



# INFORME TÉCNICO

## FINAL

*“Vaccinum forte: bioestimulante radicular para arándanos”*

PYT-2016-0487

OFICINA DE PARTES 1 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha .....	15 JUN 2018
Hora .....	14:47
Nº Ingreso .....	49622

## INFORME TÉCNICO FINAL

Nombre del proyecto	" <i>Vaccinum forte</i> : bioestimulante radicular para arándanos"
Código del proyecto	PYT-2016-0487
Nº de informe	2
Período informado	desde el 01/12/2016 hasta el 31/05/2018
Fecha de entrega	15 junio 2018

### Coordinadora principal

María José Rodríguez Oyarce

### Equipo técnico

María Antonieta Santander

Elizabeth Vargas Cifuentes



## I. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus resultados y los impactos esperados. Debe incorporar aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando la discusión de detalle en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

El proyecto comprende la validación técnica y el desarrollo de un producto mínimo viable de un bioestimulante radicular de origen natural y amigable con el medio ambiente formado en base a un consorcio microbiano. Para el proceso de validación técnica se desarrollaron pruebas a baja escala para determinar la concentración a utilizar del consorcio microbiano. Una vez determinadas las concentraciones a utilizar del consorcio se realizó un ensayo a baja escala en donde fueron inoculadas plántulas de arándanos propagadas en vitro, con estos ensayos se evidenció la eficiencia del producto en la promoción del crecimiento radicular en arándanos.

Posteriormente y con el fin de evaluar el efecto del producto en terreno se diseñó e implementó una prueba de campo (invernadero) desarrollada en la comuna de Colbún, séptima región. Para esta prueba de campo se utilizaron almácigos de tomates. Con estos ensayos en terreno se determinó la eficiencia del producto en la floración y el crecimiento de la planta. Se logró formar una proporción del consorcio que potencia en desarrollo de las plantas inoculadas. En donde, se encontraron diferencias en la altura, tamaño de hojas y formación de raíces. En la evaluación en terreno se observó adelanto en la floración y en la cosecha de las plantas. Por lo que pudimos corroborar la acción bioestimulante del producto.

## II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

El proyecto apuntó a la validación de un consorcio microbiano con propiedades promotoras del crecimiento, que estimula el crecimiento y el desarrollo radicular de las plantas.

El objetivo general de la propuesta fue determinar la eficiencia del producto, tanto in vitro como en invernadero, en pruebas a baja escala. Utilizando para dicho propósito, plantas propagadas mediante cultivo in vitro de arándanos y, además, almácigos de tomate para el ensayo de invernadero.

Se evaluaron las concentraciones y las interacciones entre los microorganismos, con el fin de obtener el mejor rango de concentraciones para su consecuente aplicación en terreno. Luego, se realizaron ensayos de aplicación del consorcio en plantas de arándanos y, en paralelo, en almácigos de tomates, los que fueron llevados a terreno en un invernadero construido para dicho propósito en la comuna de Colbún, séptima región.

### 2. **Cumplimiento de los objetivos del proyecto:**

- descripción breve de los resultados obtenidos, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias

**Objetivo específico 1:** Validar la eficiencia del producto a baja escala con plantas de arándanos in vitro y en almácigo de tomate.

Los resultados esperados del proyecto para la validación de la eficiencia del producto se cumplieron de acuerdo a los objetivos planteados. Se logró una combinación de los microorganismos utilizados que mostraron ser eficientes en la promoción del crecimiento y la formación de raíces en las plantas tratadas tanto en los tratamientos in vitro como en la prueba piloto en terreno solicitada por FIA.



## **Objetivo específico 2: Prospección Comercial**

Con la realización de la prospección comercial se logró determinar los requerimientos de información necesarios para diseñar una futura estrategia a ejecutar que potencie la difusión del producto, captura de clientes y concretización de ventas. Con este fin se determinó el segmento de clientes a abordar, la cualificación de los clientes, la segmentación de procesos, las acciones de marketing directo y como utilizarlo.

Se determinó la necesidad de gestionar redes de contacto entre pequeños y medianos productores como *target* de clientes y/o usuarios a abarcar en una primera instancia.

En esta gestión de redes de contacto se concretaron diferentes entrevistas cuya información se utilizó para re-validar la problemática abordada en este proyecto y no con el fin de dar a conocer el producto como tal. Con lo anterior, se logró validar que en arándanos el bajo desarrollo radicular sigue siendo un problema tanto en la mortandad de las plántulas y en el bajo rendimiento productivo de las mismas. Además, al consultar a productores por cultivos como el tomate, se evidencio que si bien no es un problema trascendental el enraizamiento, es bien aceptado un producto que provea a las plantas de cierta inmunidad ante patógenos, sobre todo en monocultivos, siendo bien evaluadas las cualidades de que no contamine los suelos y que sea inocuo y amigable con el medio ambiente.

A su vez, se determinó que las expectativas de los productores hacia los productos de origen natural requieren de validaciones de sus pares (otros productores) para acceder a invertir en la compra del producto, por lo que la relación con nuestros potenciales clientes debe ser de forma directa y mostrando resultados empíricos ojala gráficos (visuales) y no por evidencia en papel o estadística.

**Objetivo específico 3 y 4:** Solicitud y gestión de propiedad industrial (modelo de utilidad y marca comercial) y Gestión de Marketing y Difusión del producto.

Después de las actividades de prospección comercial del producto se rediseñaron las estrategias de protección de propiedad industrial planteadas en una primera instancia para la ejecución del proyecto. Del mismo modo las estrategias de marketing también fueron rediseñadas debido a la reestructuración del modelo de negocio.

### 3. Aspectos metodológicos del proyecto:

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

#### Evaluación del crecimiento de las bacterias en diferentes rangos de pH:

Para evaluar el crecimiento bacteriano se debe realizar una curva de crecimiento, determina mediante un espectrofotómetro en un determinado período de tiempo.

En este caso, la medición se realizó durante 24 horas con toma de muestra cada 1 hora, con el fin de comparar y determinar cuales son los rangos de mayor proliferación y crecimiento de ellas en un medio de cultivo con diferentes pH.

Primero se debe preparar el medio de cultivo recomendado por el Banco microbiológico y esterilizar todo el material que se utilizará. Una vez esterilizados los materiales todo el trabajo se debe realizar bajo una campana de flujo laminar

Se coloca en un matraz con medio de cultivo, una muestra de inóculo fresco y se “inocula”, se tapa con algodón o algún papel estéril y se deja en en agitación, utilizando shaker orbital con una oscilación de 120 rpm y una temperatura de 30°C. Cada 1 hora se saca una muestra de 1 ml y se mide en el espectrofotómetro a una densidad óptica (OD) 600 nm.

