



FIA-PI-C-2003-2-A-052 PPTA

FOLIO DE
BASES

054

CÓDIGO
(uso interno)

FIA-PI-C-2003-2-A-052

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

"Nuevas Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis*, para el Efectivo Control de Tres Familias del Orden Lepidóptera, de Importancia Agrícola en la VII Región";

Línea Temática:

Sustentabilidad y Producción Limpia

Rubro:

Elaboración de insumos para la producción orgánica (Hortalizas)

Región(es) de Ejecución:

VII del Maule

Fecha de Inicio:

Diciembre 2003

DURACIÓN:

36 meses

Fecha de Término:

Noviembre 2006

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : Bio Insumos Nativa Ltda..

Dirección : Chacra El peral Loté A-1 Ciudad y Región: San Javier, VII del Maule

RUT : 77.807250-5

Teléfono/Fax : 73-324306 E-mail: nativa@mail.com

Cuenta Bancaria (tipo, N°, banco): 694630 Banco Santander Santiago (empresa)

AGENTES ASOCIADOS:

Nombre :

Dirección :

RUT :

Teléfono :

Ciudad y Región:

Fax y e-mail:

(Se deberá repetir esta información tantas veces como números de asociados participen)

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Ximena Astorquiza Fierro

Cargo en el agente postulante: Socia, Encargada de Producción y Administración

RUT:

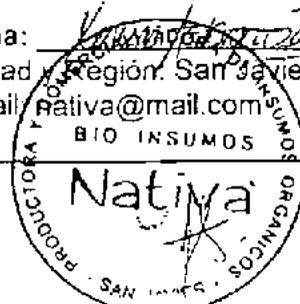
Dirección: Fdo. Santa Cecilia s/n

Fono-Fax: 73-324306

Firma:

Ciudad y Región: San Javier, VII Región

e-mail: nativa@mail.com



21



REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Pabla Andrea Rebolledo González

Cargo en el agente postulante: Socia

RUT:

Dirección: Fdo. Santa Cecilia s/n

Fono-Fax: 73-324306

Firma: 

Ciudad y Región: San Javier, VII Región

e-mail: nativa@mail.com

(Se deberá repetir esta información tantas veces como cuántos asociados participen)

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

: \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO

(Valores Reajustados)

: \$

%

APORTE DE CONTRAPARTE

(Valores Reajustados)

: \$

%





2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO
2.1. Equipo de coordinación del proyecto
(presentar en Anexo B información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO		
NOMBRE	RUT	FIRMA
Gustavo Adolfo Lobos Prats		
AGENTE Bio Insumos Nativa Ltda.		DEDICACIÓN PROYECTO (%/año) 25%
CARGO ACTUAL Gerente Comercial		CASILLA 16-D
DIRECCIÓN Chacra el Peral, Lote A-1		CIUDAD San Javier
FONO 73-324306	FAX 73-324306	E-MAIL nativa@mail.com
COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO		
NOMBRE	RUT	FIRMA
Ximena Astorquiza Fierro		
AGENTE Bio Insumos Nativa Ltda.		DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO 9%
CARGO ACTUAL Socia, Encargada de Producción y Administración		CASILLA 16-D
DIRECCIÓN Chacra el Peral, Lote A-1		CIUDAD San Javier
FONO 73-324306	FAX 73-324306	E-MAIL nativa@mail.com





2.2. Equipo Técnico del Proyecto
(presentar en Anexo B información solicitada sobre los miembros del equipo técnico y en Anexo C las cartas de compromiso de participación)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
Gustavo Lobos P		Ing Agrónomo	Producción Hortalizas Orgánica	Coordinador	25%
Ximena Astorquiza F.		Ing Agrónomo	Entomología y producción de biocontroladores	Coordinador Alterno	9%
Luis Alberto Meza B.		Químico	Biología vegetal molecular	Asesor Bioquímico y de producción de <i>Bt</i>	5%
Cristian Marcelo Muñoz M.		Tec Agrícola (especializado)	Entomología y Fitopatología	1. Diseño y evaluación de trabajo en laboratorio y terreno. 2. Dirección y adiestramiento del técnico no especializado.	50%
Alexis Eduardo Muñoz M.		Tec. Agrícola (no especializado)	Capacitado a nivel básico de laboratorio y terreno	Trabajo de laboratorio y terreno	100%
Eduardo Fuentes C.		Biólogo	Entomología	Asesor	2%





3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

La VII región, es la segunda región en importancia hortícola en el país (en superficie). Además del área hortícola como tal, son de gran relevancia los semilleros de hortalizas, destacando por ejemplo los de crucíferas con un 52% del nacional, y la agroindustria (tomate industrial con un 40% de la superficie nacional). A lo anterior, se suma el tomate bajo plástico, que a pesar de no ser una gran superficie (V Región con 744 has; IV Región con 112 has y VII Región con 94 has), si es prioritario en cuanto a su importancia económica a nivel de pequeños agricultores.

En la Región, el control de Lepidópteros ha sido realizado en un 90% en base a piretroides y organofosforados, existiendo en la actualidad evidentes problemas de resistencia, asociado a importantes especies claves para el desarrollo agrícola-agroindustrial de la región: polilla del tomate (*Gelechiidae*), gusanos cortadores (*Noctuidae*) y mariposa blanca de la col (*Pieridae*).

La agroindustria regional está ávida de nuevas alternativas efectivas, pero sobre todo limpias, ya que los mercados internacionales están exigiendo un trabajo basado en producción integrada (PI) y buenas prácticas agrícolas (BPA). A su vez, el mercado para fresco obliga a reducir o eliminar la toxicidad de los productos usados cerca de cosecha.

Bio Insumos Nativa Ltda. formalizó un nuevo convenio para desarrollar técnica y comercialmente, diez cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) con efecto contra lepidópteros, aisladas en la VII Región por el Instituto de Biología y Biotecnología, de la Universidad de Talca. Estas cepas, sólo se encuentran caracterizadas proteicamente (*Cry*), por lo que requieren ser evaluadas a nivel de laboratorio y campo, de manera de orientarlas al control específico de cada uno de las tres especies de Lepidópteros antes mencionadas, siendo el proyecto a que se postula el medio para lograr estos objetivos.

Para esto, se desarrollará una etapa en laboratorio en donde se procederá a determinar la dosis letal 50 (LD_{50}) para cada cepa, para luego evaluar las diez cepas en las tres plagas antes mencionadas, determinándose las tres cepas más agresivas por plaga. Además, a nivel de laboratorio, se medirá la compatibilidad de cada una de estas cepas con los principales funguicidas y antibióticos de uso agrícola

La siguiente etapa se llevará a nivel de campo, en donde la terna de cepas por plaga se probará para determinar el ranking de propiedad insecticida en campo

En forma paralela a estas dos etapas, habrán ensayos para dilucidar el mejor medio y forma de cultivo semi-industrial para el Bt, teniendo en cuenta para esto características como el oxígeno, temperatura, medio nutritivo, pH, factibilidad técnica y por sobre todo el costo de producción.

Este proyecto tiene un costo de \$66.558.065 y pretende entregar al medio hortícola (agrícola-agroindustrial) un insumo orgánico, con aplicación orgánica y convencional, que sea capaz de controlar las plagas antes descritas de una forma efectiva que coopere con la rotación de insecticidas, que sea económico y limpio con el medio ambiente.





4 IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

En la Región, el cultivo del tomate y otras hortalizas, tanto al aire libre como de invernadero, llevan asociada la presencia de plagas de insectos, entre las que destacan las del orden lepidóptera: polilla del tomate (*Tuta absoluta*), mariposa blanca de la col (*Pieris brassicae*) y el complejo de gusanos cortadores (*Agrotis spp.*, *Heliothis spp.*, *Copitarsia spp.*).

Debido a la poca disponibilidad de alternativas económicamente factibles de usar, y al bajo nivel técnico y de preparación de la gran mayoría de los agricultores hortícolas de la región, la rotación de ingredientes activos es escasa o nula. Esto ha ocasionado una creciente resistencia a organofosforados y piretroides de tres familias de importancia agrícola en la Región: polilla del tomate (Gelechiidae), gusanos cortadores (Noctuidae) y mariposa blanca de la col (Pieridae). Esta resistencia ha obligado a aumentar el número de aplicaciones y la concentración de estas, agravándose aun más el problema.

Lo anterior determina la necesidad de búsqueda de nuevos ingredientes activos efectivos, factibles de incorporar en la rotación y al alcance (técnico y económico) del pequeño, mediano y gran agricultor.

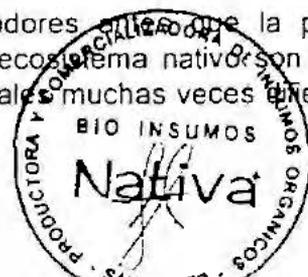
Por otro lado, estos dos grupos de insecticidas, presentan grandes inconvenientes debido a la alta toxicidad para el ser humano, medio ambiente y/o los enemigos naturales. Los piretroides, a pesar de pertenecer a un grupo de toxicidad moderada (respecto a otros químicos), no son selectivos, por lo que tienen un grave efecto sobre los organismos naturales que ayudan al control biológico de muchas plagas. Por su parte, Los organofosforados, son extremadamente tóxicos, por lo que son un gran riesgo para el operario y consumidor de las hortalizas. Esto es de suma importancia cuando en la Región se realizan aplicaciones cercanas a cosecha en hortalizas de consumo y para la agroindustria!

Lo anterior refleja la conveniencia de usar productos selectivos e inocuos para el hombre y el medio ambiente, es decir, que aseguren el exclusivo control de la plaga en cuestión, la salud de los aplicadores y consumidores, y la viabilidad del negocio agrícola en función de los requerimientos internacionales (buenas prácticas agrícolas y producción integrada).

Paralelo a lo anterior, la agricultura orgánica requiere urgentemente de un mayor número de insumos, ya que no existe una amplia gama de productos para el control de plagas y enfermedades, y en especial, de los tres órdenes anteriores. Actualmente, el control de estos se realiza en base a piretrinas y *Bacillus thuringiensis*, sin embargo este último, además de su alto costo y desconocimiento técnico por parte de quienes lo venden y usan, presenta el problema de ser usado para lepidópteros en general, existiendo entonces plagas que no son eficientemente controladas, por ejemplo, la polilla del tomate.

Esto obliga a generar nuevos productos orgánicos en base a *Bacillus thuringiensis*, pero orientados a insectos particulares de manera de controlar cada plaga con toxinas específicas a esa especie.

En Chile sigue primando la importación de biocontroladores, lo que implica que aunque los riesgos para el ecosistema nativo son bajos, los organismos seleccionados bajo otras condiciones ambientales muchas veces difieren en su





actuar cuando se les cambian el medio ambiente al cual están acostumbrados. También existe el problema que los importadores son empresas grandes que tienen estos productos para no perder un nicho de mercado, y en la mayoría de los casos no se cuenta con la capacidad técnica para la venta y asesoramiento del agricultor. Finalmente, se genera una dependencia de insumos internacionales, que sufren fluctuaciones importantes en los precios y sobre stock por los altos volúmenes importados, originándose, muchas veces, la venta de productos vencidos en bodega.

Finalmente, haciendo referencia a un aspecto transversal a los proyectos financiables con fondos estatales, es necesario mencionar que en Chile se hace mucha investigación sobre el control biológico pero, lamentablemente, son escasas las oportunidades en donde se desarrollan productos comerciales. Chile es uno de los 25 "Hot Spots" en biodiversidad a nivel mundial (entre Angostura y Temuco) por lo que utilizar microorganismos nativos para el control biológico de plagas y enfermedades, en cultivos de importancia económica, genera una valorización social y ecológica que permitiría diferenciar la producción agrícola chilena a nivel mundial.





5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

SITUACION HORTICOLA EN LA REGION DEL MAULE

La horticultura en Chile se desarrolla bajo condiciones climáticas y ecológicas privilegiadas. Esta actividad aporta importantes divisas a la economía del país. La VII región, según el último Censo Agropecuarios, es la segunda región en importancia hortícola (ver Tabla 1). Sin embargo, el bajo nivel técnico de sus agricultores, ha originado una serie de problemas regionales, dentro de los que cuentan la resistencia de muchos insectos dado por un excesivo uso de productos químicos y una baja rotación de los ingredientes activos.

Tabla 1. Detalle de hortalizas y maíz en dos temporadas.

HORTALIZAS TEMPORADA AGRICOLA 1999/2000 (1) (has)																	
Item	País	IV	%	V	%	RM	%	VI	%	VII	%	VIII	%	IX	%	resto	%
Crucíferas (2)	4 388	435	10	1 300	30	1 554	35	356	8	521	12	61	1	29	1	132	3
Choclo	12 488	800	6	1 640	13	2 239	18	3 184	25	1 584	13	900	7	227	2	1 914	15
Tomate (3)	21 756	925	4	1 920	9	1 795	8	5 879	27	9 811	45	376	2	155	1	894	4
Total Hortalizas	112 870	9 338	8	15 037	13	25 819	23	19 762	18	21 292	19	6 052	5	4 405	4	11 165	10

MAIZ TEMPORADA AGRICOLA 2002/2003 (has)																	
Item	País	IV	%	V	%	RM	%	VI	%	VII	%	VIII	%	IX	%	resto	%
Maíz Semillero (4)	17 956	0	0	0	0	1 436	8	7 901	44	8 260	46	359	2	0	0	0	0
Maíz grano (5)	109 600	750	1	2 020	2	12 490	11	65 070	59	23 530	21	5 180	5	70	0	490	0
Total Maíz	127 556	750	1	2 020	2	13 926	11	72 971	57	31 790	25	5 539	4	70	0	490	0

(1) VI Censo Nacional Agropecuario 1996 / 97
(2) Brócoli, Coliflor, Repolito brussels y Repollo
(3) Tomate incluye consumo fresco e industrial
(4) Fuente: Aprobac (2003)
(5) Fuente: Odepa 2003

A su vez, y como lo indica la Tabla 1, la Región del Maule posee la mayor parte de los semilleros de maíz, mientras que ocupa el segundo lugar del maíz grano, con un 46% y 21% de la superficie nacional, respectivamente. Al igual que en la mayoría de las hortalizas, su gran problema a nivel de emergencia es el ataque de un complejo de gusanos cortadores (Lepidóptera, Noctuidae).

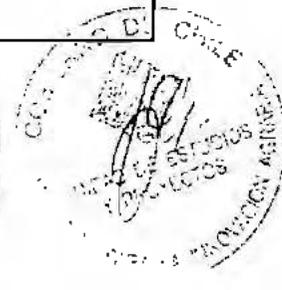
Las crucíferas por su parte, a pesar de no ser de gran importancia hortícola regional, si lo son a nivel de semilleros, abarcando algo más del 52% nacional, y siendo la mariposa blanca de la col (Lepidóptera, Pieridae), uno sus principales problemas en la región, además de los gusanos cortadores.

Por otro lado, la VII Región representará cerca del 40% de la superficie nacional de tomate industrial (ver Tabla 2). Este sector agroindustrial posee un mayor desarrollo técnico dado por el apoyo de las grandes compañías (Agrozzi, Corpora Tres Montes y Iansa). A pesar de esto, la industria posee grandes problemas con la polilla del tomate (Lepidoptera, Gelechiidae) y gusanos cortadores a nivel de fruto. Lo mismo ocurre con tomate al aire libre y tomate bajo invernadero, este último de vital importancia regional (Colín-Maule), y que abastece a otras ferias regionales para consumo en fresco.

