

Informe Final

**Proyecto FIC Región Libertador General Bernardo O'Higgins /
Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular
Facultad de Ciencias Agronómicas
Universidad de Chile**

**“Transferencia Manejo para frutales contaminados por
cobre”.**

COD IDI 40008890-0

**Jaime Auger Saavedra, Ing. Agr., MS., Ph.D.
Director Proyecto**

Santiago, 2022

“Transferencia Manejo para frutales contaminados por cobre”.

COD IDI 40008890-0

ANTECEDENTES



Actualmente en la región del Libertador General Bernardo O’Higgins existen 20.146 ha plantadas con cerezos, kiwis y nogales. Como consecuencia de la permanente amenaza de cáncer bacteriano, tizón de la flor y las Peste Negra, afectando a cerezos, kiwis y nogales respectivamente, exige utilizar programas de control químico basados en aplicaciones de cobre, como única alternativa de control.

Una potencial fuente de contaminación con cobre en la región de O’Higgins es la gran minería. Sin embargo, un importante aporte adicional es el que realiza la agricultura mediante las aspersiones con compuestos antimicrobianos a base de sales de cobre, favoreciendo la excesiva acumulación de este elemento en suelos agrícolas y en agua de riego.

La acumulación de Cu^+ en el suelo tiene efecto negativo en el almacenaje y liberación de nutrientes, en la estructura y estabilidad del suelo, el biocontrol de patógenos así como, en la degradación y/o movilidad de pesticidas.

La excesiva acumulación de cobre en suelos agrícolas y en agua de riego es un problema de contaminación que afecta la calidad y la seguridad alimentaria, debido a la concentración de Cu^{+2} especialmente en alimentos de consumo fresco como hortalizas de hoja (lechuga, espinaca) y maíz para consumo fresco, entre otros (Khan, S., *et al* 2008).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha determinado que el agua potable no debe contener más de 1,3 mg de cobre por litro de agua (1300 ppb).

Investigaciones recientes sugieren que el cobre favorece en humanos diversas patologías hepáticas y puede contribuir al desarrollo de cirrosis hepática en ausencia de factores etiológicos e hipersensibilidad a medicamentos. La exposición a cobre estimula la angiogénesis, lo cual facilita la diseminación de metástasis en personas portadoras de tumores cancerosos (Tchernitchin, A. 2015. Yoo, J.Y., *et al* 2012).

Todo lo anterior ha motivado a que:

- La Mayoría de los países europeos han limitado a **6 kg** la cantidad de Cu^+ a aplicar por hectárea año con la excepción de Alemania, Austria y Suiza que han limitado su uso a **3 kg** por hectárea al año.
- Los compuestos antimicrobianos a base de Cobre han sido prohibidos en otros países de la Unión Europea tales como Holanda y Dinamarca.
- En Australia el uso de sulfato e hidróxido de cobre son solamente permitidos bajo vigilancia de autoridades de certificación y, el uso del oxiclورو de cobre está prohibido.
- Además, si bien la aplicación de cobre es la práctica más utilizada en el control de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y de *X. arboricola* pv. *juglandis*, su uso reiterado, ha favorecido el desarrollo de cepas de *Psa*, *Pss* y *Xaj* resistentes en huertos de kiwi, cerezo y nogal en diferentes localidades del mundo y también en Chile.

Debido a ello, es necesario implementar un manejo racional del cobre que permita disminuir la contaminación medioambiental y sus negativas consecuencias, reduciendo además, los riesgos de la generación acelerada de cepas bacterianas resistentes con la pérdida de efectividad y consecuentemente, también evitando el incremento de dosis y frecuencias de aplicaciones.

Una medida de mitigación al uso reiterado de aplicaciones de cobre se fundamenta en la potencial efectividad del uso de bioantagonistas y de compuestos que estimulen los mecanismos de defensa (elicitors) en cerezo, kiwi y nogal a las principales bacteriosis que los afectan, medidas que permiten limitar el uso de cobre solo a los estadios fenológicos de mayor susceptibilidad y en presencia de condiciones medioambientales predisponentes de la enfermedad.

OBJETIVO DEL PROYECTO

- “Establecer el contenido de cobre en los suelos de huertos de cerezo, kiwi y nogal con programas intensivos en el uso de cobre y programas de manejo integrado para el control de las bacteriosis”.
- “Determinar los parámetros sanitarios y de inocuidad de la fruta producida en huertos de kiwi, cerezo y nogal bajo programas intensivos de uso de cobre y de manejo integrado”.
- “Evaluar la activación de mecanismos de defensa en cerezo, kiwi y nogal bajo programas intensivos de cobre y manejo integrado”.

DESARROLLO DEL PROYECTO Y RESULTADOS

Para lograr los objetivos del presente proyecto se procedió a evaluar programas de manejo integrado versus regimen de control de la enfermedad con uso intensivo de cobre, esto se realizó mediante la implementación de ensayos en 6 huertos seleccionados (2 cerezos, 2 kiwis y 2 nogal) de los cuales uno de cada especie en el Valle del Cachapoal y uno de cada especie en Valle del Tinguiririca (Figura 1).

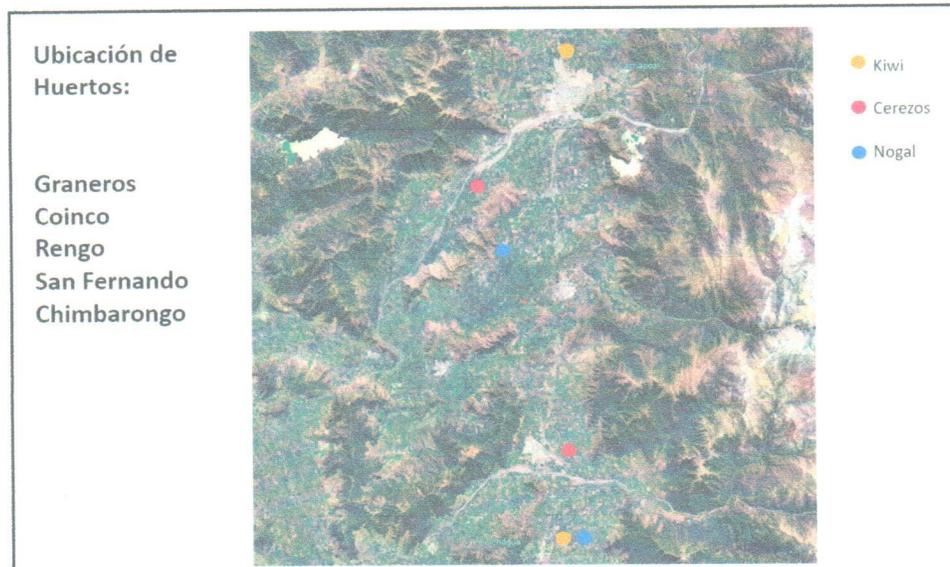


Figura 1. Distribución geográfica de los huertos utilizados en este estudio en la región de O'Higgins.

CONTENIDO DE COBRE EN EL SUELO Y EN EL AGUA DE RIEGO PRE TRATAMIENTOS

Como condición inicial se determinó el contenido de cobre en los suelos (Figura 2) y en el agua de riego (Figura 3) de cada uno de los huertos, corroborando con estos datos la existencia de altos niveles de cobre en aquellos huertos localizados en el Valle del río Cachapoal. En tanto en los huertos restantes, regados por el río Tinguiririca, los niveles de cobre en el suelo fueron bastante más bajos.

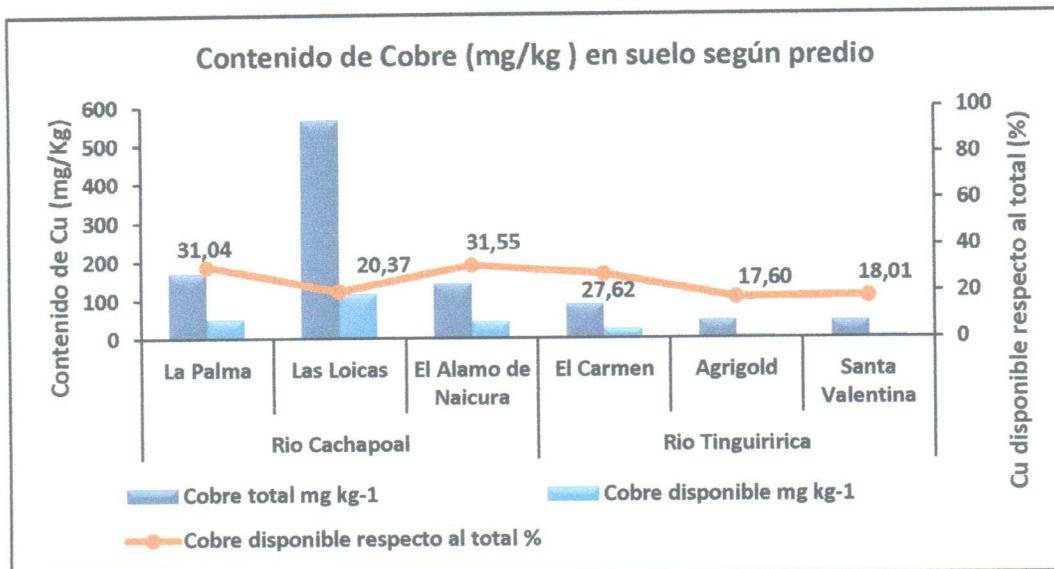


Figura 2. Contenido de Cobre (mg/kg) en suelo de predios pre-aplicación de tratamientos.

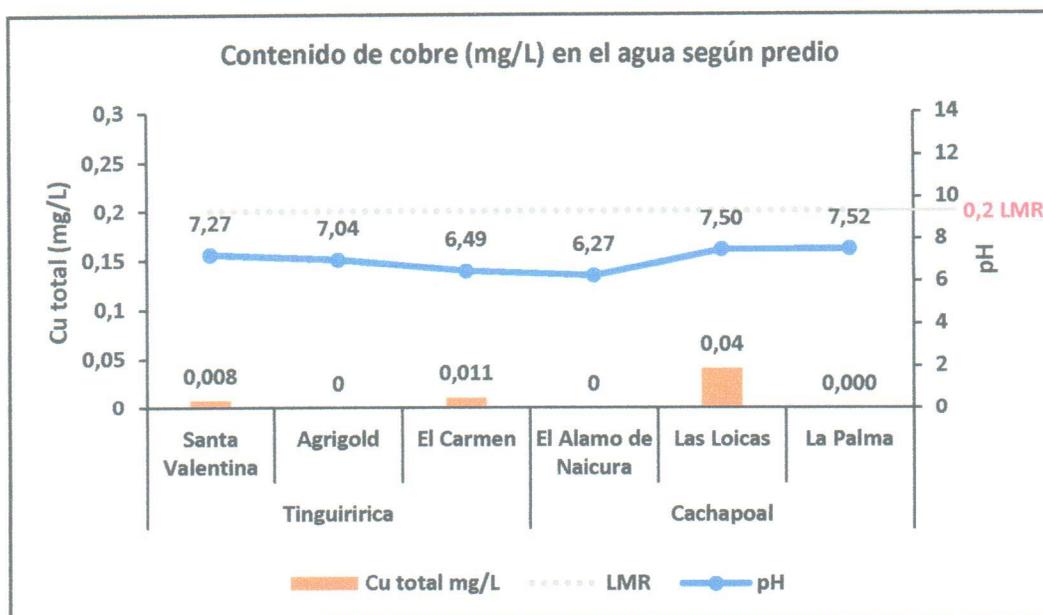


Figura 3. Contenido de Cobre total (mg/kg) en Agua de predios pre-aplicación de tratamientos (año 2019).

