

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



**PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO**

**TALLER DE TÍTULO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Fungicidas cúpricos como causantes de resistencia en  
*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y de fitotoxicidad en *Prunus*  
*avium* L.

JAVIERA FRANCISCA CRUZ CUETO

QUILLOTA, CHILE

2018

# INDICE

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA U OPORTUNIDAD</b>	<b>2</b>
2.1	HIPÓTESIS	4
2.2	OBJETIVO GENERAL	4
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
<b>3.</b>	<b>ESTADO DEL ARTE</b>	<b>5</b>
3.1	ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE ( <i>PRUNUS AVIUM L.</i> )	5
3.1.1.	Países donde se cultiva el cerezo	5
3.1.2.	Superficie y antecedentes productivos del cerezo	5
3.1.3.	Antecedentes morfológicos y taxonómicos del cultivo	5
3.1.4.	Requerimiento del cultivo de cerezos	6
3.1.5.	Manejo cultural del cultivo cerezos	7
3.1.6.	Principales enfermedades	7
3.2	CÁNCER BACTERIAL DEL CEREZO	8
3.2.1	Descripción del agente causal	8
3.2.2	Sintomatología	8
3.2.3	Diseminación	8
3.2.4	Condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad	8
3.2.5	Importancia del cáncer bacterial	9
3.2.6	Control cultural	9
3.2.7	Control Biológico	9
3.2.8	Control Químico	10
3.3	FITOTOXICIDAD EN RESPUESTA A APLICACIONES DE COBRE	11
3.4	RESISTENCIA DE LA BACTERIA A COBRE	11
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>12</b>
4.1	UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO	12
4.2	DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA DE LA BACTERIA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE COBRE	12
4.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE ACUMULADO A NIVEL FOLIAR	14
4.4	MÉTODO PARA DETERMINAR LA INTERACCIÓN (INÓCULO RESISTENTE – PLANTA) Y APLICACIONES DE COBRE SOBRE PLANTAS EN MACETA	14
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>PLAN DE TRABAJO</b>	<b>19</b>
<b>7.</b>	<b>CARTA GANTT</b>	<b>22</b>
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS ESPERADOS</b>	<b>23</b>
<b>9.</b>	<b>ORGANIZACIÓN</b>	<b>24</b>
9.1	ORGANIGRAMA	24
9.2	CARGOS Y FUNCIONES	25
<b>10.</b>	<b>PRESUPUESTO</b>	<b>27</b>
10.1	PRESUPUESTO TOTAL POR CUENTA (MM\$).	27
10.2	PRESUPUESTO TOTAL POR AÑO (MM\$).	28
	<b>ANEXOS</b>	<b>29</b>

## 1. Resumen

En Chile, el cultivo de cerezos se ha vuelto potencialmente atractivo para los agricultores, ya que permite obtener grandes ingresos debido al mercado específico que posee y su alta demanda en contraestación. Actualmente la principal enfermedad que afecta las producciones de este cultivo en el país, es el cáncer bacterial del cerezo causado por la especie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, esta bacteria ingresa al sistema vascular de la planta, generando daño a nivel subcortical en ramas y tronco con exudación gomosa, además de atizonamiento de flores y brotes. Las medidas de control para esta enfermedad son preventivas, en las que destaca el uso de productos químicos en base a cobre. El cobre es responsable de la selección de poblaciones resistentes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* lo que disminuye la efectividad en su control, además de ser un elemento fitotóxico. Por este motivo el presente trabajo tiene por objetivo general identificar el nivel de resistencia de la bacteria y determinar la concentración de cobre acumulado en la planta que causa fitotoxicidad en *Prunus avium* L. De esta manera se podrá conocer la concentración de cobre efectiva para el control de la bacteria y en qué concentraciones no existe respuesta, debido a la presencia de resistencia. Además, se analizará la cantidad de cobre que se acumula a nivel foliar al finalizar el programa de aplicación de fungicida. Esta investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos, que pertenece a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. El material vegetal para la investigación se obtendrá del huerto de cerezos de la Estación Experimental la Palma. Para la identificación del nivel de resistencia se realizará la técnica de inhibición zonal, donde las cepas de la bacteria se someterán a diferentes concentraciones de cobre y se evaluará su respuesta. Este resultado se complementará con un ensayo *in vivo* que a diferencia del anterior, las concentraciones irán en aumento acumulándose durante tres semanas. Con este último ensayo también se podrá obtener la concentración de cobre que genera fitotoxicidad en la planta. Como resultados esperados en este proyecto, se espera obtener el grado de resistencia a cobre de la bacteria PSS conocido, la concentración de cobre acumulada a nivel foliar determinada, la interacción *in vivo* entre las cepas resistentes de la bacteria y el fungicida cúprico conocido. Además efecto de fitotoxicidad por cobre en cerezo determinada.

## 2. Definición del problema u oportunidad

El cerezo (*Prunus avium L.*) es una especie frutal de clima templado, originario de Europa, Asia Menor y el Norte de África. Árbol caducifolio perteneciente a la familia Rosáceas y al género *Prunus* (Labra *et al.*, 2005).

Los principales países productores de este cultivo son: Turquía, Estados Unidos, China, Ucrania, Polonia y en sexto lugar Chile (Muñoz, 2015). Chile exporta un total de 184.000 toneladas, destinado principalmente al continente Asiático, mercado exigente en calidad e inocuidad de la fruta (Fedefruta, 2018). Las principales zonas de cultivo donde se concentra el 80 % de la producción nacional son la Región del Maule con 11.130 ha y la Región de O'Higgins con 8.674 ha, con un total estimado nacional de 25.109 ha (ODEPA, 2018).

Uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de cerezo es el cáncer bacterial, cuyo agente causal es la especie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. La bacteria sobrevive de forma epífita en árboles frutales y en algunas plantas herbáceas, penetra principalmente por heridas dejadas por las hojas al caer. Su diseminación ocurre por efecto de las lluvias y viento, las condiciones que favorecen la infección son la presencia de agua libre junto a temperaturas templadas a frías. Los síntomas se expresan sólo en la parte aérea del árbol a fines de invierno e inicios de la primavera, produciendo exudación gomosa de color ámbar, muerte de yemas, desarrollo de canchales subcorticales en ramas, ramillas y tronco. También es posible encontrar atizamiento de flores, brotes y eventualmente manchas foliares necróticas rodeadas por un halo clorótico (Latorre, 2008).

Las medidas de control para esta enfermedad son preventivas, en base a manejos culturales, control biológico o productos químicos. Dentro de los productos químicos se destaca el uso de compuestos basados en cobre metálico, como óxido de cobre, oxiclórico de cobre e hidróxido de cobre. Utilizados cuando no existe tejido verde expuesto, ya que generan fitotoxicidad. Estas aplicaciones se realizan en otoño desde caída de hojas hasta yema hinchada. Las sales de cobre de alta residualidad como

sulfatos cuprocálcicos o sulfatos de cobre pentahidratados se aplican desde brotación en adelante, la dosis máxima recomendada es de 120 g/hl (Bayer, 2017; Pinilla, 2017).