La lectura del espectrofotómetro va aumentando hasta llegar a un límite de 2,5, siendo éste el máximo de crecimiento. La densidad óptica tiene una relación directa con la cantidad de unidades formadoras de colonias o UFC (por sus siglas en inglés) contenidas en el cultivo. Generalmente, a una densidad óptica o OD 0,6 (600 nm) la cantidad de bacterias en suspensión son  $1 \cdot 10^7$  a  $1 \cdot 10^{10}$  UFC, depende de cada cepa.

A mayor DO de lectura mayor es la turbidez del cultivo y mayor es la cantidad de UFC. El espectrofotómetro realiza el cálculo de absorbancia y transmitancia, en donde, se ajusta como valor 0 al medio de cultivo sin inóculo. Cualquier contaminación es detectada por el control, el que debe dar lectura 0.

En la siguiente figura 1, se muestra la turbidez de los matraces con crecimiento bacteriano y el control.



**Figura 1.** Ensayo curva de crecimiento a distintos pH.

### **Evaluación de las mezclas de las bacterias:**

Para determinar la proporción adecuada de cada bacteria, se realizaron diferentes combinaciones de concentración. Las cuales fueron evaluadas en la germinación de semillas de lechuga y de tomate.

Se realizaron diluciones sucesivas o diluciones seriadas para lograr una mezcla que fuera superior al control. Se colocaron 25 semillas en cada placa Petri con papel filtro esterilizado con 1 ml de cada dilución de suspensión del consorcio, las placas fueron selladas con Parafilm para evitar que se deshidratación. Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperíodo 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad a una temperatura de 23 grados. Se observaron inhibiciones y muerte de ápices de raíz en las dosis más concentraciones. A medida se se diluye se observa el desarrollo de la raíz y de pelos radicales. En la figura 2, se muestran las placas con las semillas de lechuga y tomate para el ensayo de la proporción del consorcio microbiano.

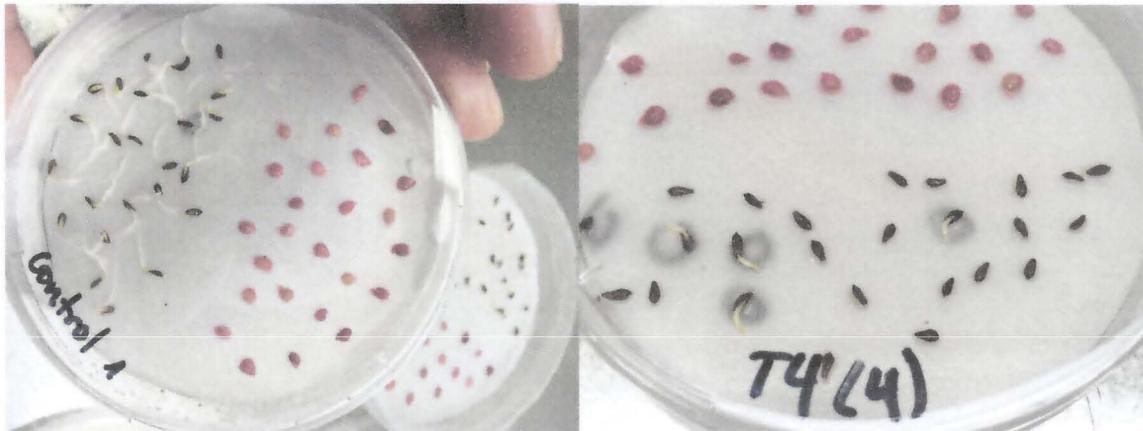


Figura 2. Ensayo de determinación de la proporción del consorcio.

### Plantas in vitro de arándanos:

Las plantas de arándanos, Figura 3, utilizadas, fueron conservadas en medio de cultivo WPM y mantenidas en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad a una temperatura de 23 grados. Se multiplicaron para tener una cantidad suficiente para los ensayos realizados.

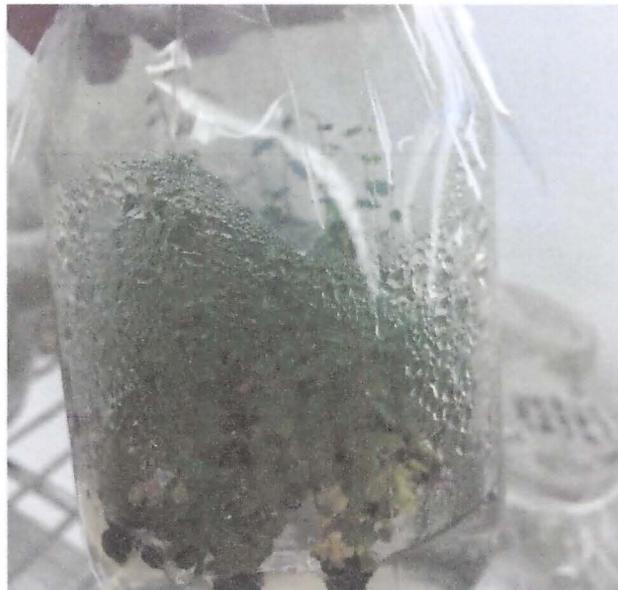


Figura 3. Plantas de arándanos in vitro.

### **Evaluación del crecimiento en arándanos in vitro. Longitud de raíz principal, número de raíces y aparición de pelos radicales:**

En forma tradicional la aclimatación de plantas de arándanos in vitro requiere de cama caliente y alta humedad constante, dejándolas en bandejas con sustrato hasta que generen raíces.

Se intentó un sistema previo al traspaso en bandeja, de modo de que las plantas estuvieran inoculadas antes de ir a cama caliente. Para esto, se traspasaron a sustrato plantas de arándanos in vitro con enraizante comercial Anasac y otro ensayo en frascos con perlita y el inóculo de la bacteria promotora del crecimiento.

En el ensayo con enraizante comercial, luego de un mes y medio a 27°C, se pudo observar escaso desarrollo de raíces y plantas muy defoliadas, Figura 4.



**Figura 4.** Ensayo aclimatación con enraizante comercial Anasac

En el segundo ensayo, Figura 5, realizado en frascos de vidrio con perlita estéril, en donde se adiciono, para humedecer el sustrato, los siguientes tratamientos. T0=Control agua, T 1= bacteria promotora en concentración de  $1 \cdot 10^4$  y T2=bacteria promotora en concentración de  $1 \cdot 10^6$ . Se observó menor defoliación y mejor conservación de las plantas al mes de evaluadas, comparándolo visualmente con el ensayo en sustrato, lo que se traduciría en una mayor sobrevivencia en esta etapa.

En este ensayo se ocuparon bastantes plantas de arándanos in vitro, las que tuvieron que ser multiplicadas para realizar los siguientes ensayos. Al ser un material delicado y, a la vez una especie difícil de aclimatar si no se cuenta con la infraestructura adecuada, como temperatura y alta humedad relativa, hizo que fuera complejo terminar este ensayo por lo que se desechó.



