

Informe Técnico Ensayo Crioprotect antiheladas en cultivos de uva de mesa en la zona de Liray (Sta Marta de Liray)

Contexto

La agrícola Santa Marta de Liray se enfoca en cultivos de exportación, como la uva de mesa (Fig. 29A), además de producir su propio compost orgánico que aplican sobre dichos cultivos. Cuentan con torres de monitoreo agroclimático en distintas ubicaciones de sus dependencias (Fig. 29B) para mantener claridad sobre las condiciones a las que los distintos cuarteles



están sometidos.

Figura 29. Fotos del predio Sta. Marta de Liray. A) Cultivos de uva de mesa de exportación de la agrícola sobre los cuales se ejecutó el ensayo. B) Estación de monitoreo agroclimático instalada dentro de los cuarteles utilizados para el ensayo.

La agrícola mantiene sus cultivos con un buen control fitosanitario, sin presencia significativa de hongos, infecciones bacteriales o lesiones por intoxicación química, con troncos y brotes sanos (Fig. 30A).

Uno de los problemas más urgentes que afectan a la agrícola es la necesidad de un control de heladas efectivo, por lo que año a año la empresa contrata un helicóptero para minimizar el daño por heladas en sus cultivos de uva (Fig. 30B).

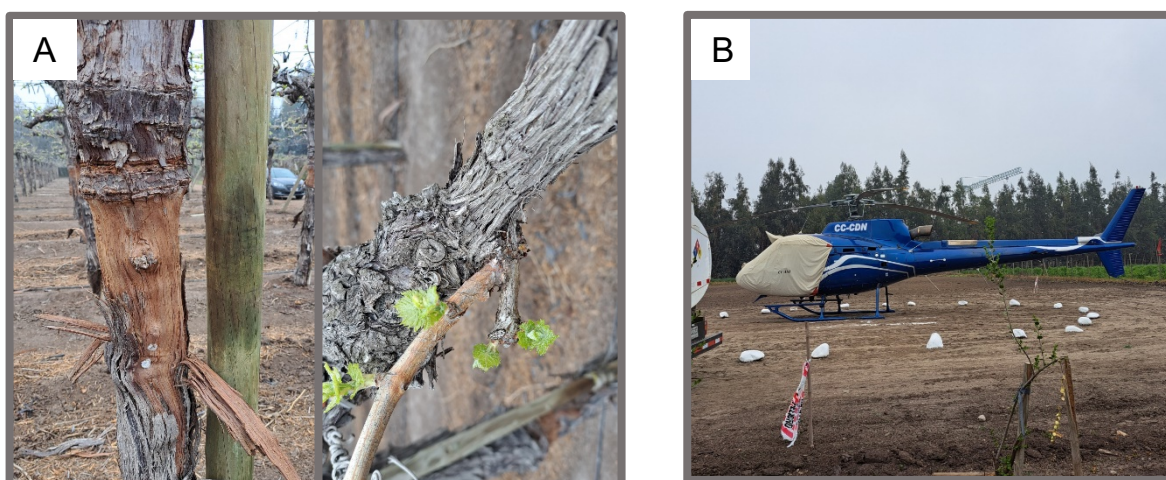


Figura 30. Ejemplos de los problemas que enfrenta la agrícola. A) Estado general de la madera y brotes sobre los cuales se ejecuta el ensayo. B Helicóptero, método actual de control de heladas.

Sin embargo, este método de control de heladas conlleva una serie de consideraciones que pueden suponer problemas para la agrícola como, por ejemplo: 1) La presencia de cableado de alta tensión (Fig. 31), donde el helicóptero no puede hacer ingreso, dejando cuarteles sin protección. 2) El hecho de que el helicóptero debe arrendarse por la temporada de sospecha de aparición de heladas (1 a 2 meses) para mantenerse dentro de los límites del predio independiente de la cantidad de heladas que efectivamente se presenten. 3) Se requiere un operador capacitado para utilizar el helicóptero, el cual supone un costo adicional por cada evento de helada presentado. 4)

El helicóptero debe sobrevolar el terreno cuando la temperatura aún no ha llegado a un punto de congelación, por lo que se requiere un sistema predictivo para evaluar de manera fehaciente el riesgo de que en las próximas horas la temperatura descienda hasta ser peligrosa para los cultivos. 5) No todos los tipos de heladas son controlables a través de la mezcla de masas de aire, ya que en algunos casos las masas de aire por sobre los cultivos pueden estar más frías que las que rodean a los cultivos, en cuyo caso aplicar este método resulta perjudicial, y también a veces se alcanzan temperaturas lo suficientemente frías como para que, aun mezclando las masas de aire, la temperatura no suba hasta niveles seguros. Debido a esto, la agrícola ha estado explorando distintas alternativas de control de heladas, razón por la cual contactaron a Pewman Innovation.

