



CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001

FORMULARIO DE PRESENTACIÓN DE PROPUESTAS

La propuesta de proyecto deberá presentarse en este formulario, en tres ejemplares (un original y dos copias) y en disquet. Aquellos postulantes que no cuenten con medios computacionales, pueden transcribir el contenido del proyecto directamente a este cuadernillo.

Antes de iniciar la preparación del proyecto y el llenado del formulario se solicita leer con detención todos los puntos del "Instructivo para la Presentación de Propuestas", a fin de evitar errores que dificultarán posteriormente la evaluación de la propuesta por parte de la Fundación, o que puedan ser motivo de rechazo de la propuesta en las etapas de admisión o evaluación.

El formulario está dividido en secciones, que incluyen cierto espacio para la presentación de la información. Si el espacio en una sección determinada no es suficiente, se podrán agregar hojas adicionales, identificando la sección a la cual pertenecen. Podrá adjuntarse además cualquier otro tipo de información adicional o aclaratoria que se considere importante para la adecuada descripción de la propuesta.





FOLIO DE
BASES

076

CÓDIGO
(uso interno)

BIOT-01-A-22

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS EN PLANTAS CHILENAS
CULTIVADAS *IN VITRO*.

Línea Temática: AGRICULTURA

Rubro: AGRICULTURA

Región(es) de Ejecución: METROPOLITANA

Fecha de Inicio: 20/12/ 2001

DURACIÓN: 48 meses

Fecha de Término: 30/12/2005

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

Dirección : ALAMEDA 3363 Ciudad y Región: SANTIAGO/METROPOLITANA
RUT

Teléfono : 6819037 Fax y e-mail: 6812108

Cuenta Bancaria (tipo, N°, banco):

AGENTES ASOCIADOS: SOCIEDAD DE DESARROLLO TECNOLÓGICO

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: UBALDO ZÚÑIGA Q

Cargo en el agente postulante RECTOR:

RUT:

Dirección: Alameda 3363

Fono: 6818729

Firma

Ciudad y Región: SANTIAGO/METROPOLITANA

Fax y e-mail:

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

: \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO

(Valores Reajustados)

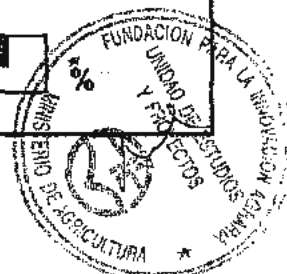
: \$

%

APORTE DE CONTRAPARTE

(Valores Reajustados)

: \$





2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

2.1. Equipo de coordinación del proyecto

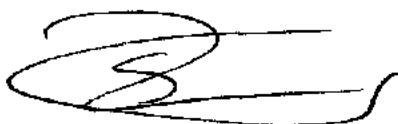
(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

NOMBRE GUSTAVO E. ZÚÑIGA NAVARRO	RUT	FIRMA 
AGENTE UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año) 40%	
CARGO ACTUAL PROFESOR JORNADA COMPLETA	CASILLA 40, CORREO 33	
DIRECCIÓN ALAMEDA 3363	CIUDAD SANTIAGO	
FONO 562-6813037	FAX 562-6812108	E-MAIL gzuniga@lauca.usach.cl

COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE LUIS VILLARROEL	RUT	FIRMA 
AGENTE UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE	DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO 30%	
CARGO ACTUAL PROFESOR JORNADA COMPLETA	CASILLA 40, CORREO 33	
DIRECCIÓN ALAMEDA 3363	CIUDAD SANTIAGO	
FONO 562-6811644	FAX 562-6812108	EMAIL lvillarr@lauca.usach.cl

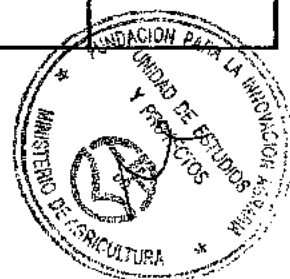




2.2. Equipo Técnico del Proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
Sandra Orellana		Bioquímica	Bioquímica	Responsable de la evaluación de la actividad alelopática. Evaluación de actividades alelopáticas y antifúngicas y caracterización de los extractos	80
Cristina Vargas		Técnico	Química	Encargada de los cultivos in vitro. Cultivo in vitro de plantas nativas	80
NN		Tesista Bioquímica	Lic. Bioquímica	Actividad alelopática	20
NN		Tesista Química	Lic. Química	Caracterización de moléculas	20





3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

El **objetivo general** del Proyecto es desarrollar un programa para la obtención de compuestos aleloquímicos en plantas chilenas cultivadas **in vivo** e **in vitro**.

Los **objetivos específicos** son: (i) optimizar metodologías para la obtención de biomasa vegetal a partir de especies nativas canelo (*Drymis winteri*), pintoa (*Pintoa chilensis*), boldo (*Peumus boldus*), patagua (*Myrceugenia planipis*), y plechea (ii) implementar metodologías para la obtención de extractos activos de especies nativas cultivadas *in vitro*, (iii) desarrollar bioensayos para la evaluación de la actividad aleloquímica de los extractos vegetales obtenidos, (iv) determinar la actividad alelopática de los extractos vegetales v) evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos vegetales, (vi) aislar e identificar el o los principios activos en los extractos, (vii) transferir la tecnología desarrollada, y (viii) proteger la propiedad industrial de los resultados del Proyecto.

La **metodología** comprende:

- Micropropagación de explantes hasta obtener coeficientes aceptables de multiplicación
- Preparación de extractos acuosos y orgánicos bajo distintas condiciones.
- Desarrollo de bioensayos para evaluar las propiedades aleloquímicas de los extractos
- Evaluación de las propiedades alelopáticas de los extractos
- Evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos.
- Cultivos de *Botrytis cinerea* y *Uncinula necator* y caracterización fisiológica y bioquímica
- Aislamiento y caracterización de los extractos.
- Transferencia tecnológica de los resultados.
- Protección de resultados.

Ante una creciente demanda mundial de pesticidas no contaminantes, el Proyecto ofrece desarrollar biopesticidas patentables, a partir de plantas nativas chilenas cultivadas *in vitro*, para proteger la producción agrícola nacional de aquellos agentes que afectan los rendimientos (malezas, y/o patógenos perjudiciales; *B. cinerea* y *U. necator*).

Los productos del Proyecto son compatibles totalmente con los requisitos de una agricultura limpia, propia de los países importadores de nuestros productos (Estados Unidos, Europa, Japón y otros), los mismos que serán próximamente establecidos para la realidad chilena por el Programa de Agricultura Limpia que ha iniciado el SAG.

El Proyecto fundamenta sus **perspectivas de éxito** en la capacidad y multidisciplinaria necesaria aportada por los **investigadores del grupo**, quienes han obtenido resultados alentadores de **experiencias previas** conducidas en el laboratorio del Director del Proyecto y en el de su colega alterno.





4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

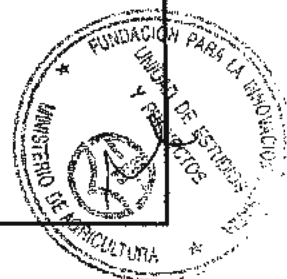
Se calcula que aproximadamente un tercio de la producción agrícola mundial, es destruida anualmente por miles de especies patógenas y plagas, tanto en condiciones de terreno como de almacenaje. Para el control de estos organismos se utilizan en forma amplia e indiscriminada los pesticidas sintéticos. Sin embargo, estos causan serios problemas al ambiente y a la salud de la población. Entre éstos problemas se destacan su toxicidad, polución de suelos, aguas subterráneas y continentales, y del aire (por fumigaciones áreas) con la clara aparición de especies resistentes a los pesticidas, lo cual significa que cada vez se requieren más grandes dosis para su control, aumentando los costos de producción agrícola.

Luego es importante la acción de desarrollar nuevas estrategias para el control de pestes y enfermedades, con un bajo costo e impacto sobre el ambiente. Los productos derivados de plantas con propiedades adecuadas, pueden jugar un papel en el desarrollo de tales estrategias, especialmente aquellos productos que puedan ser utilizados por los agricultores fácilmente.

Nuestro país posee una rica flora nativa que es explotada en forma elemental, exportándose materia prima sin valor mayor agregado y que además se ve expuesta a su reemplazo por especies de crecimiento más rápido, las cuales, muchas veces sólo poseen valor por su madera para el mercado de la construcción y del papel.

A nivel mundial existe un gran interés en la evaluación de plantas como fuente de nuevos compuestos bioactivos. El propósito de este proyecto es desarrollar metodologías para la obtención de compuestos alelopáticos a través de la propagación *in vitro* de plantas nativas.

El desarrollo de este proyecto permitirá disponer de estrategias para producir plantas que puedan ser utilizadas como fuente de biomasa para la obtención de biopesticidas y/o en programas de reforestación.





5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

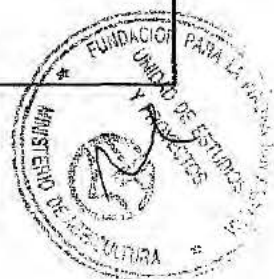
La demanda actual por productos agrícolas de alta calidad y bajos precios, impide la práctica de la **agricultura sostenible**. El aumento de las producciones agrícolas ha ido acompañado de la utilización masiva y en muchos casos indiscriminada de **plaguicidas** y fertilizantes, que han provocado diversos problemas ambientales.

