

Ensayo para TAVAN proyecto Biobactogen

NUEVOS TRATAMIENTOS BASADOS EN BIOTECNOLOGÍA
FRENTE A LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS PSEUDOMONA
SYRINGAE EN KIWI Y CEREZO

Jose Abel Bote Paniagua- responsable de investigación agrosmart
Solution S.L. Empresa de investigación ajena al proyecto.

| INCUBADORA CENTRO DE INVESTIGACIONES HISPANO LUSO- UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Índice

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	2
EMPRESA PROMOTORA DEL PROYECTO	3
PROBLEMÁTICA	4
APLICACIONES	5
RECOGIDA DE MUESTRAS Y METODOLOGÍA DEL ENSAYO.	6
METODOLOGÍA DEL ENSAYO	8
RESULTADOS	10
PRIMER ENSAYO	10
CONCLUSIONES ENSAYO TEMPRANO	11
SEGUNDO ENSAYO	13
CONCLUSIONES EXTRAOFICIALES	15
ÍNDICE DE FIGURAS	16
DATOS INFORME	17

Introducción

En el presente documento se expone el trabajo realizado por TAVAN para realizar el tratamiento de la *pseudomonas Syringae* (en adelante PSA) en ejemplares de Cerezo (*prunus avium*).

El ensayo ha sido realizado bajo financiación del Centro de Desarrollo Tecnológico Industrial (en adelante CDTI) lo cual muestra el interés agroindustrial del proyecto.

El proyecto tiene como título ““BIOBACTOGEN: NUEVOS TRATAMIENTOS BASADOS EN BIOTECNOLOGÍA FRENTE A LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS PSEUDOMONA SYRINGAE EN KIWI Y CEREZO” su objetivo es el de desarrollar nuevos tratamientos sostenibles frente a bacterias fitopatógenas basados en el empleo de la biotecnología y que permita incrementar el rendimiento agrícola del cultivo del cerezo y del kiwi.



Ilustración 1. Ejemplar de cerezo con ataque manifiesto de PSA. Imagen recogida por equipo técnico de Agrosmart solution S.L

Empresa promotora del proyecto

La empresa promotora del proyecto es Tecnologías Avanzadas Agrícolas S.L (en adelante TAVAN), esta empresa está especializada en la creación de productos bionutricionales vegetales y el asesoramiento en la aplicación de los productos desarrollados por su departamento de I+D+i con una larga trayectoria empresarial y proyección en el ámbito internacional.

Desde Tavan se cuenta con 5 sedes de trabajo, cuenta con una amplia experiencia en el manejo de cultivos en el sector hortofrutícola y el producto testado en esta investigación ha sido también probado en plantaciones de cultivo de cerezo en Chile, aunque los datos de estas explotaciones no han sido recogidos dentro de la investigación llevada a cabo por Agrosmart Solution S.L

El objetivo de TAVAN como empresa se manifiesta en el objetivo de optimizar al máximo el rendimiento de las inversiones agrícolas y que conozca al detalle el manejo de la relación suelo-planta junto con un modelo productivo agrícola sostenible.



Otras empresas que han participado en el proyecto han sido:

- Campo y tierra S.A
- Fitosanitarios Ramirez S.A
- Agrosmart Solution S.L

La empresa Campo y tierra S.A ha sido la empresa productora que ha servido como fuente de ensayos en la investigación, dotando de sus cerezos y conocimiento a la investigación.

Fitosanitarios Ramirez ha sido la empresa encargada de gestionar los programas de fertilización y asesoramiento en la explotación junto con los técnicos de Tavan sobre los protocolos de aplicación de la materia activa que ha sido empleada en la explotación.

Desde Agrosmart Solution no se ha sabido en ningún momento que tipo de materia activa se ha empleado por parte del equipo de TAVAN con el fin de ser lo más imparciales posibles.

Problemática

La problemática gira entorno a la bacteria gram-negativa conocida como “*Pseudomona Syringae*”. En adelante será citada como PSA.

La PSA es una bacteria en forma de bacilo gram-negativa flagelada lo que permite un movimiento rápido de la bacteria en condiciones de alta humedad. Esta bacteria tiene un efecto patógeno en los cultivos y provoca un decaimiento generalizado en los árboles de cerezo reduciendo su crecimiento, capacidad de desarrollo, calidad de fruto y estimulando la generación de exudados que estimulan la presencia de otros patógenos como hongos que ataquen a la madera.

