

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

KIT DE DETECCIÓN TEMPRANA DE INFECCIONES CON ROYA ASIÁTICA DE LA SOJA BASADO EN LA TÉCNICA LAMP-PCR

Freijo, Daniela – LU 1013312

Lorenzi, Daniela – LU 1011756

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Martínez Tosar, Leandro Julián

Profesor Adjunto (UADE)
Investigador Asistente (CONICET)

Octubre 17, 2013



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

AGRADECIMIENTOS

Previo a exponer en palabras el trabajo de investigación que realizamos durante este año, queremos dedicar unas breves líneas para expresar nuestro sincero agradecimiento a todas aquellas personas que a través de su ayuda han colaborado en la elaboración de la presente tesis, en especial al Dr. Leandro Martínez Tosar, tutor de este proyecto, por la orientación, seguimiento y supervisión de la misma, pero por sobre todo por la motivación y apoyo brindado a lo largo de este tiempo transcurrido.

A nuestros profesores Damián Martínez y Sol Sassone, por su colaboración en el armado del Plan de Negocios que apoya la investigación científica y que hace viable nuestra idea original, por habernos enseñado y apoyado desinteresadamente en nuestro proyecto.

A nuestros padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que hoy somos, en toda nuestra educación académica y de la vida. A nuestros amigos y familiares, por su incondicional apoyo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A todos ellos, muchas gracias.

*“El hombre encuentra a Dios
detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”*

Albert Einstein

Resumen ejecutivo

El negocio

La roya asiática, producida por *Phakopsora pachyrhizi*, es una de las infecciones más devastadoras en los cultivos de soja. La enfermedad se detecta de manera visual por los daños característicos que produce en las hojas del cultivo. Sin embargo, al momento de la detección, la infección se encuentra en un estadio avanzado y los tratamientos que ofrece el mercado actualmente son de baja eficiencia, generando grandes pérdidas económicas.

El negocio que se propone consiste en desarrollar y comercializar un **kit de detección temprana de la roya asiática**, que permita a los agricultores aplicar rápidamente los tratamientos adecuados contra este patógeno, disminuyendo las pérdidas del cultivo y la expansión de la infección.

Para llevar a cabo el negocio surge la empresa **Safe Soybean**, que se ubicará en el barrio de Villa Urquiza de la Ciudad de Buenos Aires.

El producto estará principalmente dirigido a los grandes y medianos productores de soja ubicados en las regiones de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Santiago del Estero y Salta.

¿En qué consiste el kit de detección?

El kit de detección es un dispositivo de fácil uso, portátil y descartable, el cual permite detectar infecciones con roya asiática mediante la amplificación de regiones específicas del ADN de *P.pachyrhizi* en muestras de cultivos de soja. Utiliza una técnica biotecnológica llamada LAMP-PCR, la cual se caracteriza por tener un alto grado de sensibilidad y especificidad.

Fortalezas del negocio

Las fortalezas del producto propuesto radican en la practicidad de uso (no requiere de personal especializado ni de equipamientos costosos) y en la tecnología innovadora utilizada (LAMP-PCR). La baja eficiencia de los tratamientos tardíos contra esta enfermedad y la falta de competidores directos se identificaron como oportunidades de entrada en el

mercado. Además, el papel fundamental que posee la soja en la economía argentina aumenta el valor de este producto.

Análisis económico-financiero

El negocio requiere de una inversión inicial de \$1.980.889,90. Los socios aportarán \$180.889,9 y el resto se obtendrá de un crédito emitido por una Sociedad de Garantías Recíprocas con una tasa efectiva anual del 16%. Se proyectaron las ventas a cinco años y se determinó que el plazo de recuperación de la inversión es de aproximadamente tres años y medio. De este análisis se obtuvieron otros indicadores financieros resultando en un VAN de \$ 1.077.490,50 y TIR del 32%, lo que indica que el negocio es viable para ser llevado a cabo.

Abstract

The business

Asian Soybean Rust (ASR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the most serious diseases and it causes significant crop losses in many regions of the world. In fact, Asian Soybean Rust is the major disease that affects soybean. At present, the only way to spot the disease is to detect visually the lesions it causes on the leaves. However, when the disease is detected visually, the infection is usually in an advanced stage and the products available in today's market tend to have a low efficiency, which results in great economic losses.

The proposed business consists in developing and marketing a **kit for an early detection of Asian Soybean Rust**, allowing farmers to apply the appropriate treatment at an early stage of the infection. In this way, crop losses are lowered as well as the spread of the fungus.

The **Safe Soybean Company** arises to carry out this business. It will be located in the neighborhood of Villa Urquiza, in the city of Buenos Aires.

The product will be mainly aimed at medium and large soy producers located in Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Santiago del Estero and Salta.

What does this kit consist in?

The detection kit is an easy-use device, it is portable and disposable and it allows the detection of Asian Soybean Rust by the amplification of specific regions of DNA samples of soybean crops infected by *Phakopsora pachyrhizi*. The technology this kit applies consists in a technique called LAMP-PCR, which is a biotechnological tool with high specificity and sensitivity.

Business' Strengths

Our product's strengths lie basically in its practicality, as it does not require any qualified staff or expensive equipment to be used, and in its innovative technology (LAMP-PCR). The low efficiency of the delayed treatments against ASR and the lack of direct competitors were detected as the major opportunities to get a right foothold in the

market. In addition, soy production plays a very important role in Argentina's economy. This fact increases our product's value.

Economic and financial analysis

According to this analysis, the project required an initial investment of ARS 1,980,889.90. Sales were projected to five years and found that the Payback period is approximately three years. The NPV (Net Present Value) of the project resulted in ARS 1,077,490.50 and its respective IRR (Internal Rate of Return) is 32%, indicating that the business is viable to be carried out, and its economic retribution is swift and significant.

Índice

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción | 9 |
| 1.1 Reseña histórica | 9 |
| 1.2 Enfermedades de la soja | 10 |
| 1.3 La roya de la soja | 11 |
| 1.4 <i>P.pachyrhizi</i> a nivel mundial | 14 |
| 1.5 <i>P.pachyrhizi</i> en Argentina | 14 |
| 1.5.1 Última campaña agrícola 2012/2013 | 16 |
| 2. Un kit de detección para soja infectada con <i>P. pachyrhizi</i> | 19 |
| 2.1 LAMP PCR | 20 |
| 2.2 Lateral Flow Dipsticks | 25 |
| 2.3 Detección de <i>P.pachyrhizi</i> en la soja utilizando el kit Safe Soybean. | 27 |
| 3. The Safe Soybean Company | 29 |
| 3.1 Visión | 29 |
| 3.2 Misión | 29 |
| 3.3 Valores | 30 |
| 3.4 Objetivos | 30 |
| 3.5 Estructura y localización de la empresa | 30 |
| 3.5.1. Ubicación de la planta | 30 |
| 3.5.2. Infraestructura edilicia | 31 |
| 3.5.3 Servicios | 32 |
| 4. Análisis de la empresa | 33 |
| 4.1 Desarrollo del producto | 33 |
| 4.2 Proceso productivo | 38 |
| 4.3 Ciclo de vida del producto | 41 |
| 4.4 Implementación del Marketing Mix | 44 |
| 4.5 Organigrama | 50 |
| 4.6 Marco regulatorio | 51 |
| 5. Análisis de la Oferta y la Demanda | 53 |
| 6. Análisis del Mercado | 54 |

| | |
|---------------------------------------------|----|
| 6.1 Análisis FODA | 54 |
| 6.2 Tendencia | 57 |
| 6.3 Posicionamiento | 58 |
| 6.4 Segmentación | 58 |
| 6.5 Mercado proyectado | 61 |
| 7. Análisis del entorno | 62 |
| 7.1 Análisis del macroentorno | 62 |
| 7.2 Análisis del microentorno: La Industria | 66 |
| 8. Análisis económico financiero | 69 |
| 8.1 Timeline | 69 |
| 8.2 Ventas anuales estipuladas | 70 |
| 8.3 Estructura de costos | 71 |
| 8.3.1 Costo de inversión y Costos Anuales | 71 |
| 8.3.1.1 Costos fijos anuales | 74 |
| 8.3.1.2 Costo variable unitario | 75 |
| 8.4 Financiamiento del proyecto | 76 |
| 8.5 Valuación del proyecto | 77 |
| 8.5.1 Punto de equilibrio Año 1 | 78 |
| 8.5.2 Valor Actualizado Neto (VAN) | 79 |
| 8.5.3 Tasa Interna de Retorno (TIR) | 79 |
| 8.5.4 PayBack o Plazo de Recuperación | 79 |
| 8.6 Flujo de fondos | 80 |
| 9. Estrategias a futuro | 81 |
| 9.1 Exportación del producto | 81 |
| 9.2 Ampliación de la cartera de productos | 81 |
| 10. Conclusión | 82 |
| 11. Bibliografía | 83 |
| 12. Anexos | 86 |

1. Introducción

La soja es un importante cultivo perteneciente a la familia de las leguminosas, cuyos diversos usos explican el éxito en su producción y comercialización a nivel mundial. Dentro de estos se pueden destacar su participación en la industria alimenticia tanto para el consumo humano y de ganado, como también en otras industrias, como por ejemplo para la producción de lubricantes, pinturas, resinas sintéticas, y de biocombustibles, entre otras. Existen tres especies principales de soja: *Glycine ussuriensis*, *Glycine gracilis* y *Glycine max*, siendo esta última la más desarrollada y comercializada a nivel mundial.

Según los datos brindados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el principal productor de esta legumbre es Estados Unidos, seguido por Brasil, y ubicándose Argentina en tercer lugar, con una producción de 55 millones de toneladas estimadas para el período 2012/2013.

1.1 Reseña histórica

La soja cultivada (*Glycine max*) es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China, en donde hacia el 3000 A.C. ya se la consideraba como una de las cinco semillas sagradas. Durante muchos años la producción se centró casi exclusivamente en esta zona. Ya en el año 1765 fue introducida en América por Estados Unidos, expandiéndose a partir de 1840. En Argentina, las primeras plantaciones de soja aparecieron en 1862, pero no fue hasta 1970 que comenzó a crecer rápidamente su producción. Sin embargo, lo más destacable de su explotación en la Argentina fue el crecimiento del cultivo de la soja transgénica a partir de 1996, año en que se permite el uso de dicha semilla. Este fue un segundo impulso para la producción de la soja en Argentina, ya que a partir de este hecho se evidencia un acelerado crecimiento. La soja transgénica desde entonces utilizada contiene un gen que confiere resistencia al *glifosato*, que permite controlar las malezas sin afectar directamente al cultivo, aumentando los rendimientos de grano obtenidos.

Hoy en día, la soja juega un papel fundamental en la economía argentina, siendo el producto de exportación de mayor incidencia en el Producto Bruto agropecuario del país y el mayor generador de divisas.

1.2 Enfermedades de la soja

Aquellos patógenos que causan serias pérdidas de las cosechas tienen el poder de influenciar a las comunidades humanas. Debido al importante papel que juega la soja en la economía argentina, es de gran importancia el estudio de las enfermedades que pueden ocasionar daños en los cultivos de esta legumbre, así como la prevención y tratamiento de las mismas. Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes del cultivo de *Glycine max* afectando tanto el rendimiento como la calidad de la semilla. Los distintos tipos de enfermedades causadas por hongos pueden clasificarse en tres tipos:

- a) Las que infectan raíz y tallo. Algunos casos son la podredumbre del tallo producida por *Sclerotinia sclerotiorum*, la podredumbre de la raíz y del tallo, provocada por *Phytophthora sojae* y el cancro del tallo causada por *Diaphorte phaseolorum*.
- b) Las que pueden afectar tallos, hojas y semillas, como por ejemplo el Tizón del tallo y vaina (*Phomopsis sojae*). En general los hongos de este grupo sobreviven en los restos de cultivos infectados y se transmiten por las semillas.
- c) Hongos que producen tizón de plántulas y muerte de plantas adultas en condiciones de stress hídrico ocasionado por alternancia de humedad y sequía. Algunos ejemplos son: *Sclerotium bataticola*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*.

Por otra parte, también existen enfermedades de origen bacteriano. La predominante en nuestro país es el Tizón bacteriano causado por *Pseudomonas syringae*.

En Argentina, se estima que las pérdidas en soja originadas por enfermedades en general alcanzan valores superiores a las 900.000 toneladas por año, causando un perjuicio económico de más de 250 millones de dólares.

1.3 La roya de la soja

En el espectro de enfermedades que pueden atacar a la soja, la conocida como “roya de la soja” resulta notable tanto por su amplia distribución, su agresividad y su impacto sobre la productividad del cultivo. Su alto potencial destructivo ha llevado a que se la considere como una de las amenazas económicas más importantes para los países productores de la soja. Por ejemplo, en el año 2003 esta enfermedad ocasionó pérdidas de 2 mil millones de dólares en Brasil.

Desafortunadamente, las condiciones climáticas que favorecen el cultivo de la soja también propician el desarrollo de esta enfermedad. Las temperaturas óptimas para el cultivo de la soja oscilan entre los 15 y los 18°C en la siembra, y en torno a los 25° C para la floración. En cuanto a la humedad, la soja necesita de al menos 300 mm de agua, en forma de riego o bien en forma de lluvia en aquellas zonas templadas húmedas donde las precipitaciones son suficientes. Con respecto a la roya de la soja, las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas medias de 18 a 25 °C y humedad relativa alta de 75 a 80% durante un periodo de 10 a 12 horas.

Sus síntomas pueden presentarse en cualquier momento del ciclo del cultivo, pero se hacen más evidentes en plantas en etapa de floración. Los primeros síntomas se caracterizan por pequeños puntos amarillentos en las hojas, que a medida que aumentan toman una coloración gris, café y/o rojiza (de allí su nombre en inglés y portugués, *rust* y *ferrugem* respectivamente, significando “óxido”). En el envés de las hojas se observa una protuberancia en correspondencia con los pequeños puntos, con un pequeño orificio por el cual se liberan las uredosporas. Las lesiones se pueden observar luego en ambas caras de las hojas, pero son más numerosas en el envés. En ataques severos, las lesiones también se detectan en los tallos, pecíolos y vainas, produciéndose amarillamientos de hojas y defoliación reduciéndose el número de vainas, el número de granos y el peso de los granos.

La roya de la soja (*Glycine max*) es causada por dos especies independientes del género *Phakopsora*, que poseen un 80% de similitud en su secuencia nucleotídica. Estas son *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal de la llamada “roya asiática” por provenir de dicho continente, y *Phakopsora meibomiaae*, que causa la “roya americana” o “del nuevo mundo”. Ambas especies poseen estructuras morfológicas semejantes, causando una sintomatología

similar en las plantas hospedantes. Sin embargo, difieren principalmente en la intensidad de los daños que provocan, siendo la roya asiática mucho más virulenta y agresiva que la sudamericana, causando mayores daños económicos.

La roya asiática (RAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi*, es considerada una de las patologías más destructivas del cultivo de soja. Se caracteriza y diferencia del resto de las royas por causar lesiones necróticas en el tejido foliar alrededor del punto de penetración. Como ya se ha mencionado, aunque las hojas son los órganos más afectados, los síntomas también se observan en vainas, tallos y pecíolos en esta enfermedad. La severidad de estos signos es mayor que la observada en otras royas que afectan también a la soja. Afecta negativamente la capacidad fotosintética de las hojas y el crecimiento del tallo, produciendo además el aborto de vainas y la interrupción del llenado de granos, lo que disminuye el tamaño y calidad de la semilla, disminuyendo su valor económico.

P.pachyrhizi es un parásito biotrófico (obligado) que necesita de un tejido vivo para sobrevivir. Este parásito explota los recursos metabólicos del hospedador sin producir su muerte inmediata. Su reproducción es asexual, mediante la formación de las uredosporas. Alrededor de 24 horas luego de la germinación de las esporas y unas horas luego de la penetración de la hoja, el hongo induce la formación de estructuras lobuladas denominadas haustorios, que establecen una íntima relación física con las células del hospedador, bloqueando sus mecanismos de defensa y drenando nutrientes de la célula infectada. La membrana haustorial queda ubicada en la vecindad de la membrana de la célula vegetal, solamente separada de ella por un espacio topológicamente sellado conocido como matriz extrahaustorial, y por la pared del hongo. En este nuevo compartimiento es que se da el intercambio de información entre el patógeno y el hospedador, conducente al éxito del establecimiento de la relación parasítica entre ambos organismos. En resumen, el patógeno no produce la muerte de las células del hospedador de manera directa, sino que establece una interacción prolongada con las mismas durante la cual drena sus nutrientes. El patógeno no perdura en los rastrojos ni existen evidencias de transmisión por semilla, razón por la cual las pérdidas se dan exclusivamente en la etapa productiva.

Otra importante característica que distingue a *P.pachyrhizi* es su amplio rango de hospedantes ya que, en general, las royas atacan a un número acotado de especies vegetales. Se han descrito hasta 95 especies vegetales que pueden ser infectadas por este parásito.

Como se dijo anteriormente, la soja es susceptible al patógeno durante todo el ciclo del cultivo. Debido a esto, el nivel de pérdidas dependerá del momento de ocurrencia de la enfermedad y de la severidad de los síntomas. *P.pachyrhizi* es capaz de defoliar campos enteros de soja en tan sólo unos pocos días, lo que puede llevar a una completa pérdida de la cosecha. A pesar de la efectividad de los tratamientos con fungicidas, su aplicación suele darse en estadios avanzados de la enfermedad, pues los síntomas visibles de la enfermedad aparecen tiempo después. Esto reduce notablemente la efectividad de los tratamientos, lo que trae como consecuencia un aumento en las pérdidas del cultivo.

Adicionalmente, los síntomas (lesiones necróticas) y signos (pústulas) de la roya asiática de la soja no son tan fácilmente reconocidos como en las demás royas donde sí existen colores vivaces que permiten identificar la presencia de determinado patógeno. Esta enfermedad es de difícil diagnóstico por:

- Presentar lesiones o manchas diminutas.
- Su facilidad de confusión con otras frecuentes en el cultivo (ej. bacteriosis, mancha marrón).
- Estar oculta entre las hojas inferiores.
- Generar sus pústulas principalmente en el envés de las mismas.
- Ser distintiva únicamente con lupas de al menos 20 de aumento (20 X).

La eficiencia de control de cualquier fungicida depende especialmente del **diagnóstico**, y de la **severidad de la infección** al momento de la aplicación. Por ello, los factores enumerados en el párrafo anterior dificultan la detección de la enfermedad durante etapas tempranas de la infección, justamente, el momento ideal para maximizar la efectividad del tratamiento.

Si bien se han identificado cinco variedades de soja que presentan resistencia a algunos aislamientos de *P.pachyrhizi*, aún no existen variedades de soja con resistencia completa a todas las cepas naturales del patógeno. En base a las variedades resistentes, se han predicho cinco genes "R" hipotéticos: Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4 y Rpp5, que posteriormente fueron exitosamente mapeados. Sin embargo, ninguno de estos cinco genes han sido

clonados, sumado al llamado síndrome “*boom and bust*” por el cual el patógeno *P.pachyrhizi* puede superar la resistencia adquirida gracias a los genes R, debido a la gran capacidad que tiene el hongo de adaptar sus efectores de virulencia, surgiendo nuevas razas más agresivas.

1.4 *P.pachyrhizi* a nivel mundial

Como ya se ha mencionado y su nombre indica, la roya asiática tiene su origen en Asia, pero con el correr de los años se ha extendido por todas las regiones productoras del mundo, apareciendo por primera vez en Japón en 1902 y propagándose a partir de aquí por varios países asiáticos hacia 1914. En 1994 el patógeno fue reportado por primera vez en Hawái y alcanzó el continente americano en el año 2001. Actualmente, la enfermedad también afecta países como Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay, Colombia, México y Estados Unidos, donde fue reportada por primera vez en noviembre del 2004. El alcance geográfico logrado por esta enfermedad en los últimos años pone de manifiesto la gran capacidad de adaptación de *P.pachyrhizi* a los límites ambientales. Además, su fácil expansión también puede ser explicada ya que la principal vía de propagación de la enfermedad es través de las esporas (uredinosporas) las cuales son fácilmente transportadas por el viento a grandes distancias e incluso también pueden ser propagadas a través de la ropa. No obstante, el desarrollo de la enfermedad requiere de las condiciones climáticas ya detalladas para que se cumplan las diferentes etapas de la patogénesis (temperaturas de 18 a 25 °C, humedad relativa de 75 a 80% durante 10 a 12 horas).

En los últimos años la roya asiática de la soja se ha difundido a gran velocidad en el continente Sudamericano, especialmente en Brasil, Paraguay y Bolivia, donde la enfermedad encuentra condiciones climáticas favorables y hospedantes durante todo el año.

1.5 *P.pachyrhizi* en Argentina

La roya asiática de la soja originada por *Phakopsora pachyrhizi* fue detectada por primera vez en el mes de marzo de 2002 en la provincia de misiones. A partir de los

antecedentes de dicha enfermedad y las referencias de su expansión en Brasil, Paraguay y Bolivia, se creó el Programa Nacional de Roya de la Soja (resolución SAGPYA N°538/2003) con los siguientes objetivos:

- a. Determinar oficialmente el estatus fitosanitario de la enfermedad en el país-
- b. Oficializar la evolución espacio-temporal de la enfermedad en las zonas de producción sojera de la Argentina.