* Metodología de análisis: Sadzawka, et., al 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina. Límite máximo (LMR) según normativa de agua de riego NCh1333 es 0,2 Mg/L.

CONTENIDO DE COBRE EN LA FRUTA PRETRATAMIENTOS

Se evaluó también el contenido de cobre en la fruta de 2 de las especies analizadas en este estudio (Kiwi y Nogal). Se colectaron muestras de kiwi y nogal en el mes de abril del primer año de trabajo (2019); en el caso de kiwi se separó la piel de la pulpa y en el nogal se separó el pelón, la cáscara y la mariposa obteniendo de cada uno distintos niveles de Cu^{+2} . En aquellos huertos regados por aguas del río Cachapoal se determinaron altos niveles de cobre en la fruta, superando el límite máximo de residuos (LMR) establecido como riesgoso para la salud humana por la comunidad económica europea, no así en la fruta de aquellos huertos regados por aguas del río Tinguiririca (Figuras 4 y 5).

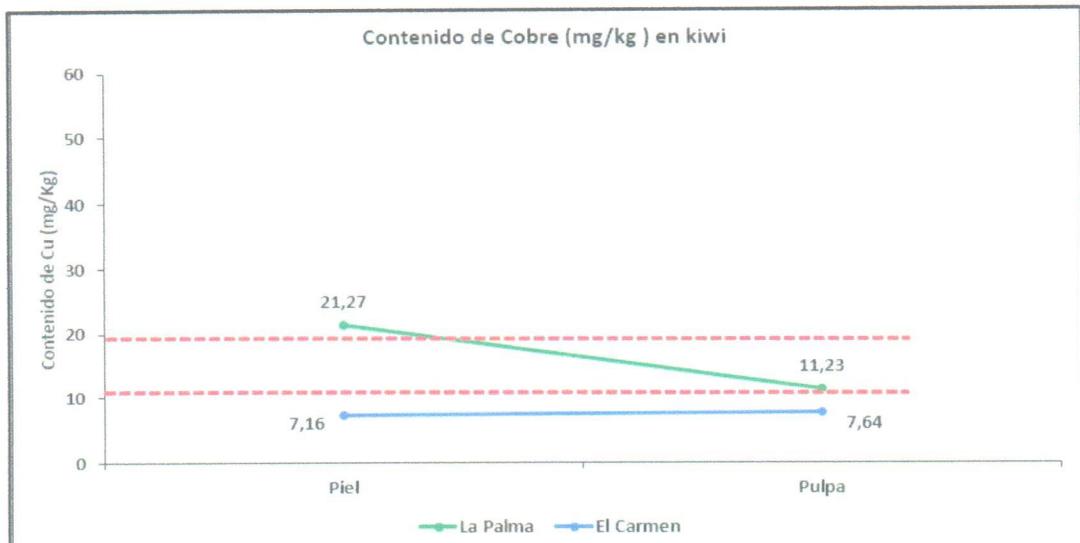


Figura 4. Contenido de Cobre (mg/kg) en Kiwi de predios pre-aplicación de tratamientos (año 2019).

El huerto localizado en el Valle del río Cachapoal superó los LMR sugeridos por la Comunidad Económica Europea, tanto en el contenido de cobre en la piel como en la pulpa, no así en la fruta del huerto ubicado en el Valle del río Tinguiririca.

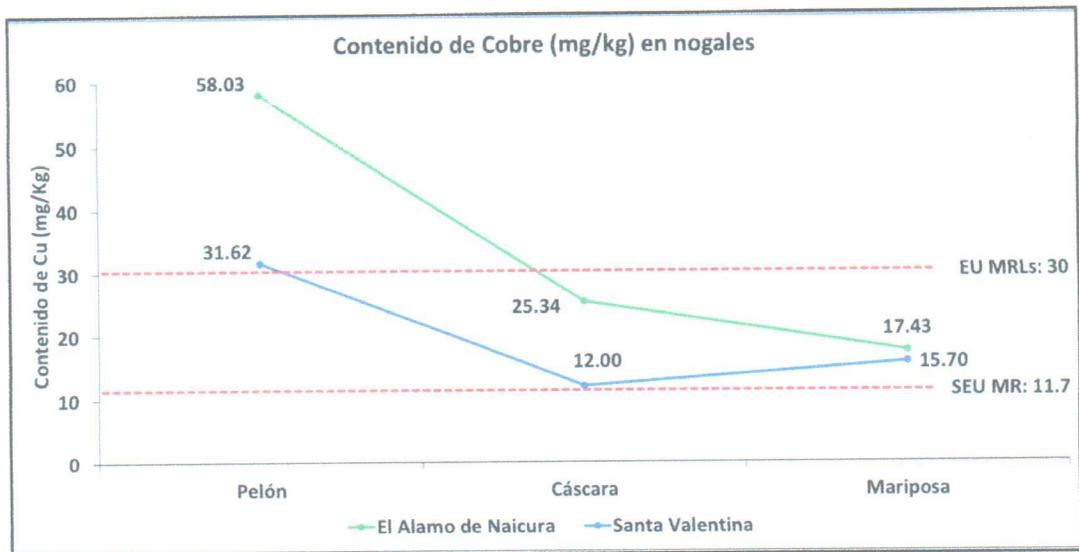


Figura 5. Contenido de Cobre (mg/kg) en Nueces de predios pre-aplicación de tratamientos (año 2019).

En nogales, en ambos huertos el contenido de cobre del pelón, cáscara y mariposa superó los límites sugeridos por la Comunidad Económica Europea.

Debido a los altos niveles de cobre detectados y con el fin de mitigar su uso, se establecieron 4 programas de manejo fitosanitario para el control de enfermedades bacterianas para cada especie, más el programa realizado por el huerto (determinado por cada uno de los productores). Cada programa se basó en un producto descrito como alternativa al Cu^{+2} para el control de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y pv. *actinidiae*, así como para *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Cerezos, nogales y kiwis fueron sometidos en dos temporadas (2019-2020 y 2020-2021) a los programas establecidos, además en el caso de los huertos de cerezos se decidió realizar una tercera temporada de aplicaciones y evaluaciones.

Cerezos

Programa de tratamiento con productos alternativos al cobre en cerezo (Figura 5)

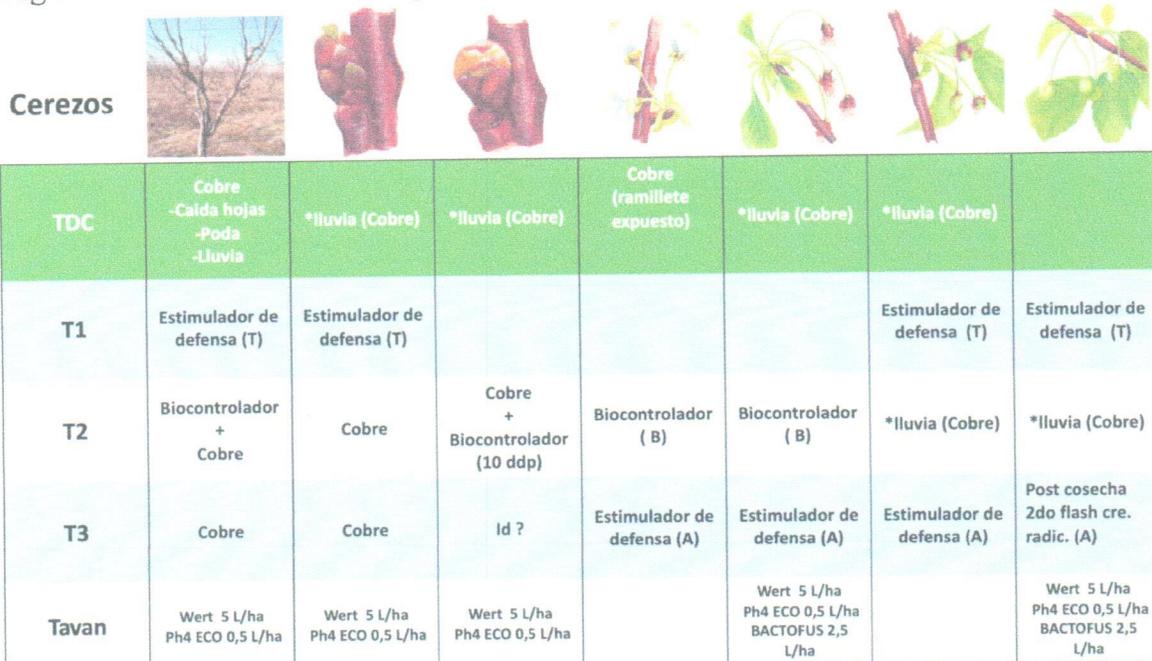


Figura 6. Programas de aplicaciones propuestos en Cerezos.

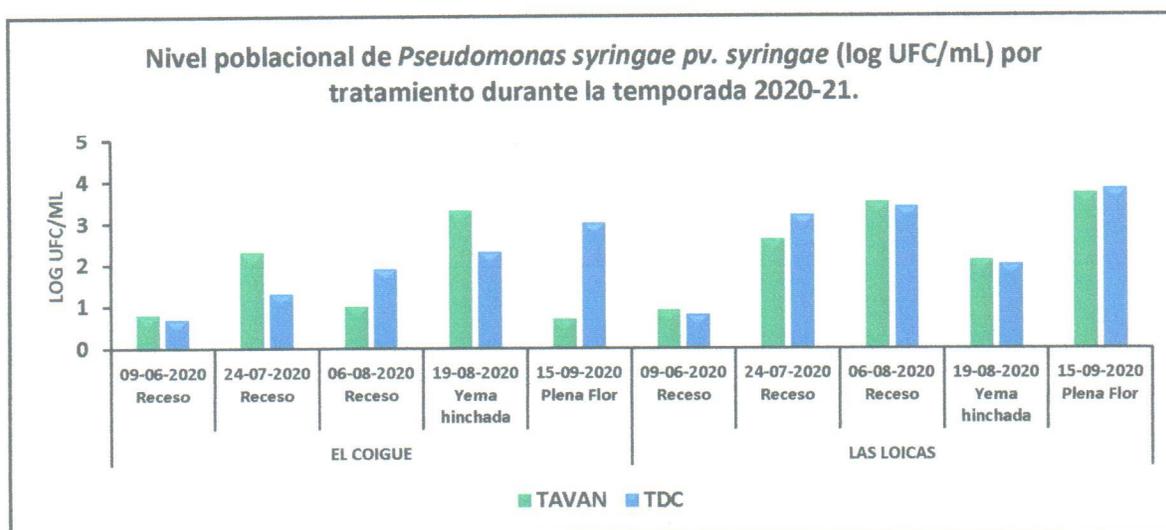


Figura 7. Nivel poblacional de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (log UFC/mL), temporada 2020-21.