**Figura 5.** Ensayos de aclimatación e inoculación

### **Evaluación del crecimiento en tomate:**

Una vez determinada la proporción del consorcio se realizó un ensayo de germinación de semillas de tomate de la variedad “San Marzano” que se muestran en las Figura 6 y 15. En una bandeja tipo speedling se colocó sustrato turba:perlita en proporción 2:1. Luego se colocó una semilla por alveolo y se regó con 3 ml de la solución. Una vez germinados y formadas las plántulas éstas se evaluaron en altura. No se realizaron evaluaciones destructivas porque las plántulas se dejaron para ser utilizadas en el ensayo de invernadero.



**Figura 6.** Ensayo promoción de crecimiento en tomate var. “San Marzano” luego de un mes de inoculadas.

## **Evaluación en terreno con tomate:**

Luego de obtenida la combinación de bacterias más efectivas, inoculamos una bandeja almaciguera con semillas de tomate “San Marzano” y otra bandeja sin inoculación como control. En los dos tratamientos evaluamos altura de plantines. Luego de cada tratamiento se escogieron al azar 24 plantas, dividiendo 12 plantas con dosis completa de fertilización y 12 con la mitad de la fertilización recomendada. De modo que tuvimos 48 macetas de la siguiente forma:

- T1: 12 plantas inoculadas con fertilización completa
- T0,5: 12 Plantas inoculadas con mitad de fertilización
- C1: 12 plantas control fertilización completa
- C0,5: 12 plantas control mitad de fertilización

Se evaluó productividad por planta, tamaño y peso de frutos.

- **Principales problemas metodológicos enfrentados.**

El principal problema estuvo dado por retrasos en el proceso de internación de las bacterias, a la espera de que el SAG nos entregara una carta de acreditación de la inocuidad y de no riesgo fitosanitario para la agricultura y silvicultura Nacional. La carta fue solicitada por el Banco Microbiológico en Bélgica (BCCM), como requisito para el envío de las bacterias, debido a esto hubo un desfase en las actividades comprometidas a la espera de la entrega de la carta, el envío a BCCM y que ellos la aprobaran, para finalmente hacernos el envío desde Bélgica.

Por otro lado, la evaluación in vitro con arándanos, en un principio, fue algo compleja ya que debimos adaptar una metodología para analizar las dosis de inoculación la que no tuvo resultados, la que presentamos en las Figuras 4 y 5. Finalmente, tuvimos que multiplicar más plantas para poder realizar un ensayo de aclimatación en sustrato, lo que implicó mayor tiempo para obtener la cantidad de plantas necesarias.

Posteriormente, en la evaluación de las combinaciones de bacterias, tuvimos problemas con las semillas de tomates que adquirimos en Sodimac, las cuales no germinaron y solo nos quedamos con los datos obtenidos con lechuga.

Otro problema, más bien estratégico y que repercutió en la metodología, fue la distancia de instalación del invernadero que construimos para las evaluaciones de

campo del consorcio bacteriano en tomates, Colbún, séptima región. Esto debido principalmente, a que por la distancia no pudimos reaccionar a tiempo para controlar el ataque de *Phytophthora* entre la segunda y tercera cosecha. Esto lo atribuimos a que, al estar las plantas en macetas los primeros meses no vimos síntomas, luego cuando las raíces comenzaron a llegar al suelo, se contagiaron. Una vez que fueron fumigadas algunas se secaron y el resto generó nuevos brotes.

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta**

Se realizó una modificación en la metodología, agregando la evaluación en invernadero de plantas de tomates, para evaluar su eficiencia en terreno. Para lo cual hubo que modificar items para construir el invernadero, considerando los materiales, construcción y una persona que nos apoyara en el riego y cuidado de las plantas. El invernadero fue instalado en Colbún, séptima región, lo que implicó reitemización para cubrir los costos de traslados para la cosecha.

#### 4. **Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.**

##### 1. **Evaluación del crecimiento en arándanos in vitro. Longitud de raíz principal, número de raíces y aparición de pelos radicales**

Se realizaron ensayos para aclimatar con bacterias las plantas de arándanos in vitro, con diferentes metodologías: sustrato y enraizante comercial y en frascos con bacterias. Por la dificultad de conservar la temperatura y la humedad necesaria para las plantas de arándanos los ensayos no tuvieron éxito, como se muestran en las figuras 4 y 5.

##### 2. **Evaluación del crecimiento en tomate. Longitud de la planta, longitud de raíz principal, peso fresco**

Se inoculó con el consorcio bacteriano con la mejor proporción, en semillas de tomate de la variedad "San Marzano" en sustrato turba:perlita en proporción 2:1, en bandejas tipo speedling de plumavit. En cada alveolo se sembró una semilla de tomates y luego se regó con 3 ml de la solución bacteriana. Se dejó germinar y luego se evaluó la altura de planta. no se realizaron evaluaciones destructivas ya que las mismas plantas fueron las que se usaron para la evaluación en terreno en Colbún.

### **3. Verificar colonización en rizosférica y endófito en arándanos in vitro**

Esta evaluación no se pudo hacer debido al problema planteado en el punto 1, en donde las plantas inoculadas no sobrevivieron.

### **4. Determinar eficiencia de proporción mezcla de consorcio microbiano en almácigo de tomate.**

Para poder realizar esta actividad, ocupamos plantas de la evaluación de crecimiento de tomate y las trasladamos al invernadero que construimos para este propósito. Se evaluó la floración y luego, a la cosecha, rendimiento por planta, tamaño y peso de frutos. Esta fue una actividad agregada para efectuar una mejor evaluación del consorcio con su comportamiento en terreno.

### **5. Actividades de Mapeo de mercado y modelo de negocios**

Con el fin de conocer e instruirnos en las temáticas sobre modelo de negocios, prospección comercial y mercado, fue solicitada una asesoría y capacitación a una asesora externa al grupo del proyecto. En esta asesoría se utilizaron metodologías acordes para la realización de un pequeño catastro de posibles clientes y de la forma en la que nos relacionamos con ellos.

Para esto se implementó la metodologías de trabajo Lean que permite ir alcanzando una mejora continua en nuestros procesos internos de desarrollo y maximizar recursos con el fin de generar valor dentro de nuestro producto.

Para trabajar sobre modelo de negocios se utilizó *Business model canvas*, con esta herramienta concluimos en un modelo de sustentabilidad económica de terminándose como *early adopters* empresas pequeñas y medianas y productores no formalizados que estén buscando realizar labores en torno a desarrollar una agricultura de cultivos sustentables y amigables con el ambiente y cumpliendo con toda las normativas vigentes. Esto nos haría más competitivas a nivel mercado local en un principio, para posteriormente escalar reforzando la gestión con acciones de marketing adecuadas para posicionamiento de marca.