En este contexto, Pewman Innovation y Agrícola Santa Marta han acordado evaluar el efecto antiheladas que CRIOPROTECT, un producto foliar basado en bacterias antárticas y nanobiopolímeros, puede otorgar a sus cultivos. Para esto, se realizó un ensayo que contempla 4 condiciones (o tratamientos) en distintos cuarteles: 1) el cuartel solo con helicóptero, 2) cuartel solo con CRIOPROTECT, 3) cuartel tanto con helicóptero como con CRIOPROTECT, y 4) cuartel sin control de heladas. El ensayo se realizó sobre la variedad Thompson seedless (cuarteles 1-3) y Red globe (4) todos con sistema de conducción horizontal (Fig. 31) y aplicando el producto 4 veces cada 10 días al 0,5 % con 400 L/Ha, 500 L/Ha y 600 L/Ha para las últimas 2 aplicaciones iniciando la 1ra semana de septiembre. La agrícola reportó 2 heladas de alrededor de -1 °C según la estación meteorológica instalada, los días 9 y 22 de septiembre.



Figura 31. Foto del cuartel aplicado. Se observa cableado de alta tensión pasando sobre el cuartel que imposibilita la utilización del helicóptero para el control de heladas.

Observaciones

En primer lugar, se tomó un registro fotográfico de los brotes en terreno (Fig. 32) y en laboratorio (Fig 33).



Figura 32. Fotos de los árboles aplicados con CRIOPROTECT (arriba) y testigo absoluto (abajo). Se observa una clara diferencia en el desarrollo de los brotes, encontrándose el control absoluto en un estado fenológico más temprano.

Los árboles más avanzados, es decir, con los brotes más desarrollados, fueron tratados con cianamida hidrogenada (producto rompedor de dormancia), por lo que adelantaron su brotación, entre los cuales se encuentran tanto los cuarteles aplicados con CRIOPROTECT como los que tienen control con helicóptero. Por otro lado, el cuartel testigo absoluto no fue tratado con rompedores de dormancia para evitar al máximo el riesgo de daño por heladas, ya que dicho cuartel no contempla ningún método de protección. Esto causó que a la fecha de la visita se observaran claras diferencias en el estado fenológico de los tratamientos, mostrándose en la figura 32 ejemplos del tamaño de los brotes en cada condición. Es importante mencionar que

este resguardo tomado por parte de la agrícola puede causar una menor aparición de daño por frío en el testigo absoluto de la que se tendría si se hubieran manejado de la misma manera que los tratamientos.

