



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



CÓDIGO
(uso interno)

FORMULARIO DE POSTULACIÓN

ETAPA 2

CONVOCATORIA NACIONAL 2019

Jóvenes Innovadores

1 FICHA RESUMEN

1.1 Nombre del proyecto

PSA Free: Desarrollo un nuevo método de biocontrol contra el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* usando un antimicrobiano natural

1.2 Resume brevemente el proyecto (1.000 caracteres)

Chile es uno de los principales productores de kiwi a nivel mundial, sin embargo en los últimos años esta industria se ha visto afectada por la enfermedad denominada como cancro bacteriano del kiwi, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* (Psa). A pesar de los métodos de control utilizados, Psa no ha podido ser erradicada, expandiéndose rápidamente por el territorio nacional, lo que ha motivado el desarrollo de nuevas alternativas de control que permitan el crecimiento sustentable de esta industria.

Nuestro grupo de trabajo ha logrado aislar desde plantas de kiwi, una bacteria con propiedades antimicrobianas contra Psa. El objetivo del proyecto es el desarrollo de un nuevo antimicrobiano natural basado en esta bacteria. Para esto se caracterizará el compuesto antimicrobiano y luego se evaluará su efectividad tanto *In vitro* como *In vivo* en plantas de kiwi, lo que permitirá contribuir al desarrollo y sustentabilidad de la industria del kiwi en Chile.

2 PROBLEMA

2.1 ¿Cuál es el problema que quieren abordar? (Máximo 250 caracteres)

La producción de kiwi en Chile se ha visto gravemente afectada por la propagación de la enfermedad conocida como el cancro bacteriano del kiwi, causada por el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

2.2 ¿Por qué se genera este problema? Describa y cuantifique las causas que lo generan. (Máximo 1.000 caracteres)

Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae es la bacteria causante del **cancro bacteriano del kiwi**, esta enfermedad afecta a las variedades de kiwi verde y en mayor medida al kiwi amarillo. Psa entra por las aberturas naturales de la planta, así como también lesiones en tallos y hojas. Los síntomas más característicos son manchas necróticas en las hojas en ramas y troncos. Posteriormente, se produce la marchitez de la planta y caída de los frutos, lo que finalmente termina en la muerte de la planta.

Factores como la agresividad de la bacteria, factores climáticos y la ineficacia de las técnicas actuales de control favorecen el desarrollo de la enfermedad del cancro bacteriano y la diseminación de la bacteria. Esta bacteria ha ido aumentando su distribución geográfica anualmente y actualmente ha alcanzado una prevalencia acumulada en Chile del 30% según datos del SAG.

2.3 ¿Cuáles son las consecuencias que genera este problema? Describa y cuantifique sus **efectos** en la industria/mercado/sector productivo según corresponda. (Máximo 1.000 caracteres)

A pesar de las estrategias de control implementadas, Psa no ha podido ser eliminada. Desde su identificación se ha expandido rápidamente entre las regiones de O'Higgins, Maule, Bío-Bío, Valparaíso y la Región Metropolitana, las que acumulan más del 99% de las plantaciones de kiwi en el País. Desde su detección hasta la fecha existe un total de 345 huertos infectados, correspondiente a 3194,5 hectáreas.

En Chile se estima que las pérdidas van de un 7 a 25% de menor producción, debido a que se han tenido que eliminar huertos completos, especialmente cultivos de *Actinidia chinensis*, variedad más susceptible a esta bacteria.

Además, existe un aumento en los costos de producción de kiwi en casi US\$ 1800 por hectárea por temporada, lo que se traduce en un aumento en costos de casi US\$ 15 millones de dólares anuales a nivel nacional.

2.4 ¿Quiénes se ven afectados directamente por este problema? Describa y cuantifique al cliente/usuario según corresponda. (Máximo 500 caracteres)

Los principales afectados son productores de kiwi. En Chile, los huertos de este fruto abarcan desde la región de Valparaíso a la región de los Ríos sumando 8.720 hectáreas plantadas con este fruto. Siendo la región del Maule la que posee el 50% de la superficie total de plantaciones de kiwi y la zona más afectada por esta pandemia. El 80% de los productores de kiwi pertenecen al Comité del kiwi, entidad con la que este equipo mantiene una estrecha relación a través de otros proyectos.

2.5 ¿Cómo se ven afectados los clientes/usuarios por este problema? Cuantifique. (Máximo 500 caracteres)

Esta bacteria está bajo el control oficial del SAG y se considera una plaga cuarentenaria, por lo que existen una serie de medidas que aumentan los costos de producción del kiwi entre 500 y 1800 dólares anuales por hectárea según datos del comité del kiwi. Una de las medidas es el uso de antimicrobianos como cobre, los que pueden ocasionar fitotoxicidad, contaminación de los suelos y resistencia bacteriana. Por otro lado, no es posible usar estos compuestos en etapa de floración.

3 SOLUCIÓN INNOVADORA

3.1 ¿Cuál es la solución que proponen para resolver el problema identificado?
(Máximo 250 caracteres)

Desarrollar un antimicrobiano natural basado en un biocompuesto producido por la bacteria *Alcaligenes spp* que sea eficiente para combatir a la bacteria *Pseudomonas syringae pv actinidiae*.

3.2 ¿A qué **causas** del problema responde la solución? Responder de acuerdo a lo indicado en el punto 2.2. (Máximo 500 caracteres)

La solución propuesta responde a combatir directamente a la bacteria *Pseudomonas syringae pv actinidiae* la cual es causante de la enfermedad del cancro bacteriano del kiwi. Se estima que el compuesto antimicrobiano natural disminuirá la carga de Psa en los huertos de kiwi disminuyendo su incidencia y previniendo el desarrollo de la enfermedad.

3.3 ¿Quiénes son los clientes y/o usuarios potenciales de la solución? Describa y cuantifique. (Máximo 500 caracteres)

Los principales beneficiarios son productores de kiwi. Por otro lado, el cultivo de este fruto se desarrolla el 80% de los productores de kiwi se encuentra asociado al Comité del kiwi, entidad con la que colaboramos activamente. Por otro lado, el cultivo de este fruto se desarrolla desde la región de Valparaíso a la región de los Ríos. Siendo la región del Maule la que posee el 50% de la superficie total de plantaciones de kiwi y es al mismo tiempo la zona más afectada por esta pandemia.