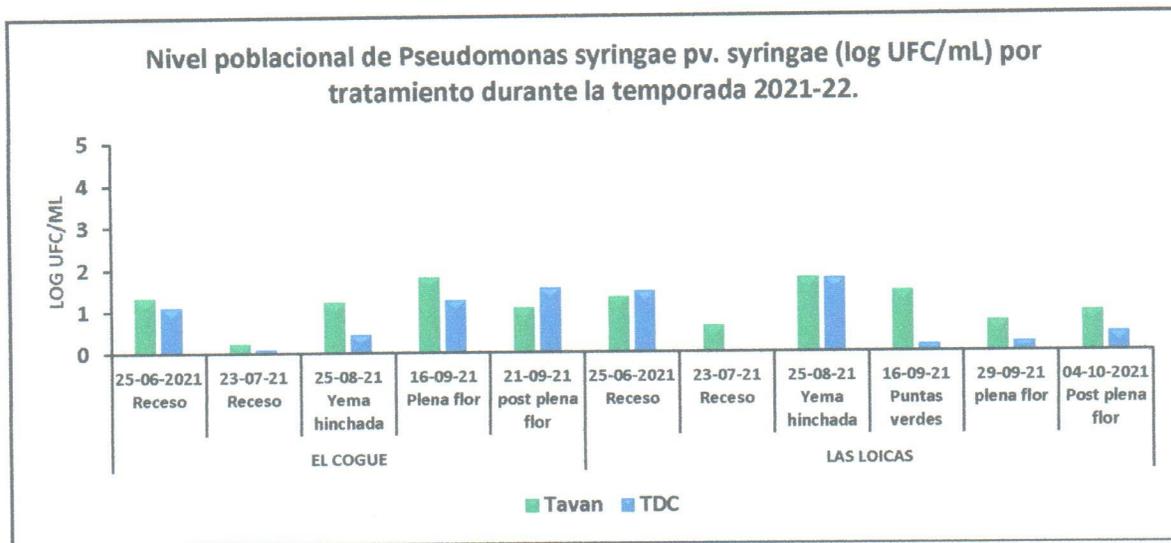


Figura 8. Nivel poblacional de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (log UFC/mL), la temporada 2021-22.

En Cerezos, al término de cada temporada se consideraron evaluaciones de poscosecha en la fruta. Se cosecharon cajas de aproximadamente 2,6 kg en promedio por repetición de cada tratamiento. Inmediatamente después de la cosecha, las cajas fueron trasladadas y almacenadas a 0°C en el Centro de estudio Post Cosecha (CEPOC), ubicado en la facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Posterior a un plazo de 30 y 60 días de almacenamiento, se realizaron evaluaciones para determinar la condición general de la fruta y posible presencia de patógenos en la fruta.

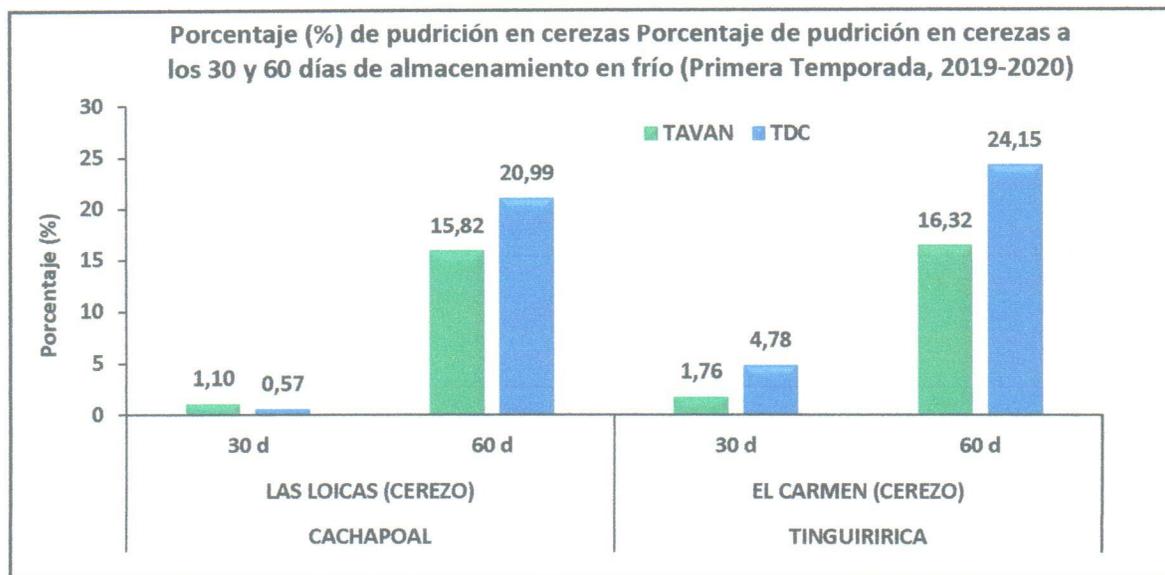


Figura 9. Porcentaje (%) de pudrición en cerezas luego de 30 y 60 días de almacenamiento en frío (Primera Temporada, 2019-2020).

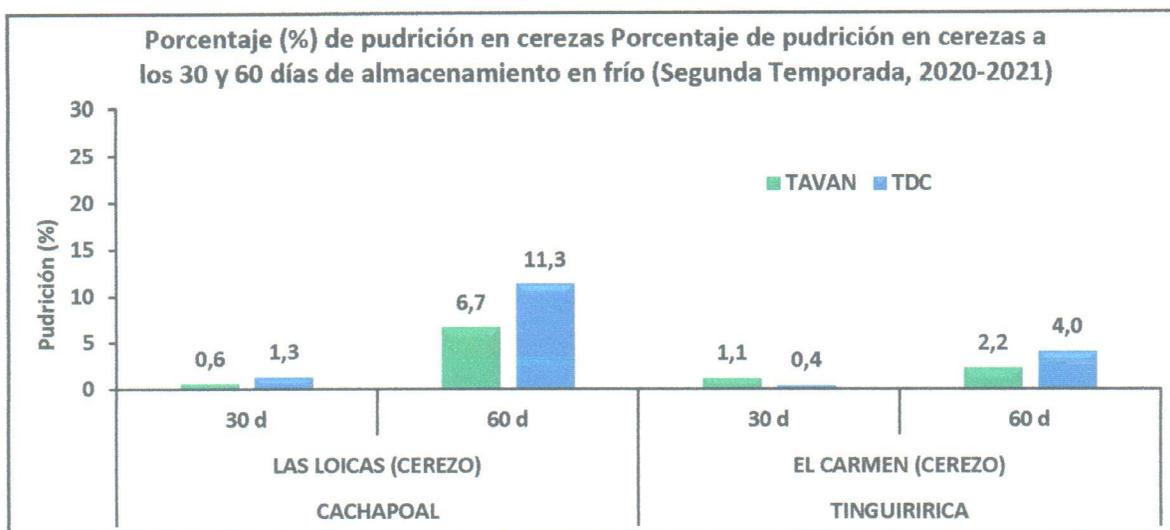


Figura 10. Porcentaje (%) de pudrición en cerezas luego de 30 y 60 días de almacenamiento en frío (Segunda Temporada, 2020-2021).



Figura 11. Porcentaje (%) de pudrición en cerezas luego de 30 y 60 días de almacenamiento en frío (Tercera Temporada, 2021-2022).

De cada caja cosechada se seleccionó una muestra de fruta, la que, junto a las colectadas al momento de cosecha, fue procesada, separadas en piel y pulpa. Estas muestras fueron liofilizadas y posteriormente, sometidas a análisis del contenido de Cobre. Con el resultado de este análisis se comprobó que la piel del fruto concentra la mayor cantidad de Cu^{+2} en comparación a la pulpa. Esto indica que las aspersiones de productos con Cobre aumentaron el contenido de Cu^{+2} acumulándose principalmente en la piel.

El nivel de Cu^{+2} en la fruta presentó variaciones con los programas alternativos de reemplazo de Cu^{+2} a través de las temporadas. Luego de tres temporadas de aplicaciones, se logró disminuir el nivel de cobre en fruta llegando a valores cercanos a los niveles de LMR establecidos por la comunidad económica Europea (5 mg/kg), no así en los programas con solo de cobre (TDC) (Figuras 12, 13 y 14).

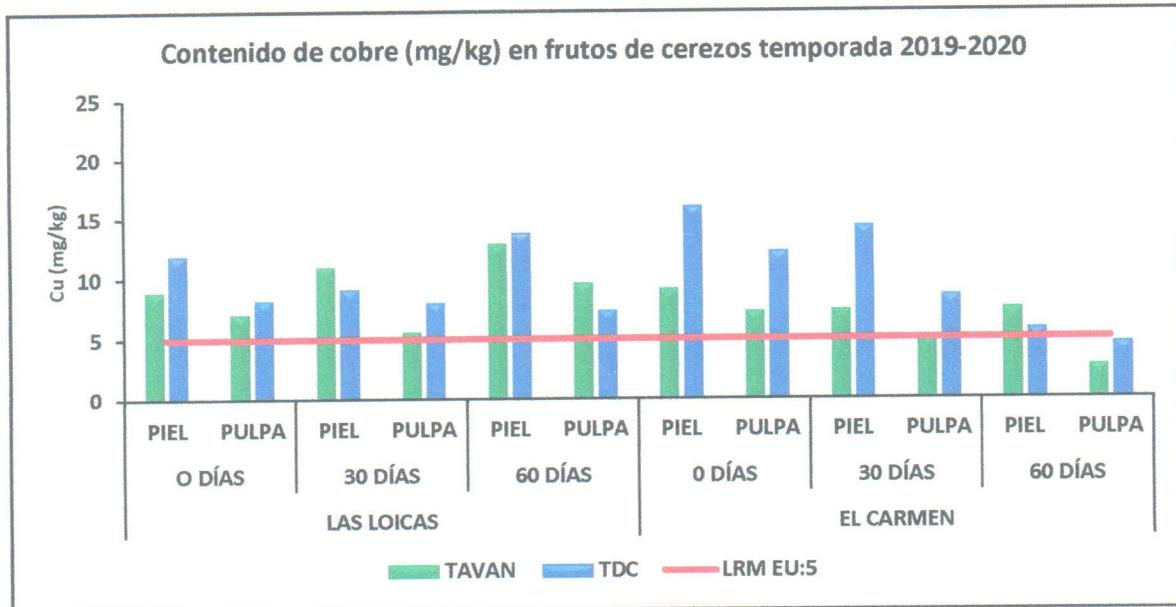


Figura 12. Contenido de Cobre (mg/kg) en Cerezas de predios post aplicación de tratamientos (temporada 2019-2020).