Con el fin de lograr esto último, la escalabilidad y posicionamiento del producto, se deberá levantar a través de matrices de construcción de alianzas estratégicas las redes de apoyo y contacto para el proyecto (producto) con una mirada estratégica.



Desde el *Business model canvas* a su vez se evidencio la necesidad de establecer el canal de distribución del producto, pues es algo que se relaciono con el cambio de la estrategia de protección industrial del producto.

Las evaluaciones básicas de pertinencia sobre propiedad industrial específicamente sobre patentamiento bajo la forma de modelo de utilidad fueron realizadas por la misma asesora. En este punto se procedió a elaborar acuerdos de confidencialidad que deben ser presentados ante cualquier acción de ventas o presentación del producto con potenciales clientes y/o usuarios del producto. Del mismo modo, se determinó utilizar el secreto industrial como estrategia de protección industrial hasta lograr hacer la solicitud de patente. No fue posible solicitar un servicio de peritaje para evaluar la pertinencia de patentamiento debido a que este servicio es muy costoso y no fue contemplado dentro del presupuesto del proyecto como tal y no contábamos con recursos propios para llevar a cabo esta acción.

#### **6. Determinar las clases asociadas al producto para confeccionar la marca del producto, según clasificador internacional de Niza en página de INAPI-chile**

Se realizo el análisis de factibilidad para registro de la marca del producto. Para esto se llevo a cabo la búsqueda de las clases a las cuales se podría acoger el producto. Se utilizaron el buscador internacional de Niza, validado por la oficina de referencia nacional en materias de propiedad industrial INAPI y conjuntamente INAPI tiene un buscador y una base de datos propia la cual también fue consultada para esta actividad.

Según el Análisis de factibilidad para realizar la solicitud de registro de marca, el producto puede acogerse a las siguientes clases, ver tabla:

### Según Clasificador NIZA e INAPI:

Clase	Subclase	ítem
1 (producto)	010271	Abonos para el suelo
1 (producto)	010293	Productos fertilizantes
1 (producto)	10622	abonos orgánicos
1 (producto)	10594	Preparaciones microorganismos que no sean de uso médico ni veterinario
1 (producto)	10595	preparaciones bacteriológicas que no sean para uso médico ni veterinario
1 (producto)	10293	Preparaciones fertilizantes
42 (servicio)	420231	consultoría tecnológica

### 7. Evaluación de solicitud de patente

Se realizó una revisión básica del estudio del arte, sin embargo, no fue posible solicitar un servicio de peritaje para evaluar la pertinencia de patentamiento debido a que este servicio es muy costoso y no fue contemplado dentro del presupuesto del proyecto como tal y no contábamos con recursos propios para llevar a cabo esta acción.

### 8. Participar en actividades de entorno para difusión del producto o proyecto

No se realizó ninguna actividad de entorno o difusión sobre el proyecto o sus resultados como tal, debido a la necesidad de guardar la novedad de alguno de sus resultados para llevar a cabo las acciones de propiedad industrial, específicamente sobre patentamiento.

## 9. Actividades de diseño y marketing

Después de las actividades de prospección comercial y modelo de negocio del producto se rediseñaron las estrategias de protección de propiedad industrial planteadas en una primera instancia para la ejecución del proyecto. Del mismo modo las estrategias de marketing también fueron rediseñadas debido a la reestructuración del modelo de negocio y específicamente por la propiedad industrial asociada al mismo. Al solicitar una patente nos obligan a no publicar ninguna información del producto ante ningún medio.

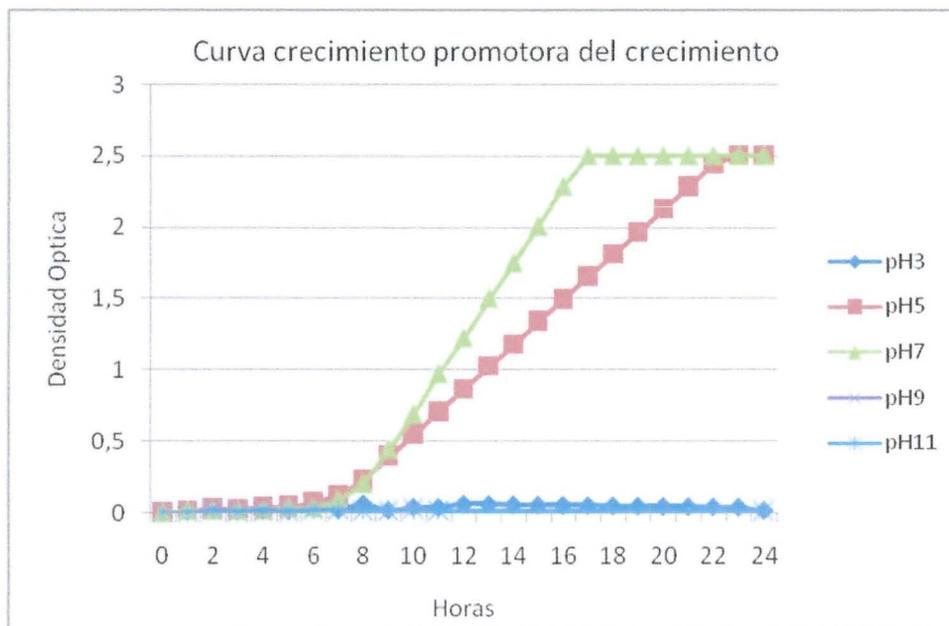
5. **Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permite poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.**

### **Evaluación del crecimiento de las bacterias en diferentes rangos de pH:**

El crecimiento de las bacterias, expresado en una curva, es una actividad muy importante, ya que nos entrega la información de cómo debemos manejarlas. Cada cepa reacciona diferente a distintos medios de cultivo y al pH de éste. En este caso, quisimos analizar el comportamiento en el pH, con el fin de corroborar que puedan ser utilizadas en un amplio rango de suelos y que cualquier intervención, ya sea por el riego, en el caso de arándano que necesita pH más ácidos, la bacterias sobreviven. Además, de tener información sobre de cómo debemos conservarlas como producto. .

