

7. RESULTADOS y DISCUSION

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos hasta la fecha, en cultivos de papa bajo condiciones de invernáculo y a campo.

Para una mayor organización primeramente se presentan los estudios del efecto de los Fosfitos en el cultivo bajo condiciones de invernáculo y luego bajo condiciones de campo.

Todos los estudios realizados permanecen en etapa de validación y análisis para continuar con las experimentaciones.

7.1. Estudios bajo condiciones de invernáculo.

Como se describe en la sección 3., las actividades han sido desagregadas en distintas etapas experimentales. A continuación se presentan los resultados obtenidos hasta el momento en cada etapa.

7.1.2. ETAPA 1. Tratamiento al tubérculo semilla

Con el propósito de conocer el posible efecto de los Fosfitos de Ca y Fosfito de K en etapas tempranas del desarrollo del cultivo, tubérculos semilla fueron tratados como se indica en la sección 5.1.1 y plantados en macetas en el invernáculo. Al momento del 80% de emergencia de los testigos, de cada cultivar, se evaluó:

- 1- La tasa de emergencia para cada tratamiento
- 2- La protección al Tizón tardío, Podredumbre seca y Rhizoctonias por infecciones en suelo.
- 3- La protección al Tizón tardío a los 20 días después de emergencia, mediante la prueba de hoja cortada
- 4- Vigor y verdor de la plántula

7.1.2.1. Efecto de tratamientos con Fosfitos en tubérculos-semilla sobre tasa de emergencia.

Las aplicaciones de Fosfito de Ca o Fosfito de K, a las dosis evaluadas aumentaron el porcentaje de plantas emergidas en ambos cultivares (Fig. 1).

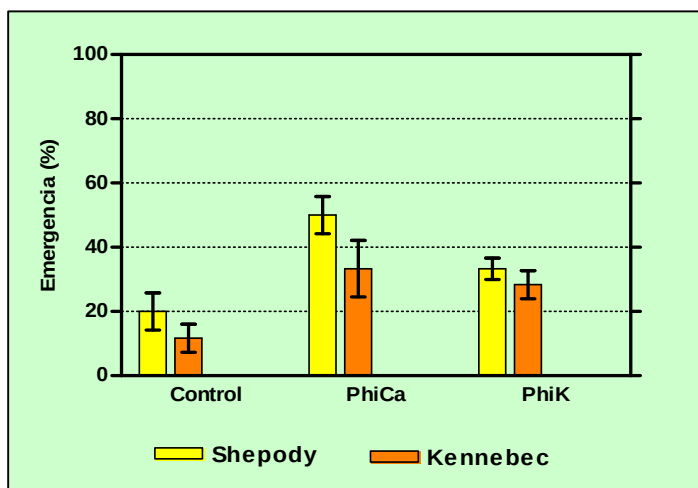


Fig. 1. Efecto del tratamiento de tubérculos semilla con Fosfitos de Ca o Fosfito de K sobre la emergencia.

7.1.2.2. Efecto de tratamientos con Fosfitos en tubérculos-semilla sobre la protección a enfermedades en suelo.

Las aplicaciones de Fosfito de Ca o Fosfito de K, a las dosis evaluadas aumentaron la resistencia a la infección por Tizón tardío y Podredumbre seca o Fusariosis y Rhizoctoniasis (Fig. 2)