La pseudomona tiene también un efecto negativo al provocar una mayor sensibilidad celular ante las posibles heladas.

La presencia de PSA en la explotación control se confirmó mediante análisis genético (PCR).

En la imagen inferior se puede ver un cerezo con un fuerte ataque de hongos y un decaimiento generalizado, esto es debido a la presencia de PSA que actúa como patógeno en los ejemplares de la explotación indicada.



Ilustración 2 Ejemplar con ataque de yesca (polyporus fomentarius) que se ha visto afectado por la presencia de pseudomona), de la explotación que fue objeto de la investigación, imágenes recogidas por técnicos de Agrosmart Solution S.L

Aplicaciones

Para determinar el protocolo de trabajo se contó con los asesores del equipo de TAVAN, hay que tener en cuenta que la primavera del año 2020 fue problemática, hay que tener en cuenta los siguientes problemas:

- Una primavera con pluviometría superior a la media que impidió una correcta aplicación de los tratamientos fitosanitarios tal y como dictaban los protocolos de aplicación determinado por TAVAN
- El problema derivado de la pandemia generada por el coronavirus que imposibilitó un correcto tránsito de los diferentes técnicos que participaban en el proyecto.

El protocolo establecido por TAVAN fue:

- Aplicación de 4 tratamientos foliares
- Definir la aplicación de los 4 tratamientos según los diferentes momentos de aplicación:
 - **Primer tratamiento:** Hinchado de yema (final febrero- inicio de marzo)
 - **Segundo tratamiento:** inicio de brotación
 - **Tercer tratamiento:** Fruto con tamaño de 5 mm
 - **Cuarto Tratamiento:** Fruto con tamaño de 10 mm

Los tratamientos fueron aplicados por la empresa que formó parte del ensayo “Campo y Tierra S.A”; que cuenta con las explotaciones agrícolas en el término de Valdeañigos.

Las aplicaciones fueron realizadas mediante equipo de atomización. Las dosis de caldo aplicado y demás están definidas por TAVAN junto con las concentraciones aplicadas.

Recogida de muestras y metodología del ensayo.

La recogida de las muestras fue realizada en diferentes fases y por las siguientes empresas:

- TAVAN
- Campo y Tierra
- Fitosanitarios Ramirez S.A (empresa que colaboró en la gestión del proyecto)
- Agrosmart Solutions S.L, empresa encargada de datar los ensayos.

La última empresa citada, la autora de esta memoria, ha sido la encargada de realizar el estudio de los datos y la investigación de forma ajena a la empresa interesada para determinar si los tratamientos tuvieron algún tipo de incidencia sobre la calidad del fruto y determinar la eficacia de los tratamientos.

Para realizar la confirmación de presencia de *Pseudomona* en el cultivo de cerezo de la empresa “Campo y tierra” el 20 de Abril de 2020 se realizó la recogida de muestras vegetales por parte del equipo técnico de Agrosmart solution S.L con el objetivo de determinar mediante análisis en laboratorio de la *Pseudomona*, siendo los resultados positivos en la presencia de la enfermedad aunque con observación visual se podía determinar la presencia de la misma.



Ilustración 3. Exudaciones pseudomona

Para realizar el análisis se procedió a recoger muestras apicales y realizar la extracción de savia del cerezo, con el fin de realizar un análisis de savia determinar la presencia o ausencia de los patógenos.