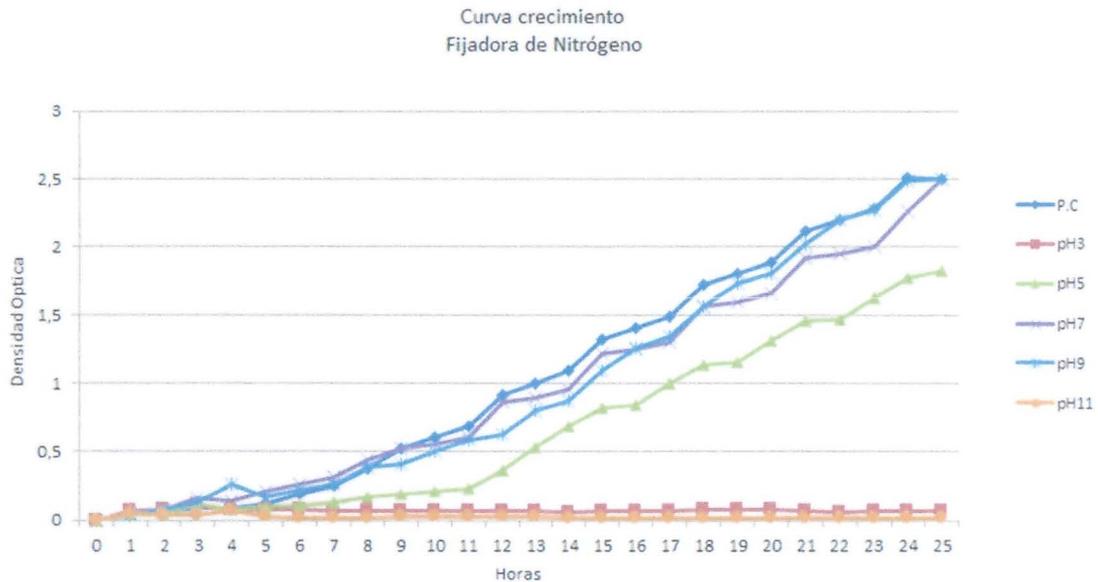
En los resultados obtenidos se logró determinar que la bacteria promotora del crecimiento (PM) es capaz de sobrevivir en forma óptima entre pH 5.0 a 7.0, siendo en el pH 5.0 el crecimiento un poco más lento que en 7.0. En pH 3.0 las bacterias tienen un leve crecimiento que luego baja, indicando que aún permanece vivo un bajo número de éstas bacterias. A pH alcalino no son capaces de sobrevivir. En la figura,7 se muestran las curvas de crecimiento de la bacteria PM en los diferentes pH evaluados.

### Curva de crecimiento de la bacteria promotora del crecimiento



**Figura 7.** Curva de bacteria promotora del crecimiento a diferentes rangos de pH.

En el caso de la bacteria fijadora de nitrógeno, figura 8, a pH 3,0 y pH 11 las bacterias no son capaces de crecer. Sin embargo a pH 9,0 el crecimiento es muy similar al comportamiento en un pH 7,0 y a la promotora de crecimiento (P.C) en un medio de cultivo con pH neutro.



**Figura 8.** Curva de bacteria fijadora de nitrógeno a diferentes rangos de pH

Estos análisis, además de entregar información sobre la sobrevivencia que la combinación podría tener en los distintos pH de suelos y la rapidez con que se multiplican las bacterias dentro de ese medio, también nos indica cuales son los tiempos óptimos de cosecha, según la concentración final que queremos para el producto final.

Las bacterias PGPR no solo colonizan la raíz sino que también son capaces de entrar a la planta y trasladarse dentro de ella. Por lo tanto, la inoculación tendría un efecto continuo durante todo su ciclo de vida.

### Evaluación de las mezclas de las bacterias:

La evaluación de las mezclas bacterianas, estuvo dirigida con el fin de obtener la mejor proporción de cada bacteria, en un solo consorcio. Para esto se realizaron diluciones seriadas, bajando la concentración de la muestra inicial o inóculo en una solución final de sulfato de magnesio, que se usa para evitar la muerte de las bacterias usando solo agua destilada.

Para el ensayo se ocuparon semillas de lechuga y de tomates, que fueron compradas en sodimac. De cada una se colocaron 25 semillas de lechuga y 25 semillas tomate

en placas Petri con papel filtro estéril, en donde, se agregó 1 ml de la suspensión y luego se selló con Parafilm, de modo de evitar la pérdida de humedad de la placa Petri y la contaminación. En el caso de que fuera necesario se regó con una solución de sulfato de magnesio.

Se evaluó diariamente la emergencia de raíz y la observación de anomalías. Se determinó porcentaje de germinación y largo de raíz. Se consideró como semilla germinada la aparición de la radícula. Solo se analizaron las semillas de lechuga, debido a la que las semillas de tomates no germinaron por ser de mala calidad, lo que se mencionó anteriormente.

En el primer ensayo realizado con las suspensiones más concentradas se observó muerte, necrosamiento y malformación de los ápices de las raíces, por consiguiente, una baja germinación. En el tratamiento control se obtuvo un 97% de germinación, comparado con la suspensión menos concentrada T6, ésta sólo alcanzó el 89% de semillas germinadas como se muestra en la tabla 1. La germinación, como se dijo anteriormente, se consideró cuando la radícula aparece, aunque en muchos casos solo se vió una mínima elongación producto de la inhibición del crecimiento como se muestra en la figura 9.

**Tabla 1** : Germinación de semillas de lechuga, primer ensayo.

Tratamiento	Germinación
T0	 97,0
T1	 54,0
T2	 59,0
T3	 63,0
T4	 80,0
T5	 75,0
T6	 89,0



**Figura 9.** Inhibición del crecimiento de raíz en T4.

Dado los resultados, a partir de la última del ensayo anterior, se realizó la continuidad de la serie de diluciones. Como se observa en la Tabla 2. se obtuvo un 97% de porcentaje de germinación en el tratamiento control, sin embargo en este caso, el tratamiento T6 logró un 99% de porcentaje de germinación. Por lo tanto, esta fue la proporción elegida para la inoculación de las plantas en sustrato.

**Tabla 2:** Germinación de semillas de lechuga, segundo ensayo.

Tratamiento	Germinación
T0	↑ 97,0
T1	↓ 92,0
T2	↓ 94,0
T3	↓ 94,0
T4	↓ 94,0
T5	→ 95,0
T6	↑ 99,0

En la figura 11, se muestran fotografías de los ensayos realizados. T4 y T2 corresponden al primer ensayo, en donde, se observa el acortamiento de la raíz con aumento de pelos radicales y el necrosamiento del ápice de raíz, respectivamente. Por otra parte, T0 y T6 corresponden al control y al tratamiento con mejor porcentaje de germinación.