Durante el ciclo 2003/2004, la enfermedad fue confirmada mediante técnicas de biología molecular en las provincias del norte del país entre las cuales se vieron afectados lotes con soja de las provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Misiones, Corrientes y Entre Ríos, así como también en el norte y centro de la provincia de Santa Fe. Desde entonces, la enfermedad se ha ido expandiendo como resultado de la capacidad que tiene el agente patógeno de mutar y adaptarse a condiciones climáticas que no son las óptimas para su desarrollo.

A continuación se resume en una breve timeline el avance de la enfermedad en el país luego de su aparición:

Campaña 2004/2005: presencia de *P.pachyrhizi* en Jujuy, Salta, Tucumán, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa. No se determinó la presencia de roya americana causada por *Phakopsora meibomiaae*.

Campaña 2005/2006: el foco de la enfermedad fue detectado en la localidad de San Carlos de la provincia de Corrientes. La evolución geográfica de la roya asiática de la soja en este período fue en dirección NOA (Noroeste Argentino), recibándose denuncias en las provincias de Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Jujuy. También hubo detección de la enfermedad en Entre Ríos y Santa Fe.

Campaña 2006/2007: La primera detección se dio en el departamento de Villaguay, Entre Ríos, continuando su avance en dicha provincia hacia Corrientes, Formosa, Salta, Santa Fe y Tucumán. Más tarde aparecieron las primeras infecciones durante esta campaña en Buenos Aires, Córdoba, Chaco, Misiones y Santiago del Estero. En esta campaña se recibieron un total de 156 denuncias.

Campaña 2007/2008: La enfermedad fue detectada en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, y Tucumán.

Campaña 2008/2009: La primera denuncia de detección de roya de la campaña fue en el departamento de Alberdi, provincia de Santiago del Estero. Las denuncias también se recibieron de las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Chaco, Salta, Formosa, Buenos Aires y Tucumán.

Campaña 2009/2010: Se detectó la enfermedad en Santa Fe, Entre Ríos, Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Salta, Tucumán y Chaco.

Campaña 2010/2011: Las primeras detecciones se dieron en Chaco y Córdoba. A continuación se recibieron denuncias en Santa Fe, Entre Ríos, Santa Fe y Tucumán.

Campaña 2011/2012: La detección de la roya asiática se dio en Salta, Santa Fe, Entre Ríos y Córdoba.

Es importante aclarar que en las primeras campañas mencionadas la primera detección del patógeno se da hacia el mes de diciembre o enero, mientras que con el correr del tiempo, dicha detección se ha ido atrasando hacia los meses de febrero y marzo. Dichas épocas se caracterizan por altas temperaturas que propician el desarrollo del patógeno. Estos datos se corresponden con las ya detalladas condiciones climáticas necesarias para el crecimiento de *P.pachyrhizi*.

1.5.1 Última campaña agrícola 2012/2013

Se continuó con la implementación de la disposición SENASA N°13/2004 que establece la obligatoriedad de denuncia ante la detección o sospecha del organismo en relación a la soja. Los objetivos de dicha temporada fueron:

- Detectar en forma temprana la enfermedad y difundir oficialmente la detección
- Oficializar y difundir la presencia de *Phakopsora pachyrhizi* por cada departamento/partido provincial denunciado.

Finalizada la campaña, los resultados fueron los siguientes:

- Presencia de la enfermedad roya de la soja en siete provincias argentinas con producción de soja: Buenos Aires, Entre Ríos, Salta, Santa Fe, Corrientes, Santiago del Estero y Chaco. La provincia que mayor cantidad de denuncias recibió fue Entre Ríos.
- *Phakopsora pachyrhizi* PRESENTE en el país.
- *Phakopsora meibomia* AUSENTE en el país.

La figura 1 ilustra la distribución para esta campaña de los focos en los cuales se detectó la enfermedad.

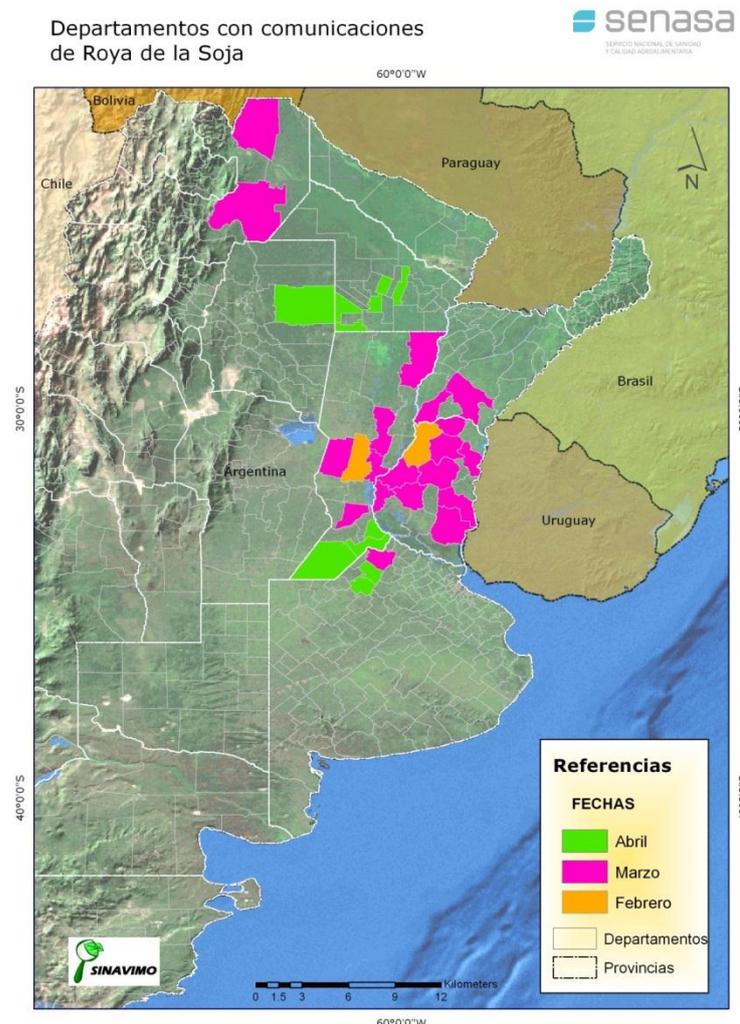


Figura 1. Representación de las zonas geográficas de la República Argentina afectadas por el patógeno durante la campaña 2012/2013 según SENASA.

A modo de conclusión, se puede afirmar que hasta el momento, el estudio e investigación de la roya asiática se ha centrado en los distintos hospedadores y los distintos mecanismos de control, es decir, en la planta infectada. Sin embargo, como hoy en día todavía no existen cultivos de soja con resistencia a todas las razas de *P.pachyrhizi*, e incluso se cuestiona si en algún momento existirán, es necesario que la investigación básica pase a centrarse en el propio patógeno. La aplicación de tecnologías moleculares probablemente podrá determinar si a futuro será posible evitar exitosamente la roya en las principales áreas de cultivo de soja.

2. Un kit de detección para soja infectada con *P.pachyrhizi*

Debido a la falta de cultivos con resistencia genética estable, actualmente los controles dependen básicamente de la detección temprana de la enfermedad y la aplicación correcta de fungicidas foliares. Un atraso en la aplicación, puede acarrear una reducción en la productividad, ya que cuando aparecen los síntomas, la planta ya ha utilizado parte de su metabolismo en su defensa, el patógeno ya ha matado células vitales para la planta y las esporas producidas estarán disponibles para ciclos secundarios de la enfermedad, de esta forma la tasa de progreso de enfermedad aumenta, aumentando así la patogénesis.

El método de identificación de la roya asiática más utilizado hasta el momento es la observación de las hojas de la soja en búsqueda de lesiones características. En algunos casos, los agricultores envían sus muestras a laboratorios para un análisis bioquímico. Estos estudios requieren de gente especializada y de equipamientos costosos. Pero la mayor desventaja es la pérdida de tiempo entre el envío de la muestra sospechosa y la obtención de resultados. El tiempo es un factor crucial para minimizar los estragos causados por el patógeno¹, ya que cuanto antes se efectúe la detección, mayor eficacia se obtendrá al aplicar el tratamiento fungicida adecuado.

Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar un kit que permita la detección temprana de la enfermedad, para que esta pueda ser tratada a tiempo y así minimizar las pérdidas evitando el decaimiento del cultivo.

El kit de detección se basa en la aplicación de una técnica llamada LAMP-PCR (*Loop-mediated amplification*)². Esta técnica consiste en la amplificación selectiva de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas. El método está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una ADN polimerasa adecuada, que posee una alta posesividad, y por un sistema de cuatro cebadores (*primers*) que

¹ Barbara S. Miranda, Elisangela M. Linares, Stefan Thalhammer, Lauro T. Kubota: Development of a disposable and highly sensitive paper-based immunosensor for early diagnosis of Asian Soybean rust. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, vol. 45, p. 123-128.

² Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000, vol. 28, n. 12, p. e63.

reconocerán un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco que se desea amplificar y detectar. Por lo tanto, se trata de una técnica sumamente sensible, específica, rápida y económica ya que no requiere de ningún equipamiento de laboratorio especializado. Es imprescindible un diseño de *primers* adecuado que permita la especificidad de la técnica y permita detectar únicamente la especie *P.pachyrhizi*. Esta técnica acoplada al llamado “*lateral flow dipstick*” elimina la necesidad de realizar una electroforesis en laboratorio, permitiendo que la detección pueda realizarse a campo abierto, acortando los tiempos y acelerando la detección temprana de la enfermedad, minimizando los daños ocasionados.

Lograr desarrollar el kit implica llevar a cabo una serie de pasos: desde el diseño de *primers* y análisis *in silico* de la especificidad, hasta la puesta a punto final de LAMP-PCR sobre muestras de soja infectadas con *Phakopsora pachyrhizi* y finalmente, lograr la puesta a punto de la detección mediante los *lateral flow dipsticks*.

El objetivo final del trabajo es plantear y diseñar el Plan de Negocios por el cual se pretende comercializar el producto, explicando y justificando la viabilidad y las expectativas de éxito del kit desarrollado.

2.1 LAMP-PCR

Como ya se ha mencionado, el kit desarrollado en este trabajo permitirá la detección visual de la presencia de *Phakopsora pachyrhizi* en un cultivo mediante la amplificación de su ADN. Para la amplificación se utiliza un método innovador: la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP-PCR).

Este método permite la amplificación de ADN con una alta especificidad, de forma muy eficiente y rápida bajo condiciones isotérmicas (temperatura constante de 60°C a 65°C). En menos de una hora se puede obtener 10^9 copias amplificadas de ADN. Se obtuvieron resultados positivos con una concentración de ADN inicial de menos de 10^{-23} moles.³

³ Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, n. 12, p. e63.

La especificidad y selectividad viene dada por la utilización de cuatro *primers* (dos internos y dos externos) especialmente diseñados que reconocen seis secuencias distintas del ADN a detectar. Estas regiones se identifican como: F3c, F2c, F1c en el extremo 3' y B1, B2 y B3 en el extremo 5' de la región a amplificar (Fig.2).

Al inicio de la reacción de amplificación se utilizan los cuatro *primers*, pero luego de completar el primer ciclo de la reacción solo los *primers* internos son utilizados para la síntesis del ADN.

Cada *primer* interno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en los ciclos posteriores de la amplificación.

Los *primers* a diseñar son los siguientes:

- FIP (*forward inner primer*): es el *primer* interno complementario a la región F2c y F1.
- F3 (*forward outer primer*): el *primer* externo complementario a la región F3c.
- BIP (*backward inner primer*): el *primer* interno reverso complementario a la región B2c y B1.
- B3 (*backward outer primer*): El *primer* externo reverso que es complementario a la región B3c.

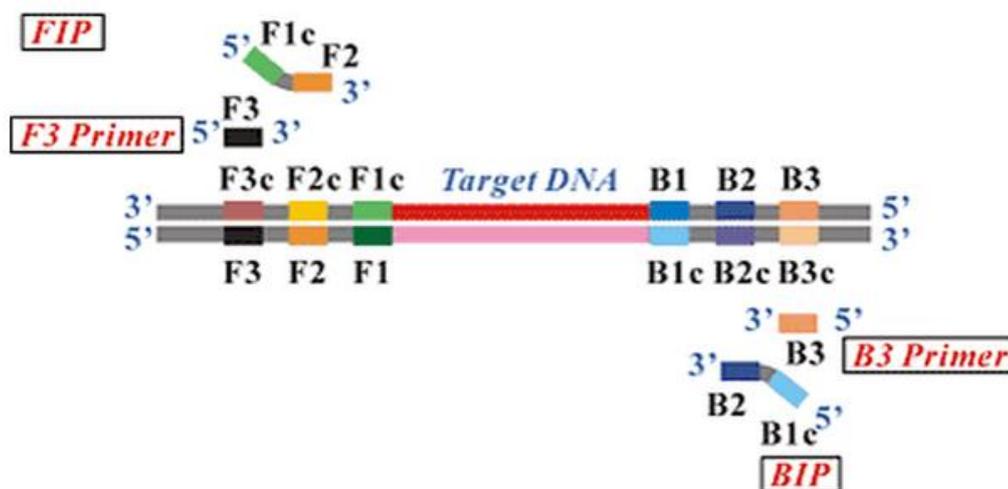


Figura 2. Esquema de los *primers* utilizados en LAMP-PCR y de sus regiones de reconocimiento en el ADN.⁴

⁴ Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008, vol. 3, n. 5, p. 877-8217.

La reacción de LAMP se inicia al adicionar la ADN polimerasa *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) y se lleva a cabo a una temperatura de 65°C durante aproximadamente una hora.

La reacción de LAMP-PCR se produce de la siguiente manera:

“El *primer* interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El *primer* externo F3 [...] se une a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura con forma de bucle (del inglés “*loop*”) en un extremo. Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del *primer* B3 originando la producción de un ADN en forma de doble asa (“*dumb-bell*”, un bucle en cada extremo de la hebra), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo (*stem loop*) [...]. A continuación, esta forma sirve de inicio para los ciclos de LAMP, la segunda etapa de la reacción de LAMP.

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura de *stem loop* del ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra [...], lo que genera una copia adicional de la secuencia blanco con un bucle en un extremo que será reconocido por BIP. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de ADN original y un ADN en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para el *primer* BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes en su tallo y [...] con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena.”⁵

⁵ Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, n. 12, p. e63

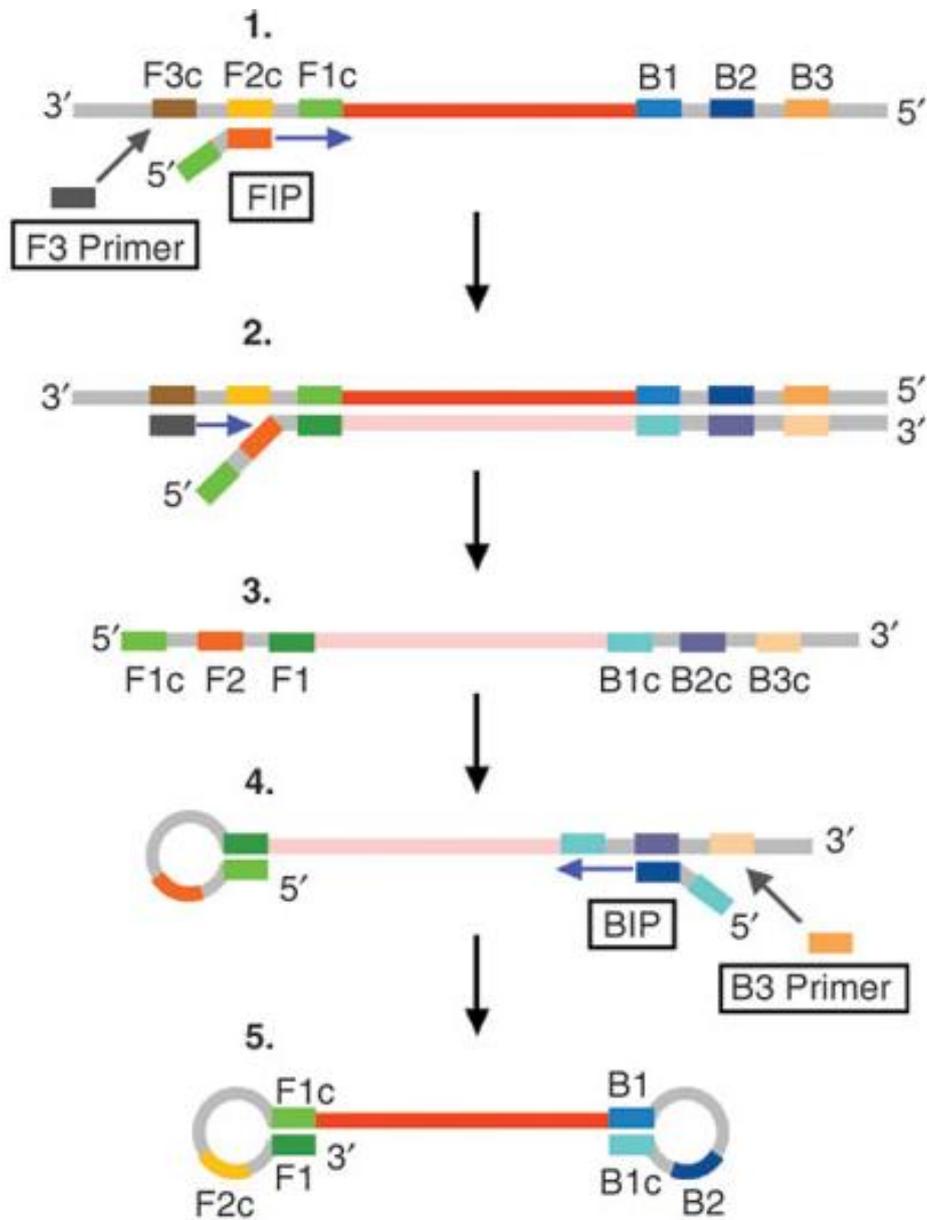


Figura 3. Primeras etapas de LAMP-PCR.⁶

⁶ Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008, vol. 3, n. 5, p. 877-8217.

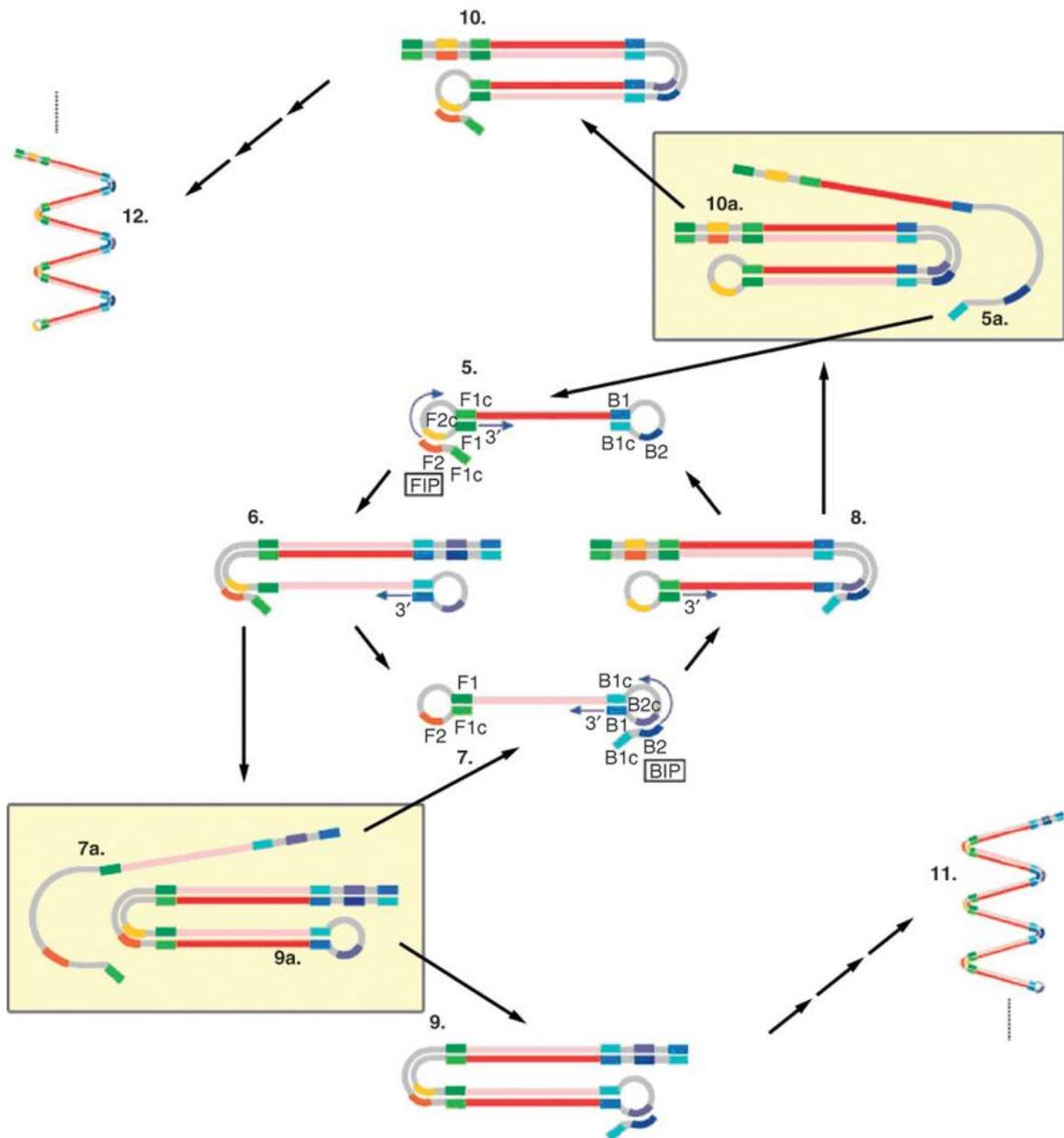


Figura 4. Los distintos productos obtenidos al amplificar una secuencia de ADN por LAMP-PCR.⁷

⁷ Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008, vol. 3, n. 5, p. 877-8217.