El número de aplicaciones varía según la condición predisponente a la enfermedad y el producto a aplicar, alcanzando un promedio máximo de cinco por temporada entre inicio y término de caída de hojas, en caso de realizar el control entre floración y cuaja este se reduce a un promedio de tres (Agrospec, 2013; Bayer, 2017). También se realizan aplicaciones de pintura fungicida en cortes de poda y a nivel de tronco, con el objetivo de proteger la corteza de microheridas causadas principalmente por golpe de sol en verano y heladas en invierno (Lemus, 2005; Pinilla, 2017). Se considera un método efectivo para reducir el porcentaje de cancro bacteriano, cuando se realiza una vez al inicio de invierno, desde el cuello hasta la inserción de las ramas principales (Pinilla *et al.*, 2010).

Existen estudios que revelan que el uso de pastas cúpricas concentradas para proteger heridas no es recomendable, por generar alteración en el tejido, produciendo daño subcortical y exudación gomosa de color ámbar, síntoma considerado como una expresión fitotóxica. Sin embargo si el producto se diluye no generaría un daño significativo (Vercellino, 1985).

Por otro lado, existen análisis realizados en *Prunus persica* que revelan que aplicaciones de cobre a nivel foliar producen fitotoxicidad en la planta, presentando síntomas de clorosis (Redondo, 2013).

Entre los métodos de control también se destaca el uso de antibióticos, estos se utilizan como tratamiento inicial en huertos con alta presión de la enfermedad, para luego continuar con el programa de aplicación mediante el uso de sales de cobre. No se recomienda el uso prolongado de estos, ya que se ha registrado resistencia del patógeno a cobre y a antibióticos como oxitetraciclina y estreptomina (Spotts *et al.*, 1995).

## 2.1 Hipótesis

La aplicación reiterada de fungicidas en base a cobre, selecciona poblaciones resistentes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en tejidos afectados y genera fitotoxicidad en *Prunus avium* L., por acumulación del ingrediente activo en la planta, disminuyendo su productividad.

## 2.2 Objetivo general

Identificar el nivel de resistencia de la bacteria y determinar la concentración de cobre acumulado en la planta, que causa fitotoxicidad en *Prunus avium* L.

## 2.3 Objetivos específicos

1. Determinar el nivel de resistencia de la bacteria a concentraciones crecientes de cobre.
2. Determinar la concentración de cobre acumulado a nivel foliar al finalizar el programa de aplicación de fungicidas en cada temporada.
3. Determinar la interacción entre cepas resistentes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y aplicaciones de cobre, sobre plantas en maceta.

### **3. Estado del Arte**

#### **3.1 Antecedentes del cultivo (*Prunus avium L.*)**

##### **3.1.1. Países donde se cultiva el cerezo**

Los principales países donde se cultiva el cerezo son Turquía, Estados Unidos, China, Ucrania, Polonia y en sexto lugar Chile. Dentro de los seis países productores a nivel mundial, Chile es el único que produce en contraestación, lo que favorece su valor en el mercado (Muñoz, 2015).

##### **3.1.2. Superficie y antecedentes productivos del cerezo**

La superficie mundial de cerezo según cifras de la FAO es de 401.656 ha, alcanzando una producción mundial de 2,41 millones de toneladas (Bravo, 2013; Prochile, 2015). Los principales exportadores son Chile y Estados Unidos (Muñoz, 2015). Según estadísticas de ASOEX, Chile exporta 80% de la producción de cerezas a China, país destacado en la importación de cereza fresca (Carbonell, 2016). La superficie nacional de cerezos es de 25.109 ha, las principales zonas de cultivo donde se concentra el 80 % de la producción nacional son: La Región del Maule con 11.130 ha y la Región de O'Higgins con 8.674 ha (ODEPA, 2018). La temporada de exportaciones (2017-2018), presenta un incremento logrando un total de 184.000 toneladas exportadas, superando los niveles históricos (Fedefruta, 2018).

##### **3.1.3. Antecedentes morfológicos y taxonómicos del cultivo**

Pertenece a la familia Rosaceae del género *Prunus*, conformado a su vez por cinco subgéneros: *Prunophora*, *Amygdalus*, *Cerasus*, *Padus* y *Laurocerasus* (INFOR, 2001). Árbol caducifolio de gran tamaño, con hábito de crecimiento acrotónico (Lauri y Claverie, 2001). Posee flores simples con cinco sépalos, de color blanco o rosado, formadas por un largo pedúnculo, agrupadas en corimbo (Gil Albert, 1996). Se caracteriza por tener flores hermafroditas auto estériles, debido a incompatibilidad gametofítica en la mayoría de los cultivares, lo que hace necesario realizar polinización cruzada (Raff, *et al.*, 1981; Raff, *et al.*, 1982).

Actualmente, gracias a diversos trabajos de mejoramiento se han obtenido variedades auto fértiles y polinizantes universales como Lapins, Sunburst, Newstar, Sweetheart y Celeste. Fructifica en yemas aisladas ubicadas en la base de la ramilla de un año y en dardos de madera de dos o más años. El fruto es una drupa formada por un endocarpio, que en su interior tiene una semilla simple de endurecida testa, todo rodeado de un tejido carnoso envuelto por un epicarpio liso (Lemus, 2005).

#### **3.1.4. Requerimiento del cultivo de cerezos**

Esta especie tiene un alto requerimiento de frío invernal para superar el receso, además necesita de estaciones calurosas para su crecimiento. Si no se cumplen las condiciones, existirá una fuerte caída de frutos y la cuaja será pobre. Existen cultivares de bajo requerimiento de frío que necesitan de 400 a 600 h bajo 7,2 °C como Brooks, Garnet, Tulare y Rainier. Otros de alto requerimiento necesitan de 1100 a 1300 h bajo 7°C, como Bing y Early Burlat principalmente (Negrón, 2005; CIREN-CORFO, 2012).

El cerezo es un frutal muy sensible a heladas primaverales, la temperatura óptima para el crecimiento vegetativo se encuentra entre 18 y 24°C. Para una adecuada cuaja se necesita de temperaturas promedio entre 20 a 25°C. Temperaturas muy altas afectan la receptividad del estigma por desecación, así también las temperaturas bajas entre 5 a 6 °C, detienen el crecimiento del tubo polínico (Negrón, 2005).

Durante la floración se requiere de alta humedad relativa para mantener la hidratación del estigma. En el extremo de existir lluvias durante el período, estas provocarían lavado de polen, impidiendo la cuaja, además de aumentar las infecciones provocadas por hongos o bacterias (Negrón, 2005). El exceso de viento produce inhibición del crecimiento de los brotes, afectando la formación, cuaja e incrementando la evapotranspiración (Negrón, 2005). Se adapta muy bien a suelos limosos o areno- limosos, con buena capacidad de retención de agua y buen drenaje. El pH óptimo para el desarrollo radicular se encuentra entre 6,0 a 6,5. En suelos de pH alcalino aparecen deficiencias de algunos microelementos como hierro, zinc, boro y manganeso (Negrón, 2005).

