

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



**PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO**

**TALLER DE TÍTULO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Control biológico de *Botryosphaeria dothidea*, causante de la enfermedad de cancro en nogales (*Juglans regia*).

KATERINE ANDREA CASTRO ARRIAZA

QUILLOTA, CHILE

2019

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÓNOMICAS Y DE LOS ALIMENTOS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

TALLER DE TÍTULO

Taller de título presentado como parte de los requisitos para optar al título de  
Ingeniero Agrónomo

**CONTROL BIOLÓGICO DE *BOTRYOSPHAERIA DOTHTIDIA*, CAUSANTE DE  
LA ENFERMEDAD DE CANCRO EN NOGALES (*JUGLANS REGIA*).**

KATERINE ANDREA CASTRO ARRIAZA

APROBACIÓN

	<b>Nombre</b>	<b>Firma</b>
Profesor Guía	Sr. EDUARDO OYANEDEL M. Ingeniero Agrónomo Ph. D.	_____

Quillota, marzo 2019

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Definición del problema .....	2
2.1. Contextualización económica del cultivo del nogal .....	2
2.2. Principales enfermedades del nogal en Chile .....	3
3. Hipótesis.....	5
3.1. Justificación de la hipótesis .....	5
4. Objetivos.....	6
4.1. Objetivo general .....	6
4.2. Objetivos específicos .....	6
5. Estado del arte.....	7
5.1. Las propiedades intrínsecas de la nuez han llevado a una mayor superficie y producción del nogal .....	7
5.2. El cancro es una enfermedad causada por hongos de la familia Botryosphaeriaceae que provoca muerte de las ramas .....	7
5.3. El hongo <i>B. dothidea</i> es el principal agente causal de la enfermedad de cancro en distintas especies.....	9
5.4. Las condiciones de estrés en las plantas contribuyen a la patogenicidad del hongo .....	10
5.5. Las estrategias de control son indispensables para evitar o controlar la expresión de <i>B. dothidea</i> sobre la madera .....	11
6. Metodología.....	13
6.1. Ubicación geográfica de los ensayos .....	13
6.2. Insumos fungibles a ocupar.....	13
6.3. Ensayos .....	13
6.4. Diseño experimental y análisis de datos.....	16
7. Bibliografía.....	17
8. Plan de trabajo.....	21
8.1. Etapa 0: Mayo a julio de 2019 .....	21

8.2. Etapa 1: Julio a agosto de 2019 .....	21
8.3. Etapa 2: Septiembre de 2019 a marzo de 2020 .....	21
8.4. Etapa 3: Septiembre de 2020 a marzo de 2021 .....	21
8.5. Etapa 4: Septiembre de 2021 a marzo 2022 .....	22
8.6. Etapa 5: Marzo a abril de 2022.....	22
9. Carta Gantt .....	23
10. Resultados esperados .....	24
11. Organización.....	25
11.1. Cargos y funciones.....	25
12. Presupuesto .....	28
12.1. Presupuesto total por cuenta (M\$).....	28
12.2. Presupuesto total por año (M\$) .....	29
13. Anexos.....	31

## 1. Resumen

El nogal inglés (*Juglans regia*) ha presentado un interés de producción y comercialización a nivel mundial, siendo Chile el cuarto país en la producción de nueces (ODEPA, 2017). Es por ello, que la presencia de factores tanto bióticos como abióticos que afecten la integridad de la planta va a repercutir económicamente. Uno de estos factores es la enfermedad de cancro en la madera causada por *Botryosphaeria dothidea*, hongo que activa su patogenicidad mediante condiciones de estrés, como heridas y condiciones de temperaturas y humedad que propician el crecimiento y desarrollo del patógeno causando necrosis y debilitamiento de la corteza hasta llegar al tejido vascular de las ramas estructurales como reproductivas, afectando el flujo de agua y nutrientes de los diferentes órganos de la planta (Manawasingle *et al.*, 2016). Dado esto, la enfermedad puede generar pérdidas de un 40 hasta 100% del cultivo del nogal (Jiang *et al.*, 2015). En el presente proyecto de investigación se realizarán tres ensayos, con diseño experimental completamente al azar tanto para las actividades *in vitro* mediante la utilización de placas Petri en el laboratorio de la PUCV<sup>1</sup> como para las actividades bajo condiciones controladas, y para el tercer ensayo bajo condiciones de campo, ubicado en la comuna de Requínoa, se realizará un diseño en bloques completamente al azar. El objetivo de los ensayos es poder evaluar y determinar la efectividad del control biológico de la enfermedad de cancro en plantas nogal, mediante el empleo de bacterias benéficas como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Brevibacillus laterosporus* en contraste con tratamientos en base a fungicidas comerciales. El proyecto tendrá una duración de 4 años y los datos recolectados serán evaluados mediante análisis de Varianza ( $p < 0,05$ ) y test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Como resultado del control biológico con las bacterias anteriormente mencionadas se espera disminuir la incidencia de la enfermedad de cancro en 30 puntos porcentuales en comparación a un testigo con 100% de incidencia, siendo una alternativa de control eficaz y sustentable. El presupuesto para llevar a cabo el proyecto tendrá un costo de \$331.056.00.

---

<sup>1</sup> Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

## 2. Definición del problema

El nogal inglés es una planta leñosa de hoja caduca, cuyo cultivo en Chile se concentra comercialmente en un 94% entre las regiones de Coquimbo y O'Higgins en el año 2016 (ODEPA, 2018). En esta superficie de producción las variedades dominantes son Chandler (70%) y Serr (24%). Por otro lado, en la temporada 2015/2016 se alcanzó un volumen de producción de 80 mil toneladas de nueces con cáscara, de las cuales se exporta cerca del 80% (ODEPA, 2017). La industria de nueces en Chile está experimentando un rápido e intenso crecimiento en cuanto a volúmenes y superficie, lo que se explica principalmente por la ventaja de poder mecanizar la cosecha. Además el aumento de los precios en las nueces se explica por el mercado tanto mundial como nacional en relación a la demanda y preferencias de los consumidores. Los daños causados en las plantas generan una disminución en el rendimiento en los campos de producción de nueces. Una de las causas de daño es la enfermedad de cancro en la madera causada por el hongo *B. dothidea*, que afecta el tejido vascular y cortical, generando pérdidas entre un 40 a 100% del cultivo (Jiang *et al.*, 2015). Estas pérdidas repercuten directamente en los volúmenes a transar a nivel nacional.

### 2.1. Contextualización económica del cultivo del nogal

Chile destaca por ser el cuarto país en la producción mundial de nueces, con aproximadamente 80 mil toneladas en el año 2016 y cerca de 100 mil toneladas para el año 2017, siendo el principal productor China con un millón de toneladas, seguido por Estados Unidos y Ucrania con 574 y 115 mil toneladas, respectivamente. Sin embargo, Chile lidera en cuanto a la tasa de crecimiento medio anual con un 20,1% desde la temporada 2012/2013 hasta el 2016/2017 (ODEPA, 2017). Según Chilenut (2018) se presenta una cosecha a contraestación con los países del hemisferio norte, por lo cual hay una elevada demanda de los principales agentes importadores de las nueces con cáscara que son Turquía (54,7% del total de las exportaciones chilenas) siendo el mayor consumidor con un promedio anual de 2 kg per cápita, seguido por los Emiratos Árabes Unidos e Italia. El precio de las exportaciones (FOB) de nueces ha aumentado desde la temporada 2013/2014 de USD \$81.095 mil a USD \$208.099 mil en 2017/2018 (ODEPA, 2018).

Según ODEPA (2018) la superficie plantada a nivel nacional con nogal fue de 37.788 hectáreas en el año 2016. El cultivo de nogal se está desplazando hacia el sur, contando con aproximadamente 300 y 10 hectáreas en la región de Araucanía y Los Ríos, respectivamente (ODEPA, 2017b). Según ODEPA (2013) los precios de venta nacional está alrededor de \$1.800 pesos productor, considerando un rendimiento de 5.000 kg/ha en la variedad Chandler.

La superficie en el cultivo de nogal se incrementa anualmente en tres mil hectáreas (Fedefruta, 2018) y en los últimos 10 años se han generado cambio de cultivo, en la cual se han arrancado parras y carozos para ser reemplazados por plantaciones de nogales. Esto se explica en parte a la temporada 2006/2007 que hubo un aumento en los precios de venta que desencadenó el cambio de cultivos por nogales en la zona centro del país. Además los nogales tienen la ventaja de ser altamente mecanizados disminuyendo la demanda de mano de obra en las labores anuales. También se debe considerar la alta demanda por los diversos formatos de las nueces, debido a la composición nutricional y compuestos bioactivos que generan respuesta positiva en la salud de las personas.