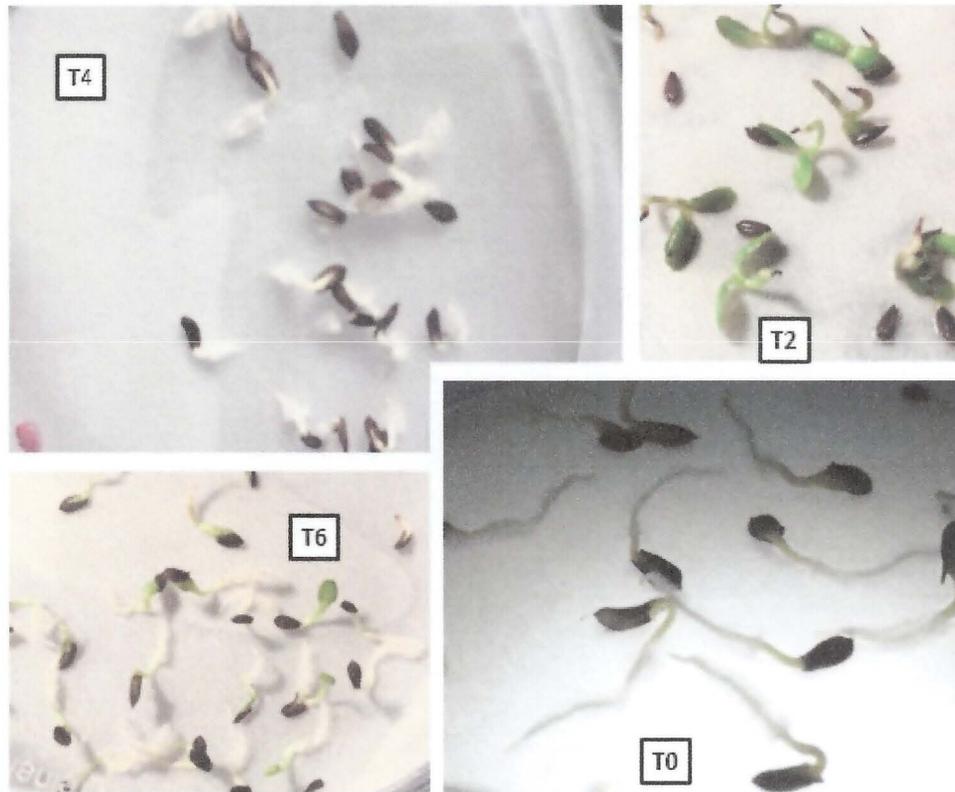
Además, se midió el largo de raíz de las semillas de lechuga germinadas, figura 10, cuyos resultados se muestran en la tabla 3. Al comparar el largo de raíz, entre T0 y T6, se observa que es mayor en el control, en donde, esta diferencia estaría dada a que en el tratamiento con la suspensión bacteriana se produjo una mayor cantidad de pelos radicales, pero entre ellos no hay diferencias.



**Figura 10.** Plántulas de lechuga.

**Tabla 3:** Largo de Raíz de plantas de lechuga germinadas con diferentes concentraciones de suspensión bacteriana.

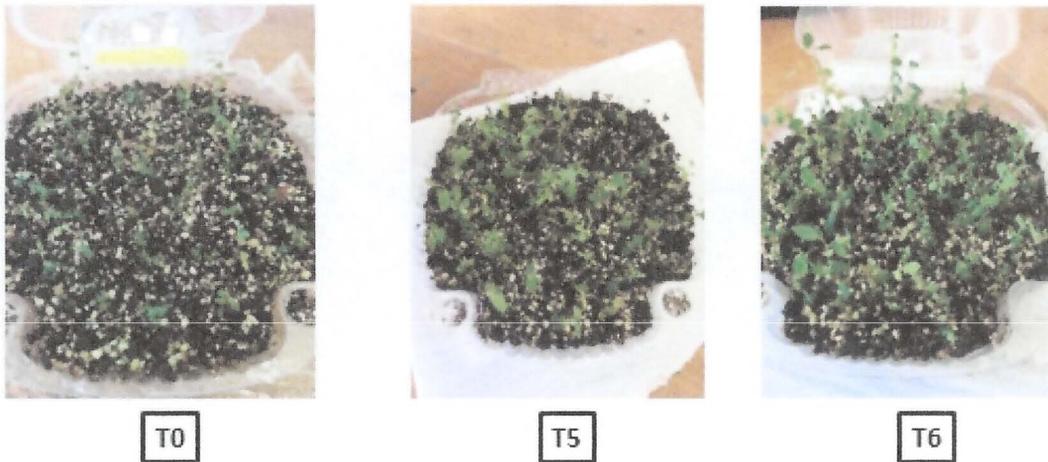
Tratamiento	Largo raíz	Número plantas evaluadas
T Control	↑ 2,09	93
T1	↓ 0,28	92
T2	↓ 0,22	92
T3	↓ 0,52	95
T4	→ 0,92	94
T5	→ 0,87	94
T6	↑ 1,64	97



**Figura 11.** Fotografía de los tratamientos de mezclas bacterianas. T2 y T4 corresponden a el primer ensayo, T0 y T6 al segundo.

### **Evaluaciones con sustrato de las mezclas seleccionadas.**

Se seleccionaron los últimos dos tratamientos para evaluar el comportamiento en la germinación de semillas de tomate, lavanda, lechuga y la aclimatación de plantas de arándanos in vitro.

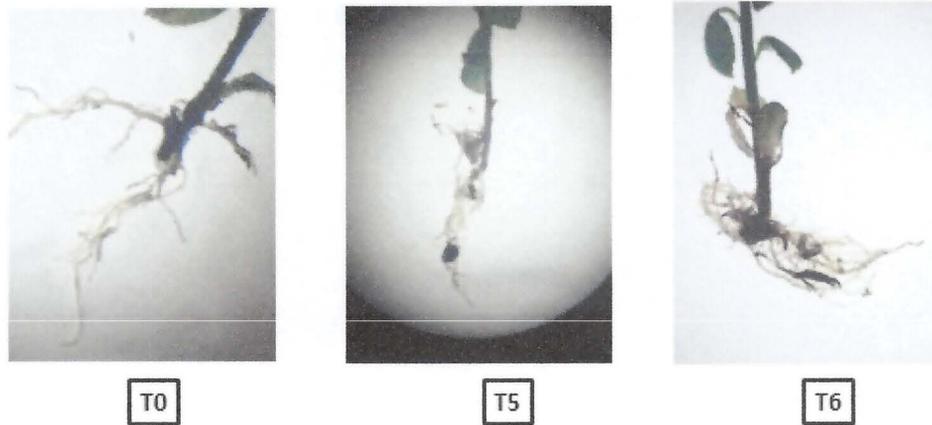


**Figura 12.** Plantas de arándanos aclimatadas con sustrato turba:perlita en proporción 2:1 y las suspensiones bacterianas.

En arándanos, la inoculación con la suspensión bacteriana se realizó directamente en la planta, dejándola 10 minutos dentro de un frasco con la mezcla de las bacterias y una solución de sulfato de magnesio, esto con el objetivo de evitar la deshidratación y que todas estuvieran el mismo tiempo en contacto con la suspensión.

En la figura 12, se puede observar mayor crecimiento y número de plantas vivas en el tratamiento T6 respecto al control.

El desarrollo de las raíces, figura 13, se evaluó en forma visual y bajo una lupa 40x, en donde, se pudo verificar un mayor grosor y volumen de raíces en los tratamientos con bacterias, comparadas a las que no fueron inoculadas. Las plantas fueron traspasadas a bandejas tipo speedling y puestas en invernadero en Colbún, pero por la alta temperatura se deshidrataron rápidamente y no sobrevivieron.