Tabla 2. Detalle de la estimación de plantación Tomate Industrial

TOMATE INDUSTRIAL TEMPORADA AGRICOLA 2003/2004 (1) (has)									
Item	País	RM	%	VI	%	VII	%	VIII	%
Corpora Tres Montes	2 500		0	1 700	68	800	32		0
Agrozzi	4 300	430	10	2 400	56	1 170	27	300	7
Iansa	3 000	190	6	900	30	1 800	60	110	4
Total	9 800	620	6	5 000	51	3 770	38	410	4

(1) Comunicación personal





LEPIDOPTERAS DE IMPORTANCIA REGIONAL EN HORTICULTURA

La polilla del tomate (*Tuta absoluta*) (Lepidoptera: Gelechiidae) es considerada una de las principales plagas endémicas de los países sudamericanos. Se estima que los daños ocasionados por las larvas de esta polilla, varían entre 60 a 100 % en cultivos sin protección (Larraín, 1986; Giustolin et al. 2001). Las larvas de estos insectos se alimentan principalmente de frutos, follaje, tallos y tubérculos de solanáceas como también plantas anuales o perennes.

El llamado "Complejo de Gusanos Cortadores" (Lepidoptera: Noctuidae) con sus principales géneros como *Agrotis*, *Heliothis*, *Copitarsia* etc. corresponde a una de familias más numerosas de este Orden de insectos (González, 1989), sus estados inmaduros se conocen como cuncunillas o gusanos cortadores. Se considera que los Noctuidos es, en forma global, una de las familias de insectos de mayor interés agrícola en Chile; la alta polifagia del grupo y la permanente asociación con muchos cultivos, la convierten en una plaga de importancia muchas veces primaria. Después del trasplante o siembra/emergencia las larvas cortan las plántulas a nivel de cuello. También consumen hojas y frutos en plantas desarrolladas, así como raíces y tubérculos de solanáceas, compuestas, crucíferas, gramíneas y cucurbitáceas.

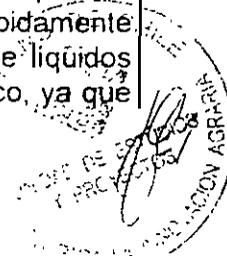
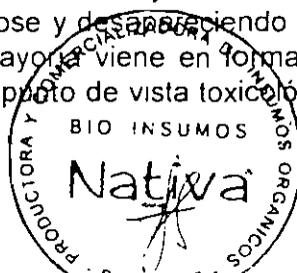
La familia- de la "Mariposa Blanca de la Col" (*Pieris brassicae*) (Lepidoptera, Pieridae), normalmente no representa un problema a la agricultura. Pero actualmente, el uso indiscriminado de insecticidas han originado resistencias, que en conjunto con la destrucción de los enemigos naturales (*Cotesia glomerata*, *Incarnya chilensis* y *Pteromalus paparum*) producto del uso de insecticidas poco selectivos (Piretroides) han convertido a esta familia en una plaga importancia agrícola en la región (principalmente a nivel de semilleros y crucíferas para el mercado fresco)

LOS INSECTICIDAS

El uso de insecticidas obtenidos por síntesis química es el causante de la mayor parte de la contaminación que se produce en la agricultura, tanto en las cosechas como en los suelos y en las aguas. Estos agentes difícilmente son biodegradables y permanecen por largos periodos en el ambiente ocasionando desequilibrio ecológico, pues destruyen muchas formas de vida, entre ellas insectos benéficos en el control biológico, la polinización y otros eventos favorables para el mantenimiento del equilibrio ecológico (Prieto, 1998).

La mayoría de los plaguicidas utilizados son organosintéticos, los cuales se clasifican según la naturaleza química del grupo funcional que caracteriza el compuesto y le imparte todas las propiedades físico-químicas y toxicológicas al plaguicida, en: organoclorados, carbamatos organofosforados y piretroides (Moraga, D. et al, 2001). Para el caso particular de la región del Maule, organofosforados y piretroides son los más recurrentes a la hora de controlar las especies antes descritas:

- a) Insecticidas Organofosforados: son ésteres del ácido fosfónico o sus homólogos. Estos ésteres fosforados, como cualquier otro éster, se hidroliza en mayor o menor proporción dependiendo de su estructura química, biodegradándose y desapareciendo rápidamente del ecosistema. Su volatilidad es muy variable; la mayoría viene en forma de líquidos volátiles. Esta propiedad es muy importante desde el punto de vista toxicológico, ya que





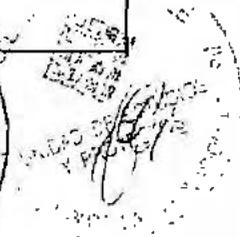
implica ingresar al organismo por la vía respiratoria, la de acción más rápida que se conoce. Son de alta toxicidad por ser inhibidores permanentes y muy potentes de la enzima colinesterasa, impidiendo la separación de la acetilcolina (transmisor nervioso), presentándose acumulación de esta sustancia y como consecuencia, el cuadro colinérgico típico de la intoxicación. Actualmente el uso de organofosforados para prevenir o atacar directamente los distintos tipos de plagas que pudieran atacar las cosechas se ha distribuido por casi todo el mundo y han venido reemplazando a los organoclorados, porque son menos persistentes en el ambiente y no se acumulan en los organismos. Sin embargo, la velocidad de degradación en estas sustancias es muy variable y en algunos casos, el producto degradado es más tóxico que el producto original. Además, ya sea por descuidos, desinterés o simplemente ignorancia su uso inapropiado ha sido causa de muchas atenciones de urgencia en los hospitales (Moraga, D. et al, 2001).

- b) Insecticidas Piretroides: son insecticidas sintéticos similares a las piretrinas naturales, a las cuales han reemplazado ampliamente por tener gran estabilidad y ser menos volátiles, además son de mayor acción insecticida. Tienen en común las siguientes propiedades: baja toxicidad aguda; pocos persistentes, no acumulables; sensibilizantes, en el hombre las lesiones causadas por los piretroides resultan más frecuentemente de las propiedades alergénicas de la sustancia, que de su toxicidad directa (dermatitis, asma, rinitis); son neurotóxicas a dosis altas; principales signos clínicos: temblores, hiperexcitabilidad y ataxia (Moraga, D. et al, 2001).

Los organofosforados ampliamente usados para el control de la polilla del tomate, presentan el gran problema de la toxicidad para el operario y para el consumidor-industria final. A pesar de que algunos compuestos como metamidofos están prohibidos en muchos países del mundo, y en Chile para su uso en invernadero, la gran mayoría de los productores de tomate bajo plástico en la Región lo usan, con los consecuentes riesgos de intoxicación para los trabajadores. A modo de ejemplo, se puede indicar que el manejo de concentrados organofosforados requiere el máximo cuidado y, en el caso de insecticidas organofosforados de toxicidad extrema y alta (metamidofos), requieren el uso de equipo protector especial sobre todo en operaciones como: Apertura de envases conteniendo organofosforados, Pesado y Mezclado de envases conteniendo organofosforados, Aplicación, esperado y rociado de organofosforados, sin embargo, es importante recalcar que estas medidas poco y nada se llevan a cabo, lo que incrementa el riesgo de intoxicación.

Por su parte, los piretroides, usados masivamente para el control de gusanos cortadores y mariposa blanca de la col, a pesar de no ser un insecticida extremadamente tóxico como el caso anterior, presenta el gran inconveniente de no ser específico y matar a una amplia gama de familias, de las cuales, muchas son benéficas, por lo que se ha producido en la región un aumento del daño de estas plagas en cultivos tan importantes como por ejemplo los tomates.

Sin embargo, como consecuencia de la constante utilización de estos insecticidas químicos, los insectos considerados como plagas han desarrollado mecanismos de resistencia (Prieto, 1998), soportando concentraciones cada vez mayores, lo que implica un mayor número y concentraciones de las aplicación, lo que redundo directamente en problemas de contaminación, intoxicación y aumento de los costos productivos.





RESISTENCIA

Los primeros casos informados de resistencia a los insecticidas sintéticos, ocurrieron hace más de 50 años. Aproximadamente treinta años después, en 1979, el programa medioambiental las Naciones Unidas, declaró la resistencia a los pesticidas como uno de los problemas medioambientales más serios del mundo. Su gravedad sobre el ambiente proviene de los problemas de alimentación humana debido a la pérdida de la cosecha, dispersión de enfermedades por insectos resistentes, suma al ambiente de nuevos y potencialmente peligrosos insecticidas debido a la resistencia desarrollada, y aplicación de cantidades mayores de químicos sobre las plagas que ya han generado la resistencia (Pimentel, D., y Burgess, M. 1985).

Los insectos pueden y han desarrollado resistencia a casi todo tipo de insecticida. La resistencia a otros insecticidas es, de hecho, una de las muchas razones que el *Bacillus thuringiensis* se ha convertido en un insecticida de uso corriente en el hemisferio norte. La resistencia a los insecticidas se desarrolla debido a la variación genética que se genera en las poblaciones de un insecto. En la población original del insecto, unos pocos individuos no son afectados por un insecticida dado. Generalmente, los individuos no afectados (resistente) difieren de los afectados (susceptible) en la naturaleza de las moléculas blanco del insecticida en el insecto, o en el método en que el insecto usa para librarse de las moléculas de la toxina (Michaud, D. 1997). Cuando el insecticida es aplicado, los individuos que no son afectados por el insecticida son aquellos que sobreviven para pasar sus genes a las generaciones siguientes. Con el tiempo, una proporción creciente de esa población es inmune al insecticida. Además del daño hecho por el creciente número de insectos supervivientes (resistentes) que se intenta controlar, la resistencia puede causar erupciones de la plagas secundarias que agravan indirectamente el daño en el cultivo (Hoy, M. 1998).

Hay varios factores que aumentan la tasa a la cual la resistencia a los insecticidas generalmente se desarrolla. Algunos factores se relacionan con la propia población del insecto: especies con mayores tasas reproductivas, con generaciones más cortas, con mayor número de descendencia, y poblaciones locales más grandes y con mayor variabilidad genética, desarrollan una gran población resistente en forma más rápida (Pimentel, D., y Burgess, M. 1985). Si la base genética de resistencia del insecto es dominante o recesiva también es de importancia (Wearing, C. y Hokkanen, H. 1995). Otros factores son dependientes del insecticida. La resistencia se desarrolla más rápidamente a los insecticidas más persistentes; su poder de quedar en el ambiente aumenta la posibilidad que se exponen los individuos susceptibles a la toxina y se mueren, y logran pasar así sus rasgos insecticida-susceptibles a la próxima generación. Esto selecciona más fuertemente a los insectos resistentes porque sólo los insectos resistentes crecen. Por la aplicación lógica, el uso frecuente de insecticidas no-persistentes tiene el mismo efecto (Wood, R. 1981). Las poblaciones de insectos con pequeñas migraciones dentro del pool genético con nuevos individuos susceptibles no expuestos, también desarrollan la resistencia más prontamente (Comins, H. 1977). Poblaciones que en el pasado fueron expuestas a un insecticida con un modo de acción similar al nuevo insecticida, el desarrollo de resistencia a la nueva toxina es rápido. Este fenómeno es conocido como la resistencia cruzada (Pimentel, D., y Burgess, M. 1985).

El empleo de diversas combinaciones de insecticidas y en dosis cada vez más crecientes, estaría provocando un incremento de la tasa de aparición de insectos resistentes. En la actualidad, existen antecedentes sobre el desarrollo de resistencia por parte de las familias





nombradas anteriormente a insecticidas organofosforados (Vargas, 1970; Ripa, 1973) y a piretroides (Salazar y Araya, 1997).

En la Región, el control de los gusanos cortadores en hortalizas, la mariposa blanca de la col en crucíferas y la polilla del tomate tomates, está basado en un 90% en base a piretroides y organofosforados, existiendo en la actualidad evidentes problemas de resistencia, asociado al uso indiscriminado de estos.

En los últimos años, las empresas han debido buscar nuevas alternativas como son las Abamectinas y Chlorfenapyr con resultados variables.

La agroindustria regional está ávida de nuevas alternativas efectivas, pero sobre todo limpias, ya que los mercados internacionales están exigiendo un trabajo basado en producción integrada (PI) y buenas prácticas agrícolas (BPA). A su vez, el mercado para fresco obliga a reducir la toxicidad de los productos usados cerca de cosecha.

Dentro de las alternativas que han demostrado ser altamente eficientes en el control de lepidópteros, pero a la vez poco desarrollado en Sudamérica y especialmente en Chile es el *Bacillus thuringiensis*.

CONTROL BIOLÓGICO Y BACILLUS THURINGIENSIS

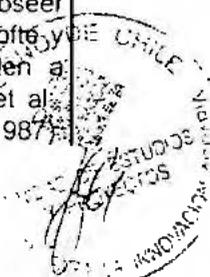
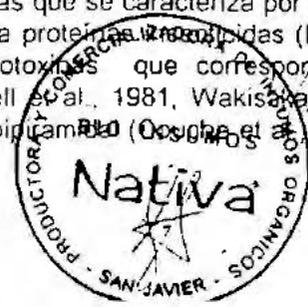
Los plaguicidas son factores importantes en el deterioro del medio ambiente y además han demostrado diversos efectos tóxicos sobre vertebrados. Asimismo, son capaces de afectar a las poblaciones de insectos benéficos, desequilibrando de esta forma el balance ecológico. Esto constituye un aliciente en la búsqueda de alternativas al empleo de plaguicidas (Prieto, 1998).

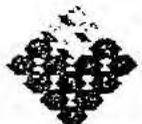
El auge de los insecticidas biológicos, en reemplazo de los químicos para fines agrícolas, está sustentado en que son más limpios ecológicamente y por tanto menos contaminantes. Estos compuestos no son tóxicos para las plantas, ni animales, ni para el hombre, y no constituyen riesgo de contaminación, por ser biodegradables (Prieto, 1998).

El control biológico es uno de los principales componentes del manejo integrado de plagas y se define como la suma de acciones emprendidas para favorecer la acción de los parásitos, depredadores y patógenos en el control de un insecto-plaga, esto incluye toda una estrategia de manejo racional de insecticidas, en donde parte importante son los productos biológicos. El combate biológico puede ser realizado en forma natural o inducido y consiste en el manejo de poblaciones de la plaga utilizando a sus enemigos naturales (Bujanos, 1998).

Como alternativa al empleo de plaguicidas sintéticos, la atención se ha dirigido a las propiedades insecticidas de ciertos microorganismos o productos microbianos secundarios. Los más estudiados corresponden a bacterias, hongos y virus. Entre los primeros, el mayor número de especies conocidas con propiedades insecticidas pertenece al género *Bacillus* en particular la especie *Bacillus thuringiensis* (Bt).

El Bt es una bacteria Gram positiva, facultativa, formadora de esporas que se caracteriza por poseer una variedad de plásmidos que contienen genes que codifican para proteínas insecticidas (Höfte y Whiteley 1989). Entre éstas se encuentran las llamadas δ -endotoxinas que corresponden a inclusiones cristalinas de naturaleza proteica (Bujanos, 1998, Tyrell et al., 1981, Wakisaka et al., 1982; Höfte y Whiteley 1989) con una sub unidad tóxica de forma bicámarada (Osoyche et al., 1987).