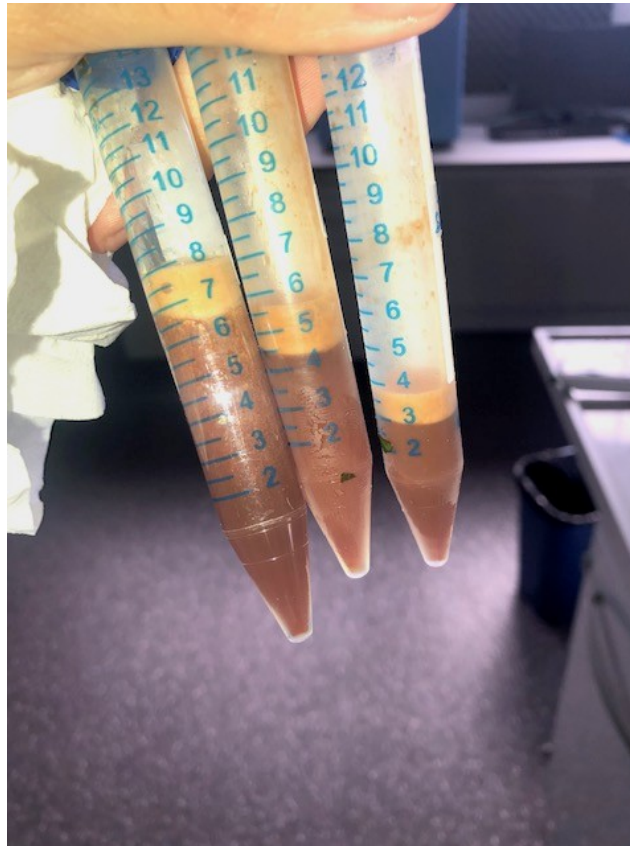


Ilustración 4. Procesado de muestras para análisis

Se realizó un análisis mediante PCR y se determinó la presencia de Pseudomona en el cultivo tal y como se puede ver en el gel de agarosa donde se aprecian líneas marcadas en la muestra 1, 2 y 3 los controles C3 y J muestran el positivo.

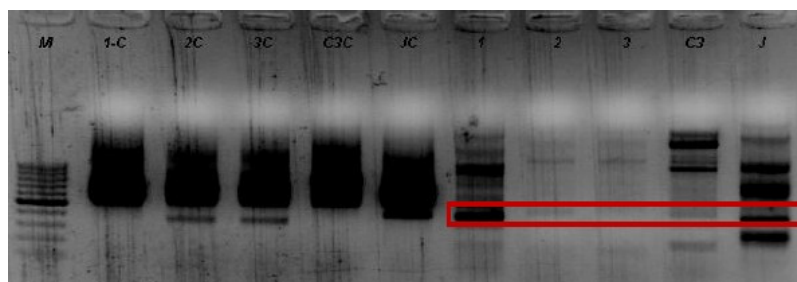


Ilustración 5 Gel de agarosa empleado en PCR

Esta empresa constató algunos problemas durante la recogida de las muestras que fueron ajenas a todas las partes interesadas como fue el problema generado por la precipitación de granizo que provocó pérdidas de cosecha en algunas de las parcelas del ensayo o la imposibilidad de movimiento de algunos participantes del proyecto durante ciertos momentos por el motivo de la “pandemia”.

Metodología del ensayo

El ensayo se ha basado en una determinación cuantitativa (mediciones directas y reales) realizando el análisis de las cerezas de forma unificada, siendo el número de mediciones realizadas superior a 300 muestras. Las mediciones realizadas fueron:

- Medición de calibres
- Medición de pesos
- Medición de concentración de azúcares

La medición se realizó con calibre digital midiendo el ancho de la fruta, lo que aportaba precisión a la medición y la capacidad de tener correctamente toda la información para su posterior análisis de datos.



Ilustración 6 Medición con calibre digital

La medición de pesos se realizó con báscula de precisión con pesas certificadas por ENAC. Esta báscula tiene una precisión de diezmilésima de gramo.

La última medición realizada, la medición de azúcares, fue realizada con refractómetro analógico calibrado periódicamente con agua destilada, se estableció un trabajo de precisión de 0 a 10 grados Brix y de 0 a 32 grados Brix. La medición implicaba tener que emplear papel absorbente entre cada una de las mediciones para absorber el azúcar del prisma de forma que las mediciones tuviese la menor contaminación posible. El motivo de emplear dos medidores es que nos encontrábamos con medidas que eran variables

y cuando las mediciones superaban los 10 grados Brix se empleaba el medidor de 0-32 grados Brix.



Ilustración 7. Refractómetros medidores de concentración brix

Los ensayos fueron divididos en dos fases¹:

- Recolección temprana
- Recolección tardía

¹ La mediciones fueron realizadas con muestras escogidas al azar de forma que se evitase el sesgo y sin comunicar los tratamientos recibidos al personal que realizó las mediciones por parte de Agrosmart solution S.L