## **2.2. Principales enfermedades del nogal en Chile**

En el nogal es posible encontrar diversos tipos de enfermedades que generan pérdidas económicas y que están presentes en Chile. Aquellas que son causadas por bacterias incluye la peste negra y agallas de la corona; y hongos como la antracnosis y la pudrición del cuello y raíz (Loewe y González, 2001). Las enfermedades con mayor impacto e importancia económica son la pudrición de la raíz (*Phytophthora cinnamomi*), pudrición del cuello (*P. citrophthora* y *P. cactorum*) y la peste negra (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) (FIA y ChileNut, 2010). Sin embargo, Carús (2010) señala la presencia de enfermedades emergentes en huertos de nogales en la región de Valparaíso, como lo son los hongos de la madera, entre ellos *B. dothidea*. Además Agrios (2006) señala que el nogal, entre otras especies frutales, es hospedero de este agente causal *B. dothidea*. Se han reportado pérdidas de cultivo mayores al 50% por causa de *B. dothidea*, repercutiendo directamente en el rendimiento y pérdidas económicas (Jiang *et al.*, 2015). También cabe destacar que el cancro en la madera es una enfermedad de lento desarrollo, por lo que puede tardar entre siete a diez años en presentar lesiones de nivel económico (Latorre y Díaz, 2017). Por ello es fundamental conocer la enfermedad y

desarrollar herramientas de control, en caso de que esta enfermedad de cancro en la madera llegue a generar pérdidas relevantes para los productores. En países como China, Australia y Estados Unidos el hongo *B. dothidea* genera grandes daños en cultivos leñosos con importancia comercial. Por otro lado, los estudios de control de la enfermedad se han llevado a cabo en especies como la vid, níspero, álamo, peral, duraznero, manzano y nogal chino, pero no se han hecho reportes en la especie *J. regia*.



### **3. Hipótesis**

Mediante el control biológico con bacterias del género *Brevibacillus* y *Bacillus* es posible controlar la enfermedad de cancro (*B. dothidea*) en nogal, dado que logra mantener la integridad de la madera y con ello de la planta.

#### **3.1. Justificación de la hipótesis**

Chile ha tenido una tasa de crecimiento anual del 20,1% en la producción de nueces, desde el año 2012 al 2017 (ODEPA, 2017b). Los daños por *B. dothidea* en las plantas conllevan a un rápido envejecimiento, teniendo que arrancar plantas antes de lo previsto, por lo que se traduce en pérdidas económicas para los productores. Los daños ocasionados por *B. dothidea* generan pérdidas entre un 40 a 100% del cultivo bajo condiciones óptimas para que el hongo se vuelva patógeno, como son el estrés en las plantas (daño físico, estrés hídrico y deficiencia de nutrientes), la temperatura (20-25°C) y alta humedad relativa (Jiang *et al.*, 2015; Manawasingle *et al.*, 2016). Sin embargo, la investigación de la enfermedad causada por este microorganismo en el nogal inglés aún es muy limitada (Li *et al.*, 2016a), ya que no hay estudios sobre el control de la enfermedad de cancro específicamente en esta especie frutal. El control biológico es una alternativa para suprimir el crecimiento de *B. dothidea* y disminuir daños en ramas de nogal, ya que agentes biológicos como las bacterias del género *Bacillus* y *Brevibacillus* poseen compuestos bioactivos y enzimas antifúngicas que permiten el control de las pérdidas por el daño de la enfermedad de cancro en ramas del nogal (Jiang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016b).

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Probar que mediante la utilización de bacterias del género *Bacillus* y *Brevibacillus* se reduce la incidencia y severidad de la enfermedad de cancro en la madera del nogal.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Determinar la efectividad del control biológico utilizando bacterias del género *Bacillus* y *Brevibacillus* de forma *in vitro*.
2. Evaluar el efecto del control biológico preventivo con bacterias en plantas de nogal bajo condiciones de campo.
3. Determinar el efecto del control biológico preventivo del patógeno en nogal bajo condiciones de campo
4. Comparar la efectividad del control biológico con bacterias benéficas versus el control químico con fungicidas.
5. Evaluar la efectividad del control biológico de forma curativa sobre plantas de nogal en campo.

## **5. Estado del arte**

### **5.1. Las propiedades intrínsecas de la nuez han llevado a una mayor superficie y producción del nogal**

El cultivo de nogal ha tomado una gran importancia en los últimos años tanto en superficie, como en rendimiento y consumo. La semilla presenta propiedades benéficas para la salud y bienestar de las personas, sumado a una mayor preocupación y conciencia por parte de los consumidores en Chile y en el mundo. A nivel mundial, los principales productores de nuez son China (1.65 millones de toneladas), Irán (0.49 millones toneladas) y EE.UU (0,42 millones toneladas) (Chen *et al.*, 2014), concentrando casi el 80% de la producción de nueces sin cáscaras a nivel mundial (ProChile, 2017). Según ODEPA (2018) la superficie comercial en Chile aumentó en 27 mil hectáreas desde al año 2003 al 2017. Por otro lado, en el año 2016 la superficie se concentró en las regiones Metropolitana (14 mil ha), Valparaíso (6.7 mil ha), O'Higgins (6.5 mil ha) y Maule (5 mil ha). En cuanto a rendimiento, la variedad Chandler en la región Metropolitana con un marco de plantación de 7 x 7 m, puede llegar a tener una producción de 5.000 kg/ha (ODEPA, 2013). Por lo tanto, el mercado de la nuez se explica por un aumento en la demanda, ya que este fruto seco presenta una respuesta positiva a la salud cardiovascular, además de sus propiedades antioxidantes. Por ejemplo, en Chile en el año 2014 el consumo per cápita fue de 80 gramos, estimándose un consumo de 260 gramos en el año 2050 (ProChile, 2017). La alta demanda de nuez en la última década ha aumentado debido a sus propiedades beneficiosas para la salud y bienestar de las personas, llevado a un aumento en la superficie plantada.

### **5.2. El cancro es una enfermedad causada por hongos de la familia Botryosphaeriaceae que provoca muerte de las ramas**

La enfermedad de cancro en la madera en especies tanto frutícolas como forestales, puede ser causada por diferentes agentes patógenos. Las especies de la familia Botryosphaeriaceae se caracterizan por causar dicha enfermedad y presentan una sintomatología similar en los tejidos infectados por la producción de esporas. La enfermedad produce una necrosis del tejido afectado, con crecimiento desde la corteza del tronco hasta la ramilla de los árboles, así como también desde tejido cortical hacia tejido vascular (Li *et al.*, 2016). No obstante, Chen *et al.* (2014) demostraron que no solo

afecta estructuras de madera, sino que también es posible dañar hojas y frutos, presentando los síntomas de tizón y marchitamiento. La enfermedad de cancrrosis se inicia por medio de heridas, desarrollándose los síntomas que se caracterizan por zonas muertas en la corteza que se extienden tanto radial como longitudinalmente. Se presenta una mayor rapidez en el desarrollo de la sintomatología en ramas jóvenes (Agrios, 2006). Si bien la familia se caracteriza por presentar microorganismos específicos de la madera de diversos huéspedes, también puede haber incidencia en órganos vegetales como frutos y hojas. Por consiguiente, la sintomatología de tejido necrosado es un patrón común entre los hongos que pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae, por lo que se hace indispensable un análisis con mayor profundidad para diferenciar los agentes causales agrupados en la misma familia.

#### 5.2.1. Los daños ocasionados por la enfermedad generan pérdidas productivas y económicas

Como se mencionó en la sección 4.2, el daño causado por estos hongos de la madera - Botryosphaeriaceae- avanza desde la corteza hacia el tejido vascular, afectando el movimiento tanto ascendente como descendente del agua y de los nutrientes, causando daño al afectar ramillas que presentan potencial fructífero. Por ejemplo, el desarrollo del hongo *Botryosphaeria dothidea* -que afecta tanto brotes, racimos y puntos productivos como ramas de segundo orden- puede causar pérdidas desde un 40 hasta un 100% del cultivo con efectos directos sobre el rendimiento productivo (Jiang *et al.*, 2015). Manawasingle *et al.* (2016) indican que las condiciones de estrés en la planta, tanto a nivel de suelo como aérea, se activa la patogenicidad del hongo llegando a causar incluso la muerte de la planta lo que repercute en pérdidas económicas. Erza *et al.* (2017) señalan que al presentarse la interacción huésped-patógeno a nivel de madera se perjudica la longevidad del árbol, debido a que estos microorganismos de la familia Botryosphaeriaceae a pesar de nutrirse a expensas del árbol generan una descomposición debilitadora, evitando el soporte de cargas como la fruta. Un estudio en China demostró que el efecto de gomosis (causada por familia Botryosphaeriaceae) en árboles de hoja caduca se presentó de un 46 a 100% de la producción disminuyendo la cosecha de la fruta (Erza *et al.*, 2017). Por ende, los daños necróticos causados por estos hongos de la madera impactan directamente sobre el rendimiento, generando un daño

económico en huertos frutales, obligando a su control para disminuir las lesiones en la madera.

