

INTRODUCCIÓN

Las directrices de la estrategia europea "Europa 2020", propuesta por la Comisión Europea, y el documento sobre la Política Agrícola Común (PAC) "La PAC en el horizonte 2020", ambos reconocen la agricultura como sector estratégico para Europa. La agricultura está considerada como una actividad capaz de contribuir con éxito a la generación de crecimiento económico europeo, aumentando el contexto de la seguridad alimentaria, a través de la aplicación de las normas de calidad y seguridad de los productos que tienen que ser altas, mantener una adecuada uniformidad, y que de manera competitiva pueden satisfacer a escala mundial las expectativas del mercado interior y el de fuera de Europa.

De acuerdo con "La PAC en el horizonte de 2020", el éxito futuro de la agricultura moderna en Europa está preparado para respetar un modelo de desarrollo sostenible, en temas como la seguridad alimentaria, la trazabilidad y la calidad de los productos, y todo ello está transversalmente integrados con otras cuestiones esenciales, tales como protección del medio ambiente y protección de los recursos naturales, así como de las zonas rurales, respetando al mismo tiempo sus poblaciones y los recursos humanos. Por otra parte, este nuevo modelo de desarrollo para la agricultura no puede estar separado de otros problemas de la producción agroalimentaria relacionados con el cambio climático que padecemos y que tiene lugar a nivel mundial. Existe una estrecha relación entre todos estos temas y la gestión y el control de enfermedades de las plantas, para los que se necesitan con urgencia el desarrollo e introducción de estrategias innovadoras de control con el fin de reducir el uso de pesticidas sintéticos, manteniendo al mismo tiempo los ingresos y la producción inalterada tal y como exige la más reciente legislación europea en esta materia.

En este contexto, el 12 de julio de 2006 la Comisión Europea aprobó la Comunicación "Estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas", la cual representa una propuesta de directiva con el fin de establecer un marco para una acción común europea sobre el uso sostenible de los plaguicidas, y que fue aceptada por el Parlamento Europeo en 2007. Esta estrategia temática propone una serie de medidas destinadas a reducir el impacto de los compuestos utilizados en la protección de las plantas en la salud humana y el medio ambiente, garantizando al mismo tiempo la productividad. La reducción de esas moléculas sintéticas para la protección de las plantas mediante la sustitución por otros compuestos alternativos y eficaces, es una de las estrategias previstas para el logro de este objetivo. Los compuestos de cobre, utilizados desde hace unos 150 años como fungicidas y bactericidas para el control de enfermedades de las plantas, se encuentran entre los plaguicidas cuya reducción fue planificada en la actual legislación europea, tanto en términos de número de formulaciones permitidas y de las cantidades anualmente admitidas para su uso en campo, incluida la agricultura orgánica.

Para alcanzar estos objetivos, la Unión Europea ha promovido una serie de medidas para fomentar la investigación innovadora sobre los compuestos fitosanitarios y plaguicidas, además de promover acciones relativas a la vigilancia de sus pruebas, así como la información y formación de los usuarios cuando se demuestra su eficacia para la protección de cultivos