Entre los métodos de prevención de la aparición de malezas, que compiten y reducen los rendimientos, el uso de herbicidas continúa siendo el componente más importante a la hora de incrementar el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, el uso continuo de agroquímicos en áreas de monocultivo ha conducido a la aparición, en varios lugares del mundo de malezas tolerantes y resistentes a muchos herbicidas, lo que en definitiva se ha traducido en un aumento en los costos de producción y mayor impacto ambiental debido a problemas de contaminación de suelos y aguas. Una situación similar se observa frente al uso de fungicidas.

Frente a la problemática descrita, los **productos naturales** representan una fuente cierta de potenciales productos agroquímicos, debido a su diversidad en estructuras químicas, su acción natural biológica específica y su carácter inocuo sobre el medio ambiente. Entre las alternativas para el control de malezas destaca la **Alelopatía**, que estudia cualquier proceso que involucre productos naturales de plantas o microorganismos, que afectan el crecimiento y desarrollo de otras plantas y microorganismos. En el campo agrícola, se busca el control de malezas por medio de efectos alelopáticos selectivos, lo que se ajusta a una visión moderna y comprometida con el ambiente en el manejo de los ecosistemas agrícolas. Las posibles aplicaciones que deriven de los estudios alelopáticos permitirá diseñar metodologías y estrategias encaminadas a la protección vegetal, control integrado de plagas, enfermedades y malezas, control biológico, fenómenos de resistencia, etc.

Chile presenta una flora nativa única y exclusiva, con especies que solo crecen en el país, y que puede constituirse en una fuente importante de principios aleloquímicos. Resulta importante destacar que nuestro país pierde cada día una cantidad importante de recursos genéticos vegetales, debido a que no existe una política que estimule la investigación destinada a incorporar valor agregado a especies y a la protección de ciertos resultados con valor comercial. Sin embargo, la sobre-explotación de una determinada especie podría ocasionar su desaparición.

Frente a la posibilidades de utilizar comercialmente una especie nativa y de asegurar la preservación de un determinado germoplasma, el cultivo de tejidos vegetales **in vitro**, surge como una alternativa viable. En nuestro laboratorio hemos encontrado que mediante esta técnica es posible obtener de manera eficiente compuestos aleloquímicos a partir de plantas como el palqui, ruda y chamico. El propósito de este proyecto es la Producción de compuestos alelopáticos en plantas nativas cultivadas **in vitro**. El éxito de este proyecto permitirá: incorporar valor agregado a plantas nativas productoras de compuestos aleloquímicos, optimizar metodologías para producir y/o preservar germoplasma y finalmente proteger nuestra flora nativa.





6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

En 1946, la introducción del 2,4 D Y el MCPA mostró a los agricultores el potencial de los herbicidas para controlar eficaz y económicamente las malezas en cereales. En la actualidad, el mercado mundial ofrece alrededor de 250 ingredientes activos que permiten el control de malezas en cultivos principales y secundarios. La alta eficiencia de los herbicidas actuales les permite a los agricultores producir sus cultivos en forma reiterada y rentable en los mismos terrenos y optimizar sus ingresos. Sin embargo, una de las desventajas del uso de estos productos es la evolución de malezas resistentes.

Comparada con los insectos y patógenos, las malezas tienen ciclos de reproducción relativamente largos, lo que ha contribuido a la evolución de resistencia a herbicidas. El 2,4-D ha sido ampliamente utilizado desde 1947. Aunque Hilton (1957) informó el primer caso de resistencia, cuarenta años después, se ha reportado resistencia a auxinas sintéticas para 14 especies (Heap, 1997). El glifosato es el herbicida más usado en el mundo, para el cual también se ha informado resistencia (Pratley et al, 1999). Las auxinas sintéticas y el glisofosfato son ejemplos de productos considerados de **bajo riesgo** en la evolución de resistencia a herbicidas.

Por el contrario, la primera maleza resistente a triazinas, *Senecio vulgaris* se encontró el 1970 y en 1986 ya existían 43 malezas dicotiledóneas y 18 monocotiledóneas resistentes a triazinas, sobre todo en campos de maíz. A nivel mundial existen más de 3 millones de hectáreas infestadas con malezas resistentes a triazinas. Esto junto a restricciones de uso ha provocado una disminución en su uso.

Un problema bastante serio es el rápido desarrollo de malezas resistentes a herbicidas inhibidores de las enzimas acetolactato sintetasa (ALS) y acetyl coenzima-A carboxilasa (ACCase). Estos herbicidas son considerados de **alto riesgo** en la evolución de la resistencia.

El clorsulfuron, primer herbicida inhibidor de la ALS, se comercializó en 1982 y el primer caso de resistencia, en la *Lactuca serriola*, se confirmó en 1987 (Mallory-Smith et al, 1990).

Los grupos químicos de herbicidas que inhiben la ALS son las sulfonilúreas, las imidazolinonas, las triazopirimidinas y los pirimidil benzoatos. Los inhibidores de ALS representaron un 13% del mercado mundial en 1996 (Saari, 1999). Actualmente es común encontrar malezas resistentes en cultivos de rotación, en especial si los inhibidores de la ALS se aplican en cultivos sucesivos. La resistencia a este grupo de herbicidas es la que aumenta más rápidamente en la actualidad (Heap, 1997).

Dos grupos químicos componen los inhibidores de la ACCase: los ariloxifenoxipropanoatos (AFP) y las ciclohexanodionas (CHD). Estos graminicidas son efectivos en cultivos de hoja ancha y en cereales y representan aproximadamente un 6% del mercado mundial de herbicidas (Saari, 1999). De manera similar a los que ocurre con los inhibidores de la ALS, los graminicidas seleccionan rápidamente las poblaciones resistentes. A la fecha se ha informado de 21 gramíneas resistentes, las que constituyen una seria amenaza en muchas situaciones, pues no se dispone de herbicidas alternativos con diferentes modos de acción capaces de controlarlas.

El **bromuro de metilo** ha sido usado como fumigante durante los últimos 60 años, debido al amplio rango de plagas que puede controlar. Se utiliza como fumigante en contra de patógenos (hongos, bacterias y otros patógenos del suelo), insectos, nemátodos, roedores, etc. Este fumigante se aplica previo a plantar en conjunto con Cloropiclorina como un componente del sistema de manejo de plagas. La mezcla de estos fumigantes actúa sinérgicamente en el control de patógenos.





Aunque el bromuro de metilo, es una poderosa herramienta en casos específicos, existen un gran número de limitaciones técnicas y legislativas que restringen su uso. Es fitotóxico, el tratamiento con este compuesto genera la producción del ion bromuro como residuo. Este se puede acumular en niveles excesivos y afectar las aguas.

El bromuro de metilo fue clasificado en 1993, como la principal sustancia que afecta la capa de ozono según el Protocolo de Montreal. El Congreso de los Estados Unidos ha regulado el uso de este fungicida reduciendo su utilización en los siguientes términos 50% durante el 2001, un 70% el 2003 y un 100% para el 2005. Esta reducción ha generado ya un aumento en los precios de este producto (impuestos) y la búsqueda de alternativas que puedan reemplazarlo. Entre las alternativas actuales se utilizan los siguientes compuestos: metil isotiocianato (MITC), generadores de MITC y dazomet. También se utilizan, hidrocarburos halogenados tales como 1,3 dicloropropano (1,3D) cloropicrina (tricloronitrometano) y etilen-dibromuro (EDB). **Todos estos compuestos presentan cierto grado de toxicidad.**

Los organofosfatos o carbamatos, utilizados en el control de **nemátodos son altamente tóxicos** (inhibidores de la colinesterasa).

Las plantas superiores son reconocidas como una fuente importante de un amplio rango de aleloquímicos, usados como drogas, pesticidas, saborizantes y aromas. Tradicionalmente estas sustancias son obtenidas desde plantas crecidas en su hábitat natural. Desde el punto de vista comercial, esto involucra el cultivo a larga escala que se encuentra sujeto a todas las regulaciones propias de los diferentes países. (Ej. alcaloides desde *Catharanthus roseus*). Si bien, muchos productos vegetales pueden ser producidos mediante la síntesis química, dependiendo de la complejidad de las sustancias, esta alternativa puede tener un costo muy elevado o bien ser impracticable.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una alternativa atractiva, bajo ciertas condiciones como por ejemplo: si la especie resulta difícil de cultivar, si requiere un largo periodo de cultivo, si presenta un bajo rendimiento y si la síntesis química no ha sido posible producto de limitaciones técnicas o si es muy compleja. El rendimiento de principios activos obtenidos mediante el cultivo de tejidos *in vitro*, puede ser significativamente más alto que el observado en condiciones de campo. Esto debido a que las condiciones de cultivo son óptimas y controladas. Utilizando esta tecnología, se pueden obtener metabolitos de interés, bajo condiciones controladas y reproducibles, independiente de factores climáticos y geográficos, y hoy en día de bajo costo por la utilización de bioreactores.