### 3.1.5. Manejo cultural del cultivo cerezos

Antes de efectuar la plantación es necesario preparar el suelo, eliminando toda la capa compactada que dificulte la infiltración del agua y el desarrollo de raíces, luego se recomienda hacer una fertilización base en el lugar. Según el sistema de conducción a implementar se define el marco de plantación, densidad de plantas y tipos de podas (Guerendiain, 2004). La poda se ejecuta en función del sistema de conducción escogido, los más usados son: Eje central, tatura, vaso español, vaso tradicional y ejes múltiples. Esta se realiza durante los meses de invierno, sellando las heridas con mezcla de pintura y fungicida, si el árbol es vigoroso será conveniente podar en verano para disminuir el vigor (Guerendiain, 2004).

La fertilización se realiza según los resultados obtenidos en análisis de suelo, en la primera etapa de desarrollo es importante que exista buena disponibilidad de fósforo y nitrógeno, que favorecen el crecimiento vegetativo de la planta y en la etapa productiva buenos niveles de potasio para obtener fruta de calidad. El nitrógeno se aplica a fines de invierno junto a la dosis de fósforo y potasio, sin embargo, durante el verano se incorpora únicamente nitrógeno. La dosis de microelementos a incorporar dependerá de los resultados del análisis foliar (Guerendiain, 2004). Actualmente se utiliza un sistema de riego presurizado, en que se organiza la frecuencia según el requerimiento del cultivo, para mantener un nivel de humedad óptimo. Otro manejo importante es el control de malezas, con el fin de evitar la competencia por nutrientes y agua, además de ser hospederos alternativos de plagas o enfermedades (Guerendiain, 2004).

### 3.1.6. Principales enfermedades

Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo de cerezo en nuestro país se destaca: La pudrición de cuello, provocada por especies del género (*Phytophthora spp.*), agallas del cuello (*Agrobacterium tumefaciens*), cáncer bacterial (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), tizón de la flor (*Monilinia laxa*), plateado (*Chondrostereum purpureum*), pudrición o moho gris (*Botrytis cinérea*). Entre los principales virus que afectan al cultivo se encuentra (*Prunus necrotic ringspot virus*) o anillado necrótico de los *Prunus* y el enanismo de los *Prunus* (*Prune dwarf virus*)(Pinilla, 2005; CORFO, 2013).

## **3.2 Cáncer bacterial del cerezo**

### **3.2.1 Descripción del agente causal**

Corresponde a una bacteria Gram negativa de forma bacilar, con uno o varios flagelos polares, presenta colonias planas de forma circular o poliédrica, con bordes enteros o ligeramente lobados (Breed *et al.*, 1957).

### **3.2.2 Sintomatología**

Entre los síntomas se destaca la formación de cancro sobre el tronco y ramas principales con abundante exudación de goma, la lesión presenta forma alargada o circular, levemente hundida y estriada (Agrios, 1978; Pinilla, 2005). También es posible encontrar atizonamiento de yemas, brotes, flores y eventualmente manchas foliares necróticas rodeadas por un halo clorótico (Latorre, 2008). Los frutos afectados caen antes en la temporada, presentando lesiones necróticas alargadas (Jones, 1971).

### **3.2.3 Diseminación**

Se disemina principalmente por acción del viento y lluvias, también por actividad de agentes polinizadores y arrastre superficial del inóculo desde plantas enfermas a sanas. (CORFO, 2013).

### **3.2.4 Condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad**

La presencia de agua libre y temperaturas entre -5 y -2 °C, condicionan la infección de un hospedero susceptible, mientras que temperaturas entre 15 y 25°C favorecen el desarrollo de los síntomas (Pinilla, 2005). La presencia de la bacteria en el interior de los tejidos genera la formación de núcleos de hielo a temperaturas entre -2 a -3 °C, causando la ruptura del vegetal lo que facilita el ingreso de la bacteria a la planta (Cruz, 1995).

### 3.2.5 Importancia del cáncer bacterial

El cáncer bacterial genera una baja producción del cultivo, provocando grandes pérdidas económicas por el severo deterioro de la planta (Meriño *et al* , 2014). Es una bacteria con un gran número de hospederos lo que facilita su propagación y permanencia en los cultivos.

### 3.2.6 Control cultural

Las labores culturales para evitar la enfermedad son: Uso de material vegetal sano desde el vivero, plantar en zonas donde las condiciones de clima y suelo sean inapropiadas para el desarrollo de la enfermedad, realizar control de malezas cercanas al cultivo por ser reservorio del inóculo, realizar la poda en verano donde la temperatura es alta y existe escasa humedad relativa, evitar el exceso de fertilizante nitrogenado para no generar tejidos suculentos o nuevas brotaciones ya que son más propensos a la colonización bacteriana, desinfección de las herramientas de poda y protección de los cortes efectuados con pintura y fungicida (Pinilla, 2005; Corfo, 2013).

### 3.2.7 Control Biológico

Para el control biológico de cáncer bacterial en cerezos se utilizan productos en base a cepas (*Bacillus spp.* y *Brevibacillus brevis*), bajo el nombre comercial de (Nacillus®) según lista de plaguicidas autorizados para el año 2017 por el SAG. Presenta acción bactericida a través de competencia, antibiosis y depredación de bacterias fitopatógenas. Su aplicación se realiza a nivel foliar, desde caída de hoja hasta poscosecha (Nativa, 2017). Entre los bactericidas autorizados para agricultura orgánica según SAG año 2016, encontramos un producto en base a cepas de microorganismos propios del suelo (*Bacillus spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viride* y *Nocardia coralina*), bajo el nombre (OIKO- BAC 174), Su aplicación es directamente al suelo, generando un aumento de la actividad microbiana, acelerando el proceso de compostaje, eliminando así organismos patógenos (OIKO, 2017).

### 3.2.8 Control Químico

#### 3.2.8.1 Uso de antibióticos

Entre los antibióticos autorizados para el control de cáncer bacterial en cerezos se encuentran productos en base a sesquisulfato de estreptomina y clorhidrato de oxitetraciclina, bajo el nombre comercial (Strepto Plus®), su aplicación se realiza desde caída de hojas (Anasac, 2015). Otro antibiótico utilizado es el producto en base a sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina, bajo el nombre comercial (Agrigent Plus®), aplicado durante el período de floración (Asp, 2014).

#### 3.2.8.2 Uso de polisulfuro de calcio

Ensayos demuestran que aplicaciones en invierno de polisulfuro de calcio seca los canchales con goma. Se recomienda utilizarlo de forma complementaria a las aplicaciones de cobre en invierno, para limpiar el huerto antes de salir del receso, así disminuir la carga del inoculo, tanto en bacterias como en hongos (Pinilla, 2017).

#### 3.2.8.3 Aplicación de fungicidas cúpricos

Aplicaciones foliares. Se registra efectivo control en la zona central, donde la incidencia de la enfermedad es menor, realizando un programa de tres a cuatro aplicaciones de fungicidas cúpricos, esto dependiendo directamente de la presión de la enfermedad en el huerto. Se privilegia el uso de cobres metálicos por su efectividad y bajo costo, todo esto es complementado con antibióticos en base a estreptomina y oxitetraciclina<sup>1</sup>.