Los cristales son agregados de una proteína grande (130 - 140 Kda) que es una protoxina, esta debe ser activada antes para que tenga efecto. Estas proteínas son sintetizadas y ensambladas en cuerpos de inclusión paraesporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (Srinivas et al., 1995 citado por Ananda et al., 1996; Bujanos, 1998, Yang and Wang, 1998). Las toxinas o también llamadas δ -endotoxinas, son insecticidas naturales para un gran número de plagas de insectos de importancia agronómica (Aronson et al. 1986). Se considera que éstas son seguras desde el punto de vista ambiental e inócuas para los seres vivos, incluyendo al hombre, ya que el cristal proteínico es altamente insoluble en condiciones normales; así, ésta es enteramente seguro para humanos, animales y muchos insectos (The microbial world, 1999).

El *Bt* puede ser aislado desde una gran variedad de hábitats (insectos muertos, suelo, pastos, barredura de silos, etc.), pero al no ser una especie dominante no crece en muchos de estos medios (Martín y Travers, 1989) y permanece en estado de spora. La mayoría de las subespecies de *Bt* encontradas en la actualidad difieren en su toxicidad y la gama de hospederos sobre las cuales son activas. Una de las principales ventajas de este biopesticida es su alta especificidad, pues actúa sobre un rango limitado de insectos, siendo inocuo sobre aves, mamíferos y peces. Además, por ser un habitante natural del suelo, no provoca efectos colaterales de contaminación (Vásquez, 1993; Kwang-Bo y Côte, 2002).

En 1989, Hofte y Whiteley propusieron una nomenclatura y clasificación de las proteínas *Cry* basados en la similitud de su secuencia de aminoácidos y el rango de especificidad. En el pasado, las proteínas *CryI*, *CryII*, *CryIII*, *CryIV* fueron clasificadas en función del insecto blanco como específicas contra lepidópteros, lepidópteros-dípteros, coleópteros y dípteros, respectivamente (Agaisse, H. y Lereclus, D. 1995). Las clases V y VI, activas contra nematodos, fueron consideradas posteriormente en la clasificación por Feitelson y colaboradores en 1992. En 1998, Schnepf y colaboradores propusieron una nueva clasificación basada solamente en la similitud de secuencias primaria entre las proteínas *Cry* (Fernández-Larrea, 2003).

La nomenclatura actual (Fernández-Larrea, 2003) de las toxinas *Cry* las agrupa como:

- (1) proteínas tóxicas a lepidópteros grupos *Cry1*, *Cry2* y *Cry9*;
- (2) proteínas activas contra coleópteros grupos *Cry3*, *Cry7* y *Cry8*;
- (3) proteínas con actividad dual grupos *Cry1B* y *Cry11*;
- (4) proteínas con actividad nematocida, grupos *Cry5*, *Cry12*, *Cry13* y *Cry14*;
- (5) proteínas tóxicas a dípteros, grupos *Cry2*, *Cry4*, *Cry10*, *Cry11*, *Cry16*, *Cry17* y *Cry19*

Las proteínas *Cry* varían en toxicidad contra ciertas especies de insectos; del mismo modo, diferentes especies de insectos pueden variar en la susceptibilidad hacia una proteína *Cry* en particular (Yamamoto y Powell, 1993).

Las etapas de acción insecticida pueden resumirse en los siguientes eventos

- (1) ingesta del cristal proteínico,
- (2) solubilización del cristal en un medio alcalino del intestino,
- (3) procesamiento proteolítico de la protoxina mediante la acción de proteasas endógenas,
- (4) unión de la toxina a receptores específicos del epitelio intestinal y
- (5) formación de poros y lisis de las células epiteliales.

La δ -endotoxinas es solo efectiva cuando es ingerido por insectos con un pH intestinal específico (usualmente alcalino) y tienen las estructuras de la membrana intestinal específica.





para ligar la toxina. No solo el insecto debe tener la correcta fisiología y estar en un estado susceptible de desarrollo, sino la bacteria debe estar ingiriéndola en cantidad suficiente. Una vez que la protoxina ha sido ingerida y solubilizada en el intestino del insecto, la protoxina es partida por una proteasa intestinal para producir una toxina activa de 60Kda. Esta toxina se une a las células epiteliales intestinales, creando poros en las membranas celulares y conduciendo el desequilibrio de iones. Como resultado, el intestino es rápidamente inmovilizado, las células epiteliales se lisan, la larva deja de alimentarse, y el pH intestinal es disminuido para equilibrarla con el pH sanguíneo. Esta disminución de pH permite a las esporas bacterianas germinar, y la bacteria puede luego invadir el huésped, causando una septicemia letal. (The Microbial World, 1999).

El insecto hospedero detiene su ingesta de alimento y eventualmente muere al cabo de 2 a 6 días (Feitelson et al., 1992; Aronson et al., 1986; Gill et al., 1992; Tapp et al., 1995; Juárez-Pérez et al., 1997; Park et al., 1998; Schnepf et al., 1998; Rang et al., 1999; Maagd et al., 2001; Aronson et al., 2001 y Naimov et al., 2001).

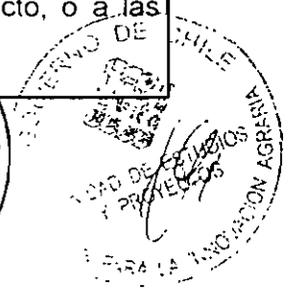
B. thuringiensis, es producido comercialmente en grandes tanques de fermentación. Durante el proceso, el bacilo primero se propaga en una fase vegetativa. Cuando un compuesto nutritivo crítico llega a ser degradado, este entra a la fase de esporulación y las proteínas toxigénicas son sintetizadas durante esta misma fase. Después de la terminación de la esporulación, las células son lisadas completamente para liberar esporas y cristales proteínicos. Esta ampliamente reconocido que la formación de la proteína toxigénica esta asociado al proceso de esporulación (Cranshaw, 1992; Yang y Wang, 1998).

Bacillus thuringiensis Y DESARROLLO COMERCIAL

Aunque el *Bt* es conocido desde hace más de 70 años, fue necesario llegar a los años setenta para que adquiriese importancia y comenzase a ser aplicado en forma amplia en el control de plagas (Frutos, 1994; Frankenhuyzen, 1995). *B. thuringiensis* se ha usado, por ejemplo, para el control de ciertas especies de insectos entre los órdenes Lepidoptera, Díptera y Coleóptera. Recientes reportes acerca de los nuevos aislamientos de este bacilo, manifiestan que son activos contra otros ordenes (Hemiptera, Orthoptera y Mallophaga) y contra nemátodos, ácaros, platelmintos e inclusive protozoos (Feitelson et al., 1992; Madigan et al., 1998; Schnepf et al., 1998). También se ha encontrado que produce compuestos antibióticos que tienen actividad antifúngica (Schnepf et al., 1998).

El *Bacillus thuringiensis* fue detectado por primera vez en 1901 como causante de la enfermedad de "Soto" que ataca al gusano de seda de Japón. La actividad insecticida de *B. thuringiensis* fue descubierta por primera vez en 1911, tomó su nombre en 1927; en ese mismo año fue aislado por Matthew en Alemania. Algunos años más tarde, se usaba esta bacteria como agente controlador microbiano cuyos resultados permitieron la primera preparación comercial llamada SPORINE en Francia (1938), sin embargo, esta no estuvo comercialmente disponible hasta 1950 (en Estados Unidos) (Van Frankenhuyzen, K. 1993, Pantuwatana, 1987; Cranshaw, 1994).

En los años ochenta, el interés comercial en *Bt* creció muy rápidamente ya que los populares insecticidas sintéticos se volvieron ineficaces debido a la resistencia del insecto, o a las restricciones medioambientales (Ely, S 1993).





En 1995, las ventas mundiales de *B. thuringiensis* fueron proyectadas en \$90 millones de dólares, representando el 2% del total de insecticida llevado al mercado mundial. Otros investigadores reportaron que la distribución anual mundial de *B. thuringiensis* asciende a 2.3 Tm. Para 1990 había otros 42 plaguicidas biológicos en el mercado (Tyler, 1994; Bujanos, 1998). En 1998, hubo casi 200 productos registrados de *B. thuringiensis* en EE.UU. Aunque el uso de pesticidas biológicos en la agricultura permanece significativamente detrás de los pesticidas químicos sintéticos (Schnepf, et al., 1998).

Existen varias razones por las cuales, a nivel mundial, se continúa con la búsqueda y caracterización de nuevas cepas de *Bt*. Algunas de éstas son las siguientes: (a) la búsqueda de cepas con características propias que puedan ser patentadas, (b) el aislamiento de cepas con mayores niveles de toxicidad que los estándares y (c) la búsqueda de nuevos patotipos (Ibarra, 1994).

A pesar que la producción de *B. thuringiensis* supera en mucho la de cualquier otro insecticida microbiano producido comercialmente (Ward, 1991), en América Latina no se tiene ninguna industria productora de *Bt*. Se sabe que en la Universidad de La Plata, Argentina, hay un grupo que trabaja con esta bacteria hace más de diez años, sin embargo, no se tiene conocimiento de ningún bioinsecticida comercial. Así mismo, en Brasil, la Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias (EMBRAPA) ha dedicado esfuerzos importantes en la investigación de bioinsecticidas; también otro grupo de investigación latinoamericano están trabajando en distintos aspectos de *B. thuringiensis* pero ninguno de ellos se produce comercialmente (Bravo y Quintero, 1993).





6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

En la Región, debido al uso indiscriminado y nula rotación de organofosforados, especialmente metamidofos, para el control de la polilla del tomate, y de piretroides para el control de gusanos cortadores y la larva de la mariposa blanca de la col, se han generado resistencias asociadas a estos insecticidas

Lo anterior ha sido gravitante para el agricultor hortalicero, por su incidencia en el control de gusanos cortadores, y en las últimas temporadas, sobre larvas de mariposa blanca de la col (de suma importancia regional a nivel de semilleros de crucíferas).

Por su parte, la agroindustria regional de tomates (pulpa y pasta) y los hortaliceros de tomates (al aire libre y bajo invernadero), tienen grandes problemas con la polilla del tomate. Los primeros, debido a las exigencias internacionales (BPA y PI) reclaman por insumos efectivos y más ecológicos, mientras que los segundos buscan productos más baratos pero efectivos y, que además, les permita hacer aplicaciones inocuas cerca de cosecha (productos sin carencia).

En la región es necesario buscar nuevas alternativas eficaces, limpias y económicas, que le den al agricultor una herramienta de solución a sus actuales problemas. Dadas las notables propiedades del *Bacillus thuringiensis* (ya explicadas anteriormente), representa una alternativa útil y complementaria a los insecticidas químicos actuales. En este sentido, el *Bacillus thuringiensis* producido con cepas y tecnología nacional respondería a estas necesidades.

Existen varias razones por las cuales a nivel mundial se continúa con la búsqueda y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*, entre éstas destacan: (a) el hallazgo de nuevas cepas con características propias, (b) el aislamiento de cepas con mayores niveles de toxicidad que los estándares y (c) la búsqueda de nuevos patotipos (Ibarra, 1994).

A pesar que la producción de *B. thuringiensis* supera en mucho la de cualquier otro insecticida microbiano producido comercialmente (Ward, 1991), en América Latina no se tiene ninguna industria productora de *Bt*. Se sabe que en la Universidad de La Plata, Argentina, hay un grupo que trabaja con esta bacteria hace más de diez años, sin embargo, no se tiene conocimiento de ningún bioinsecticida comercial. Así mismo, en Brasil, la Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias (EMBRAPA) ha dedicado esfuerzos importantes en la investigación de bioinsecticidas; también otro grupo de investigación latinoamericano están trabajando en distintos aspectos de *B. thuringiensis* pero ninguno de ellos se produce comercialmente (Bravo y Quintero, 1993).

El único *Bt* comercial existente en el país, posee algunos inconvenientes que opacan las ventajas en el uso de este tipo de insumo:

- 1.- Es recomendado para el control amplio de lepidópteros, no específico por familia o especie. Esto lógicamente tiene el problema que no es tan efectivo para ciertas plagas, como por ejemplo para la polilla del tomate.
- 2.- Deficiente respaldo técnico, lo que resulta en un inadecuado uso del producto por parte del agricultor. Se ha llegado a recibir información de los importadores, en relación a que





el producto actúa por contacto, lo que obviamente influye en la eficiencia del insumo y en los costos productivos. A lo anterior se suma la escasa o nula investigación de las toxinas de este producto y su real efectividad en Chile y sus plagas.

- 3.- Poca difusión, debido a que este es un producto para un pequeño grupo de agricultores que trabaja bajo un sistema orgánico o está preocupado de la resistencia o el medio ambiente. Este insumo debiera ser orientado al manejo convencional, pero como los importadores se dedican a la venta de insecticidas químicos, difícilmente invertirán el tiempo y los recursos necesarios para su uso masivo.
- 4.- Alto precio, debido a que es un producto elaborado en el hemisferio norte y con tecnologías caras. El costo de importación y su baja venta hacen que este producto exceda en cerca de un 30% sobre el valor que se podría comercializar un producto nacional.

El proyecto se enmarca en las políticas de Bio Insumos Nativa, las cual buscan el desarrollo científico y comercial de insumos destinados a la agricultura orgánica, basados en organismos nativos, que impliquen una disminución de las externalidades negativas de la producción agrícola, mejoren la eficiencia productiva y disminuya los costos de producción.

Esta empresa ha logrado posicionar las cepas de *Trichoderma*, obtenidas del proyecto FIA-Universidad de Talca (Codigo C98-1-A-98), a un nivel comercial (2.000 lts. durante el primer año), tanto para la agricultura orgánica como para la convencional. El mismo objetivo se busca en este proyecto con las cepas de *Bacillus thuringiensis* en convenio con el Instituto de Biología y Biotecnología, de Universidad de Talca.

Bio Insumos nativa, aprovechando la basta experiencia en el tema orgánico de sus dueños, pretende desarrollar un producto hecho a la medida del agricultor chileno, en donde, además de las características que poseerá este nuevo producto, le entregará al agricultor una asesoría integral respecto del mejor uso del *Bt* y su interacción con el resto de los agroquímicos del mercado nacional.

Debido a que la empresa está en el rubro de los insumos orgánicos (para la agricultura convencional y orgánica), es parte de la subsistencia el hacer la máxima difusión de estos, por lo que se garantiza un real impacto del proyecto y los productos resultantes.





7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

(Anexar además un plano o mapa de la ubicación del proyecto)

Nombre lugar o entidad donde se lleva a cabo el proyecto: Bio-Insumos Nativa Ltda.