La droga anti-cancer Taxol® (marca registrada por Bristol-Meyer Squibb), es un muy importante ejemplo de una sustancia a ser producida mediante cultivo de tejidos. El taxol, fue originalmente aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, especie de muy lento crecimiento que crece en las Islas del Pacífico. Para obtener 1gr de droga se requiere la corteza de 1.000 árboles de aproximadamente 100 años de edad. El desarrollo de metodologías para el cultivo *in vitro* de esta especie podría permitir la obtención de plantas para ser utilizadas en programas de reforestación y/o para la obtención de taxol o algún precursor (Seki et al, 1996).





En la tabla siguiente muestra el impacto de la biotecnología en el mercado mundial de productos químicos (Millones de US\$).

Clase de producto	1995	2000	Biotechnología (%)
Productos Farmacéuticos			
Cardiovasculares	45.000	70.800	40
Antibióticos	22.000	30.750	30
Sistema Nervioso Central	16.900	23.100	40
Productos Agrícolas			
Fertilizantes	34.000	45.000	20
Insecticidas y herbicidas	21.200	31.000	50
Plantas y semillas	19.000	26.750	75
Productos Industriales			
Aminoácidos	750	900	50
Enzimas industriales	500	700	30

El bosque nativo chileno está formado por diferentes tipos forestales los que constituyen algunos de los ecosistemas más escasos del mundo, como es el bosque valdiviano. El bosque nativo cubre una superficie aproximada de 13,4 millones de hectáreas, equivalentes al 85,9% de la superficie boscosa del país y al 17,8% de la superficie del territorio nacional. Las características especiales de este recurso forestal constituyen una riqueza de gran valor no sólo para Chile, sino para toda la humanidad.

Nuestros bosques nativos ofrecen un amplio potencial productivo maderable de gran calidad. Además, constituyen una importante fuente de trabajo y sustento para la población rural, ya que proporciona diversos productos, tales como: leña, forraje, frutos, corteza, hongos, materias primas para fármacos y tintas, entre otros. Si bien existe una gran cantidad de información de carácter químico, no existe en el país un programa que asegure el uso sustentable de nuestra flora.

La actual destrucción de éste recurso es una amenaza que afecta a todo el planeta ya que guarda directa relación con el cambio climático, extinción de especies de flora y fauna, pérdida de suelos y nutrientes, sedimentación de los cursos de agua e inundaciones.

El cultivo *in vitro* de plantas nativas constituye una herramienta de la biotecnología para el uso sustentable de la biodiversidad. Nos permitirá, por ejemplo seleccionar el mejor clon de una planta productora de un metabolito importante, y mediante el cultivo de órganos o meristemas *in vitro*, realizar la limpieza de los tejidos dejándolos libres de patógenos. Con esto se mejora su calidad para la obtención de productos útiles. Estas plantas se pueden multiplicar para su propagación masiva en cultivos industriales. Esto introduciría en Chile un programa cuantitativo de uso racional de la biodiversidad vegetal.

Referencias

- Heap, I.M. 1997 The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* 51: 235.
- Hilton, H.W. 1957. Herbicide tolerant strains of weeds. *Sugar Planters Association Annual Report*, 69
- Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C. and Dial, M.J. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*) *Weed Technology* 4: 163.
- Pratley, J., Urwin, N Stanton, R., Baines, P., Broster, J., Cullis, K., Schafer, D., Bohn J. and Krueger, R. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. *Weed Science* 47: 405.
- Saari, L.L. 1999. A prognosis for discovering new herbicide sites of action. En *pesticide Chemistry and Bioscience* (Brooks, G.T y Roberts, T.R. eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.



Seki, M., Ohzora, C., Takeda, M. And Furisaki, S. 1997. Taxol production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidate*. Biotechnol. Bioeng. 53: 214.

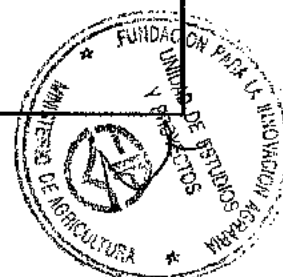




7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

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

El presente proyecto se desarrollará en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, Región Metropolitana. Sin embargo, los resultados obtenidos podrán ser utilizados en cualquier parte del país en el caso de compuestos bioactivos y en aquellas zonas donde se requiera de plantas nativas para programas de reforestación.





8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL

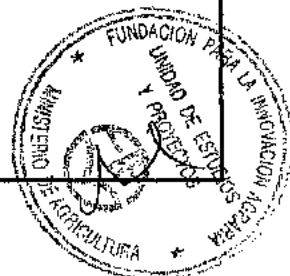
Generar un programa para la obtención de compuestos aleloquímicos en plantas Chilenas cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

8.2. ESPECÍFICOS:

1. Evaluar actividad alelopática en canelo (*Drymis winteri*), pintoa (*Pintoa chilensis*), Patagua (*Myrceugenia planipis*), boldo (*Peumus boldus*) y Pluchea (*Pluchea absintiodes*)
2. Optimizar metodologías para la obtención de biomasa vegetal a partir de las especies nativas canelo (*Drymis winteri*), pintoa (*Pintoa chilensis*), Patagua (*Myrceugenia planipis*), boldo (*Peumus boldus*) y Pluchea (*Pluchea absintiodes*)
3. Implementar metodologías para la obtención de extractos bioactivos en las especies nativas cultivadas *in vitro*
4. Desarrollar bioensayos para la evaluación de la actividad aleloquímica de extractos obtenidos.
5. Evaluar las propiedades alelopáticas de los extractos
6. Evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos.
7. Aislar e identificar el o los principios activos en los extractos
8. Proteger la propiedad industrial de los resultados del Proyecto.
9. Transferir la tecnología desarrollada a pequeños industriales
10. Elaborar informe final del proyecto

Metas del Proyecto:

- 1.- Obtener antifúngicos orgánicos contra botrytis y U.necator
- 2.- Desarrollar tecnología para instalar en Chile una industria de extractos aleloquímicos
- 3.- Crear una banco de germoplasma de plantas productoras de aleloquímicos
- 4.- Recopilar información y antecedentes y Editar un libro sobre producción de aleloquímicos y su utilización
- 5.- Realizar un encuentro nacional de Investigadores y Agricultores entorno al debate de utilización de aleloquímicos versus agroquímicos.





9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

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

1. Obtención de plantas. Las plantas serán obtenidas desde su habitat natural y mantenidas en condiciones de invernadero. Se utilizarán las siguientes especies vegetales que en condiciones de laboratorio han mostrado una buena actividad pesticida en investigaciones anteriores: *Drymis winteri* (canelo), *Peumus boldus* (boldo) especie que presenta una interesante actividad alelopática *in vivo*, y de la cual se extrae la boldina que presenta propiedades antioxidantes importantes. *Pintoa chilensis*, especie nativa de las regiones III y IV y que de acuerdo al catastro de la CONAF es considerada una especie rara y producto de la sobreexplotación se encuentra desaparecida. También se utilizarán Patagua y *Plechea absintiodos* (Plechea), especies con propiedades alelopáticas muy significativas.

2. Cultivo *in vitro* de plantas.

2.1. Obtención de explantes

Se utilizarán diferentes muestras de tejido vegetal de cada una de las especies seleccionadas en el proyecto. Los tejidos serán desinfectados superficialmente mediante su incubación en soluciones de cloro comercial durante 10 minutos y luego lavados con abundante agua destilada estéril.

2.2.- Pruebas con diferentes medios.

Los explantes serán incubados en medios de cultivo sintéticos ricos en sales minerales vitaminas, fuente de carbono. Como base se probarán los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) (Smith, 2000). Los medios serán suplementados con frecuentes combinaciones de reguladores de crecimiento (auxina y citoquinina). Los frascos de cultivo serán incubados en cámaras de crecimiento especialmente construidas, donde son reguladas las condiciones de luz, temperatura y humedad. Se realizarán estudios tendientes a evaluar los efectos de las modificaciones de las condiciones de cultivo sobre la el crecimiento de los explantes vegetales.

2.3. Subcultivo de las especies

Las especies con actividad pesticida (alelopática y fungicida) serán subcultivadas en forma periódica dependiendo de la tasa de crecimiento de las especies. Esto a fin de disponer de la biomasa vegetal necesaria para la producción de los extractos para los ensayos

2.3 Uso de bioreactores.

Se utilizará un sistema basado en la técnica de inmersión temporal que permite la propagación de plantas por organogénesis. Este sistema entrega la posibilidad de aumentar el volumen de biomasa en forma significativa. Se prepararán frascos de 1 L a los que se incorporará aproximadamente 800 ml de medio de cultivo. En este sistema se incorporarán explantes (10 brotes). Al frasco se insuflara aire estéril a fin de permitir la constate disponibilidad de oxígeno en la solución. El sistema se mantendrá en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura.