Aplicación en tronco. La aplicación se realiza una vez durante el otoño de manera preventiva, actualmente se aplica caldo bórdales en dosis (100 kg/1000 l) más cinco litros de adherente (Bond®), utilizando nebulizadora con pitón y boquilla de 1,2 mm, para obtener una mejor cobertura del tronco, sin perder efectividad. Existen registros hasta el año 2016, de otra alternativa de aplicación para prevención en troncos, en base a mezcla de caldo bórdales, cola fría y látex blanco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Comunicación personal con Administrador del campo, Ing. Alberto Cortés, Estación Experimental La Palma (EELP), Escuela de Agronomía, PUCV.

<sup>2</sup> Comunicación personal con Jefe de campo (EELP) Florentino Cofré, Escuela de Agronomía, PUCV.

### **3.3 Fitotoxicidad en respuesta a aplicaciones de cobre**

Fitotoxicidad por pastas cúpricas. Existen estudios que revelan que pastas cúpricas a base de oxiclورو de cobre en concentración (500g/l), producen daño subcortical, manifestado por necrosis de los tejidos y exudación gomosa de color ámbar en los primeros centímetros de contacto con las pasta. Las aplicaciones más diluídas no generan daños significativos (Vercellino, 1985).

Fitotoxicidad a nivel foliar. Existen análisis realizados en *Prunus persica* que revelan que una aplicación de hidróxido cuproso en dosis (300g/hl) produce fitotoxicidad, presentando síntomas de clorosis (Redondo, 2013).

### **3.4 Resistencia de la bacteria a cobre**

La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en exposición a fungicidas a base de cobre genera resistencia y ésta aumenta más de siete veces en generaciones posteriores, según ensayos realizados por la Universidad Estatal de Oregón, existen cepas resistentes a concentraciones bajas de 16 ppm y a concentraciones mayores de 48 ppm, obteniendo un crecimiento de la cepa equivalente en los diferentes ensayos independiente de la concentración aplicada (Sheck y Pscheidt, 1998).

## 4. Metodología

### 4.1 Ubicación geográfica del estudio

Esta investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos, que pertenece a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. El material vegetal para la investigación se obtendrá del huerto de cerezos de la Estación Experimental La Palma. La ubicación geográfica del estudio es calle San Francisco, La Palma s/n provincia de Quillota, Región de Valparaíso.

### 4.2 Determinación del nivel de resistencia de la bacteria a concentraciones crecientes de cobre

Material vegetal. Las muestras serán obtenidas de un huerto de cerezos (*Prunus avium* L.) de la variedad Brooks y Lapins, que se encuentran sobre el portainjerto CAB 6P en un marco de plantación de 4,5 x 2,5 m. Se identificarán los árboles que presentan sintomatología de cáncer bacterial para efectuar aislamientos a partir de tejido afectado. Se coleccionarán ramas secundarias con síntomas, las muestras se guardarán en bolsas Ziploc debidamente rotuladas con fecha, hospedante, lote y número de planta. Posteriormente serán llevadas al laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía, donde se efectuará el aislamiento y las pruebas *in vitro*.

Aislamiento del inóculo. A partir de la zona de avance de lesiones presentes en la corteza de las ramas secundarias, se extraerán trozos de tejido de aproximadamente (3 mm<sup>2</sup>), se desinfectarán con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 min, posteriormente serán macerados en agua destilada y la suspensión resultante será cultivada en un medio MBK. Se incubarán en oscuridad por 3 días a 25°C en una incubadora marca 1DiES modelo D53VU. Una vez que se obtenga crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, la bacteria será re-aislada nuevamente en MBK para su purificación.

Pruebas in vitro. Se utilizará el fungicida hidróxido de cobre (Hidrocup® WG) que contiene un 50% de cobre metálico.

Técnica de inhibición zonal. Se utilizará la técnica de inhibición zonal propuesta por (Kelman *et al* (1967 citado por Lopéz y Castaño, 2011)). Consiste en dispensar 20 ml de agar nutritivo por placa Petri de 9 cm de diámetro, para proveer el medio basal. Una vez solidificado este medio se agregarán 5 ml de un cultivo bacteriano desarrollado 18 h en medio de cultivo MBK. Cada placa Petri será refrigerada por una o dos horas hasta su utilización. Discos de papel filtro de 12 mm de diámetro serán sumergidos en diluciones del producto en dosis de 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ppm, cada disco se contactará dos veces con la pared del frasco que contenga la solución del producto, para eliminar el exceso. Cada disco impregnado será colocado en el centro de cada placa Petri, las cuales se incubarán a 27°C por un período de 24 h en una incubadora marca 1DiES modelo D53VU. Después de este tiempo, se determinará: Rango de inhibición (mm), área de inhibición (cm<sup>2</sup>) y eficacia (%) de cada producto, mediante la siguiente fórmula:

$$E = \frac{RDITto}{RDIMáx} \times 100\%$$

E = Porcentaje (%) de eficacia de la concentración del producto.

RDITto = Rango de inhibición obtenido por tratamiento.

RDIMáx = Máximo rango de inhibición obtenido en el mejor tratamiento.

#### Análisis estadístico.

A los datos del rango de inhibición por tratamiento se les realizará análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparación múltiple de Tukey. Los valores de rango de inhibición para los tratamientos a base de cobre serán ajustados a un modelo de regresión lineal donde se obtendrá EC<sub>50</sub>, EC<sub>90</sub> y MIC. Se realizarán seis tratamientos con diferentes concentraciones de cobre y un tratamiento testigo, cada uno tendrá tres réplicas, obteniendo así un total de 21 observaciones (Cuadro1).

Cuadro 1: Rango de inhibición (mm) de la bacteria (*Pseudomonas syringae* pv.*syringae*) en exposición a diferentes concentraciones de hidróxido de cobre.

	T0 (agua destilada)	T1 (50ppm)	T2 (100ppm)	T3 (200ppm)	T4 (400ppm)	T5 (800ppm)	T6 (1600ppm)
R1							
R2							
R3							

#### 4.3 Determinación de la concentración de cobre acumulado a nivel foliar

Material vegetal. Se realizará una recolección de hojas en el huerto de cerezos de la Estación Experimental La Palma, después de cumplir con el programa de aplicaciones foliares de fungicidas cúpricos, la muestra recibida debe ser lavada con agua potable y detergente o bien con HCl 0,1 mol/l, luego resta enjuagar con agua destilada, para posteriormente ser colocada en una bolsa de papel a secar a 70 +/- 5 °C por 12 a 24 h. Luego de este proceso, se procederá a moler y tamizar la muestra por 0,5 mm, de esta muestra se pesa 1g y se calcinará a 500°C por cuatro a ocho horas, se enfría y agrega cuidadosamente 2 ml de agua para humedecer las cenizas, luego agregar 10 ml de HCl (2mol/l) y calentar en plato calefactor hasta su ebullición, por último, se debe filtrar el contenido en el crisol a través de papel filtro recibiendo el filtrado en matraz aforado de 50 o 100 ml, se lava y enrasa con agua. Finalmente la concentración de cobre foliar se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica. (Sadzawka *et al.*,2007).

#### 4.4 Método para determinar la interacción (inóculo resistente – planta) y aplicaciones de cobre sobre plantas en maceta

Muestra vegetal. Se utilizarán 60 plantas terminadas de *Prunus avium* L., proveniente de un vivero ubicado en Casablanca, Región de Valparaíso. Estas serán trasplantadas a macetas con sustrato estéril, recibirán fertilización y riego según requerimientos.