Región: Séplima

Provincia: Linares

Comuna: San Javier

Localidad: Ubicada dentro del radio urbano de San Javier, a 25 kms. al sur de Talca

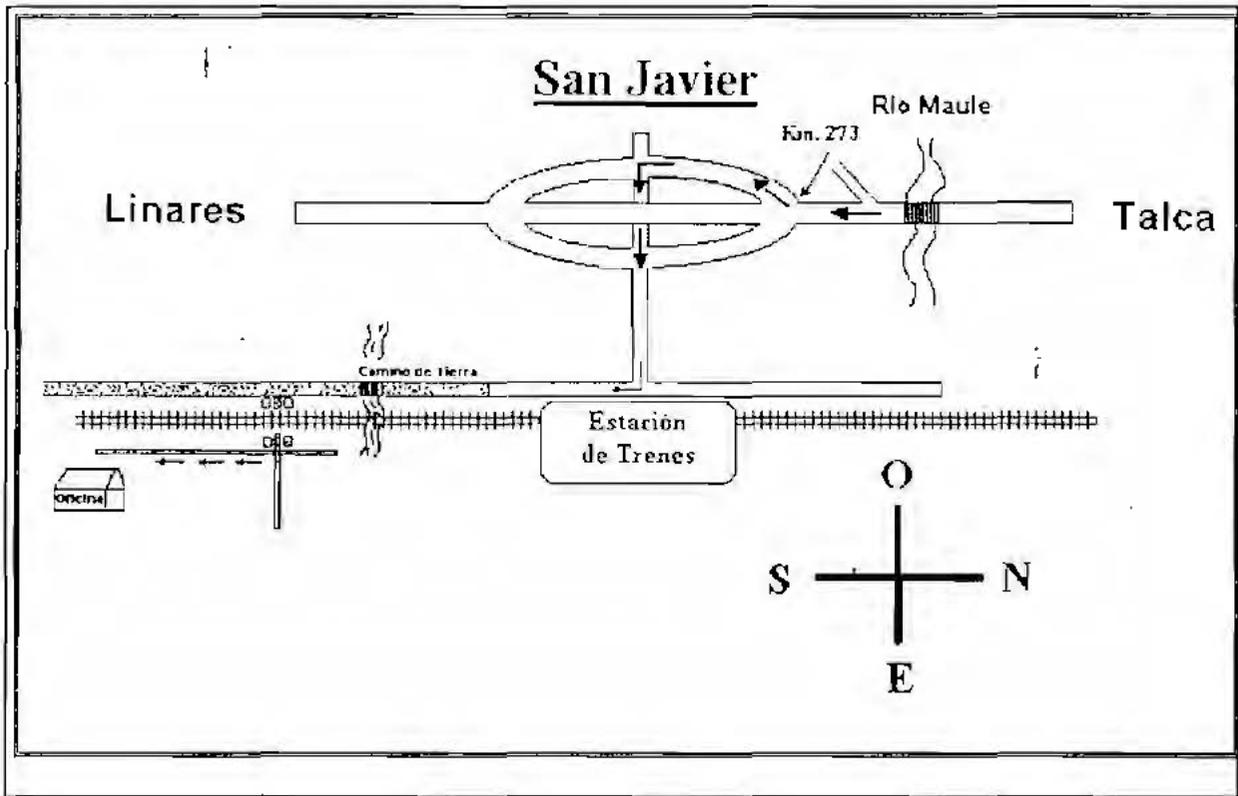
Propietario (Nombre, RUT, dirección, fono y fax) en caso que corresponda

(Repetir esta información tantas veces como número de unidades productivas existan)

PLANO DE UBICACIÓN DE OFICINA Y BODEGA DE NATIVA LTDA

1. De Talca salir con dirección San Javier.
2. Salirse de la carretera en el cruce principal de San Javier (km. 273).
3. Dirigirse hacia la Cordillera de los Andes hasta topar con la Estación de Trenes de San Javier.
4. Doblar hacia el Sur (derecha). Al poco andar, comenzará un camino de tierra, luego se pasará un puente de madera.
5. Poco mas allá (50 mt) habrán 2 pilastras blancas para cruzar la línea del tren (una de ellas está en el suelo), doblar a la izquierda.
6. Cruzar la línea del tren.
7. Al cruzar la línea del tren INMEDIATAMENTE (8 mts.) doblar hacia el sur (derecha). Entrarán por un callejón con palmeras por las orillas.
8. Seguir el camino hasta llegar al Laboratorio.







8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL:

Desarrollar un insumos para la agricultura orgánica (y convencional) en base a formulaciones de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*), complejo de gusanos cortadores (*Agrotis spp.*, *Copitarsia spp.*, *Heliothis spp.*, entre otros) y mariposa blanca de la col (*Pieris brassicae*), de importancia agrícola para la séptima región.

8.2. ESPECÍFICOS:

- 1.- Determinar las tres cepas con mayor efecto insecticida por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*.
- 2.- Determinar en condiciones de campo, la capacidad insecticida de las 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*
- 3.- Determinar parámetros óptimos de producción de las cepas activas de *B. thuringiensis* , para las plagas en estudio, de manera de generar 3 productos comerciales: *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*
- 4.- Difundir el uso de *Bt* en cultivos de importancia regional y elaborar un instructivo de uso.





9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

(Describir en detalle la metodología y procedimientos a utilizar en la ejecución del proyecto)

I. Aspectos Generales

La propiedad intelectual es de la Universidad de Talca y esta analizando la normativa y métodos de registro de patentes y la aplicabilidad a este tipo de microorganismos. Bio Insumos Nativa, solo Serra la encargada de la producción masiva y comercialización, por lo que no tenemos mayor injerencia en este aspecto.

En el ultimo año del proyecto, dependiendo de los resultados obtenidos y del nivel de comercialización, Nativa estimara según los volúmenes estimados y la legislación y normativas de mercado existentes, realizar los ensayos necesarios y los procedimientos necesarios para obtener el registro SAG.

1.- Material Vegetal

Se utilizará plantas de tomate (vd. Presto), para la crianza de la polilla del tomate, Lechugas (vd. Esmeralda) para los gusanos cortadores (altamente polífagos) y repollo (vd. Record) para la mariposa blanca de col. Estas hortalizas corresponden a las más cultivadas en la Región del Maule. Las condiciones de luz y temperatura se mantendrán controladas (fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 25° C). Estas plantas serán utilizadas tanto para los ensayos *in vitro* como de campo.

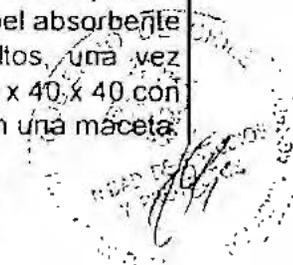
2.- Obtención de larvas neonatas de los distintos lepidópteros

Las larvas de insectos que serán utilizadas en los bioensayos (Polilla del Tomate, *Tuta absoluta*, Mariposa Blanca de la col *Pieris brassicae* y Gusanos cortadores *Agrotis* spp), se obtendrán desde los principales sectores de producción de estas hortalizas en la Región (San Clemente, Colín). Los individuos en sus estados larvales serán colectados y transportados al laboratorio de Bio Insumos Nativa Ltda., para su establecimiento. La crianza de larvas se efectuará en placas petri; utilizando como sustrato sus respectivas plantas hospederas, bajo condiciones controladas. De esta forma se contará con el número adecuado de organismos para los bioensayos.

3.- Crianza de estados inmaduros bajo condiciones controladas

Una vez obtenidos los estados inmaduros es posible alimentarlos dentro de placas petri de 10 x 15, en forma individuales. Sin embargo se debe tener la preocupación de mantenerlas siempre lo más higiénicamente posible (restos de alimentos y fecas), con el fin de evitar todo tipo de contaminación biológica. Las larvas se criarán en forma individual y con restos de hojas de sus respectivas hospederas (tomate, para la Polilla del Tomate, repollo, para la Mariposa blanca de col y lechuga para los Gusanos cortadores. Se opto por la producción sin utilizar dietas artificiales, dada la facilidad de producir estos insectos en sustratos naturales y los problemas de manejo de contaminantes en las dietas artificiales, los que requieren el uso de fungicidas y antibioticos, que podrían afectar el desarrollo de los ensayos.

Al cabo de algunas semanas los insectos completarán su desarrollo larval para dar paso a los estados pupales, estas serán puestas en las cámaras de acrílico sobre papel absorbente ligeramente humedecidos para obtener así los primeros ejemplares adultos, una vez eclosados los adultos se trasladarán dentro de unas cámaras de acrílico de 40 x 40 x 40 con una puerta con malla o tull, estas tendrán en su interior su planta hospedera en una maceta.





Esto permitirá que los adultos se reproduzcan y realicen sus posturas en las hojas o paredes de las cámaras. Una vez eclosada las larvas se trasladaran con ayuda de pinceles a sus respectivas placas petri para ser nuevamente criadas o utilizada en los bioensayos, así se completará el ciclo para las 3 especies de lepidópteros.

4.- Obtención del extracto *Bt*

Las bacterias serán crecidas en medio de cultivo leche peptonizada, hasta que se observe lisis bacteriana total. Para verificar esta condición, se tomará alicuotas de cultivo para su visualización en microscopio óptico, previa tinción con azul de Coomassie R-250. Terminado el tiempo de fermentación, la obtención del producto se realizará mediante centrifugación el medio fermentativo a 2500g por 15 minutos, eliminándose el sobrenadante. El precipitado será deshidratado a 50°C por 24 horas. La biomasa seca obtenida se triturará. Como formulación bioinsecticida se considerará el contenido total de esporas, cristales proteicos y residuos de bacterias, presentes en dicha materia seca.

II. Ensayos

1.- Bioensayo de Laboratorio: Determinación de las tres cepas con mayor efecto insecticida por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*.

Para evaluar el rango de eficacia insecticida de cada una de las cepas, se realizará un ensayo preliminar. Este consistirá primero en analizar el efecto de dos dosis límites (una alta y una baja), de manera de detectar el piso y techo de las concentraciones a evaluar





En una segunda etapa, se evaluará la dosis letal 50 (LD₅₀). Se analizarán 5 dosis por cepa (dentro de los rangos evaluados anteriormente), con 10 larvas por tratamiento (repeticiones). Utilizando una balanza analítica para la preparación exacta de las dosis, una cantidad adecuada de extracto Bt se resuspenderá en 25 ml de agua destilada estéril, ajustada a pH 10,5, mezclándose mecánicamente a 37° C, hasta lograr homogeneización total (Thomas y Ellar, 1983).

Debido a los problemas de canibalismo, reportados en algunas larvas neonatas, se utilizará la metodología conocida como bioensayos en hojas (bioassays leaf). Esta consiste en la utilización de discos de hojas jóvenes, correspondientes a los hospederos de cada insecto, como sustrato alimenticio. Discos de hojas de repollo y de lechuga de 5 cm, servirán de alimento a larvas de la mariposa blanca de la col y gusanos cortadores, respectivamente. Para la polilla del tomate se utilizará un foliolo como sustrato. El tejido vegetal utilizado debe ser fenológicamente uniforme y libre de cualquier plaguicida. Estos serán colocados en el interior de una placa Petri (6 cm de diámetro).

Cada disco (o foliolo) será lavado en una solución de Tween 20 al 0,3%, luego lavado en agua destilada (tres veces) y secado en papel absorbente. El material vegetal así tratado, será sumergido y agitado suavemente por 2 minutos, en una suspensión de extracto Bt, de características y concentraciones determinadas. Una vez seco, sobre una superficie no absorbente, el material vegetal será transferido al interior de una placa petri, sobre papel previamente humedecido con agua destilada estéril. En tomate, se colocará un algodón humedecido en el extremo apical del foliolo para controlar su hidratación. Una larva neonata será depositada sobre el disco vegetal, y constituirá la unidad experimental (Jonson et al., 1991).

Se efectuarán controles utilizando larvas festigos depositadas sobre tejido vegetal humectadas solamente con el vehículo de la solución proteica, agua destilada estéril ajustada a pH 10,5.

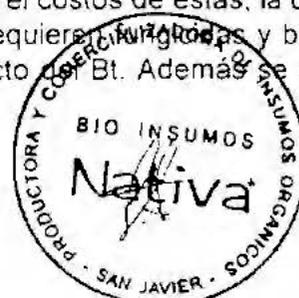
Las condiciones ambientales de los ensayos serán de 25° C, con un fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

La mortalidad se evaluará cada 24 horas, siendo la duración de cada bioensayo de 144 hrs. Los porcentajes de mortalidad se adecuarán a la fórmula de Abbot (Abbot, 1925) y los valores LD50 (Dosis Letal 50) se obtendrán por análisis Probit (Moermans y Hecke, 1995) utilizando para ello un programa computacional.

Para cada especie de insecto, se elegirá las tres cepas con menor LD₅₀. Estas cepas serán utilizadas en los estudios de compatibilidad con pesticidas.

El diseño experimental será completamente al azar con arreglo factorial de 10X 5 donde los factores son cepas y dosis respectivamente. Cada tratamiento tendrá 10 repeticiones. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

No se utilizarán dietas, por las siguientes razones, primero el costo de estas, la dificultad de manejo y principalmente por el hecho que estas dietas requieren fungicidas y bactericidas para su elaboración, lo que podría estar alterando el efecto del Bt. Además se cuenta con





experiencia en la crianza de estas plagas sobre sustrato natural, lo que es bastante fácil ya que lechuga se encuentra durante todo el año.

1.1 Ensayo de Compatibilidad con pesticidas

El principal objetivo de este ensayo, es analizar la compatibilidad de las tres cepas de *B. thuringiensis* por plaga (que mostraron mayor actividad insecticida) frente a los principales funguicidas y bactericidas usados en las hortalizas. Estos productos por su composición química, podrían eventualmente causar alguna incompatibilidad, o anular su efecto insecticida de *Bt*. Para este propósito se utilizará algunos de los funguicidas más usados por los agricultores: captan, benomil y mancozeb, además de algún bactericida como oxiclورو de cobre.

Cada ensayo se realizará con larvas sobre discos de hojas o folíolos. Las dosis a utilizar corresponderán a las LD_{50} determinadas para las cepas *Bt* en estudio, y en el caso pesticidas, se usará las dosis comerciales. Las dosis de ambos productos (*Bt* y Pesticidas) serán mezclados para luego realizar las aplicaciones por aspersión sobre los discos o folíolos. Cada ensayo contemplará 10 unidades experimentales.

Los controles corresponderán a hojas sumergidas en agua destilada estéril ajustada a pH 10,5. las condiciones de los ensayos serán de 25° C, con un fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

1.2. Ensayo de efectos sobre enemigos naturales.

Para realizar este ensayo se aplicarán la mejor dosis y cepas seleccionadas de cada una de las plagas. Los insectos a evaluar serán *Apis mellifera* e *Hipodamia* sp, representando los órdenes a los que pertenecen la mayoría de los controladores biológicos. Se realizarán dos ensayos uno por contacto, donde los insectos serán asperjados con la dosis y cepas seleccionadas anteriormente y luego puestos en un hábitat adecuado, sin presencia de las cepas, donde se evaluará su sobrevivencia. El segundo ensayo consistirá en realizar aplicaciones de las cepas sobre el hábitat, con las fuentes de alimento presentes, solución estéril azucarada para abejas y pulgones para chinitas, donde se medirá el efecto por ingestión. Los insectos una vez muertos serán sembrados en placas petri con agar nutriente, para determinar la presencia de las cepas de *Bt*.

El diseño experimental será completamente al azar, siendo cada tratamiento las cepas a la dosis seleccionada y con 10 repeticiones, por insecto. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

Los tratamientos serán aplicación de cada una de las cepas de *Bacillus* seleccionadas y un testigo sin aplicación. Considerándose 3 repeticiones de 10 insectos por tratamiento.





2.- Bioensayo de Terreno: Determinación en condiciones de campo, de la capacidad insecticida de las 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*

Esta etapa contempla la evaluación de campo de las 3 mejores cepas obtenidas a partir de los bioensayos de laboratorio para cada especie a controlar.

Para el estudio de ensayos de campo, se seleccionará sectores con altos índices de ataque de este grupo de insectos. Los sectores más adecuados corresponden a la zona de San Clemente, reconocida productora de hortalizas, y la zona de Colín, que está entre los mayores productores de tomate bajo plástico u otra que muestre altos índices de ataque de las plagas en cuestión. Los agricultores a seleccionar, serán habituales productores de los cultivos en estudio, ubicados en la séptima región, en zonas con historial de problemas de las plagas, serán convencionales y si existiera la posibilidad en el momento, se realizara otra unidad con un productor orgánico.