3.4 ¿De qué manera la solución resuelve el problema y cuáles son los beneficios generados para los clientes y/o usuarios? (Máximo 1.000 caracteres)

La solución apunta a combatir a la *Pseudomonas syringae pv actinidiae*, causante de la enfermedad del cancro bacteriano, logrando así que se reduzcan las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad, además de controlar al patógeno de manera eficiente y específica sin causar daño a la planta.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los compuestos basados en cobre no se pueden utilizar durante etapa de floración, lo que abre una ventana para las infecciones producidas por Psa. Nuestro antimicrobiano natural si podría utilizarse en ese periodo ayudando a combatir las infecciones. Otro aspecto a considerar a largo plazo, es que muchos productores han cambiado a producir otros frutos debido a los problemas que causa Psa. Esto implica una desvalorización del suelo y una reducción en las ganancias de los productores. Solucionar el problema de la Psa ayudaría a reactivar esta industria.

3.5 ¿Qué soluciones actualmente resuelven o intentan resolver el problema identificado?¹(Máximo 1.000 caracteres)

A nivel nacional existen otros proyectos relacionados con el desarrollo de otras alternativas de control contra Psa, sin embargo no se relacionan directamente con este proyecto. Actualmente se encuentran en desarrollo los proyectos FONDEF: **Nuevo biopesticida basado en bacterias inductoras de resistencia para el control de la bacteriosis del kiwi psa**, basado en bacterias del género *Pseudomonas* productoras de 2,4 diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG) y/o con actividad quitinolítica Y **Kiwiphage: Desarrollo de un antimicrobiano natural contra el cancro bacteriano del kiwi utilizando bacteriófagos**.

Actualmente el SAG mantiene una lista de compuestos autorizados para el control de Psa. Esta lista incluye 26 compuestos basados en cobre, 2 antibióticos, 2 biocontroladores y 1 elicitor de defensa de la planta. La evidencia muestra que el uso de estos compuestos no ha sido suficiente para controlar la enfermedad.

3.6 Según lo indicado anteriormente, ¿En qué se diferencia la solución propuesta con las otras soluciones que actualmente resuelven o intentan resolver el problema identificado?² Describa y cuantifique. (Máximo 1.000 caracteres)

Las soluciones anteriormente mencionadas apuntan a resolver la problemática mediante el uso de bacteriofagos que infectan a la PSA y el uso de bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales son antagonistas del patógeno, en cambio, nuestra solución apunta usar un compuesto antimicrobiano producido por la bacteria *Alcaligenes spp*, el cual se libera cuando esta bacteria crece.

La principal diferencia entre las soluciones anteriores y nuestra solución radica en el agente antimicrobiano, los casos anteriores plantean usar bacteriofagos los cuales deben ser aplicados sobre las plantas para que sean capaces de infectar al patógeno y eliminarlo. Por otra parte, el uso de bacterias antagonistas, involucra la liberación de bacterias sobre las plantas, en donde competirán con el patógeno. En cambio nuestra solución involucra el uso de un biocompuesto natural producido por una bacteria durante su crecimiento y su uso no requiere que se liberen entes biológicos o bacterias al medio ambiente.

¹Indique los últimos avances a nivel regional, nacional e internacional que resuelven o están intentando solucionar el problema. Considerar las últimas investigaciones, patentes, desarrollo de productos, servicios, entre otros. Buscar en base nacional de proyectos www.fia.cl.

² Indique el atributo diferenciador de la solución propuesta respecto a la oferta actual del mercado u otras soluciones que apuntan a resolver ese problema.

3.7 De acuerdo a lo anterior, indique el tipo de innovación³ que se pretende desarrollar:

Tipo innovación	Descripción	Marque con una X
Innovación Producto	Una innovación de producto es la introducción en el mercado de un bien o un servicio nuevo o significativamente mejorado, en cuanto a sus características o al uso al que se destina.	x
Innovación Procesos	Una innovación de proceso es la implementación de un nuevo o significativamente mejorado proceso de producción, método de distribución o actividad de soporte para los bienes o servicios.	
Innovación Marketing	Implementación de un nuevo concepto de marketing, estrategia o modelo de negocios que difiera significativamente del método de marketing existente en la empresa y el cual no ha sido utilizado antes. Implique cambios significativos del diseño o envasado de un producto, promoción o precios.	
Innovación Organizacional	Introducción de una nueva metodología en las prácticas de la empresa y/u organización (incluyendo administración del conocimiento), la organización del lugar de trabajo o las relaciones externas que no han sido usadas en la empresa anteriormente.	

³Definición según Manual de Oslo, 3ª edición año 2005.

4 VÍNCULO CON SECTOR AGRARIO

4.1 ¿Cómo el proyecto se vincula con el sector agrario, agroalimentario y forestal nacional? (Máximo 1.000 caracteres)

La solución planteada se vincula directamente con la industria chilena del kiwi ofreciendo una solución para controlar a Psa, la cual causa grandes pérdidas económicas. En Chile, Psa está declarada como un fitopatógeno en cuarentena. El SAG, que actúa como ente regulador, sugiere el uso de antimicrobianos contra Psa.

Los productores de kiwi están obligados a probar distintas alternativas para controlar esta bacteria. Sin embargo, la evidencia indica que ninguna de las soluciones existentes ha sido suficiente para solucionar este problema. Por lo que, el desarrollo de un nuevo biocontrolador contra Psa, ofrece una nueva alternativa para combatir el cancro bacteriano del kiwi. El desarrollo de este proyecto permitirá a los productores de kiwi acceder a este nuevo producto para aplicar en sus campos, lo cual beneficiaría a la industria del kiwi.

Nuestro equipo mantiene colaboraciones con el SAG, el Comité del kiwi y productores de kiwi como la Sociedad Agrícola Graneros Ltda.

4.2 ¿Cómo se beneficiará el sector agrario, agroalimentario y forestal nacional con el desarrollo del proyecto? Describa y cuantifique claramente quiénes y cómo se verán beneficiados. (Máximo 1.000 caracteres)

El principal beneficio de la solución planteada, es el biocontrol de Psa, disminuyendo significativamente su propagación por el territorio nacional y el posterior desarrollo de la enfermedad, disminuyendo así, las grandes pérdidas económicas que ha tenido el sector agroalimentario.