### 5.2.2. Las distintas especies de la familia generan confusión al determinar el agente causal, por presentar los mismos síntomas

Una misma enfermedad puede ser causada por diversos agentes causales, ya sea de diferentes o igual género, incluso de diferentes familias. Sin embargo, existe una alta complejidad a la hora de querer determinar el verdadero agente causal mediante una evaluación morfológica; esto se debe a una similitud de síntomas entre ciertas especies. Según Manawasingle *et al.* (2016) la familia Botryosphaeriaceae presenta un total de 17 géneros con 195 especies, de los cuales los géneros más relevantes son *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*. Por lo tanto, la identificación resulta difícil mediante las características morfológicas (tamaño y forma de los conidios), porque entre género-especie, o bien, entre géneros existe una estrecha relación del cuerpo estructural de los hongos anteriormente señalados (Lawrence, *et al.*, 2017). Los grandes géneros de la familia Botryosphaeriaceae se caracterizan por presentar acosporas halianas a oscuras, ascomas multiloculares y una diversidad de morfos asexuales que generalmente carecen de cubierta mucoide y apéndice apical (Slipper *et al.*, 2013). Por ende, no se pueden identificar especies de la familia Botryosphaeriaceae mediante la técnica morfológica. Asimismo, ante cualquier estudio se tiene que corroborar la especie de interés por medio de un análisis molecular.

### **5.3. El hongo *B. dothidea* es el principal agente causal de la enfermedad de cancro en distintas especies**

Es importante conocer a la especie de interés en profundidad, en cuanto a características, métodos de acción y ciclo de vida, ya que se puede obtener información detallada a la hora de querer controlar el agente causal de la enfermedad de cancro. El microorganismo *B. dothidea* pertenece a los hongos superiores que Agrios (2006) clasifica en la subdivisión Ascomycotina, clase Pyrenomycetes y orden Sphaeriales; se caracteriza por presentar la estructura reproductora en forma de saco que no está totalmente cerrado. Por otro lado, *B. dothidea* presenta anamorfo con género distinto (*Fusicoccum aesculi*), donde Martos *et al.* (2008) señala que la fase asexual es común de encontrar en la naturaleza. Las características morfológicas son descritas por Lawrence *et al.* (2017)

como conidios fusiformes halianos, con paredes delgadas que pueden volverse septadas y tomar coloración oscura con la edad. A lo largo del ciclo de vida del hongo es posible identificar dos interacciones entre el microorganismo y la especie leñosa. La primera, como endófitos en donde vive dentro de los tejidos de las plantas de forma asintomática; la segunda, cuando la planta sufre distintos grados de estrés se desarrolla el rol patogénico, es decir, sintomático causando la enfermedad de cancro en la madera (Slippers *et al.*, 2013). Sin embargo, Manawasingle *et al.* (2016) señalan que el otro cambio -de endófito a saprófito- está dado por condiciones abióticas como temperatura y humedad principalmente; otra forma de volverse patógeno es mediante condiciones bióticas como microorganismos, donde afloran nuevas especies y se genera una competencia para poder mantenerse con vida a lo largo del tiempo en la planta leñosa. Un mecanismo de acción que puede explicar la patogenicidad del hongo es a través de la síntesis de metabolitos secundarios estudiado por Martos *et al.* (2008); ellos comprobaron que las fitotoxinas producidas por la especie *B. dothidea* inducen síntomas de lesión necrótica en el tejido de tabaco *in vitro*. Las formas de crecimiento y desarrollo de las diferentes etapas del ciclo de vida del hongo son relevantes para el estudio de la enfermedad.

#### **5.4. Las condiciones de estrés en las plantas contribuyen a la patogenicidad del hongo**

Las especies leñosas como frutales, forestales e inclusive las de bosques naturales se encuentran creciendo bajo condiciones edafoclimáticas variables, las cuales influyen directamente en el comportamiento de las plantas. Es por ello que variaciones (temperatura, humedad o manejos realizados en la planta) a nivel de estrés generan una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos. Según Manawasingle *et al.* (2016) las condiciones de estrés en las plantas por factores como la temperatura, radiación, humedad relativa, sequía o anegamiento, favorecen la colonización de la planta por parte del patógeno. Sin embargo, también se puede generar estrés mediante daño físico como la poda, agravado con la presencia de lluvias (Manawasingle *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2017), y a través de aperturas naturales como estomas, lenticelas o tejido enfermo (Manawasingle *et al.*, 2016). Por último Manawasingle *et al.* (2016) señalan que el cambio climático puede ser un factor que contribuya al desarrollo de especies de la familia Botryosphaeriaceae, principalmente por un aumento de las temperaturas que propician

del crecimiento y la distribución de los hongos. Por lo tanto, existen diferentes formas de tensión en las plantas en las que se favorece la invasión de estos microorganismos.

### **5.5. Las estrategias de control son indispensables para evitar o controlar la expresión de *B. dothidea* sobre la madera**

El control químico es uno de los métodos de control más eficaz, utilizado para reducir el crecimiento micelial de *B. dothidea* en distintas especies frutales. De hecho, para poder reducir el 50% del hongo *in vitro* en madera de nogal chino (*Carya cathayensis*), fue efectivo añadir concentraciones menores a 1 mg/L de ingredientes activos como Tebuconazol y Difenconazol (Dai *et al.*, 2017). No obstante, solo el primer fungicida presenta registro para plantas leñosas como vid, palto, almendro, duraznero y pistacho en Chile (SAG, 2018). Según Pitt *et al.* (2012), el fungicida que presentó mayor eficacia de control sobre *B. dothidea in vitro* en *Vitis vinifera* fue Tebuconazol con 0,03 mg/L. Un experimento en ramas de manzano dejó clara evidencia de la efectividad del Benomilo, ya que este componente de origen químico -comparado con extractos y aceites orgánicos como ajo y clavo de olor- logró reducir el tamaño de la lesión de la enfermedad de cancro (Brown and McManus, 2000). Por ende, los fungicidas son una opción a considerar, ya que tienen un resultado positivo sobre el control de la enfermedad de cancro; sin embargo no hay estudios sobre la respuesta a de fungicidas en ramas de *J. regia*.

#### 5.5.1. El control biológico es una alternativa a la utilización de productos químicos

La utilización de microorganismos como bacterias sobre la patogenicidad de *B. dothidea* ha sido contrastado con productos químicos. En un experimento en ramas de álamo se describió la eficacia de una cepa bacteriana *Brevibacillus laterosporus*, donde se logró controlar entre un 70 a 90% de las lesiones del hongo en las ramas de álamo bajo condiciones controladas (Jiang *et al.*, 2015). Por otro lado, la capacidad de inhibición *in vitro* de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sobre el micelio del patógeno, se comprobó que logra disminuir el crecimiento en un 50% en comparación con un testigo con 100% de crecimiento del micelio de *B. dothidea* (Cheng, *et al.*, 2016). Li *et al.* (2016b) corroboraron la eficacia de la *B. amyloliquefaciens* tras lograr una disminución del 20% la incidencia de la enfermedad de cancro en ramas de duraznero, en comparación a los tratamientos con agua y fungicida Carbendazol, siendo este último explicado como una respuesta de resistencia al fungicida por parte del hongo patógeno.

El fungicida Benomilo, es otro compuesto químico utilizado para el control de cancro en la agricultura, sin embargo no logra disminuir la incidencia de la enfermedad de cancro en comparación al control biológico con *B. amyloliquifaciens* (Brown and McManus, 2000; Li *et al.*, 2016b). Los microorganismos antifúngicos son efectivos tanto *in vitro* como en campo para el control de *B. dothidea*. Sin embargo no se han realizado estudios del control biológico *in vitro* en *J. regia*, como tampoco se ha demostrado la efectividad del control de *B. dothidea* mediante bacterias bajo las condiciones edafoclimáticas de Chile.