Para realizar los tratamientos se considerará el estado fenológico de los cultivos y los insectos. El tratamiento contra gusanos cortadores como la mariposa blanca de la col comenzará junto con la emergencia de las plantas (lechuga y repollo respectivamente). Para tomate, los estados a considerar serán floración y formación de frutos.

Los ensayos de campo serán realizados en cámaras individuales de alimentación. Estas consisten en dos cápsulas cilíndricas plásticas de 10 cm de diámetro, cubiertas en uno de sus extremos con una fina malla metálica, unidas a una pinza metálica que permite fijar la cámara a la lamina foliar sin dañarla físicamente, e impidiendo la salida de las larvas. Esta técnica evita el problema de alterar el tejido y compuestos naturales de la planta, con la consiguiente liberación de sustancias que pueden alterar la conducta del insecto y del ensayo

Las variedades de hortalizas corresponderán a las mismas utilizadas en los ensayos in vitro. El diseño experimental será de bloques al azar. Para cada cultivo se evaluarán 10 plantas (unidades experimentales) de tamaño y vigor similar. Cada planta tendrá 4 cámaras de alimentación, con una larva cada una (repeticiones). Los parámetros a medir serán mortalidad y área de daño por la larva. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

Las plantas serán asperjadas con una suspensión de extracto *Bt*, utilizando la concentración LD50 determinada en los bioensayos de laboratorio. La aplicación se realizará al atardecer, evitando la exposición solar.

Tratamientos por plaga:

- T1: Testigo absoluto
- T2: Control positivo: Dipel 2X en dosis comercial
- T3: Cepa Bt 1
- T4: Cepa Bt 2
- T5: Cepa Bt 3
- T6: Piretroide convencional.
- 5- Enemigos naturales





3.- Determinación de los parámetros óptimos de producción de las cepas activas de *B. thuringiensis*, para las plagas en estudio.

Para cumplir con esta actividad, se dispone de 10 cepas nativas de *B. thuringiensis*, aportadas por el doctor Luis Meza Basso de la Universidad de Talca, las cuales mostraron una alta producción de la toxina activa. Como una forma de evitar la contaminación de las muestras, todas las operaciones de repique e inoculación se realizarán en cámara de flujo laminar.

Para realizar los estudios de laboratorio, las cepas serán cultivadas en matraces erlenmeyer, en medio de cultivo leche peptonizada, en agitación en agitador orbital. El crecimiento de las cepas se realizará con agitación continua, a 25° C, esto permitirá tener un inóculo estándar para la realización de los ensayos. Todos los trabajos de inoculación se realizarán bajo cámara de flujo laminar.

La producción de bacterias, se realizará en biorreactores del tipo "air lift" de asa interna. Para la construcción de los biorreactores, se emplearán botellas de suero de 1L, las cuales serán cortadas por su parte superior hasta una altura desde 14 cm. Las tapas se fabricarán de un material microporoso, con un diámetro de 10 cm, y tendrán orificios para los dispositivos de salida de CO₂, toma temperatura e ingreso de aire. Una asa interna, hecha de un tubo de vidrio con un diámetro de 3,0 cm y con una altura de 5,5 cm, se encontrará en la parte central del biorreactor adherido con silicona a las paredes a través de soportes. Para el insuflado de aire, se emplearán bombas de aireación para peceras. Este aire se distribuirá en el biorreactor, por medio de una piedra dispersadora, previo paso por unas botellas de vidrio, conteniendo una solución saturada de NaCl al 20% para esterilizar el aire (Mendoza, 1995), modificándose el ingreso de la aireación por medio de un tubo desde la parte superior hasta la parte inferior del biorreactor.

Los biorreactores vacíos serán esterilizados usando luz UV a 30 cm durante 15 minutos, previo tratamiento con hipoclorito de sodio al 20% por 5 minutos.

Para iniciar el cultivo se producirá un preinóculo bacteriano a partir del cepario preexistente. Para ello, se tomará una pequeña cantidad de bacterias, desde las placas petri, y se crecerán en 20 ml de leche peptonizada, durante 24 horas a 28 °C con agitación constante. Este preinóculo será vertido sobre 480 ml de leche peptonizada contenido en el biorreactor.

4.1. Ensayo de medio de cultivo.

Se evaluarán para cada una de las cepas seleccionadas las siguientes mezclas de nutrientes, para determinar el mejor medio de cultivo de Bt.

- Caldo nutriente.
- Medio Lb.
- Medio CIB.
- Medio PMB
- Jugo de tomate KH₂PO₄+ K₂HPO₄+(NH₄)₂SO₄+ CaCl₂ 7H₂O+ MnSO₄
- Jugo de tomate + aceite de pescado
- Jugo de tomate + aceite de pescado + KH₂PO₄+ K₂HPO₄+(NH₄)₂SO₄+ CaCl₂ 7H₂O+ MnSO₄





Se considera al Agar nutriente, como tratamiento control.

Cada uno de estos medios de cultivo serán colocado en matraces erlenmeyer de 500 ml, en un volumen de 250 ml/ matraz siendo sembrados, con 25 ml del inóculo estandar suspensión de esporas de *Bt.* a una concentración 10^6 esporas/ml, esto realizado en cámara de flujo laminar. Manteniéndose los cultivos en agitación, a una temperatura de 25°C . Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bioinsecticida. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizándose un diseño completamente al azar.

4.2. Ensayo de temperatura y pH.

Para medir el efecto del pH y la temperatura se harán las siguientes combinaciones:

- pH 6,5 a 25, 30 y 35°C .
- pH 7,0 a 25, 30 y 35°C
- pH 7,5 a 25, 30 y 35°C .

Se considera pH 7 y 25°C como condiciones control.

Para esto se utilizarán los bio reactores, cada uno de los cuales serán llenado con 500 ml del medio de cultivo, seleccionado del ensayo I e inoculado con 50 ml del inóculo estandar a una concentración de 10^6 esporas/ml Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bioinsecticida. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizando un diseño factorial de 3×3 .

4.3. Ensayo de oxigenación.

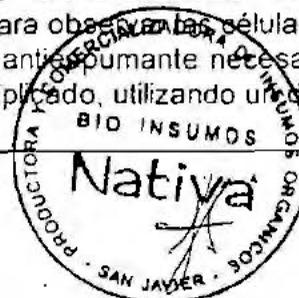
Utilizando la combinación de los factores antes estudiados, se evaluarán 3 sistemas de oxigenación.

- Sin adición de aire ni agitación (control)
- Adición de H_2O_2 (10 mg/l) cada 3, 6, 12 y 24 hrs.
- Adición de aire esterilizado a 0,5, 1, 1.5 y 2 vol de aire/vol de medio/min

En combinación con dos patrones de agitación de 200 y 800 rpm.

El aire se esterilizará, al hacerlo pasar por una suspensión de NaCl al 30%

Para esto se utilizarán los bio reactores, cada uno de los cuales serán llenado con 500 ml del medio de cultivo, seleccionado del ensayo I e inoculado con 50 ml del inóculo estandar a una concentración de 10^6 esporas/ml Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2mL de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bio-insecticida. Además se determinará la cantidad de anti-espumante necesario para cada velocidad de agitación. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizando un diseño factorial de $2 \times 4 \times 2$





4.4. Optimización producción.

Una vez determinado el mejor conjunto de parámetros de producción, se iniciara un proceso de optimización, de la producción, a través de la disminución controlada de aporte de nutrientes y energía, al sistema productivo buscando al final del proyecto poder generar una cantidad de *Bt.* suficiente para abastecer 20 has de alguna de las hortalizas, sobre las que se trabaja en el proyecto. Además de realizar una estimación de costos de producción de cada una de las cepas de *Bt.* Esto se realizaría en los bio reactores air lift, conjugando todos los factores ya estudiados.

La producción de bacterias, se realizará en biorreactores del tipo "air lift" de asa interna. Para la construcción de los biorreactores, se emplearán botellas de suero de 1L, las cuales serán cortadas por su parte superior hasta una altura desde 14 cm. Las tapas se fabricarán de un material microporoso, con un diámetro de 10 cm, y tendrán orificios para los dispositivos de salida de CO₂, toma temperatura e ingreso de aire. Una asa interna, hecha de un tubo de vidrio con un diámetro de 3,0 cm y con una altura de 5,5 cm, se encontrará en la parte central del biorreactor adherido con silicona a las paredes a través de soportes. Para el insuflado de aire, se emplearán bombas de aireación para peceras. Este aire se distribuirá en el biorreactor, por medio de una piedra dispersadora, previo paso por unas botellas de vidrio, conteniendo una solución saturada de NaCl al 20% para esterilizar el aire (Mendoza, 1995), modificándose el ingreso de la aireación por medio de un tubo desde la parte superior hasta la parte inferior del biorreactor.

Los biorreactores vacíos serán esterilizados usando luz UV a 30 cm durante 15 minutos, previo tratamiento con hipoclorito de sodio al 20% por 5 minutos.

4.5. Evaluación de sistemas artesanales.

Paralelamente a la producción en bio reactores, se montara el sistema de producción artesanal, utilizado en Cuba, el que consiste en:

En frascos de vidrio de 1 l, se añaden 700 ml de medio de cultivo, con el pH ajustado al valor mejor evaluado, estos frascos se colocan a incubar a la mejor temperatura evaluada en oscuridad.

Para cada tratamiento se realizaran muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bio-insecticida. Una vez detectado el cristal bio insecticida, se elaborara el extracto *Bt* para cada uno de los sistemas, los que serán evaluados para cada una de las cepas seleccionadas, en sus respectivas plagas

4.6. Almacenamiento del producto activo

Utilizando el mejor conjunto de parámetros de producción, se producirán en los bio reactores 500 ml de cada una de las cepas de *Bt*, los que se someterán a centrifugación a 2500g por 15 minutos, eliminándose el sobrenadante, dividiéndose en . El precipitado se someterá a los siguientes tratamientos:

- 50° C
- 45° C





Con y sin aire forzado, en estufa de secado con aire forzado.
cada una de estas temperaturas por:

- 12 hrs.
- 24 hrs.

Después de esta etapa se evaluará la actividad *in vitro* de dosis de cada una de las cepas, bajo cada uno de los tratamientos, seleccionando el sistema de secado que requiera menor dosis y concentración de las cepas de *Bt*

El tratamiento mejor evaluado para cada cepa será sometido al siguiente ensayo factorial.

Factor acarreados

- Talco.
- Bentonita.
- Zeolita.

Factor temperatura de almacenaje

- 4° C
- 10° C
- 25° C

Envase

- Envase de papel aluminizado.
- Envase de papel aluminizado envasado al vacío.

Esto con 10 repeticiones por tratamiento.

Trimestralmente, por 16 meses se evaluará, a través de ensayos *in vitro*, la actividad de cada uno de los tratamientos y las UFC por gr. de cada una de las formulaciones. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

Justificación de los equipos

Cámara de Flujo laminar: Requerimos un equipo con un área de trabajo mínimo de 1,18 m de largo, además que se encuentre instalada lo más pronto posible, por lo que se optó por el equipo nacional, el que ha tenido excelentes críticas de otros laboratorios y no requiere 60 a 90 días para estar funcionando.

Balanza analítica: Debido a los volúmenes a utilizar de las cepas para los ensayos *in vitro*, se requiere balanzas de una precisión de 0,1 mg.

Agitador orbital: Dada la cantidad de tratamientos en los ensayos de producción, se requiere un agitador con suficiente capacidad en cuanto a peso para poder mantener la agitación de los matraces.

Horno de secado: Se estimó una capacidad de 53 litros, para asegurar simultaneidad en la realización de los ensayos de secado del producto, además de aire forzado con el fin de disminuir la temperatura requerida para el secado y así evitar daños en el formulado.

Lupa: Se considera una lupa para determinar síntomas, etapas larvales y economía de los insectos a utilizar.





Con y sin aire forzado, en estufa de secado con aire forzado.
cada una de estas temperaturas por :

- 12 hrs.
- 24 hrs.

Después de esta etapa se evaluará la actividad *in vitro* de dosis de cada una de las cepas, bajo cada uno de los tratamientos, seleccionando el sistema de secado que requiera menor dosis y concentración de las cepas de *Bt*.

El tratamiento mejor evaluado para cada cepa será sometido al siguiente ensayo factorial.

Factor acarreados

- Talco.
- Bentonita.
- Zeolita.

Factor temperatura de almacenaje

- 4° C
- 10° C
- 25° C

Envase

- Envase de papel aluminizado.
- Envase de papel aluminizado envasado al vacío.

Esto con 10 repeticiones por tratamiento.

Trimestralmente, por 16 meses se evaluará, a través de ensayos *in vitro*, la actividad de cada uno de los tratamientos y las UFC por gr. de cada una de las formulaciones. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

Justificación de los equipos

Cámara de Flujo laminar: Requerimos un equipo con un área de trabajo mínimo de 1,18 m de largo, además que se encuentre instalada lo más pronto posible, por lo que se optó por el equipo nacional, el que ha tenido excelentes críticas de otros laboratorios y no requiere 60 a 90 días para estar funcionando.

Balanza analítica: Debido a los volúmenes a utilizar de las cepas para los ensayos *in vitro*, se requiere balanzas de una precisión de 0,1 mg.

Agitador orbital: Dada la cantidad de tratamientos en los ensayos de producción, se requiere un agitador con suficiente capacidad en cuanto a peso para poder mantener la agitación de los matraces.

Horno de secado: Se estimó una capacidad de 53 litros, para asegurar simultaneidad en la realización de los ensayos de secado del producto, además de aire forzado con el fin de disminuir la temperatura requerida para el secado y así evitar daños en el formulado.

Lupa: Se considera una lupa para determinar síntomas, estas larvas y la taxonomía de los insectos a utilizar.





Centrifuga: La centrifuga especificada, es necesaria, ya que debemos trabajar solo con el sobrenadante de las soluciones, en volúmenes pequeños para los ensayos in vitro y volúmenes considerables para los ensayos en campo, esto implica varios rotores y que sea refrigerada, de forma de permitir un uso continuo a 3500 g, que es lo necesario para separar los cuerpos paraesporales.





