654.422	\$684.435	\$297.980	\$1.619.385	\$1,6	3
Total Gastos de Administración	\$162.958	\$262.958	\$2.000.000	\$2.881.479	\$2,8	5
Subtotal	\$38.764.880	\$20.028.363		\$59.012.334	\$59,3	96
Imprevistos (5%)	\$1.938.244	\$368.800		\$2.307.044	\$2,3	4
Porcentaje de Aporte (%)	70%	20%	80%	100%	100%	100
		30%				
TOTAL(CLP)	\$40.703.124	\$20.397.163		\$61.319.378	\$61,7	100

Fuente: Elaboración propia, 2018

Este proyecto tendrá una duración de 18 meses (2 temporadas), el cual se postulará a un proyecto FIA, el cual aportará el 70% del presupuesto con un límite máximo de 150.000.000 de aporte. El 30% restante del presupuesto espera ser financiado por una entidad privada interesada en la investigación que cumpla con el perfil de proyecto o bien por los aportes de una persona natural, con un mínimo de aporte pecuniario de 10% del total.

Cuadro 5: Presupuesto total por año, según tipo de aporte

	Cuenta	Año 1	Año 2	Total(MM\$)
A.	Total Recursos Humanos			
	<i>Pecuniario</i>	\$16.250.000	\$16.250.000	\$32,50
	<i>No Pecuniario</i>	\$90.000	\$90.000	\$0,18
B.	Total Subcontratos			
	<i>Pecuniario</i>	\$7.558.624	\$7.558.624	\$12,53
	<i>No Pecuniario</i>	\$6.837.175	\$6.837.175	\$13,67
C.	Total Gastos de Inversión			
	<i>Pecuniario</i>	\$1.721.870	\$0	\$1,70
	<i>No Pecuniario</i>	\$0	\$0	
D.	Total Gastos Materiales e Insumos			
	<i>Pecuniario</i>	\$1.338.857	\$0	\$1,33
	<i>No Pecuniario</i>	\$0,297	\$0	\$0,30
E.	Total Gastos Administración			
	<i>Pecuniario</i>	\$425.916	\$0	\$0,43
	<i>No Pecuniario</i>	\$2.000.000	\$0	\$2,00
	Imprevistos (5%)			
	<i>Pecuniario</i>	\$3.227.763	\$0	\$3,22
	<i>No Pecuniario</i>	\$0	\$0	
	Total(MM\$)			
	<i>Pecuniario</i>	\$30.523.030	\$23.808.624	\$51,7
	<i>No Pecuniario</i>	\$8.927.175	\$6.927.175	\$16,15
	Porcentaje del total			
	<i>Pecuniario</i>			77%
	<i>No Pecuniario</i>			23%

Fuente: Elaboración propia, 2018

11. Anexos

11.1. Anexo 1

Cuadro 6: Presupuesto extendido de costos, RRHH, gastos y subcontratos

GASTOS DE INVERSIÓN				
Item	Valor Unitario (CLP)	Cantidad	Unidad	Total (CLP)
Espectrofotómetro visible modelo 721 N, Unbranded	\$570.000	1	Unidad	\$570.000
Electroforesis de proteína, Nambi, modelo DYCZ- 26C	\$884.000	1	unidad	\$884.000
Notebook Hp	\$199.990	1	unidad	\$199.990
Impresora Samsung W2020	\$39.900	1	unidad	\$39.900
Mouse Microsoft 3500	\$7.990	1	unidad	\$7.990
Toner Samsung MLT1115	\$19.990	1	unidad	\$19.990
Sub Total				\$1.721.870
5% Imprevistos				\$86.094
Total				\$1.807.964

SUBCONTRATOS				
Item	Valor Unitario (CLP)	Cantidad	Unidad	Total (CLP)
Arriendo camioneta	\$57.990	240	día	\$13.917.600
Arriendo de laboratorio equipado	\$700.000	18	mes	\$12.600.000
Arriendo Oficina	\$100.000	18	mes	\$1.800.000
Gasto en petróleo	\$474	1000	km/día	\$474.000
Total				\$28.791.600

RECURSOS HUMANOS				
Item	Valor Unitario (CLP)	Cantidad	Unidad	Total (CLP)
Director del proyecto	\$650.000	18	meses	\$11.700.000
Ingeniero Agrónomo	\$750.000	18	meses	\$13.500.000
Encargado de Laboratorio	\$350.000	18	meses	\$6.300.000
Trabajador agrícola	\$18.000	10	días	\$180.000
Estadístico	\$200.000	5	semanas	\$1.000.000
Total				\$32.680.000

Fuente: Elaboración propia, 2018

11.2. Anexo 2

Cuadro 7: Presupuesto extendido de materiales insumos

MATERIALES E INSUMOS				
Ítem	Valor Unitario (CLP)	Cantidad	Unidad	Total (CLP)
Bion @ 50	\$142.820	1	kg	\$142.820
Biorend	\$27.020	2	Litro	\$54.040
FosFight 40-20	\$35.560	2	Litro	\$71.120
Recipiente	\$3.990	2	Unidad	\$7.980
Agar PDA	\$41.690	10	g	\$416.900
Placa Petri	\$230	1200	Unidad	\$276.000
Sulfato de Cafalexina	\$18.311	2	kg	\$36.622
Tubos Falcon 50 ml	\$1.500	3	c/u	\$4.500
Alcohol 95%	\$3.650	1	kg	\$3.650
Glicerina	\$146.683	1	Litros	146683
Pipeta 5 ml	\$3.464	2	c/u	\$6.928
Sacarosa	\$15.398	2	c/u	\$30.796
Agua Destilada	\$700	5	Litro	\$3.500
Nitrato de Calcio	\$25.439	2	kg	\$50.878
Sulfato de magnesio	\$33.284	2	kg	\$66.568
Nitrato de Potasio	\$34.333	2	kg	\$68.666
Ácido Bórico	\$18.311	2	kg	\$36.622
Solución de metino	\$25.760	2	Litro	\$51.520
Hipoclorito de Sodio	\$13.500	2	Litro	\$27.000
Solución DAPL	\$18.311	2	Litro	\$36.622
Ciclo heximida	\$48.711	2	kg	\$97.422
Sub Total				\$1.636.837
5% Imprevisto				\$81.842
Total				\$1.718.679

11.3. Anexo 3

Cuadro 7: Presupuesto extendido de gastos administrativos

GASTOS ADMINISTRATIVOS				
Item	Valor Unitario (CLP)	Cantidad	Unidad	Total (CLP)
Lápices pasta	\$3.474	1	caja	\$3.474
Marcadores	\$10.540	1	caja	\$10.540
Correctores	\$10.370	1	unidad	\$10.370
Tijeras	\$590	3	unidad	\$1.770
Tabla portatiles	\$1.000	3	unidad	\$3.000
Set escritorio	\$29.990	1	unidad	\$29.990
Silla	\$14.990	3	Unidad	\$44.970
Archivadores	\$2.569	5	unidad	\$12.845
Almuerzos	\$3.500	240	c/u	\$840.000
Agua mineral 500 cc	\$650	300	unidad	\$195.000
Plan telefónico Empresa Básico Celular x	\$39.990	24	mes	\$959.760
Plan internet 4G Entel	\$29.990	24	mes	\$719.760
Sub Total				\$2.831.479
5% Imprevisto				\$141.574
Total				\$2.973.053

Fuente: Elaboración propia, 2018