## 6. Metodología

### 6.1. Ubicación geográfica de los ensayos

El proyecto de investigación constará de un total de 4 ensayos, los cuales se realizarán en dos áreas geográficas, que se detallan a continuación:

- a) La Palma, localidad situada en la comuna y provincia de Quillota de la región de Valparaíso, Chile. En el laboratorio de fitopatología de la PUCV se llevará a cabo el primer ensayo del proyecto. Presenta una distancia de 4 km a la ruta 60 y 6 km al centro de Quillota.
- b) Requínoa, comuna de la provincia de Cachapoal de la región del Libertador General Bernardo O'Higgins, el cual presenta un clima cálido supratermal con régimen de humedad semi árido. Acumulación anual de 1146 horas frío y 1979 grados días con una precipitación anual de 472 mm (Universidad de Chile y AGRIMED, 2017). En la comuna de Requínoa se llevarán a cabo los ensayos 2, 3, 4 y 5 que corresponden a actividades en campo.

### 6.2. Insumos fungibles a ocupar

Para evaluar la incidencia de la enfermedad de cancro en campo se utilizará el cultivo de nogal inglés variedad Chandler, ya que a nivel nacional es la variedad con mayor superficie plantada (ODEPA, 2017). En los ensayos en campo se utilizarán plantas de nogal adulta pertenecientes a la agrícola Valles del Norte.

Para el control biológico en los diversos ensayos, se utilizarán placas de Petri con colonias de las bacterias *B. amyloliquefaciens* y *B. laterosporus*, las cuales serán obtenidas de la colección del laboratorio de fitopatología de la PUCV, al igual que el agente causal de la enfermedad de cancro, *B. dothidea*.

Para el tratamiento químico se utilizará el fungicida Benomilo (Polyben 50 WP) correspondiente a la empresa Anasac Chile S.A.

### 6.3. Ensayos

En el proyecto de investigación sobre el control biológico de la enfermedad de cancro (*B. dothidea*) en nogal con bacterias benéficas (*B. amyloliquefaciens* y *B. laterosporus*), se

realizarán cuatro ensayos de forma secuencial: 1) evaluación *in vitro* del control que ejercen las bacterias sobre el patógeno, 2) evaluar el control biológico de *B. dothidea* en plantas de nogal bajo condiciones controladas, 3) determinar en campo el efecto del control biológico sobre *B. dothidea* de forma preventiva contrarrestando con fungicida, 4) evaluar el control biológico de forma curativa en campo.

#### 6.3.1. Primer ensayo: Evaluación *in vitro* del control biológico

Para llevar a cabo el primer ensayo de investigación, se realizarán cinco tratamientos: (T0) *B. dothidea*; (T1) *B. dothidea* y *B. amyloliquefaciens*; (T2) *B. dothidea* y *B. laterosporus*; (T3) *B. dothidea* con ambas bacterias; (T4) *B. dothidea* y Benomilo.

Se empleará la técnica de cultivo doble (Pitt *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016) y para ello, se iniciará con la preparación del medio cultivo 15,7 g de PDA deshidratada (frasco de 500 g marca Merck) por 400 ml de agua destilada en matraces de Erlenmeyer de 500 ml, los cuales se sellarán con algodón hidrófobo y papel aluminio para llevar al autoclave y esterilizar mediante vapor de agua. Posteriormente, se enfriarán y se agregará el medio cultivo preparado a las placas Petri de 9 cm de poliestireno estériles para que solidifique. Mediante las placas madres con cada microorganismo se purificarán mediante el cultivo de un cuadrado de 1 cm sobre una nueva placa con medio de cultivo para incubar durante 3 días a 28°C. Se prepararán soluciones madres con el fungicida químico, para ello se suspenderá en 1 ml de acetona para luego modificar el medio de cultivo agregando 1 mg/L de i.a. (Pitt *et al.*, 2012). Para realizar el ensayo como tal, se sembrará un tapón de PDA con *B. dothidea* (1cm) en el centro de la placa Petri de PDA, luego se adicionarán dos tapones de 1 cm de agar del mismo tratamiento a una distancia de 2 cm del patógeno (Jiang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016). Se sellarán los bordes de la placa con parafilm y se identificará la placa con la fecha y tratamiento realizado (ejemplo: fecha-T1) para llevar a la incubadora por 3 días a 28°C. Finalizado el tiempo de incubación se tomarán datos 3 veces con frecuencia de 5 días, se analizarán los datos y se elaborará un informe del ensayo *in vitro* con los resultados obtenidos.

#### 6.3.2. Segundo ensayo: Evaluación del control biológico bajo condiciones controladas

En el segundo ensayo de investigación, se realizarán nueve tratamientos: (T0) *B. dothidea*; (T1) Agua destilada; (T2) *B. amyloliquefaciens*; (T3) *B. laterosporus*; (T4)

Benomilo; (T5) *B. dothidea* y *B. amyloliquefaciens*; (T6) *B. dothidea* y *B. laterosporus*; (T7) *B. dothidea* con ambas bacterias; (T8) *B. dothidea* y Benomilo.

Cada tratamiento se realizará en un árbol de nogal adulto, del cual se seleccionarán tres ramas al azar como unidad de muestreo. El control químico se preparará según recomendación de la etiqueta del fungicida y para el control biológico se utilizará 5x10<sup>8</sup> UFC/ml. Para el control positivo se inocularán las plantas con *B. dothidea* mediante tapón de 1 cm de agar con micelio del hongo. Cada rama seleccionada se realizará una herida mediante un bisturí donde de forma manual se aplicará cada tratamiento de forma preventiva, es decir, se asperjará el fungicida o bacteria benéfica y luego de dos horas se inoculará el patógeno, para tapar por completa la rama con una bolsa plástica (Michailides, 1991). Se identificará cada rama tratada con una etiqueta indicando fecha y tratamiento realizado. Los datos serán recolectando durante todo el periodo de primavera-verano con una frecuencia de siete días.

#### 6.3.3. Tercer ensayo: Evaluación del control biológico en campo de forma preventiva

En el tercer ensayo de investigación, se realizarán seis tratamientos: (T0) *B. dothidea*; (T1) Agua destilada; (T2) *B. dothidea* y *B. amyloliquefaciens*; (T3) *B. dothidea* y *B. laterosporus*; (T4) *B. dothidea* con ambas bacterias; (T5) *B. dothidea* y Benomilo.

El procedimiento y recolección de datos se detallan en el apartado 6.3.2., con la diferencia de que en el tercer ensayo no se evaluará el control biológico bajo condiciones controladas, por lo que luego de inocular con el patógeno se identificará cada rama (fecha y tratamiento realizado) y no se utilizará la bolsa plástica.

#### 6.3.4. Cuarto ensayo: Evaluación del control biológico en campo de forma curativa

En el cuarto ensayo de investigación, se realizaran tratamientos, procedimientos y recolección de datos como se detallan en el apartado 6.3.3, con la diferencia de que los tratamientos serán realizados de forma curativa, es decir, se inoculará con el patógeno y luego de dos horas se asperjará con fungicida o bacteria benéfica, según el tratamiento que se esté realizando.

#### 6.4. Diseño experimental y análisis de datos

Se realizará un diseño experimental completamente al azar para el primer y segundo ensayo y un diseño experimental en bloques completamente al azar para el tercer y cuarto ensayo.

El primer ensayo constará de diez repeticiones, siendo la unidad experimental y de muestreo una placa Petri de 9 cm y se evaluará el crecimiento del micelio de *B. dothidea* en mm y el porcentaje de inhibición por parte de los diversos controles del hongo, considerando el 100% un crecimiento del patógeno de 20 mm desde el centro de la placa.

En el segundo ensayo se realizarán tres repeticiones, considerando como unidad experimental un árbol de nogal adulto y como unidad de muestreo tres ramas al azar. La variable respuesta será el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad de cancro en la madera. El marco de plantación será de 7x7 m, que corresponde al implementado en la agrícola y se tendrá un total de 60 plantas (2.940 m<sup>2</sup>) para el ensayo.

Para el tercer y cuarto ensayo se realizarán tres repeticiones y la unidad experimental corresponderá a un total de nueve árboles, de los cuales se seleccionarán 3 ramas al azar de un solo árbol para la unidad de muestreo. En ambos ensayos se evaluará el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad. El marco de plantación será el establecido por la agrícola y se tendrá un total de 216 árboles (10.584 m<sup>2</sup>) por cada ensayo.