La técnica de LAMP-PCR posee varios aspectos ventajosos al compararla con la PCR convencional que nos permiten desarrollar el kit de detección con las características ya mencionadas:

- Amplificación isotérmica: la reacción de amplificación se lleva a cabo a una **temperatura constante** de entre 60 a 65°C. Permite el ahorro de tiempo al no tener que modificar la temperatura en los ciclos de la amplificación como sucede en la PCR convencional (anexo D).
- Método muy sensible y específico al reconocer seis regiones distintas de un ADN blanco. Estas características le proveen a esta técnica una alta capacidad diagnóstica.
- Rapidez: la máxima eficiencia se obtiene entre los 35 a 60 minutos.
- Bajos costos y de fácil aplicación: no se requiere de equipamientos costosos como un termociclador ni de personas capacitadas.

A pesar de la gran cantidad de aspectos positivos de esta técnica, algunas de las desventajas son las siguientes:

- La eficacia de la detección puede disminuir si se tiene una baja concentración de ADN molde.
- Algunos de los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación deben almacenarse a - 20°C.

2.2 Lateral flow dipsticks

El *lateral flow dipstick* permite la detección visual del producto de la amplificación de LAMP-PCR de forma muy sencilla. Para este trabajo se decide utilizar los *lateral flow dipstick*: BESt™ (Biohelix Express Strip) Cassette Type I, comercializados por Biohelix Co, Beverly, MA, USA.⁸ Estos dispositivos están conformados por:

- Un Cartucho de amplificación que contiene el buffer de corrida y un tubo de 0,2 ml donde se colocan los reactivos necesarios para la reacción de amplificación.

⁸ BIOHELIX [en línea] [consulta 25 may. 2013] <http://www.biohelix.com/products/BESt_Cassettes.asp>

- Una Cámara de detección donde se encuentra la cinta de flujo vertical que permite la detección visual del producto generado en el cartucho de amplificación.

La **detección visual** de un producto de amplificación se realiza de la siguiente manera (Fig. 5):

1. Llevar a cabo la reacción de amplificación.
2. Colocar el tubo con los amplicones generados en el Cartucho de amplificación al lado del tubo con el buffer de corrida.
3. Cerrar firmemente el Cartucho de amplificación y colocarlo dentro de la Cámara de detección.
4. Cerrar adecuadamente el dispositivo de detección, manteniéndolo en posición vertical.
5. Al cerrar el Cámara de detección se liberan los amplicones y se mezclan con el buffer de corrida.
6. La mezcla fluye de forma vertical hacia arriba a través de la cinta por capilaridad.

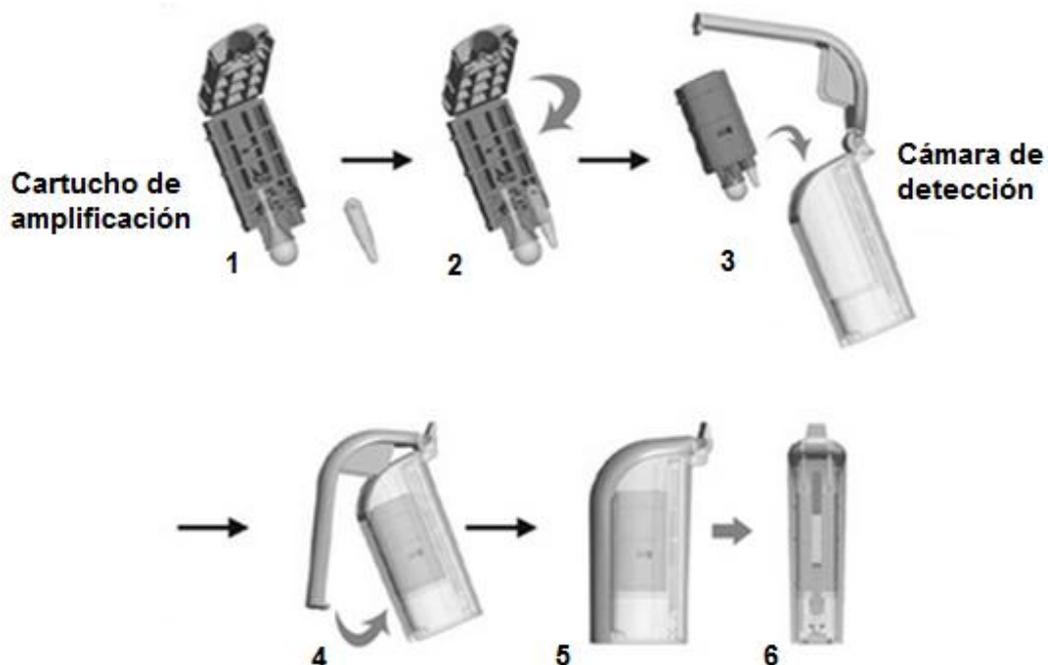


Figura 5. Procedimiento de carga del *lateral flow dipstick* para detectar el producto de amplificación de una secuencia de ADN.⁹

⁹ BIOHELIX [en línea] [consulta 25 may. 2013] <http://www.biohelix.com/products/BESt_Cassettes.asp>

La tira de detección BEST™ tipo I está diseñada para detectar un único tipo de amplicón, el cual debe estar doblemente marcado con **biotina** y **fluoresceína**. Por esta razón, deben utilizarse *primers* previamente marcados. Basándonos en los óptimos resultados obtenidos en trabajos similares en los cuales se detectó cancrrosis bacteriana en cítricos mediante LAMP-PCR¹⁰, se decidió marcar el *primer* FIP con biotina en el extremo 5', y marcar en el extremo 5' el *primer* BIP con fluoresceína.

Al mezclar los amplicones marcados con el buffer de corrida, la mezcla sube por capilaridad por la tira de detección. Los amplicones se detectan en la línea T. (Fig. 6). La línea C se utiliza como control.

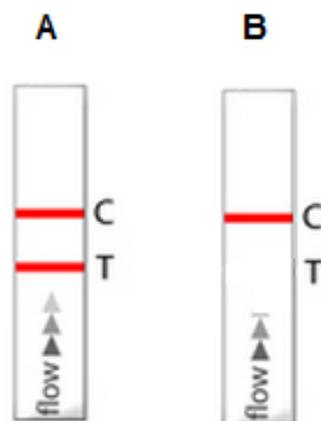


Figura 6. A) Se obtiene un resultado positivo. Se observa amplificación del ADN blanco. B) Resultado negativo. Sólo se observa la línea correspondiente al control.¹¹

2.3 Detección de *P.pachyrhizi* en la soja utilizando el kit Safe Soybean.

En esta sección del trabajo se explica de forma detallada cómo utilizar el kit de detección Safe Soybean.

¹⁰ Rigano Luciano A., Marano María R., Castagnaro Atilio P., Morais Do Amaral Alexandre, Vojnov Adrian A.: Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combines with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiology*. 2010, vol. 10, p. 176.

¹¹ BIOHELIX [en línea] [consulta 25 may. 2013] <http://www.biohelix.com/products/Type_II_Cassettes.asp>

El kit de detección que se busca comercializar viene equipado con los siguientes elementos:

- tubo tipo Eppendorf.
- mortero plástico.
- capilar plástico.
- buffer de homogeneización.
- *lateral flow dipstick*, compuesto por un cartucho de amplificación y una cámara de detección.

La detección puede ser llevada a cabo por cualquier persona de forma muy sencilla, siguiendo las instrucciones descriptas en la caja que contiene el producto.

Se recomienda realizar el monitoreo antes y durante los primeros ciclos de floración de la soja. Si es posible, **repetir el monitoreo cada 30 días**, principalmente en las zonas donde las condiciones son beneficiosas para el desarrollo de la infección: temperatura de entre 18 a 25°C, humedad relativa de 75 a 80% y presencia de rocío superior a 6 horas.

1. Recorrer el campo de siembra siguiendo un patrón en forma de “W”, **tomando una muestra cada 15 hectáreas**. Para la toma de muestra, se utiliza la tapa del tubo tipo Eppendorf como sacabocado, aplicando presión sobre la hoja a analizar. El disco de hoja obtenido se coloca en el interior del mismo tubo.
2. Procesar cada muestra por ruptura mecánica (mediante el mortero de plástico y tubo tipo Eppendorf provistos por el kit) y ruptura química mediante el buffer de homogeneización.
3. Colocar una alícuota de la muestra procesada (utilizando el capilar plástico que ha sido calibrado para extraer el volumen de muestra adecuado) en el tubo de reacción. Homogeneizar por agitación.
4. Llevar el tubo de reacción a una temperatura de entre 60 - 65°C por una hora. La reacción puede llevarse a cabo fácilmente en baño maría, con un calentador de agua eléctrico.
5. Colocar el tubo de reacción en el cartucho de amplificación.
6. Colocar el cartucho de amplificación en la cámara de detección y observar el resultado al cabo de dos minutos.

3. The Safe Soybean Company

The Safe Soybean Company es una empresa que se dedicará al desarrollo y comercialización de un kit portátil y descartable que permita la detección temprana de la roya asiática de la soja de manera específica, de manera tal que los cultivos de dicha legumbre puedan ser tratados a tiempo, minimizando así las pérdidas provocadas por la enfermedad, tanto a nivel cultivo como a nivel económico.

A partir de la reciente expansión de esta enfermedad en la soja es que la empresa ha detectado un nicho de mercado a explotar, satisfaciendo así una necesidad del cliente que hasta entonces no ha sido atendida por ninguna otra empresa del rubro. Sumado a las innovadoras características y propiedades que el producto ofrece, existe un segundo punto fuerte (no por eso menos importante) que respalda el éxito del kit de detección de roya asiática: el papel fundamental que juega la soja en la economía del país, motivo por el cual la prevención y cuidado de estos cultivos se vuelve aún más importante.

3.1 Visión

Ser reconocidos en el ámbito agrícola como aliados de referencia a nivel nacional para el diagnóstico temprano (y por lo tanto del control) de infecciones por roya asiática de la soja en cultivos de *Glycine max*.

3.2 Misión

Nuestra misión es proporcionar a nuestros clientes un producto de calidad, respetuoso del medio ambiente y de las limitaciones de equipamiento sofisticado en el campo, ofreciendo un producto de alta tecnología, confiable, y de requerimientos técnicos mínimos que ayude a minimizar las pérdidas económicas debidas a la roya asiática de la soja en el territorio argentino.

3.3 Valores

Los objetivos de The Safe Soybean Company son alentados y guiados por los valores que permitirán formar y desarrollar una cultura característica de la empresa. Ellos son:

- Compromiso con el medio ambiente: respetando y cumpliendo las normas que existen para su cuidado.
- Eficiencia y calidad: cumpliendo con todos los estándares de calidad para poder asegurarle al cliente que adquirirá las características y beneficios que busca en nuestro producto.
- Innovación: buscando desarrollar constantemente nuevas estrategias, técnicas y métodos de trabajo que generen mayor utilidad tanto para el cliente, como para la empresa y sus empleados.

3.4 Objetivos

- Lograr el crecimiento de la empresa de forma rentable.
- Obtener reputación entre clientes, trabajadores e inversores.
- Satisfacción de las necesidades de los clientes.
- Mantener la calidad del producto a lo largo del crecimiento de la empresa.

3.5 Estructura y localización de la empresa

3.5.1. Ubicación de la planta

La empresa, incluyendo la parte productiva y las oficinas administrativas, está ubicada en el barrio de Villa Urquiza de la Ciudad de Buenos Aires, principalmente por dos motivos. En primer lugar, Villa Urquiza es un barrio industrial de Capital Federal que se caracteriza por tener una alta concentración de empresas que se dedican al rubro químico y farmacéutico, y por lo tanto, poseen laboratorios en sus instalaciones. En segundo lugar, se eligió su localización en Capital Federal ya que se desea tener proximidad a los principales proveedores de la empresa, ya sean nacionales o proveedores extranjeros. De esta manera, se facilita la llegada de materias primas, reduciendo los costos relacionados con el transporte de

éstas. Como los principales clientes se encuentran distribuidos por gran parte del territorio argentino, no existe una ubicación ideal que permita estar cercano de todos ellos, por eso es que se eligió localizar la empresa en base a la cercanía a los proveedores, evitando así posibles problemas de abastecimiento de insumos para la empresa.

3.5.2. Infraestructura edilicia

Como ya se mencionó, el edificio ubicado en el barrio de Villa Urquiza, constará de las oficinas administrativas y el sector de producción y almacenamiento de stock. El edificio contará con un único acceso por el cual ingresarán las personas y se hará la recepción de materias primas.

El sector de producción consiste de un único laboratorio con el equipamiento necesario para llevar a cabo el armado del kit con todos los reactivos necesarios y el control de calidad del producto terminado. La presentación y armado final del producto en el empaque se llevará a cabo fuera de dicho laboratorio, en un área próxima a este.

Además, la empresa contará con un almacén refrigerado a la temperatura necesaria para mantener en condiciones óptimas el producto terminado. Este lugar de stock es en el cual se almacenarán los kits desde el momento que finaliza su producción hasta el momento en el que se distribuirán a los clientes, ya que la empresa no se manejará con un determinado nivel de stock debido a las propiedades del producto. Adicionalmente, este depósito tendrá una división que permita también utilizarlo como depósito de materias primas, ya que varias de éstas igualmente necesitan estar almacenadas a bajas temperaturas para no sufrir modificaciones y mantener así su actividad y calidad.

Relacionado al área de producción, la empresa necesitará contar con un área de vestuario próxima al acceso de personas, ya que por reglamentación, no está permitido ingresar a dicha área sin la vestimenta apropiada, es decir, guardapolvo o ambo y calzado adecuado.

En último lugar, el área administrativa de la empresa se encontrará compuesta por una oficina de secretaría en la cual se atenderán pedidos de clientes, y una oficina preparada para reuniones y usos múltiples.

Conjuntamente, existirá un área equipada de manera que pueda ser destinada a la cocina y comedor para los empleados.

3.5.3 Servicios

La empresa cuenta con los siguientes servicios necesarios para su puesta en marcha y funcionamiento: gas natural, caldera, agua corriente, servicio de Internet, luz, teléfono, grupo electrógeno y desagüe cloacal.

4. Análisis de la empresa

4.1 Desarrollo del producto

A continuación se explican los pasos de desarrollo y puesta a punto del kit de detección de la roya asiática.

- Análisis de la secuencia de DNA de *P.pachyrhizi* y diseño de *primers*

Como se explicó anteriormente, la roya de la soja es causada por dos especies de hongos: *Phakopsora pachyrhizi* y *Phakopsora meibomiae*. Estas dos especies poseen un 80% de similitud entre sus secuencias nucleotídicas. Por esta razón, se analizaron rigurosamente ambas secuencias para diseñar *primers* que permitieran identificar con alta especificidad a *P.pachyrhizi*.

Para el diseño de los *primers* nos basamos en trabajos ya publicados sobre estas dos especies en los cuales se secuenciaron y compararon las regiones ITS (espacio transcribible interno del ADN ribosómico)¹².

Los ITS (de las siglas en inglés para “*internal transcribed spacer*”) son regiones no funcionales del ADN ribosomal (Fig.7)¹³. En estudios de taxonomía y filogenia molecular es muy común la comparación de regiones ITS ya que poseen un alto grado de variación, incluso entre especies muy relacionadas.¹⁴

¹² Reid D. Frederick, Christine L. Snyder, Gary L. Peterson y Morris R. Bond.: Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection and Discrimination of the Soybean Rust Pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae*. *Mycology*. 2002, vol. 92, n. 2, p. 217-227.

¹³ WIKIPEDIA [en línea] [consulta 17 jul. 2013]
<http://es.wikipedia.org/wiki/ADN_ribos%C3%B3mico>

¹⁴ WIKIPEDIA [en línea] [consulta 17 jul. 2013]
<http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer>

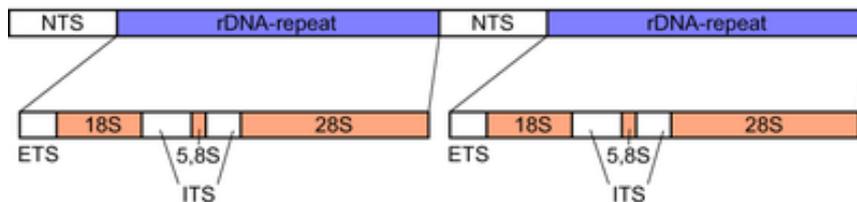


Figura 7. Estructura del ADN ribosomal

Las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de *primers* se encuentran en la base de datos del GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Los números de acceso de GenBank son los siguientes:

P.pachyrhizi: AF333488 (anexo A)

P.meibomia: AF333502 (anexo A)

Estas secuencias corresponden a las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 de las especies en cuestión.

Se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) entre las dos secuencias nucleotídicas para determinar cuáles son las regiones de mayor divergencia entre las dos especies (anexo B). Este análisis indicó una similitud del 85%.

Se analizaron los resultados obtenidos del BLAST y se determinó que las regiones de alta especificidad para *P.pachyrhizi* se encuentran aproximadamente entre los nucleótidos 113 a 220 y 400 a 600 (anexo B).

Para el diseño de *primers* se utilizó el software “*Primer Explorer*” (anexo C). Este programa analiza una secuencia nucleotídica y genera los cuatro *primers* necesarios para LAMP-PCR: FIP, BIP, F3 y B3. Para la selección del set de *primers* generados por el software se buscó que al menos uno de los *primers* se encuentre dentro de las regiones de alta especificidad para *P.pachyrhizi*. En la Tabla I se detallan las posiciones 5’ y 3’ de cada *primer*. Los *primers* para la reacción de amplificación seleccionados son los siguientes (anexo C):

F3: 5'- ACTTTTAACAAT GGATCTCTAGG -3'

B3: 5'- TCAAATCCAACAATTTCCCTT -3'

FIP: 5'- GATTCACTGAATTCTGCAATTCACA-CTCTCATATCGATGAAGAACAC -3'

BIP: 5'- ATCAAGTTTTTGAACGCACCTTG-ATGTTGAGAAGATTTTCATGACAC -3'

Para el análisis *in silico* de la especificidad cada *primer* fue puesto a prueba mediante un BLAST contra toda la colección de secuencias nucleotídicas del GenBank. De esta forma se corroboró la especificidad de los oligonucleótidos para *P.pachyrhizi* y se verificó que no reconozcan secuencias relacionadas con otras especies que pudiesen infectar la soja e intervenir en los resultados de identificación generando falsos positivos.

Por otro lado, se analizaron tres parámetros principales de cada *primer* generado (Tabla I). Estos datos son provistos por el mismo software (Anexo C):

- Porcentaje de GC (guanina y citosina):

Lo ideal es un porcentaje de entre 40 y 60 %. Un porcentaje menor de estos nucleótidos genera una disminución en la especificidad de la reacción de amplificación.

- Temperatura de *melting* (T_m):

Es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de *primers* se encuentran hibridadas con el ADN molde. Esta característica depende del porcentaje de GC y es requerida para la selección de las condiciones de la reacción de amplificación. En el caso de LAMP-PCR, como la reacción se lleva a cabo a una temperatura de entre 60 a 65°C (debido a la polimerasa utilizada), la T_m debe encontrarse alrededor de estos valores.

La T_m del *primer* F1c y la de B1c deberían ser un poco más altas que los valores para F2 y B2. Por otro lado, los valores de T_m para los *primers* F3 y B3 deberían ser menores a los de F2 y B2 (para asegurarse que los *primers* internos comiencen la síntesis antes que los *primers* externos)¹⁵.

¹⁵ Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, n. 12, p. e63.

- Longitud de los *primers*:

Se recomienda una longitud de entre 15 a 30 nucleótidos, siendo la óptima de 20.

Debe haber una diferencia de no más de 3 nucleótidos de longitud entre los *primers*.

| <i>Primer</i> | Posición 5' | Posición 3' | Longitud | % GC | T _m |
|---------------|-------------|-------------|----------|------|----------------|
| F3 | 254 | 276 | 23 | 35 | 55,52°C |
| B3 | 439 | 460 | 22 | 32 | 56,49°C |
| F1c (de FIP) | 318 | 342 | 25 | 36 | 55,63°C |
| F2 (de FIP) | 277 | 298 | 22 | 41 | 55,63°C |
| B1c (de BIP) | 343 | 365 | 23 | 39 | 56,81°C |
| B2 (de BIP) | 401 | 423 | 23 | 35 | 60,41°C |

Tabla I. Características de los *primers* diseñados.

A partir de los datos de la Tabla I, determinamos que los *primers* seleccionados se ajustan perfectamente a los criterios óptimos para la reacción de LAMP-PCR.

Cabe destacar que la generación de *primers* óptimos (que cumplan con todas las características recomendadas) es algo muy improbable y la única forma de comprobar la eficacia de estos es realizando la reacción de amplificación con distintos sets de *primers* y comparando los resultados obtenidos. Cuanto mayor sea el ajuste a los parámetros recomendados, se obtendrá un mejor rendimiento.

Por otro lado, se comprobó que los mejores resultados en una LAMP-PCR se obtienen con un ADN molde de longitud menor a 300 pb.¹⁶ En este caso, según los *primers* seleccionados la región de ADN a amplificar es de 208 pb.

¹⁶ Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, n. 12, p. e63.