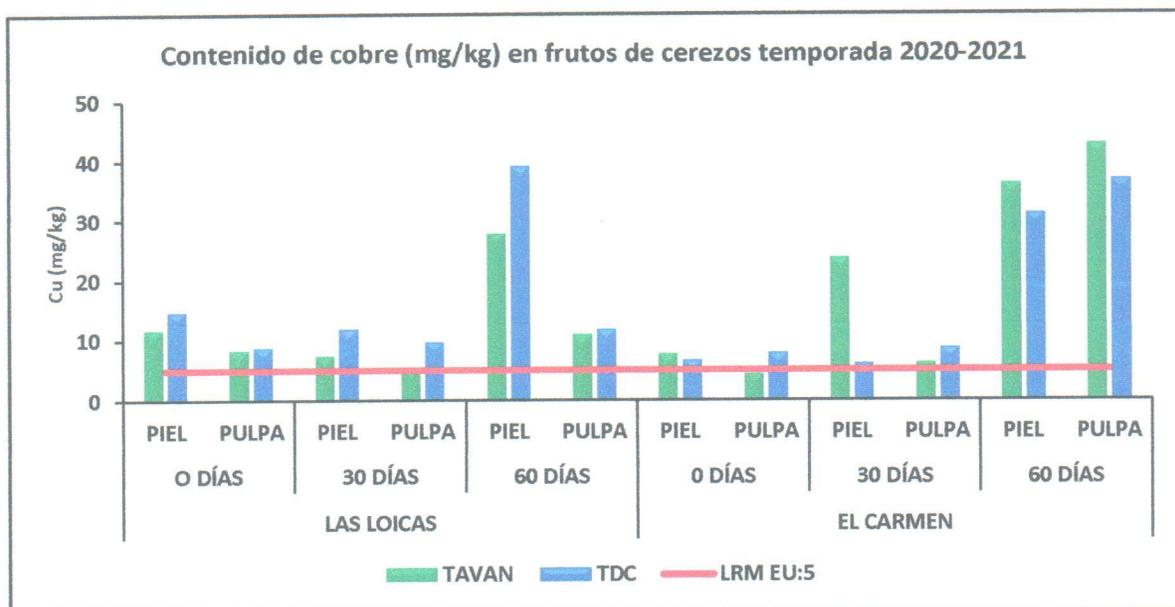


Figura 13. Contenido de Cobre (mg/kg) en Cerezas de predios post aplicación de tratamientos (temporada 2020-2021).

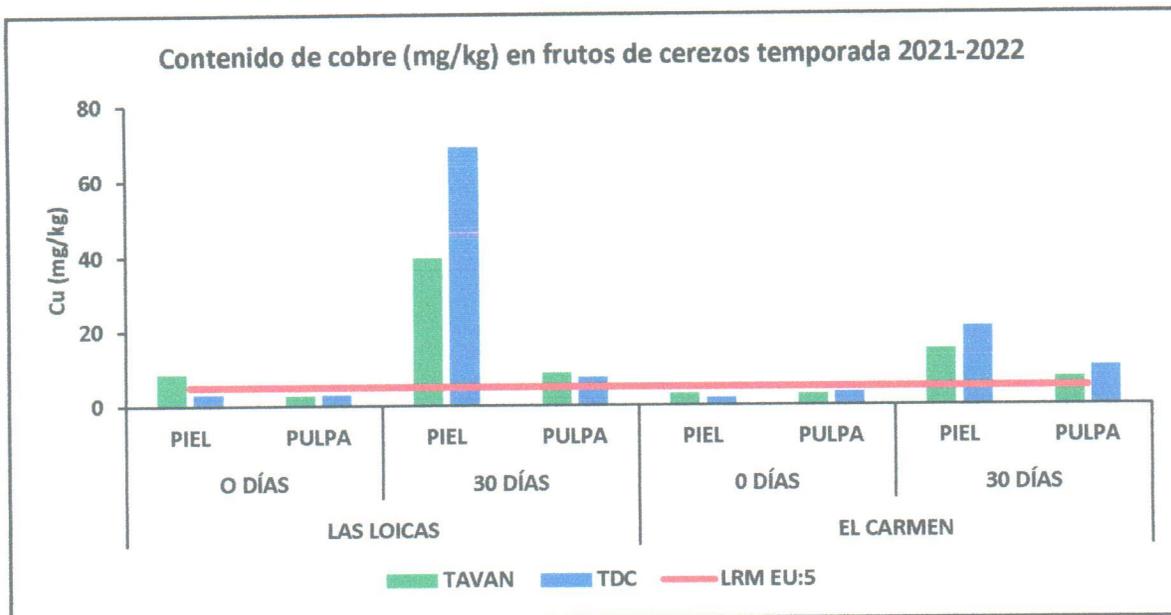


Figura 14. Contenido de Cobre (mg/kg) en Cerezas de predios post-aplicación de tratamientos (temporada 2021-2022).

EFFECTO DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS A TRATAMIENTOS CON TAVAN

Con el objeto de comprobar la capacidad para la inducir de la respuesta de defensa de los frutales de interés comercial: cerezo (*Prunus avium* cv. Bing), kiwi (*Actinidia chinensis* cv. *deliciosa* “Hayward”) y nogal (*Juglans regia*), estos fueron sometidos a tratamiento con TAVAN cuya actividad inductora de defensa ha sido demostrada para otras especies vegetales o es putativa. Tres procesos biológicos fueron estudiados en el contexto de la respuesta de defensa: síntesis de metabolitos secundarios, proteínas de defensa y estrés oxidativo. Para ello se utilizó una aproximación transcripcional donde la expresión de genes candidatos fue estudiada. Los transcritos de plantas tratadas y no tratadas fueron obtenidos y comparados luego de diferentes periodos de tiempo post tratamiento (4, 15 y 21 días; Figura 15).

Cambios positivos en los niveles de expresión de los genes estudiados en plantas tratadas respecto a plantas control fueron entendidos como una inducción de la respuesta de defensa.

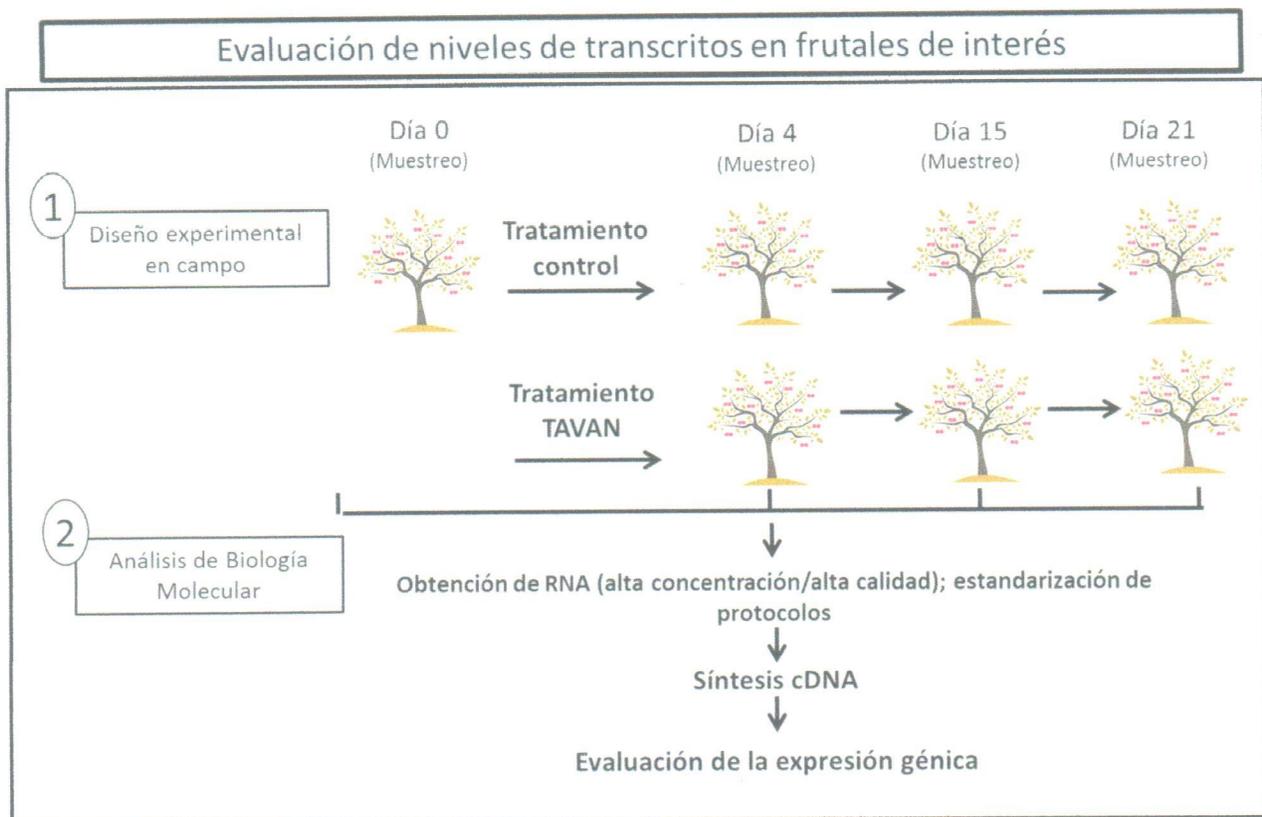


Figura 15. Diseño experimental. Hojas completamente extendidas de frutales tratados con los productos de interés fueron muestreados a los 4, 15 y 21 días postratamiento. El material fue almacenado a -80°C hasta ser procesado. Se obtuvo RNA total desde las muestras el que se depuró en su concentración y calidad. Entonces, se sintetizó cDNA para la evaluación de los niveles de expresión de los genes de interés.