LA HISTORIA DEL COBRE EN LA PROTECCIÓN FITOSANITARIA

El uso de cobre como producto antimicrobiano se remonta a los tiempos de los egipcios, pero fue al final del siglo XVIII cuando las sales cúpricas se utilizaron por primera vez en el control de enfermedades de las plantas, en particular contra el agente causante de enfermedades del trigo. Vale la pena indicar que la validez del Cu como agente infeccioso se demostró de manera concluyente y aceptó sólo desde mediados del siglo siguiente, con relación a la patología de las plantas. En la década de 1800, el botánico francés y ampelógrafo Alexis Millardet evaluó las propiedades fungicidas de una mezcla de sulfato de cobre, cal y agua, capaz de controlar el mildiu de la vid; esta mezcla más tarde fue llamada "caldo bordelés" que se ha hecho este descubrimiento en la provincia de Burdeos. Inicialmente utilizada en los viñedos, la mezcla de Burdeos se convirtió rápidamente en el primer fungicida usado en todo el mundo para la protección de las plantas. Algún tiempo después, se demostró que la mezcla de Burdeos era también eficaz contra las bacterias patógenas de plantas. La actividad fungicida y bactericida de la mezcla de Burdeos, así como de otros compuestos a base de cobre, no es específica. Su acción se basa en la toxicidad de los iones de cobre Cu^{2+} que, cuando es absorbido por el hongo o una bacteria, se une a varios grupos químicamente diferentes de proteínas estructurales o enzimáticos, causando su desnaturalización y por lo tanto el bloqueo de su funcionalidad. La concentración de iones de cobre Cu^{2+} potencialmente bioactivos como antimicrobianos depende de la solubilización del compuesto cúprico utilizado, así como de las condiciones físico-químicas encontradas en superficies de las plantas después del tratamiento. En términos generales, en condiciones ácidas el compuesto cúprico tiene una bioactividad alta y rápida, pero no es muy persistente / estable. Por el contrario los compuestos a base de cobre son más persistentes en condiciones alcalinas, aunque menos eficaz. En consecuencia, la evolución de la mezcla de Burdeos ha sido impulsada por la necesidad de optimizar los factores termodinámicos y cinéticos que regulan la producción y la liberación de los iones de cobre Cu^{2+} . Hasta los años 60, la mezcla de Burdeos fue fabricado directamente por los agricultores, mientras que muchas formulaciones industriales a base de cobre se establecieron posteriormente y produjeron, con el objetivo de reducir la cantidad de Cu^{2+} activo por hectárea, pero con la misma eficacia hacia la planta. La adhesión, la persistencia de la planta, y la resistencia al lavado por agua de todos los compuestos de cobre se ha mejorado poco a poco, así como sus propiedades de recubrimiento. Básicamente, se requieren formulaciones industriales a base de cobre para garantizar un cobre más biodisponible y persistente, capaz de obtener una liberación constante de iones de cobre Cu^{2+} , a bajas concentraciones y en una sola vez, y que no se vean afectados por cualquier variación que ocurre en las condiciones ambientales sobre la superficies de las plantas

EL COBRE EN LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS: TEMAS Y LEGISLACIÓN EUROPEA ACTUAL

En Europa, la protección de cultivos de hongos patógenos y bacterias todavía se sustenta principalmente en el uso de productos a base de cobre. El uso de cobre se permite también en la agricultura orgánica por el reglamento europeo, formulado como hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre tribásico, etc. Las normas que

rigen la evaluación, aprobación, comercialización y monitorización sobre el uso de productos fitosanitarios en la Unión Europea sigue estando esencialmente basados en la Directiva 91 / 414CEE. Y esta Directiva fue fundamental para iniciar el proceso de armonización en esta materia entre los Estados miembros de la UE. En 2002, la Comisión Europea comenzó a trabajar en "La Estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas". En el mismo año, se aprobó el Reglamento nº 473/2002, y por lo tanto un proceso legislativo para la reducción del uso del cobre en los productos fitosanitarios comenzó, también en los Estados miembros de la UE. La estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas fue adoptado por la Comisión Europea en 2006. Pocos años después, con la Directiva 2009/128 / CE, se redactaron normas mínimas sobre el uso de pesticidas para ser aplicado en toda la UE, con el fin para reducir los riesgos para la salud humana y para el medio ambiente derivados de su utilización. En la actualidad, no más de 6 kg de cobre por hectárea y por año se pueden utilizar para la protección de las plantas en la agricultura orgánica (Reg. CE 889/2008), y reglas aún más restrictivas también pueden ser aplicadas por cada Estado miembro de la UE, de acuerdo con su legislación sobre la protección de enfermedades de las plantas. Además, se han previsto excepciones particulares de este límite, especialmente para los tratamientos a base de cobre de cultivos perennes. Restricciones similares se hicieron necesarias cuando los efectos ecotoxicológicos negativos del consumo de cobre en la protección fitosanitaria fueron evidentes, a pesar de sus muchas ventajas en la agricultura. El cobre se acumula en el suelo, de acuerdo con su naturaleza química intrínseca, como resultado de tratamientos constantes y repetidos en la agricultura. No se ve afectado por cualquier forma de degradación, y su presencia en el suelo es variable en función de fenómenos tales como la lixiviación, la escorrentía y la absorción por los microorganismos y plantas. Cuando hay un exceso en los suelos, como ocurre en ambientes ácidos, el cobre se ha demostrado tóxico para la microflora, la cual resulta esencial para la fertilidad biológica del suelo, así como para su fauna. En altas concentraciones, el cobre se ha demostrado que causa daño a los organismos auxiliares, tales como escarabajos, avispas, crisopas, ácaros y los ácaros depredadores. Por otra parte, a altas concentraciones que a veces se encuentran en los agroecosistemas, el cobre es fitotóxico para la mayoría de las especies de plantas, con daños que ocurren en las hojas con enrojecimiento, clorosis, necrosis, retraso en el crecimiento a principios de otoño, con la desecación de las yemas, con áreas suberizadas y necróticas en los frutos, y con una acción de polinización muy marcada. Este daño es más pronunciado cuando los tratamientos con los compuestos de cobre se aplican sobre la vegetación húmeda.