- Puesta a punto de PCR convencional sobre ADN_c de *P.pachyrhizi*

Para poner a prueba la eficacia de los *primers* diseñados para identificar *P.pachyrhizi* se realizó una reacción de amplificación sobre muestras de ADN_c del hongo en cuestión mediante la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR, anexo D).

Como la PCR convencional solo requiere de dos *primers*, se comenzó con la compra de los *primers* F3 y B3. De esta forma se evita incurrir en gastos innecesarios de dinero en caso de que no funcionaran correctamente. Este ensayo fue realizado en los UADE Labs (anexo E).

Los siguientes pasos del desarrollo del producto son los que quedan pendientes por realizar para poner a punto el kit de detección propuesto.

- Puesta a punto de LAMP-PCR sobre ADN_c de *P.pachyrhizi*

Luego de comprobar la especificidad de los *primers* F3 y B3, se procede a la compra de los *primers* FIP, BIP y de la polimerasa *Bst*. Se amplifican muestras de ADN_c de *P.pachyrhizi* mediante LAMP-PCR. Para la confirmación de la reacción de especificidad se envían a secuenciar los resultados, utilizando los *primers* FIP y BIP como *primers* de secuenciación.

Si los resultados no son los esperados, se vuelven a analizar las condiciones de reacción utilizadas para adecuarlas a las características de los *primers* diseñados. Si los resultados continúan siendo negativos, se vuelven a analizar la secuencia del hongo para el diseño de nuevos *primers*.

- Puesta a punto de LAMP-PCR sobre muestras de soja infectadas con *P.pachyrhizi*

Luego de la puesta a punto de LAMP-PCR, se realiza esta reacción de amplificación sobre muestras de soja infectadas con el hongo en cuestión.

Es importante utilizar controles negativos (muestras de soja sanas) para corroborar que los *primers* no amplifiquen secuencias propias de esta planta.

Los amplicones generados se corren en un gel de agarosa y se envían a secuenciar para comprobar que la región amplificada corresponde a la secuencia delimitada por los *primers* diseñados.

- Puesta a punto de la detección mediante *lateral flow dipsticks*.

Finalmente, se compran los *lateral flow dipsticks* y se pone a punto el kit de detección: esto incluye desde la prueba del buffer de homogeneización hasta la detección colorimétrica de la reacción de LAMP-PCR. Para esto se utilizan nuevamente muestras de plantas de sojas infectadas con *P.pachyrhizi* y plantas sanas como control negativo. Se comprueba que el *lateral flow dipstick* funcione correctamente para la detección de la enfermedad.

4.2 Proceso productivo

En la figura 8 se representa el proceso productivo para el desarrollo del producto presentado en este trabajo.

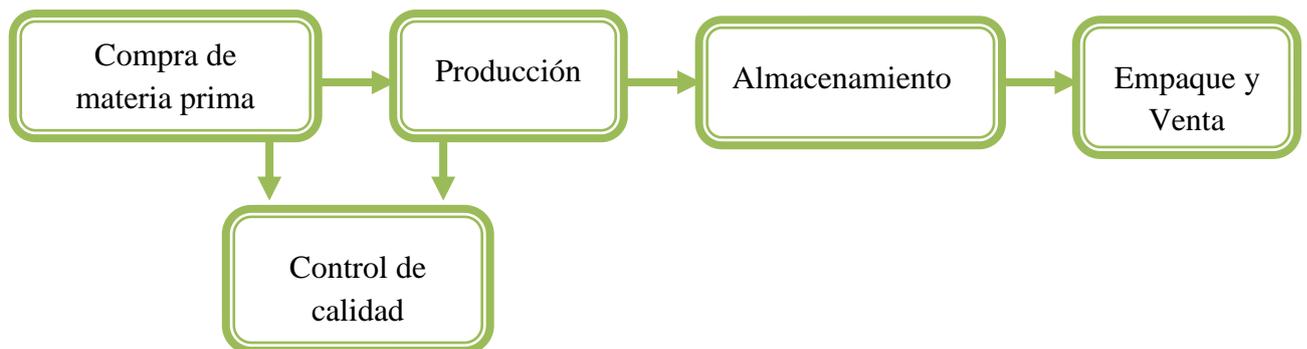


Figura 8. Proceso productivo del kit de detección Safe Soybean

1. Adquisición de la materia prima

El personal de depósito recibe la materia prima enviada por el proveedor y la guarda en el depósito hasta su utilización: la mayor parte de los reactivos y materiales se almacenan a temperatura ambiente o heladera. Los *primers*, la ADN polimerasa y buffers se almacenan a -20°C.

2. Producción

El personal de este departamento prepara una solución stock de la reacción de amplificación para generar 100 kits de detección.

Los componentes para una reacción de LAMP de 25 µl son¹⁷:

- Buffer de reacción (20mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgSO₄, 0,1% Triton x-100)
- Desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (0,2 mM cada uno)
- *Primer* FIP (0,8 µM)
- *Primer* F3 (0,2 µM)
- *Primer* BIP (0,8 µM)
- *Primer* B3 (0,2 µM)
- Polimerasa *Bts* (8 U)
- Agua c.s.p. 25 µl

Los volúmenes de cada reactivo deben ponerse a punto previamente al desarrollar el producto. Se utiliza una concentración mayor de los *primers* internos (FIP y BIP) que de los externos ya que los internos solo se utilizan al inicio de la reacción.

En cada tubo de reacción se introducen los microlitros necesarios de la solución stock. La polimerasa *Bst* se adiciona individualmente a cada tubo de amplificación.

Los tubos de reacción se almacenan a bajas temperaturas hasta el momento del embalaje para preservar la actividad de la ADN polimerasa por el mayor tiempo posible.

¹⁷ Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, n. 12, p. e63.

La producción es por lote y depende del lote de los *primers* utilizados. Al comenzar a utilizar un nuevo lote de esta materia prima se comienza un nuevo lote del producto final.

3. Control de calidad

Se realiza un control de calidad de cinco muestras tomadas al azar por lote. Los productos se inspeccionan de la siguiente manera: se pipetea muestra de ADN_c de *Phakopsora pachyrhizi* almacenada en freezer y se introduce en el kit. Al observarse la señal de color se confirma la presencia de este hongo. Se realiza un control negativo para descartar la posibilidad de que los reactivos se encuentren contaminados.

También se realiza el control de calidad de los *primers* enviados por el proveedor antes de ser utilizados para el armado de los kits: mediante una PCR convencional se amplifica el ADN de una muestra de *Phakopsora pachyrhizi* utilizando los *primers* F3 y B3. Luego se corre en un gel de agarosa y se determina el buen funcionamiento de los *primers* según el peso molecular de la banda amplificada. Se realiza además como muestra control un blanco (sin muestra del ADN del hongo) para comprobar que los reactivos no estén contaminados. En este caso no se debe observar ninguna banda al realizar la electroforesis.

4. Empaque y venta del producto

Lo ideal es proceder al empaque del producto inmediatamente antes de su entrega al cliente (ya sea un productor agropecuario, una empresa de monitoreo ambiental o una empresa distribuidora). Si esto no fuera posible, el producto terminado se mantiene en el almacén refrigerado hasta el momento de su venta.

Si el cliente se encuentra a no más de 300 km de distancia de la empresa, el producto es entregado por el empleado encargado de la logística. En el caso de clientes ubicados a mayores distancias la logística es tercerizada. Para el transporte del producto deben utilizarse camiones refrigerados.

Si el producto una vez vendido es almacenado a -20°C, su fecha de vencimiento será de entre 6 a 12 meses (dependiendo de lo recomendado por el proveedor de la polimerasa *Bst*). Si el cliente almacena el producto en heladera, se establece una fecha de vencimiento de

un mes. En caso de mantenerse el producto a temperatura ambiente, el producto tiene una caducidad de 2 semanas.

4.3 Ciclo de vida del producto

Una vez que el kit para detección sea lanzado al mercado, se iniciará su ciclo de vida. El producto no generará su volumen máximo de ventas inmediatamente después de su introducción en el mercado, sino que estas irán evolucionando con el tiempo. Las condiciones bajo las cuales el producto se venderá, cambiarán con el correr del tiempo, y así lo harán también las ventas y las estrategias de precio (*Marketing Mix*) deberán ajustarse según en qué fase del ciclo de vida se encuentre el producto.

La figura 9 ilustra el ciclo de vida clásico para un producto. La curva muestra la evolución en el nivel de ventas a lo largo del tiempo. Se distinguen en ella las cuatro etapas en las cuales se divide el ciclo: Introducción o Lanzamiento, Crecimiento, Madurez y Declive.

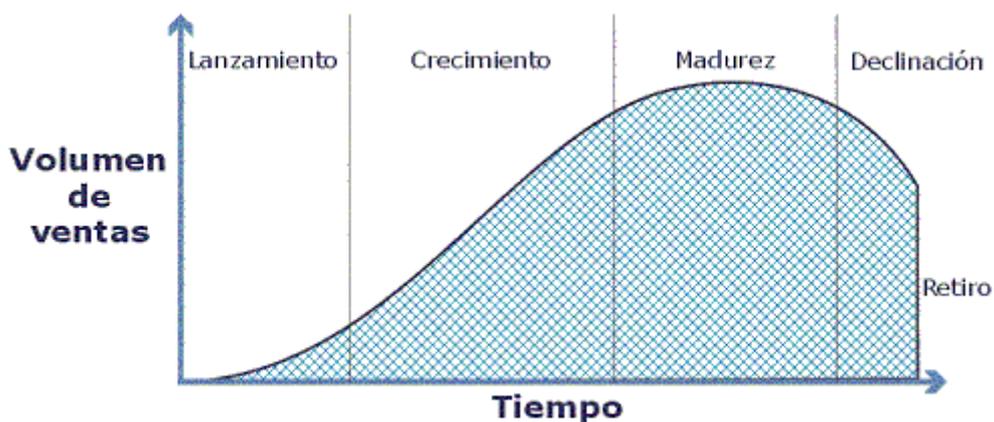


Figura 9. Evolución del volumen de ventas según la etapa del ciclo de vida del producto.

Previo a la etapa de lanzamiento, existe una etapa adicional conocida como etapa de Desarrollo del producto en la cual no se registrarán ventas ya que es la etapa de creación y puesta a punto del producto y creación de la empresa, en la cual surge la concepción de la idea, desarrollo del proyecto y plan de negocios. Esta etapa estará compuesta únicamente por

todos los costos necesarios para poner en marcha la empresa, gastos de investigación y desarrollo necesarios y costos de producción del kit de detección. Una vez que esta etapa concluye, el producto está listo para ser lanzado al mercado e iniciar su ciclo de vida.

1. Lanzamiento

Es el período en el cual el kit de detección para la detección de la roya asiática de la soja será introducido en el mercado. La empresa se ocupará a través del marketing de llevar a cabo las estrategias necesarias para comenzar la penetración del mercado (ver estrategias de marketing en el punto 4.4). Como en un principio el producto no será conocido entre los potenciales clientes, el volumen de ventas será bajo y el crecimiento será lento. Además, los costos de introducción del producto serán muy elevados, ya que se necesitará de un gran esfuerzo de venta para promocionar el producto. Esto se traduce en beneficios inapreciables.

2. Crecimiento

En esta etapa, nuestro producto completará el posicionamiento definitivo y comenzará a aumentar su participación en el mercado, gracias a la creciente aceptación por parte de los clientes quienes valorarán los beneficios que el producto ofrece. Al aumentar el volumen de ventas, las utilidades comenzarán a crecer. El mantenimiento del producto requerirá una inversión adecuada en estrategias de marketing.

3. Madurez

Durante la primera parte de este período se espera que las ventas continúen en crecimiento, pero a un ritmo cada vez menor, hasta estabilizarse. El producto se consolida en el mercado y los beneficios son altos, pero pueden comenzar a disminuir debido al potencial ingreso de competidores.

4. Declinación

Luego de una meseta de alta participación y muy buenas ventas y utilidades en el mercado, el producto suele tender a decrecer en su evolución. Las ventas del producto pueden comenzar a decrecer y las utilidades a mermar como consecuencia. Normalmente el producto

que alcanza esta fase debe prepararse para salir de un mercado ya saturado. En general, la causa de la declinación de un producto suele ser la obsolescencia. A esta etapa suele suceder una última etapa de desaparición y retiro del producto, en la cual los usuarios ya no aceptarán al mismo por no adaptarse a sus expectativas. El producto está en la empresa pero pierde vigencia en el mercado, y por lo tanto se decide el retiro definitivo del mismo. Cabe aclararse que, como la proyección de nuestro producto es a cinco años, no se espera que alcance estas últimas fases descriptas en su ciclo de vida.

En la Tabla II se muestra a modo explicativo las características más generales de cada una de las etapas.

| | Introducción | Crecimiento | Madurez | Declinación |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Ventas | Bajas | En ascenso | Ventas Pico | Declinantes |
| Costos | Costo elevado por cliente | Costo medio por cliente | Costo bajo por cliente | Costo bajo por cliente |
| Utilidades | Negativas | En ascenso | Elevadas | Declinantes |
| Clientes | Innovadores | Adaptadores tempranos | Mayoría media | Rezagados |
| Competidores | Pocos | En aumento | El número empieza a declinar | Declinantes |
| Oferta | Genérica | Comienza a diferenciarse | Máxima diferenciación | Nuevos usos/mercados |
| Objetivos de marketing | Crear conciencia | Maximizar la participación en el mercado | Maximizar las utilidades | Reducir los gastos |

Tabla II. Ciclo de vida de la Oferta

4.4 Implementación del Marketing Mix

Producto

Características

El producto consiste en un kit de detección de roya asiática de la soja. Se trata de un dispositivo sencillo que contiene todos los reactivos necesarios para la detección incorporados, de manera tal que su utilización sea simple, rápida y práctica. Es de uso único y descartable.

Calidad

Para ofrecer la mejor calidad y eficiencia del producto se llevaran a cabo las pruebas experimentales apropiadas de manera tal de asegurar una detección segura y fiable de la roya asiática de la soja. Además la detección es específica, evitando así la obtención de un resultado erróneo.

Marca

Safe Soybean pretende ser reconocida como una marca innovadora, que emplea la última tecnología para la detección de enfermedades de la soja, de manera que a futuro sea reconocida y valorada por los distintos mercados como una marca que ofrece calidad e innovación.

Estilo

El estilo que se busca proyectar es una empresa seria, respaldando el producto ofrecido en el mercado con investigación científica igualmente segura, confiable y seria.

Logo

Mediante el logo (Fig. 10), el cliente podrá fácilmente identificar que el producto está destinado a poder salvar a tiempo a aquellos cultivos de soja que han sido infectados por la roya asiática. Este logo será la caracterización de la empresa, ya que a futuro se espera

poder extender la tecnología para la detección temprana de distintas enfermedades (fúngicas o bacterianas) en otros cultivos, permitiendo asociar la empresa con la curación del cultivo.



Figura 10. Logo de la empresa

Empaque

Como ya se mencionó en el punto 2.3, el kit se comercializa incluyendo todos elementos necesarios para realizar la detección a campo abierto, de forma que cualquier persona pueda llevar a cabo dicha reacción de manera sencilla. El empaque consistirá de una pequeña caja de cartulina maule que contendrá en su interior un tubo, un mortero plástico, un capilar plástico, una solución buffer para homogeneizar la muestra y el *lateral flow dipstick* que es el elemento en el cual se realizará la detección. Para la entrega del producto, se colocará dichas cajas en un empaque de poliestireno para preservar la baja temperatura. Se recomienda el uso de un kit por cada 15 hectáreas de plantación de soja, por lo que la comercialización del producto se realizará en cajas de a 100 kits.

Además, el empaque llevará consigo el siguiente texto a modo de instructivo (Figura 11) que explique la forma adecuada de utilizar el producto para obtener un resultado verídico y confiable:



Safe Soybean

Kit para detección temprana de roya asiática en soja

Instrucciones de uso

1. Tomar una porción de hoja de soja usando la tapa del tubo incluido como sacabocado.
2. Agregar al tubo con la muestra de soja la solución buffer igualmente incluida y a continuación procesar la porción de hoja tomada con el mortero plástico dentro del mismo tubo. Esto ayuda a procesar y triturar la muestra.
3. Con ayuda del capilar plástico que incluye el kit, tomar una alícuota del contenido del tubo y colocarla en el tubo de reacción que se encuentra en el dispositivo de detección y cerrarlo. (Ver figura 1).
4. Llevar el tubo de reacción a 60 – 65°C por una hora. Esto se puede llevar a cabo fácilmente utilizando un calentador de agua eléctrico, a baño maría.
5. Una vez pasado el tiempo de calentamiento, volver a colocar el tubo de reacción en el cartucho de amplificación, y a continuación, colocar este cartucho en la cámara de detección. (Seguir figura 1, pasos 2 a 6)
6. Al cabo de dos minutos se podrá observar el resultado. Si se observan dos rayas, el resultado es positivo, es decir, indica la presencia de roya asiática. Si en cambio se observa una sola raya, el resultado es negativo. (Ver figura 2)

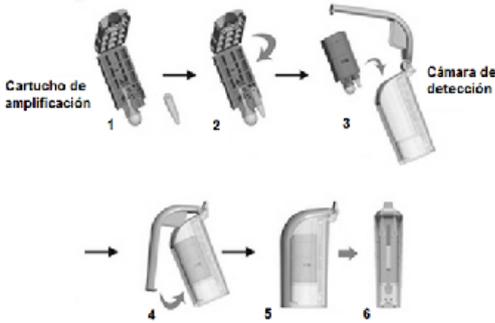


Figura 1. Cómo armar el dispositivo para la detección

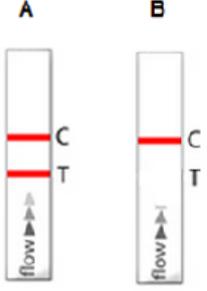


Figura 2. Visualización de resultados posibles. En el caso A, la detección es positiva. En el B, negativa.

Recomendaciones

Se recomienda realizar el monitoreo utilizando el kit antes y durante los primeros ciclos de floración de la soja.

Repetir el monitoreo cada 30 días para mayor prevención.

Se recomienda como mínimo, utilizar un kit por cada 15 hectáreas de campo sembrado con soja para obtener resultados confiables. Para lograr una mayor prevención se debe utilizar un kit para un menor número de hectáreas, nunca superando las 15 hectáreas por kit.

Figura 11. Instructivo para el uso del kit adjunto en el empaque.

Precio

El precio fijado para el producto fue pensado de manera tal que se puedan cubrir los costos de producción y reportar rédito, teniendo en cuenta que la tecnología incorporada en el mismo no es utilizada actualmente por ninguna otra empresa para la detección de la roya asiática. Al no tener un competidor directo, el precio no pudo ser fijado en relación con la competencia; sin embargo, se buscó que este sea adecuado a la capacidad adquisitiva de todos los clientes, sean grandes empresas o pequeños productores. El precio establecido para 100 kits es de \$2500. Esta cantidad permite la detección de roya asiática en 1.500 hectáreas de plantación, ya que se considera para una detección segura, la utilización de un kit por cada quince hectáreas de plantación.

Las condiciones de pago pueden ser en efectivo o crédito, con la opción de dividir el pago hasta en 6 cuotas. Además, se ofrece una reducción del precio de lista de un 10% con la compra de más de las 2000 unidades y un descuento del 5% adicional si se abona el total de la factura dentro de los 30 días luego de efectuada la compra.

Promoción

Publicidad

Los anuncios televisivos aparecerán únicamente en canales y programas de campo como lo son InfoCampo y Canal Rural. También se publicitará el producto mediante gráficas en revistas rurales.

Promoción y Fuerza de Ventas

Para dar a conocer nuestro producto, se repartirán 1000 kits entre empresas de servicio de monitoreo de cultivos y empresas dedicadas a la venta de productos agropecuarios. Esto permitirá comenzar a captar clientes e incentivar y educar al cliente en la utilización de productos de detección temprana como medida de prevención sanitaria en el cultivo de la soja, permitiéndoles incurrir en menores pérdidas económicas. Adicionalmente, se aplicará un descuento especial del 15% a las cinco primeras compras al por mayor realizadas, para acelerar aún más el proceso de captación de nuevos clientes.

Relaciones Públicas

Se pretende tener un stand durante la próxima Expo Rural en Capital Federal en el cual se ofrecerá información acerca de las características del producto, su utilización, beneficios y descuentos, y promociones disponibles.

Plaza

El producto será comercializado directamente al consumidor final o a una empresa distribuidora (empresas de venta de agroquímicos). La distribución del producto a través de un canal directo permitirá mantener un contacto directo con el cliente, ya sea con un productor agrícola o un técnico perteneciente a una empresa de monitoreo ambiental.

Algunos ejemplos de empresas que ofrecen servicios de monitoreo de plagas y enfermedades fúngicas, con las cuales se podría generar una alianza comercial son las siguientes:

- HALCON: es una empresa de monitoreo de plagas y otros problemas sanitarios de cultivos. Ejerce su acción principalmente en el norte y centro de Córdoba.
- SMC: Monitoreo de cultivo. Esta empresa ofrece el servicio de “monitoreo puntual” para la detección de la roya de la soja. Toman muestras de los cultivos y las envían al laboratorio. Luego, elaboran un informe con recomendaciones de acuerdo a los resultados obtenidos.
- Protección vegetal: Una empresa de monitoreo que desde el 2005 ofrecen el servicio de diagnóstico de la roya de la soja.