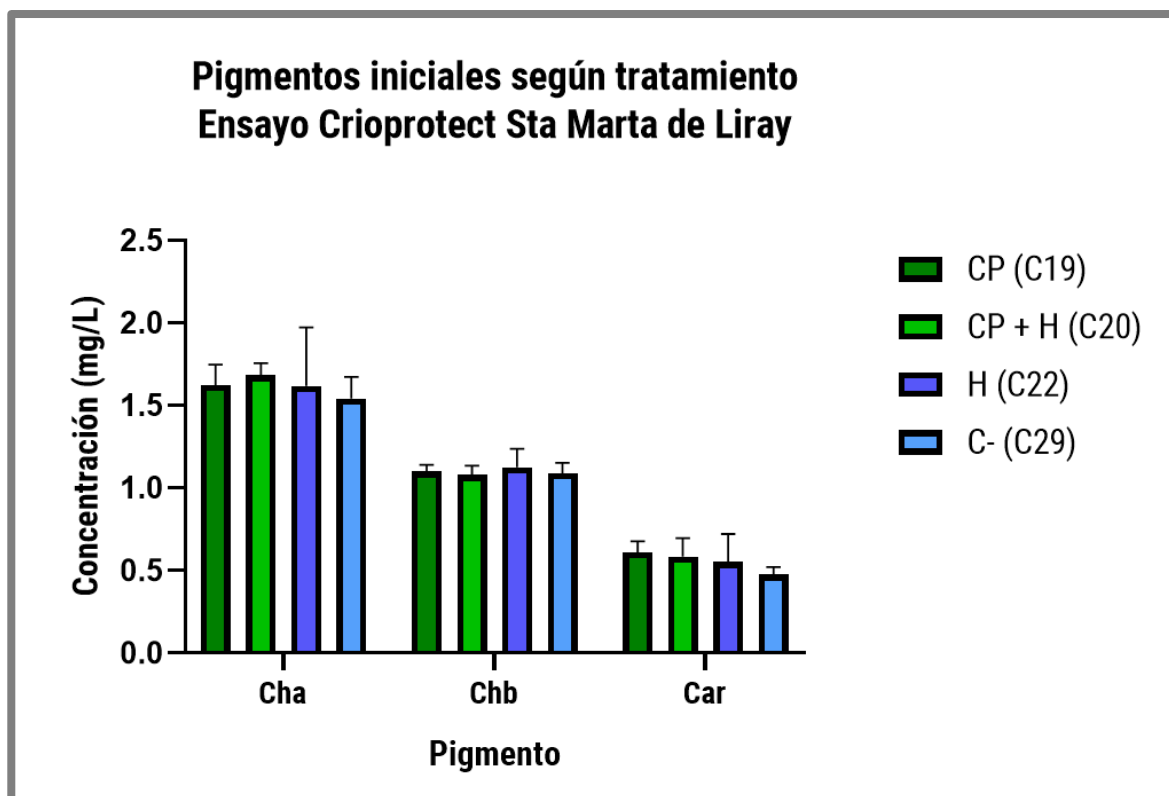


Figura 33. Fotografías de los frutos en formación. No se observan mayores diferencias entre los árboles aplicados con CRIOPROTECT y los árboles protegidos con helicóptero. Se observan leves daños en las hojas de los brotes sin protección.

La figura 33 muestra que tanto los brotes aplicados con CRIOPROTECT como los protegidos con helicóptero no tienen diferencias significativas en cuanto a la presencia de algún tipo de tejido dañado, algo observado repetidamente en distintos puntos de cada cuartel. De los 50 brotes examinados por cuartel, ninguno de los que estaban cuidados con helicóptero, CRIOPROTECT o ambos presentó daño (0% de daño). En el caso del testigo absoluto, se observó un daño leve, exclusivamente en las puntas de las hojas, a pesar de la consideración de la agrícola de no adelantar su brote. En este caso, de los 50 brotes observados, solo 2 presentaron daños leves en las hojas (4% de daño leve). De estas observaciones se

puede desprender que, frente a las heladas presentadas desde la salida de dormancia del 9 y 22 de septiembre, CRIOPROTECT ha generado al menos la misma protección que el helicóptero, incluso habiendo adelantado la brotación con rompedores de dormancia.

También se recolectaron muestras para la cuantificación bioquímica de pigmentos principalmente en hojas. Dadas las diferencias leves en estados fenológicos, se optó por elegir brotes de tamaños similares de cada cuartel. Se tomaron 500 mg de tejido, se procesaron con un mortero, se suspendieron en un solvente, se centrifugaron y se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda del sobrenadante con un espectrofotómetro para luego



calcular la cantidad de pigmentos en mg/L.

Figura 34. Cuantificación bioquímica de clorofila a (Cha), clorofila b (Chb) y carotenoides (Car) septiembre 2022. Los tratamientos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Según la cuantificación bioquímica de pigmentos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos. Esto indica que a pesar de que el cuartel aplicado con CRIOPROTECT fue adelantado en su brotación, exponiéndolo a un potencial daño por heladas durante el mes de septiembre, el cultivo ha sido capaz de mantener su actividad fotosintética (clorofila a y b) al mismo nivel que el cuartel tratado con helicóptero. Se espera que estos resultados marquen la línea base para las cuantificaciones futuras, donde podremos observar si es que se presentan diferencias, y si es que estas diferencias se deben al aumento de pigmentos de cierto tratamiento o a la disminución de pigmentos de los controles.

En octubre se volvieron a tomar muestras foliares para repetir el análisis anteriormente mostrado. Los resultados se muestran a continuación.