Para cuantificar la incidencia y severidad de la enfermedad para los ensayos en campo, se utilizarán las siguientes fórmulas:

$$A) \textit{ Severidad (\%)} = \frac{\sum(\textit{nivel enfermedad} \times \textit{n}^\circ \textit{ lesiones})}{\textit{n}^\circ \textit{ total lesiones} \times \textit{mayor nivel}} \times 100$$

$$B) \textit{ Incidencia (\%)} = \frac{\textit{Plantas con síntomas}}{\textit{Total de plantas}} \times 100$$

Se otorgarán valores para determinar el nivel de lesión según longitud del cancro para efectos de cálculo: 0 sin lesión; 1 lesión < 1 cm; 2 lesión 1-2 cm; 3 lesión 2-3 cm; 3 lesión > 3 cm y en los diferentes tratamientos.

Los datos serán evaluados mediante análisis de varianza (ANDEVA) y se utilizará el test de separación de medias de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) con  $p \leq 0,05$ .

## 7. Bibliografía

Agrios, G. 2006. Fitopatología. p. 388. Editorial Limusa, Ciudad de México, México.

Asociación de Productores y Exportadores de Nueces de Chile. 2018. Nuez de nogal: Información para compradores/importadores. Disponible en: <http://www.chilenut.cl/index.php?seccion=nuez-de-nogal>. Leído el 24 de mayo del 2018.

Brown, D., and P. McManus. 2000. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease* 84: 1031-1037

Carús, M. 2017. Manejos fitosanitarios del nogal. Disponible en: [http://www.chilenut.cl/docs/curso\\_FIA\\_2017/Manejos\\_fitosanitarios\\_carus\\_los\\_andes.pdf](http://www.chilenut.cl/docs/curso_FIA_2017/Manejos_fitosanitarios_carus_los_andes.pdf). Leído el 25 de mayo del 2018.

Chen, S., D. Morgan, J. Hasey, K. Anderson and T. Michailides. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. *Plant Disease* 98 (5):636-652.

Cheng, M., Q. Xu, Y. Li, H. Qin and J. Chen. 2016. Antifungal activity and identification of active compounds of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp *plantarum* against *Botryosphaeria dothidea*. *Forest Pathology* 46 (6): 561-568.

Dai, D., H. Wang, Y. Wang and C. Zhang. 2017. Management of Chinese hickory (*Carya cathayensis*) trunk canker through effective fungicide application programs and baseline sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to trifloxystrobin. *Australasian Plant Pathology* 46: 75-82.

Erza, D., M. Hershovich and D. Shtienberg. 2017. Insights into the etiology of gummosis syndrome of deciduous fruit trees in Israel and its impact on tree productivity. *Plant Disease* 101 (8): 1354-1361.

Federación de Productores de Fruta de Chile. 2018. Producción de nueces en Chile anotaría récord de 130 mil toneladas en 2018. Disponible en: <https://fedefruta.cl/produccion-de-nueces-en-chile-anotaria-record-de-130-mil-toneladas-en-2018/>. Leído el 24 de mayo del 2018.

Fundación para la Innovación Agraria y Asociación Gremial de Productores y Exportadores de Nueces de Chile. 2010. Producción de nueces de nogal. Disponible en: <https://frutales.files.wordpress.com/2011/01/022-produccion-de-nueces-de-nogall.pdf>.

Leído el 25 de mayo del 2018.

Jiang, H., X. Wang, C. Xiao, W. Wang, X. Zhao, J. Sui, R. Sa, T. Guo and X. Lui. 2015. Antifungal activity of *Brevibacillus laterosporus* JX-5 and characterization of its antifungal components. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 1605-1618.

Latorre, B., y A. Díaz. 2017. Cancrosis de la madera en vides y efectividad de control. Disponible en: <http://www.redagricola.com/cl/cancrosis-la-madera-vides-efectividad-control/>. Leído el 25 de mayo del 2018.

Lawrence, D., F. Hand, W. Gubler and F. Trouillas. 2017. Botryosphaeriaceae species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp nov. *Fungal Biology* 121 (4): 347-360.

Li, G., F. Liu, J. Li, Q. Liu and S. Chen. 2016a. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English walnut in China. *Journal of Phytopathology* 164: 348-353.

Li, X., Y. Zhang, Z. Wei, Z. Guan, Y. Cai and X. Liao. 2016b. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *Plos One* 11 (9): 1-22.

Loewe, V., y M. González. 2001. Nogal común (*Juglans regia*): Una alternativa para producir madera de alto valor. 165 p. Fundación para la Innovación Agraria, Santiago, Chile. <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/145538>. Leído el 25 de mayo del 2018.

Manawasinghe, I., A. Phillips, K. Hyde, K. Chethana, W. Zhang, W. Zhao, J. Yan and X. Li. 2016. Mycosphere essays 14: assessing the aggressiveness of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. *Mycosphere* 7 (7): 883-892.

Martos, S., A. Andolfi, J. Luque, L. Mugnai, G. Surico and A. Evidente. 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on

grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121 (4): 451-461.

Michailides, T., D. Morgan, D. Felts, R. Puckett, and M. Luna. 2014. Dealing with *Botryosphaeria* in Walnuts. Available at <http://ccfruitandnuts.ucanr.edu/files/239150.pdf>. Accessed 25 de septiembre de 2018.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2013. Ficha técnico-económica: Nogal, región Metropolitana. Disponible en [http://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/09/Ficha\\_costo\\_nogal\\_chandler\\_metropolitana\\_2013.pdf](http://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/09/Ficha_costo_nogal_chandler_metropolitana_2013.pdf). Leído el 11 de mayo del 2018.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2017. Nueces: Chile la mayor tasa de crecimiento productivo medio anual. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/wpcontent/uploads/2017/11/Nueces.pdf>. Leído el: 24 de mayo del 2018.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2018. Boletín fruta fresca: nuez. Disponible en: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiYWY5YTQwYjEtNWY2YS00OGI3LWJhODctMjc2NDUyMWY0NjdiliwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIslmMiOjR9>. Leído el 24 de mayo del 2018.

Pitt, W., M. Sosnowski, R. Huang, Y. Qiu, C. Steel and S. Savocchia. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapesvines. *Plant Disease* 96: 1303-1308.

ProChile. 2017. Nueces del nogal, sin cáscara. Mercado internacional. Estudio Enexpro. Disponible en: [https://www.prochile.gob.cl/wp-content/uploads/2017/05/Nueces\\_ENEXPRO.pdf](https://www.prochile.gob.cl/wp-content/uploads/2017/05/Nueces_ENEXPRO.pdf). Leído el 11 de mayo del 2018.

Servicio agrícola y ganadero. 2018. Lista de plaguicidas autorizados. Disponible en: <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/plaguicidas-y-fertilizantes/78/registros>. Leído el 30 de abril del 2018.

Slippers, B., E. Boissin, A. Phillips, J. Groenewald, L. Lombard, M. Wingfield, A. Postma, T. Burgess and P. Crous. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaerales*: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76: 31-49.

Universidad de Chile y AGRIMED. 2017. Atlas agroclimático de Chile, estado actual y tendencias del clima, tomo III: regiones de Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins y Maule. 205 p. FIA, Santiago, Chile.



## **8. Plan de trabajo**

### **8.1. Etapa 0: Mayo a julio de 2019**

Se realizarán los contratos con la Agrícola Valles del Norte, así como también la selección del personal para formar parte del equipo de trabajo del proyecto, además de efectuar las compras de materiales e insumos para las diversas actividades administrativas, de laboratorio y en campo.

### **8.2. Etapa 1: Julio a agosto de 2019**

Se comenzará con el primer ensayo de evaluación *in vitro* en el laboratorio de fitopatología de la PUCV, donde se llevarán a cabo actividades como la purificación de los microorganismos, preparación del medio de cultivo, realización de los tratamientos previamente explicados en el apartado 6.3.1., y su posterior evaluación cuantitativa para la elaboración de un informe con los resultados obtenidos del experimento *in vitro*.

### **8.3. Etapa 2: Septiembre de 2019 a marzo de 2020**

Se realizará el segundo ensayo y para ello se comenzará con el montaje y desarrollo de las actividades en la agrícola. En los meses de primavera y verano se registrará la incidencia de la enfermedad de cancro sobre las plantas tratadas. A finales del año 2019 se redactará y presentará el primer informe financiero del proyecto. Por último, en el mes de marzo se redactará un informe con los resultados del experimento realizado bajo condiciones controladas.