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2003

Objetivo especific: N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
Global	1	<u>Compra de equipos e insumos</u>	Nov/03	Marzo/04
1	1.1	<u>Cultivo de plantas hospederas para plagas</u>	Nov/03	Mar/04
1	1.2	Recolección de plagas a criar	Nov/03	Mar/04
1	1.3	Crianza de plagas	Ene/04	Oct/04
3	3.1	Elaboración de bio reactores	Nov/03	Mar/04
3	3.2	Elaboración de cepario de Bt.	Dic/03	Ene/04

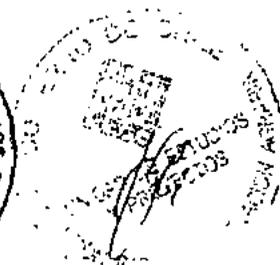




10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual)

AÑO 2004

Objetivo especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
Global	2	Compra de insumos	Ene/04	Dic/04
3	3.3	Producción de cepas de Bt. para ensayos	Ene/04	Mar/04
1	1.4	Bio Ensayo Laboratorio	Mar/04	Jun/04
1	1.5	Bio ensayo compatibilidad	Jul/04	Sep/04
3	3.4	Ensayo I (Medio cultivo)	Abr/04	Jun/04
3	3.5	Ensayo II (T° pH)	Jul/04	Sep/04
2	2.1	Selección de agricultores	Sep/04	Sep/04
2	2.2	Bio ensayos de campo	Oct/04	Abril/05
	3.6	Ensayo III (oxigenación)	Oct/04	Dic/04
1	1.6	<u>Cultivo de plantas hospederas para plagas</u>	Nov/04	Mar/05
1	1.7	Recolección de plagas a criar	Nov/04	Mar/05
4	4.1	Día de campo	Dic/04	Dic/04





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2005

Objetivo especific. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
Global	3	Compra de insumos	Ene/05	Dic/05
3	3.7	Ensayo IV (Optimización)	Ene/05	Abr/05
4	4.2	Participación congreso	Mar/05	Mar/05
3	3.8	Ensayo V (Artesanales)	Ene/05	Abr/06
2	2.3	Desarrollo Unidades de Validación	Jul/05	May/06
3	3.9	Ensayos VI (Almacenaje)	Abr/05	Sep/06
4	4.3	Día de campo	Oct/05	Oct/05
2	2.3	Instalación y desarrollo de ensayos de campo	Oct/05	Abr/06
4	4.4	Día de campo	Dic/05	Dic/05





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2006

Objetivo especific. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
Global	4	Compra de insumos	Ene/06	Jul/06
4	4.5	Participación congreso	Mar/06	Mar/06
4	4.6	Elaboración de boletín de difusión	Ago/06	Oct/06
Global	5	Elaboración informe final	Ago/06	Oct/06



PRJ	Actividad	Descripción	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic		
Unab	1.2.3.4	Compras equipos e insumos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	5	Elaboración Informe final																																							
	1.1	Cultivo de plantas hospederas para plagas	X	X	X	X	X																																		
	1.2	Recolección de plagas a criar	X	X	X	X	X																																		
	1.3	Crianza de plagas		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	1.4	Bfo ensayo Laboratorios					X	X	X	X																															
	1.5	Bfo ensayo compatibilidad							X	X	X																														
	1.6	Cultivo de plantas hospederas para plagas																								X	X	X	X	X											
	1.7	Recolección de plagas a criar																								X	X	X	X	X											
		Resultados de ensayos in vivo e in vivo																								X															
Hito I																																									
	2.1	Selección de agricultores											X																												
	2.2	Instalación y desarrollo de ensayos de campo												X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2.3	Desarrollo Unidades de Validación																								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hito II		Resultados de ensayos en campo																								X															
PRJ	Actividad	Descripción	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic		
	3.1	Elaboración de bio reactores	X	X	X	X	X																																		
	3.2	Elaboración de cepas de Bt		X	X	X	X																																		
	3.3	Producción de cepas de Bt, para ensayos		X	X	X	X																																		
	3.4	Ensayo I (Medio cultivo)						X	X	X																															
	3.5	Ensayo II (T° pH)									X	X	X																												
	3.6	Ensayo III (oxigenación)												X	X	X																									
	3.7	Ensayo IV (sist. Artesanales)														X	X	X	X																						
	3.8	Ensayo V (Almacenaje)																X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3.9	Ensayos VI (optimización)																X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	4.1	Día de campo													X																										
	4.2	Congreso científico														X																									
	4.3	Día de campo																								X															
	4.4	Día de campo																										X													
	4.5	Congreso científico																																							
	4.6	Elaboración de boletín de difusión																																							
Hito III		Elaboración Informe final																																							





11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1 Resultados esperados por objetivo

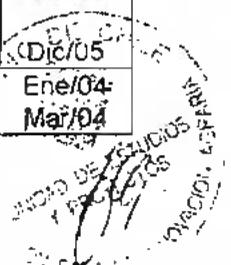
Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Obtener 2 cepas activas para cada plaga	Numero de cepas activas	2 por plaga	1 cepa	May/04
2	control de cada una de las plagas	Disminución de daño	80%	50% / 80%	Abr/05 Abr/06
3	Producción para 20 has. Equivalente a 1 Kg. de formulado/ ha Y periodo de almacenaje por 12 meses	Kg. Meses	20 Kg./mes	5 Kg. /mes 10 Kg./mes 20 Kg./mes	Ago/05 Dic/05 Jul/06
			Jul/06	6 meses	Ene/06
4	días de campo	Informe día de campo	4	2 2	Ago/05 Ago/06
	Asistencia a congresos científicos.	Resumen de congreso	2	1 2	Oct/04 Nov/05
	Boletín de difusión 200 ejemplares	Impresión		Documento elaborado Documento impreso	Jul/06 Oct/06





11.2 Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. N°	Activid. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
Global	1	Porcentaje de compra de equipos e insumos para el año	Facturas	100%	50% 100%	Jun/03 Dic/03
Global	2	100% Compra de equipos e insumos para el año	Facturas	100%	50% 100%	Jun/03 Dic/03
Global	3	100% Compra de equipos e insumos para el año	Facturas	100%	50% 100%	Jun/03 Dic/03
Global	4	100% Compra de equipos e insumos para el año	Facturas	100%	50% 100%	Jun/03 Dic/03
Global	5	Elaboración informe	Informe	Aprobación de informe	Entrega informe	Oct/06 Nov/06
1	1.1	Producción de alimento para insectos	N° insectos por plaga	150 insectos / plaga	75 150	Ene/04 Mar/04
1	1.2	Población inicial de insectos por plaga	N° insectos por plaga	150 insectos / plaga	75 150	Ene/04 Mar/04
1	1.3	Producción de insectos	N° insectos por plaga	150 insectos / plaga/ mes	75 150	Jun/04 Oct/04
1	1.4	Cepas seleccionadas por plaga	N° cepas	2 cepa por plaga	1 cepa 2 cepas	May/04 Jun/04
1	1.5	Determinación de compatibilidades	N° de productos testeados	10	5 10	Ago/04 Sep/04
1	1.6	Producción de alimento para insectos	N° insectos por plaga	150 insectos / plaga	75 150	Dic/04 Mar/05
1	1.7	Población inicial de insectos por plaga	N° insectos por plaga	150 insectos / plaga	75 150	Ene/05 Mar/05
2	2.1	Selección de agricultores	N° agricultores	2 agricultores por plaga	2	Sep/04
2	2.2	Cepas activas en campo	Disminución porcentaje de daño	80%	50% 80%	Abr/05 Abr/06
2	2.3	Unidades de Validación	N°	3	Tomate invernadero Tomate aire libre Repollo	Jul/05 Oct/05 Dic/05
3	3.1	Bio reactores operativos	N° de bio reactores	12	6 12	Ene/04 Mar/04





3	3.2	Cepario funcionando	Nº cepas reproducidas	10	5 10	Dic/04 Ene/04
3	3.3	Producción de cepas	litros	15/mes	10 15	Feb/04 Mar/04
3	3.4	Selección de mejor medio	Producción sobre testigo (AN)	100%	50% 100%	May/04 Jun/04
3	3.5	Selección mejor combinación Tº y pH	Producción sobre testigo	100%	50% 100%	Ago/04 Sep/04
3	3.6	Selección sistema de oxigenación	Producción sobre testigo	100%	50% 100%	Nov/04 Dic/04
3	3.7	Sistema de producción	Kg.	5 Kg /mes	2,5 Kg./mes 5 Kg./mes	Feb/05 Abr/05
3	3.8	Aumento de los niveles de producción	Kg.	20 Kg./mes	10 Kg./mes 20 Kg./mes	Ene/06 Sep/06
3	3.9	Almacenaje por 16meses	meses	16	6 meses 16 meses	Oct/05 Abr/06
4	4.1	Día de campo	Nº asistentes	25	25	Dic/04
4	4.2	Participación congreso	Publicación de resumen			Mar/05
4	4.3	Día de campo	Nº asistentes	25	25	Oct/05
4	4.4	Día de campo	Publicación de resumen			Dic/05
4	4.5	Participación Congreso	Nº asistentes	25	25	Mar/06
4	4.6	Boletín difusión	Grado de avance	100%	50% (elaboración) 100% (impresión)	Sep/06 Oct/06





12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

En el aspecto económico se espera disminuir los costos asociados al control de *Tuta absoluta* y *Agrotis spp*, en cultivos orgánicos y convencional

Aumento en los rendimientos por disminución de las pérdidas ocasionadas por las plagas antes mencionadas, ya que al disminuir el tiempo de reingreso facilitaría el manejo de los cultivos.

Generar fuentes de trabajo asociadas directa e indirectamente a la producción de Bt. Dado por el uso de insumos de producción de procedencia nacional.

Disminución en los costos en salud pública, asociados a la disminución del uso de insecticidas convencionales.

Una valorización de la bio diversidad nacional, mostrando beneficios económicos concretos asociados a su protección y estudio.

Al disminuir la resistencia a las medidas de control (la forma de acción de Bt, es al sistema digestivo y no a los neurotransmisores), disminuiríamos los volúmenes y número de aplicaciones.

12.2. Social

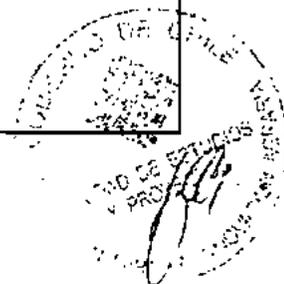
- Generación de fuentes de trabajo asociadas en forma directa a la producción del Bt., como indirectas, producción y transporte de insumos, asistencia técnica y difusión.

- Mejora en la calidad de vida y seguridad de los trabajadores agrícolas, al generar una alternativa viable a la utilización de insecticidas con riesgos para la salud humana.

- Demostrar que la investigación científica con fondos públicos, es capaz de generar respuestas concretas a las necesidades regionales.

- Dado que el uso de bio controladores, requiere de una mejor gestión agroecosistémica por parte de los agricultores, se genera una necesidad por el perfeccionamiento y una mejor administración de la producción.

- Inocuo a trabajadores, generando una disminución de atenciones hospitalarias, por intoxicaciones.





12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

- Al darle un uso económico a cepas nativas, se genera la necesidad de dar una marco legal coherente, que sea capaz de regular la valorización, investigación y uso racional de los recursos aportados por la bio diversidad nativa.
- Apoya a las organizaciones dedicadas a la preservación de la diversidad biológica, con argumentos económicos y sociales.
- Al aumentar las alternativas para el control de plagas, se estimula la conversión a sistema de producción mas amigables con el medio ambiente como a la salud humana.





13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

La realización de este proyecto genera impactos ambientales positivos, en un grado alto para los ecosistemas agrícolas, dado que disminuye el uso de insecticidas, que además de ser de amplio espectro, poseen una alta persistencia en el ambiente con consecuencias a largo plazo.

Al utilizarse cepas nativas, la modificación del ambiente se ve disminuida, ya que no ingresamos genes nuevos al ecosistema nacional, sino que solo aumentamos la frecuencia de los ya presentes. Esto es importante dada la facilidad relativa, que poseen las especies bacterianas a la transmisión horizontal de su material genético.

Al valorizar la biodiversidad nacional, permite una mejor protección de esta, dado que la comunidad y el mercado la perciben como un recurso útil a ser protegido.

La producción de *Bt.* no conlleva ningún impacto negativo para el ambiente, dado que gran parte de los insumos destinados a la nutrición del *Bt.* son productos de desechos y el resto, presenta un fácil degradación en el ambiente, sin metabolitos intermedios recalcitrantes o tóxicos.

Se disminuye el daño a los enemigos naturales y por lo tanto mejora el equilibrio ecosistémico, de los predios.

Disminuye la resistencia a insecticidas.

13.2. Acciones propuestas

Dado que los efectos de la producción y uso de *Bt.* no presentan efectos negativos sobre el medio ambiente, sino que lo contrario, se postula una amplia difusión de los resultados del proyecto.

13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)

El sistema de seguimiento, consistirá en desarrollar un registro, de los insumos utilizados por los agricultores, a los que se les transfiera el uso de *Bt.* y compara los volúmenes de piretroides y organofosforados, utilizados antes y después de la adopción del bio insecticida.





14. COSTOS TOTALES DEL PROYECTO: CUADRO RESUMEN

(resultado de la sumatoria de los cuadros 15.1 y 15.3)

Ítem	2003/2004	2004/2005	2005/2006	TOTAL
Honorarios				
Técnico 1	2.745.600	2.855.424	2.957.922	8.558.946
Técnico 2	3.379.200	3.514.368	3.654.943	10.548.511
Asesoría Entomólogo	200.000	208.000	216.320	624.320
Asesoría Bioquímico	1.000.000	1.040.000	1.081.600	3.121.600
Director	2.904.000	3.020.160	3.134.630	9.058.790
Director Alterno	1.056.000	1.098.240	1.142.170	3.296.410
Total	11.284.800	11.736.192	12.187.585	35.208.577
Equipos				
Cámara flujo	3.717.000			3.717.000
horno secado aire forzado	1.021.876			1.021.876
Centrifuga	8.083.773			8.083.773
Agitador orbital	1.738.742			1.738.742
Balanza Analítica	1.519.698			1.519.698
Lupa estereoscópica	708.000			708.000
Total	16.789.090			16.789.090
Insumos	1.193.333	1.241.067	1.288.800	3.723.200
Transferencia				
Día de campo	-	312.000	324.480	634.800
Congresos y/o seminarios	-	156.000	162.240	318.240
Boletín	-	-	648.960	648.960
total	-	468.000	1.135.680	1.602.000
Uso Instalaciones	960.000	998.400	1.036.800	2.995.200
Gastos Adm.	600.000	624.000	648.000	1.872.000
Viáticos	400.000	416.000	432.000	1.248.000
Transporte	1.000.000	1.040.000	1.080.000	3.120.000
Total	60.301.112	28.727.851	31.132.129	66.558.066





15. FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

15.1. Aportes de contraparte: Cuadro Resumen (utilizar valores reajustados por año según índice anual)

Si hay más de una institución que aporta fondos de contraparte se deben presentar los valores en cuadros separados para cada agente

Ítem	2003/2004	2004/2005	2005/2006	TOTAL
Honorarios				
Director	2.904.000	3.020.160	3.134.630	9.058.790
Director Alterno	1.056.000	1.098.240	1.142.170	3.296.410
Total	3.960.000	4.118.400	4.276.800	12.355.200
Uso Instalaciones	960.000	998.400	1.036.800	2.995.200
Gastos Adm.	600.000	624.000	648.000	1.872.000
Viáticos	400.000	416.000	432.000	1.248.000
Transporte	1.000.000	1.040.000	1.080.000	3.120.000
Total	10.880.000	11.315.200	11.750.400	21.590.400





15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

Proyecto (años)		3
Proyecto (meses)		36
Semanas al año		48
Reajuste Anual		4%
Hora Director	5 500	
Hora Director Alterno	5.500	
Hora Agrónomo	4.200	
Hora Técnico Especializado	3.200	
Hora Técnico	1 300	

Aporte Empresa

Honorarios	horas/semana	horas/totales	costo/hora	costo/total
Director	11	1584	5.500	8.712.000
Director alternativo	4	576	5.500	3.168.000
				11.880.000

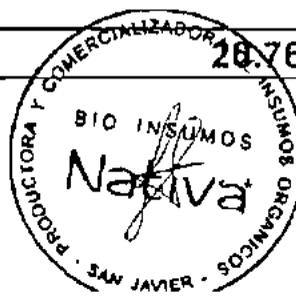
Uso Instalaciones	mes	costo/und	costo total
Laboratorios	36	80.000	2.880.000
Oficina	0	20.000	-
Habilitación pieza crianza	0	800.000	-
			2.880.000