Los metabolitos secundarios corresponden a un amplio grupo de compuestos estructuralmente diversos considerados dispensables para el desarrollo o reproducción de la planta. Sin embargo, cumplen papeles especializados, particularmente en las interacciones planta-ambiente, especialmente en la interacción planta-microorganismo. Diversas investigaciones han demostrado que los cambios en los niveles de expresión de genes que codifican enzimas centrales en la vía de síntesis correlacionan directamente con la acumulación de los metabolitos secundarios. Por ello, estudiamos los cambios de expresión de genes que codifican para cuatro enzimas en la etapa inicial de la ruta: PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE (PAL), COUMARATE-CoA LIGASE (4CL), CHALCONE SYNTHASE (CHS) y CHALCONE ISOMERASE (CHI).

En la Figura 16, se presentan de manera resumida los resultados obtenidos respecto de TAVAN y su efecto sobre las enzimas antes indicadas.

Blanco de estudio: Síntesis de metabolitos secundarios

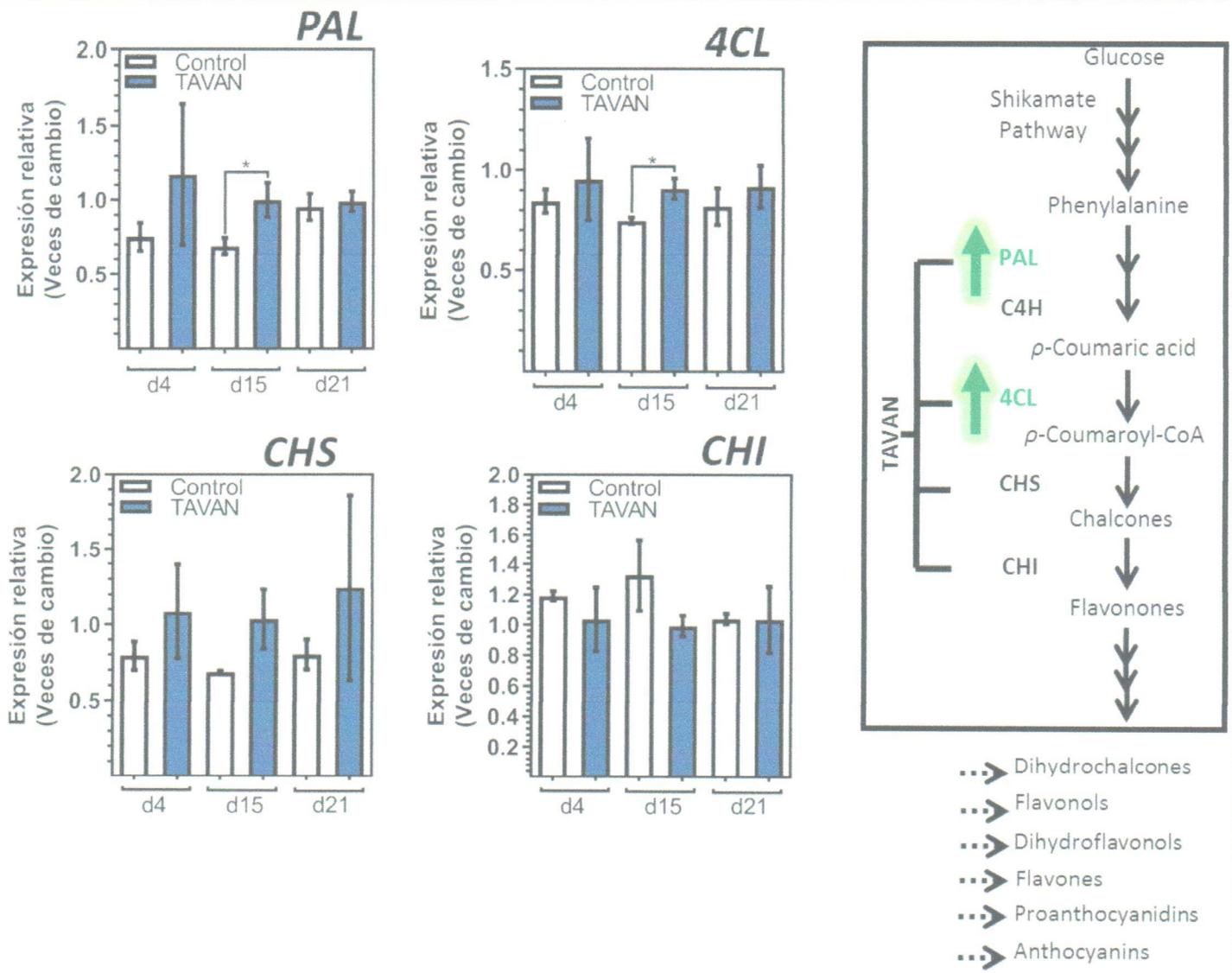


Figura 16. Niveles de expresión de las distintas enzimas estudiadas en cerezo a diferentes tiempos pos tratamiento.

Kiwis

Programa de tratamiento con productos alternativos al cobre en kiwis (Figura 20). El nivel de Cu^{+2} en fruta tuvo variaciones con los programas alternativos de reemplazo de Cu^{+2} a través de las temporadas. En el caso de kiwis después de dos temporadas de aplicaciones, se logró disminuir los límites máximos de residuos aceptados en la Unión Europea incluso cercano a los límites más bajos sugeridos (Figuras 21 y 22).

KIWIS						
	TDC	*lluvia (Cobre)	Cobre	Cobre	Cobre	Cobre
T1	Bioactivador	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa
T2	Biocontrolador + Cobre	Cobre	Cobre + Biocontrolador (10 ddp)	Biocontrolador	Biocontrolador	*lluvia (Cobre)
T3	Cobre	Cobre	Cobre	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa
Tavan	Wert 4 L/Ha Ph4 ECO 0,5 L/ha	Wert 4 L/ha Ph4 ECO 0,5 L/ha		V6 4 L/ha Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha	*V6 4L/ha Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha	

Figura 20. Programas de aplicaciones propuestos en Kiwis. * En el tratamiento de Tavan se realizaron tres aplicaciones en el estadio de: Botón floral, pre flor y 100 % de flor.

Como se observa en la Figura 16, luego de cuatro días de tratamiento no se induce la expresión de *PAL* en forma estadísticamente significativa en cerezo. Sin embargo, el valor promedio para TAVAN es mayor al de plantas solo tratadas con agua. Al día 15 post tratamiento gatilla un aumento significativo en los transcritos de *PAL* diferenciándose estadísticamente del testigo. Tras 21 días de tratamiento no se observó una inducción significativa de TAVAN en la expresión de *PAL* respecto al control.

Por otro lado al evaluar la expresión de *4CL*, luego de 4 días post aplicación del producto se observó niveles de expresión estadísticamente equivalente con el control, aunque el promedio es mayor al control. Los valores promedio son mayores al control al día 15 y 21 post tratamiento, pero es importante señalar que solo se observaron diferencias significativas respecto de la condición del control en el día 15.

En el caso de la expresión de *CHS*, no se detectaron cambios significativos en ninguno de los tiempos considerados. Sin embargo, en todos los tiempos post aplicación evaluados, el valor promedio del tratamiento fue mayor que el control. Finalmente, los datos muestran que la expresión de *CHIs* no es modificada respecto al control por ninguno de los tratamientos realizados.

En la Figura 17 se presenta una versión reducida de la vía del shikimato en que las enzimas bajo análisis se encuentran marcadas en negrita. Según la respuesta obtenida TAVAN gatillaría la expresión temprana de *PAL*, *4CL* y *CHS*, mientras una pobre respuesta y tardía de *CHIs*. Esta respuesta es importante de destacar porque la integración de productos con capacidad inductora temprana y tardía es sumamente interesante, aunque su uso conjunto debe ser validado.

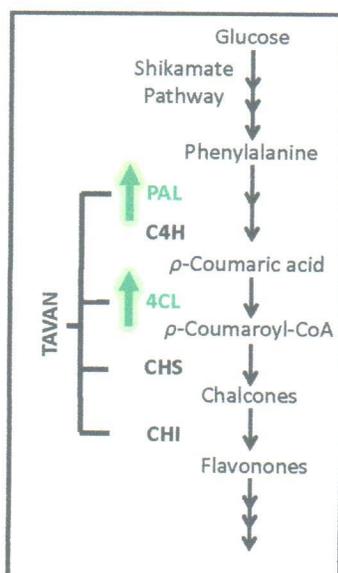


Figura 17. Vía del shikimato resumida donde las enzimas de interés son destacadas en negrita. (B) Análisis de agrupamiento bajo los distintos tratamientos de la inducción de los genes de interés en cerezo en la ruta de síntesis de metabolitos secundarios.

En la Figura 18, se presentan los resultados obtenidos en cerezos de TAVAN respecto del control al evaluar la respuesta del ácido salicílico. El papel de la hormona Ácido Salicílico (AcS) es central tanto a nivel local en el punto de infección (respuesta de hipersensibilidad; HR), como señal sistémica (resistencia sistémica adquirida; SAR). AcS es percibido a nivel citoplasmático en la célula vegetal por NPR1 (NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1) receptor de AcS. NPR1 unido a AcS migra al núcleo de la célula donde participa como coactivador transcripcional modulando la expresión de genes requeridos en la respuesta de defensa, entre los que se cuentan las proteínas PR. la inducción de la expresión de NPR1 en momentos temporalmente acotados de la vida del organismo o la directa inducción de los blancos transcripcionales de NPR1 son estrategias valiosas para desafíos futuros. Por ello, *NPR1* y *PR* fueron escogidos para su estudio en este trabajo. la inducción de la expresión de NPR1 en momentos temporalmente acotados de la vida del organismo o la directa inducción de los blancos transcripcionales de NPR1 son estrategias valiosas para desafíos futuros. Por ello, *NPR1* y *PR* fueron escogidos para su estudio en este trabajo.