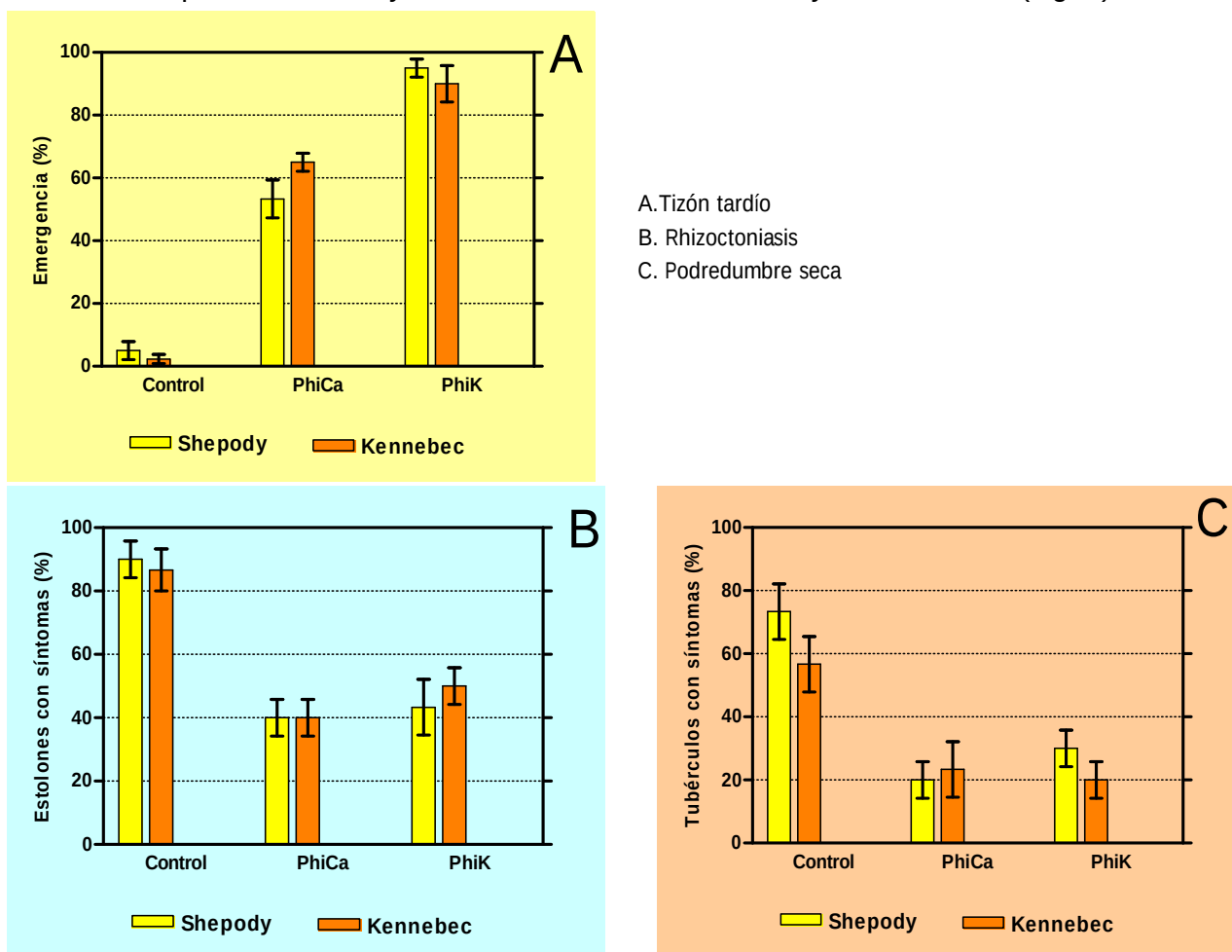


Fig. 2. Efecto de tratamientos con Fosfitos en tubérculos-semilla sobre la protección al Tizón tardío, Podredumbre seca y Rhizoctoniasis

7.1.2.3. Efecto de tratamientos con Fosfitos en tubérculos semilla sobre la protección al Tizón tardío en estadios tempranos del cultivo.

A los 15 días de la emergencia se cortaron hojas de las plantas y se infectaron con *P. infestans* mediante la técnica de laboratorio de hoja cortada.

Los resultados obtenidos indicaron no haber protección en el follaje en esta etapa de desarrollo del cultivo por la aplicación de Fosfitos de Ca o Fosfito de K al tubérculo semilla al momento de la plantación en ambos cultivares.