Gastos Administ.	mes	costo/und	costo total
	36	50.000	1.800.000
			1.800.000
Servicios	año	costo/und	costo total
Mantenión equipos	0	150.000	-
			-

Viáticos	eventos	costo/und	costo total
Viajes y terrenos	120	10.000	1.200.000
			1.200.000

Transporte	Kms	costo/und	costo total
	25000	120	3.000.000
			3.000.000

Total			28.760.000
--------------	--	--	-------------------

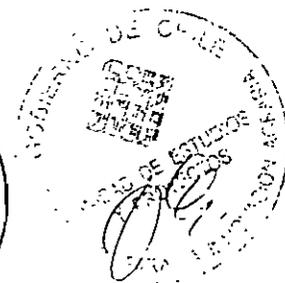




15.3. Financiamiento Solicitado a FIA: Cuadro Resumen
(utilizar valores reajustados por año según índice anual)

(desglosado por ítem y por año)

Ítem	2003/2004	2004/2005	2005/2006	TOTAL
Honorarios				
Técnico 1	2.745.600	2.855.424	2.957.922	8.558.946
Técnico 2	3.379.200	3.514.368	3.654.943	10.548.511
Asesoría Entomólogo	200.000	208.000	216.320	624.320
Asesoría Bioquímico	1.000.000	1.040.000	1.081.600	3.121.600
Total				22.853.377
Equipos				
Cámara flujo	3.717.000	-	-	3.717.000
horno secado aire forzado	1.021.876	-	-	1.021.876
Centrifuga	8.083.773	-	-	8.083.773
Agitador orbital	1.738.742	-	-	1.738.742
Balanza Analítica	1.519.698	-	-	1.519.698
Lupa estereoscópica	708.000	-	-	708.000
Total	16.789.090	-	-	16.789.090
Insumos	1.193.333	1.241.067	1.288.800	3.723.200
Transferencia				
Días de Campo		312.000	324.480	634.800
Congresos		156.000	162.240	318.240
Boletín			648.960	648.960
Total				1.602.000
Total	42.096.312	8.858.859	9.199.585	44.967.666





15.4. Financiamiento solicitado a FIA: criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

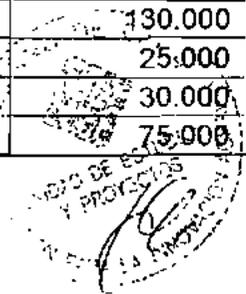
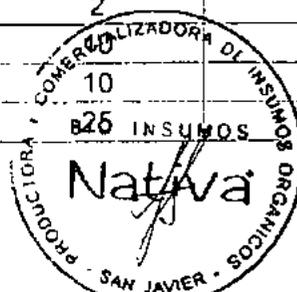
Proyecto (años)	3
Proyecto (meses)	36
Semanas al año	48
Reajuste Anual	4%
Hora Técnico Especializado	3 200
Hora Técnico	1 300

Aporte Fia

Honorarios	horas/semana	horas/totales	costo/hora	costo/total
Técnico	44	6.336	1.300	8.236.800
Técnico Especializado	22	3.168	3.200	10.137.600
Asesorías	asesorias/año	años	Valor unit	costo/total
Asesor Entomólogo	2	3	100.000	600.000
Asesor Bioquímico	4	3	250.000	3.000.000
				21.974.400

Equipamiento	Unidades	Valor unit	costo/total
Cámara flujo	1	3.717.000	3.717.000
horno secado aire forzado	1	1.021.876	1.021.876
Centrifuga	1	8.083.773	8.083.773
Balanza Analítica	1	1.519.698	1.519.698
Lupa estereoscópica	1	708.000	708.000
Agitador orbital	1	1.738.742	1.738.742
			16.789.090

Insumos	und	n° und	costo/unidad	Costo Total
Agar nutritivo	Kg	6	80.000	480.000
Agar B King	Kg	5	80.000	400.000
Caldo Nutriente	Kg	5	80.000	400.000
Placas desechables	Paqt	13	25.000	325.000
Insumos cultivo industrial	Und	5	50.000	600.000
puntillas	Paqt	8	7.500	60.000
Antibióticos	Kg	2	65.000	130.000
Porta objetos	Caja	10	2.500	25.000
Cubre objetos	Caja	10	3.000	30.000
Carteles	Und	25	3.000	75.000





speedling	und	20	1.500	30.000
filtros	und	5	50.000	250.000
tinturas	litros	1	35.000	35.000
Caldo LB	kg	4	80.000	320.000
Reactivos varis (alcohol, etc)	Mes	0	15.000	-
Macetas	und	100	500	50.000
Fertilizantes y semillas	Kg	90	1.000	90.000
Línea de riego	mt	50	400	20.000
fiting riego	und	10	5.000	50.000
malla antiafido	mt	30	500	15.000
Pinzas	und	4	5.000	20.000
algodón	kg	10	3.500	35.000
sustrato almacigo	m3	10	14.000	140.000
				3.580.000

Transferencia	Unidades	Valor unit	costo/total
Día de campo	4	150.000	600.000
Congresos y/o seminarios	2	150.000	300.000
Boletín	200	3.000	600.000
			1.500.000

Total **43.843.490**





16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto

Para realizar el estudio de rentabilidad se utilizó un cultivo de tomate en invernadero, considerando una hectárea .

Los ingresos corresponden al ingreso por un tomate convencional, dado que los sobre precios en Chile no están asegurados.

Los costos corresponden a un cultivo orgánico de tomate, donde se ha reemplazado el uso de *Bacillus thuringiensis* comercial por el nativo.





**16.2. Flujo de Fondos del Proyecto e Indicadores de Rentabilidad
(calcular el VAN y la TIR dependiendo del tipo de proyecto)**

I. PROYECCIÓN SITUACIÓN SIN PROYECTO

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1. ENTRADAS						
Venta de tomates	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000
Subtotal Entradas	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000
2. SALIDAS						
2.1. Inversiones						
Invernadero	3.500.000					
2.2. Gastos de Operación						
Plástico	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000
Preparación almácigos	147.000	147.000	147.000	147.000	147.000	147.000
Preparación suelo	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000
Fertilización	219.000	219.000	219.000	219.000	219.000	219.000
Confección mltgas y accuadiura	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
Transplante	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000
Control de malezas	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Control de plagas						
insecticidas	85.000	85.000	85.000	85.000	85.000	85.000
<i>Bacillus thuringensis extrahjero</i>	32.000	32.000	32.000	32.000	32.000	32.000
Fungicidas	75.000	75.000	75.000	75.000	75.000	75.000
Antibióticos	150.000	150.000	150.000	150.000	150.000	150.000
Caldo Bordesles	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000
Riegos	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
Cosecha	294.000	294.000	294.000	294.000	294.000	294.000
imprevistos	39.000	39.000	39.000	39.000	39.000	39.000
Subtotal Salidas	5.051.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES (1-2)	2.451.000	1.049.000	1.049.000	1.049.000	1.049.000	1.049.000
VAN (12%)	\$ 1.187.866,28					
TIR	32%					



II. PROYECCIÓN SITUACIÓN CON PROYECTO

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1. ENTRADAS						
Venta de tomates	2 600.000	2 600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2 600.000
Subtotal Entradas	2 600.000	2 600.000	2.600.000	2.600.000	2 600.000	2 600.000
2. SALIDAS						
2.1. Inversiones						
Invernadero	3 500.000					
2.2. Gastos de Operación						
Plástico	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000
Preparación almácigos	147.000	147.000	147.000	147.000	147.000	147.000
Preparación suelo	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000
Fertilización	219.000	219.000	219.000	219.000	219.000	219.000
Confección mcilas y accuadadura	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
Transplante	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000
Control de malezas	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Control de plagas						
insecticidas	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000	25.000
<i>Bacillus thuringensis</i> nativo	12.000	12.000	12.000	12.000	12.000	12.000
Fungicidas	75.000	75.000	75.000	75.000	75.000	75.000
Antibióticos	150.000	150.000	150.000	150.000	150.000	150.000
Caldo Bordeles	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000
Riegos	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
Cosecha	294.000	294.000	294.000	294.000	294.000	294.000
imprevistos	39.000	39.000	39.000	39.000	39.000	39.000
Subtotal Salidas	4.971.000	1 471.000	1 471.000	1 471.000	1 471.000	1 471.000
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES (1-2)	2 371.000	1 129.000				
VAN (12%)	\$ 1 516.778,87					
TIR	38%					





III. FLUJO DE FONDOS DEL PROYECTO

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1. SUBTOTAL ENTRADAS SIN PROYECTO	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000
2. SUBTOTAL ENTRADAS CON PROYECTO	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000	2.600.000
3. ENTRADAS TOTALES (2-1)	-	-	-	-	-	-
4. SUBTOTAL SALIDAS SIN PROYECTO	5.051.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000	1.551.000
5. SUBTOTAL SALIDAS CON PROYECTO	4.971.000	1.471.000	1.471.000	1.471.000	1.471.000	1.471.000
6. SALIDAS TOTALES (5-4)	- 80.000	- 80.000	- 80.000	- 80.000	- 80.000	- 80.000
7. BENEFICIOS NETOS INCREMENTALES DEL PROYECTO (3-6)	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000
8. BENEFICIOS NETOS TOTALES CON PROYECTO (2-5)	- 2.371.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000
9. BENEFICIOS NETOS TOTALES CON PROYECTO DESPUÉS DEL IMPUESTO	- 2.371.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000	- 1.129.000
VAN (12%)	\$ 1.516.778,87					
TIR	38%					





17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. Técnicos

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* fuera incompatible con los agroquímicos utilizados en la agricultura convencional. Para esto se centraría las pruebas en manejo orgánico y se realizarían pruebas de resistencia a agroquímicos para determinar las compatibilidades de uso.

Las cepas aisladas de *Bt.* no presenten una acción suficientemente eficiente en el control de las enfermedades a evaluar. Frente a esta situación se plantea realizar pruebas con mezclas de las mejores cepas, lo que además serviría para disminuir el riesgo de aparición de resistencia.

17.2. Económicos

El precio de los productos comerciales en base a *Bt.* bajen drásticamente, aun que esto es poco probable, solo hay que escalar la producción de *Bt.* a un nivel industrial para lograr que los precios de producción se igualen, pero teniendo un ahorro en transporte e internación.

17.3. Gestión

En este topico, no se perciben riesgos, dados que la gestión del proyecto depende exclusivamente de la capacidad operativa del organismo ejecutantes

17.4. Otros

Otro riesgo posible, es la reticencia de los agricultores por usar una bacteria, las que están normalmente asociadas a enfermedades. La acción propuesta es la difusión de la inocuidad de esta especie a través del programa de transferencia





17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Baja actividad de las cepas	Bajo	Utilizar mezclas de cepas.
Presencia de resistencia a cepas	Bajo	Utilizar mezclas de cepas.
Incompatibilidad con agroquímicos	Bajo	Enfocar hacia la agricultura orgánica
Baja de precio de <i>Bt.</i> comercial	Bajo	Buscar la forma de escalar la producción de <i>Bs</i> a un nivel industrial.
Reticencia de agricultores	Medio	Campaña de difusión.



18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

La estrategia de transferencia consistirá en una primera etapa de una charla divulgativa, que informara sobre los aspectos generales de *Bt.* y los resultados de los primeros ensayos de laboratorio. La segunda etapa estará dada por días de campo que entregaran los resultados de los ensayos de campo. A estos días de campo se sumara la exposición en el congresos científicos. Además de lo anterior se elaborara y publicara un boletín de distribución gratuita sobre el las características, uso, producción y almacenaje estándares de las cepas de *Bs.*

Al realizar ensayos en predios de agricultores, se le dará la validación necesaria para lograr la difusión de estas cepas de *Bt.*

Una vez finalizado el proyecto y solucionado los problemas metodológicos y de estándares de calidad, Bio-Insumos Nativa, se avocara a el escalamiento tecnológico, necesario para lograr una formulación comercial, destinada a la producción de hortalizas, tanto convencional como orgánica.





19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo G el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

Bio Insumos Nativa Ltda. es una joven y emergente empresa chilena de la Región del Maule, dedicada a la creación, producción y comercialización de insumos orgánicos para la agricultura convencional y orgánica. Bio Insumos Nativa Ltda. nació debido a la necesidad de unirse para potenciar las cualidades individuales con que contaba cada uno por separado (información, tecnología, conocimiento, contacto, capital, terrenos, etc.).

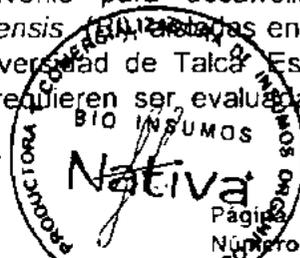
Está formada por tres Ingenieros Agrónomos (Gerente Comercial, Gerente Técnico y Gerente General) y dos vendedores, también Ing. Agrónomos. Todos ellos ligados en diversas formas a la producción orgánica y convencional.

Posee una idea de negocio distinto al concepto actual, considerando una amplia gama de productos orgánicos y altamente efectivos, pero formulados en base a cepas y especies nativas (chilenas). Esto, por consiguiente, origina un producto mejor adecuado a las condiciones locales, generalmente más efectivos en el control de los insectos y patógenos presentes en el país y con un menor precio final. Dentro del mismo concepto de distinguirnos del resto, es necesario mencionar que Bio Insumos Nativa Ltda., además del la venta del producto, entrega un servicio integral, en el que apoyamos al productor en su manejo productivo sin costo alguno: entre otros, análisis patológicos y entomológicos, compatibilidades de otros químicos con nuestros productos, análisis de inóculo inicial de *Venturia inaequalis* en hojarasca de manzanos. Es por esto que la venta de nuestros productos exige una atención personal y a nivel de campo, por lo que no trabajamos a través de la, muchas veces poco profesional, venta de mesón de la mayoría de los productos (químicos y orgánicos). Además lo anterior, en la actualidad estamos desarrollando nueva investigación a través de ensayos formales (Agroindustria, empresas semilleras, empresas frutícolas, Centros de Investigación, y Universidades) y tesis de grados en la Universidad de Talca.

La empresa posee un convenio con la Universidad de Talca para la producción y comercialización de tres cepas de *Trichoderma* aisladas por el Laboratorio de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias de dicha Universidad con financiamiento de la Fundación para la Innovación Agraria-FIA (Proyecto UTAL-FIA C98-1-A-072). Estas cepas han resultado ser altamente efectivas en el control de una serie de enfermedades como *Fusarium*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*. Bio Insumos Nativa Ltda. ha podido, en menos de un año, triplicar las ventas a través de un trabajo serio y profesional.

Los clientes son importantes empresas como las viñas Montes, Ventisquero, San Rafael, Semilleras como Sunseeds, Takii, Maraseed, forestales como Copihue y Agroindustrias como Iansa, entre otras.

La semana pasada, se formalizó un nuevo convenio para desarrollar técnica y comercialmente diez cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en la VII Región por el Instituto de Biología y Biotecnología de la Universidad de Talca. Estas cepas se encuentran caracterizadas proteicamente (Cry) pero requieren ser evaluadas a nivel de





laboratorio y campo, de manera de orientarlas al control de larvas de Lepidópteros como son gusanos cortadores, polilla del tomate, y mariposa blanca de la col, siendo el proyecto a que se postula el medio para lograrlo.





19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

Bio Insumos Nativa Ltda. cuenta con un laboratorio nuevo de 70 mt², pensado y construido con los requerimientos y estándares que la producción de biocontroladores requiere, y en un 100% con material sólido.