Obtención del inóculo. Las cepas resistentes serán extraídas del ensayo de inhibición zonal realizado anteriormente.

Ensayo. Se realizarán seis tratamientos, cada planta se inoculará con 20 cepas resistentes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, para ello se realizarán lesiones en las plantas y se asperjará sobre ellas una suspensión bacteriana, con una concentración mayor a  $5 \times 10^7$  bacterias por ml (Sosa *et al.*, 1997). Para otorgar las condiciones de humedad se le colocará una bolsa transparente a cada planta por un período de 48 h, todo esto bajo un invernadero frío. Una vez infectada la planta se realizarán aplicaciones de hidróxido de cobre cada siete días en diferentes concentraciones por tratamiento, durante un período de tres semanas, cada tratamiento tendrá 10 repeticiones (Cuadro2). Este ensayo permitirá medir la eficacia del control en la disminución del inóculo resistente en condiciones de campo, para ello se hará un recuento de colonias que serán cultivadas en un medio B King cada semana. Se utilizará un análisis para medir incidencia de la enfermedad en las plantas tratadas y se comparará con la planta testigo que está inoculada pero no recibe tratamiento. Además, se evaluará la respuesta de la planta a las diferentes concentraciones acumuladas de cobre, hasta obtener síntomas de fitotoxicidad en *Prunus avium* L., luego los resultados serán comparados con un tratamiento testigo.

Cuadro 2: Tratamientos con distintas concentraciones de cobre (hidróxido de cobre) a realizar durante un período de tres semanas en plantas adultas de *Prunus avium* L.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Concentración acumulada
T0	-	-	-	-
T1 (50ppm)	50	50	50	150ppm
T2 (100ppm)	100	100	100	300ppm
T3 (200 ppm)	200	200	200	600ppm
T4 (400ppm)	400	400	400	1200ppm
T5 (800ppm)	800	800	800	2400ppm

#### Análisis estadístico

Los tratamientos serán distribuidos en un diseño completamente al azar, se realizará análisis de varianza (ANOVA), test de comparación múltiple de Tukey y análisis para medir incidencia e índice de daño. Análisis de incidencia (Kruskal- Wallis).

## 5. Bibliografía

Agrios, G. N, 1978. Plant Pathology. 629 p. Academic Press, New York.

Agrospec. 2013. Fungicup ® 87 WP. Fungicida - Bactericida Cúprico. Santiago, Chile.

Bayer. 2017. Agrocopper ® SP. Fungicida - Bactericida. Santiago, Chile.

Bravo, J. 2013. Cerezas: Actualización de un mercado. 10 p. ODEPA, Santiago, Chile.

Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. 1094 p. 7 ed. Md Williams and Wilkins, Baltimore.

Carbonell, C. 2016. Más de 80 % crecen exportaciones de fruta chilena a China, y la industria prepara intensas y creativas promociones para la próxima campaña. Disponible en <http://simfruit.cl/noticias-destacadas/2189-mas-de-80-crecen-exportaciones-de-frutas-chilenas-a-china-y-la-industria-prepara-intensas-y-creativas-promociones-para-la-proxima-campana.html> Leído el 1 de junio de 2017.

CIREN-CORFO. 2012. Antecedentes técnicos y económicos para la producción de cerezo en la Región del Maule. 43 p. CIREN-CORFO, Santiago, Chile.

Corfo. 2013. Guía de plagas y enfermedades en cerezo. 8 p. Corfo, Santiago, Chile.

Cruz, M. 1995. El cáncer bacterial del cerezo una enfermedad que puede prevenirse. Centro Regional de Investigación Quilamapu N° 62 p. 6-9.

Cruz, M. 1999. Aplique un control preventivo Cáncer bacterial del cerezo. 2 p. Serie Quilamapu N° 134. Instituto de Investigación Agropecuaria, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillan, Chile.

Fedefruta. 2018. Exportaciones de cereza chilena superan niveles históricos. Disponible en <http://fedefruta.cl/exportaciones-de-cereza-chilena-superan-niveles-historicos/> Leído el 21 de agosto de 2018.

Gil – Albert, F. 1996. Tratado de arboricultura frutal. Morfología y Fisiología del árbol. 4ª edición. Madrid, Ediciones Mundi – Prensa. 102 p. (Vol I).

Gonzalez, J. 1984. Susceptibilidad estacional de cerezo (*Prunus avium* L.) a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y el efecto del agua libre sobre la poblaciones epifitas en condiciones de invernadero y de campo. p. Tesis Ingeniero Agrónomo. PUC, Santiago, Chile.

Guerendiain, F. 2004. Labores culturales en cerezos. p. 35- 38. Agencia de extensión rural INTA los Antiguos, Santa Cruz, Argentina.

INFOR- FIA. 2001. Cerezo común (*Prunus Avium*) Una alternativa para producir madera de alto valor. 105 p. INFOR – FIA, Santiago, Chile.

- Jones, A. L., 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Dis. Rep.* 55: 951-965.
- Labra, E., J. Riquelme y O. Astudillo. 2005. Establecimiento de huerto de cerezos. 86 p. INIA, Villa Alegre, Chile.
- Latorre, B. 2008. Cerezos saludables. *Agronomía y forestal Universidad Católica de Chile* N° 34 p. 8 -11.
- Lauri, P., and J. Claverie. 2001. Conduite du cerisier. Principes et pratiques de extinction. *Réussir Fruit & Légumes* 199:42-45.
- Lemus, G. 2005. Características de la especie. p. 11-16. *In* G. Lemus. El cultivo del cerezo. INIA N°133, Santiago, Chile.
- López, N. y J. Castaño. 2011. Evaluación *in vitro* de la eficacia de bactericidas sobre *Pseudomonas sp. Migula*, causante de la muerte descendente del tomate de árbol [*Solanum betaceum* (CAV) SENDT.]. (*Agrom.*19:31-41).
- Meriño, C., J. Sepúlveda, y J. Guerrero. 2014. Susceptibilidad a cáncer bacterial de cultivares de cerezos, en tres localidades del sur de Chile. Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.
- Muñoz, M. 2015. Cerezas frutas en expansión. 6 p. ODEPA, Santiago, Chile.
- Negrón, C. 2005. Adaptación a condiciones edafoclimáticas. p. 17-22. *In* G. Lemus. El cultivo del cerezo. INIA N°133, Santiago, Chile.
- ODEPA .2018. Superficie de frutales por región. Disponible en <http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2017/01/Superficie-plantada-nacional-WEB.xlsx> Leído el 9 de abril de 2017.
- Pietrzack, U., and D.C. McPhail. 2004. Cooper accumulation distribution and fractionation in vineyard soil of Victoria, Australia. *Geoderma* 122:151-166.
- Pinilla, B. 2005. Enfermedades. p. 133 – 142. *In* G. Lemus. El cultivo del cerezo. INIA N°133, Santiago, Chile.
- Pinilla, B., C. Corvalán. 2010. Importancia de la protección de troncos de cerezos, con pinturas fungicidas para el control de cáncer bacterial causado por *Pseudomonas syringae pv. syringae*. XIX Congreso Nacional de Fitopatología, Pucón, Chile. 9 -12 de noviembre de 2010. SOCHIFIT, Pucón, Chile.
- Pinilla, B. 2017. Productos de cobre: Cada vez más necesarios. *Red Agrícola*. N° 84 p. 32-35.
- Puiggros, P., y C. Morín. 1980. Nutrición de los cítricos. *In* C. Morín. 1980. El cultivo de cítricos. 2ª edición, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Lima, Perú.