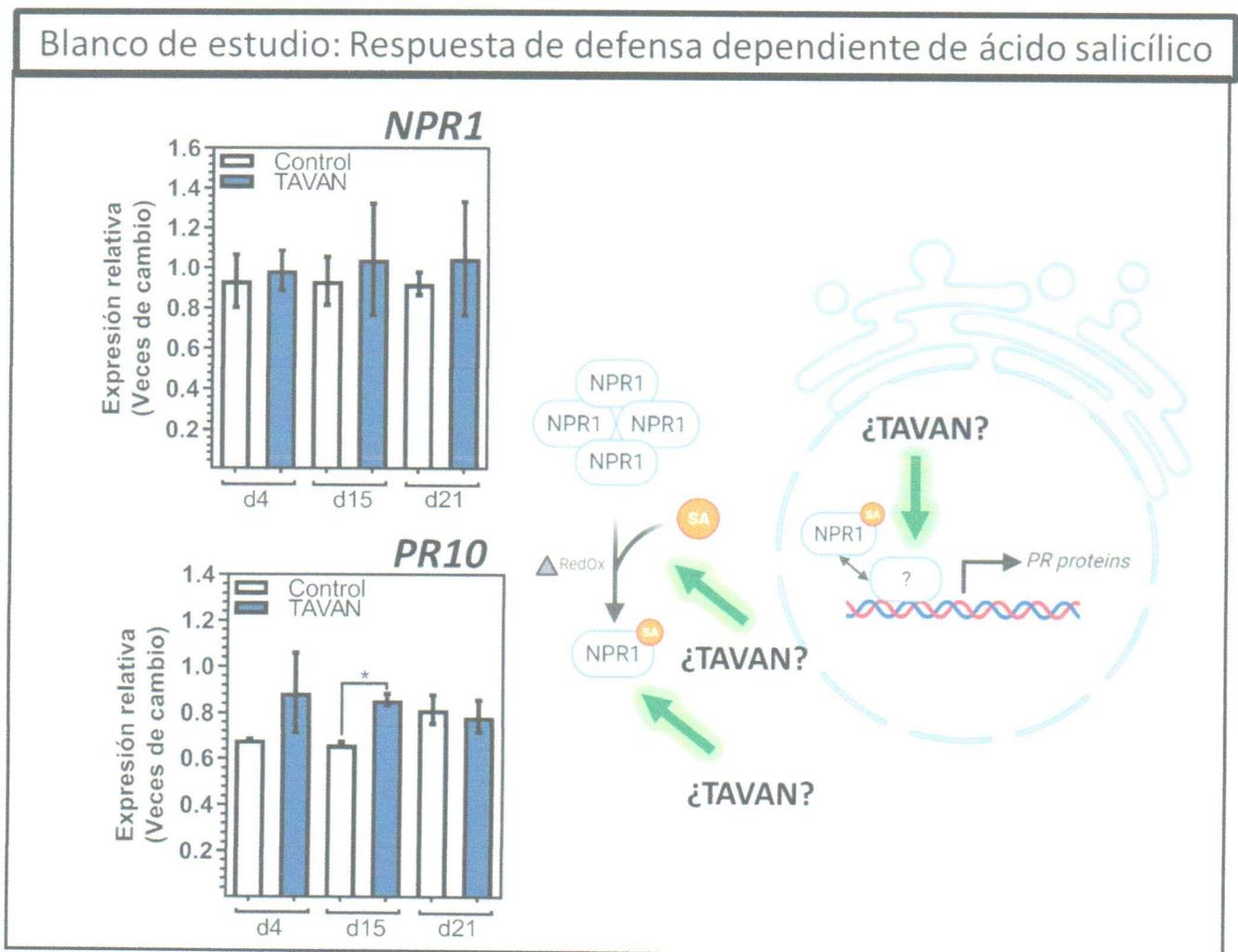


Figura 18. Respuesta obtenida respecto de las proteínas de defensa NPR1 y PR10 en cerezos después de aplicar TAVAN en los tres tiempos evaluados.

Por último, este trabajo abordó el estrés oxidativo como proceso biológico de interés. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) cumple papeles esenciales durante la defensa de las plantas participando como molécula de señalización a larga distancia en conjunto a AcS para restringir el avance de la infección sistémica (parte de la respuesta SAR) como también localmente permitiendo reforzar la pared celular, a través de la modificación de glicoproteínas, o activando la muerte celular programada durante la HR (Ali et al., 2018).

En contra parte, la eficiencia en la detoxificación de ROS permite evitar costos metabólicos tras ser restringida la amenaza de infección (Huang et al., 2019). Durante la detoxificación de ROS las enzimas CATALASE (CAT), GLUTATION PEROXIDASE (GPX) y SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) son clave (Caverzan et al., 2016), por lo que fueron escogidas como blanco de estudio (Figura 19).

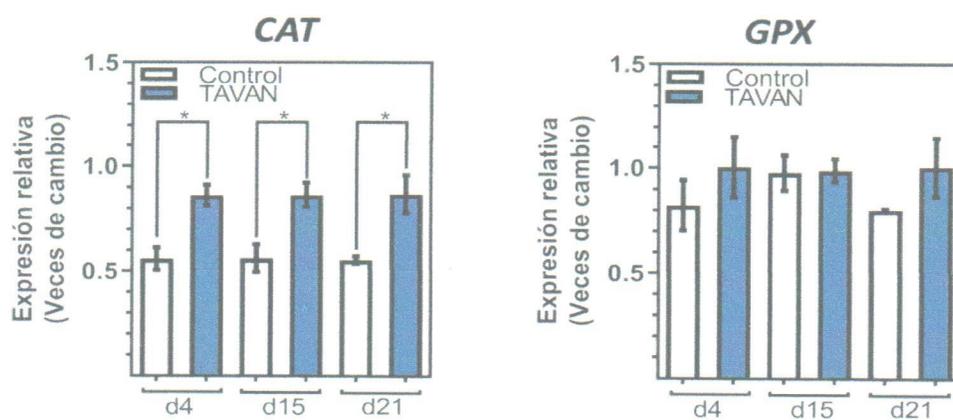


Figura 19. Niveles de expresión *CAT* y *GPX* en cerezos a diferentes tiempos post tratamiento.

CONSIDERACIONES GENERALES DE TAVAN COMO ACTIVADOR DE MECANISMOS DE DEFENSA EN CEREZO

Los resultados obtenidos permiten sugerir que:

- TAVAN promueve coordinadamente la expresión de PAL y 4CL a los 15 días post aplicación. Adicionalmente, gatilló la expresión de CHS en una ventana temporal que abarcó desde los 4 hasta los 21 días post aplicación. La regulación de la expresión de PAL ha sido mostrada por gatillar una defensa de amplio espectro a diferentes tipos de patógenos a través de la modificación de la pared celular. Adicionalmente, la inducción de la expresión de las enzimas 4CL y CHS, río abajo en la ruta de síntesis, se asocian con la síntesis y acumulación de metabolitos asociados a la defensa, como fitoalexinas, en conjunto a la síntesis de ácido salicílico.
- TAVAN promovió la expresión de PR10 a los 15 días post aplicación. Homólogos a PR10 en otras especies vegetales representan la proteína sintetizada en mayor nivel ante el ataque de un patógeno (aproximadamente el 10%). Mientras que la pérdida de PR10 se asocia directamente con mayor susceptibilidad contra diferentes especies de hongos y bacterias.
- TAVAN promovió la expresión de CAT a lo largo de la ventana temporal estudiada, sugiriendo que TAVAN interfiere con el estrés oxidativo de la planta. Una mayor expresión de CAT correlaciona con una mayor detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) permitiendo un mejor desempeño fisiológico de la planta ante una condición de estrés.



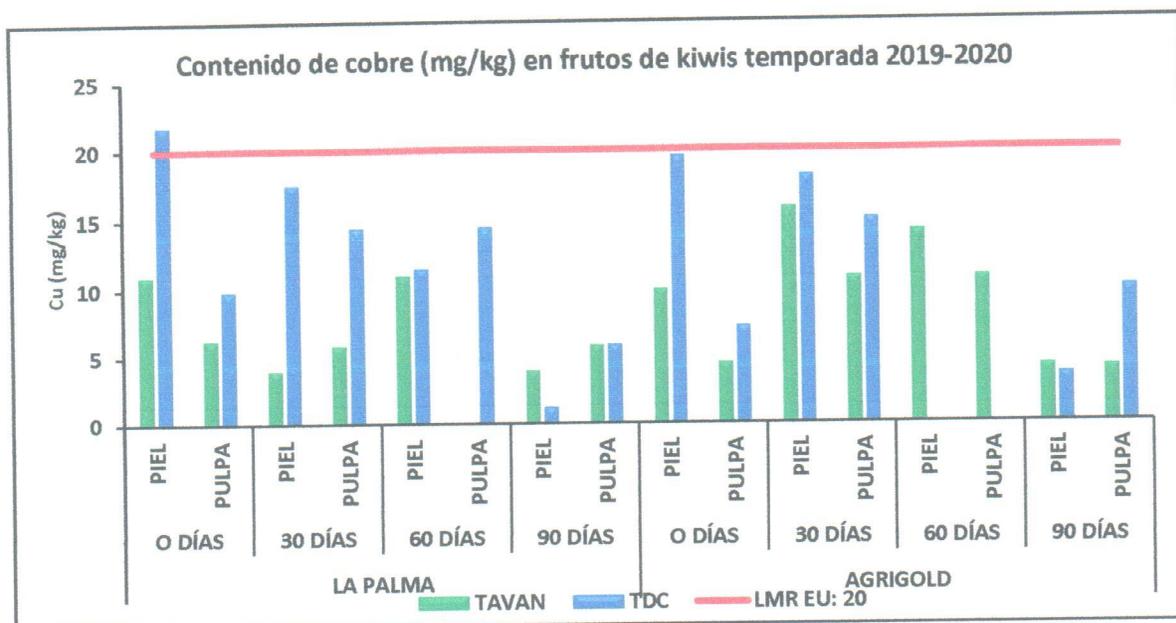


Figura 21. Contenido de Cobre (mg/kg) en Kiwis de predios post-aplicación de tratamientos (temporada 2019-2020).

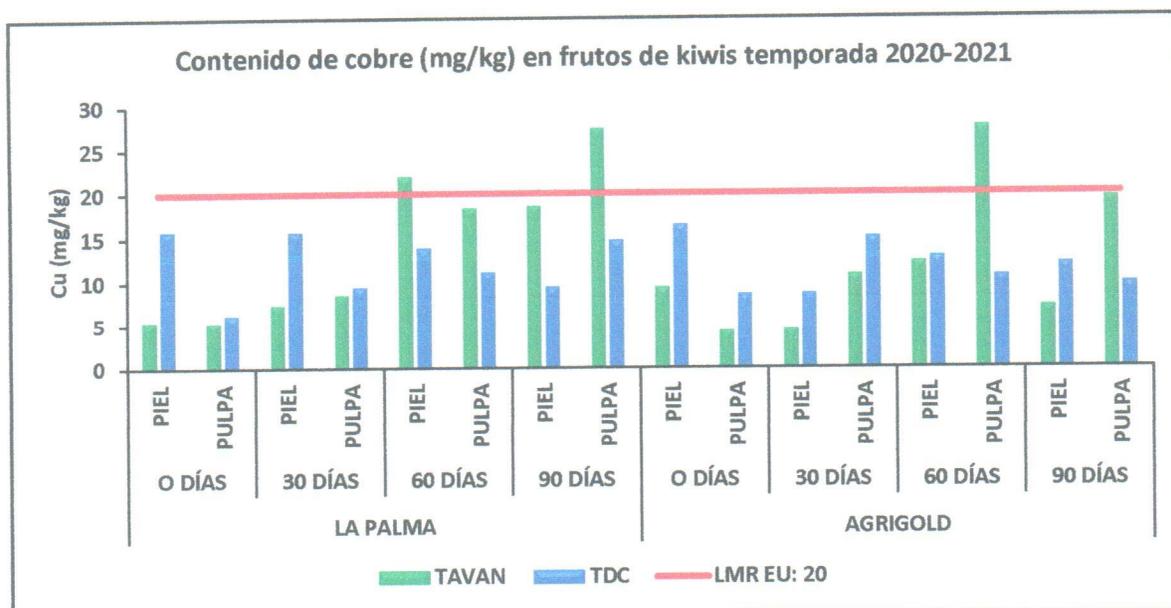


Figura 22. Contenido de Cobre (mg/kg) en Kiwis de predios post-aplicación de tratamientos (temporada 2020-2021).