7.1.2.4. Efecto del tratamiento con Fosfitos en tubérculo-semilla sobre el vigor, verdor y altura de las plantas en etapas tempranas del desarrollo del cultivo.

No se observaron diferencias en el verdor ni en el vigor de las plantas tratadas con Fosfito respecto al control. Sin embargo, se observó una mayor altura en las plantas provenientes de tubérculos-semilla tratados con Fosfitos de K (Fig. 3)

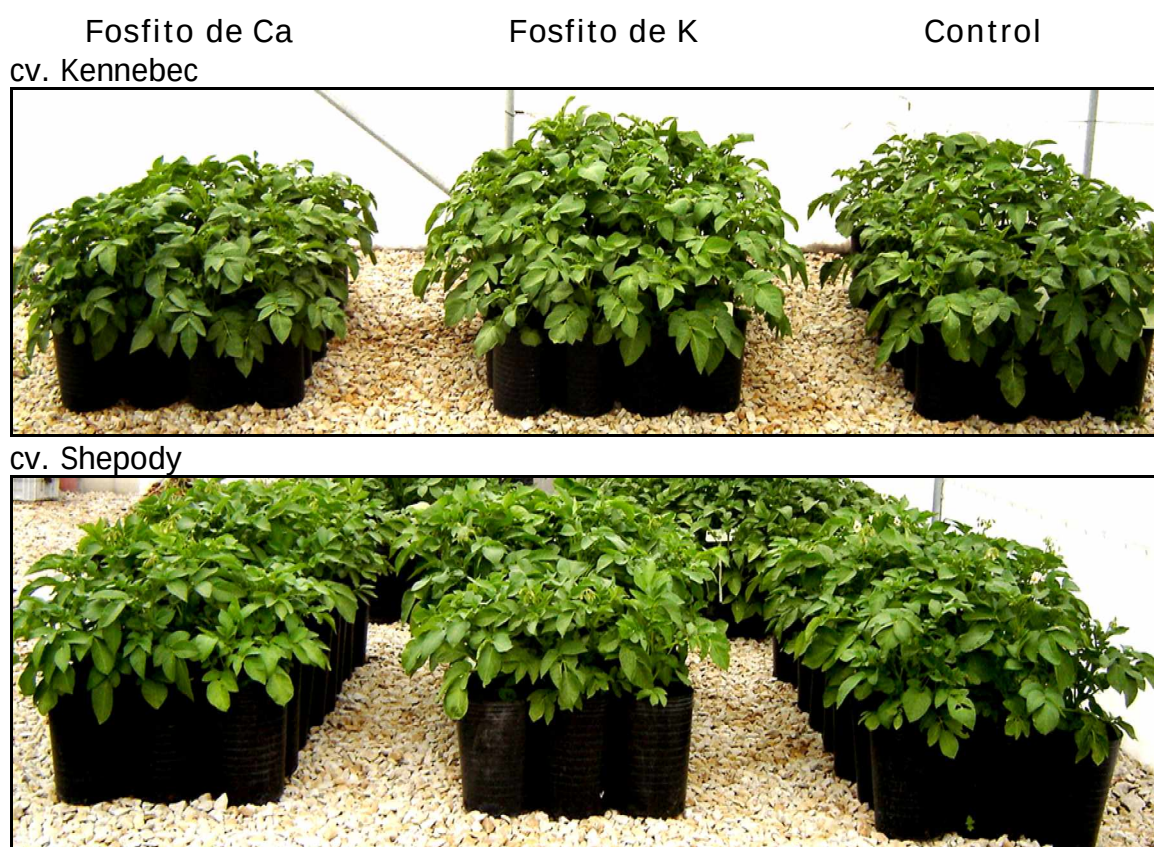


Fig.3. Altura promedio de plantas de 25 días de emergencia provenientes de tubérculos semilla tratados con Fosfitos a la dosis de 3 lts.ha⁻¹.