Los principales beneficiarios de este proyecto, serán los productores de kiwi afectados por el cancro bacteriano del kiwi, que según datos del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) corresponden a 72 productores con campos positivos para Psa, distribuidos en las regiones del Maule, Bio Bio, O'Higgins y Metropolitana.

Los principales beneficios para los productores de kiwi serán el control de la plaga en sus huertos, disminución de las pérdidas económicas por la eliminación de plantaciones de kiwi infectadas con Psa, disminución en los costos de producción y la distribución de sus productos libres del patógeno y compuestos químicos derivados del cobre.

5 NIVEL DE DESARROLLO

5.1 Indique en qué etapa de desarrollo⁴ se encuentra el proyecto;

Nivel	Detalle	Marque con una X
Idea	Concepto no probado, no se han realizado pruebas	
Investigación básica	Principios postulados y observados, pero no hay pruebas experimentales disponibles	
Formulación de la tecnología	Se han formulado conceptos e hipótesis	
Investigación aplicada	Han completado las primeras pruebas en laboratorio, prueba de concepto realizada	x
Prototipo I	Prototipo a pequeña escala realizado en laboratorio ("prototipo rudimentario")	
Prototipo II	Prototipo a gran escala probado en terreno	
Prototipo III	Sistema de prototipo testeado en terreno con desempeño cercano al esperado	
Prototipo IV	Sistema demostrativo pre-comercial funcionando en ambiente operativo (sistema robusto).	
Validación comercial	Primera versión comercial. Problemas de manufactura y diseño resueltos.	
Disponible en mercado	Aplicación comercial completa. Tecnología disponible para los consumidores.	

5.2 ¿Cuál es el grado de avance y los resultados que han obtenido hasta el momento?
(Máximo 1000 caracteres)

Este proyecto se encuentra en un nivel de desarrollo TLR 4. Se han realizado pruebas de laboratorio, detectando la presencia de compuestos antimicrobianos en el sobrenadante de un cultivo de la *Alcaligenes* (Anexo 5).
Mediante curvas de crecimiento, se logró determinar que estos compuestos se producen durante la fase exponencial. Posteriormente, se realizó la CMI (concentración mínima inhibitoria) para evaluar la capacidad inhibitoria del compuesto contra PSA. Los resultados mostraron que a un 25% v/v del extracto, tiene una alta actividad antimicrobiana, mostrando efectividad contra Psa de aproximadamente un 40%. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana contra otro patógeno (*Xantomonas spp.*) mostrando un efecto similar.
Si bien, estos compuestos no han sido caracterizados aún, los resultados muestran que tienen un alto potencial como biocontrol contra Psa. Por otro lado, por ser compuestos naturales, consideramos que esta herramienta podría usarse en cultivos orgánicos, contribuyendo a la sustentabilidad de la industria del kiwi.

⁴ Nivel de desarrollo basado en Technology Readiness Level.

5.3 Indique los fondos del Estado que han recibido, y las actuales postulaciones.

¿Han recibido fondos del Estado?	Sí	No	<input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo indicar;			
Nombre fondo			
Año adjudicación			
Monto adjudicado			
¿Está vinculado con esta postulación?	Sí	No	
En caso afirmativo, indique cómo se vinculan			

¿Actualmente, están postulando a fondos del Estado?	Sí	No	<input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo indicar;			
Nombre fondo			
Año entrega resultados			
Monto solicitado			
¿Está vinculado con esta postulación?	Sí	No	
En caso afirmativo, indique cómo se vinculan			

5.4 Formalización empresa

¿Su emprendimiento es una empresa constituida legalmente?	Sí	No	<input checked="" type="checkbox"/>
¿Cuánto tiempo lleva constituido legalmente?	Entre 0 - 1 años		
	Entre 1 - 2 años		
	Entre 2 o más años		

6 EQUIPO

6.1 Representante del equipo

Indique los datos del representante del equipo, quien será la contraparte técnica y financiera de FIA.

Nombre completo	Manuel Alejandro Arce Arellano	
RUT		
Fecha de nacimiento (dd/mm/aa) ⁵		
Nacionalidad ⁶	chilena	
E-mail		
Teléfono de contacto		
Dirección de contacto para envío de documentación	Calle y número	
	Comuna	Valparaíso
	Ciudad	Valparaíso
	Región	Valparaíso
Género	Femenino	
	Masculino	x

Estudios pregrado	Tipo de institución educacional	Técnico nivel medio	
		Centro de Formación Técnico	
		Instituto Profesional	
		Universidad	x
	Nombre institución	Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	
	Carrera	Bioquímica	
¿Terminó sus estudios?	Sí	x	
	No		
Estudios postgrado	Grado académico	Magister	
		Doctorado	
	Nombre institución		
	Carrera		
	¿Terminó sus estudios?	Sí	
No			

⁵ Debe adjuntar la fotocopia de la Cédula de Identidad (C.I.) en Anexo 1.

⁶ En caso que sea extranjero adjuntar la Cédula de Identidad para Extranjeros (C.I.)

Describe brevemente tus capacidades y experiencia relacionada con la propuesta (500 caracteres).

Durante mis estudios de pregrado tuve la oportunidad de hacer mi tesis en el área de microbiología, específicamente en un tema relacionado con competencia bacteriana y producción de antimicrobianos, por lo que conozco las técnicas de aislamiento y caracterización de compuestos antimicrobianos.

6.2 Integrante 1 del equipo

Indique los integrantes del equipo, quienes participarán directamente en el desarrollo del proyecto.

Nombre completo	Camila Andrea Prince Casarotto
RUT	
Edad	32 años
Nacionalidad	Chilena
E-mail	
Teléfono de contacto	
Estudios/profesión	Bioquímico
Describe brevemente tus capacidades y experiencia relacionada con la propuesta (500 caracteres).	
Poseo experiencia en el área de microbiología y manejo con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> . Mi tesis de pregrado se basó en la caracterización de aislados chilenos de PSA. Además, trabajé en la realización de un sistema de modificación genética en este patógeno. Actualmente, me encuentro realizando un Magíster en Ciencias microbiológicas.	

6.3 Integrante 2 del equipo

Indique los integrantes del equipo, quienes participarán directamente en el desarrollo del proyecto.