Raff, J., R. Knox and R. Clark. 1981. Style antigens of (*Prunus avium* L). *Planta* 153: 125-129.

Raff, J., J. Pettitt and R. Knox. 1982. Cytochemistry of pollen tube growth in stigma and style of *Prunus avium*, *Phytomorphology* 13: 214-231.

SAG. 2016. Insumos visados para el uso en agricultura orgánica de acuerdo al D. S. N° 2/2016 (que deroga el D. S. 17/ 2007) Subdepartamento de agricultura orgánica – SAG. SAG, Chile.

SAG. 2017. Lista de plaguicidas con autorización. SAG, Chile.

Scheck, H.J., and J.W. Pscheidt. 1998. Effect of copper bactericides on copper-resistant and-sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Dis.* 82:397-406.

Spotts, R. A. and L. A. Cervantes. 1995. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant disease.*79:1132-1135.

Sosa, C., F. Perdomo, C. W.D.Brathwaite y J.J. Salazar. 1997. 223p. Agencia de cooperación técnica del IICA, Mexico.

Vercellino, M. 1985. Variación poblacional de *Pseudomona syringae* (van Hall) en huertos de cerezos. 39 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

## **6. Plan de trabajo**

### **Habilitar Laboratorio de Fitopatología e Invernadero**

Habilitar área del laboratorio donde se realizarán los respectivos ensayos, coordinar el uso de un invernadero de la Escuela de Agronomía, para llevar a cabo el ensayo *in vivo* en plantas de cerezo.

Duración actividad: 2 meses

### **Compra de Insumos**

Consiste en la compra de todos los insumos requeridos para la ejecución del proyecto, tales como: Placas Petri, papel filtro, bolsas Ziploc, hipoclorito de sodio, agua destilada, materiales para medios de incubación, sustrato inerte, macetas, plantas de cerezo, entre otros.

Duración actividad: 1 mes

### **Habilitar oficina y contratación del personal**

El proyecto comenzará a principio del año 2019 con la contratación del personal requerido para cada etapa del proyecto. Las labores administrativas como facturas y contratos, se realizarán en un sector previamente habilitado como oficina en el interior del laboratorio.

Duración actividad: 1 mes

### **Obtención del inóculo y material vegetal**

Esta actividad consiste en obtener muestras de tejido vegetal infectado con cáncer bacterial proveniente del huerto de cerezos de la Estación Experimental La Palma, para ello será necesaria la autorización del administrador de campo el Ing. Alberto Cortés.

Se obtendrán aislados de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* a partir de ramas secundarias infectadas, se identificarán con pruebas bioquímicas y moleculares. Posteriormente se llevará a cabo la multiplicación de las cepas aisladas en el laboratorio. Además se realizará la recolección de hojas para evaluar la concentración de cobre acumulado al finalizar las aplicaciones de cobre (Ensayo N°2).

Duración de la actividad: 3 meses

### **Ensayo N° 1 Determinación del nivel de resistencia de la bacteria a concentraciones crecientes de cobre**

En esta actividad las cepas previamente aisladas y multiplicadas en laboratorio se distribuirán en placas de Petri, luego mediante el uso de la técnica de inhibición zonal se determinará el nivel de resistencia de la bacteria en exposición a diferentes concentraciones de cobre.

Duración actividad: 3 meses

### **Ensayo N° 2 Determinación de la concentración acumulada de cobre a nivel foliar**

Se determinará la concentración de cobre acumulado a nivel foliar en plantas de cerezo del huerto de la EELP al finalizar el programa de aplicaciones fitosanitarias, mediante la técnica de calcinación que se llevará a cabo en laboratorio.

Duración actividad: 3 meses

### **Ensayo N° 3 Método para determinar la (Interacción inóculo resistente – planta) y aplicaciones de cobre sobre plantas en maceta**

Se utilizarán 60 plantas sanas de cerezo provenientes de un vivero comercial ubicado en Casablanca, Región de Valparaíso. Estas serán trasladadas hasta la EELP, donde se habilitará un invernadero para efectuar el llenado de las macetas con sustrato estéril. Posteriormente se realizará la inoculación con las cepas resistentes obtenidas en el ensayo N°1, luego de la infección se aplicarán diferentes concentraciones de cobre con el objetivo de evaluar la concentración que genera control de la población bacteriana y síntomas de fitotoxicidad en la planta.

Duración actividad: 3 meses

### **Evaluación de los tratamientos**

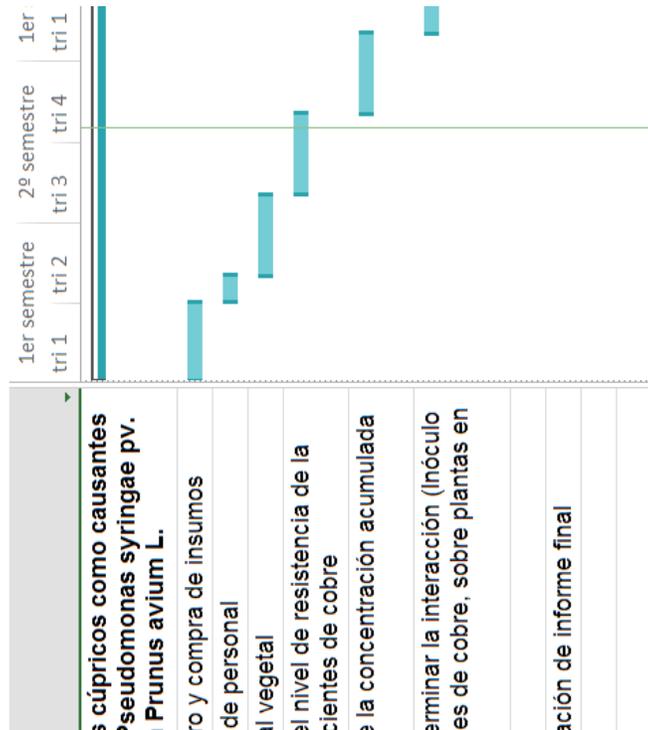
La evaluación de los tres ensayos se realizará en el laboratorio, donde se obtendrán los resultados que serán determinados con los diferentes análisis.

Duración actividad: 2 meses

### Análisis de resultados y elaboración de informe final

De acuerdo a los datos obtenidos de los tratamientos, se realizarán los análisis estadísticos y conclusiones para finalizar el informe del proyecto.

Duración de actividad: 6 meses



### 8. Resultados esperados

#### 7. Carta Gantt

Determinar el nivel de resistencia de la bacteria a concentraciones crecientes de cobre.

#### Resultado esperado

Grado de resistencia a cobre de la bacteria PSS conocido.

#### Objetivo específico N° 2

Determinar la concentración de cobre acumulado a nivel foliar al finalizar el programa de aplicación de fungicidas en cada temporada.