### **8.4. Etapa 3: Septiembre de 2020 a marzo de 2021**

Se continuará con el tercer ensayo en campo, donde se realizará todo el montaje y desarrollo de las actividades como son la elección de plantas, realización e identificaciones de los tratamientos como tal y la recolección de datos. Se elaborará un informe financiero a finales del año 2020 y se finalizará el tercer ensayo en el mes de marzo de 2021 mediante un informe con el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

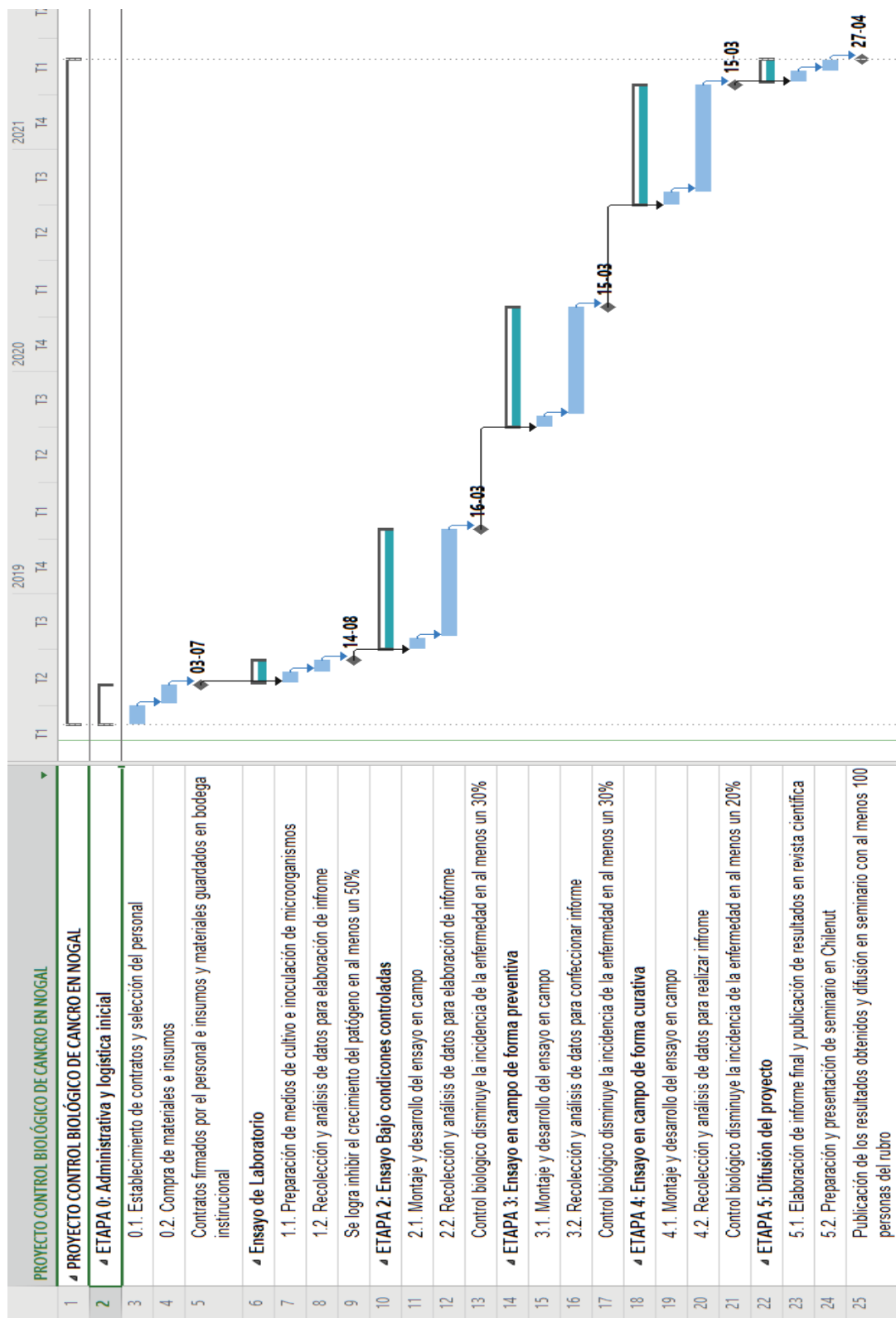
**8.5. Etapa 4: Septiembre de 2021 a marzo 2022**

Durante los meses de septiembre a marzo se continuará con el montaje y desarrollo del cuarto y último ensayo de investigación del proyecto. Se realizará un informe financiero para finales del año 2021 y un informe con los resultados obtenidos del cuarto ensayo en campo.

**8.6. Etapa 5: Marzo a abril de 2022**

En la última etapa del proyecto de investigación, se redactará un informe final con todos los resultados y análisis estadísticos de cada ensayo realizado, el cual será publicado en la revista científica Plant Disease y se finalizará con un seminario en Chilenut.

## 9. Carta Gantt



### 10. Resultados esperados

	Objetivos específicos	Resultados esperados
<b>OB1</b>	Determinar la efectividad del control biológico utilizando bacterias del género <i>Bacillus</i> y <i>Brevibacillus</i> de forma <i>in vitro</i> .	Control biológico disminuye el crecimiento <i>in vitro</i> del patógeno en 10 mm respecto al control con 20 mm de crecimiento micelial.  Control biológico disminuye en 50 puntos porcentuales con respecto a un testigo con 100% de crecimiento del hongo.
<b>OB2</b>	Evaluar el efecto del control biológico preventivo con bacterias en plantas de nogal bajo condiciones de campo.	Tratamientos solo con las bacterias o fungicida no presentan presencia de cancro o debilitamiento de la madera.  Control biológico disminuye la incidencia de la enfermedad entre 20 a 30 puntos porcentuales respecto a un testigo con 100% de incidencia de cancro.
<b>OB3</b>	Determinar el efecto del control biológico preventivo del patógeno en nogal bajo condiciones de campo	Control biológico disminuye la incidencia de la enfermedad de cancro entre 20 a 30 puntos porcentuales respecto a un control con 100% de incidencia de la enfermedad.
<b>OB4</b>	Comparar la efectividad del control biológico con bacterias benéficas versus el control químico con fungicidas.	Control biológico disminuye la incidencia de la enfermedad entre 20 a 30 puntos porcentuales, mientras que el control químico logra disminuir entre 5 a 10 puntos porcentuales, ambos con respecto a un testigo con 100% de incidencia.
<b>OB5</b>	Evaluar la efectividad del control biológico de forma curativa sobre plantas de nogal en campo.	Control biológico logra disminuir la incidencia de la enfermedad entre 15 a 20 puntos porcentuales, respecto a un testigo con 100% de incidencia de cancro.

## 11. Organización

### 11.1. Cargos y funciones

Formación /grado académico	Cargo en el proyecto	Funciones (N°)	Costo del personal (MM\$)	Aporte del FONDO CONCURSABLE (MM\$)
Ing. Agrónomo Ph. D. en Fitopatología Frutal	Director general	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Formular y ejecutar el proyecto.</li> <li>2. Coordinar y tomar decisiones en relación a contratos y compra de insumos y materiales.</li> <li>3. Coordinar el recurso humano.</li> <li>4. Planificar los diversos tratamientos para el control de la enfermedad.</li> <li>5. Dirigir y participar de la difusión de resultados.</li> </ol>	1.5	0.75
Ing. Agrónomo Ph. D. en Fisiología Frutal	Director alterno	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colaborar en la formulación, ejecución y gestión del proyecto.</li> <li>2. Coordinar las relaciones con los proveedores de insumos y empresas asociadas al proyecto.</li> <li>3. Diseñar los experimentos de los ensayos <i>in vitro</i> y en campo.</li> <li>4. Participar de la difusión de resultados.</li> </ol>	1.5	0.75

Ing. Agrónomo Ph. D. en Frutales de Hoja Caduca	Investigador principal	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ejecutar y gestionar los diversos ensayos.</li> <li>2. Analizar los resultados obtenidos</li> <li>3. Elaborar planillas Excel y elaboración de informes semestrales con el análisis estadístico de los resultados obtenidos.</li> </ol>	1.0	0.75
Ing. Agrónomo Ph. D. en Epidemiología y control de enfermedades en plantas	Investigador asistente	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Supervisar las labores del jefe de campo y laboratorio.</li> <li>2. Gestionar y supervisar el montaje y desarrollo de los ensayos.</li> <li>3. Recolección y análisis de datos.</li> </ol>	1.0	0.75
Ing. Agrónomo MSc. Agropecuarias	Jefe de campo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Supervisar las actividades en campo.</li> <li>2. Recolección de datos en campo.</li> <li>3. Colaborar con el análisis de los datos recolectados.</li> </ol>	0.7	0.3
Técnico Bioquímico	Jefe de laboratorio	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Montaje y desarrollo del ensayo en laboratorio.</li> <li>2. Recolección de datos.</li> </ol>	0.5	0.5
Técnico Agrícola	Encargado de campo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Montaje y desarrollo de los ensayos en campo.</li> </ol>	0.6	0.6