7.1.2. ETAPA 2. Tratamiento al follaje y evaluaciones

Con el propósito de conocer el posible efecto de los Fosfitos de Ca y Fosfitos de K en follaje sobre:

1-la protección al Tizón tardío

2-la inducción de los mecanismos de defensa

Plantas de 35 días de emergencia (tratamiento temprano) y 66 días de emergencia (tratamiento tardío), fueron tratadas con diferentes dosis de los Fosfitos de Ca o Fosfitos de K (3, 4.5 y 6, lts.ha⁻¹). Luego de cada aplicación se realizaron 4 muestreos del material tratado (a los 5, 14, 21, 33 días). Para ello se extrajeron hojas de las plantas tratadas y de las plantas control y se sometieron a la prueba de hoja desprendida, mediante la cual la hoja es infectada con *P. infestans*. A partir de este material infectado y sus controles sin infectar se realizaron determinaciones fitopatológicas y bioquímicas.

7.1.2.1. Efecto de la aplicación de Fosfito de Ca o Fosfito de K a distintas dosis en estadios temprano y tardío del cultivo sobre la protección al Tizón tardío y tiempo de persistencia.

La Fig 4 muestran que la aplicación temprana es más efectiva en la protección al Tizón tardío en follaje para ambos cultivares, con alta protección y mayor persistencia.

Con respecto al comportamiento de cada Fosfito en los distintos cultivares podemos concluir que,

- Ø en el cv Kennebec resultó ser más efectivo el Fosfito de Ca, con una muy buena protección y persistencia con las tres dosis. Por la aplicación tardía, solo la dosis de 6 y 4.5 lts.ha⁻¹ mostró alta protección a los 5 días de la aplicación, disminuyendo rápidamente.
- Ø en el cv. Shepody se observó una importante diferencia entre ambos Fosfitos, detectándose mayor protección y persistencia con el Fosfito de K a las tres dosis. El Fosfito de Ca no mostró protección significativa a ninguna dosis. Por la aplicación tardía, se observó el mismo efecto pero con muy baja persistencia de la protección.