**Resultado esperado**

Concentración de cobre acumulada a nivel foliar determinada.

**Objetivo específico N° 3**

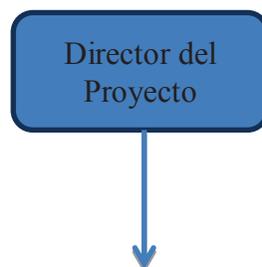
Determinar la interacción entre cepas resistentes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y aplicaciones de cobre sobre plantas en maceta.

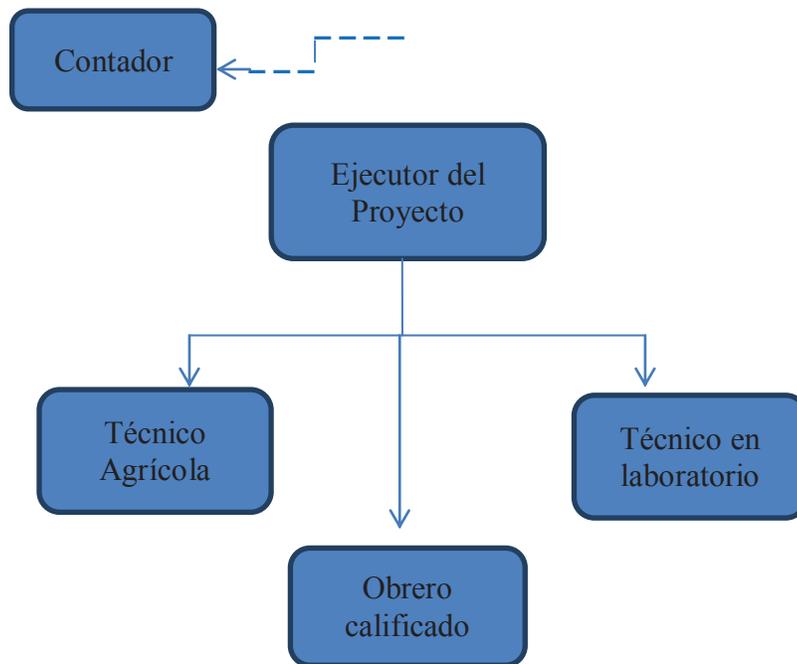
**Resultado esperado**

Interacción *in vivo* entre las cepas resistentes de la bacteria y el fungicida cúprico conocido. Fitotoxicidad por cobre en cerezo determinada.

## 9. Organización

### 9.1 Organigrama





## 9.2 Cargos y funciones

**Cuadro 3. Descripción de funciones**

Nombre del profesional	Formación / grado académico	Cargo en el proyecto	Funciones (Nº)	Costo del personal (MM\$)	Aporte FONDO CONCURSABLE (MM\$)
Ximena Besoain C.	Ing. Agrónomo	Director del proyecto	1.- Guiar y supervisar el correcto funcionamiento del	12,00	

			<p>proyecto y análisis de resultados.</p> <p>2.- Revisar elaboración de avances e informes.</p> <p>3.- Representante entre la empresa y el ejecutor.</p> <p>4.- Rendir cuentas por los fondos utilizados.</p>		
Javiera Cruz C.	Ing. Agrónomo	Ejecutor del proyecto	<p>1.- Coordinación general del proyecto en campo y laboratorio.</p> <p>2.- Cotización y adquisición de insumos y servicios.</p> <p>3.- Planificación y ejecución del plan de trabajo.</p> <p>4.- Análisis de resultados y elaboración de avances e informe final.</p>	16,8	16,8
Francisca Valencia	Técnico de laboratorio	Técnico de nivel superior analista químico	<p>1.- Montar laboratorio para análisis.</p> <p>2.- Analizar muestras que lleguen al laboratorio.</p> <p>3.- Tabular datos de acuerdo al ensayo.</p> <p>4.- Entregar resultados de cada</p>	2,02	2,02

			muestreo.		
Héctor Donoso	Técnico agrícola	Técnico agrícola de nivel superior	1.- Encargado de realizar la inoculación de las plantas. 2.- Registrar el estado de cada tratamiento. 3.- Tabular datos de acuerdo al ensayo. 4.- Entregar resultados de cada muestreo	0,40	0,40
Jaime Figueroa	Contador auditor	Contador auditor	1.- Realización de pago de honorario, cotizaciones e impuestos. 2.- Llevar un balance del estado financiero del proyecto.	1,05	1,05
NN	Obrero calificado	Enseñanza media completa	1.- Labores y manejos diarios en el invernadero.	0,75	0,75

## 10. Presupuesto

### 10.1 Presupuesto Total por Cuenta (MM\$).

	Cuenta	Fondo Concursable	Empresa		Total (MM\$)
			Pecunario	No pecunario	
<b>A.</b>	<b>Total de Recursos Humanos</b>	19,97	0	12,00	31,97
<b>B.</b>	<b>Total Subcontratos</b>	0	0	3,00	3,00

<b>C.</b>	<b>Gastos de operación</b>	2,64	0	0	2,64
<b>D.</b>	<b>Total Gastos de Administración</b>	1,99	0	0	1,99
<b>E.</b>	<b>Imprevistos 10%</b>	0	0	3,96	3,96
	<b>Porcentaje de Aporte</b>	56,47%	0	43,52%	100%
	<b>Total (MM\$)</b>	24,60	0	18,96	<b>43,56</b>

## 10.2 Presupuesto Total por Año (MM\$).

	<b>Cuenta</b>	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Total (MM\$)</b>
<b>A.</b>	<b>Total Recursos Humanos</b>			
	Pecunario	9,60	10,37	19,97
	No pecunario	6,00	6,00	12,00
<b>B.</b>	<b>Total Subcontratos</b>			

	Pecunario	0	0	0
	No pecunario	2,05	0,95	3,00
<b>C.</b>	<b>Total Gastos de Operación</b>			
	Pecunario	1,20	1,44	2,64
	No pecunario	0	0	0
<b>D.</b>	<b>Total Gastos de Administración</b>			
	Pecunario	0,85	1,14	1,99
	No pecunario	0	0	0
<b>E.</b>	<b>Imprevistos %</b>			
	Pecunario	0	0	0
	No pecunario	1,98	1,98	3,96
	<b>Total (MM\$)</b>	<b>21,68</b>	<b>21,88</b>	<b>43,56</b>
	Pecunario	11,65	12,95	24,60
	No pecunario	10,03	8,93	18,96

## ANEXOS

### Anexos 1. Detalle del Presupuesto

Recursos Humanos	Tipo	N° Meses	Meses / J / H Año 1	Meses / J / H Año 2	Honorario \$/Mes	Incentivos	% Participación	Cantidad	Año 1		Año 2		Valor total (\$)	Total Proyecto (MMS)	
									Pecunario	No pecunario	Pecunario	No pecunario			
Director del proyecto	No pecunario	Mensual	24	12	12	\$ 0	\$ 500.000	20	1		8.000.000		8.000.000	\$ 12.000.000	12,00
Ejecutor del proyecto	Pecunario	Mensual	24	12	12	\$ 700.000	\$ 0	30	1	8.400.000		8.400.000	8.400.000	\$ 16.800.000	16,80
Técnico de laboratorio	Pecunario	J/H	135	80	55	\$ 15.000	\$ 0	20	1	1.200.000		825.000	825.000	\$ 2.025.000	2,02
Técnico Agrícola	Pecunario	J/H	20	0	20	\$ 20.000	\$ 0	20	1			400.000	400.000	\$ 400.000	0,40
Obrero Calificado	Pecunario	J/H	50	0	50	\$ 15.000	\$ 0	10	1	0		750.000	750.000	\$ 750.000	0,75
<b>Total</b>										<b>9.600.000</b>	<b>6.000.000</b>	<b>10.375.000</b>	<b>6.000.000</b>	<b>\$ 31.975.000</b>	<b>31,97</b>