Nombre completo	Roberto Andrés Bastías Romo
RUT	
Edad	39 años
Nacionalidad	Chilena
E-mail	
Teléfono de contacto	
Estudios/profesión	Ingeniero en Biotecnología Molecular y Dr. en Microbiología
Describe brevemente tus capacidades y experiencia relacionada con la propuesta (500 caracteres).	
Actualmente me desempeño como académico en el Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Mi línea de investigación se relaciona con el estudio de interacciones microbianas. En este contexto he participado y liderado diversos proyectos de I+D asociados al control de bacterias patógenas. Durante los últimos años mi grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> evaluando distintas alternativas de biocontrol.	



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



6.4 ¿Qué han hecho juntos como equipo y por qué son capaces de llevar a cabo esta propuesta?

Tanto Manuel Arce como Camila Prince fueron tesisistas del Dr. Bastías mientras cursaban su carrera de Bioquímica en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Durante estos periodos ambos trabajaron en diversos proyectos microbiológicos, incluyendo un proyecto FONDEF asociado al desarrollo de nuevos antimicrobianos contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Una de las líneas de investigación iniciadas en ese proyecto es la que da origen a la presente propuesta, y ofrece la oportunidad de que tanto Manuel como Camila continúen innovando en este tema. El trabajo conjunto realizado por este equipo entre otras cosas ha permitido que Camila haya participado en un artículo ISI, y ambos, Manuel y Camila hayan participado en congresos de Microbiología.

Actualmente Manuel y Camila cursan estudios de postgrado con el objetivo de continuar su formación y tener más herramientas para poder desarrollar nuevos proyectos de innovación en el área de la microbiología y agronomía.

6.5 Asociados

Indique los asociados de la propuesta los cuales contribuirán o se verán directamente beneficiados con el desarrollo del proyecto.

DATOS ASOCIADO 1				
Nombre completo / Razón social		Pontificia Universidad Católica de Valparaíso		
Actividad / Giro		Universidad		
RUT				
E-mail				
Teléfono de contacto				
Dirección de contacto para envío de documentación (Calle y número, Comuna, Ciudad, Región)				
¿Actualmente es parte del equipo técnico de alguna iniciativa en ejecución con apoyo de FIA?		SI	x	
		NO		
Si la respuesta al punto anterior es SI, por favor indique el código FIA de la iniciativa.				
REPRESENTANTE LEGAL DEL ASOCIADO 1				
Si el asociado corresponde a una persona jurídica, complete el siguiente cuadro.				
Nombre completo		Claudio Elórtgui Raffo		
Cargo que ocupa el representante legal en la entidad		Rector		
RUT				
Nacionalidad		chileno		
Género	Femenino		Masculino	x
Etnia	SI (Indique cual)		NO	x
Dirección de contacto				
Teléfono de contacto				
E-mail				
Profesión		Ingeniero comercial		
Indicar brevemente cuál es su vinculación con la propuesta. (Máximo 1.000 caracteres)				
Los resultados preliminares se obtuvieron en el laboratorio de microbiología, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.				

DATOS ASOCIADO 2				
Nombre completo / Razón social		Camila Andrea Prince Casarotto		
Actividad / Giro		Bioquímico		
RUT				
E-mail				
Teléfono de contacto				
Dirección de contacto para envío de documentación (Calle y número, Comuna, Ciudad, Región)				
¿Actualmente es parte del equipo técnico de alguna iniciativa en ejecución con apoyo de FIA?		SI		
		NO	x	
Si la respuesta al punto anterior es SI, por favor indique el código FIA de la iniciativa.				
REPRESENTANTE LEGAL DEL ASOCIADO 1				
Si el asociado corresponde a una persona jurídica, complete el siguiente cuadro.				
Nombre completo				
Cargo que ocupa el representante legal en la entidad				
RUT				
Nacionalidad				
Género	Femenino		Masculino	
Etnia	SI (Indique cual)		NO	
Dirección de contacto				
Teléfono de contacto				
E-mail				
Profesión				
Indicar brevemente cuál es su vinculación con la propuesta. (Máximo 1.000 caracteres)				
Poseo experiencia en el área de microbiología y manejo con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> . Mi tesis de pregrado se basó en la caracterización de aislados chilenos de PSA. Además, trabajé en la realización de un sistema de modificación genética en este patógeno. Actualmente, me encuentro realizando un Magíster en Ciencias microbiológicas.				

6.6 Servicios de terceros

En el caso que corresponda, indique en el siguiente cuadro las actividades que serán realizadas por terceros, las cuales no pueden ser realizadas por integrantes del equipo.

N°	Enumere las actividades y servicios que serán externalizados para la ejecución del proyecto
1	Separación del compuesto antimicrobiano por HPLC
2	Caracterización química del compuesto antimicrobiano por LC/MS
3	Secuenciación del genoma de <i>Alcaligenes spp</i>
4	Fitopatólogo para supervisar la mantención de plantas de kiwi en invernadero y asesorías para pruebas de campo
5	Tesista de agronomía para ayuda en pruebas de campo

7 PLAN DE TRABAJO

7.1 Objetivos, resultados esperados y metodología

Defina un objetivo general y a partir de éste desglose entre 3 a 5 objetivos específicos. Por cada objetivo específico, determine qué resultados se esperan obtener para verificar su cumplimiento y describa cómo se logrará alcanzar cada objetivo específico (método).

Objetivo general ⁷	
Desarrollar un nuevo biocontrolador natural contra el fitopatógeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> .	
Objetivo específico N°1 ⁸	
Caracterizar el compuesto antimicrobiano aislado de un cultivo bacteriano de <i>Alcaligenes spp.</i>	
Resultados Esperados ⁹ que se esperan conseguir para validar el cumplimiento del objetivo específico N°1	Fecha de alcance (mes de ejecución)
Compuesto antimicrobiano aislado y caracterizada su naturaleza química.	Agosto 2020
Describa el método ¹⁰ para cumplir el objetivo específico N°1: (Máximo 2.000 caracteres)	
<p>En primer lugar se realizará una purificación parcial del compuesto antimicrobiano. Para ello se harán crecer los aislados en medio mínimo M9 y se realizará una extracción líquido-líquido del antimicrobiano, desde el sobrenadante libre de células utilizando acetato de etilo en una relación 1:1 (sobrenadante: disolvente) y se mezclarán por agitación durante 30 minutos. La mezcla será transferida a un embudo de separación y se dejará reposar hasta observar la separación de las fases, tomando la fase orgánica. Posteriormente, el extracto obtenido será secado y resuspendido en metanol para probar su actividad antimicrobiana contra Psa, utilizando el método de difusión en agar, usando metanol como control negativo.</p> <p>El extracto antimicrobiano, será analizado por HPLC, utilizando una columna de fase inversa. Se realizará una corrida de aproximadamente 30 minutos, y se recogerán las fracciones eluidas cada un minuto, a las cuales se evaluará su capacidad antimicrobiana como se describe anteriormente. Los eluidos que presenten una mayor capacidad antimicrobiana contra el patógeno, serán seleccionados para ser analizados por LC-MS y así conocer su naturaleza química.</p>	