Los compuestos más fitotóxicos son los basados en hidróxido sulfato de cobre, mientras que los óxidos son menos fitotóxicos. Aunque en la agricultura algunas medidas se pueden adoptar para remediar al menos en parte, estos efectos fitotóxicos del cobre, los riesgos ambientales y toxicológicos derivados de su uso constante en la protección de las plantas justifican los esfuerzos hacia su reducción en el uso. Por último, aunque no menos importante, otro efecto secundario importante derivado de repetidas aplicaciones de fungicidas y bactericidas a base de cobre es el desarrollo de los fenómenos de resistencia hacia algunos patógenos de las plantas, con una disminución de su eficacia en el control de enfermedades vegetales. Por otra parte, por un fenómeno de resistencia cruzada, el cobre también determina un aumento alarmante en el porcentaje de bacterias resistentes a varios antibióticos en la microflora de los ecosistemas agrícolas. Esto crea una especie de depósito de genes de resistencia a antibióticos, que son generalmente plásmido transmisores, y que pueden ser fácilmente transferidos por conjugación también a bacterias patógenas para seres humanos y animales, lo que hace ineficaz el uso profiláctico y terapéutico de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria

LAS ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LAS PLANTAS Y SU CONTROL

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas, que tienen reproducción asexual por fisión binaria. Aunque la mayoría de las bacterias son a menudo inofensivas o beneficiosas, varios agentes patógenos pueden ser capaces de causar enfermedad. Entre las bacterias patógenas hay algunos agentes causales de enfermedades de las plantas. Las primeras bacterias patógenas para las plantas fueron identificadas al final del siglo 19, con *Erwinia amylovora*, el agente causal de esta enfermedad que afecta a más de 130 especies de plantas de la familia de las rosáceas (Burrill, 1878), y *Pseudomonas savastanoi*, el agente causal de enfermedades asociadas al olivo (Savastano, 1886-1889). En la actualidad, se conocen alrededor de 1.600 especies de bacterias, de las que unas 300 son patógenos de plantas. Muchas bacterias fitopatógenas viven la mayor parte de su ciclo asociado con superficies de la planta, tanto en el filosfera como en la rizosfera, sin causar ningún daño y síntomas. Su patogenicidad se expresa en su etapa endofítica, cuando se multiplican y colonizan los espacios intercelulares o incluso los elementos vasculares de la planta huésped. Incapaces de penetrar activamente en las plantas ni por acción mecánica ni enzimática, las bacterias infectan a sus anfitriones aprovechando la presencia de ambas lesiones accidentales (por ejemplo, cortes de poda, daños por heladas, así como cicatrices de las hojas) y las aberturas naturales (por ejemplo, los estomas y lenticelas, hidátodos, estigmas). Con menor frecuencia, se transmiten directamente a las plantas por insectos vectores. Las fuentes de inóculo primario más comunes son los restos de plantas y tumores de corteza infectados. Una considerable importancia también tiene las infecciones de forma asintomática en semillas y materiales de propagación, y en el polen raramente infectadas. La difusión de inóculo secundario puede ser por medio abiótico (por ejemplo, el agua, el riego, la lluvia, el viento y los instrumentos infectados también) y por agentes bióticos (por ejemplo, insectos, nematodos, aves). Entre ellos, los seres humanos muy a menudo desempeñan un papel decisivo. Aunque las enfermedades bacterianas de las plantas no son tan comunes como las causadas por virus y hongos, las bacterias fitopatógenas pueden ser clasificadas en categorías de elevado riesgo de todos modos, de acuerdo con parámetros tales como su capacidad para causar enfermedad a menudo independientemente de la presencia de factores predisponentes, la gravedad de la enfermedad en términos de letalidad y la reducción de la producción agroforestal, la difusión y la transmisión, polifagia o la capacidad de infectar a más especies de plantas, incluso filogenéticamente distantes, el potencial diagnóstico en términos de disponibilidad de la técnica de identificación específica, sensible y rápido, así como la accesibilidad a las intervenciones eficaces, preventivas, curativas, o erradicación. Por otra parte, las bacterias fitopatógenas están presentes y la enfermedad causa daños en muchos entornos extremadamente diferentes, así como en un número considerable de huéspedes vegetales. Por su rápida multiplicación, pueden ser extremadamente destructivas en condiciones ambientales favorables. Su impacto destructivo es aún más dramático en el caso de las bacterias fitopatógenas de cuarentena y de patógenos de plantas recién introducidas