Contador Auditor	Contador	1. Gestionar el estado financiero por año del proyecto. 2. Efectuar pagos mensuales al personal del proyecto. 3. Elaboración de informes anuales.	0.9	0.9
---------------------	----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----	-----

## 12. Presupuesto

### 12.1. Presupuesto total por cuenta (M\$)

	Cuenta	Fondo Concursable	Aporte PUCV		Total (M\$)
			Pecuniario	No Pecuniario	
<b>A.</b>	Total Recursos Humanos	169.710	0	72.000	241.710
<b>B.</b>	Total Subcontratos	0	0	0	0
<b>C.</b>	Total Capacitación	0	0	0	0
<b>D.</b>	Total Misiones Tecnológicas	1.363	0	650	2.013
<b>E.</b>	Total Difusión	3.000	0	100	3.100
<b>F.</b>	Total Gastos de Inversión	763	0	0	763
<b>G.</b>	Total Gastos de Operación	480	0	25.500	25.980
<b>H.</b>	Total Gastos de Administración	0	0	0	0
	Porcentaje de aporte	64	27	9	100
<b>TOTAL (M\$)</b>		<b>175.316</b>	<b>72.650</b>	<b>25.600</b>	<b>273.566</b>



**12.2. Presupuesto total por año (M\$)**

	<b>Cuenta</b>	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>	<b>Año 4</b>	<b>Total (M\$)</b>
<b>A.</b>	Total Recursos					
	Humanos					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	60.427,5	60.427,5	60.427,5	60.427,5	241.710
<b>B.</b>	Total Subcontratos					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
<b>C.</b>	Total Capacitación					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
<b>D.</b>	Total Misiones					
	Tecnológicas					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	503,25	503,25	503,25	503,25	2.013
<b>E.</b>	Total Difusión					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	775	775	775	775	3.100
<b>F.</b>	Total Gastos de					
	Inversión					
	<i>Pecuniario</i>	190,75	190,75	190,75	190,75	763
	<i>No Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
<b>G.</b>	Total Gastos de					
	Operación					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	6.495	6.495	6.495	6.495	25.980
<b>H.</b>	Total Gastos de					
	Administración					
	<i>Pecuniario</i>	0	0	0	0	0
	<i>No Pecuniario</i>	0	0	0	0	0

	<b>Total (M\$)</b>					
	<i>Pecuniario</i>	190,75	190,75	190,75	190,75	763
	<i>No Pecuniario</i>	68.200,8	68.200,8	68.200,8	68.200,8	272.803

### 13. Anexos

#### 13.1. Costo total del proyecto

ITEM	COSTO TOTAL M\$	FINANCIAMIENTO			
		INSTITUCIONAL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		FONDEF M\$
			INCREMENTAL (*)	NO INCREMENTAL (*)	
HONORARIOS, INCENTIVOS, REMUNERACIONES	252.510	72.000	0	10.800	169.710
SUBCONTRATOS	5.000	0	0	5.000	0
CAPACITACIÓN	0	0	0	0	0
EQUIPOS	11.013	650	0	9.000	1.363
SOFTWARE	316	268	0	0	48
MATERIAL FUNGIBLE	7.013	0	6.250	0	763
PASAJES	0	0	0	0	0
VIÁTICOS	0	0	0	0	0
SEMINARIOS, PUBLICACIONES Y DIFUSIÓN	3.100	100	0	0	3.000
PROPIEDAD INTELECTUAL E INDUSTRIAL	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	25.980	25.500	0	0	480
GASTOS GENERALES 8% Máx. (ver nota N°1)	3.543	0	0	0	3.543
GASTOS DE ADM. SUPERIOR 12% Máx. (ver nota N°2)	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>308.475</b>	<b>98.518</b>	<b>6.250</b>	<b>24.800</b>	<b>178.907</b>
PORCENTAJE	<b>100%</b>	<b>32%</b>	<b>2%</b>	<b>8%</b>	<b>58%</b>
Validación % Aportes		<b>Cumple Aportes Mínimos</b>	<b>Cumple Aportes Mínimos</b>		<b>Cumple Máx. FONDEF</b>

### 13.2. Remuneraciones, honorarios e incentivos

ITEM (Señalar nombre y cargo)	INSTITUCIÓN O EMPRESA ASOCIADA	HONORARIOS M\$/MES	INCENTIVOS M\$/MES	REMUNERACIONES INSTITUCIONALES M\$/MES	SUBTOTAL M\$/MES	DEDICACION AL PROYECTO % DE JORNADA	MESES A CONTRATAR Nº	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO				TOTAL M\$	
									INSTITUCIONAL M\$	SUMA DE APORTES DE		FONDEF		
									INCREMENTAL (*)	NO INCREMENTAL (*)	HONORARIOS	INCENTIVOS		
<b>DIRECTOR(A), DIRECTOR(A) ALTERNO(A), INVESTIGADORES(AS)</b>														
Director general	PUCV	0	750	1.500	2.250	50,00%	48	54.000	36.000	0	0	0	18.000	54.000
Director alterno	PUCV	0	750	1.500	2.250	50,00%	48	54.000	36.000	0	0	0	18.000	54.000
Investigador principal		1.000	0	1.000	2.000	50,00%	48	48.000	0	0	0	48.000	0	48.000
Investigador asistente		1.000	0	1.000	2.000	50,00%	48	48.000	0	0	0	48.000	0	48.000
		0	0	0	0	0,00%	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>PROFESIONALES</b>														
Ingeniero Agrónomo		300	0	700	1.000	50,00%	48	24.000	0	0	0	24.000	0	24.000
		0	0	0	0	0,00%	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TÉCNICOS</b>														
Técnico Bioquímica		500	0	0	500	30,00%	5	750	0	0	0	750	0	750
Contador		900	0	0	900	30,00%	48	12.960	0	0	0	12.960	0	12.960
Técnico Agrícola		600	0	0	600	50,00%	36	10.800	0	0	10.800	0	0	10.800
<b>PERSONAL DE APOYO Y TESISISTAS (PRE Y POST GRADO)</b>														
		0	0	0	0	0,00%	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0,00%	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>SUBTOTAL</b>								<b>252.510</b>	<b>72.000</b>	<b>0</b>	<b>10.800</b>	<b>133.710</b>	<b>36.000</b>	<b>252.510</b>
												<b>Monto Incentivos Validado</b>	<b>Monto Total Validado</b>	

### 13.3. Subcontratos

ITEM Nombre del subcontrato conforme a programa de actividades	INSTITUCIÓN O EMPRESA ASOCIADA	OBJETIVO Debe ingresar de forma clara la descripción del servicio que se requiere contratar	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO			TOTAL M\$	
				INSTITUCIONAL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS			FONDEF M\$
				INCREMENTAL (*) M\$	NO INCREMENTAL (*) M\$			
Huerto Valles del Norte	Agrícola Valles del Norte	Superficie aproximada de 2,5 ha para llevar a cabo los experimentos en campo, incluye agua, energía, seguridad, bodega, mano de obra, fertilización.	5.000	0	0	5.000	0	5.000
<b>SUBTOTAL</b>			<b>5.000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5.000</b>	<b>0</b>	<b>5.000</b>
							<b>Monto Total Validado</b>	

### 13.4. Software

DESCRIPCIÓN Los softwares de uso general no son financiados por FONDEF	COSTO UNITARIO M\$/UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO			TOTAL M\$
				INSTITUCION AL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		
				INCREMENTAL (*) M\$	(*) M\$		
Microsoft office 365 incluye todas las aplicaciones y se usará en la totalidad del proyecto, \$/unidad hace referencia al valor anual por computador	67	4	268	268	0	0	268
Software estadístico IBM SPSS 25.0	48	1	48	0	0	48	48
<b>SUBTOTAL</b>			<b>316</b>	<b>268</b>	<b>0</b>	<b>48</b>	<b>316</b>
							<b>Monto Total Validado</b>