3. Evaluación de propiedades aleloquímicas

3.1. Obtención de extractos

3.1.1. Obtención de extractos acuosos

La obtención de extractos se hará utilizando las siguientes metodologías:

- a) **Planta completa:** Las plántulas para iniciar las actividades serán obtenidas desde viveros comerciales. A partir de hojas de estas plantas se obtendrán infusiones y extractos previa molienda en nitrógeno líquido. La identificación exacta de las especies adquiridas se realizará con la ayuda de Personal del Museo de Historia Natural.
- b) **Plántulas *in vitro*.** Para plántulas obtenidas de los cultivos "*in vitro*", consistentes en hojas y tallos, se realizarán extracciones por inmersión en agua fría por 24 horas.

c) **Planta molida:**

El tejido de plantas *in vivo* e *in vitro*, se congelará en nitrógeno líquido y se molerá en un mortero en presencia de agua. El solvente será eliminado por evaporación a presión reducida, los extractos se pesarán y se guardarán en un refrigerador a 0 °C. A cada extracto se le determinará su actividad alelopática y antifúngica.

3.1.2 Obtención de extractos orgánicos

Las plántulas serán sumergidas en un solución alcohólica (85%) durante 24 hrs. Adicionalmente, se molerán en presencia de nitrógeno líquido y se extraerán con la misma solución alcohólica. A estos extractos se les determinará su actividad alelopática y antifúngica.

3.1.2. Estandarización de los extractos.

Con el propósito de disponer de extractos equivalentes en términos de su composición, estos serán estandarizados utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que permite comparar los principales componentes existentes en la muestra. La estandarización se hará en función de el componente mayoritario presente en la muestra.

3.1.3 Fraccionamiento de los extractos.

Los extractos se fraccionarán por columnas cromatográficas rápidas, utilizando solventes de diferente polaridad, como hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo y etanol. Para ello se utilizará la técnica de Cromatografía Líquida a Presión Reducida (CLPR) que permitirá obtener mezclas de compuestos menos complejas que los extractos originales. Cada una de estas sub-fracciones se concentrarán a presión reducida, los extractos se pesarán y se guardarán a 0°C. Las sub-fracciones serán analizadas por cromatografías en capa fina analítica (CCF) en diferentes sistemas cromatográficos. A cada sub-fracción se le medirá su actividad antifúngica y antimicrobiana. Aquellas sub-fracciones de mayor actividad, se seleccionarán para una posterior separación y purificación de sus componentes activos.





3.1.4 Purificación de los extractos.

Las sub-fracciones más activas, se purificarán por técnicas cromatográficas (capa fina preparativa, líquida de alta eficiencia). La determinación estructural de cada compuesto aislado se realizará por análisis espectroscópico, U.V., IR con TF, RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensional, por espectrometría de masas de alta y baja resolución, si fuese necesario. Los compuestos puros serán evaluados como agentes alelopáticos y/o antifúngicos.

3.2. Evaluación de las propiedades alelopáticas

3.2.1. Evaluación en Semillas. Para estudiar las propiedades alelopáticas de los extractos, se utilizarán semillas de mono y dicotiledóneas, de acuerdo metodologías descritas en la literatura.

Monocotiledóneas:	Liliaceae:	<i>Allium cepa</i> : Cebolla
	Gramineae:	<i>Triticum aestivum</i> , Trigo <i>Hordeum vulgare</i> , Cebada
Dicotiledóneas:	Cruciferae	<i>Lepidium sativum</i> , Berro
	Compositae	<i>Lactuca sativa</i> Lechuga
	Solanaceae	<i>Lycopersicum esculentum</i> , Tomate
	Umbelliferae	<i>Daucus carota</i> , Zanahoria

3.2.2. Efecto de los extractos sobre la germinación de semillas.

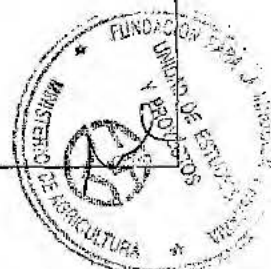
En placas Petri de 14 cms de diámetro, cubiertas con papel filtro Watman N° 1, se colocaran 10 semillas previamente desinfectadas de las especies indicadas en el punto 3.2.1. Las placas serán puestas en una cámara de crecimiento a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 16/8 hrs. luz/ oscuridad. Cada ensayo se realizará por triplicado. Se considerará como indicador de germinación aquellas semillas cuyo crecimiento radicular sea igual o superior a 0,5 cm.

3.2.3. Efecto de los extractos sobre la α -amilasa

3.2.3.1. Ensayo de placa Petri:

Serán embebidas mitades de semillas de cebada con embrión, por 48 horas en extractos alelopáticos al 4%p/v, agua o ácido abscísico (ABA en concentraciones de 10^{-7} a 10^{-3}M). Luego, las semillas se sembrarán en placas Petri preparadas con 15 mL de solución agar almidón (1%p/v en extracto, agua o ABA) Cada placa con 10 semillas cerrada herméticamente, se incubará en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16/8 horas luz, durante 24 hrs. Finalmente, se retirarán las semillas y se revelarán las placas con lugol (6gr KI más 600 mg I_2 en 100 mL de agua).

El parámetro a determinar es el efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima α -amilasa será en función del diámetro del halo que indica la degradación de almidón por la enzima.





3.2.3.2. Análisis espectrofotométrico

Serán maceradas semillas de cebada (previamente embebidas durante 48 horas, en frío en CaCl_2 5mM en una proporción de 0.5:5 (gr/mL). El macerado será filtrado y centrifugado a 12.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se utilizará como extracto enzimático. La mezcla de reacción para evaluar la actividad enzimática contendrá 100 μL del extracto enzimático y 400 μL de agua. La reacción se iniciará al agregar 500 μL de solución A (50 mM NaOAc, pH 4.8; 0.03 %p/v almidón p.a.; 60 mM NaCl y 20 mM CaCl_2) y se detendrá al adicionar 500 μL de solución de lugol, luego de un periodo de incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar el efecto de los extractos se agregará a la mezcla de reacción diferentes volúmenes de extracto (10-50 μL). La actividad enzimática se expresará en base al consumo de almidón (μg) por (minuto y mg de proteína), al determinar la absorbancia del complejo almidón-lugol a 620 nm.

3.3.- EFECTO DE EXTRACTOS SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO EN MITOCONDRIAS DE CEBADA:

3.3.1 Obtención de suspensión mitocondrial de plantas de cebada:

Esta suspensión será preparada según el método descrito por Aranda y colaboradores (1983), utilizando plantas de cebada crecidas a 25°C y en oscuridad para evitar desarrollo de cloroplastos. Las plantas de 15 días serán maceradas en frío con buffer de extracción (0.25 M sacarosa, 1mM EDTA, 2 mg/mL de BSA y 10 mM Tris-HCl, pH 7.6), en una proporción 1:5. El extracto obtenido se filtrará y centrifugará a 2.000 g por 15 minutos. El sobrenadante se centrifugado nuevamente a 10.000 g por otros 20 minutos. La pella resultante se resuspenderá en buffer de resuspensión mitocondrial (0.25 M de sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4).

3.3.2 Determinación de consumo de oxígeno:

El consumo de oxígeno se determinará utilizando un electrodo de Clark durante 15 minutos a temperatura de 30°C. La mezcla de reacción contendrá una cantidad de proteínas y buffer de resuspensión mitocondrial. La reacción se iniciará al agregar 60 μL de NaDH 1 mM.

El efecto de los extractos alelopáticos al 4 %p/v y 1mM KCN fue evaluado en forma similar al protocolo antes mencionado pero con 100 μL del extracto o 100 μL de KCN (control positivo). El consumo de oxígeno se determinará según la siguiente expresión:

$$\text{Consumo de oxígeno} = (M \times S) / (100 \times P) \quad (\text{umoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{prot}).$$

Donde:

M = pendiente inicial de la curva trazada por el oxígrafo expresada como una diferencia porcentual de contenido de O_2 por minuto.

S = solubilidad del oxígeno en tampón mitocondrial equivalente a un 100 % (0.223 mM a 30°C).

P = concentración de proteínas (mg/mL).

La concentración de proteínas será determinada mediante método de Bradford modificado usando una solución de BSA estandar 1mg/mL.





3.4.- Efecto de extractos sobre la reacción de Hill:

Se macerarán 10 gramos de hojas de espinaca en frío con 20 mL de 0.5 M sacarosa y 3 mL de 0.1 M buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5. El macerado será filtrado y luego, centrifugado a 5.700 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se centrifugará otra vez a 12.700 rpm por 7 minutos. La pella resultante se resuspenderá en 20 mL de 0.1 M buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5 en frío. La suspensión de cloroplastos se guardará en hielo y en oscuridad.

La mezcla de reacción contendrá 1 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5, 2 mL de agua y 1 mL de 2.5×10^{-4} M DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol). La reacción se iniciará al adicionar 1 mL de suspensión de cloroplastos y se seguirá el avance de la reacción espectrofotométricamente, previa iluminación de los tubos cada 15 segundos durante 75 segundos.

La reacción de Hill se evidencia a través de la fotoreducción del DCPIP a 600nm, por parte de los cloroplastos iluminados..

El efecto de los extractos alelopáticos al 4 %p/v y de un herbicida será evaluado en forma similar al protocolo antes mencionado.