**Figura 13,** Desarrollo de raíces en plantas de arándanos inoculadas con las suspensiones bacterianas.

Para el caso de las semillas de lavanda, se pudo observar el mismo comportamiento que en las plantas de arándanos, es decir, mayor sobrevivencia y un mayor volumen de raíces en las semillas que fueron inoculadas con las suspensiones bacterianas. Además, del crecimiento en longitud de las plántulas, se observó que éstas eran mucho más verdes que el control. En la figura 14, se observa la diferencia en el tamaño y coloración de las plántulas germinadas.



**Figura 14.** Plantas de lavanda.

La evaluación de tomates se realizó, como previamente ya se mencionó, en bandejas tipo speedling dejando una semilla por alveolo y regando con la suspensión bacteriana. Luego fueron dejadas en un lugar con luz y temperatura adecuada para favorecer la germinación y crecimiento de las plantas. Al mes de crecimiento, se evaluó la altura de las plantas, cuyos resultados se muestran en la tabla 4.

Se puede observar la notoria diferencia en el color y el tamaño de las hojas, con una mayor área foliar. Para no destruir las plantas y utilizarlas en el ensayo de terreno no se pudo realizar las mediciones de peso fresco.



**Figura 15.** Ensayo promoción de crecimiento en tomate *var.* “*San Marzano*” luego de un mes de inoculadas.

**Tabla 4.** Altura promedio de plantas de tomates inoculadas

Altura	Control	T6
R1	↓ 5,5	↑ 8,0
R2	↓ 6,1	↑ 8,8
R3	→ 7,2	↑ 8,7

De la tabla 4 se puede mencionar la mayor altura promedio de los tratamientos en las plantas inoculadas, respecto de las plantas control o no inoculadas.

### **Evaluación en terreno con tomate:**

El invernadero que utilizamos y que se construyó para efectos de la evaluación del consorcio microbiano formulado, en el crecimiento y desarrollo productivo de plantas de tomates de la variedad San Marzano, se encuentra en la comuna de Colbún, séptima región. Previamente se realizó la limpieza del terreno, y luego la aplicación de herbicidas y productos químicos para la fumigación del terreno.



**Figura 16.** Construcción de invernadero

Una vez realizada la construcción y preparación del terreno libre de malezas, se procedió al trasplante de las plantas de tomates que fueron seleccionadas al azar, dentro de las que se utilizaron en el ensayo de promoción de crecimiento previamente descrito. Las plantas fueron puestas en macetas de 12 litros con una mezcla de sustrato turba:perlita 2:1. Las plantas fueron fertilizadas con Phostrogen vía riego según las recomendaciones especificadas por el fabricante semanalmente. Se realizaron durante el período 4 cosechas, en donde, se evaluó en cada planta: peso y tamaño por fruto (largo y ancho). El diseño fue 4\*4\*3, considerando 4 tratamientos, 4 plantas por tratamiento y 3 repeticiones, figura 17. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- T1: 12 plantas inoculadas con fertilización completa
- T0,5: 12 Plantas inoculadas con mitad de fertilización
- C1: 12 plantas control fertilización completa
- C0,5: 12 plantas control mitad de fertilización



Trasplante



1 semana

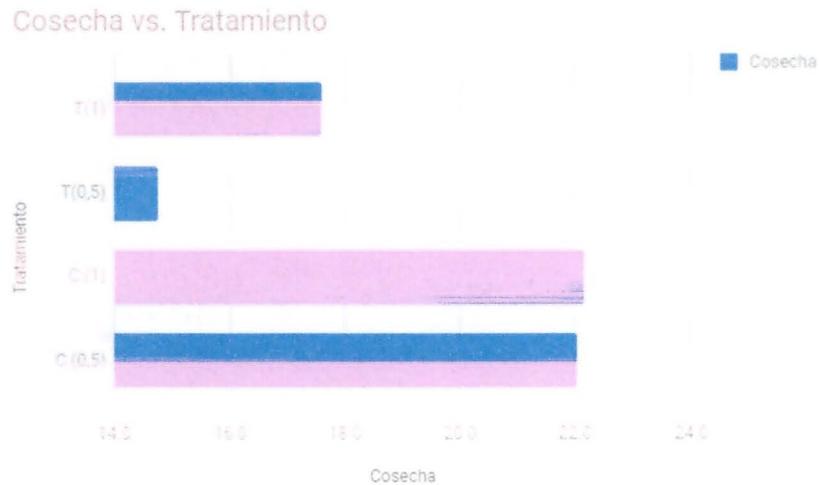


3 semanas

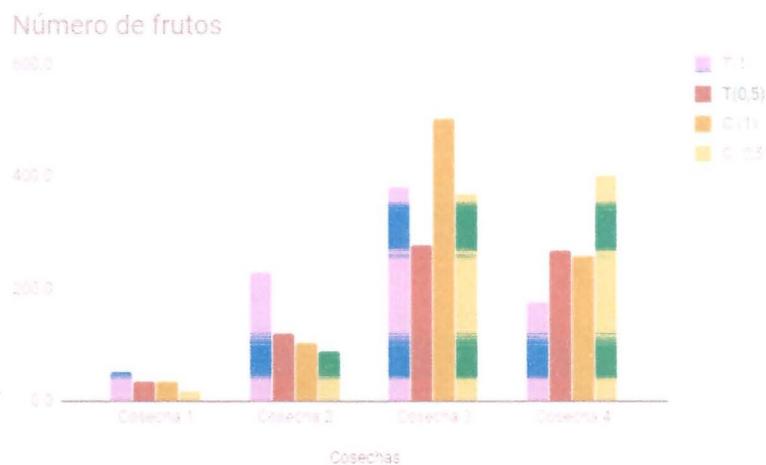
**Figura 17.** Ensayo tomates en invernadero.

Otras actividades realizadas fueron el amarre de plantas y limpieza de malezas, con herbicida y en forma manual. Además, se realizaron aplicaciones preventivas de fungicidas y para controlar el ataque de phytophthora durante la segunda y tercera cosecha, así como la aplicación de insecticida en forma preventiva para la mosquita

blanca. De los resultados obtenidos en la cosecha por tratamiento, expresada en kilogramos y que se presentan en la figura 18, se puede observar mayor cosecha, cercano a los 22 kg, en los tratamientos controles comparados con los obtenidos en los tratamientos con el consorcio microbiano, aunque distribuidas en el total de plantas, estos no tienen diferencia.