## 13.5. Equipos

NOMBRE DEL EQUIPO Detalle los equipos individualmente	DESCRIPCIÓN	COSTO UNITARIO			CANTIDAD UNIDADES O MESES	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO				TOTAL M\$
		ADQUISICIÓN EQUIPO M\$/UNIDAD	ARRIENDO EQUIPO O USO UNIDADES EXISTENTES	INSTITUCIONAL M\$			SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		FONDEF M\$		
							INCREMENTAL (*) M\$	NO INCREMENTAL (*) M\$			
<b>Equipos de oficina</b>											
Impresora HP	Una impresora por oficina para imprimir los informes mensuales o diversos reportes	30	0	2	60	0	0	0	0	60	60
Notebook	Marca HACER, procesador Intel Celeron 4GB, RAM-500GB, pantalla 14"	250	0	4	1.000	0	0	0	0	1.000	1.000
<b>Equipos de campo</b>											
Termohigrómetro LH500 marca Ehdis	Medidor portátil de la temperatura y humedad	23	0	1	23	0	0	0	0	23	23
Camioneta	Marca Volkswagen saveiro año 2016 (27.053 km), tipo de combustible bencina, 2 puertas	9.000	0	1	9.000	0	0	9.000	0	0	9.000
Pie de metro	Instrumento para medir el crecimiento en mm del hongo a nivel de laboratorio y campo	10	0	2	20	0	0	0	0	20	20
Celulares	Marca Nokia 8GB color negro	70	0	2	140	0	0	0	0	140	140
<b>Equipos de laboratorio</b>											
Incubadora de crecimiento	Marca Memmert IN30 digital y convección natural de 32 litros, T° mín: 5°C y máx: 80°C	360	0	1	360	360	0	0	0	0	360
Autoclave vertical	Equipo de esterilización de materiales y medios de cultivo, marca Bluestone autoclave VA-FJ de 35 litros	290	0	1	290	290	0	0	0	0	290
Balanza analítica	Balanza digital de 0,001 gr a 500 gr	100	0	1	100	0	0	0	0	100	100
Matraz Erlenmeyer	Volumen de 500 ml y material de vidrio	4	0	5	20	0	0	0	0	20	20
<b>SUBTOTAL</b>					<b>11.013</b>	<b>650</b>	<b>0</b>	<b>9.000</b>	<b>1.363</b>	<b>11.013</b>	
											<b>Monto Total Validado</b>

## 13.6. Material fungible

DESCRIPCIÓN	INSTITUCIÓN O EMPRESA ASOCIADA	COSTO UNITARIO M\$/UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO				TOTAL M\$
					INSTITUCIONAL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		FONDEF M\$	
						INCREMENTAL (*) M\$	NO INCREMENTAL (*) M\$		
<b>Insumos para experimentos en laboratorio</b>									
Caja de 500 placas Petri de plástico estéril 90 mm		70	1	70	0	0	0	70	70
Frasco de 500 g de agar potata-glucosa deshidratado, marca Merck		50	1	50	0	0	0	50	50
Matraz Erlenmeyer 500 ml		6	4	24	0	0	0	24	24
Mango bisturí N°11		2	5	10	0	0	0	10	10
Hojas de bisturí N°11, caja de 100 unidades		1	5	5	0	0	0	5	5
Bidon Agua destilada 5L		4	5	20	0	0	0	20	20
Probeta de plástico 1000 ml		1	20	20	0	0	0	20	20
Fungicida Benomilo		15	2	30	0	0	0	30	30
Placas con <i>Botryosphaeria dothidea</i>		100	1	150	0	0	0	150	150
Placas con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		100	1	150	0	0	0	150	150
Placas con <i>Brevibacillus laterosporus</i>		100	1	150	0	0	0	150	150
Rollo parafilm "M"		20	1	20	0	0	0	20	20
Set 5 plumones Sharpie punta fina color negro		5	2	10	0	0	0	10	10
<b>Insumos para experimentos en campo</b>									
Plantas de nogal var. Chandler	Agrícola Valles del Norte	5	600	3.000	0	3.000	0	0	3.000
Cañería con gotero incorporado autocompensado rollo 500 metros	Agrícola Valles del Norte	200	10	2.000	0	2.000	0	0	2.000
Carteles identificadores	Agrícola Valles del Norte	10	50	500	0	500	0	0	500
Bolsas plásticas 100 unidades	Agrícola Valles del Norte	15	50	750	0	750	0	0	750
<b>Insumos de oficina</b>									
Caja de 50 lapices pasta bic color azul		10	2	20	0	0	0	20	20
Resma tamaño carta Alquimia		4	2	8	0	0	0	8	8
Tinta color HP		13	1	13	0	0	0	13	13
Tinta color negro HP		13	1	13	0	0	0	13	13
<b>SUBTOTAL</b>				<b>7.013</b>	<b>0</b>	<b>6.250</b>	<b>0</b>	<b>763</b>	<b>7.013</b>

Monto Total Validado

### 13.7. Seminarios, publicaciones y difusión

DESCRIPCIÓN	INSTITUCIÓN O EMPRESA ASOCIADA	COSTO UNITARIO M\$/UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO				TOTAL M\$
					INSTITUCION AL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		FONDEF M\$	
					INCREMENTAL (*) M\$	NO INCREMENTAL (*) M\$			
Charla de inicio del proyecto de investigación en Aula Media para una capacidad de 100 personas	PUCV	100	1	100	100	0	0	0	100
Banquetería para la charla realizada en la PUCV considerando \$15000/persona		1.500	1	1.500	0	0	0	1.500	1.500
Charla en Chilenut de cierre del proyecto de investigación en salón en un hotel, incluyendo banquetería y equipos para proyección de la presentación		1.500	1	1.500	0	0	0	1.500	1.500
<b>SUBTOTAL</b>				<b>3.100</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3.000</b>	<b>3.100</b>
									<b>Monto Total Validado</b>

### 13.8. Gastos generales

DESCRIPCIÓN (Gastos generales)	COSTO UNITARIO M\$/UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO				TOTAL M\$
				INSTITUCIONAL M\$	SUMA DE APORTES DE ASOCIADAS		FONDEF M\$	
					INCREMENTAL (*) M\$	NO INCREMENTAL (*) M\$		
Bencina (COPEC) 95	797	3	2.391	0	0	0	2.391	2.391
Peajes	4	288	1.152	0	0	0	1.152	1.152
<b>SUBTOTAL</b>			<b>3.543</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3.543</b>	<b>3.543</b>
							<b>Monto FONDEF Validado</b>	<b>Monto Total Validado</b>



## 13.9. Infraestructura

NOMBRE DE LA INFRAESTRUCTURA	INSTITUCIÓN O EMPRESA ASOCIADA	DESCRIPCIÓN	COSTO UNITARIO		CANTIDAD UNIDADES O MESES	TOTAL PROYECTO M\$	FINANCIAMIENTO			FONDEF M\$	TOTAL M\$
			CASO ADQUISICIONES O HABILITACIÓN (M\$/UNIDAD)	CASO ARRIENDO O USO UNIDADES EXISTENTES (M\$/MES)			INSTITUCIONAL M\$	EMPRESA U OTRA SOCIA CONTRAPARTE	INCREMENTAL (*)		
Laboratorio de fitopatología	PUCV	Laboratorio de 50 m <sup>2</sup> , espacio suficiente para para el autoclave, incubadora de crecimiento, mesones, sillas, cámara de cultivo y refrigerador	0	1.500	4	6.000	6.000	0	0	0	6.000
Oficina	PUCV	Oficina de 15 m <sup>2</sup> para poner 2 escritorios donde trabajarán el gerente general y el alterno	0	225	40	9.000	9.000	0	0	0	9.000
Oficina	PUCV	Oficina de 15 m <sup>2</sup> para poner 2 escritorios donde trabajarán el investigador primario y el asistente	0	225	40	9.000	9.000	0	0	0	9.000
Sala de reunión	PUCV	Sala de reunión de 20m <sup>2</sup> donde se juntaran todos los Doctores del proyecto para discutir temas y tomar desiciones en conjunto, se utilizara al principio del proyecto, despues de cada experimento terminado y al final del proyecto	0	300	5	1.500	1.500	0	0	0	1.500
Escritorios		Marca Tuhome, medidas: 121x42x75 cm color wengue	100	0	4	400	0	0	0	400	400
Sillas		Marca Asenti, medidas: 59x56x89 cm color negro	20	0	4	80	0	0	0	80	80
<b>SUBTOTAL</b>						<b>25.980</b>	<b>25.500</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>480</b>	<b>25.980</b>
											<b>Monto Total Validado</b>