Como ya se mencionó, el producto será también comercializado a empresas de agroquímicos para su distribución al consumidor final. A continuación se detallan algunas de estas empresas que comercializan productos contra la roya asiática de la soja:

- Facyt: es una empresa nacional, dedicada a la formulación, fabricación y comercialización de agroproductos como fertilizantes, coadyuvantes, inoculantes, fungicidas, herbicidas e insecticidas. Se encuentra ubicada de forma estratégica sobre la autopista Córdoba-Rosario en la localidad de Laguna Larga, provincia de Córdoba. La ventaja es que posee

una amplia red comercial de agente de ventas y centros de distribución en todo el país. Actualmente exporta a Uruguay y Paraguay.

- Agrofina: Empresa que desarrolla, produce y comercializa productos agroquímicos. Para combatir la roya asiática de la soja ofrece fungicidas como el CLEAN LEAF 25[®] (buconazole 25%) y el GARDNER[®] (Difenoconazole 25%).
- Dupont: Empresa internacional que comercializa fungicidas contra la roya de la soja como Fusión[®] y STINGER[®], con acción curativa post infectiva, para el control de enfermedades en los cultivos de trigo, soja y maní.

El local de producción junto con las oficinas administrativas se localizará en el barrio de Villa Urquiza en Capital Federal, ya que se considera de suma importancia estar cerca de los proveedores. La mayoría de los clientes se encuentran en zonas rurales del país, siendo las regiones de mayor densidad de clientes las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y en menor medida, Buenos Aires.

El siguiente mapa (Fig. 12) ilustra la distribución del cultivo de soja a lo largo del país, lo cual se encuentra en directa relación con la distribución de nuestros clientes, sean estas empresas agroquímicas, de servicio de monitoreo ambiental o productores agrícolas.

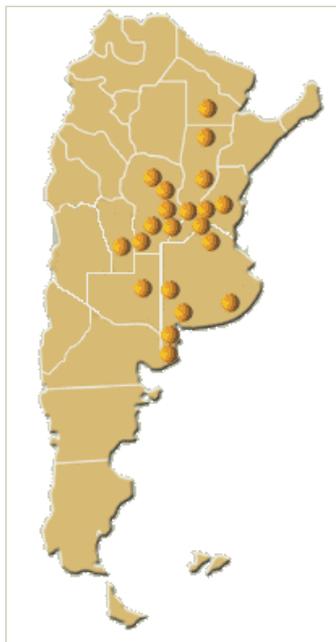


Figura 12. Distribución del cultivo de soja en Argentina

En cuanto a la logística, Safe Soybean decidió tercerizar el servicio para aquellos clientes que se encuentran más de 300 km de distancia de la empresa hacia las regiones rurales. Para los clientes que se encuentren hasta a 300 km de distancia, se ofrece un servicio de distribución gratuito propio, coordinando las entregas una vez por mes. Esto último permite ofrecerle más beneficios al cliente, y nos permite a nosotros mantener la lealtad del cliente y lograr una mayor satisfacción en la compra.

4.5 Organigrama

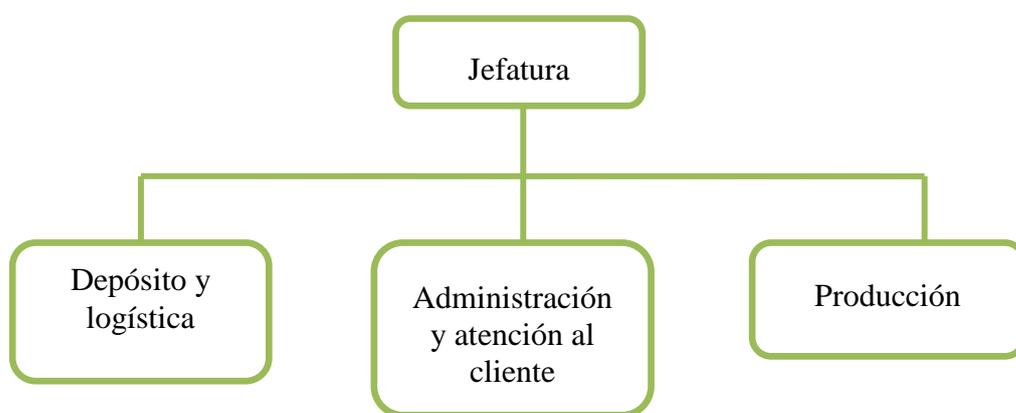


Figura 13. Organigrama de la empresa

La estructura de la organización (Fig. 13) es sencilla. La jefatura está compuesta por dos jefes asociados. Se encargan de supervisar todas las áreas de la organización y de la toma de decisiones. Poseen una comunicación directa con los distintos departamentos.

El departamento de depósito y logística está constituido por una persona cuyas tareas principales son:

- Recepción y almacenamiento de las materias primas.
- Almacenamiento del producto terminado (a -20°C).
- Entrega del producto a clientes hasta 300 kilómetros.

El departamento de administración y atención al cliente está compuesto por una persona encargada de:

- El trato con los clientes: informar acerca de nuestro producto, organizar pagos y entregas del mismo.
- Tareas de marketing.
- El trato con proveedores: pedir cotizaciones de materias primas y efectuar las compras necesarias.

El departamento de producción está constituido por dos personas con las siguientes tareas:

- Armado de los *lateral flow dipsticks* mediante el agregado de los reactivos correspondientes.
- Embalaje del producto.
- Control de calidad de cada lote del producto terminado y de los *primers* (materia prima).

Las tareas contables son tercerizadas.

4.6 Marco regulatorio

La legislación vigente que regula los avances biotecnológicos en Argentina se centra principalmente en la biotecnología agropecuaria, más precisamente en la seguridad e inocuidad de los organismos genéticamente modificados (OGM) con los que se realizan ensayos experimentales en una primera instancia y que eventualmente obtienen un permiso de comercialización. Sin embargo, el producto que la empresa ofrece en el mercado, no entra dentro de esta clasificación, sino que se trata de un producto de diagnóstico vegetal *in vitro*.

Por otra parte, tampoco se puede incluir al producto dentro de alguna de las categorías que regula el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica), ya que no se trata de un producto que afecte de forma directa al ser humano, sino que es un producto de diagnóstico vegetal.

De forma análoga, tampoco puede ser considerado un producto fitosanitario, en cual caso sería inscripto en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal, dependiente del SENASA.

Actualmente, la legislación argentina no contempla ninguna reglamentación o normativa para este tipo de productos, ya que no existen en el mercado nacional productos del mismo estilo, justamente por la falta de conciencia sobre la prevención en materia agrícola.

Considerando que el producto que se desea comercializar es completamente inocuo y los riesgos para la salud humana y medio ambiente son despreciables, se decide apegarse a las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio para su producción, cuyos cuatro principales principios son:

- 1. Facilidades Adecuadas.** Desde el punto de vista del trabajo, para que éste pueda ser realizado por los trabajadores en forma segura y apropiada. Se debe contar con suficientes salas, para que el personal trabaje sin limitaciones de espacio. El propósito y el tipo de producto a analizar deben ser considerados en el diseño de un laboratorio.
- 2. Personal Calificado.** Es importante contar con personal calificado. Esto es una decisión de manejo basada en trabajo de calidad.
- 3. Equipamientos Mantenidos y Calibrados.** Emplear equipos mantenidos y calibrados de manera apropiada. Además disponer de los registros de los mantenimientos.
- 4. Procedimientos Estándares de Operación (SOPs).** Aseguran que cada uno obedezca al único procedimiento al mismo tiempo. Es importante esta práctica, tanto para las operaciones de muestreo como en las del procedimiento analítico, porque es una manera de asegurar que la muestra, está en condiciones para el análisis.

Por otra parte, el kit de detección propuesto permite a los agricultores trabajar acorde a las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Estas normas no son obligatorias actualmente en la República Argentina. Sin embargo, permiten garantizar que los alimentos frescos son producidos en condiciones de inocuidad, disminuyendo los riesgos de contaminación y mejorando la eficiencia de la producción.

5. Análisis de la Oferta y la Demanda

Como la empresa se encuentra en un nicho del mercado y ofrece un producto que carece de competencias directas o sustitutas, la oferta de mercado está compuesta únicamente por la empresa Safe Soybean. La misma está dirigida a empresas agroquímicas o de servicio de monitoreo de campos y a productores del rubro agrícola ubicados en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, Salta, Corrientes, Chaco, Santiago del Estero y sur de Buenos Aires, ya que estas regiones son los focos principales de producción de soja y se encuentran ubicados en una zona con un clima apto para la infección por parte del hongo.

La oferta del mercado dependerá, al igual que la demanda, de la cantidad de soja cultivada en el territorio y de la incidencia que tenga la roya asiática en cada caso particular. Con respecto a la soja en la Argentina, en el período 2011/2012 la superficie plantada con soja llegó a los 18,85 millones de hectáreas y se espera que supere los 19 millones en la campaña 2012/2013, equivalente a una producción de más de 55 millones de toneladas de soja. Por ende, se espera que la demanda del producto desarrollado se acople al incremento observado en la siembra.

La actual expansión de la roya asiática de la soja amenaza con producir grandes pérdidas económicas para aquellos productores de soja, y por lo tanto es indispensable tener alguna forma de detectarla a tiempo. Es una gran necesidad a satisfacer, y un gran atractivo para aquellas empresas del rubro agrícola. La oferta actual es pequeña, pero con el paso del tiempo se espera que estas empresas pertenecientes al rubro, como lo son Monsanto y DuPont, ingresen en el mercado, logrando ofrecer en conjunto una oferta mucho mayor, respaldada en la gran demanda que habrá.

Por otro lado, los productores que se vean afectados económicamente por cultivos infectados con roya asiática se verán obligados a tomar más precauciones para la siguiente campaña. Y la mejor opción para esto es el kit de detección Safe Soybean desarrollado en este trabajo.

6. Análisis del Mercado

6.1 Análisis FODA

El siguiente esquema muestra la situación de la empresa según el análisis interno de fortalezas y debilidades, y el análisis externo de oportunidades y amenazas, que permitirán luego planificar las estrategias.



Esquema 1. Análisis FODA de la empresa.

Fortalezas

- Contamos con recursos humanos con alto conocimiento en ciencia básica, imprescindible para comprender el funcionamiento del kit y su fabricación.
- Satisfacemos una necesidad que hasta ahora no ha sido cubierta que es la de detectar de forma temprana infecciones de roya asiática en la soja, y de esta manera disminuir las pérdidas económicas.
- Somos pioneros, ya que es la primera empresa que se dedicará a tratar a la roya de la soja de manera preventiva, logrando su tratamiento antes de la aparición de los síntomas.
- El producto es una gran innovación, no existe un producto similar en el mercado actual para este tipo de cultivo.
- Ausencia de competidores directos.
- Alto poder de negociación con nuestros clientes, por ser actualmente los únicos en el mercado que elaboran un producto que permite la prevención de futuras y potenciales pérdidas.
- El producto es un kit portátil, de fácil manipulación, que provee resultados muy confiables debido a la técnica utilizada (LAMP-PCR).
- No se necesita de una gran infraestructura para poder llevar a cabo la fabricación del producto.

Oportunidades

- Actualmente el cultivo de la soja se está extendiendo a regiones que años atrás no poseían las condiciones climáticas necesarias para su crecimiento. Esto se debe a las nuevas generaciones de soja transgénica que pueden ser cultivadas en regiones con características climáticas muy distintas. El aumento del cultivo de la soja en Argentina trae consigo un aumento de la roya asiática de la soja, por lo que existe una posibilidad de expansión de la empresa a futuro.
- La tecnología aplicada en el desarrollo del kit, puede ser también utilizada para la fabricación de otros kits de detección de distintas enfermedades en cultivos diferentes, como es en el caso de los cítricos que también son altamente cultivados en el país y que suelen ser atacados por el cancro de los cítricos (Citrus Bacterial Canker).

- En la Argentina existen varias empresas que ofrecen el servicio de monitoreo de campos para la detección de enfermedades fúngicas, entre ellas la roya asiática de la soja. Se detecta la oportunidad de comercializar el kit de detección Safe Soybean a estas empresas permitiendo que los clientes obtengan resultados confiables de forma rápida y sencilla. El kit de detección permitirá a estas empresas detectar la enfermedad en cuestión de forma temprana, brindando rápidas respuestas a sus clientes.
- La posibilidad de establecer una alianza comercial con empresas dedicadas a la venta de productos agropecuarios es una gran oportunidad para Safe Soybean. Estas empresas podrán comercializar nuestro producto como un **kit de prevención** contra la roya asiática. En caso de detectar el hongo en los cultivos de soja, la empresa distribuidora ofrecerá los productos químicos adecuados para combatir la infección. Además, como el kit Safe Soybean permite detectar la enfermedad antes de observar lesiones en los cultivos, el agricultor podrá atacar al hongo en estadios más tempranos, y los productos agroquímicos darán mejores resultados. La venta del producto a este tipo de empresas nos permitirá abarcar mayores regiones del país aprovechando los distintos puntos de distribución de estas empresas y su experiencia en este tipo de mercado.

Debilidades

- Bajo poder de negociación con los proveedores, ya que no existe un gran número de empresas que provean los insumos necesarios, sin los cuales es imposible el desarrollo del producto.
- Falta de capacidades para fabricar a gran escala como lo harían potenciales competidores, empresas pertenecientes al rubro agrícola como por ejemplo Monsanto y DuPont.

Amenazas

- Existen en el mercado grandes empresas que se dedican a la fabricación de productos agrícolas, como lo es Monsanto, que poseen las dimensiones y capital necesarios para imitar nuestra tecnología. A su vez, estas empresas buscan siempre el desarrollo de nuevas especies de soja transgénica, pudiendo lograr producir una soja resistente a la roya asiática.

- Outsourcing: la fabricación de algunos de los reactivos necesarios para nuestra fabricación es tercerizada. La empresa proveedora de estos posee también el conocimiento necesario para imitar nuestra tecnología y convertirse en un competidor.

6.2 Tendencia

El uso de fungicidas comenzó a hacerse notorio a fines del siglo XX como forma de combatir a las plagas. Estos agroquímicos componen uno de los métodos más efectivos para atacar plagas ya que producen beneficios a corto plazo. Existen algunos de ellos que son muy utilizados debido a su amplio espectro para controlar la maleza.

Sin embargo, la utilización de estos productos químicos resulta en algunos casos tóxica, existiendo incluso algunos de ellos que son cancerígenos. Algunas de las posibles consecuencias de su uso extensivo pueden ser el deterioro del suelo, como también constituir una amenaza para los mismos cultivos y consumidores.

Por esta razón, es que hoy en día existe una tendencia emergente a reemplazar estos agroquímicos por productos más naturales, que no sólo contaminen menos sino que también produzcan menores efectos nocivos para el ser humano.

A pesar de los avances a nivel tecnológico y ecológico, no existe aún una respuesta conveniente para tratar la roya asiática de la soja. Actualmente la infección por parte de RAS se trata con mezclas de triazol con estrobilurina y triazol con imidazol, que son los agroquímicos que mejor funcionan dentro de los fungicidas para reducir las pérdidas por la enfermedad. **La principal desventaja de estos tratamientos radica en el momento de aplicación:** su eficacia para salvar los cultivos afectados se ve disminuida ya que la aplicación se realiza una vez detectada de manera visual la enfermedad, momento en el cual el patógeno ha colonizado toda la planta y ya es difícil revertir la situación. Unos de los principales problemas en la utilización de fungicidas es su aplicación en momentos que no son los más oportunos, especialmente porque dejan crecer la enfermedad a mayores niveles. Por lo tanto, es muy común encontrar aplicaciones realizadas tardíamente. Las consecuencias de una aplicación tardía se visualizan en una menor residualidad del fungicida, o en un menor impacto en el rendimiento. Por lo tanto, la práctica más difundida es aplicar fungicidas de

manera preventiva, encareciendo sensiblemente los costos de producción. *P.pachyrhizi* es un patógeno epidemiológicamente diferente a los actualmente conocidos. Es capaz de producir por ejemplo en Argentina de 232 a 577 pústulas por cm² de folíolo y una lesión puede tener hasta 16 pústulas. Además de ello, cada pústula puede producir esporas por 20 días y una lesión por 36 días. Es por eso que se considera a *P.pachyrhizi* como un patógeno de agresividad muy pocas veces vista. De esta forma, las aplicaciones a realizar adquieren un valor agregado diferencial.

Es aquí que entra en acción la ventaja más fuerte de Safe Soybean, ya que permite una detección temprana de la enfermedad, lo cual se traduce en la posibilidad de tratarla a tiempo, reduciendo las pérdidas provocadas por el patógeno así como también reduciendo la aplicación preventiva innecesaria en cultivos que no se encuentran infectados, lo que encarecería los costos de producción. Es indispensable satisfacer la necesidad de **prevención** de la roya asiática de la soja, para así evitar la aparición de brotes en regiones con condiciones climáticas amenas para el hongo.

6.3 Posicionamiento

Safe Soybean busca posicionarse en la mente del consumidor como un producto innovador que permite obtener de forma rápida y sencilla resultados confiables.

La principal ventaja del producto que queremos que el consumidor recuerde es que el kit Safe Soybean detecta la roya asiática antes de que el cultivo presente lesiones visibles.

Como se mencionó anteriormente, no existe en el mercado un producto de estas características para detectar este tipo de infección en la soja, por lo que no se espera tener grandes dificultades para lograr el posicionamiento buscado.

6.4 Segmentación

Previo a determinar cuál será el mercado target y mercado proyectado de la empresa, se realizaron estudios para determinar qué segmentos del mercado son los que

mayor utilidad le dejarán a la empresa, y por lo tanto, sobre qué sectores se deberá realizar un mayor esfuerzo de ventas para lograr penetrarlo exitosamente.

Para esto, se utilizó el modelo de Mapa de Segmentación de la empresa, el cual permite asignarle un grado determinado de prioridad a los diferentes segmentos del mercado abordados por la compañía. Los segmentos son definidos según criterios de clasificación. Para el caso del Mapa de Segmentación, se eligen dos criterios de clasificación, que en este caso fueron:

- Localización geográfica:

Ya que el grado de concentración de los potenciales clientes depende de las condiciones climatológicas de la región. Dentro del país, las principales zonas de producción de soja son el sur de Santa Fe, norte de la provincia de Buenos Aires, sur de Córdoba y Entre Ríos, donde las condiciones climáticas permiten obtener rendimientos altos. Sin embargo, cabe destacar que también se cultiva soja en otras zonas gracias a la producción de semillas transgénicas, que permiten que se cultive soja en zonas con condiciones climáticas que no son las óptimas, como es el caso de Santiago del Estero y Salta, entre otras. La figura 14 muestra el porcentaje de producción de soja de las principales provincias productoras de dicha legumbre. Las provincias que no fueron consideradas en el mapa geográfico, no poseen las condiciones aptas para el cultivo de soja, por lo tanto no son regiones productoras de soja.

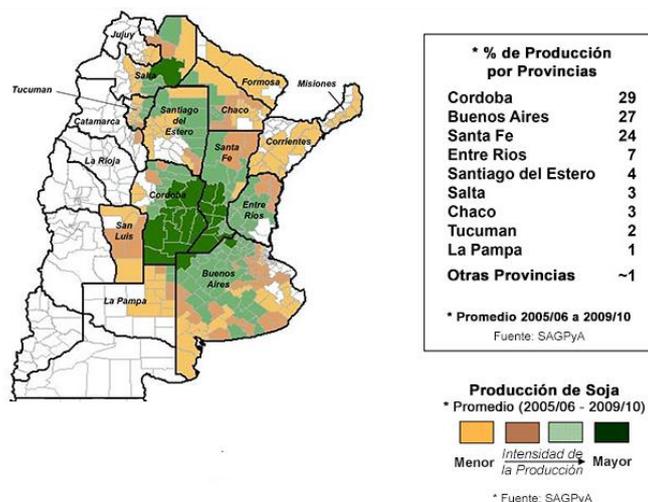


Figura 14. Intensidad de producción de soja en el territorio argentino según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación.

- Tamaño de producción:

Dependiendo de si se trate de grandes o pequeños productores de soja, la prioridad que se les dé. Los grandes productores de soja son los potenciales grandes consumidores del kit de detección, ya que sus utilidades están atadas al rendimiento obtenido por el cultivo de soja de grandes extensiones de territorio.

En base a estos dos criterios de clasificación, se confeccionó el Mapa de Segmentación (Fig.15) en el cual se pueden observar cuáles son los segmentos de mayor prioridad para la empresa:

| Región/Tamaño de productor | Pequeños Productores | Medianos Productores | Grandes Productores |
|----------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Sur Santa Fe | Orange | Red | Red |
| Norte Buenos Aires | Orange | Red | Red |
| Sur Córdoba | Orange | Red | Red |
| Entre Ríos | Orange | Red | Red |
| Sur Buenos Aires | Yellow | Orange | Orange |
| Santiago del Estero | Orange | Orange | Red |
| Salta | Orange | Orange | Red |
| Corrientes | Yellow | Yellow | Yellow |
| Chaco | Yellow | Yellow | Yellow |
| Formosa | Yellow | Yellow | Yellow |
| Misiones | Yellow | Yellow | Yellow |

| | |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| PRIORIDAD ALTA |  |
| PRIORIDAD MEDIA |  |
| PRIORIDAD BAJA |  |

Figura 15. Mapa de Segmentación según la región y el tamaño del productor

El análisis del Mapa de Segmentación determino que los segmentos con mayor prioridad para la empresa son los grandes y medianos productores de las regiones del sur de Santa Fe, norte de Buenos Aires, sur de Córdoba y Entre Ríos, y los grandes productores de Santiago del Estero y Salta, regiones en las cuales se produce soja transgénica.