Cuenta con una oficina, un laboratorio principal, una sala de autoclavado y preparación comercial del producto. Del laboratorio principal sale un pasillo con doble puerta para entrar a una sala de cultivo (iluminada en sus cuatro paredes y cielo) y una sala de inoculación, ambas aisladas del exterior sólo por la doble puerta.

En cuanto al equipamiento de laboratorio, se cuenta con el necesario para la producción de Trichoderma, vale decir, agitador magnético, micropipeta, autoclave de 12 lts., autoclave de 80 lts., microscopio, campana de vidrio, material de vidrio.

2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

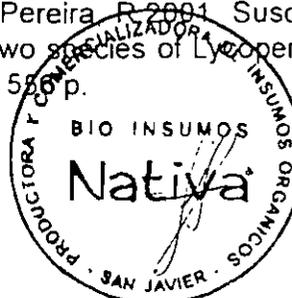
La empresa cuenta con el personal administrativo necesario para llevar a cabo este proyecto y cuenta con un contador externo a la empresa que lleva toda la contabilidad de esta. Ambos estarán a cargo de la gestión administrativo contable necesaria para la tranquilidad de la empresa y FIA.





BIBLIOGRAFÍA

- ◆ **Abbott, W.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- ◆ **Agaisse, H. y Lereclus, D.** 1995. How Does *Bacillus Thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?. *Journal Of Bacteriology.* 177(21): 6027-6032.
- ◆ **Ananda K.; R. Sharma Y V. Malik.** 1996. The Insecticidal Protein Of *Bacillus Thuringiensis* And Yield Of Bioinsecticidal Crystal Protein. London. Ontario. Canadá M. E. Sc. P. 193
- ◆ **Aronson, A y Shai, Y.**2001 Why *Bacillus thuringiensis* toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 195:p 1-8
- ◆ **Aronson, A; Beckman, W y Dunn, P.**1986. *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens. *Microbiological reviews.* Mar. P 1-24
- ◆ **Bravo, A. y Quintero, R..** 1993. Importancia Y Potencial De *Bacillus Thuringiensis* En El Control De Plagas. En Cuarto Curso Avanzado De Procesos Biotecnológicos. Escalamiento De La Producción De Proteínas Recombinantes. Instituto De Biotecnología. Unam. Cuernavaca. México. 2: 1-32.
- ◆ **Bujanos, M.** 1998. Manejo Integrado De La Palomilla Dorso Diamante (*Plutella Xillostella*). [Http://Www.Infap-Gto.Org/Index.Html](http://Www.Infap-Gto.Org/Index.Html).
- ◆ **Comins, H.** 1977. The development of insecticide resistance in the presence of migration. *J. Theor. Biol.* 64: 177-197.
- ◆ **Couche, A. ; M. A. Pfannestel And K. W. Nickerson.** 1987. Structural Disulfide Bonds In The *Bacillus Thuringiensis* Subesp. *Israelensis* Protein Crystal. *Journal Of Bacteriology.* 169(7): 3281-3288.
- ◆ **Cranshaw, W.** 1994. Question And Answers About *Bacillus Thuringiensis*. Colorado State University Cooperative Extension. [Http://Searchpdf.Adobe.Com/Proxies/1/26/81/4.Html](http://Searchpdf.Adobe.Com/Proxies/1/26/81/4.Html).
- ◆ **Ely, S.** 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. In: *Bacillus thuringiensis, An Experimental Biopesticide: Theory and Practice*, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 105-124.
- ◆ **Feitelson, J Payne, J. y Kim, L.**1992.*Bacillus thuringiensis* : insects and beyond. *Bio/technology* 10:271-275.
- ◆ **Fernández-Larrea, O .**2003. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. En <http://www.phemexico.com.mx/producción.html>.
- ◆ **Frankenhuyzen, K.** 1995. The Development Of *Bacillus Thuringiensis* For Control Of The Spruce Budworm, *Choristoneura Fumiferana*, In Canadá. In: T. Feng (Ed.). *Bacillus Thuringiensis And Enviromental Benefits*. Hua Shiang Yuan. Taipei-Taiwan. Pp. 405-423.
- ◆ **Frutos, J.** 1994. *Biología Y Control De Plagas Urbana*. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. Barcelona, España
- ◆ **Frutos, R., Rang, C., y Royer, M.** 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Reviews in Biotechnology* 19: 227-276.
- ◆ **Gill S; Cowles, E y Pietrantonio, P.**1992. The modo of actino of *Bacillus thuringiensis* Entodoxins. *Annu. Rev. Entomol* 37: 615-36.
- ◆ **Giustolin, T; Vendramin, J; Alves, S; Viera, A y Pereira, R.**2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstarki*. *J. Appl. Ent.* 125, 551- 556 p.



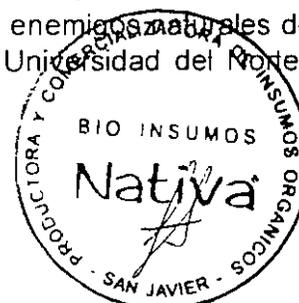


- ◆ **González, R.** 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Santiago, Impresora y editora Ograma S.A. 310 p.
- ◆ **González, M y Carlton, B.** 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*. In Genetic exchange. a celebration and a new generation. U.N. Streips, S.H. Goodal, W.R. Guild and G.A. Wilson (eds). Marcel Dekker. New York. pp. 85-95
- ◆ **Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., y Laster, M.** 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3519-23.
- ◆ **Höfte, H. Y Whiteley, R.** 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255
- ◆ **Hoy, M.** 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353: 1787-95.
- ◆ **Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A., y McGaughey, W. H.** 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 284: 965-967.
- ◆ **Ibarra, G.** 1994. Patogenicidad de *Bacillus thuringiensis*. En: Patogenicidad de organismos parásitos de insectos. R. Lezama (Ed.) Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. Pp 29-46.
- ◆ **Iqbal, M., Verkerk, R. H. J., Furlong, M. J., Ong, P. C., Rahman, S. A., y Wright, D. J.** 1996. Evidence for resistance to *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *kurstaki* HD-1, Bt subsp. *aizawai* and Abamectin in field populations of *Plutella xylostella* from Malaysia. Pestic. Sci. 48: 89-97.
- ◆ **Johnson, D., McGaughey, W. y Barnett, B.** 1991. Small scale bioassay for the determination of *Bacillus thuringiensis* toxicity toward *Plodia interpunctella*. J. Intervertebr. Pathol. 57:159-165.
- ◆ **Juarez-Pérez, V; Ferrendis, M y Frutos, R.** 1997. PCR-Based Approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry Genes. Applied and Environmental Microbiology. 2997-3002 p.
- ◆ **Larraín, P.** 1986. Plagas del tomate. IPA, La Platina N°39. p 30-35.
- ◆ **Liu, Y. y Tabashnik, B.** 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond B 264:605-10.
- ◆ **Liu, Y., Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Patin, A. L., y Bartlett, A. C.** 1999. Development time and resistance to Bt crops. Nature 400:519.
- ◆ **Maagd, R; Bravo, A y Crickmore, N.** 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxin to colonize the insect world. Review Trends in Genetics Vol. 17 N° 4. p: 193-199
- ◆ **MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Jokerst, R. S., y Fuchs, R. L.** 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8930-8933.
- ◆ **Madigan, M., J. Martinko Y J. Parker.** 1998. Brock. Biología De Los Microorganismos. Octava Edición. Editorial Prentice Hall International Ltd. España.
- ◆ **Martin, T y Travers, R.** 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437 – 2442
- ◆ **McGaughey, W.** 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229: 193-195
- ◆ **Michaud, D.** 1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. Trends Biotech. 15: 4-6.





- ◆ **Moermans, R.** y Hecke, P. 1995. Effects of samples size and number of doses for determination of LD50. *J. Appl. Ent.* 119:637-642
- ◆ **Moraga, D;** Medina, J; Kirsten, L; Arancibia, R y Castillo, P. 2001. Intoxicación aguda por organofosforados, ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CASOS EN HOSPITAL HERMINDA MARTIN (CHILLÁN) ENTRE 1996 Y 2001. Facultad de Medicina Universidad Católica de Ssma. Concepción
- ◆ **Naimov, S;** Weemen-Hendriks, M; Duriandjiev, S, y Maagd, R.2001. *Bacillus thuringiensis* Delta-Entotoxin Cry1 Hybrid Proteins with Increased Activity against the Colorado Potato Beetle. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 67 N° 11: p 5328-5330.
- ◆ **Odepa,** 2003. Hortalizas y Flores: Séptima Región; Superficie sembrada o plantada.
- ◆ **Pantuwatana, S.** 1987. Microbiological Control Of Cabbage Loppers: Field Application Of Polyedrosis Virus And Bacillus Thuringiensis In Food And Fertilizer Technology Center. Extension Bulletin. China. 256: 1-7.
- ◆ **Park, H;** Ge, B, Bauner, L y Federici, B. 1998. Optimazation of Cry3A Yields in *Bacillus thuringiensis* by Use of Sporulation-Dependent Promoters in Combination whit the STAB-SD mRNA Sequence. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 64 N°10: p 3932-3938.
- ◆ **Pimentel, D.,** y Burgess, M. 1985. Effects of Single Versus Combinations of Insecticides on the Development of Resistance. *Environ. Entomol.* 14: 582-9.
- ◆ **Prieto, F.** 1998. Agencia Universitaria De Periodismo Universitario. [Http://Mafaldaunivalle.Edu.Co/~Aupec/Aupec/Octubre98/Bioinsecticida.Htm](http://Mafaldaunivalle.Edu.Co/~Aupec/Aupec/Octubre98/Bioinsecticida.Htm)
- ◆ **Rang, C;** Vachon, V, Maagd, A; Villalon, M; Schwartz, J; Bosch, D; Frutos, R y Laprade, R. 1999. Interaction between Funtional Domains of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 65 N° 7: p 2918-2925.
- ◆ **Salazar, E** y Araya, J.1997. Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente* 67: 8-22 p
- ◆ **Schnepf, E.;** N. Crickmore; J. Van Rie; D. Lereclus, J. Baum; J. Feitelson; D. Zeigler y D. Dean. 1998 *Bacillus Thuringiensis* And Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 775-806.
- ◆ **Tabashnik, B.,** Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J, Johnson, M. W., Luo, K., y Adang, M. J. 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4120-4.
- ◆ **Tapp, H** y Stotzky, G. 1995. Insecticidal Activity of the Toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* Adsorbed and Bound on Pure and Soil Clays. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 61 N° 5. p 1786-1790.
- ◆ **The Microbial World** 1999. *Bacillus Thuringiensis* Edinburgh University. [Http://Helios.Bto.Ed.Ac.Uk/Bto/Microbes/Bt.Htm](http://Helios.Bto.Ed.Ac.Uk/Bto/Microbes/Bt.Htm).
- ◆ **Thomas, W** y Ellar, J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelinesis* crystal delta-endotoxin: effects on insects and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.* 60:181-197.
- ◆ **Tyler, G.** 1994. *Ecología Y Medio Ambiente.* Grupo Editorial Iberoamérica. S. A. De C. V. México.
- ◆ **Van Frankenhuyzen, K.** 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In. *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide. Theory and Practice,* Entwistle, P. E., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds , John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1-35.
- ◆ **Vargas, H.** 1970. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate *Gnorismoschema absoluta* (Meyr.). IDESIA, Universidad del Norte (Chile) 1: 75-110.





- ◆ **Vásquez, M.** 1993. Actividad Entomopatógena de cepas de *Bacillus thuringiensis* B. Aisladas en el país. Tesis Mag. Sc. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 123 p.
- ◆ **Wearing, C.** y Hokkanen, H. 1995. Pest resistance to *Bacillus thuringiensis*: ecological crop assessment for Bt gene incorporation and strategies of management. In: Biological control: benefits and risks, Hokkanen, H. M. T. and Lynch, J. M., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 236-252.
- ◆ **Whalon, M.** y McGaughey, W. 1998. *Bacillus thuringiensis*: Use and Resistance management. In: Insecticides with novel modes of action: mechanism and application, Ishaaya, I. and Degheele, D., Eds., Springer, Berlin, 106-137.
- ◆ **Wirth, M.,** Georgiou, G. P., y Federici, B. A. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10536-40.
- ◆ **Wood, R.** 1981. Strategies for conserving susceptibility to insecticides. Parasitology 82: 69-80.
- ◆ **Yamamoto, T** y Powell, G. 1993. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: Recent advances in understanding its insecticidal activity. In: Kim (ed.). Advances in Engineered Pesticides. Marcel Dekker. Inc. New York. Pp 3-4



aporte FIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Item																			
Honorarios																			
Tecnico 1	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	228.800	237.952	237.952	237.952	237.952	237.952	237.952	
Tecnico 2	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	281.600	292.864	292.864	292.864	292.864	292.864	292.864	
Asesoría Entomología				100.000			100.000									104.000			
Asesoría Bioquímica				250.000			250.000			250.000		250.000				260.000			
Total	510.400	510.400	510.400	860.400	510.400	510.400	860.400	510.400	510.400	760.400	510.400	760.400	530.816	530.816	530.816	894.816	530.816	530.816	
Equipos																			
Cámara flujo	1.717.000																		
horno secado aire forzado	1.021.876																		
Centrifuga	8.083.773																		
Agitador orbital	1.738.742																		
Balanza Analítica	1.519.698																		
Lupa estereoscópica	708.000																		
Total	16.789.090																		
Insumos	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	99.444	103.422	103.422	103.422	103.422	103.422	103.422	103.422	
Transferencia																			
Días de Campo													156.000						
Congresos																156.000			
Boletín																			
Total																			
Total	17.398.934	609.844	609.844	959.844	609.844	609.844	959.844	609.844	609.844	609.844	859.844	609.844	863.822	634.238	634.238	634.238	998.238	634.238	634.238



Aporte Prop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Item																		
Honorarios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Director	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	242.000	251.680	251.680	251.680	251.680	251.680	251.680
Director. Alie	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	88.000	91.520	91.520	91.520	91.520	91.520	91.520
Total	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	330.000	343.200	343.200	343.200	343.200	343.200	343.200
Uso Instalaci	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	80.000	83.200	83.200	83.200	83.200	83.200	83.200
Gastos Adm	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	52.000	52.000	52.000	52.000	52.000	52.000
Servicios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viajeros	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	33.333	34.667	34.667	34.667	34.667	34.667	34.667
Transporte	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	83.333	86.667	86.667	86.667	86.667	86.667	86.667
Total	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	906.667	916.533	942.933	942.933	942.933	942.933	942.933



Aporte Propri	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	Total			
Honorarios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Director	251.680	251.680	251.680	251.680	251.680	251.680	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	261.219	9.058.790		
Director Adm	91.520	91.520	91.520	91.520	91.520	91.520	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	95.181	3.296.410	
Total	343.200	343.200	343.200	343.200	343.200	343.200	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	356.400	12.355.200	
Uso Instalac	83.200	83.200	83.200	83.200	83.200	83.200	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	86.400	80.000	2.995.200	
Gastos Adm	52.000	52.000	52.000	52.000	52.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	50.000	1.872.000		
Servicios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Viaticos	34.667	34.667	34.667	34.667	34.667	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000	33.333	1.248.000	
Transporte	86.667	86.667	86.667	86.667	86.667	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000	83.333	3.120.000
Total	942.933	942.933	942.933	942.933	942.933	952.800	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	979.200	959.466	21.590.399	