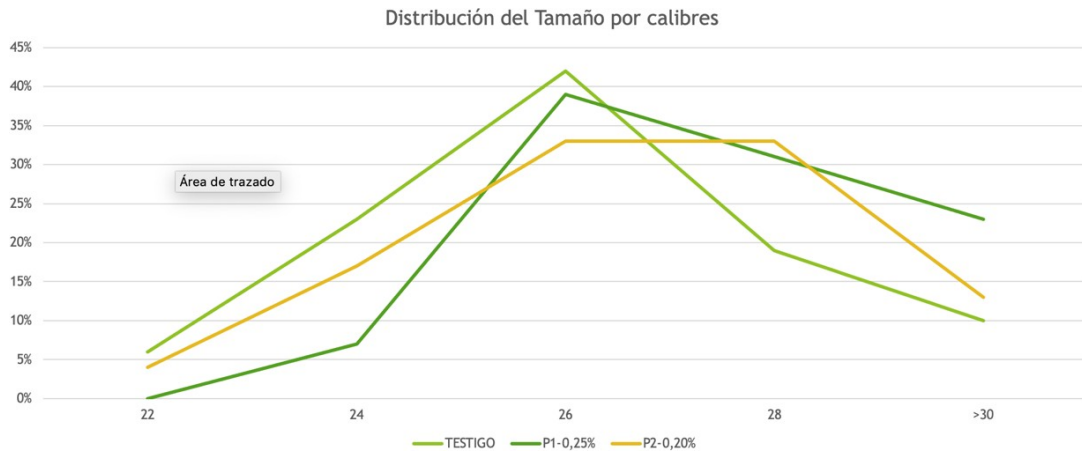
Resultados

Primer ensayo

En la siguiente imagen se puede apreciar la tabla de distribución respecto al peso por 100 cerezas. Estas muestras fueron recogidas por los propios trabajadores de Campo y tierra.

Muestra	TESTIGO	P1-0,25%	P2-0,20%
1	1382	1216	430
2	612	3716	1033
3	1797	873	1857
4	877	1654	1696
5	747	2114	540
6	3376	2182	1329
7	1093	2164	622
8	1015	1313	1319
9	263	1379	237
10	837	783	2054
Peso Total	11999	17394	11117
Media	1199,9	1739,4	1111,7

En la siguiente imagen se puede ver la distribución de los calibres según el agrupamiento de datos.



A continuación, podemos observar los datos de mayor interés junto con la distribución por calibres, el de los azúcares, valor que nos indica el sabor dulce de la fruta.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Testigo	45	673,6	14,96888889	3,144464646		
T- 0,20	49	774,3	15,80204082	4,555204082		
T-0,25	57	895,2	15,70526316	3,713007519		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	19,52057037	2	9,760285186	2,556972171	0,080960998	3,057196806
Dentro de los grupos	564,9346614	148	3,817126091			
Total	584,4552318	150				

Conclusiones ensayo temprano

Se observa que hay una gran diferencia entre los tratamientos con concentración 0,25%, 0,20% y el testigo.

En el tamaño del fruto y calibre podemos observar un mayor tamaño que en el de la fruta sin tratamiento en el tratamiento de 0,25%, en el tratamiento 0,20 incluso se aprecia un tamaño muy parecido o menor.

Si identificamos la presencia de azúcares, medido como azúcares solubles, siendo estos con la unidad de medidas "grados brix", podemos identificar que la muestra de tratamiento 0,20% tiene una concentración superior al testigo, las del tratamiento de

0,25% tienen una concentración ligeramente inferior a las de 0,20, pero puede deberse a que hubiesen necesitado 48 horas más de maduración debido a su mayor calibre.



Ilustración 8 Muestras del primer ensayo enviadas desde la explotación

Segundo ensayo

El segundo ensayo -Recogida de muestras el 22 de mayor de 2020- presentó problemas en la recogida por la precipitación del granizo lo que derivó en problemas de cosecha (se dejaron algunas parcelas sin cosechar). Debido a este problema, se observó en campo que las cerezas del tratamiento de 0,25% eran muchos menores en cantidad a las de 0,20 y el testigo. Según indicó el técnico de Campo y Tierra , la cantidad de cerezas se vio reducida por los ataques de las aves, hay que indicar que el mayor ataque de aves se concentró en las cerezas con un tratamiento de 0,25 del principio activo empleado por TAVAN.