El kiwi, *Actidinia chinensis* cv. *deliciosa* "Hayward", es un organismo hexaploide (Popowski *et al.*, 2021) en cuyo genoma identificamos múltiple isoformas codificando las enzimas de interés en la vía de síntesis de metabolitos secundarios. Para acotar el análisis, la expresión de solo dos isoformas por gen de interés fue evaluada. Interesantemente, solo detectamos cambios en la expresión de la enzima PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, donde se estudió la expresión de *PAL2* y *PAL5* (Figura 23).

Para *PAL2* ningún producto gatilló un aumento en la expresión del gen 4 días post tratamiento, aunque se detectó un aumento consistente y significativo a los 15 días post tratamiento condicionando los mayores niveles de inducción de la expresión de *PAL2*. Luego de 21 días de tratamiento, la respuesta inducida por TAVAN mantiene un aumento significativo en la expresión de *PAL2* respecto al control bajo esta temporalidad, aunque menor en magnitud a lo registrado para 15 días post tratamiento. Coherentemente TAVAN conduce a valores promedios más altos de *PAL5* respecto al control a los 15 días postratamiento no diferenciándose estadísticamente de este. En contraste, a 21 días postratamiento impacta significativamente en los niveles de expresión de *PAL5*.

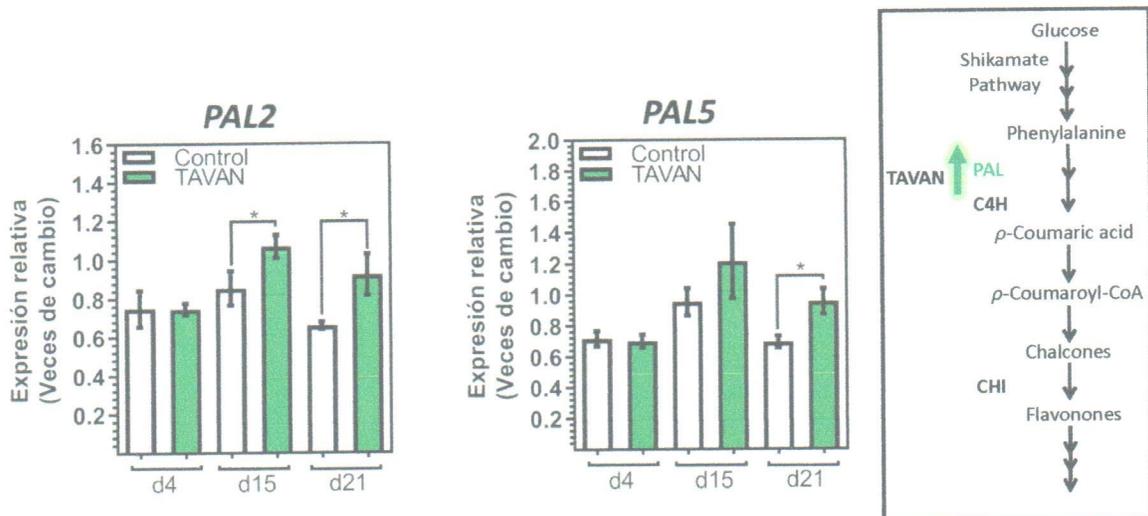


Figura 23. Niveles de expresión de *PAL* en kiwi a diferentes tiempos postratamiento.

No modificó los niveles de expresión a 4 días post tratamiento. La inducción de la expresión de *PAL* es promisoría debido a que es requerida para la síntesis de todos los precursores durante la producción de metabolitos secundarios, pudiendo actuar sobre la expresión de los otros genes requeridos en la ruta metabólica a través de un mecanismo de retroalimentación positiva bajo condiciones particulares de estrés.

Además, como precursor de metabolitos primario, como aminoácidos, podría conducir a un mejor desempeño de la planta durante su desarrollo y crecimiento. Interesantemente, los productos no condicionan una respuesta equivalente a 15 y 21 días postratamiento, por lo que potencialmente pueden ser usados conjuntamente. Sin embargo, no condujo a la inducción en la expresión de *PAL* a tiempos tan tempranos como 4 días postratamiento, abriendo una ventana para la búsqueda de inductores específicos en dicha ventana temporal.

Blanco de estudio: Respuesta de defensa dependiente de ácido salicílico

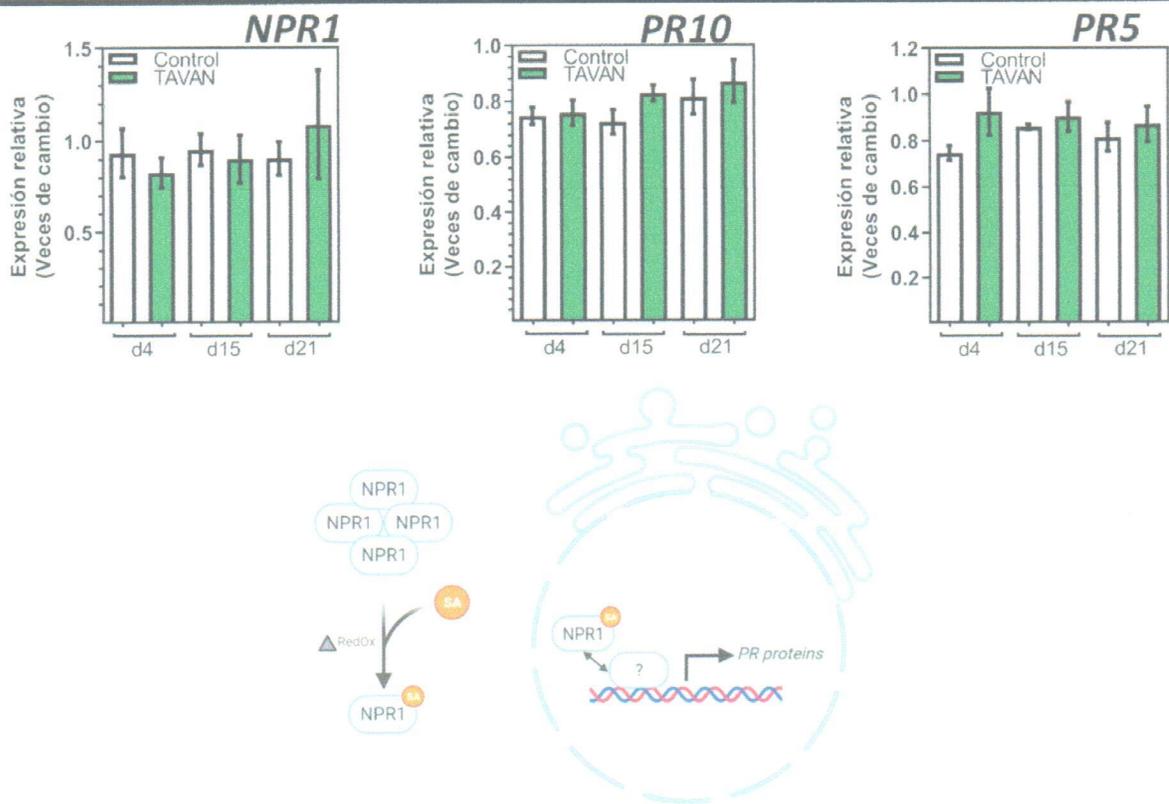


Figura 24. Niveles de expresión de *NPR1*, *PR10* y *PR5* en kiwi a diferentes tiempos post tratamiento.

Blanco de estudio: Estrés oxidativo

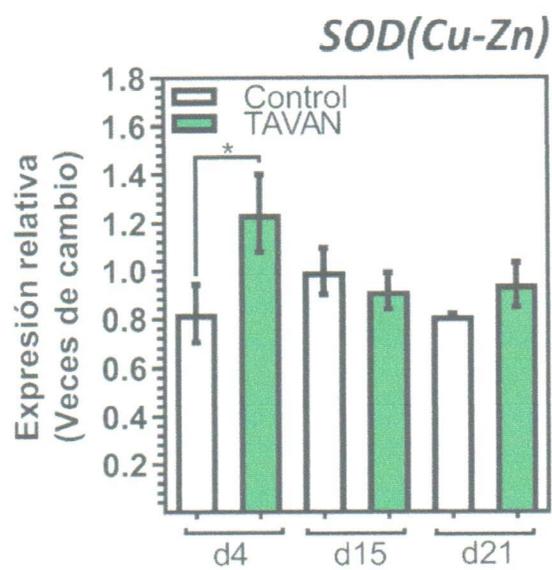


Figura 25. Niveles de expresión *SOD (Cu-Zn)*, en kiwi a diferentes tiempos post tratamiento.

CONSIDERACIONES GENERALES DE TAVAN COMO ACTIVADOR DE MECANISMOS DE DEFENSA EN KIWÍ

- TAVAN promovió la expresión de los homólogos de PAL en kiwi PAL2 y PAL5 desde los 15 días de aplicación. Debido al papel central de PAL en la ruta de síntesis de metabolitos secundarios es posible sugerir que en kiwi este producto conduzca a una defensa robustecida, soportada en el reforzamiento de la pared celular y/o síntesis de metabolitos secundarios. Se sugiere el estudio de expresión de homólogos de 4CL, CHS e CHI en kiwi (*Actidinia deliciosa*), los que debido al alto número de homólogos dentro del genoma de esta especie fueron obviados por relación costo / tiempo dentro del proyecto.
- TAVAN no indujo la expresión de los genes candidatos PR1 y PR5 (Thaumatin-Like Proteins, TLPs) asociados a defensa. Sin embargo, la inducción de la expresión de PR1 en cerezos sugiere que TAVAN puede promover proteínas de la familia PR, por lo que se sugiere fuertemente estudiar otros candidatos que permitan dilucidar la inducción de la defensa mediada por proteínas PR en kiwi.
- TAVAN promovió la expresión de SOD (Cu-Zn) tempranamente, sugiriendo un impacto directo en detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) post aplicación, permitiendo un mejor desempeño fisiológico de la planta ante una condición de estrés.