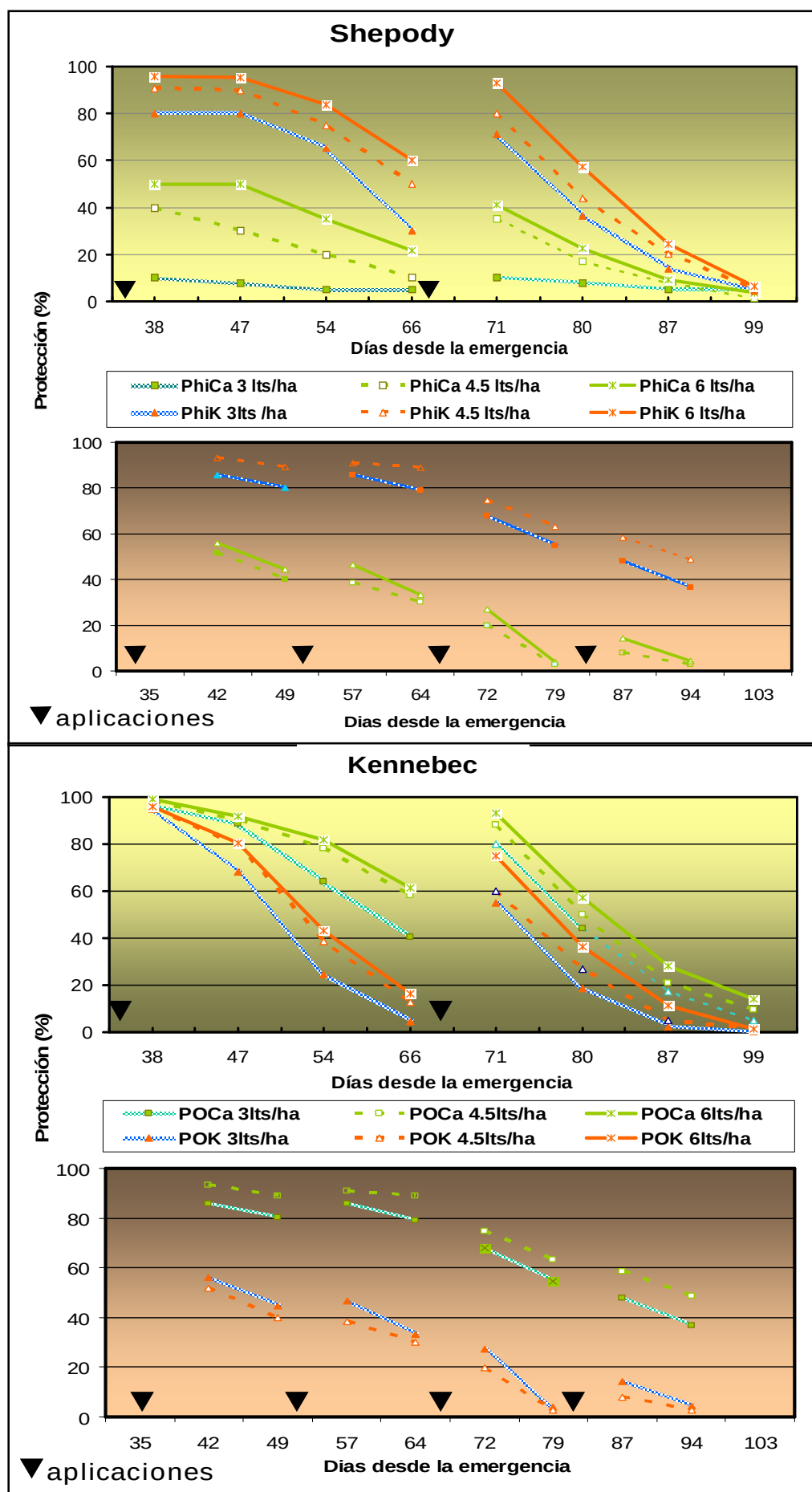


Fig. 4. Efecto de la aplicación de Fosfito de Ca o Fosfito de K a distintas dosis en estadios temprano y tardío del cultivo sobre la protección al Tizón tardío y tiempo de persistencia.