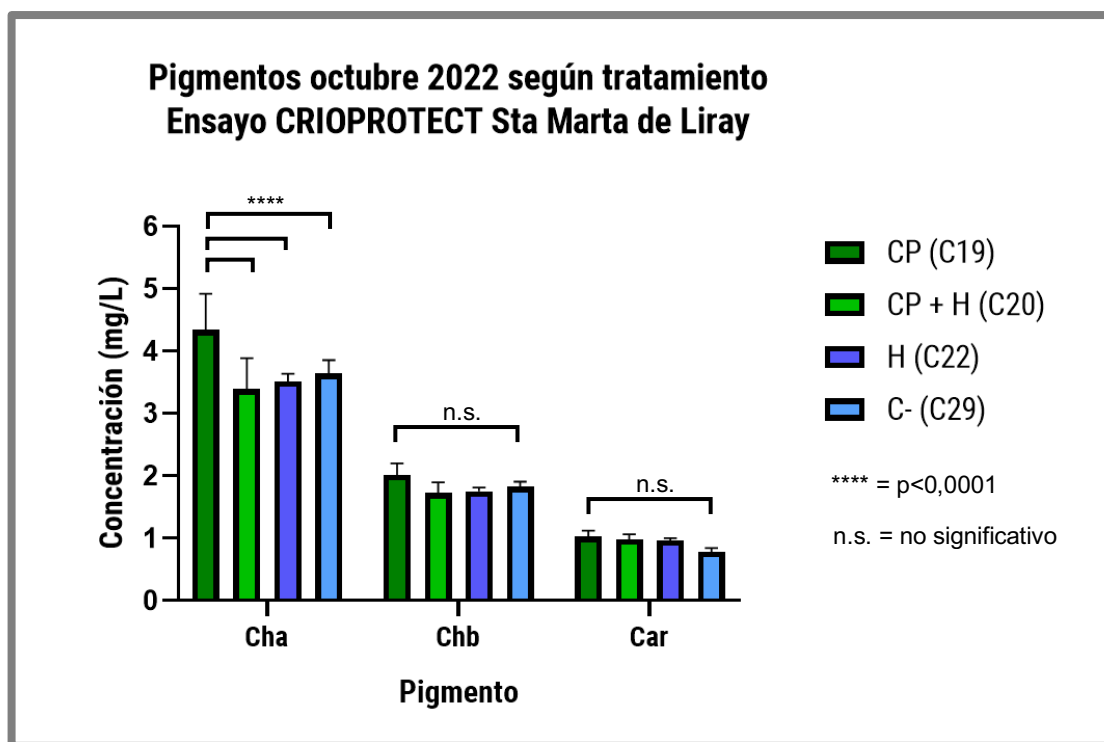


Figura 35. Cuantificación bioquímica de clorofila a (Cha), clorofila b (Chb) y carotenoides (Car) octubre 2022. El tratamiento CP (C19) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido de clorofila a frente a los 3 otros tratamientos.

En esta época el desarrollo foliar es mayor y la planta se encuentra en un estado metabólicamente más activo, lo que se demuestra al mirar los valores generales en los que se encuentran la concentración de pigmentos. En la cuantificación anterior, la concentración de ninguno de los pigmentos superaba los 2 mg/L para clorofila a, y la clorofila b y carotenoides se encontraban alrededor de 1 y 0,5 mg/L respectivamente, mientras que en esta etapa los árboles presentan una concentración de más de 3 mg/L para clorofila a, y alrededor de 2 y 1 mg/L de clorofila b y carotenoides respectivamente, lo que comprende un aumento de aproximadamente el doble en aproximadamente 1 mes y medio.

En este segundo análisis también se observó que el cultivo que fue únicamente tratado con CRIOPROTECT (sin la utilización del helicóptero) presenta una diferencia estadísticamente significativa con todos los otros tratamientos en el contenido de clorofila a, siendo ésta de un promedio de 4,3 mg/L. Teniendo los valores de los cuarteles 20, 22 y 29 un promedio de 3,4, 3,5 y 3,6 mg/L respectivamente, esto corresponde a un aumento de aproximadamente un 20%. Si bien los otros pigmentos no variaron de forma estadísticamente significativa, este aumento ya puede dar cuenta de una estimulación de la fotosíntesis, lo cual está estrechamente relacionado con la estimulación del metabolismo en general. Es necesario investigar más a detalle el efecto que la utilización del helicóptero puede haber tenido sobre la aplicación del producto en el cuartel 20, ya que ésta es la primera vez que se aplica el producto en esta condición.

En diciembre se realizó un tercer análisis de cuantificación de pigmentos de los mismos cuarteles.