Las bacterias patógenas de plantas son una amenaza importante debido a su importancia económica para las áreas o países para aquellos países en los que estaban ausentes o no muy extendido todavía. Por eso, la aplicación oportuna de las medidas oficiales específicas en el caso de la presentación de informes está regulada por la ley. Finalmente, al igual que sucede con otros microorganismos patógenos, también para las bacterias que causan enfermedades en las plantas incluyendo las de cuarentena, es probable suponer un aumento adicional de su propagación en los próximos años, como consecuencia de la intensificación de las operaciones

internacionales y del actual cambio climático, el cual ayudará casi con toda seguridad directa o indirectamente a la difusión y propagación de bacterias.

La amenaza más grave y el verdadero problema que plantean las enfermedades bacterianas de las plantas es que son difíciles de tratar una vez surgida y producida la enfermedad. Por lo tanto, su control se basa esencialmente en un enfoque preventivo, mediante la adopción de criterios y medidas estrictas, incluso de carácter legislativo. En este sentido, la Directiva 2000/29 / CE del Consejo Europeo estableció las medidas que los Estados miembros debían adoptar para proteger las plantas de los microorganismos patógenos y plagas hacia ellas, limitando su difusión en la Unión Europea mediante la prevención de su propagación en caso de reciente introducción. En pocas palabras, cada Estado miembro está obligado a designar una autoridad responsable de la salud de las plantas, a cargo de organizar los controles fitosanitarios específicos tanto en la producción interna a partir de terceros países, para la liberación de un certificado fitosanitario y la verificación del pasaporte fitosanitario, respectivamente.

En el marco de la seguridad alimentaria y para aumentar la competitividad europea en un mercado globalizado, en mayo de 2013 la Comisión Europea propuso un nuevo reglamento sobre esta materia, que también incluye un paquete de fitosanidad, y específicamente para los materiales de reproducción de las plantas (COM / 2013/0267)

La nueva propuesta tiene como objetivo crear un régimen regulador claro y transparente, para reemplazar y derogar la Directiva 2000/29 / CE, mediante la definición y actualización de las prioridades y el fortalecimiento de las medidas de prevención de enfermedades, mediante la adopción de estrategias más funcionales para alcanzar los objetivos en términos de una mejor relación coste-beneficio. En este contexto, la propuesta define la necesidad de dar prioridad a los organismos nocivos a nivel de la UE en todos los Estados miembros. La lista actual de prioridad para organismo nocivo dentro de la UE no supera el 10% de los que hasta ahora se consideran plagas de cuarentena para la UE, e incluye sólo aquellos que tienen potencialmente impactos económicos, ambientales y sociales dramáticos. Los instrumentos para controlar la presencia y la propagación natural de plagas en caso de que finalmente lleguen a la UE se incluyen en la propuesta 2013/0140 (COD), que sustituiría y armonizaría el Reglamento 882/2004 / CE.