⁷ El objetivo general debe dar respuesta a lo que se quiere lograr con la propuesta. Se expresa con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

⁸ Los objetivos específicos constituyen los distintos aspectos que se deben abordar conjuntamente para alcanzar el objetivo general de la propuesta. Cada objetivo específico debe conducir a un resultado cuantificable y verificable. Se expresan con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

⁹ Considerar que el conjunto de resultados esperados debe dar cuenta del logro del objetivo general de la propuesta. Un objetivo específico puede requerir del logro de uno o más resultados esperados para asegurar y verificar su cumplimiento.

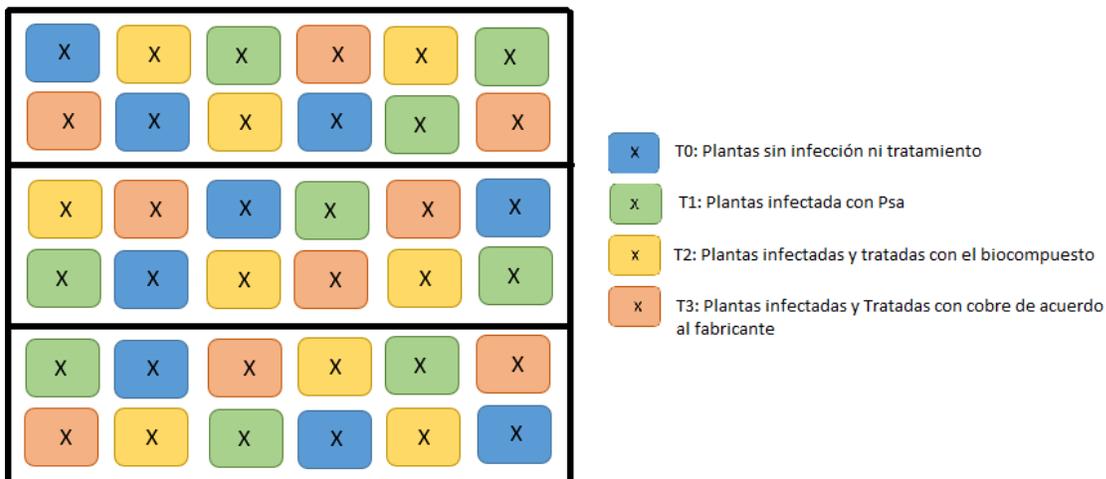
¹⁰ Indique y describa detalladamente cómo logrará el cumplimiento de este objetivo específico. Considerar todos los procedimientos y actividades que se van a utilizar, como tipo de análisis, equipamiento, productos, ensayos, técnicas, tecnologías, manejo productivo, entre otros.

Tanto la separación por HPLC y caracterización por LC-MS serán realizadas por el Nucleo de Biotecnología de Curauma (NBC).

Objetivo específico N°2	
Demostrar la efectividad del Biocompuesto in vitro y en condiciones de invernadero	
Resultados Esperados que se esperan conseguir para validar el cumplimiento del objetivo específico N°2	Fecha de alcance (mes de ejecución)
Reducción de un 60% de la carga bacteriana de PSA in vitro	Noviembre 2020
Reducción de un 50% de la carga bacteriana de PSA en invernadero	Agosto 2021
Reducción de un 30% de la carga bacteriana en campo.	Noviembre 2021
Describa el método para cumplir el objetivo específico N°2: (Máximo 2.000 caracteres)	
<p>En primer lugar se realizará un ensayo de efectividad del biocompuesto in vitro como se detalla a continuación:</p> <p>Crecimiento bacteria: La bacteria será sembrada en placas de medio LB e incubadas a 25°C por 24 h. Las colonias serán resuspendidas en una solución salina 0,85 % NaCl, ajustándose a una OD=0,1, asegurando una concentración final de 1×10^6 UFC/ml.</p> <p>Ensayo en placas Petri: Para el evaluar la efectividad del Biocompuesto frente al patógeno, se hará crecer la bacteria productora en medio LB durante 24 h a 25°C. Cumplido el tiempo, se procederá a centrifugar el cultivo a 5000 RPM durante 10 mins, con el objetivo de obtener el sobrenadante libre de células bacterianas. Posteriormente se sembrará la bacteria <i>Pseudomonas syringae pv actinidiae</i> mediante la técnica de doble agar. Una vez sembrada la bacteria se agregan gotas de 10 ul del sobrenadante del cultivo de la bacteria productora y se incubará a 25°C durante 18 hrs.</p> <p>Ensayo en placas 96 pocillos: Para evaluar el efecto antagónico que tiene el Biocompuesto sobre el crecimiento de <i>Pseudomonas syringae pv actinidiae</i>, se realizaran curvas de crecimiento del patógeno en presencia y ausencia del biocompuesto. Para esto se hará crecer tanto la bacteria productora como la bacteria patógena en medio LB durante 18 hrs a 25°C. Para obtener el sobrenadante del cultivo se tomará el cultivo de la bacteria productora y se procederá a centrifugar el cultivo a 5000 RPM durante 5 mins. Para realizar las curvas de crecimiento de la bacteria patógena se tomará una alícuota 100 ul del cultivo previamente crecido y se llevará a un tubo con 10 ml de medio LB fresco y se dejará en agitación hasta que el cultivo alcance una OD = 0,1. A partir de este nuevo cultivo se tomará una alícuota de 50 ul y se llevarán a 100 ul de medio LB. Para el evaluar el biocompuesto se tomarán 50 ul de bacteria junto con 50 ul de Biocompuesto y 50 ul de medio LB. Posteriormente las placas se llevarán a un lector de placa, dejándose en agitación a 25°C durante 24 hrs y se medirá la absorbancia del cultivo a 600 nm cada 1hr.</p>	