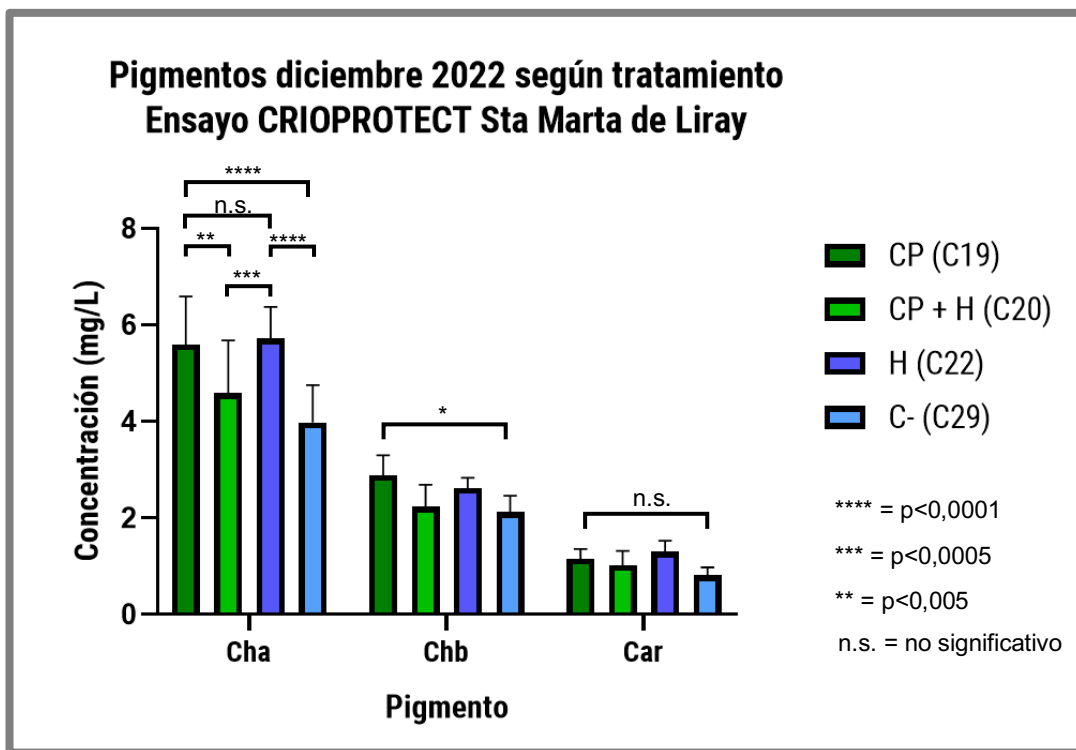


Figura 36. Cuantificación bioquímica de clorofila a (Cha), clorofila b (Chb) y carotenoides (Car) octubre 2022. La leyenda indica la relevancia estadística de cada comparación

El tercer análisis fue realizado aproximadamente 2 meses después de las aplicaciones del producto. Según el seguimiento que se ha hecho hasta la fecha y tal como muestra el gráfico, el cuartel aplicado únicamente con CRIOPROTECT ha logrado mantener su metabolismo al mismo nivel que el cuartel que está tratado únicamente con helicóptero a pesar de estar fenológicamente más atrasado, lo que indica no solo el efecto protector antiheladas del producto, sino que también su efecto de estimulación sistémica. El cuartel que tiene ambos tratamientos juntos (CRIOPROTECT y helicóptero) mostró diferencias significativas en cuanto a la presencia de clorofila a frente a todos los otros tratamientos, siendo menor a la cantidad de

clorofila encontrada aquí frente a la utilización de cada tratamiento por separado. Es necesario indagar más acerca del tratamiento agronómico particular de cada cuartel, ya que al conversar con el encargado se mencionó la utilización diferenciada de rompedores de dormancia y también de aplicaciones de giberelina que podrían dilucidar la razón del retraso o disminución del metabolismo fotosintético.

De todas maneras, en esta etapa de desarrollo ya se observa una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de clorofila b entre el cuartel aplicado únicamente con CRIOPROTECT y el que no tiene aplicaciones ni tratamientos, algo que en las otras 2 mediciones aún no se manifestaba. Otro punto importante es que ha podido registrarse el aumento de la actividad fotosintética desde la salida de dormancia hasta pleno verano, donde las primeras mediciones de clorofila a en septiembre rondaban los 2 mg/L, en octubre los 4 mg/L y en diciembre alcanzan los 6 mg/L. Esta línea de tiempo puede funcionar como referencia para próximos años en cuanto al estado metabólico del cultivo y también como línea base para comparar entre variedades.