6.5 Mercado proyectado

Como ya fue mencionado, en la Argentina actualmente son más de **19 millones de hectáreas** las que se utilizan para la plantación de soja. Para determinar el mercado proyectado, se debe tener en cuenta que idealmente la detección debe realizarse una vez cada treinta días ya que la soja es susceptible al patógeno durante todo el ciclo del cultivo; y que se requiere de un kit de detección por cada quince hectáreas. Por lo tanto, si la penetración del mercado fuera de un 100%, la venta de kits para la detección de soja infectada por la roya asiática sería de **1.266.666,67 unidades por mes**.

Se estima que el porcentaje de mercado penetrado durante el primer año será de un 4%, el cual irá aumentando a lo largo de los años hasta llegar a una penetración del 14%. Dicho porcentaje fue estimado teniendo en cuenta diversas variables, entre las cuales es sumamente importante mencionar la dificultad que implica para la empresa lograr que el consumidor incorpore nuevas tecnologías a su trabajo diario.

En la Tabla III se muestra el progreso de penetración de mercado durante los primeros cinco años de vida del proyecto.

| Año | Penetración del mercado | Unidades vendidas (1 unidad = 100 kits) |
|-----|-------------------------|-----------------------------------------|
| 0 | 0% | - |
| 1 | 4% | 6.072 |
| 2 | 7% | 10.640 |
| 3 | 10% | 15.200 |
| 4 | 12% | 18.240 |
| 5 | 14% | 21.280 |

Tabla III. Penetración del mercado durante el período año 0 – año 5

7. Análisis del entorno

7.1 Análisis del macroentorno

Con el fin de analizar el macroentorno de la empresa e identificar los factores del entorno general que pueden afectar a la misma de manera negativa o positiva, se realiza el análisis PESTEL, que ayudará a la planificación estratégica. Los factores del entorno que se analizan son: Políticos, Económicos, Socioculturales, Tecnológicos, Ecológicos y Legales.

Factores económicos

Hoy en día, Argentina es la tercera economía de América Latina, después de Brasil y México, y considerada una de las principales economías emergentes, formando parte del actual grupo G-20. Si se considera al PBI en términos de paridad de poder adquisitivo (la suma final de cantidades de bienes y servicios producidos en un país), según de los datos del FMI, este ha alcanzado US\$ 710.690 millones.

La Argentina se beneficia de los enormes recursos naturales que posee. Uno de los fuertes importantes de su economía es el sector agrícola y ganadero, siendo la soja, junto con el petróleo, la base de la actividad de exportación del país. Según los datos del INDEC de marzo del 2012, las exportaciones durante el 2011 fueron de una suma de US\$ 84.269 millones. De esta suma, el 35% pertenece al sector agroindustrial, el 31% al sector industrial, el 22% a productos primarios y por último, el 12% restante a combustibles y energía.

El complejo de la soja aporta la cuarta parte de las divisas que el país obtiene en concepto de importaciones. Durante el 2007, según datos del INDEC, alcanzó los US\$ 13.572 millones, pasando a ser desde entonces el principal rubro generador de divisas del país.

Además, el complejo sojero contribuye en gran parte a la economía nacional creando nuevas fuentes de empleo, ya que para su producción se requiere de productores, acopiadores, corredores, transportistas, industrias, puertos, envasados, entre otros, sumando aproximadamente 263 mil personas empleadas en esta actividad lo que implica que más de un millón de personas dependen directamente de los ingresos que genera la producción de la soja.

Factores legales

En el 2007 se dispusieron medidas que modificaron los derechos de exportación, para lograr una redistribución y reducción de precios internos. Sin embargo, estas medidas no fueron bien vistas, lo que derivó en el dictado del Decreto 904/08: En el 2009 se emitió el Decreto de Necesidad y Urgencia n° 206/2009 por parte del Poder Ejecutivo de la Argentina. Por dicho decreto se creó un “Fondo Federal Solidario” para financiar en las provincias obras que mejoren la infraestructura sanitaria, educativa, vial y hospitalaria entre otras. Este fondo está compuesto por el 30% de lo que el Estado Nacional percibe en concepto de exportación de soja y sus derivados, lo que significa que el 30% de lo recaudado por los productores que exportan soja, es destinado al financiamiento de obras públicas.

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Soja | (U\$S millones) 1.200 |
| Derivados | (U\$S millones) 2.800 |
| Total Fondo Federal Solidario | U\$S millones 4.000 |

Tabla IV. Ingresos por Retenciones a la Soja 2009.

Además, este Fondo Federal Solidario se distribuye entre las distintas provincias de acuerdo a la Ley de Coparticipación Federal que establece los coeficientes de distribución para cada provincia.

En cuanto al marco legal en el cual se debe desarrollar la empresa Safe Soybean, el local adquirido para llevar a cabo todas las actividades necesarias debe contar con una habilitación por parte del SENASA, organismo responsable de garantizar y certificar la sanidad y calidad de la producción agropecuaria, pesquera y forestal. El tiempo de demora del mismo pueden variar entre seis meses a dos años.

Factores políticos

Políticamente, la Argentina atraviesa una crisis de carácter fiscal debida a la incapacidad de financiar el gasto público. La crisis se desencadena por una caída en la

recaudación tributaria y el aumento del gasto público. Además el modelo macroeconómico es muy cuestionado por sectores industriales orientados al mercado interno, así como también el tipo de cambio y la devaluación de la moneda argentina.

A causa de la imposibilidad de financiar el gasto público es que se han creado medidas como por ejemplo el Decreto 904/08 que buscan lograr nuevas fuentes de ingreso mediante la retención de exportaciones a la soja.

Por otro lado el atraso del tipo cambiario impide que se generen reservas de dólares por parte del BCRA provenientes de la exportación de la soja, cuyo precio por tonelada ha aumentado notablemente en este último tiempo. Actualmente supera los U\$S 600 por tonelada de soja, como consecuencia de la fuerte sequía de Estados Unidos, provocando una mayor demanda de soja por parte del principal productor de soja.

Actualmente, el país es muy sensible a cualquier pequeña variación en los precios de la soja, ya que una disminución de este repercute en distintos sectores.

Factores socioculturales

Uno de los principales factores socioculturales es el rápido aumento de la población, lo cual se traduce en un aumento de la demanda de materias primas, como la soja, para la producción de alimentos. Al haber un aumento constante en la producción de soja, aumenta la posibilidad de encontrar cultivos infectados con roya asiática, lo cual lleva a tomar medidas preventivas.

Otro factor sociocultural que influye en este emprendimiento es el aumento de personas capacitadas en el área de la agroindustria y en análisis genéticos, lo cual facilitará la búsqueda de personas capacitadas para trabajar en este proyecto.

Hoy en día existe una tendencia creciente a utilizar kits de detección temprana como el que se desarrollará ya que permiten, en el área agrícola, evitar el uso innecesario de sustancias químicas, obteniendo productos más naturales e inocuos. Se disminuyen las pérdidas de dinero al permitir poder tomar las medidas necesarias contra una infección mucho tiempo antes de que las infecciones se observen a simple vista.

Por último, un factor sociocultural que afecta positivamente a este negocio es la opinión negativa de muchas personas acerca de los alimentos transgénicos, lo cual impulsa la

utilización de otros medios para detectar la infección en el cultivo sin necesidad de modificar al cultivo en sí.

Factores ecológicos

Las épocas de tormentas y fuertes vientos permiten el esparcimiento de las esporas de la roya asiática que pueden llegar a infectar cultivos muy lejanos unos de otros.

Las condiciones climáticas que favorecen la infección por *Phakopsora pachyrhizi* son temperaturas óptimas de entre 18 a 25°C y tiempo húmedo, por ende cualquier factor que tenga un impacto sobre el clima aumentando la cantidad de lluvias, favorecerá las condiciones para la infección por parte de este hongo.

La soja no es solo cultivada en la zona pampeana, sino que gracias a los avances en el desarrollo de soja transgénica se cultivan también en el noroeste, el noreste y el oeste de la Argentina (fenómeno conocido como Pampeanización). Se comenzaron a utilizar zonas antiguamente ganaderas, derribando cientos de hectáreas de bosques y montes nativos para el cultivo de soja. La falta de regulación en esta actividad ocasiona un gran impacto ambiental, lo cual puede llevar consigo un cambio climático en las áreas afectadas.

Factores tecnológicos

Se destacan grandes avances tecnológicos en los últimos años en el sector agropecuario, principalmente en la producción de soja. Los cambios tecnológicos más importantes en el sector es el avance genético de semillas, herbicidas y fertilizantes. Las aplicaciones biotecnológicas a los cultivos de soja han permitido aumentar la velocidad de los procesos productivos.

Un factor tecnológico clave son los avances en el área de la genética molecular que permiten el desarrollo de este producto. Principalmente, la invención de LAMP-PCR, la cual posee mayor especificidad que la PCR convencional, muy eficiente y rápida con la ventaja de que se lleva a cabo bajo condiciones isotérmicas.

7.2 Análisis del microentorno: La Industria

La situación de la empresa en relación con el mercado se analiza a través del modelo de las Cinco Fuerzas de Porter.

Poder de negociación de los clientes

El producto final será comercializado de tres formas:

- A través de un canal directo al consumidor final: los productores de soja.
- A empresas de monitoreo, cuyo trabajo será ampliamente facilitado al disponer de un kit que simplifique la detección del patógeno.
- A empresas reconocidas del área de la agricultura con una importante experiencia en el ámbito y reconocimiento por parte del consumidor final, lo cual ayudará a la más rápida penetración en el mercado.

Consideramos que nuestros clientes podrían llegar a tener un bajo poder de negociación debido a que somos la única empresa que ofrece un producto de este tipo. Por otra parte, algunos de nuestras empresas compradoras pueden llegar a tener la infraestructura y capital necesario para poder desarrollar un producto similar. Sin embargo, el patentamiento de la aplicación del producto final impediría esta amenaza, reduciendo el poder de negociación de los clientes.

Poder de negociación de los proveedores

Los proveedores tienen un alto poder de negociación debido a que las materias primas que necesitamos para la producción son materiales de no muy fácil acceso y comercializado por pocas empresas.

Con respecto a los *primers* necesarios para la elaboración, se tendrá un arreglo con la empresa productora debido a la gran cantidad que se requiere.

Un problema importante es la barrera a las importaciones, lo cual nos obliga a comprar principalmente a empresas argentinas, cuyo poder de negociación aumenta considerablemente.

Amenaza de productos sustitutos

Como ya se aclaró anteriormente, no existe en el mercado un producto similar que permita detectar la infección por roya asiática en la soja antes de que se observen daños en el cultivo. Hoy en día la detección de la enfermedad se realiza por inspección visual del cultivo. Cuando se la detecta por este método, la infección se encuentra en un estadio del desarrollo muy avanzado, en el cual el daño provocado es irreversible, lo que provoca grandes pérdidas económicas.

Por otro lado, las empresas de investigación dedicadas al agro podrían llegar a desarrollar nuevos tipos del cultivo con genes de resistencia a *Phakopsora pachyrhizi*, lo cual dejaría a nuestro producto sin utilidad. Sin embargo, este tipo de desarrollos requieren de una gran inversión de tiempo y dinero destinados a investigación, además de que mucha gente se opone a estos tipos de cultivos.

Amenaza de nuevos competidores

Esta amenaza depende de las barreras de entrada que existen en el mercado las cuales definen un acceso fácil o difícil. A continuación detallamos las barreras de entradas principales en nuestro mercado:

- Acceso a proveedores exclusivos: Los descuentos emitidos por las empresas proveedoras de las materias primas nos permiten disminuir los costos de producción y dificultar la entrada de competidores potenciales.
- Requerimiento de capital: no es un negocio que requiera una gran inversión. Por este motivo hay una gran amenaza por parte de nuestros clientes distribuidores y de nuestros proveedores que poseen la información necesaria para poder desarrollar un producto similar.
- Acceso a canales de distribución: nuestra relación con los principales distribuidores de productos agropecuarios aumenta la dificultad de entrada para nuevos competidores.
- Barrera a las importaciones: este problema desmotiva a posibles competidores a insertarse en este tipo de negocio.

Rivalidad entre los competidores

Este aspecto define la rentabilidad del sector según los cuatro puntos anteriores. Como en este sector no hay competidores directos, la rivalidad es baja y nuestra rentabilidad será alta. Será difícil que con el tiempo no surjan nuevos competidores.

Pero se espera posicionar al producto en la mente del consumidor antes de que surjan competidores directos. También se mantendrá o aumentará nuestra participación en el mercado con el desarrollo de nuevos productos para otros tipos de infecciones y cultivos, ampliando así la cartera de negocios.

8. Análisis económico financiero

8.1 Timeline

| Actividad | Año 0 | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|-----------|-------|---------|---|
| | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero | Febrero | |
| Adquisición del local | █ | | | | | | | | | | | | |
| Habilitación del local en el SENASA | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | |
| Compra de materiales de laboratorio | | | █ | | | | | | | | | | |
| Compra equipamientos para el local | █ | █ | █ | | | | | | | | | | |
| Compra de elementos de oficina | | | █ | █ | | | | | | | | | |
| Compra rodado | | | | | | | | █ | | | | | |
| Recursos humanos (laboratorio) | | | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ |
| Recursos humanos (administrativos) | | | | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ |
| Esfuerzo de marketing | | | | | | | | | | | | | |

Tabla V. Timeline del proyecto – Año 0.

8.2 Ventas anuales estipuladas

La empresa ingresará al mercado con Safe Soybean, su primer producto. Durante el primer año de comercialización del producto (Año 1), éste debe hacerse conocido en el mercado, por lo que se necesitará de un gran esfuerzo de marketing para lograr la penetración esperada. A pesar del esfuerzo de marketing necesario para alcanzar la proyección establecida, se considera que a lo largo del ciclo de vida del producto, será totalmente factible llegar a los porcentajes de penetración estipulados, gracias a las atractivas características que presenta el producto para la satisfacción de una necesidad aun no cubierta en el mercado. En la Tabla VI se analiza cómo se espera que aumente la cuota de mercado de la empresa, comenzando con una penetración del 4% para el Año 1, y estimando aumentar dicho porcentaje en diez puntos más a lo largo de cinco años.

A partir de los porcentajes de penetración del mercado se calcularon las unidades vendidas anuales, y los ingresos por ventas esperados, partiendo de un precio por unidad (1 unidad = 100 kits) de \$2500. Así se estima que se logrará obtener en el primer año de comercialización del producto una suma superior a los \$15.000.000 en concepto de ingresos por ventas.

| Año | Penetración del mercado | Unidades vendidas (1 unidad = 100 kits) | Ingresos por ventas anuales estipuladas |
|-----|-------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0 | 0% | - | - |
| 1 | 4% | 6.072 | 15.180.000 |
| 2 | 7% | 10.640 | 26.600.000 |
| 3 | 10% | 15.200 | 38.000.000 |
| 4 | 12% | 18.240 | 45.600.000 |
| 5 | 14% | 21.280 | 53.200.000 |

Tabla VI. Proyección de ventas anuales

La etapa de desarrollo y estudio de viabilidad técnica del producto no puede iniciarse hasta tener la habilitación del laboratorio, la cual en este caso lleva alrededor de seis meses y se realiza en el SENASA.

Durante el año cero no se podrá comercializar el producto ya que todo el proceso legal de habilitación del local es fundamental para poder comenzar su producción. Entonces, el Año 0 estará compuesto únicamente por egresos. Ya durante el Año 1 el producto podrá ser comercializado bajo el marco legal y regulatorio adecuado, y por lo tanto se obtendrán ingresos.

8.3 Estructura de costos

8.3.1 Costo de inversión y Costos Anuales

La inversión del proyecto **realizada en el Año 0** es de \$1.980.889,90 dentro de la cual se consideran gastos de habilitación del laboratorio en el SENASA, adquisición del local y todos los gastos necesarios para el desarrollo del producto y gestión del proyecto. El cálculo de dicho costo se encuentra detallado en la Tabla VIII, en la cual se observa que se incluye un 3% adicional en concepto de contingencias.

Los costos de producción anuales del **Año 1**, incluyendo materias primas, sueldos, gastos de administración y comercialización, entre otros, son de unos \$14.107.861 para el primer año, pero estos irán aumentando acorde a la cantidad de unidades producidas y comercializadas durante los años posteriores.

Por otro lado, teniendo en cuenta los ingresos por ventas junto con los costos anuales, las ventas del primer año superarán los \$15.000.000, mientras que las estimadas para el siguiente año aumentarán a \$26.000.000, lo que trae aparejado a su vez un aumento en el margen de ganancias obtenidas durante el transcurso de los años.

La Tabla VII ilustra los costos, ventas y finalmente el margen de ganancia estimados para los siguientes años.

| Año | Costos Totales | Unidades vendidas (1 unidad = 100 kits) | Ingresos por ventas | FEO |
|-----|------------------------|--------------------------------------------|---------------------|------------------------|
| 0 | \$1.980.889,90 | 0 | 0 | -\$1.980.889,90 |
| 1 | \$14.107.861,49 | 6.072 | \$ 15.180.000 | \$ 350.806,29 |
| 2 | \$24.384.675,56 | 10.640 | \$ 26.600.000 | \$ 738.282,26 |
| 3 | \$34.607.529,80 | 15.200 | \$ 38.000.000 | \$ 1.146.677,81 |
| 4 | \$41.422.765,96 | 18.240 | \$ 45.600.000 | \$ 1.412.033,97 |
| 5 | \$48.238.002,10 | 21.280 | \$ 53.200.000 | \$ 1.675.130,19 |

Tabla VII. Ganancias proyectadas para el período año 0 – año 5.

*FEO: Resultado Neto + Amortizaciones + Intereses

De esta manera, las ganancias totales obtenidas durante el período año 0 – año 5 ascienden a más de \$2.000.000.

| Actividad | Año 0 | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero | Febrero |
| Adquisición del local | \$ 1.500.000,00 | | | | | | | | | | | |
| Habilitación del local en el SENASA | | | \$ 3.333,33 | \$ 3.333,33 | \$ 3.333,33 | \$ 3.333,33 | \$ 3.333,33 | \$ 3.333,33 | | | | |
| Compra de materiales de laboratorio | | | | | | \$ 14.891,00 | \$ 14.891,00 | | | | | |
| Compra equipamientos para el local | \$ 29.456,67 | \$ 29.456,67 | \$ 29.456,67 | | | | | | | | | |
| Compra de elementos de oficina | | \$ 8.514,00 | \$ 8.514,00 | \$ 8.514,00 | | | | | | | | |
| Compra rodado | | | | | | | | \$ 70.000,00 | | | | |
| Recursos humanos (laboratorio) | | | | | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 | \$ 14.000,00 |
| Recursos humanos (administrativos) | | | | | | | | \$ 13.500,00 | \$ 13.500,00 | \$ 13.500,00 | \$ 13.500,00 | \$ 13.500,00 |
| Esfuerzo de marketing | | | | | | | | | | | \$ 5.000,00 | \$ 5.000,00 |
| Costo total por mes | \$ 1.529.456,67 | \$ 37.970,67 | \$ 41.304,00 | \$ 11.847,33 | \$ 17.333,33 | \$ 32.224,33 | \$ 32.224,33 | \$ 100.833,33 | \$ 27.500,00 | \$ 27.500,00 | \$ 32.500,00 | \$ 32.500,00 |
| Costo inversión inicial | \$ 1.923.193,98 | | | | | | | | | | | |
| Contingencias (3%) | \$ 57.695,82 | | | | | | | | | | | |
| Total Costo de inversión inicial (C0) | \$ 1.980.889,80 | | | | | | | | | | | |

Tabla VIII. Costo de inversión – Año 0

8.3.1.1 Costos fijos anuales

| | Mensual | Anual | Cantidad |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|----------|
| Servicios: | | | |
| Agua | \$ 50,00 | \$ 600,00 | - |
| Luz | \$ 350,00 | \$ 4.200,00 | - |
| Gas | \$ 150,00 | \$ 1.800,00 | - |
| Internet | \$ 250,00 | \$ 3.000,00 | - |
| Telefono | \$ 180,00 | \$ 2.160,00 | - |
| Tasas municipales | \$ 230,00 | \$ 2.760,00 | - |
| Bidones de agua | \$ 92,00 | \$ 1.104,00 | - |
| | | | |
| TOTAL SERVICIOS | \$ 1.302,00 | \$ 15.624,00 | |
| Servicios de Mantenimiento: | | | |
| de instalaciones | \$ 2.500,00 | \$ 30.000,00 | - |
| de muebles y útiles | \$ 300,00 | \$ 3.600,00 | - |
| de equipos de computación | \$ 150,00 | \$ 1.800,00 | - |
| | | | |
| TOTAL SERVICIOS MANTENIMIENTO | \$ 2.950,00 | \$ 35.400,00 | |
| Empleados: | | | |
| Administrativo | \$ 5.000,00 | \$ 65.000,00 | 1 |
| Encargado de depósito | \$ 5.000,00 | \$ 65.000,00 | 1 |
| Empleado de limpieza | \$ 3.500,00 | \$ 45.500,00 | 1 |
| Técnico de laboratorio | \$ 14.000,00 | \$ 182.000,00 | 2 |
| Subtotal: | \$ 27.500,00 | \$ 357.500,00 | 5 |
| Leyes Sociales (20%) | \$ 5.500,00 | \$ 71.500,00 | |
| Aporte Patronal (1%) | \$ 275,00 | \$ 3.575,00 | |
| Viáticos (10%) | \$ 2.750,00 | \$ 35.750,00 | |
| | | | |
| TOTAL EMPLEADOS | \$ 36.025,00 | \$ 468.325,00 | |

Tabla IX. Detalle de los costos fijos

| Costos Fijos | Mensual | Anual |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| Servicios | \$ 1.302,00 | \$ 15.624,00 |
| Empleados | \$ 36.025,00 | \$ 468.325,00 |
| Librería, Papelería e Imprenta | \$ 500,00 | \$ 6.000,00 |
| Gastos Varios Fijos | \$ 500,00 | \$ 6.000,00 |
| Mantenimiento | \$ 2.950,00 | \$ 35.400,00 |
| TOTAL | \$ 41.277,00 | \$ 531.349,00 |

Tabla X. Total de costos fijos

En las Tablas IX y X se observa en detalle los costos fijos en los que la empresa incurrirá del año 0 al año 5. A pesar de que la cuota de mercado de la misma aumentará con el correr del tiempo, no se consideró necesario un aumento de la escala productiva dada la simpleza del proceso productivo y de la estructura organizacional, por lo que los costos fijos son los mismos para todos los años en los cuales se analizó la viabilidad del proyecto.