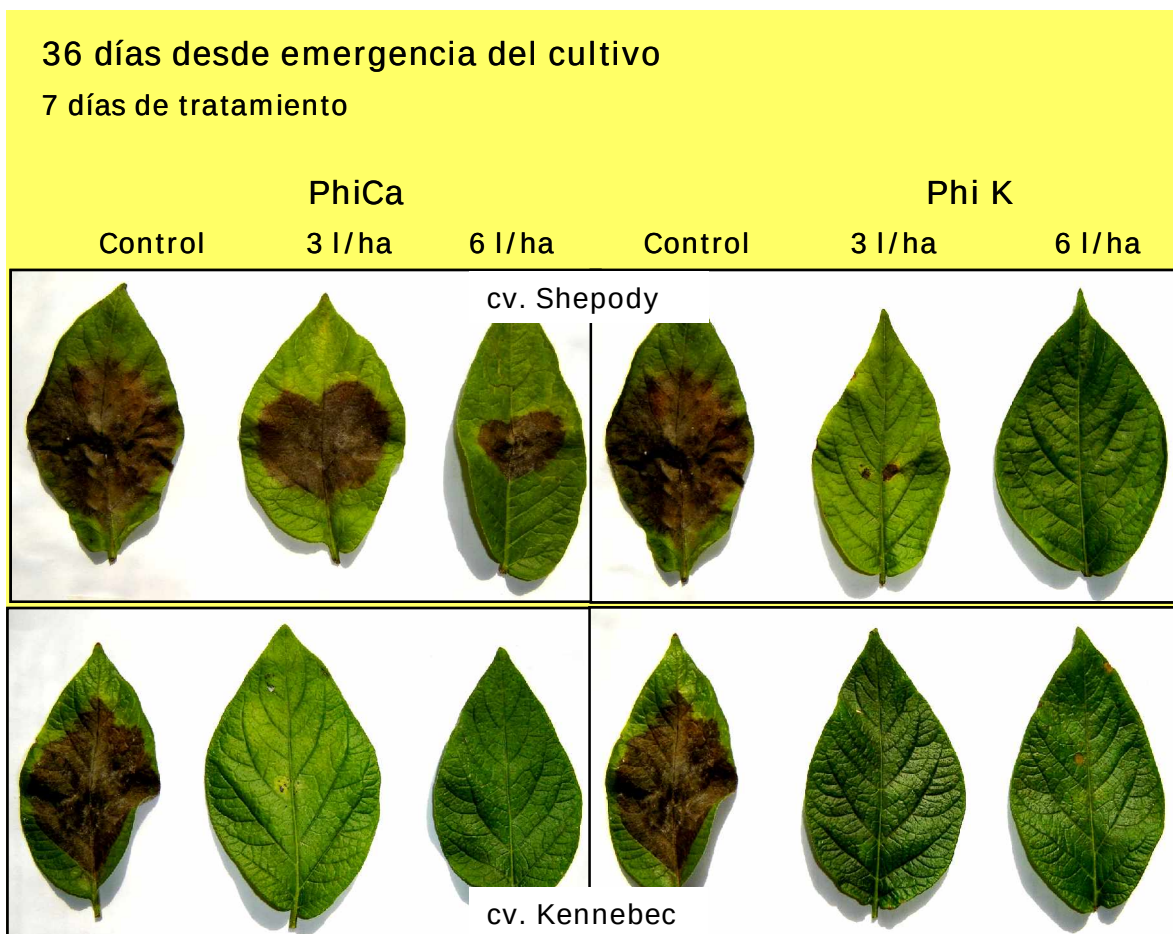


Fig. 5: Protección al Tizón tardío en follaje de plantas de papa por la aplicación de Fosfito de Ca o Fosfito de K a los 35 días desde la emergencia. Luego de 7 días de la aplicación con 3 o 6 lts/ha, se extrajeron hojas de las plantas tratadas y de las plantas control y se sometieron a la prueba de hoja cortada.

En la Fig. 5 se muestran fotos de hojas de ambos cultivares, representativas de los resultados obtenidos de evaluación de protección al Tizón tardío por la aplicación temprana de Fosfito de Ca o Fosfito de K.

7.1.2.2. Efecto de la aplicación del Fosfito de Ca o Fosfito de K sobre la inducción de moléculas relacionadas con la defensa. Análisis cuali y cuantitativo.

Como se mencionó en la introducción, existen numerosas evidencias científicas que relacionan a los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas PR (glucanasas y quitinasas entre otras), reforzadores de pared (lignina, fenoles, calosa,) y compuestos terpenoides antimicrobiales (fitoalexinas) y la resistencia inducida en solanáceas. Las enzimas hidrolíticas (glucanasas y quitinasas) poseen una función dual en la resistencia; pueden poseer un efecto antimicrobial directo sobre el patógeno o pueden acelerar y amplificar la respuesta de resistencia a través de la producción de inductores. La producción de enzimas hidrolíticas no es

suficiente para la protección de la planta frente a una enfermedad. Otros componentes de la resistencia como las fitoalexinas, que poseen actividad antimicrobial, tanto como los fenoles, lignina y calosa, sustancias reforzadoras de la pared celular que actúan como barrera física, son importantes en el desarrollo de la resistencia.

En consecuencia, el conocimiento de las bases moleculares del mecanismo de resistencia inducida producido por los Fosfitos de Ca y Fosfito de K en los cvs. Shepody y Kennebec, través del conocimiento de las moléculas involucradas, su cuantificación, distribución temporal y espacial y el tiempo de persistencia de las mismas en los diferentes órganos de la planta de papa, permitirá contribuir en la extensión práctica de la resistencia inducida para su implementación dentro de estrategias de Manejo Integrado de Pesticidas (MIP)

Para llevar a cabo este estudio, se extrajeron hojas de plantas tratadas con diferentes dosis de Fosfitos a los 5 y 21 días del tratamiento temprano o tardío, y se sometieron a prueba en el laboratorio.