**Figura 18.** Gráfico cosecha vs. tratamiento



**Figura 19.** Gráfico de número de frutos por cosecha.

Al observar el gráfico de la figura 19, en donde se muestra la cantidad de tomates por cosecha, se aprecia mayor cantidad de frutos en la primera y sobretodo en la segunda en los tratamientos T1, que tiene el doble del T0,5, lo que nos indica que estos se “adelantan” respecto a los tratamientos controles. Esto concuerda con la tendencia

que encontramos en la cantidad de racimos, tabla 5, y en la floración de las plantas de tomates en invernadero, tabla 6. En ambas tablas es posible observar, el mayor número de racimos formados y florecidos, en los tratamientos T6, que son los inoculados con el consorcio, respecto a los controles T0.

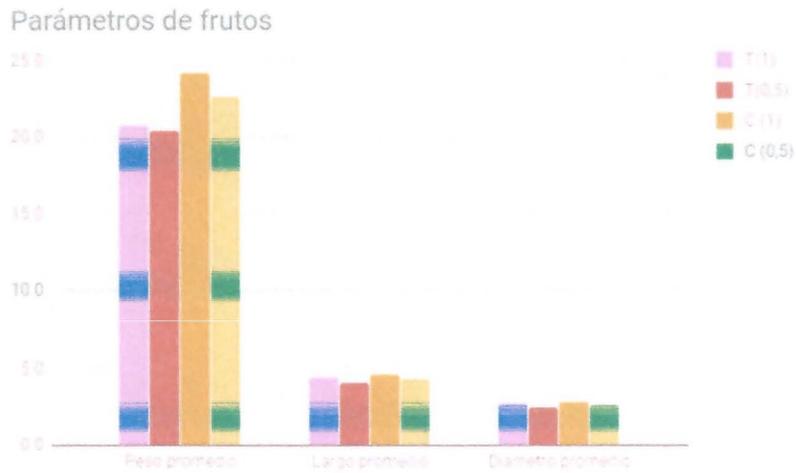
**Tabla 5.** Número de racimos por tratamiento

Tratamiento	06-ene	13-ene	20-ene
T0D0,5	↓ 2	→ 23	→ 34
T0D1	↓ 2	↓ 18	→ 27
T6D0,5	↓ 6	↑ 41	↑ 60
T6D1	↓ 6	→ 31	↑ 42

**Tabla 6.** Floración por tratamiento

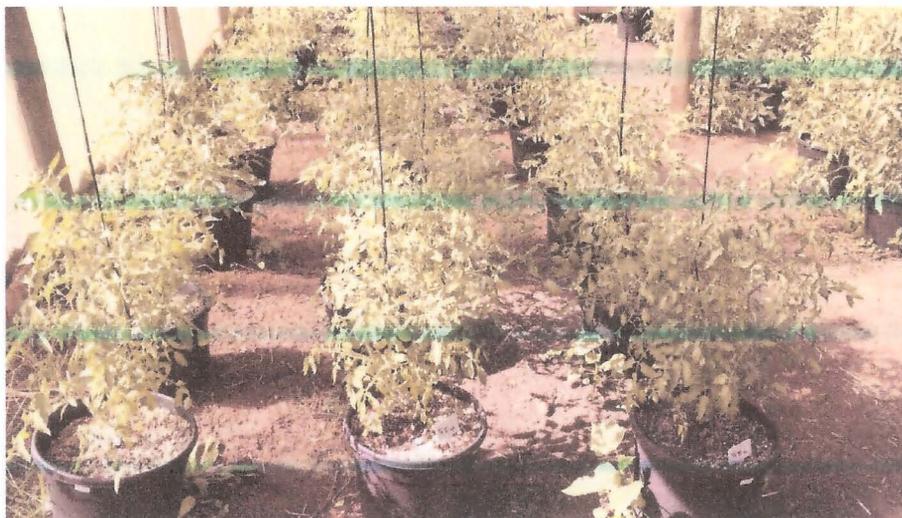
Flores	06-ene	13-ene	20-ene
T0D0,5	↓ 0	↓ 3	↓ 4
T0D1	↓ 0	↓ 4	↓ 4
T6D0,5	↓ 1	→ 6	↑ 15
T6D1	↓ 2	→ 5	↑ 11

Por otra parte, si consideramos que las plantas sufrieron daño por el ataque de phytophthora, entre la segunda y tercera cosecha, podríamos suponer que al estar más avanzadas éstas plantas sufrieron más que las controles, ya que varias de las plantas inoculadas se secaron y murieron, por lo tanto no fueron cosechadas en la última cosecha, mientras que las sobrevivientes siguieron formando flores.



**Figura 20.** Gráfico parámetros evaluados de frutos por cosecha.

Otros parámetros medidos fueron peso, largo y diámetro promedio de cada fruto, los que se presentan en la figura 20, para los cuales no existen diferencias significativas.



**Figura 21.** Ensayo de tomates a los dos meses



**Figura 22.** Cosecha de tomates y cosecha de planta T1 con ataque de *phytophthora*.

**6. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.**

Se realizó una modificación en la metodología, agregando la evaluación en invernadero de plantas de tomates, para evaluar su eficiencia en terreno. Para lo cual hubo que modificar ítems para construir el invernadero, considerando, los materiales, construcción y una persona que nos apoyara en el riego y cuidado de las plantas. El invernadero fue instalado en Colbún, séptima región, lo que implicó reitemización para cubrir los costos de traslados para la cosecha.

Otro problema, más bien estratégico fue la distancia de instalación del invernadero debido principalmente, a que por la distancia no pudimos reaccionar a tiempo para controlar el ataque de *Phytophthora* entre la segunda y tercera cosecha. Esto lo



atribuimos a que, al estar las plantas en macetas los primeros meses no vimos síntomas, luego cuando las raíces comenzaron a llegar al suelo, se contagiaron. Una vez que fueron fumigadas algunas se secaron y el resto generó nuevos brotes.

**7. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.**

No se realizó ninguna actividad de entorno o difusión sobre el proyecto o sus resultados como tal, debido a la necesidad de guardar la novedad de alguno de sus resultados para llevar a cabo las acciones de propiedad industrial, específicamente sobre patentamiento.

**8. Conclusiones**

Se logró formar una proporción del consorcio que potencia en desarrollo de las plantas inoculadas. En donde, se encontraron diferencias en la altura, tamaño de hojas y formación de raíces. En la evaluación en terreno se observó adelanto en la floración y en la cosecha de las plantas. Por lo que pudimos corroborar la acción bioestimulante del producto.

**9. Proyecciones del proyecto**

- i. Concretar las acciones de PI replanteadas
- ii. Una vez solicitado y teniendo prioridad de solicitud de lo anterior, Concretar las acciones de marketing y difusión.
- iii. Determinar dentro del modelo de negocios la cadena de distribución del producto y el formato de venta.
- iv. Comenzar con las presentaciones del producto dentro de los *early adopters* encontrados dentro de la red de contactos confeccionada
- v. Realizar pruebas en cultivos hidropónicos