Ensayo en discos de hojas: Para este ensayo se utilizarán 54 discos de hojas de plantas de kiwi de 2 cm de diámetro aproximadamente, las que serán distribuidas en 3 grupos de 18 discos y colocadas en 10 ml de agua estéril con cicloheximida (100 μg / ml) en 3 multiplacas de 6 pocillos (1 disco por pocillo). En el primer grupo, los discos se inocularán con tres gotas (30 μL cada una) de una suspensión bacteriana de Psa a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Al segundo grupo de discos se le añadirá las mismas gotas de la suspensión bacteriana de Psa a la misma concentración e inmediatamente 3 gotas de 30 μL del biocompuesto directamente sobre la gota de Psa, a una concentración por estimar. El índice de enfermedad (0-5) se asignará a los síntomas observados en los discos mantenidos a 20 ° C en la oscuridad durante 12 días, siendo: 0 = hojas sanas; 1 = pequeñas ollas o rayas necróticas (1–4% de área infectada); 2 = macetas necróticas o venas más grandes (5–10%); 3 = manchas o áreas necróticas convergentes (11-30%); 4 = áreas necróticas convergentes ($\geq 50\%$); 5 = hojas completamente necróticas. Los análisis estadísticos se realizarán mediante análisis de varianza (análisis de varianza unidireccional) utilizando la prueba de Duncan $P \leq 0.05$.

El ensayo en invernadero, considera la infección de las plantas con la bacteria patógena, mediante la aspersión de esta y luego la aspersión del biocompuesto. Los ensayos se realizarán en un invernadero ubicado en el Campus Curauma de la PUCV autorizado por el SAG (RES N°. No: 5435/2019). Para ello se utilizarán 4 tratamientos (T0, T1, T2, T3) con tres plantas cada uno Y tres réplicas por tratamiento, dando un total de 36 plantas, distribuidas al azar como se observa en el siguiente esquema:



El ensayo considera los siguientes tratamientos:

T0: Plantas sin infección ni tratamiento.

T1: Plantas infectada con Psa.

T2: Plantas infectadas y Tratadas con el biocompuesto.

T3: Plantas infectadas y Tratadas con cobre de acuerdo al fabricante.

Para el ensayo se usará la cepa de Psa 743, que corresponde a un aislado chileno de Psa.

Crecimiento bacteria: La bacteria será sembrada en placas de medio LB e incubadas a 25°C por 48 h. Las colonias serán resuspendidas en una solución salina 0,85 % NaCl, ajustándose a una OD=0,1, asegurando una concentración final de 1×10^6 UFC/ml.

Las plantas serán infectadas por la aspersion de la bacteria sobre la superficie de la hoja. Para esto se utilizarán 10 mL de solución bacteriana y se utilizarán cubiertas plásticas para cada planta con el objetivo de aumentar la humedad y favorecer el ingreso de la bacteria.

Ensayo en plantas: Los síntomas se determinarán a los 15 y 30 días después de la infección. Para cuantificar los síntomas se utilizará el índice de daño la enfermedad (ID), que corresponderá al porcentaje del área de hoja afectada por las manchas necróticas causadas por el patógeno de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ID = \sum (NIR/NT) \times LR$$

NIR = Número de hojas en cada categoría de severidad LR = Valor de la severidad (0 a 5)

NT = Número total de hojas

La severidad en el daño (0-5) de las hojas será evaluada usando una escala:

0 = Hoja sana

1 = <1% del área de la hoja afectada

2 = 1–2% del área de la hoja afectada, presencia de manchas únicas, pocas manchas fusionadas

3 = 3–4% del área de la hoja afectada, manchas que comienzan a fusionarse

4 = 5–9% del área de la hoja afectada, manchas fusionadas cubriendo las venas e incrementando su tamaño

5 = >10% del área de la hoja afectada

Los análisis estadísticos se realizarán mediante análisis de varianza (análisis de varianza unidireccional) utilizando la prueba de Duncan $P \leq 0.05$.

Luego de las pruebas en invernadero, se escogerá la mejor formulación para repetir el mismo ensayo en condiciones de campo en la época de floración, utilizando el protocolo que se describe anteriormente.

Objetivo específico N°3	
Formulación para el biocompuesto natural contra Psa	
Resultados Esperados que se esperan conseguir para validar el cumplimiento del objetivo específico N°3	Fecha de alcance (mes de ejecución)
Obtención de una formulación que permita un alto desempeño del biocompuesto frente al patógeno <i>Pseudomonas syringae pv actinidiae</i> .	Noviembre 2021
Describa el método para cumplir el objetivo específico N°3: (Máximo 2.000 caracteres)	
<p>Formulación de biocompuesto:</p> <p>Este ensayo involucra el uso de adyuvantes que en combinación con el biocompuesto mejorarán su rendimiento, para lo cual se utilizará Heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno (Silwet L-77).</p> <p>Para ello se hará crecer la bacteria productora en medio LB a 25°C durante 24 hrs. Posteriormente se tomará el cultivo y se centrifugará a 5000 RPM durante 10 mins, obteniéndose el sobrenadante. Luego se tomará el sobrenadante y se harán soluciones con 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 1,0 % de Silwet L-77. Finalmente se evaluará el efecto bactericida de la formulación en condiciones in vitro y en invernadero, como se ha descrito anteriormente.</p> <p>Estabilidad Fisicoquímica: Para comprobar que la formulación del biocompuesto es estable se realizarán desafíos de pH, Temperatura y Exposición a radiación UV.</p> <p>Para evaluar la efectividad frente a diferentes pH se tomarán alícuotas del biocompuesto y se les agregarán soluciones de NaOH y HCl para evaluar la estabilidad en un rango de pH desde 4 hasta 10, realizándose 3 tres réplicas por cada condición. Posteriormente se evaluará la efectividad del compuesto frente al patógeno, mediante un ensayo de inhibición en placa, realizándose 3 réplicas biológicas.</p> <p>Para evaluar la efectividad del biocompuesto frente a diferentes temperaturas se tomarán alícuotas del biocompuesto y se someterán a diferentes temperaturas para evaluar la estabilidad en un rango desde 16°C, 25°C y 37°C, realizando tres réplicas por cada condición. Posteriormente se evaluará la efectividad del compuesto frente al patógeno, mediante un ensayo de inhibición en placa, realizándose 3 réplicas biológicas.</p> <p>Se evaluará la efectividad del biocompuesto luego de ser sometido a un alto índice de radiación UV, por diferentes tiempos, en un rango de 30 min, 60 min y 120 min por triplicado. La efectividad del compuesto se verificará como se describió anteriormente.</p> <p>Optimización de la producción del biocompuesto por <i>Alcaligenes</i> spp.</p> <p>Para obtener mayores concentraciones celulares de la bacteria <i>Alcaligenes</i> spp. y por ende mayores concentraciones del biocompuesto se optimizará el medio de cultivo, cambiando la composición de la fuente de carbono. Para ello se utilizará el medio definido Medio mínimo M9, y se evaluarán las diferentes fuentes de carbono tales como, glucosa, galactosa, manosa, sacarosa, fructosa y sorbitol, cada uno al 20% v/v. Posteriormente se elegirá la fuente de carbono que produzca mayor concentraciones celulares.</p>	