8.3.1.2 Costo variable unitario

| Materiales | Valor | CV unitario |
|---------------------------------------|-------------|--------------------|
| Tips con filtro 1000 ul Gilson | \$ 1.250,00 | \$ 25,00 |
| Tips con filtro 200 ul Gilson | \$ 1.250,00 | \$ 25,00 |
| Tips con filtro 20 ul Gilson | \$ 1.250,00 | \$ 25,00 |
| Tips con filtro 10 ul Gilson | \$ 1.250,00 | \$ 25,00 |
| Tubos Eppendorf 1,5 ml | \$ 150,00 | \$ 30,00 |
| Tubos Eppendorf 0,2 ml | \$ 620,00 | \$ 65,00 |
| Agarosa 25 g Bio-Rad | \$ 260,00 | \$ 10,40 |
| Loading Buffer 5X 500 ul | \$ 30,00 | \$ 0,08 |
| Marcador de peso molecular 1 kb 600ul | \$ 500,00 | \$ 4,16 |
| Buffer TAE 50X 1,6L | \$ 560,00 | \$ 7,00 |
| Kit Taq Polimerasa | \$ 550,00 | \$ 2,75 |
| dNTPs Mix 800 ul | \$ 750,00 | \$ 0,46 |
| Primers 1 | \$ 200,00 | \$ 1,00 |
| Primers 2 | \$ 200,00 | \$ 1,00 |
| Primers 3 | \$ 200,00 | \$ 1,00 |
| Primers 4 | \$ 200,00 | \$ 1,00 |
| Guantes de Látex | \$ 34,00 | \$ 34,00 |
| Alcohol 70% | \$ 15,00 | \$ 6,00 |
| Bromuro de etidio 1 g | \$ 500,00 | \$ 250,00 |
| Polimerasa LAMP-PCR | \$ 1.000,00 | \$ 500,00 |
| Agua destilada | \$ 15,00 | \$ 3,00 |
| Lateral Flow Dipsticks x 100u | \$ 1.150,00 | \$ 1.150,00 |
| Packaging x 100u | \$ 75,00 | \$ 75,00 |
| TOTAL | | \$ 2.241,85 |

Tabla XI. Listado de costos variables por unidad

A diferencia de los costos fijos totales, el costo variable sí irá variando a lo largo de los años ya que depende del nivel de producción de la empresa, a mayor sea la producción, mayor será el costo variable total.

8.4 Financiamiento del proyecto

Como ya fue mencionado, el proyecto requiere una inversión de \$1.980.889,90. De este monto, los socios aportarán una parte igual a \$180.889,90, y el resto será financiado a través de un crédito de \$1.800.000 solicitado a la Sociedad de Garantías Recíprocas (SGR) “Garantizar”. La TEA (tasa efectiva anual) es del 16% y el sistema de amortización a utilizar es el sistema francés (Método de Cuotas Constantes). El préstamo se devolverá en 24 cuotas mensuales fijas compuestas por los intereses más la amortización de capital de cada mes.

| | |
|--------------|-------------------------------|
| 1.800.000,00 | Importe inicial del préstamo |
| 16,00 | Tipo de interés nominal anual |
| 2 | Años de vida del préstamo |
| 12 | Pagos periódicos al año |

Tabla XII. Datos del Préstamo a la SGR Garantizar.

| Período actual | Períodos pendientes | Préstamo vivo | Pago periódico | Intereses del período | Cuota de amortización |
|----------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 24 | \$1.800.000,00 | \$88.133,60 | \$24.000,00 | \$64.133,60 |
| 1 | 23 | \$1.735.866,40 | \$88.133,60 | \$23.144,89 | \$64.988,71 |
| 2 | 22 | \$1.670.877,69 | \$88.133,60 | \$22.278,37 | \$65.855,23 |
| 3 | 21 | \$1.605.022,46 | \$88.133,60 | \$21.400,30 | \$66.733,30 |
| 4 | 20 | \$1.538.289,16 | \$88.133,60 | \$20.510,52 | \$67.623,08 |
| 5 | 19 | \$1.470.666,08 | \$88.133,60 | \$19.608,88 | \$68.524,72 |
| 6 | 18 | \$1.402.141,36 | \$88.133,60 | \$18.695,22 | \$69.438,38 |
| 7 | 17 | \$1.332.702,98 | \$88.133,60 | \$17.769,37 | \$70.364,23 |
| 8 | 16 | \$1.262.338,76 | \$88.133,60 | \$16.831,18 | \$71.302,42 |
| 9 | 15 | \$1.191.036,34 | \$88.133,60 | \$15.880,48 | \$72.253,11 |
| 10 | 14 | \$1.118.783,23 | \$88.133,60 | \$14.917,11 | \$73.216,49 |
| 11 | 13 | \$1.045.566,74 | \$88.133,60 | \$13.940,89 | \$74.192,71 |
| 12 | 12 | \$971.374,03 | \$88.133,60 | \$12.951,65 | \$75.181,95 |
| 13 | 11 | \$896.192,08 | \$88.133,60 | \$11.949,23 | \$76.184,37 |
| 14 | 10 | \$820.007,71 | \$88.133,60 | \$10.933,44 | \$77.200,16 |
| 15 | 9 | \$742.807,55 | \$88.133,60 | \$9.904,10 | \$78.229,50 |
| 16 | 8 | \$664.578,05 | \$88.133,60 | \$8.861,04 | \$79.272,56 |
| 17 | 7 | \$585.305,49 | \$88.133,60 | \$7.804,07 | \$80.329,53 |
| 18 | 6 | \$504.975,97 | \$88.133,60 | \$6.733,01 | \$81.400,59 |
| 19 | 5 | \$423.575,38 | \$88.133,60 | \$5.647,67 | \$82.485,93 |
| 20 | 4 | \$341.089,45 | \$88.133,60 | \$4.547,86 | \$83.585,74 |
| 21 | 3 | \$257.503,71 | \$88.133,60 | \$3.433,38 | \$84.700,22 |
| 22 | 2 | \$172.803,50 | \$88.133,60 | \$2.304,05 | \$85.829,55 |
| 23 | 1 | \$86.973,95 | \$88.133,60 | \$1.159,65 | \$86.973,95 |
| 24 | 0 | \$0,00 | \$0,00 | \$0,00 | \$0,00 |

Tabla XIII. Detalle de cuotas del préstamo por el Sistema Francés

8.5 Valuación del proyecto

Para el análisis de valuación del proyecto se utilizaron las siguientes herramientas financieras:

- Punto de equilibrio
- Valor Neto Actualizado (VAN)
- Tasa Interna de Retorno (TIR)
- Payback

8.5.1 Punto de equilibrio Año 1

El punto de equilibrio es el volumen de ventas en el cual el beneficio es nulo, es decir que los ingresos por ventas igualan a los costos, tanto fijos como variables. Por lo tanto, es el punto en el cual no existe ni utilidad ni pérdida. Más allá del volumen de ventas que indica el punto de equilibrio, se obtendrán ganancias netas positivas. El cálculo de dicho indicador corresponde a la ecuación (1).

$$\text{Punto de equilibrio} = \frac{\text{Costos fijos totales}}{(\text{Precio} - \text{Costo Variable Unitario})} \quad (1)$$

| | |
|-------------------------------|--------------|
| Costos Variables (por unidad) | \$ 2.241,85 |
| Total Costos Fijos | \$ 41.277,00 |
| Precio venta por unidad | \$ 2.500,00 |
| | |
| Punto de equilibrio | 160 |

Tabla XIV. Punto de equilibrio Año 1.

El cálculo del punto de equilibrio para el Año 1 a partir de la ecuación (1), arroja como resultado, un valor de 160 unidades (Tabla XIV). Esto quiere decir, que para lograr igualar la suma de los costos fijos y variables, es necesario que la empresa venda 160 unidades del producto (considerando que 1 unidad = 100 kits).

8.5.2 Valor Actualizado Neto (VAN)

El Valor Actualizado Neto permite calcular el valor presente de un determinado número de flujos de caja futuros, originados por una inversión, para poder determinar si luego de descontar el costo de inversión del proyecto, quedarán ganancias. Si el resultado de este indicador financiero es positivo, el proyecto es viable. Para su cálculo se empleó una tasa del 16% que es la que ofrece la sociedad de garantías recíprocas elegida para el financiamiento del proyecto y el resultado fue de un VAN igual a \$ 1.077.490,50.

8.5.3 Tasa Interna de Retorno (TIR)

Es la tasa real que proporciona un proyecto de inversión y es aquella que al ser utilizada como tasa de descuento en el cálculo de un VAN dará como resultado 0. Además, es un indicador de rentabilidad de un proyecto, ya que a mayor TIR, mayor rentabilidad. El cálculo de este indicador es fundamental para la toma de decisiones a la hora de determinar si el proyecto será aceptado o rechazado. La TIR calculada para dicho proyecto fue del 32%.

8.5.4 PayBack o Plazo de Recuperación

Es de gran utilidad para hacerse una idea aproximada del tiempo que se tardará en recuperar el desembolso inicial invertido en el proceso productivo. Para este proyecto, el plazo de recuperación calculado es de aproximadamente tres años y medio.

8.6 Flujo de fondos

| | Año 0 | Año 1 | Año 2 | Año 3 | Año 4 | Año 5 |
|------------------------------------------|-------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ventas | | \$15.180.000,00 | \$ 26.600.000,00 | \$ 38.000.000,00 | \$ 45.600.000,00 | \$ 53.200.000,00 |
| (Costos) | | \$14.107.861,49 | \$ 24.384.675,56 | \$34.607.529,80 | \$ 41.422.765,96 | \$ 48.238.002,12 |
| Resultado Operativo | | \$1.072.138,51 | \$2.215.324,44 | \$3.392.470,20 | \$4.177.234,04 | \$4.961.997,88 |
| (Amortizaciones) | | \$69.332,16 | \$69.332,16 | \$69.332,16 | \$69.332,16 | \$69.332,16 |
| Resultado antes de intereses e impuestos | | \$1.002.806,35 | \$2.145.992,28 | \$3.323.138,04 | \$4.107.901,88 | \$4.892.665,72 |
| (Intereses) | | \$228.977,22 | \$86.229,16 | \$0,00 | \$0,00 | \$0,00 |
| Resultado imponible | | \$773.829,14 | \$2.059.763,12 | \$3.323.138,04 | \$4.107.901,88 | \$4.892.665,72 |
| (Impuestos - Ganacias) | | \$726.240,20 | \$1.518.917,09 | \$2.303.098,31 | \$2.805.765,66 | \$3.308.433,00 |
| Resultado Neto | | -\$1.980.889,80 | \$540.846,03 | \$1.020.039,73 | \$1.302.136,22 | \$1.584.232,72 |
| Cálculo de PayBack | | -\$1.980.889,80 | -\$1.392.454,83 | -\$372.415,11 | | 3,286003184 |
| FEO (rto neto + intereses + amort) | | -\$1.980.889,80 | \$696.407,35 | \$1.089.371,89 | \$1.371.468,38 | \$1.653.564,88 |

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| Valor Actualizado Neto (16%) | \$ 1.077.490,50 |
| Tasa Interna de Retorno (TIR) | 32% |
| PayBack | 3,286003184 |

Tabla XV. Flujo de Fondos Año 0 – Año 5

9. Estrategias a futuro

9.1 Exportación del producto.

El producto será comercializado los primeros años principalmente en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Buenos Aires. Las ganancias que se esperan obtener durante los primeros cinco años permitirían en un futuro aumentar la capacidad productiva de la compañía para poder exportar el producto a países limítrofes afectados gravemente por *Phakopsora pachyrhizi* como Brasil, Bolivia y Paraguay.

9.2 Ampliación de la cartera de productos

Los grandes márgenes de ganancia que se esperan obtener en los próximos años serán invertidos para el desarrollo de otros kits de detección para otro tipo de patologías, sean en soja u otros cultivos.

Para lograr este objetivo será necesario aumentar la capacidad productiva de la empresa, aumentando el número de empleados. También se planea la creación de un departamento de Investigación y Desarrollo para la investigación y puesta a punto de nuevos productos.

Para determinar qué tipo de producto se desarrollará en un futuro se realizará una investigación del mercado para poder detectar aquello que el consumidor busca satisfacer, qué otras enfermedades están causando un daño económico considerable que lleve a los agricultores a invertir su dinero en productos como un kit de detección.

10. Conclusión

A partir de la elaboración de este proyecto, concluimos que el desarrollo y comercialización del kit de detección para roya asiática es totalmente viable y es una propuesta factible.

El kit busca satisfacer la necesidad de los agricultores argentinos de detectar la infección por roya asiática de manera temprana, permitiéndoles reducir las pérdidas generadas por este microorganismo.

Una de las ventajas de este producto es que el proceso de producción es simple, y no requiere de gran infraestructura ni de equipamientos muy costosos para su desarrollo, así como también para el consumidor final. La inversión requerida es de \$1.980.889,90 y el PayBack de 3 años y medio.

A partir del análisis económico-financiero se observa que el proyecto es rentable (TIR: 32%) y con un valor de VAN positivo de \$ 1.077.490,50.

Por último, la simplicidad de uso e innovación del kit de detección hacen de este producto único en el mercado.

11. Bibliografía

Arroyo A. María Isabel, Morales L. Gloria Patricia, Sosa V. Paula Andrea, Maestre B. Amanda: Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. *Médica Vis.* 2008, vol. 21, p. 158-175.

Barbara S. Miranda, Elisangela M. Linares, Stefan Thalhammer, Lauro T. Kubota: Development of a disposable and highly sensitive paper-based immunosensor for early diagnosis of Asian Soybean rust. *Biosensors and Bioelectronics.* 2013, vol. 45, p. 123-128.

COMITÉ NACIONAL SISTEMA PRODUCTO OLEAGINOSAS [en línea] [consulta 12 jun. 2013] <http://www.oleaginosas.org/art_140.shtml>

Goellner K., Loehrer M., Langernbach C., Conrath U., Koch E. and Schaffrath: *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular plant pathology.* Mar. 2010, vol. 11, n. 2, p. 169-77.

Ing. Agr. M Sc Marcelo Carmona. Profesor Asociado. Facultad de Agronomía Universidad de Buenos: Roya asiática de la soja. Monitoreo, Fungicidas y su relación con la calidad de aplicación y éxito de control. Una visión desde la Fitopatología. [en línea] [consulta 01 jul. 2013] <<http://www.agro.uba.ar/sites/default/files/catedras/tecnologiaaplicacion.pdf>>

Ing. Agr. Silvia G. Distéfano & Biól. Laura C. Gadbán: Evaluación de fungicidas foliares para el manejo de la Roya Asiática de la Soja (*Phakopsora pachyrhizi*) en Marcos Juárez (Pcia. de Córdoba). Campaña 2006/2007” [en línea] [consulta 01 jul. 2013] <http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/02_Red%20de%20Ensayos/_archivo/000002-Campa%C3%B1a%202006-07/000000_Informe%20Final%20Marcos%20Juarez.pdf>

Instituto Nacional de Tecnología Industrial [en línea] [consulta 01 oct 2013] <<http://www.inti.gob.ar/certificaciones/c-BPAgricolas.htm>>

L. D. Ploper, D. Escobar, A. Ivancovich, C. G. Diaz, M. Sillon, N. Formento, J. de Souza, G. Cabrera de Alvarez, V. Gonzalez, M. R. Galvez, V. Frigidi, A. del C. Ridao, M. Scandiani, I. Vicentin, A. Castro, R. Zapata, M. Rivadeneira y E. Saieg: Propuesta de protocolo para muestreo y evaluación de la Roya Asiática de la soja en Argentina. [en línea] [consulta 10 jun.

2013].

<[http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/01_Informes/archivo/000000-
Informes%20de%20campa%C3%B1as%20anteriores/000000-
Propuesta%20de%20protocolo%20para%20muestreo%20y%20evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20roya%20asi%C3%A1tica%20de%20la%20soja%20en%20argentina.pdf](http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/01_Informes/archivo/000000-
Informes%20de%20campa%C3%B1as%20anteriores/000000-
Propuesta%20de%20protocolo%20para%20muestreo%20y%20evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20roya%20asi%C3%A1tica%20de%20la%20soja%20en%20argentina.pdf)>

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000, vol 28, n. 12, p. e63.

Reid D. Frederick, Christine L. Snyder, Gary L. Peterson y Morris R. Bonde: Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection and Discrimination of the Soybean Rust Pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Mycology*. 2002, vol. 92, n. 2, p. 217-227.

Rigano Luciano A., Marano María R., Castagnaro Atilio P., Morais Do Amaral Alexandre, Vojnov Adrian A.: Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combines with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiology*. 2010, vol. 10, p. 176.

Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008, vol. 3, n. 5, p. 877-8217.

Informe Final – Campaña 2012-2013 [en línea] [consulta 7 oct. 2013]

SOCIEDAD DE GARANTIAS RECÍPROCAS [en línea] [consulta 22 nov. 2012]
<<http://www.garantizar.com.ar/productos-servicios-proyectos-de-inversion.php>>

PRIMER EXPLORER [en línea] [consulta 11 may. 2012] < <http://primerexplorer.jp/e/>>

EIKEN GENOME SITE [en línea] [consulta jun. 2012]

<<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>>

INFOAGRO [en línea] [consulta 04 oct. 2012]

<<http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>>

BIOHELIX [en línea] [consulta 25 may. 2013]

<http://www.biohelix.com/products/BESSt_Cassettes.asp>

BIOHELIX [en línea] [consulta 25 may. 2013]

<http://www.biohelix.com/products/Type_II_Cassettes.asp>

WIKIPEDIA [en línea] [consulta 17 jul. 2013]

<http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer>

WIKIPEDIA [en línea] [consulta 17 jul. 2013]

<http://es.wikipedia.org/wiki/ADN_ribos%C3%B3mico>

SENASA [en línea] [consulta 04 oct. 2013] <<http://www.sinavimo.gov.ar/pagina/informe-final-%E2%80%93campana-2012-2013>>

AGROFINA [en línea] [consulta 04 oct. 2013] <<http://www.agrofinacom.com.ar/compania.html>>

DUPONT [en línea] [consulta 04 oct. 2013]

<<http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/home.php>>

FACYT [en línea] [consulta 04 oct. 2013] <<http://www.facyt.com/index.asp>>

HALCON [en línea] [consulta 04 oct. 2013]

<<http://www.halconmonitoreos.com.ar/servicios>>

MONITOREO DE CULTIVOS [en línea] [consulta 04 oct. 2013]

<<http://www.monitoreodecultivos.com/servicios-monitoreo-cultivos.php>>

PROTECCIÓN VEGETAL [en línea] [consulta 04 oct. 2013]

<<http://www.proteccionvegetal.com.uy/main.html>>

MDZ 4 de octubre del 2012: La soja cubrirá en el país 19,7 millones de hectáreas [en línea] [consulta 12 jun. 2013] <<http://www.mdzol.com/nota/423356-la-soja-cubrira-en-el-pais-19-7-millones-de-hectareas/>>

12. Anexos

Anexo A

Secuencia nucleotídica del ADN_r de *P.pachyrhizi* (ITS1, 5.8S, ITS2)

Número de acceso: AF333488.

```

1   ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaataaaa
61  agctaaagag tgcactttat tgtggctcaa aactaaactt ttaataaac ccatttaatt
121 ggctcattga ttgataagat ctttgggcaa tggtagcttt gaaaaaagct gcaaccacc
181 tattaatcat aatctttttt tttttaactc aaagtcaaat agaatgtttt ataaatttaa
241 atatatatat ataactttta acaatggatc tctaggctct catatcgatg aagaacacag
301 tgaaatgtga taattaatgt gaattgcaga attcagtгаа tcatcaagtt tttgaacgca
361 ccttgcacct tttgggtattc caaaaggtag acctgtttga gtgtcatгаа atcttctcaa
421 cattatttct ttttttttaa gggaaattgt tggattttga gtgttgctgt tgcttttttt
481 gcagctcact ttaaataaat aaatatatat aagtttcagt atattttgat gtaataataa
541 aatcatttca tcaaaaaaat aaatatatgt gagatttatt ataacattaa ttgaatgtaa
601 attttttttt aagacctcaa atcaggtgag actaccact gaacttaagc atatcaataa
661 gcggagga

```

Secuencia nucleotídica del ADN_r de *P.meibomiae* (ITS1, 5.8S, ITS2)

Número de acceso: AF333502.

```

1   ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaataaaa
61  agcttaaaaa agagtgcact taattgtggc tctaaacaca aaacttttta tataaaccca
121 ttaaaactgg ctcagctact tcattgaagt ttttgggcaa atcacagctt tgaaaaaagt
181 tgcaaatcat ctattatatac attgtcattt tttattttat taaataacca aagtcacaaa
241 gaatgtttta taaattttta aaaatatata taacttttag caatggatct ctaggctctc
301 atatcgatga aagaacacagt gaaatgtgat aattaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat
361 catcaagttt ttgaacgcac cttgcacctt ttgggtattcc aaaaggtaga cctgtttgag
421 tgtcatgaat tattctcaac tctttcttta tttacttgaa gaaaagcatg ttggattttg
481 agtgctgctg tgtttttaata tagctcactt taaataaata gatataataa ttcttgata
541 tatatatatg gtgtaataat acaaacatt tcatcattga tttatataaa ggaatatata
601 tagtattaa ttattattat tattaaatt taagacctca aatcaggtgg gactaccac
661 tgaacttaag catatcaata agcggagga

```



```
Query 457 TTGAGTGTGGCTGTGCTcttttttttGCAGCTCACTTTAAATAAATAAATATATATAAGT-T 515
          ||||||| |||||| | ||| | ||||||| ||||||| ||||||| ||| |
Sbjct 478 TTGAGTGTGGCTGT-G-TTTTAATATAGCTCACTTTAAATAAATAGATATATA-AATTCT 534

Query 516 TCAGTATAT-T-T-TGATGTAATAATAA-AATCATTTCATCaaaaaaaaTAAATATATGTG 571
          | ||||| | | || ||||||| || ||||||| | || ||| | | |
Sbjct 535 TGTATATATATATATGGTGTAAATAATAACAAACATTTTCATCATTGATTTATATAAA-G-G 592

Query 572 AGATTTATTATAACATTAATTGAATGTAAAttttt--ttttaAGACCTCAAATCAGGTGA 629
          | || ||| || ||||| | | | | | | ||||||| |||||||
Sbjct 593 A-ATATAT-ATAGTATTAAATTATTATTATTATTAAATTTTAAGACCTCAAATCAGGTGG 650

Query 630 GACTACCCACTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 668
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 651 GACTACCCACTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 688
```

Anexo C

En este anexo se explica cómo se obtuvieron los *primers* para LAMP-PCR a partir del Software PrimerExplorer.