Junto con la adopción de medidas legislativas, el control de bacterias patógenas de plantas también prevé la adopción de prácticas preventivas culturales. Básicamente, su objetivo es reducir el inóculo bacteriano mediante la eliminación del material vegetal infectado y sus restos, o aumentar la resistencia basal de las plantas por fertilización y riego aplicado adecuadamente, para acabar con el uso de variedades de plantas resistentes cuando estén disponible.

Sin embargo, el control químico todavía tiene una fuerte importancia en la protección de las plantas contra enfermedades bacterianas, para preservar tanto la producción como el beneficio económico, en el corto y medio plazo. En general, el control químico contra las bacterias fitopatógenas es menos eficaz que contra hongos patógenos de plantas, y esencialmente se basa en el uso de compuestos a base de cobre, que tiene una acción preventiva bastante exclusiva.

EL PROYECTO DE AFTER CU

El proyecto de AFTER Cu tiene como objetivo demostrar la eficacia de moléculas anti-infecciosas alternativas al uso del cobre, para el control de las enfermedades bacterianas de las plantas, para así abrir un nuevo escenario y enfoques innovadores para la protección de las plantas.

En particular, el proyecto AFTER Cu demuestra la existencia de una verdadera oportunidad de adoptar estrategias respetuosas con el medio ambiente para el control de las enfermedades bacterianas de las plantas, para reducir o incluso reemplazar productos bactericidas basados en el cobre, los cuales son usados de manera tradicional. Aunque todavía está permitido el uso de compuestos a base de cobre, incluso en la agricultura ecológica, se ha restringido su uso en el campo, y sus límites máximos de residuos en alimentos y piensos se redujeron también por la legislación europea más reciente. El proyecto AFTER Cu está incluido en el ámbito señalado con anterioridad, y demostró con éxito las actuaciones anti-infecciosas de moléculas de péptidos innovadores para el control de bacterias Gram negativas que afectan a las plantas. La actividad anti-virulencia directa de los péptidos obtenidos en AFTER-Cu, no se deriva de un efecto antimicrobiano, y excluye además cualquier riesgo de los fenómenos de resistencia para garantizar una mayor eficacia a largo plazo que la dada por el uso de cobre.

Los resultados y el objetivo principal del proyecto AFTER-Cu se lograron con éxito mediante el uso de péptidos frente a varias bacterias fitopatógenos pertenecientes al denominado grupo de *Pseudomonas syringae*, las cuales causan cientos de enfermedades perjudiciales en todo el mundo sobre las monocotiledóneas, herbáceas y dicotiledóneas leñosas. Por otra parte, algunas de estas bacterias están incluidas en la lista A2 de la EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria) de patógenos de cuarentena. En particular, el proyecto de AFTER Cu se ha centrado en aquellas bacterias *P. syringae* que causan enfermedades importantes en los cultivos típicos del Mediterráneo, y está presente en los Estados miembros de la UE, como Italia y España. Las especies de plantas utilizadas como modelo fueron *Olea europaea*, deliciosa *Actinidae*, *Citrus spp.*, en su interacción con *P. savastanoi*, *P. syringae pv. actinidae*, *P. syringae pv. syringae*, respectivamente. Como se muestra a continuación, se utilizaron bacterias lato sensu como *P. syringae* para propósitos de comparación y experimentales.

| PATOGENOS DE BACTERIAS | PLANTAS |
|--|--------------------------------------|
| <i>Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi</i> | <i>Olea europaea</i> |
| <i>Pseudomonas savastanoi pv. nerii</i> | <i>Nerium oleander</i> |
| <i>Pseudomonas syringae pv. actinidae</i> | <i>Actinidae deliciosa/chinensis</i> |
| <i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i> | <i>Citrus limon /sinensis</i> |
| <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |

LOS PÉPTIDOS CONSEGUIDOS Y EXPERIMENTADOS EN AFTER CU

En el proyecto AFTER Cu se han estudiado péptidos diseñados con el fin de ser específicos contra las bacterias patógenas Gram negativas de plantas. Esta característica es esencial en los péptidos generados con AFTER Cu para actuar en las primeras etapas de la interacción entre el patógeno bacteriano y su planta huésped, sin comprometer la viabilidad bacteriana y por lo tanto sin inducir la aparición de fenómenos de resistencia. Este modo de acción es por lo tanto crucial para garantizar el éxito de los péptidos experimentados en AFTER Cu, y su eficacia a largo plazo. Además, entre otras considerables posibilidades aplicativas de los péptidos probados en AFTER Cu está el resultado de la demostración de la ausencia total de cualquier toxicidad, tal como se evaluó sobre la microflora epífita del suelo, por varios