Objetivo específico N°4	
Gestión de propiedad intelectual del Biocompuesto	
Resultados Esperados que se esperan conseguir para validar el cumplimiento del objetivo específico N°4	Fecha de alcance (mes de ejecución)
Desarrollo del estudio de patentamiento del biocompuesto e ingreso de la solicitud de patentamiento ante INAPI	Noviembre 2021
Describa el método para cumplir el objetivo específico N°4: (Máximo 2.000 caracteres)	
<p>1. INVESTIGACIÓN Los académicos, investigadores y alumnos ejecutan sus líneas de investigación, donde son apoyados por la Universidad para acceder a financiamiento y recursos que le permitan ir desarrollando investigación básica y aplicada.</p> <p>2. DISCLOSURE O DECLARACIÓN DE INVENCION Cuando se obtienen resultados concluyentes, los investigadores formalizan y documentan esta información a través de un formulario de declaración de invención y lo hacen llegar a la OTL PUCV, para su posterior evaluación.</p> <p>3. PROPIEDAD INTELECTUAL (PROTECCIÓN) La OTL PUCV, con la información recibida, idealmente a través de la declaración de invención (disclosure), realiza un estudio del estado de la técnica (o estado del arte previo) y evalúa la posibilidad de protección a través de patentes, registros de marca, derechos de autor, secreto industrial, entre otros y según corresponda a la invención o tecnología que se analice.</p> <p>4. VALORIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA Todo resultado de investigación que se obtenga puede ser transferido y por lo mismo la OTL PUCV, sea o no protegible, se encarga de la valorización de las tecnologías que conforman el portafolio de la Universidad, procurando igualmente proteger el conocimiento a través de otros medios como la vía contractual.</p> <p>5. GESTIÓN DE LA TRANSFERENCIA</p> <p>5.1) Alianzas: La OTL PUCV, en conjunto con el investigador, busca la mejor forma de llevar los resultados de investigación al mercado, generando redes con empresas, emprendedores e inversionistas.</p> <p>5.2) Negociación: Cuando ya se tiene un interesado en los resultados de la investigación, se discuten los términos y condiciones en que se realizará la transferencia por parte de la Universidad.</p> <p>5.3) Transferencia efectiva: Si bien existen variados mecanismos de transferencia, los más recurrentes son los contratos de licencia o la creación de empresas de base científico/tecnológica o Spin Off. En esta etapa se celebrarán los convenios o acuerdos correspondientes, en los términos definidos en la negociación.</p> <p>6. VIGILANCIA TECNOLÓGICA Y SEGUIMIENTO En esta etapa se vela por el cumplimiento de los acuerdos convenidos, es decir, que no se atente contra la protección de la Propiedad Intelectual de los resultados transferidos, y que también se cumpla con los pagos y regalías acordados.</p> <p>Posterior al estudio de patentamiento realizado por la OTL de la PUCV se llevará el informe de factibilidad de la patente del biocompuesto y se solicitará el ingreso a INAPI.</p>	

Objetivo específico N°5	
Modelo de negocios adecuado para comercialización del biocompuesto	
Resultados Esperados que se esperan conseguir para validar el cumplimiento del objetivo específico N°4	Fecha de alcance (mes de ejecución)
Obtención de un modelo de negocios que permita la comercialización del biocompuesto	Noviembre 2021
Describa el método para cumplir el objetivo específico N°4: (Máximo 2.000 caracteres)	
<p>Para el desarrollo del modelo de negocios del biocompuesto se utilizará como guía el modelo canvas.</p> <p>Modelo de negocios Canvas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentar los clientes: definir con claridad el nicho de mercado y las oportunidades del negocio que vamos a emprender. • Definir bien la propuesta de valor: es decir, debemos saber por qué nos podemos considerar innovadores, en qué nos diferenciamos de nuestra competencia y qué nos puede acercar a potenciales clientes. • Delimitar los canales de comunicación, distribución y de estrategia publicitaria: esto fortalecerá nuestra marca e idea de negocio. Con clientes bien segmentados y una propuesta de valor definida, debe quedar claro cómo llegar a ellos y qué ofrecerles. • Establecer la relación que mantendremos con los clientes: es preciso contar con estrategias de fidelización que nos permitan mantener la relación con nuestros clientes en un horizonte de largo plazo. • Determinar las fuentes económicas de nuestra idea de negocio: este aspecto es fundamental, ya sea para la inversión inicial como para los planes de expansión de la empresa. Desde recursos propios y préstamos de familiares hasta créditos bancarios, todo cuenta. • Identificar los activos y recursos que necesitaremos: estas son herramientas imprescindibles en el engranaje de la idea empresarial, sin las cuales el proyecto definitivamente no marchará. • Conocer las actividades clave que darán valor a nuestra marca: también establecer las estrategias necesarias para potenciarlas. • Definir estrategias de networking: es importante establecer cuáles serán nuestros potenciales socios o proveedores para establecer contactos y alianzas para el desarrollo del negocio. • Establecer las estructuras de costos: esto nos ha de servir para saber el precio que tendrá que pagar el cliente por adquirir el bien o servicio vayamos a vender u ofrecer. 	



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



2. ANEXOS

ANEXO 1. Fotocopia de la Cédula de Identidad (C.I.) o Cédula de Identidad para Extranjeros.

ANEXO 2. Currículum Vitae

Se debe presentar el CV del postulante (máximo 3 hojas y con un resumen de los últimos 5 años de experiencia), y si aplica de:

- Cada uno de los miembros del equipo.
- Cada uno de los asociados con el que se llevará a cabo la propuesta.