Tras realizar el análisis de los datos se recogieron los siguientes datos:

	Testigo			0,2			0,25		
	tamaño	Pesos	Brix	tamaño	Pesos	Brix	tamaño	Pesos	Brix
1	24,59	6,4	19	26,41	8,9	20	25,7	8,16	20
2	23,56	6,08	19	27,53	9,33	19	26,38	8,07	20
3	24,5	6,7	21,2	25,97	8,93	15	26,24	8,59	22
4	22,2	5,61	19,2	26,06	8,29	20,2	24,25	6,91	17
5	26,1	8,87	21,8	25,12	7,12	19	27,43	8,83	20,5
6	15,63	2,01	13,8	25,62	7,81	22	27,67	8,82	20,8
7	21,25	4,28	19	25,23	6,67	18	27,85	8,21	17
8	21,52	5,38	21,2	25,44	8,12	21	26,89	8,77	24,5
9	25,36	7,61	14	24,43	7,23	20,5	25,77	7,78	16
10	22,06	4,98	19	26,14	7,53	19	25,35	7,4	17
Datos	22,677	5,792	18,72	25,795	7,993	19,37	26,353	8,154	19,756
				3,12	2,20	0,65	3,676	2,362	1,036

Tras realizar el análisis de los datos se trabajó de nuevo con un análisis de la varianza, arrojando los siguientes datos:

Peso Testigo	Brix Testigo	Peso 0,2	Brix 0,2	Peso 0,25	Brix 0,25
5,82	18,45	6,95	21,61	7,99	19,73
		1,12	3,16	2,17	1,29
		19,31%	17,15%	37,25%	6,97%
				15%	-8,69%

Conclusiones segundo ensayo

En este segundo ensayo encontramos datos que indican:

- Un mayor contenido de azúcares superior respecto a los testigos en ambos tratamientos
- Un aumento del peso en ambos tratamientos respecto al testigo
- La mayor concentración de grados brix en el tratamiento 0,20%
- Mayor tamaño de la fruta en el tratamiento de 0,25%.



Ilustración 9 En la imagen se pueden apreciar daños por granizo en cerezas testigo

Conclusiones extraoficiales

El resultado de las pruebas ha sido satisfactorio según los datos analizados, se produjo un incremento de la calidad y el calibre a pesar de que fue una primavera problemática por las malas condiciones climáticas y de que no se pudo realizar un control del DPV (*déficit de presión de vapor*) durante la aplicación del producto. En el segundo ensayo casi no había cerezas del tratamiento 0,25 y por lo tanto creemos que estos datos pueden tener sesgo y que el resultado fuese mejor de lo esperado.

Desde Agrosmart Solution S.L creemos que el producto cumple su cometido ya que:

- Incrementa los grados brix del producto
- Incrementa el calibre del producto
- Permite un correcto desarrollo de los diferentes estados fenológicos del cultivo con presencia de pseudomonas
- Reducir la presencia de chancros y a su vez se estimula la cicatrización de estos.
- Resulta rentable económicamente para los agricultores al incrementar calidad, cantidad del producto obtenido (cerezos) a los que se añade la mejora de la sanidad vegetal

Siendo esto los parámetros objetivos demandados por el mercado, calidad y tamaño de la fruta.

Sería interesante conocer el precio de mercado de las materias primas y cotización según calidad para determinar la mejora de ingresos para la explotación agrícola, a su vez, desde Agrosmart creemos que el empleo de estos tipos de productos es interesantes ya que trabajan en la línea de producción “residuo cero” y permite desarrollar un modelo agrícola más sostenible al no emplear productos fitosanitarios que se puedan considerar nocivos para el entorno natural.

Índice de Figuras

Ilustración 1. Ejemplar de cerezo con ataque manifiesto de PSA.Imagen recogida por equipo técnico de Agrosmart solution S.L	2
Ilustración 2 Ejemplar con ataque de yesca (polyporus fomentarius), de la explotación que fue objeto de la investigación, imágenes recogidas por técnicos de Agrosmart Solution S.L	4
Ilustración 3. Exudaciones pseudomona	6
Ilustración 4. Procesado de muestras para análisis	7
Ilustración 5 Gel de agarosa empleado en PCR	7
Ilustración 6 Medición con calibre digital	8
Ilustración 7. Refractómetros medidores de concentración brix	9
Ilustración 8 Muestras del primer ensayo enviadas desde la explotación	12
Ilustración 9 En la imagen se pueden apreciar daños por granizo en cerezas testigo	14

Datos informe

Autor: Jose Abel Bote Paniagua

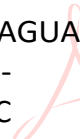
Localización: Incubadora Parque Científico- Centro de Investigaciones Hispano Luso
Universidad de Salamanca

Calle Río Duero nº 12

Laboratorio 6

Empresa: Agrosmart Solution S.L

BOTE PANIAGUA
JOSE ABEL -
76130158C



Firmado digitalmente
por BOTE PANIAGUA
JOSE ABEL - 76130158C
Fecha: 2020.12.30
14:58:41 +01'00'