Subcontratos	Tipo	N° Meses	Meses Año 1	Meses Año 2	Precio Unitario (\$)	Valor total (\$)	Año 1		Año 2		Valor total (\$)	Total Proyecto
							Pecunario	No pecunario	Pecunario	No pecunario		
Arriendo Invernadero	Mensual	4	3		\$ 150.000	600.000		450.000		150.000	600.000	0,6
Arriendo Laboratorio Equipado	Mensual	12	8		\$ 200.000	2.400.000		1.800.000		800.000	2.400.000	2,4
<b>Total</b>								<b>2.050.000</b>		<b>950.000</b>	<b>3.000.000</b>	<b>3</b>

Gastos de Operación	Unidades	Cantidad	Precio Unitario	Año 1		Año 2		Valor total \$ 2 años	Valor Total (MM\$)
				Pecunario	No pecunario	Pecunario	No pecunario		
Plantas terminadas cerezos	Unidad	60	\$ 3.675			\$ 220.500		\$ 220.500	
Alcohol 95%	L	20	\$ 3.600	\$ 36.000				\$ 72.000	
Macetas 11 litros	Unidad	60	\$ 2.500			\$ 150.000		\$ 150.000	
Agua destilada	L	10	\$ 1.700	\$ 17.000				\$ 17.000	
Papel absorbente	Unidad	10	\$ 770	\$ 7.700				\$ 7.700	
Parafilm	Unidad	1	\$ 144.126	\$ 144.126				\$ 144.126	
Tijera podadora	Unidad	1	\$ 15.990	\$ 15.990				\$ 15.000	
Mechero alcohol	Unidad	1	\$ 16.460	\$ 16.460				\$ 16.460	
Pinzas de borde plano acero inoxidable	Unidad	1	\$ 35.744	\$ 35.744				\$ 35.744	
Recipiente de vidrio	Unidad	3	\$ 3.000	\$ 9.000				\$ 9.000	
Mascarilla clinica	Unidad	50	\$ 60	\$ 1.500		\$ 1.500		\$ 3.000	
Guantes de nitrilo	Caja de 50 Uds	1	\$ 3.600	\$ 3.600				\$ 3.600	
Cinta de riego	unidad	1	\$ 20.000			\$ 20.000		\$ 20.000	
Hojas de bisturi N°11	Caja de 100 Uds	1	\$ 7.600			\$ 7.600		\$ 7.600	
Porta Bisturi N°3	Unidad	1	\$ 5.500			\$ 5.500		\$ 5.500	
Rociador	L	2	\$ 1.520			\$ 3.040		\$ 3.040	
Bomba de espalda	Unidad	1	\$ 75.990			\$ 75.990		\$ 75.990	
Bolsas plasticas	Unidad	70	\$ 150			\$ 10.500		\$ 10.500	
Bolsa Ziploc	20 Unidad	1	\$ 2.690			\$ 2.690		\$ 2.690	
Pipeta de 5ml	Unidad	1	\$ 57.286	\$ 57.286				\$ 57.286	
Pipeta de 20 ml	Unidad	1	\$ 27.729	\$ 27.729				\$ 27.729	
Pera de pipetas	Unidad	2	\$ 3.614	\$ 3.614			\$ 3.614	\$ 7.228	
Hidroxiido de cobre	25 kg	1	\$ 187.425			\$ 187.425		\$ 187.425	
Agar MBK	kg	5	\$ 65.000	\$ 162.500		\$ 162.500		\$ 325.000	
Glicena	L	2	\$ 146.683	\$ 293.366				\$ 293.366	
Placas petri 47 mm	Unidad	180	\$ 300	\$ 54.000				\$ 54.000	
Sustrato (Turba)	Bolsa de 20 litros	5	\$ 11.000			\$ 55.000		\$ 55.000	
Suelo vegetal (pasteurizado)	bolsa de 20 litros	5	\$ 1.500			\$ 7.500		\$ 7.500	
Sustrato (Perlita)	Bolsa de 20 litros	5	\$ 11.500			\$ 57.500		\$ 57.500	
Hipoclorito de sodio	2.5 litros	2	\$ 27.000	\$ 13.500		\$ 13.500		\$ 27.000	
Papel filtro	Caja de 100 Unidad	1	\$ 8.000	\$ 8.000				\$ 8.000	
Fertilizante (Multicote)	Bolsa 25 Kilos	1	\$ 58.000			\$ 58.000		\$ 58.000	
Flete para trasportar plantas terminadas		1	\$ 60.000			\$ 60.000		\$ 60.000	
Vialicos (Santiago)	dias	10	\$ 50.000	\$ 250.000		\$ 250.000		\$ 500.000	
Pasajes (Santiago)	dias	10	\$ 10.000	\$ 50.000		\$ 50.000		\$ 100.000	
<b>Total</b>				<b>\$ 1.207.115</b>	<b>\$ 0</b>	<b>\$ 1.438.359</b>	<b>\$ 0</b>	<b>\$ 2.645.474</b>	<b>2,64</b>

Gastos Administrativos	Cantidad	Precio unitario							
Insumos de oficina	Mensual	21	\$ 20.000	\$ 180.000		\$ 240.000		\$ 420.000	
Pagos de servicios (agua, luz)	Mensual	21	\$ 25.000	\$ 225.000		\$ 300.000		\$ 525.000	
Contador auditor	Honorario	21	\$ 50.000	\$ 450.000		\$ 600.000		\$ 1.050.000	
<b>Total</b>				<b>\$ 855.000</b>	<b>0</b>	<b>\$ 1.140.000</b>	<b>0</b>	<b>\$ 1.995.000</b>	<b>1,99</b>

	Año 1		Año 2		Valor Total de Proyecto (\$)
	Pecunario (\$)	No pecunario (\$)	Pecunario (\$)	No pecunario (\$)	
<b>Total</b>	<b>\$ 11.662.115</b>	<b>\$ 8.050.000</b>	<b>\$ 12.953.359</b>	<b>\$ 6.950.000</b>	<b>\$ 39.615.474</b>
<b>imprevistos (10%)</b>	<b>\$ 1.166.212</b>	<b>\$ 805.000</b>	<b>\$ 1.295.336</b>	<b>\$ 695.000</b>	<b>\$ 3.961.547</b>
<b>Total con imprevistos</b>	<b>\$ 12.828.327</b>	<b>\$ 8.855.000</b>	<b>\$ 14.248.695</b>	<b>\$ 7.645.000</b>	<b>\$ 43.577.021</b>
<b>Total Final</b>					<b>\$ 43.577.021</b>