3.5.- Actividad de los extractos alelopáticos sobre malezas:

Semillas desinfectadas de diferentes malezas (*Gallega officinalis*, serán embebidas en agua (control) y en extractos crudos de plantas *in vitro* (tratamiento) durante 2 horas. Luego, las semillas se sembrarán en placas de germinación siguiendo similar protocolo que en punto 4. Se considerarán semillas germinadas aquellas que presenten un desarrollo de la radícula $\geq$ que 0.5 cms, a las 72 horas de realizado el ensayo. Las placas selladas fueron incubadas en una cámara de cultivo a 25°C y fotoperíodo de 16/8.

3.6 Evaluación de las propiedades fungicida.

Se realizarán muestreos en viñedos de Ovalle, Melipilla y Curicó a fin de obtener cepas de *B.cinerea* y *U.necator*. De cada aislado se obtendrán muestras que serán cultivadas según los requerimientos de la especie.

3.6.1.- Cepas de *B. cinerea*.

En este estudio se utilizará como control en la caracterización de las cepas aisladas, la cepa U29 de *B. cinerea*, esta cepa fue aislada de uvas infectadas por el hongo y fue purificada de manera que la cepa utilizada proviene de un conidio

3.6.2.- Crecimiento y mantención del hongo

El hongo será crecido en el medio de cultivo agar papa-dextrosa y será mantenido en tubos inclinados con agar papa-dextrosa. Para la obtención de esporas las placas serán incubadas a 10 cm de distancia de tubos fluorescentes F15T8 BLB con un espectro de emisión de 310-410 nm. Se realizarán subcultivos periódicos a fin de mantener el hongo activo.

3.6.3 Cepas de *U.necator*

Debido a que el hongo es biótrofo obligado, el efecto de los extractos será determinado sólo en experimentos *in vivo*.

3.6.3.1.- Cepas de *U. necator*





Los aislados que se utilizarán en este estudio serán obtenidos de hojas o tallos de parras o uvas contaminados con el hongo de cada uno de los sitios de colecta

3.6.3.2.- Crecimiento y mantención del hongo

En el laboratorio el hongo se inoculará en hojas de parra jóvenes, las que serán desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Las hojas serán colocadas en placas Petri sobre agar-agua. Se incubará a 22°C. Cuando la hoja se encuentre completamente cubierta por el micelio del hongo, éste se traspasará a otra placa de Petri que contenga hojas de parra

3.7.- Actividad antifúngica *in vitro* y citotoxicidad de los extractos.

En los experimentos *in vitro* se evaluará el efecto sobre el crecimiento del micelio y sobre la germinación de los conidios.

3.7.1.- Evaluación *in vitro* del efecto de los extractos

3.7.1.1. Sobre el crecimiento de *B. cinerea*.

Para realizar estos experimentos se preparará placas Petri que contengan el medio de cultivo agar papa-dextrosa y los extractos solubles en una concentración de 10 mg/ml. Se inoculará al centro de la placa micelio del hongo y se medirá el diámetro de crecimiento del micelio diariamente. Como controles se usará placas de cultivo que contengan agar papa-dextrosa en ausencia de los extractos. Cada experimento se realizará al menos en quintuplicado

3.7.1.2. Sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea*.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la germinación, los conidios serán resuspendidos en el medio de cultivo líquido papa-dextrosa en presencia de los extractos en una concentración de 10 mg/ml. Los conidios resuspendidos serán incubados a 22 °C y se determinará la cinética de germinación. Como control se determinará la cinética de germinación de los conidios resuspendidos en medio de cultivo, pero en ausencia de los extractos.

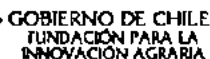
3.7.1.3. sobre el crecimiento de *U. necator*.

La capacidad de *U. necator* para producir lesiones en hojas de parra será determinada de la siguiente manera: las hojas desinfectadas serán rociadas con una solución que contenga los extractos en una concentración de 10 mg/ml. Las hojas serán inoculadas con una suspensión de conidios, en una concentración de 1×10^5 conidios/ml y se incubarán a 22°C en cámaras húmedas. Al cabo de un tiempo se determinará el diámetro de la lesión producida. Como control se utilizará hojas que no hayan sido tratadas con los extractos.

3.7.3.- Determinación de la actividad citotóxica

Se seguirá el protocolo "Test de control de citotoxicidad en cultivos celulares" en "Cultivos celulares" escrito por la Dra. Marcela Aranda en un Manual del Instituto Bacteriológico de Chile, 1979. En este protocolo se determina la actividad citotóxica incubando un cultivo celular (células Vero) con distintas cantidades de compuesto o extracto. Se analiza en el tiempo el crecimiento celular midiendo el número de células y relacionándolo con el crecimiento del cultivo celular en ausencia del compuesto o extracto, con el respectivo control del solvente utilizado.





AÑO 2001

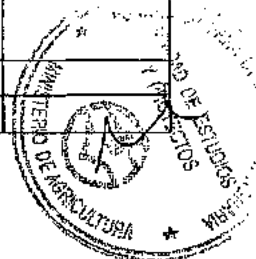




10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio (mes/Año)	Fecha Término (mes/Año)
2	1	Determinar medio de cultivo adecuado para obtener cultivos <i>in vitro</i> de las especies	03/2002	08/2002
	2	Búsqueda de las condiciones adecuadas para la obtención de biomasa, con alto rendimiento.	03/2002	08/2002
	3	Producción de biomasa mediante el uso de bioreactores	04/2002	12/2005
	4	Subcultivo de las especies	04/2002	12/2005
3	1	Obtención de extractos bioactivos. Efecto de solvente.	04/2002	12/2002
	2	Obtención de extractos bioactivos. Efecto de pH	04/2002	12/2002
4	1	Ensayo de Germinación	04/2002	12/2002
	2.	Ensayo sobre enzimas	06/2002	01/2003
	3	Respiración en mitocondrias aisladas	08/2002	08/2003
	4	Fotosíntesis- Reacción de Hill	10/2002	08/2003
5	1	Efecto de extractos acuosos de diferentes especies sobre la germinación	04/2002	01/2005
	2	Efecto del pH sobre la actividad de extractos en la germinación	04/2002	01/2005
	3	Efecto de extractos orgánicos sobre la germinación	04/2002	01/2005
	4.	Efecto de extractos sobre la actividad de la α -amilasa	06/2002	03/2005
8	1	Realizar taller N° 1	07/2002	07/2002





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

AÑO 2003

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio (mes/Año)	Fecha Término (mes/Año)
2	3	Producción de biomasa mediante el uso de bioreactores	04/2002	12/2005
	4	Subcultivo de las especies	04/2002	12/2005
4	2.	Ensayo sobre enzimas	04/2002	07/2003
	3	Respiración en mitocondrias aisladas	06/2002	08/2003
	4	Fotosíntesis- Reacción de Hill	10/2002	08/2003
5	1	Efecto de extractos acuosos de diferentes especies sobre la germinación	04/2002	01/2005
	2	Efecto del pH sobre la actividad de extractos en la germinación	04/2002	01/2005
	3	Efecto de extractos orgánicos sobre la germinación	04/2002	01/2005
	4.	Efecto de extractos sobre la actividad de la α -amilasa	06/2002	03/2005
	5	Efecto de los extractos sobre la respiración	08/2002	06/2005
6	1	Aislamiento de cepas de <i>Botrytis cinerea</i>	10/2003	11/2004
	2	Cultivo de <i>B. cinerea</i> en condiciones de Laboratorio	10/2003	12/2005
	3	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vitro</i>	11/2003	08/2005
	4	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vivo</i>	11/2003	12/2005
	5	Efecto de extractos sobre <i>U. necator</i>	11/2003	12/2005
8	1	Realizar taller N° 2	11/2003	11/2003

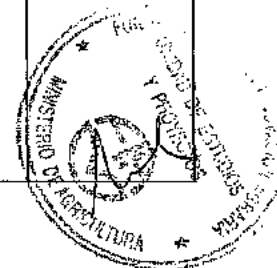




10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2004

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio (mes/Año)	Fecha Término (mes/Año)
2	3	Producción de biomasa mediante el uso de bioreactores	04/2002	12/2005
	4	Subcultivo de las especies	04/2002	12/2005
5	2	Efecto del pH sobre la actividad de extractos en la germinación	04/2002	01/2005
	3	Efecto de extractos orgánicos sobre la germinación	04/2002	01/2005
	4	Efecto de extractos sobre la actividad de la α -amilasa	04/2002	03/2005
	5	Efecto de los extractos sobre la respiración	08/2002	06/2005
	6	Efecto de los extractos sobre la fotosíntesis	08/2002	06/2005
	7	Efecto de extractos sobre malezas	01/2004	06/2005
	8	Efecto de extractos sobre el crecimiento de plantas indicadoras	01/2004	06/2005
6	1	Aislamiento de cepas de <i>Botrytis cinerea</i>	10/2003	11/2004
	2	Cultivo de <i>B. cinerea</i> en condiciones de Laboratorio	10/2003	12/2005
	3	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vitro</i>	11/2003	08/2005
	4	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vivo</i>	11/2003	12/2005
	5	Efecto de extractos sobre <i>U. necator</i>	11/2003	12/2005
8	1	Taller 3	10/2004	10/2004
	2	Curso	05/2004	05/2004