Figura 37. Planta con una visible afectación en su follaje. Caso aislado en cuartel de variedad *Red Globe*.

En la visita de diciembre se observó un cultivo con una aparente afectación fitosanitaria en uno de los cuarteles de la variedad *Red Glove* que se encontraba aledaño a los estudiados previamente. Es importante mencionar que era un caso aislado, ya que en general todos los cuarteles observados tienen una óptima salud fitosanitaria, y por lo mismo a Pewman Innovation le interesó examinar una muestra de este árbol, para al menos diferenciar si tenía un origen microbiano (hongos/bacterias), viral o metabólico. Para esto, se tomaron muestras de follaje, se masaron 500mg, se homogeneizaron los tejidos en un mortero con agua destilada estéril y luego se sembraron muestras de manera directa y luego de una dilución de 1/10. Como referencia este proceso se repitió para el cuartel 19, el cual estaba aplicado con CRIOPROTECT y el cuartel 22, el cual no tenía aplicaciones del producto.

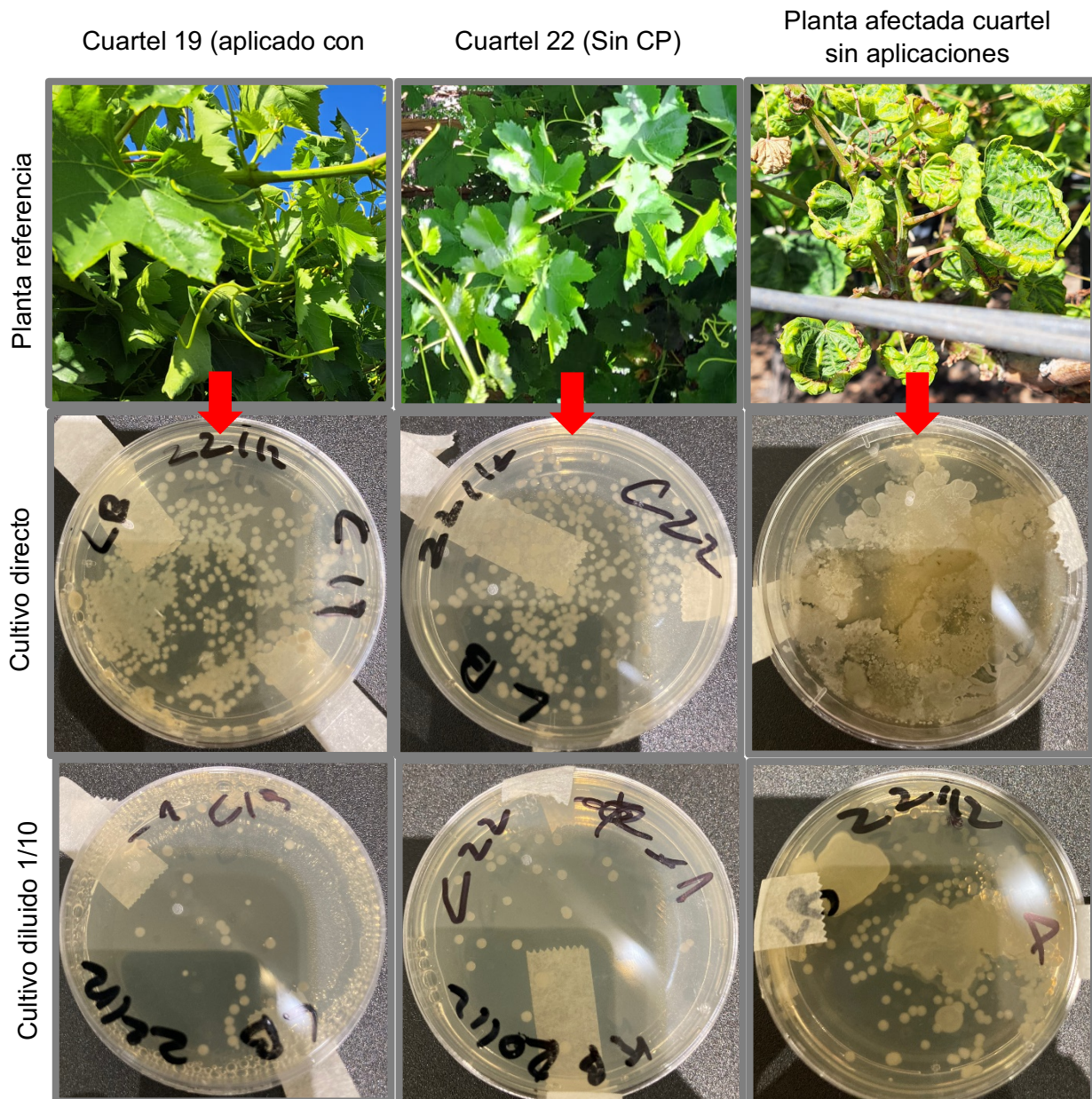


Figura 38. Siembra de microorganismos desde muestras foliares en placas de petri con medio sólido nutritivo.