organismos de ensayo [por ejemplo, *Daphnia magna*, *Artemia salina* (UNI EN ISO 6341: 2013; APAT CNR IRSA 8060 Hombre 29 2003) y *Vibrio fischeri*], para terminar con los objetivos subcelulares de universalización presentes y esenciales para la viabilidad de cualquier organismo y micorganismo tales como -ATPasa de membrana Ca^{2+} .

Los péptidos AFTER Cu fueron obtenidos por síntesis química tradicional, de acuerdo con la actual legislación de la UE REACH 1907/2006. Por otra parte, la posibilidad de la producción recombinante biotecnológica de los péptidos AFTER Cu también fue demostrada, para responder a una agricultura más respetuosa con el medio ambiente y con cualquiera de sus prácticas relacionadas.

¿CÓMO USAR LA TECNOLOGÍA DESARROLLADA EN AFTER Cu?

Para el control de las enfermedades bacterianas que se pueden dar sobre el olivo, kiwi y limón, causada por bacterias fitopatógenas que pertenecen al género *Pseudomonas*, dentro del AFTER Cu se ha previsto el estudio, el diseño, el desarrollo y la síntesis de una mezcla específica de péptidos capaces de proteger a estos cultivos de una infección bacteriana.

Los pasos para la preparación y la aplicación de péptidos AFTER Cu se señalan dentro del mencionado proyecto. Estas indicaciones se redactaron en consecuencia a la experiencia adquirida, tanto a escala piloto como sobre el terreno durante el proyecto de After Cu, a través de inoculaciones artificiales directas e indirectas (por ejemplo *P. syringae* pv. *actinidiae* lluvias infecciosas en kiwi) a altas concentraciones, con el objetivo para imitar las peores condiciones de infección que podría ocurrir en condiciones naturales.

Al final, también se señalan los efectos beneficiosos no focalizados que se derivan de la aplicación de los péptidos producidos en AFTER Cu.

1) Procedimiento de solubilización de los péptidos AFTER Cu

La solubilización de los péptidos AFTER Cu es una fase muy delicada, ya que estos péptidos tienen una baja solubilidad en disolventes acuosos. Por lo tanto, se recomienda proceder de acuerdo con el siguiente protocolo:

- i) Pesar el péptido liofilizado (17 o 21 g, véase más adelante), y luego transferir el polvo en un recipiente adecuado para la preparación de la solución madre (100x en comparación con la concentración de trabajo). Es importante evitar presionar el polvo durante este paso, para evitar la generación de partículas prácticamente insolubles.
 - ii) Resuspender el péptido ponderado en 50 ml de DMSO. A continuación, se añaden 50 ml de agua destilada (posiblemente esterilizada) hasta homogeneidad. Se lleva la solución a un volumen final de 1 litro, utilizando agua destilada y agitando vigorosamente la solución para ayudar a una re-suspensión completa. A continuación, añadir otros 9 litros de agua (esto hace para hacer prácticamente inexistente la presencia de DMSO en la solución final).
 - iii) La solución madre se diluyó 1: 100 en agua para de esa forma obtener la concentración final de su uso (sugerido $60\mu\text{M}$).
-

| | |
|--|---|
| AP17 (Olivo y Limón) | PSA21 (Kiwit) |
| Enfermedad: enfermedad del olivo, y necrosis del limonero. | Enfermedad: tumor bacteriano del kiwi |
| Agente causante: <i>P. savastanoi</i> and <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> | Agente causante: <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> |
| PM 1,893.21 g/mol | PM 2,350.78 g/mol |
| Solucion stock (100x): 17 g/L (for 10 Litros) | Solución Stock (100x): 21 g/L (for 10 Litros) |
| Solución detrabajo (1x): 170 g/L (for 100 Litross) | Solución de trabajo (1x): 210 g/L (for 100 Litros) |
| Manejo (spray sobre la parte aerea de la planta): | Manejo (spray sobre la parte aerea de la planta): |
| - Olivo, 800 L/ha | - Kiwifruit, 1,100 L/ha |
| - Limon, 900 L/ha | |

Los tratamientos fitosanitarios realizados con el conocido como “caldo bordelés o extracto de Burdeos” tienen un límite máximo anual de cobre correspondiente a 6 kg / ha. La concentración utilizada para los péptidos utilizada en el Proyecto AFTER Cu no excede de 170 a 210 g / ha. Por lo tanto, la cantidad de péptido por hectárea que se deriva del proyecto AFTER Cu, y que mostraron eficacia para la protección de las plantas es menor de 3,5% en comparación con el cobre.