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

AÑO 2005

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
2	3	Producción de biomasa mediante el uso de bioreactores	04/2002	12/2005
	4	Subcultivo de las especies	04/2002	12/2005
5	2	Efecto del pH sobre la actividad de extractos en la germinación	04/2002	01/2005
	3	Efecto de extractos orgánicos sobre la germinación	04/2002	01/2005
	4.	Efecto de extractos sobre la actividad de la α -amilasa	04/2002	03/2005
	5	Efecto de los extractos sobre la respiración	08/2002	06/2005
	6	Efecto de los extractos sobre la fotosíntesis	08/2002	06/2005
	7	Efecto de extractos sobre malezas	01/2004	06/2005
	8	Efecto de extractos sobre el crecimiento de plantas indicadoras	01/2004	06/2005
6	2	Cultivo de <i>B. cinerea</i> en condiciones de Laboratorio	10/2003	12/2005
	3	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vitro</i>	11/2003	08/2005
	4	Efecto de extractos sobre <i>B. cinerea in vivo</i>	11/2003	12/2005
	5	Efecto de extractos sobre <i>U. necator</i>	11/2003	12/2005
8	1	Taller 4	10/2005	10/2005
9	1	Patentar resultados	03/2005	12/2005
10	1	Elaborar informe final	12/2005	04/2006

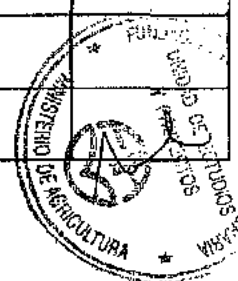




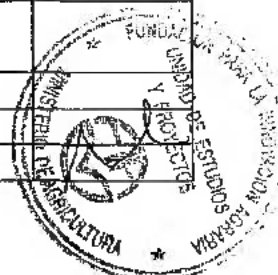
11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. Nº	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo (mes/Año)
1	Medios y condiciones para la propagación in vitro de plantas	Especies micropropagadas	6	3	06/2002
2	Extractos bioactivos	Nº de extractos	6	3	08/2002
3	Bioensayos adecuados para evaluar actividad de extractos	Nº de bioensayos disponibles	5	3	03/2003
4	Extractos alelopáticos	Nº de extractos alelopáticos	5	3	12/2003
5	Extractos Antifúngicos	Nº de extractos antifúngicos	5	3	12/2004
6	Moléculas bioactivas	Cantidad de moléculas	10	10	12/2004
7	Talleres de transferencia tecnológica	% de asistencia a los talleres	4	2	Dic/2004
8	Patentes de extractos y/o procedimientos	Nº de patentes	3	3	12/2005



11.2. Resultados esperados por actividad

[illegible]

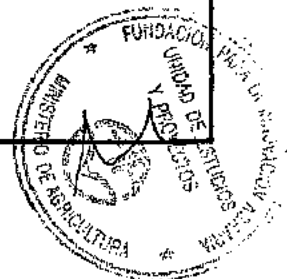


12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

El principal impacto al desarrollar este proyecto será el desarrollo de agroquímicos que permitirán disminuir el uso de pesticidas químicos que provocan una serie de problemas ambientales y de salud.

- A nivel mundial existe una gran demanda por la búsqueda de alternativas que permitan el reemplazo del bromuro de metilo.
- La agricultura orgánica requiere de nuevos pesticidas que presenten un bajo impacto ambiental. En nuestro país la superficie dedicada a la agricultura orgánica ha aumentado de manera significativa en los últimos años
- Los extractos producidos en este proyecto permitirán el desarrollo de nuevos negocios asociados a la agricultura.
- En el campo específicos de los herbicidas y fungicidas, nuestros resultados preliminares nos permiten proponer que desarrollaremos compuestos capaces de controlar malezas y hongos fitopatógenos que afectan diferentes procesos productivos, como por ejemplo, la producción de uva.
- Si solo dimensionamos el impacto que podría tener este proyecto en relación al cultivo de vides, se puede mencionar lo siguiente:
- Existen alrededor de 140.000 hectáreas en el país
- En la temporada 2000-2001 se exportaron 69.193.805 cajas, lo que origino un retorno por sobre los US\$ 1.000 millones.
- Las vides son atacadas por hongos *B.cinerea* y *U. necator* que provocan pérdidas cercanas al 10%. Este porcentaje podría ser disminuido en alrededor de un 7%, originado un ahorro anual de US\$ 70 millones.
- Los extractos podrán ser utilizados en todos aquellos cultivos en los que se utiliza el bromuro de metilo.
- Disminuirá el costo de la prevención y curación de intoxicaciones, enfermedades y malformaciones asociadas al empleo de agroquímicos (Existe una gran cantidad de evidencia sobre los efectos negativos de ciertos agroquímicos en la VI Región)
- Se podrá utilizar nuestra flora nativa, sin afectar los ecosistemas agregando valor a productos que se exportan en la actualidad solo como materia prima.
- Los productos que se obtengan en este proyecto podrán ser patentados Nacional e Internacionalmente.





12.2. Social

En un estudio realizado por el Instituto de Salud Pública durante el año 2000, se comprobó que:

- el 21% de las frutas y verduras que consumimos los chilenos, presentan residuos de plaguicidas.
- El 4% de las muestras contenía restos de plaguicidas autorizados en Chile, pero en concentraciones superiores a la autorizadas.
- Un 9% de los alimentos contenía Etilparation, plaguicida prohibido en Chile desde 1999
- Un 8% contenía Mevinfos, prohibido desde 1994.
- Un 79% de las muestras contenía algún tipo de residuo, el 21% de ellos era de plaguicida.

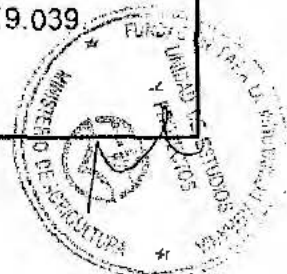
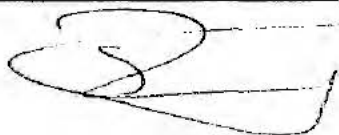
A través de este proyecto se disminuirá el costo de la prevención y curación de intoxicaciones, enfermedades y malformaciones asociadas al empleo de agroquímicos.



Las normas que regulan el tema de los biofungicidas en Chile son las siguientes:

Decreto Ley N° 3.557 del Ministerio de Agricultura, Título III "Fabricación, comercialización y aplicación de plaguicidas y fertilizantes", Párrafo 1° "De los plaguicidas".

- Resolución N° 940 que establece normas para la evaluación y autorización de plaguicidas.
- La Resolución N° 940 señala que corresponde al SAG regular, restringir o prohibir la fabricación, importación, distribución, venta y aplicación de plaguicidas. La evaluación integral de los mismos deberá contar con la participación del Ministerio de Salud y de la Comisión Nacional del Medio Ambiente, integradas en el Comité Asesor del SAG para la Evaluación de Plaguicidas de Uso Agrícola.
- La norma señala que plaguicida es un compuesto químico, orgánico o inorgánico, o sustancia natural que se utilice para combatir malezas, enfermedades o plagas potencialmente capaces de causar perjuicios en organismos u objetos. Se entenderá cada producto formulado y la sustancias activas con que se formulan, con aptitudes insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, lagomorficidas, avicidas, **fungicidas**, bactericidas, alguicidas, herbicidas, defoliantes, desecantes, fitorreguladores, coadyuvantes, antitranspirantes, atrayentes, feromonas, repelentes, y otros que se empleen en las actividades agrícolas y forestales.
- La misma norma señala que sólo se podrá fabricar, importar, distribuir, vender o aplicar, plaguicidas de uso en agricultura autorizados por el Servicio. La autorización no constituirá propiedad del plaguicida ni de la sustancia activa que contiene. La autorización se otorgará previa evaluación favorable del SAG, realizada en conformidad con la Resolución 940. Dicha autorización deberá ser solicitada al SAG por una persona domiciliada en el país y que cuente con la asesoría de profesionales con calificación en las disciplinas que se relacionen con el uso de plaguicidas, y contener la información que la misma resolución señala en el punto 28.
- La autorización de una plaguicida podrá ser **definitiva** o **experimental**.
- Será **definitiva** para los plaguicidas cuyo usos hayan sido comprobados en el país y tendrá una duración de cinco años renovables por períodos iguales. Se considerará uso comprobado para los plaguicidas, el ensayo oficial realizado en el país por Estaciones Experimentales autorizadas por el SAG o certificada su eficacia por profesionales debidamente acreditados por este y siguiendo sus protocolos. La autorización será **experimental** para los plaguicidas cuyos usos no haya sido comprobados en el país en la forma señalada anteriormente y tendrá una vigencia de cinco años renovables por períodos iguales.
- Mientras el plaguicida cuente con autorización experimental no podrá comercializarse y sólo podrá usarse en Estaciones Experimentales autorizadas por el SAG, bajo protocolos establecidos por este. Podrá solicitarse la autorización definitiva antes del término del plazo, para los usos cuya eficacia haya quedado demostrada con la experimentación realizada. Para la autorización definitiva deberán obtener autorización definitiva de acuerdo con el protocolo establecido por el SAG.
- La información científica proporcionada por el solicitante para la autorización del plaguicida, que no sea de dominio público, o no haya sido publicada en revistas científicas o de divulgación, será confidencial, de este modo se puede mantener los requisitos de patentabilidad señalados en el artículo 32 y 33 de la Ley N° 19.039.