Por un lado, este análisis sirve para determinar que la aplicación de CRIOPROTECT de manera foliar no desequilibra el microbioma propio de la planta, ya que tanto el cuartel aplicado como el no aplicado, ambos en un buen estado fitosanitario, no presentan diferencias significativas. Este resultado también acompaña el hecho de que las bacterias del consorcio se

van biodegradando y por tanto van disminuyendo en el tiempo, ya que la última aplicación registrada en el cuartel 19 corresponde a al menos 1 mes y medio antes de la toma de muestras, lo que refuerza la importancia de las repeticiones de la aplicación para obtener una protección óptima.

Por otro lado, este análisis también permite descartar que la afectación observada pertenezca a un origen viral (los virus no crecen en los medios utilizados) o a un origen metabólico, ya que en las placas de Petri se observa un crecimiento excesivo de microorganismos que no se observa en las muestras utilizadas como comparación. Si bien se mencionó que el predio completo en general se encuentra en un buen estado fitosanitario, es de todas maneras recomendable deshacerse rápidamente de estas infecciones, ya que pueden funcionar como fuente de inóculo para otros árboles dentro del predio, sobre todo cuando se realizan labores de manejo de carga que dejan expuestas algunas heridas que permiten la subsecuente infección de la planta.

También, en la primera visita, al no haber tejido foliar, se tomaron muestras de suelo superficial de un cuartel sin aplicación de CRIOPROTECT, y muestras de suelo superficial y profundo (20 cm) de un cuartel aplicado con el producto hace 10 días. Se tomaron 5 gramos de tierra que se suspendieron en 10 mL de agua estéril, se prepararon diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 y se sembraron sobre medio de cultivo nutritivo sólido en placas de Petri.