Para mejorar las propiedades de adherencia de los tratamientos basados en péptidos experimentados en el proyecto AFTER Cu, STICK VP (Demeter) o cualquier otro producto equivalente pueden ser añadidos a una concentración de 1 kg / 1.000 L. Esta adición es opcional y se recomienda en el caso de los tratamientos que se realicen en períodos de lluvia.

Con el objetivo de mejorar aún más la estabilidad de los péptidos obtenidos en AFTER Cu en la planta a través del tiempo, extractos de tanino vegetal se pueden añadir a la solución de tratamiento, o también extractos polifenólicos de semilla de uva, o de oliva, hasta una concentración máxima de 1 kg / 1000 L. Además, estos extractos naturales también muestran un efecto positivo sobre el sistema de defensa basal de las plantas contra varios estreses bióticos.

2. NÚMERO Y FRECUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS (PÉPTIDOS) OBTENIDOS EN AFTER CU

Las aplicaciones sobre olivo y limón (AP17), y en kiwi (PSA21) deben tener en cuenta algunos parámetros y variables importantes:

- Estación (en particular, la temperatura)
- Precipitaciones (mm)
- Estado de desarrollo fenológico
- La poda
- Estado general de salud
- La agresividad de la enfermedad

La cantidad de los péptidos AFTER Cu en la solución de trabajo debe mantenerse a una concentración de 60 mM, esencial tanto para la protección de las plantas y para dar efectos beneficiosos sobre su crecimiento, tal y como se evaluó en varios ensayos

independientes.

Se recomienda aplicar al menos un tratamiento al final de la temporada de invierno, cuando las temperaturas comienzan a subir y permanecer en torno a 18-20 ° C. Si el tratamiento se realiza mediante la adición de un agente de pegajosidad y un estabilizador, se sugiere otro tratamiento solo durante la primavera, cuando las temperaturas son alrededor de 22 a 23 ° C. En cualquier caso, no se recomienda más de tres tratamientos durante el año. El tercer tratamiento se puede administrar durante la primavera, con 15 días de distancia sobre el primer tratamiento o al comienzo del verano, cuando las temperaturas medias son de alrededor de 25-26 °C.

Las precipitaciones, la poda, la historia pasada de la enfermedad en el campo a tratar y la etapa fenológica son todas las variables que afectan la frecuencia y el número de tratamientos. Para aplicar cuatro o cinco tratamientos, aunque puede parecer excesiva, podría ser una buena estrategia para promover la acción de los péptidos AFTER Cu en el primer año, sobre todo después de una epidemia generalizada en la temporada anterior / año

En resumen:

- Recomendación sobre los tratamientos sugeridos: 2-3 (o, a veces 4-5, si es necesario)
- períodos recomendados: a finales del invierno (18-20 ° C), primavera (22-23 ° C), a principios de verano (25-26 ° C)

LOS EFECTOS POSITIVOS NO FOCALIZADOS CONSEGUIDOS POR LOS TRATAMIENTOS PEPTÍDICOS AFTER CU

El cobre ha demostrado ser tóxico para el agro-ambiente, así como para los cultivos, donde puede causar importantes reducciones de crecimiento vegetativo y otros daños. Este efecto negativo no se produce en el caso de aplicar péptidos AFTER Cu, que son inherentemente natural y biodegradable, y que representan un sustrato de proteína que la planta en sí se puede utilizar como un nutriente.

Los tratamientos con péptidos AP17 y PSA21 indujeron un aumento en el vigor vegetativo general de la planta, y un aumento de la longitud de las raíces (de 60 a 90%) en comparación con las plantas no tratadas