- Sin embargo, el SAG u otros organismos del Estado podrán utilizarla con fines de control de calidad, de preservación de la salud humana o animal y prevención de la contaminación ambiental. En todo caso, esta información científica sólo podrá ser utilizada por agencias oficiales para resolver situaciones calificadas, según lo demanden los intereses nacionales.
- Además de todo lo señalado anteriormente, el uso de biofungicidas está regulados en Chile, por la normativa que rige la aplicación de sustancias orgánicas pues se trata de compuestos con un bajo impacto ambiental, esto por tratarse de compuestos naturales. Estas normas son la NCh 2439 sobre producción, procesamiento, comercialización y etiquetado de alimentos producidos orgánicamente y la NCh 2079 que señala criterios generales para la certificación de sistemas de producción procesamiento, transporte y almacenamiento de productos orgánicos.
- En el caso de compuestos que pudieran ser exportados, ambas normas que equivalen a las de la Unión Europea N° 2092/91 y EN 45011 o ISO 65 serán certificadas por la Empresa IMO-Fundación Chile, mientras el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), no adquiera el estatus de organismos certificador



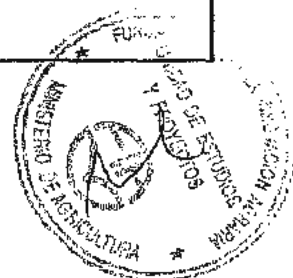


13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

El desarrollo de este proyecto tendrá un impacto ambiental positivo por las siguientes razones:

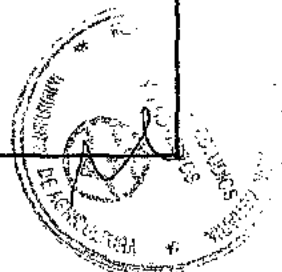
- Los extractos a desarrollar son de origen vegetal y por lo tanto considerados como productos orgánicos, y son íntegramente biodegradables
- La aplicación de los extractos evitará a la población, particularmente a los trabajadores agrícolas, el riesgo de una constante exposición a agroquímicos de alta toxicidad para el ser humano. (tema social de gran actualidad)
- En la obtención de los extractos vegetales de plantas nativas mediante cultivo *in vitro* es un control a la seguridad de las especies para que no sean afectadas por una sobreexplotación comercial, sin provocar ningún impacto en los ecosistemas
- En el caso de especies en peligro de extinción, como la pintoa, la micropropagación *in vitro* podrá contribuir con plantas para programas de recuperación de hábitats naturales.
- Por tratarse de sustancias de origen natural deberían ser biodegradadas por los organismos, reduciéndose su periodo de permanencia en ellos y en los ecosistemas. Esto tiene especial importancia, pues en la actualidad se emplean sustancias que no siempre son degradadas y por lo tanto se acumulan en cantidades que provocan alteraciones en los ecosistemas. Lo señalado es fundamental, debido a las exigencias crecientes por un lado de las instituciones encargadas del medio ambiente, y por otro lado de los países compradores de productos agrícolas.





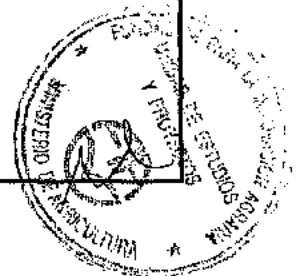
13.2. Acciones propuestas

Ni las hay, por tratarse de un proyecto de nulo efecto ambiental





13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)



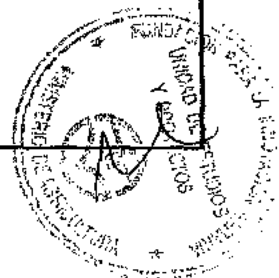


15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración

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.

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

1. Recursos Humanos. Se considera el aporte en horas de: Investigador responsable (40% de la Jornada) : \$ 680.000/mes, Investigador alterno (30% de la Jornada) : \$360.000. Investigador 1 (20% de la Jornada): \$180.000/mes, Secretaría: \$ 60.000/mes, Encargada Manejo Contable : 70.000/mes
2. Equipamiento. Se considera el uso de los equipos existentes y requeridos para el desarrollo del proyecto (Cámara de flujo laminar, autoclave, espectrofotómetro, destilador de agua, etc), equipos computacionales y otros implementos. Se les asigno un 20% del costo que fue prorrateado a 5 años. Equipos de Laboratorio: \$ 120.000/mes, equipos computacionales: \$ 25.000/mes, Otros equipos: 25.000/mes.
3. Infraestructura: Se considera el uso de las cámaras de crecimiento de plantas, el laboratorio de Fisiología Vegetal, Invernadero. Se considero un 20% del valor de esta infraestructura: \$600.000/mes
4. Gastos Generales. Se considera el pago de luz, teléfono, agua: \$ 350.000/mes
5. La Universidad a través de la oficina de protección de resultados, se encargará de evaluar aquellos resultados que sean susceptibles de protección, tanto a nivel nacional como internacional. Esta misma oficina se encargará de realizar todos los trámites necesarios para patentar los resultados.





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)

Los aportes solicitados al FIA corresponden a los siguientes aspectos.

Recursos Humanos.

Incentivos. Investigador Responsable e Investigador Alumno.

Honorarios Bioquímico (\$ 6.819 x 44hrs, todo el proyecto) y Técnico (\$4.546 x44 hrs, todo el proyecto). Ambos profesionales serán contratados para el desarrollo del proyecto.

Equipamiento. Se requiere la adquisición de un Espectrofotómetro con arreglo de diodo, necesario para la identificación de las moléculas bioactivas. El costo estimado a la fecha es de \$6.500.000.

Viajes y Viáticos (Ítem susceptible al precio del dólar). Los cálculos

Viáticos Nacionales. Se consideró la participación de los Investigadores en las siguientes reuniones científicas : Sociedad Agronómica de Chile: Inscripción, Pasajes y viáticos (Todo el proyecto). Sociedad de Biología de Chile o Sociedad Botánica de Chile. Inscripción, pasajes y viáticos (Todo el proyecto).

Viáticos internacionales (Los cálculos se realizaron considerando valor dólar US\$ 700). Se consideró la participación en las siguientes reuniones científicas.

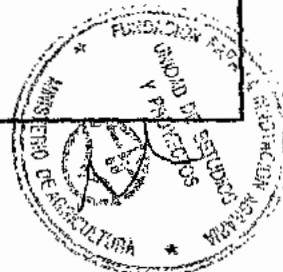
IFOAM 2002 Organic World Congress. Cultivating Communities., 21-27 de Agosto British Columbia- Canada. Pasaje aéreo US\$ 1.400. Inscripción US\$ 300 Viáticos. US\$ 1000
American Society of Plant Biology. 2003. Pasajes US\$ 1.400. Viáticos US\$ 1.400.
Inscripción US\$ 300

Allelopathy Society Congress 2004. Pasajes US\$ 1.400. Viáticos. 1.400. Inscripción.

Materiales e insumos (Ítem susceptible al precio del dólar). Los reactivos y solventes requeridos para realizar este proyecto son todos de grado analítico, esto significa que deben ser importados. Por esta razón, en este ítem se mantuvo el monto solicitado en la formulación inicial

Se considero la adquisición de insumos de laboratorio (medios de cultivo, hormonas, agar-agar, solventes grado analítico), materiales de laboratorio (material de vidrio, frascos para cultivo, puntas para Micropipetas, tubos eppendorf, micropipetas, etc.), insumos para invernadero (tierra de hoja, bolsas, fertilizantes, etc), tubos fluorescentes y otros. Reactivos específicos para la implementación de bioensayos (Enzimas, sustratos enzimáticos, etc)

Servicios a terceros. Se considero la reparación de un liofilizador que actualmente se encuentra inutilizado.





Difusión. Se consideró la realización de talleres, de un curso para estudiantes de postgrado y profesionales y la elaboración de un manual o libro de recopilación de antecedentes del proyecto.

Los talleres serán programados según fecha de inicio del proyecto, sin embargo se estima la siguiente calendarización:

Las fechas y títulos son tentativos

Taller 1 "Extractos Vegetales en la Industria del 2002 "

Fecha: Julio del 2002

Dirigido a: Empresarios, Ejecutivos, Exportadores de Productos Químicos, Laboratorios

Cupo: 20 personas

Taller 2 "Propagación in vitro de plantas nativas"

Fecha: Noviembre del 2003

Dirigido a: Empresarios, Ejecutivos, Exportadores de Productos Químicos, Laboratorios, Agricultores, Agroindustrias

Cupo: 20 personas

Taller 3 "Utilización de Aleloquímicos en Chile"

Fecha: Octubre del 2004

Dirigido a: Empresarios, Ejecutivos, Exportadores de Productos Químicos, Laboratorios, Agricultores, Agroindustrias

Cupo: 20 personas

Taller 4 "Biofungicidas en la Agricultura Orgánica"

Fecha: Junio del 2005

Dirigido a: Empresarios, Ejecutivos, Exportadores de Productos Químicos, Laboratorios, Agricultores, Agroindustrias

Cupo: 20 personas

Curso. Fraccionamiento y actividad biológica de extractos vegetales

Dirigido a: Estudiantes de postgrado, Profesionales.