Ingresamos a la página <<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>> (Fig. 16). Seleccionamos el archivo correspondiente a la secuencia de *P.pachyrhizi* (Número de acceso: AF333488) en formato FASTA y seleccionamos “Primer Design”.

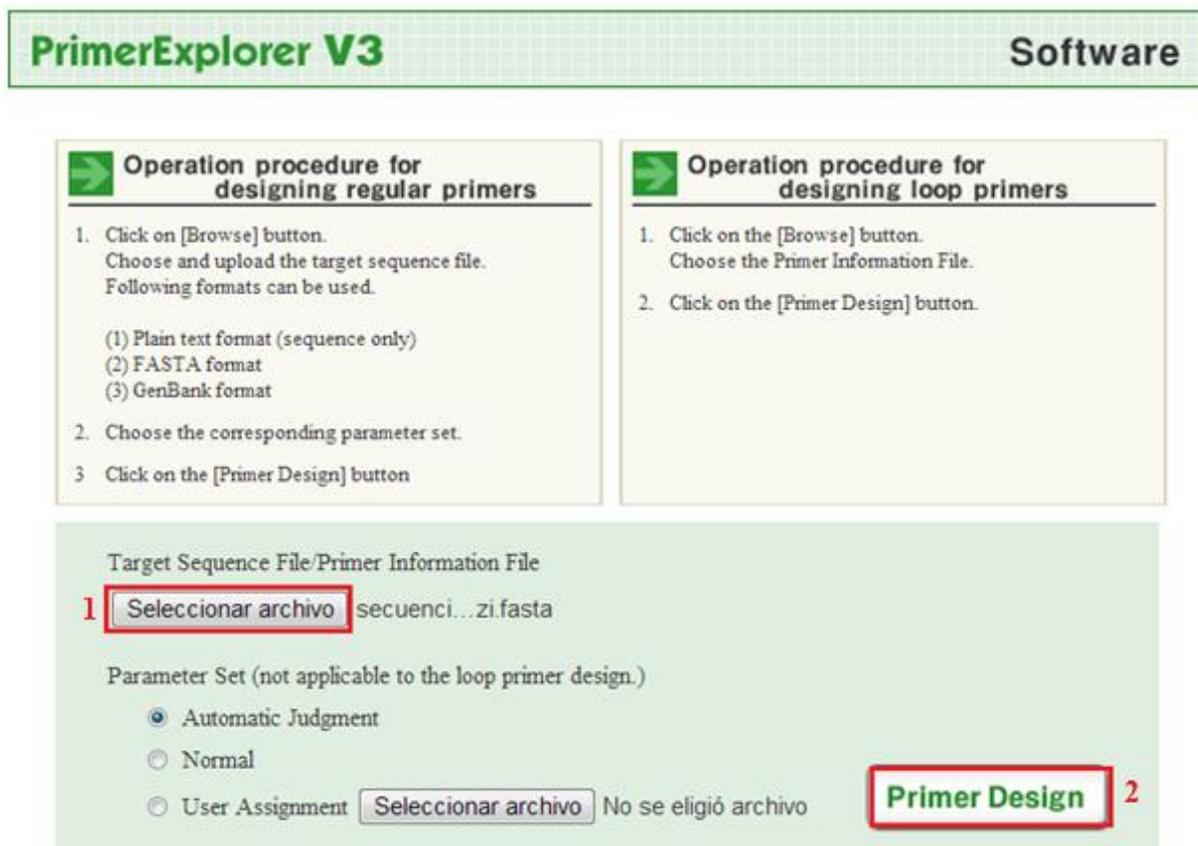


Figura 16. Selección de la secuencia nucleotídica.

Una vez cargada la secuencia deseada, seleccionamos “Generate” (Fig. 17), para generar los *primers*. Al finalizar este proceso, presionamos en “Display” para observar los resultados obtenidos (Fig. 19).

En la Figura 18 se observan los parámetros seleccionados para la generación de los *primers*. Estos parámetros son los recomendados por el software. La temperatura de

melting se establece entre los 55 y 60°C ya que es la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción de LAMP.

UPLOAD FILE : secuencia P. pachyrhizi fasta

```

1 GGAAGTAAAA GTGCTAACAA GGTTCOCTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTAATAAAA AGCTAAAGAG TGCACITTAAT 80
.....
81 TGTGGCTCAA AACTAAACTT TTTAATAAAC CCAITTAAT  GGCTCATTGA TTGATAAGAT CTTTGGGCAA TGGTAGCTTT 160
.....
161 GAAAAAAGCT GCAACCCACC TATTAATCAT AATCTTTTT TTTTAACTC AAAGTCAAAT AGAATGTTT ATAAATTTAA 240
.....
241 ATATATATAT ATAACITTTA ACAATGGATC TCTAGGCTCT CATATCGATG AAGAACACAG TGAATGTGA TAATTAATGT 320
.....
321 GAATTGCAGA ATTCASTGAA TCATCAAGT  TTTGAACGCA CCTTGCACCT TTTGGTATTC CAAAAGGTAC ACCTGTTTGA 400
.....

```

Set Mutation: Mut/Cons, Clear

Fixed Primer: F3, F2, F1, B1, B2, B3, Clear

- Select Range Option.
 - Ignore range
 - Within F2-B2 Targeting Range
 - Between F1c-B1c
- Push "Generate" button and wait during calculation.
- Push "Display" button in order to transfer to page "Primer Set List".

Figura 17. Generación de los primers para LAMP-PCR.

Parameter Set

AT rich Save Parameters

Basic Setting

| Length | | Tm | | Distances | |
|---------|----|---------|----|--------------|-----|
| F1c/B1c | 20 | F1c/B1c | 60 | (F2-B2) | 120 |
| F2/B2 | 18 | F2/B2 | 55 | Loop(F1c-F2) | 40 |
| F3/B3 | 18 | F3/B3 | 55 | F2-F3 | 0 |
| | | | | F1c-B1c | 0 |

Figura 18. Parámetros establecidos para la generación de los primers.

Primer Set List DesignId 130810004132

- Turn on the check box of a primer set to see its detailed information.
- Push "Details" button in order to transfer to page "Primer Sets Details".

6

Details Sorting rule [None] / Displayed 1 - 100 / [outputs: 906 sets]

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA ATATATATATAATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAATGTGATAAATTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAA

(Complement) tatatatataattgaaaattgttacctagagatccgagagtagtagctactcttctgtctactttacactattaattacacttaacgtcttaagtcactt

CONSENSUS(*) *****

| Primer ID | dG(dimer) | Sequence |
|-----------------------------------------|-----------|------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> [1] | -2.08 | ACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACAC |
| <input type="checkbox"/> [2] | -2.08 | ACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACA |
| <input type="checkbox"/> [3] | -2.08 | TTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACA |
| <input type="checkbox"/> [4] | -2.08 | TTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAG |
| <input type="checkbox"/> [5] | -2.08 | TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAG |
| <input type="checkbox"/> [6] | -2.16 | TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGT |
| <input type="checkbox"/> [7] | -2.16 | TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGT |
| <input type="checkbox"/> [8] | -2.16 | TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTG |
| <input type="checkbox"/> [9] | -2.16 | ACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTG |
| <input type="checkbox"/> [10] | -2.18 | TCTCTAGGCTCTCATATCGA GAAGAACACAGTGAATGTGAT |
| <input type="checkbox"/> [11] | -2.18 | TCTCTAGGCTCTCATATCGA AAGAACACAGTGAATGTGAT |
| <input type="checkbox"/> [12] | -2.08 | ACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACAC |
| <input type="checkbox"/> [13] | -2.08 | ACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACA |
| <input type="checkbox"/> [14] | -2.08 | TTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACA |
| <input type="checkbox"/> [15] | -2.08 | TTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAG |

Figura 19. Lista de los primers generados por el software.

Seleccionamos un set de primers y presionamos “Details” para ver los detalles (Fig. 19). En la Figura 20 se observan los cuatro primers generados (F3, B3, FIP y BIP) y las regiones F2, F1c, B2 y B1c. Además, se detallan las posiciones 5’ y 3’ de cada región, su temperatura de melting, longitud y proporción de GC.

| ID | dimer (minimum) dG | label | 5'pos | 3'pos | len | Tm | 5'dG | 3'dG | GCrate | Sequence |
|-------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|--------|---------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ID:1 | dimer (minimum) dG = -2.08 | F3 | 254 | 276 | 23 | 55.52 | -3.66 | -4.27 | 0.35 | ACTTTTAACAATGGATCTCTAGG |
| | | B3 | 439 | 460 | 22 | 56.49 | -3.69 | -5.20 | 0.32 | TCAAAAATCCAACAATTTCCCTT |
| | | FIP | | 47 | | | | | | GATTCAC TGAATTCTGCAATTCACA-CTCTCATATCGATGAAGAACAC |
| | | BIP | | 46 | | | | | | ATCAAGTTTTTGAACGCACCTTG-ATGTTGAGAAGATTTTCATGACAC |
| | | F2 | 277 | 298 | 22 | 55.63 | -4.60 | -4.67 | 0.41 | CTCTCATATCGATGAAGAACAC |
| | | F1c | 318 | 342 | 25 | 60.21 | -3.92 | -4.58 | 0.36 | GATTCAC TGAATTCTGCAATTCACA |
| | | B2 | 401 | 423 | 23 | 56.81 | -4.21 | -5.07 | 0.35 | ATGTTGAGAAGATTTTCATGACAC |
| | | B1c | 343 | 365 | 23 | 60.41 | -3.90 | -5.00 | 0.39 | ATCAAGTTTTTGAACGCACCTTG |

Figura 20. Detalles de los primers generados por el software.

Anexo D

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación de una secuencia específica de ADN. Se utiliza una polimerasa dependiente de ADN la cual copia el ADN molde de forma cíclica, aumentando exponencialmente el número de copias original de una región determinada del ADN en cuestión.

Para poder llevar a cabo la PCR, la ADN polimerasa requiere de un *primer* que provea de un extremo 3' libre al cual será capaz de incorporar nucleótidos libres para formar la cadena complementaria. Un *primer* es un oligonucleótido sintético de entre 18 a 25 nucleótidos de longitud y es complementario a la zona flanqueante de la región que se desea amplificar.

Para la PCR se necesitan los siguientes reactivos:

- Buffer de amplificación: Contiene elementos como KCl (Cloruro de potasio), Tris y MgCl₂ (Cloruro de magnesio, cofactor de la Taq-polimerasa).
- *Primers*: Se deben seleccionar *primers* que tengan una temperatura de hibridación similar y con un porcentaje de GC de 40-60%.
- Desoxinucleótidos trifosfato: dATP, dCTP, cGTP y dTTP. Permiten la síntesis de la cadena de ADN que se desea amplificar.
- Polimerasa: Por lo general, para este tipo de PCR se utiliza la *Taq* polimerasa. Esta polimerasa proviene de la bacteria *Termophilus aquaticus*, la cual es resistente a altas temperaturas. Por lo tanto, esta enzima es capaz de resistir las elevadas temperaturas necesarias para la PCR, que permiten la desnaturalización del ADN y el pegado de los *primers* en cada ciclo. Además, tiene una velocidad media de extensión de 60 nucleótidos por segundo.
- ADN molde o templado: El ADN del cual deseamos amplificar una región determinada.

La PCR consiste en ciclos de temperatura que comprenden los siguientes procesos:

1. **Desnaturalización:** Una temperatura elevada de 95°C aproximadamente permite la desnaturalización de la doble hebra de ADN, rompiendo los puentes de hidrógeno entre las bases, obteniendo simples cadenas de ADN.

2. **Hibridación o *Annealing*:** La temperatura disminuye a 40-65°C permitiendo el pegado de los *primers* a las hebras monocatenarias del ADN. La temperatura de esta etapa depende de los *primers* en particular y suele ser aproximadamente 5°C menos de la temperatura de *melting*. La temperatura de *melting* es la temperatura a la cual el 50% de las moléculas de ADN doble cadena están desnaturalizadas.

3. **Extensión:** En esta etapa la temperatura se eleva nuevamente a 72-75°C, la temperatura óptima para la acción de la *Taq* polimerasa. La enzima incorpora nucleótidos libres al extremo 3' de los *primers* utilizando como molde la cadena de ADN desnaturalizada.

Anexo E

En esta sección se describe el trabajo realizado en UADE Labs.

Objetivo

Comprobar el correcto diseño de los *primers* F3 y B3 para la identificación de *Phakopsora pachyrhizi* mediante la reacción de PCR convencional.

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa convencional, comúnmente llamada PCR, permite amplificar una secuencia específica de una muestra de ADN. Para esto se requiere de *primers* que hibriden con las regiones delimitantes del fragmento a amplificar.

Para identificar la presencia de la roya asiática de la soja se diseñaron cuatro *primers* para poder realizar una LAMP-PCR. Debido a la complejidad de esta reacción, se comienza con una PCR convencional para verificar la especificidad de dos de los *primers* diseñados (F3 y B3).

Los productos obtenidos se analizan mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se utiliza bromuro de etidio, un intercalante de ADN, que permite visualizar los fragmentos de ADN amplificados al exponer la placa electroforética a la luz UV. Los resultados obtenidos se comparan con las bandas de un marcador de masa molecular para determinar la longitud de las regiones de ADN amplificados. Se espera observar una banda de 208 pb aproximadamente, que corresponde al tamaño del fragmento a amplificar por los *primers* B3 y F3.

Materiales

- *Primers* B3 y F3
- Reactivos para PCR (Buffer de amplificación, dNTPs, *Taq* polimerasa)
- Agua MilliQ
- ADN_c de *P.pachyrhizi*
- Termociclador
- Eppendorffs 1,5 ml

- Pipetas (p1000, p200, p20, p10)
- Vórtex

Métodos

Se utilizaron tres muestras distintas de ADN_c de *P.pachyrhizi* provistas por el tutor de este proyecto.

Se realizó un blanco como control negativo (sin muestra de ADN).

Para la reacción de PCR se utiliza comúnmente la *Taq* polimerasa, la cual puede generar un nuevo producto de ADN de 1000 pb en 60 segundos. En este caso, para amplificar el fragmento de ADN_c de *P.pachyrhizi* de 208 pb le llevaría 12,48 segundos. Sin embargo, la polimerasa provista por el laboratorio es la *Vent* polimerasa. Esta polimerasa se caracteriza por tener actividad de *proofreading* (corregir los nucleótidos erróneamente incorporados). Por esta razón, tarda el doble de tiempo que la *Taq* polimerasa en polimerizar la nueva hebra de ADN. El tiempo para generar una nueva hebra de ADN de 208 pb para la *Vent* polimerasa es de 25 segundos aproximadamente. Estos datos son necesarios para establecer las condiciones de reacción en el termociclador.

A continuación se detallan los pasos llevados a cabo para cumplir con el objetivo de este trabajo:

- 1- Se descongelan en hielo los reactivos.
- 2- Se prepara la Master Mix para cuatro reacciones (Tabla XVI).

| Reactivo | Volumen por tubo de reacción | Volumen total para la Master Mix * |
|-------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Buffer 10x | 2,5 µl | 11 µl |
| Primer F3 | 1,0 µl | 4,4 µl |
| Primer B3 | 1,0 µl | 4,4 µl |
| dNTPs | 0,5 µl | 2,2 µl |
| Polimerasa (Vent) | 0,3 µl | 1,32 µl |
| H ₂ O | 17,7 µl | 77,88 µl |
| Total | 23,0 µl | 101,2 µl |

Tabla XVI. Master Mix

*Se calcula un 10% más para compensar errores al pipetear.

3- Se agrega a cada tubo de reacción 23 μ l de la Master Mix y 2 μ l de la muestra de ADN_c o 2 μ l de agua en el caso del blanco.

4- Los tubos de reacción se colocan en el termociclador. Las condiciones de la reacción son las siguientes:

95°C - 1'30''

95°C - 30''

55°C - 30''

72°C - 25''

x 10 (disminuyendo 1°C/ciclo)

95°C - 30''

45°C - 30''

72°C - 25''

x 30

72°C - 50''

16°C

5- Al finalizar la reacción de amplificación, se le adiciona a cada tubo de reacción 3,5 μ l de buffer de siembra (6x) y se analiza el producto de la PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Resultados y discusión

En la Figura 21 se observa los resultados de la reacción de amplificación de las distintas muestras.

La muestra “blanco” nos permite confirmar que los reactivos no se encuentran contaminados ya que no se obtuvo amplificación (no se observan bandas).

No se obtuvieron resultados positivos con la muestra de ADN_c 1 y 3. La muestra de ADN_c 1 aparenta estar degradada. El proveedor de las muestras de ADN_c de *P.pachyrhizi* nos alertó que las muestras podrían estar en mala calidad.

En cambio, la muestra de ADN_c 2 genera resultados positivos ya que se observa una banda de 200 pb aproximadamente la cual corresponde con la longitud del fragmento a amplificar por los *primers* B3 y F3.

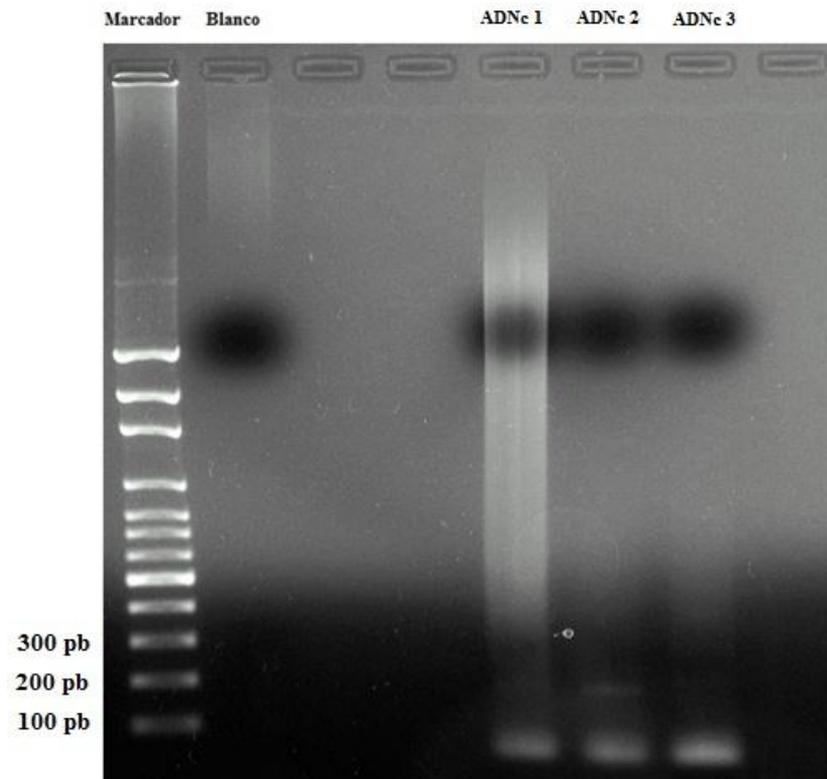


Figura 21. Electroforesis de los resultados de PCR.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, concluimos que los *primers* B3 y F3 aparentan estar bien diseñados para amplificar al ADN de *P.pachyrhizi*. Se debería repetir el análisis modificando algunos de los parámetros del ciclo de la reacción de amplificación ya que, a pesar de obtener resultados positivos con la muestra 2, la amplificación fue débil.