Nogal

Programa de tratamiento con productos alternativos al cobre en nogal (Figura 26). El nivel de Cu^{+2} en fruta tuvo variaciones con los programas alternativos de reemplazo de Cu^{+2} a través de las temporadas.

NOGAL							
	TDC	*lluvia (Cobre)	*lluvia (Cobre)	*lluvia (Cobre)	*lluvia (Cobre)	*lluvia (Cobre)	
T1			Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa	
T2	Biocontrolador + Cobre	Biocontrolador + Cobre	Biocontrolador + Cobre	Biocontrolador	Biocontrolador	Biocontrolador	
T3	Cobre	Cobre		Cobre	Estimulador de defensa	Estimulador de defensa (10-20 ddp)	Post cosecha 2do flash cre. radic.
Tavan	Wert 4 L/Ha	Cobre	-	V6 4 L/ha Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha	Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha	Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha	V6 4 L/ha Ph4 ECO 0,5 L/ha BACTOFUS 2,5 L/ha

Figura 26. Programas de aplicaciones propuestos en Nogales.

En las Figuras 27 y 28 se presentan los contenidos de cobre detectados en frutos de Nogal en las dos temporadas analizadas.

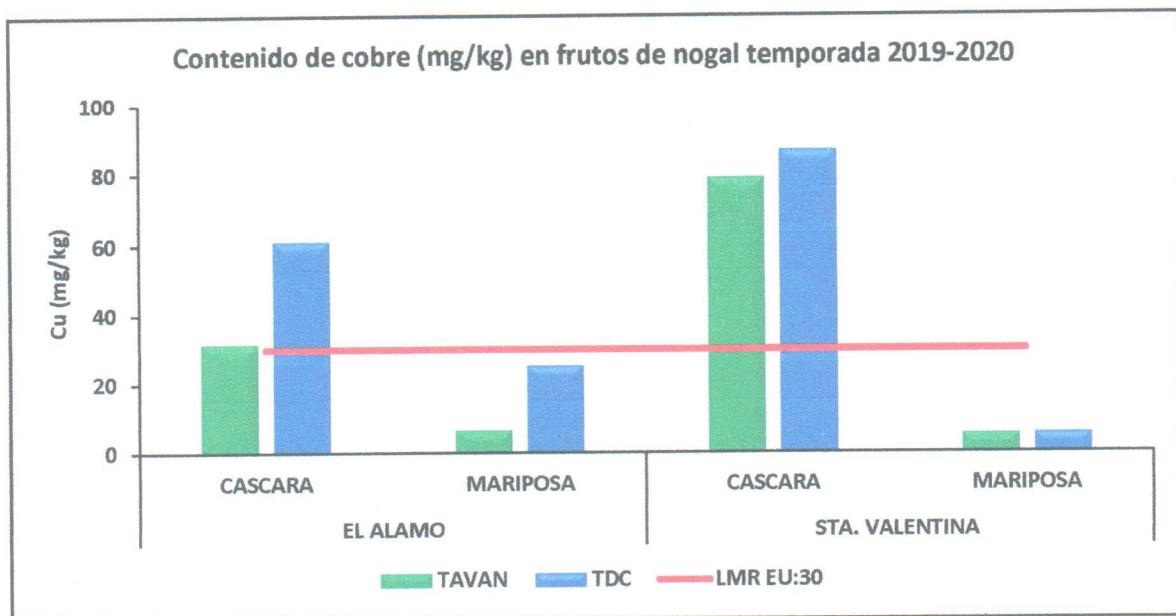


Figura 27. Contenido de Magnésio (mg/kg) en Nueces de predios post aplicación de tratamientos (temporada 2019-2020).

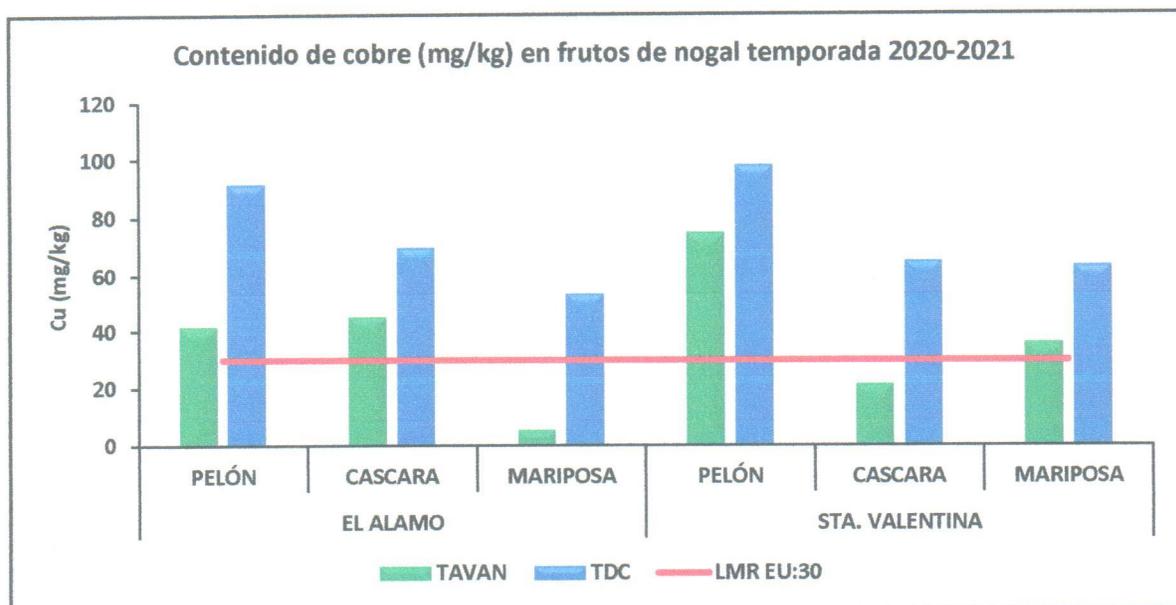


Figura 28. Contenido de Calcio (mg/kg) en Nueces de predios post aplicación de tratamientos (temporada 2020-2021).

En nogal, genes que codifican para cada una de las enzimas de interés, funcionalmente estudiadas en la literatura fueron identificados y utilizados en el análisis experimental, TAVAN no repercute en los niveles de expresión de *PAL* y *4CL* bajo ninguna de las temporalidades evaluadas (Figura 29). En el caso de TAVAN se observó la inducción de *CHS* sólo como una respuesta tardía a los 21 días post tratamiento.

Finalmente, a los 21 días post tratamiento la totalidad de los productos gatilló la inducción de la expresión de *CHIs* respecto al tratamiento control. La aparente inconsistencia en la inducción de *CHS* y *CHI* bajo el tratamiento TAVAN puede ser explicado a partir del amplio número de genes codifican *PAL* y *4CL* en el genoma de nogal (Figura 29).

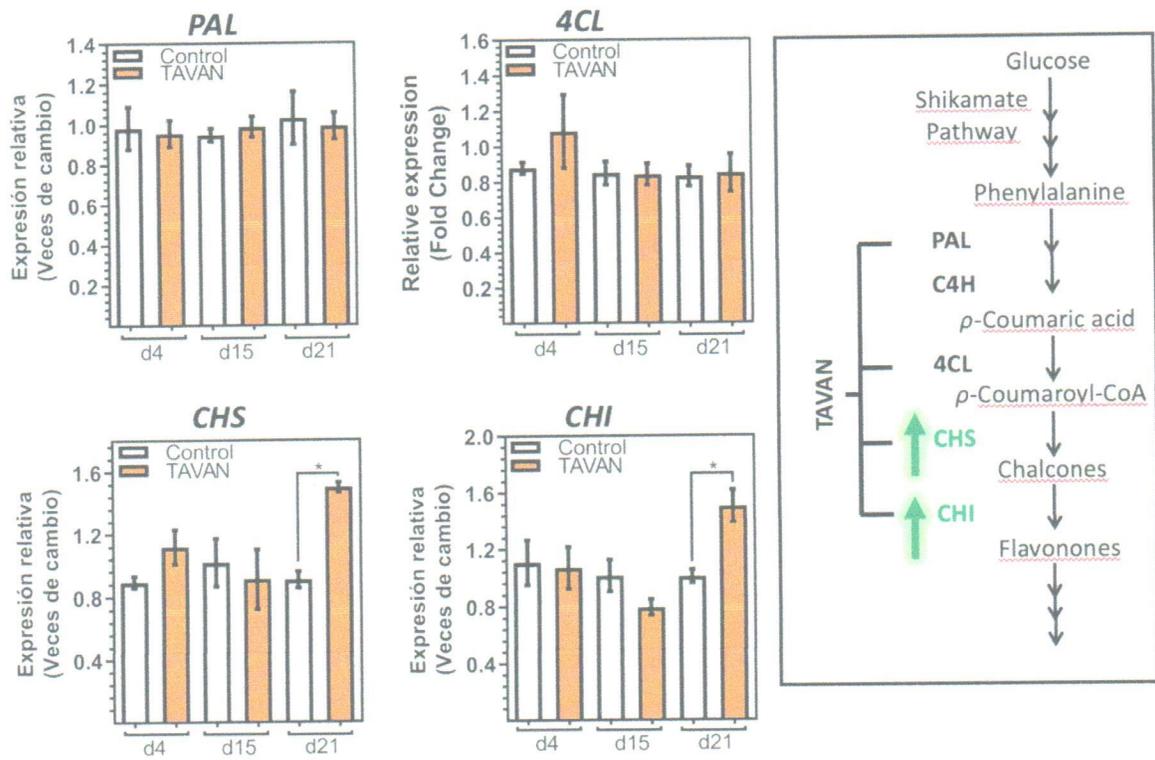


Figura 29. Niveles de expresión de *PAL*, *4CL*, *CHS* y *CHI* en nogal a diferentes tiempos post tratamiento.

CONSIDERACIONES GENERALES DE TAVAN COMO ACTIVADOR DE MECANISMOS DE DEFENSA EN NOGAL

- TAVAN promovió coordinadamente la expresión de *CHS* y *CHI* desde los 15 días post aplicación, sugiriendo una protección a largo plazo en este frutal. Particularmente, TAVAN en nogal permitiría una defensa de amplio espectro a diferentes tipos de patógenos mediante la modificación (robustecimiento) de la pared celular, y también, a través de la síntesis y acumulación de metabolitos asociados a la defensa, como fitoalexinas y flavonas.



Sin otro particular y atento a vuestros comentarios, les saluda atentamente

Jaime Auger Saavedra

Director Proyecto

Agosto, 2022