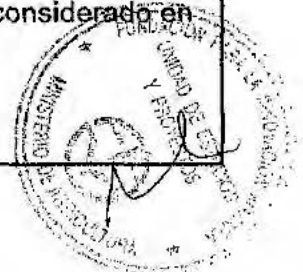
Fecha. Mayo del 2004

Elaboración de un Manual sobre el uso de aleloquímicos en la agricultura

Fecha. Abril-Noviembre del 2005

Gastos generales. En estos gastos se consideró el financiamiento de actividades típicas del laboratorio (mantención de equipos, adquisición de implementos computacionales, etc.). Además, se incluyó el ítem fotocopias y materiales de oficina

Imprevistos. La suma considerada permitirá solventar cualquier aspecto no considerado en los ítems anteriores.





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

El principal beneficio al desarrollar este proyecto será el desarrollo de agroquímicos que permitirán disminuir el uso de pesticidas químicos que provocan una serie de problemas ambientales y de salud.

- En el campo específicos de los pesticidas, nuestros resultados preliminares nos permiten proponer que desarrollaremos compuestos capaces de controlar malezas y hongos fitopatógenos que afectan la producción de uva.
- Existe una gran demanda por la búsqueda de alternativas que permitan el reemplazo del bromuro de metilo.
- El mercado mundial de fungicidas supera los US\$ 5.900 millones, mientras que el mercado de herbicidas supera los US\$ 14.000 millones
- El monto de pesticidas importados durante el año 2000 alcanzó una cifra cercana a los US\$ 50.000.000. Se espera que como resultado de este proyecto este monto debería disminuir en al menos un 20%.
- Si solo dimensionales el impacto que podría tener este proyecto en relación al cultivo de vides, se puede mencionar los siguiente:
- Existen alrededor de 140.000 hectáreas en el país
- En la temporada 2000-2001 se exportaron 69.193.805 cajas, lo que origino un retomo por sobre los US\$ 1.000 millones.
- Las vides son atacadas por hongos *B.cinerea* y *U. necator* que provocan perdidas cercanas al 10%. Este porcentaje podría ser disminuido en alrededor de un 7%, producto del proyecto originado un ahorro anual de US\$ 70 millones.
- El boldo es una especie de alta demanda, cuya explotación se encuentra controlada debido a que es una especie de baja capacidad de germinación, lo que afecta la disponibilidad de plantas para ser utilizadas en programas de reforestación.
- La pintoa es una planta que prácticamente se encuentra desaparecida en la tercera región. Su producción podría permitir la reforestación de la III región.
- La producción de plantas también podrá generar recursos. Se espera producir como resultado del proyecto el siguiente volumen de plantas:
 - Pintoa chilensis: 50.000 plantas (\$1.000): \$50.000.000
 - Peumus boldus: 50.000 plantas (\$1.000) \$50.000.000
- El desarrollo del proyecto generará los siguientes ahorros:
 - Gasto actual por importación de pesticidas: \$3.350.000.000.000
 - Ahorro, por menor importación de pesticidas: \$ 6.700.000.000
 - Ahorro por disminución de perdidas en vides \$4.690.000.000.000



[Handwritten signature]



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						
Subtotal Entradas						
2. SALIDAS						
2.1. Inversiones						
2.2. Gastos de Operación						
2.3. Otros						
Subtotal Salidas						
3. BENEFICIOS NETOS						
TOTALES (1-2)						
VAN (12%)						
TIR						

2



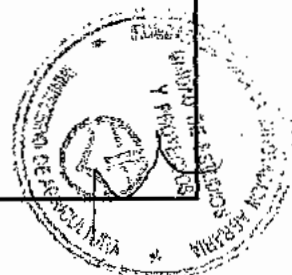


17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. Técnicos

Producto de la experiencia del grupo de investigación y a resultados preliminares obtenidos en diferentes sistemas, los riesgos técnicos asociados a la ejecución de este proyecto son mínimos.

- Los índices de multiplicación obtenidos con especies nativas como el quillay, maiten y peumo entre otras, permiten proponer a esta técnica como una herramienta adecuada en la obtención de principios activos.
- Debido a que se trabajará con plántulas y no con callos o células en suspensión- como ha sido la forma tradicional para obtener compuestos activos- los rendimientos son adecuados debido a el mayor nivel de diferenciación de los tejidos.





17.2. Económicos

En lo que se refiere a la comercialización de los extractos se puede mencionar los siguientes riesgos.

- 17.2.1 Introducción efectiva al mercado. El mercado de agroquímicos es controlado por grandes empresas transnacionales. Se debería buscar la alianza con ellas a fin de lograr la introducción al mercado.
- 17.2.2 Que el precio de venta de extractos y/o plantas sea inferior al considerado en el análisis económico del proyecto.
- 17.2.3 Que exista una baja demanda por los extractos producidos en el proyecto.

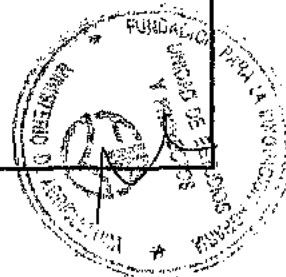


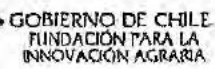


17.3. Gestion

Por tratarse de un grupo que tiene una amplia experiencia en el desarrollo de proyectos (FONDEF, FONDECYT y FONTEC), no debería haber problemas de gestión de proyectos.

17.4. Otros



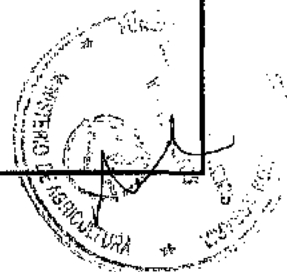




18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Los mecanismos de transferencia de los resultados del proyecto serán los siguientes:

- La realización de al menos 3 talleres de capacitación en el uso de agroquímicos a productores.
- Elaboración de informes y folletos de difusión.
- Elaboración de un libro con la recopilación de antecedentes de aleloquímicos
- La implementación de una planta elaboradora de extractos bioactivos
- La transferencia del Know-how a empresas agroindustriales interesadas en desarrollar las técnicas propuestas (cultivo de tejidos, obtención de extractos vegetales bioactivos)





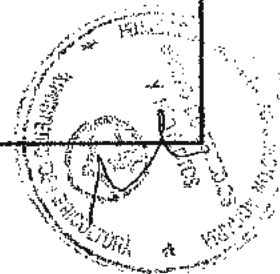
19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

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

La Universidad de Santiago es una institución con amplio desarrollo en la línea de Investigación propuesta. El laboratorio de Fisiología Vegetal es un laboratorio consolidado, a cargo de un investigador con amplia experiencia en el tema y un equipo de trabajo que garantiza la realización del proyecto propuesto. Producto de investigaciones anteriores, relacionadas con la temática propuesta, se encuentra en etapa de presentación una patente relacionada con extractos capaces de controlar el virus en salmónidos (Proyecto FONDEF).

Por otra parte, la Universidad de Santiago a través de la Vice - Rectoría de Investigación y Desarrollo ha otorgado el apoyo a través del aporte para el funcionamiento del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Química y Biología, y sobre todo lo que dice relación con la protección de resultados.





19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

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

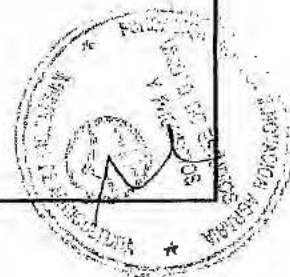
Se dispone de un laboratorio que cuenta con los siguientes instrumentos y facilidades:

1. Cámara de flujo laminar
2. Autoclave
3. Evaporador rotatorio
4. Espectrofotómetro
5. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)
6. Cámaras de crecimiento de plantas (dos de 6 mts²)
7. Refrigeradores (4)
8. Freezer -20 °C
9. Freezer -70 °C
10. Destilador de agua
11. Bidestillador de agua
12. Microondas
13. Agitadores magnéticos
14. Material de vidrio
15. Micropipetas
16. Balanza analítica
17. Balanza granataria
18. Laboratorio de Análisis Biológico y Químico
19. Invernadero equipado
20. Computadores y softwares estadísticos

La Facultad de Química y Biología cuenta además, con diferentes facilidades que serán utilizadas en el desarrollo del proyecto por ejemplo: Planta de nitrógeno líquido, equipo de resonancia magnética nuclear (RMN), Taller de Vidrio, bodega de almacenamiento de productos químicos. Red Internet.

2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

La Universidad de Santiago cuenta con una unidad especializada en el manejo contable de proyectos dependientes de la Vice-Rectoría de Investigación y Desarrollo. Esta unidad se encargará del manejo contable del proyecto la cual ha implementado un software de contabilización de proyectos exclusivo y personal especializado en esta área desde ya cinco años.





20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones
Miguel Jordan	PUC	Profesor	