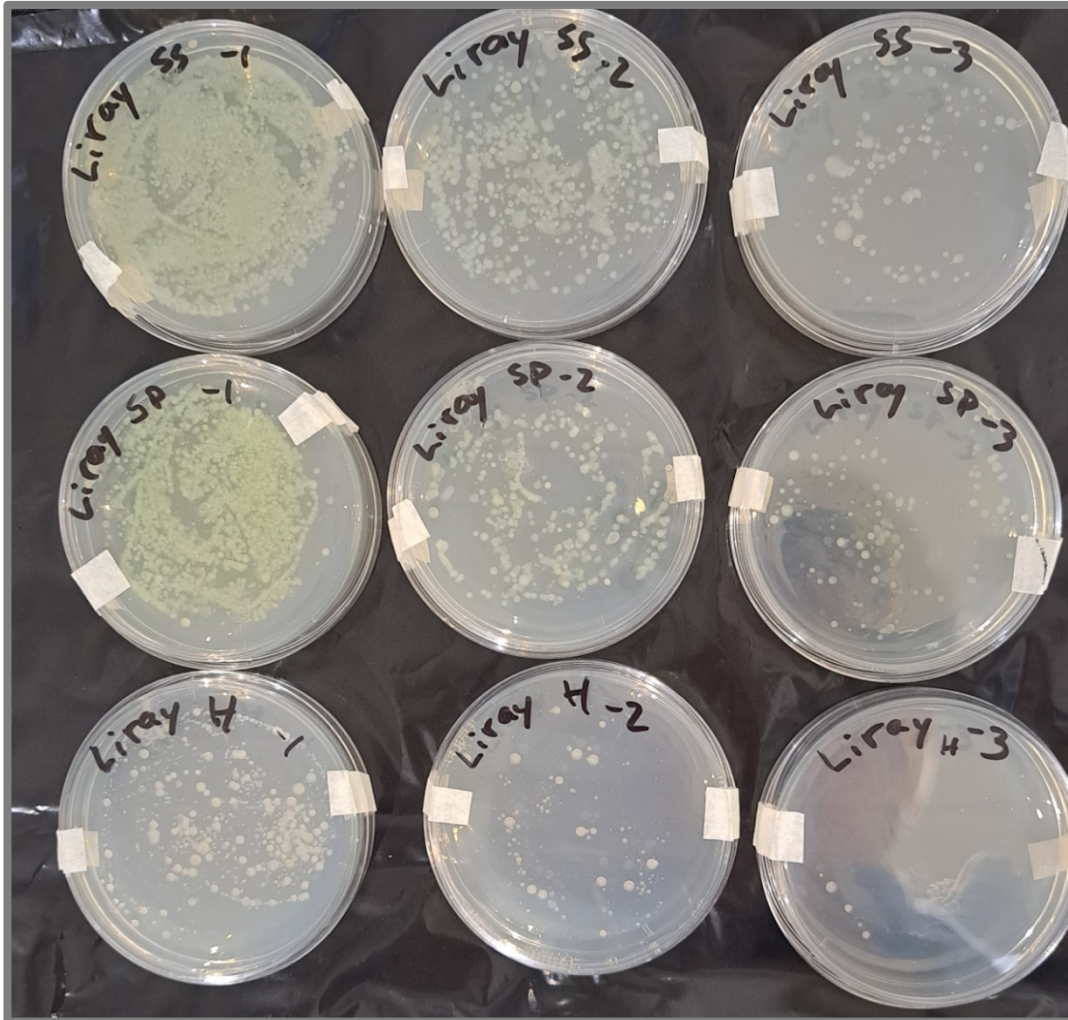


Figura 39. Siembra en medio de cultivo líquido de distintas diluciones de muestras de suelo de distintos cuarteles. Fila 1: aplicado con CRIOPROTECT, suelo superficial. Fila 2: aplicado con CRIOPROTECT, suelo profundo. Fila 3: sin aplicaciones de CRIOPROTECT, superficial.

Los resultados de observación de bacterias en las muestras de suelo indican claramente una mayor presencia de microorganismos en los cultivos aplicados con CRIOPROTECT a los 10 días de aplicación en contraste a los cuarteles no aplicados. A pesar de que las aplicaciones de CRIOPROTECT se realizan de manera foliar, parte del producto cae al suelo (Fig. 40), donde se establece y comienza a formar parte de la comunidad microbiológica presente de antemano. Es importante notar que uno de los mecanismos de

acción del producto (mecanismo sistémico de acción) está justamente ligados a la estimulación sistémica por parte de algunas de las bacterias del consorcio que producen compuestos orgánicos y señalizadores, la cual ocurre principalmente en la raíz. Este establecimiento por parte de las bacterias antárticas ocurre también las hojas, ramas y troncos donde el producto es aplicado, contribuyendo a disminuir la población relativa de microorganismos nucleadores de hielo, evitando así gran parte de la formación de hielo sobre la planta (mecanismo biológico de acción), además de que permite que las bacterias establecidas puedan producir los nanobiopolímeros que brindan una barrera física 100% orgánica ante el ambiente (mecanismo físico de acción). Esta combinación de mecanismos es la que genera una respuesta antiheladas robusta por parte de la planta.



Figura 40. Aplicación de CRIOPROTECT sobre los cultivos. Se puede observar que parte de la nube que no se deposita sobre los cultivos cae directamente al suelo.

Por otro lado, análisis posteriores revelaron que no todos los microorganismos encontrados en la rizosfera de los cultivos tratados con

CRIOPROTECT corresponden a los microorganismos del consorcio aplicado, indicando que el producto contribuye a un enriquecimiento microbiano. Este enriquecimiento de microorganismos puede contribuir (como se ha observado en ensayos anteriores ejecutados por Pewman) a una disminución de la colonización por parte de patógenos, contribuyendo a mantener la sanidad del cultivo de manera 100% orgánica y así disminuir la aplicación de químicos (como compuestos en base a cobre) que pueden acumularse y causar intoxicaciones en las plantas si no se aplican de manera responsable.

Conclusiones

- CRIOPROTECT mostró un grado de protección al menos igual al brindado por el helicóptero ante las 2 heladas del mes de septiembre registradas in situ, en los cultivos de uva de mesa tratados con rompedores de dormancia con potencial riesgo de daño por heladas.
- La aplicación de CRIOPROTECT genera un enriquecimiento de las comunidades microbianas presentes en la rizosfera y superficie del cultivo.