ANEXO 3. Cartas de compromiso

Se debe presentar una carta de compromiso de participación de cada uno de los asociados y miembros del equipo en el siguiente formato:

Lugar,
Fecha (día, mes, año)

Yo **Nombre completo**, RUT: XX.XXX.XXX-X, vengo a manifestar mi compromiso de participar activamente en la propuesta denominada "**Nombre de la propuesta**", presentado a la **Convocatoria "Jóvenes Innovadores 2019"**, de la Fundación para la Innovación Agraria.

Firma



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



ANEXO 4. Identificación sector y subsector.

Sector	Subsector
Agrícola	Cultivos y cereales
	Flores y follajes
	Frutales hoja caduca
	Frutales hoja persistente
	Frutales de nuez
	Frutales menores
	Frutales tropicales y subtropicales
	Otros frutales
	Hongos
	Hortalizas y tubérculos
	Plantas Medicinales, aromáticas y especias
	Otros agrícolas
	General para Sector Agrícola
	Praderas y forrajes
Pecuario	Aves
	Bovinos
	Caprinos
	Ovinos
	Camélidos
	Cunicultura
	Equinos
	Porcinos
	Cérvidos
	Ratites
	Insectos
	Otros pecuarios
	General para Sector Pecuario
	Gusanos
Dulceacuícolas	Peces
	Crustáceos
	Anfibios
	Moluscos
	Algas
	Otros dulceacuícolas
	General para Sector Dulceacuícolas
	Bosque nativo
	Plantaciones forestales tradicionales



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



Sector	Subsector
Forestal	Plantaciones forestales no tradicionales
	Otros forestales
	General para Sector Forestal
Gestión	Gestión
	General para General Subsector Gestión
Alimento	Congelados
	Deshidratados
	Aceites vegetales
	Jugos y concentrados
	Conservas y pulpas
	Harinas
	Mínimamente procesados
	Platos y productos preparados
	Panadería y pastas
	Confitería
	Ingredientes y aditivos (incluye colorantes)
	Suplemento alimenticio (incluye nutracéuticos)
	Cecinas y embutidos
	Productos lácteos (leche procesada, yogur, queso, mantequilla, crema, manjar)
	Miel y otros productos de la apicultura
	Vino
	Pisco
	Cerveza
	Otros alcoholes
	Productos forestales no madereros alimentarios
	Alimento funcional
	Ingrediente funcional
	Snacks
	Chocolates
	Otros alimentos
	General para Sector Alimento
Productos cárnicos	
Productos derivados de la industria avícola	
Aliños y especias	
	Madera aserrada
	Celulosa
	Papeles y cartones



CHILE LO
HACEMOS
TODOS



Sector	Subsector
Producto forestal	Tableros y chapas
	Astillas
	Muebles
	Productos forestales no madereros no alimentarios
	Otros productos forestales
	General Sector Producto forestal
Acuícola	Peces
	Crustáceos
	Moluscos
	Algas
	Echinodermos
	Microorganismos animales
	Otros acuícolas
	General para Sector Acuícola
General	General para Sector General
Turismo	Agroturismo
	Turismo rural
	Turismo de intereses especiales basado en la naturaleza
	Enoturismo
	Otros servicios de turismo
	General Sector turismo
Otros productos (elaborados)	Cosméticos
	Biotecnológicos
	Insumos agrícolas / pecuarios / acuícolas / forestales / industrias asociadas
	Biomasa / Biogás
	Farmacéuticos
	Textiles
	Cestería
	Otros productos
	General para Sector Otros productos

Anexo 5. Efectividad del compuesto antimicrobiano contra Psa y otros fitopatógenos

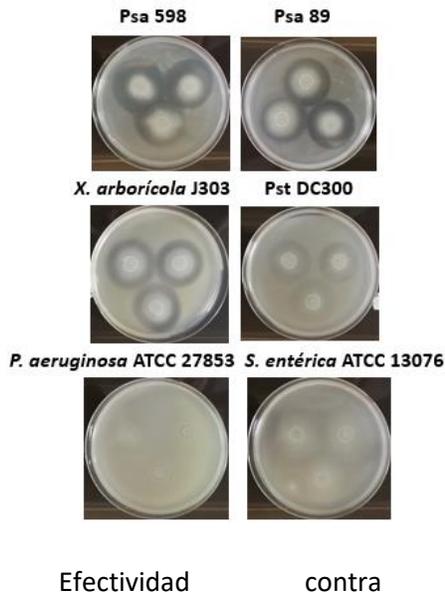


Figura 1: Ensayo de inhibición por gotas en césped. Efecto inhibitorio de *Alcaligenes* spp. contra los fitopatógenos Psa, *X. arboricola* y Pst. La efectividad del compuesto aproximada se puede calcular como el ((diámetro del halo de inhibición-diámetro de la colonia)/diámetro del halo) x100. Lo que da como resultado:

Efectividad contra Psa 598:	37,46	+/-	9,34
Efectividad contra Psa 89:	34,07	+/-	7,69
Efectividad contra Pst DC300:	17, 58	+/-	4,79
Efectividad contra <i>X. arboricola</i> J303:	19,41	+/-	3,49
Efectividad contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853:	0		
Efectividad contra <i>S. entérica</i> ATCC 13076:	0		

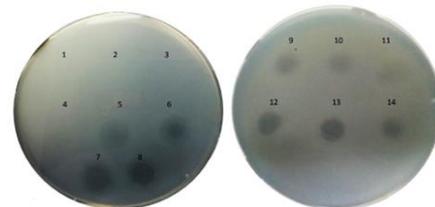
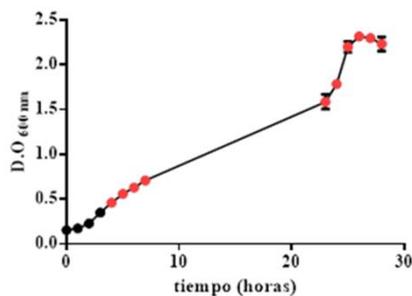


Figura 2: El compuesto antimicrobiano es producido a partir de la fase exponencial y se mantiene en el cultivo hasta la fase estacionaria. Izquierda: Curva de crecimiento de *Alcaligenes* spp. realizada durante 28 horas e incubada a 25°C. La presencia del compuesto antimicrobiano corresponde a los puntos rojos. Derecha: Efecto de inhibición del compuesto antimicrobiano producido por *Alcaligenes* spp. contra Psa después de ser incubados por 48 horas a 25°C.