Las muestras fueron subdivididas en diferentes submuestras para su tratamiento y análisis como se detalla en la sección 5.2.1.2.

7.1.2.3. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la actividad total de β 1-3 glucanasas en hojas de papa.

La Fig. 6 muestra la actividad de glucanasas totales en hojas de papa de plantas tratadas tempranamente con la dosis de 3 o 6 lts.ha⁻¹ de cada Fosfito.

En general, se observa una baja actividad en las muestras control de tratamiento correspondiente a hojas procesadas inmediatamente al corte, provenientes de plantas tratadas con Fosfitos y sin tratar. También, un variable aumento en las muestras control sin infección provenientes de plantas tratadas con Fosfitos y si tratar, debido al efecto del “wounding” sobre la inducción de actividad de glucanasas basales en el tejido hasta el procesamiento del mismo (tres días).

En todos los casos se detecta aumento de actividad en hojas control infectadas provenientes de plantas sin tratar con Fosfitos. Este efecto es esperable, debido a que estas moléculas son inducibles por infección. No obstante se manifestaron aumentos significativos en las muestras infectadas provenientes de plantas tratadas con Fosfitos, detectándose una muy buena correlación entre el aumento en la actividad y la protección al Tizón tardío y persistencia (Fig. 4).

Es así que:

Ø en el cv. Kennebec, se detectaron las mayores actividades en las muestras infectadas correspondientes al tratamiento de Fosfito de Ca a los 5 y 21 días de tratamiento con ambas dosis, correspondiéndose con la alta protección y persistencia detectada en los ensayos

fitopatológicos. También se detectó alta actividad a las dosis de 3 kg.ha⁻¹ con Fosfito de K en los primeros 5 días de tratamiento.

Ø en el cv. Shepody se detectó la mayor actividad en las muestras infectadas correspondientes al tratamiento de Fosfito de K a los 5 y 21 días de tratamiento con ambas dosis. Se registraron bajas actividades en las muestras infectadas procedentes de plantas tratadas con Fosfito de Ca. La dosis de 6 lts/ha mostró un incremento sostenido en el tiempo por sobre la de 3 lts.ha⁻¹.

7.2.2.2. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la expresión de β 1-3 glucanasas y quitinasas en hojas de papa.

A partir del extracto crudo enzimáticos de cada submuestra correspondiente a la aplicación temprana de Fosfitos, se determinó la expresión de β 1-3 glucanasas básica y quitinasas inducibles específicamente en fluido intercelular de hojas de papa infectadas con *Phytophthora infestans*.

La Fig. 7 muestra los resultados de expresión de β 1-3 glucanasas básica y quitinasas por inmunoblot. Para una mejor comprensión acerca de la densidad de las bandas proteicas se adjuntan las correspondientes densitometrías, permitiendo un análisis cuantitativo para cada submuestra.

Con respecto a la expresión de β 1-3 glucanasas básica, se puede observar que a los 5 días de tratamiento se detecta una mayor expresión en hojas de plantas tratadas con Fosfitos de Ca y Fosfito de K a la menor dosis (3 lts.ha⁻¹) para ambos cultivares. A los 21 días de tratamiento, la expresión de esta enzima es igual en las submuestras correspondientes a los controles infectados sin tratamiento de Fosfitos y los infectados tratados con Fosfitos, excepto en el cv. Kennebec tratado con Fosfito de Ca.

Con respecto a la expresión de quitinasas en hojas, se puede observar que a los 5 días de tratamiento no se detecta una mayor expresión en plantas tratadas con Fosfitos, excepto en el cv Kennebec tratado con Fosfito de K (3 lts.ha⁻¹). A los 21 días de tratamiento, la expresión de esta enzima es igual en las submuestras correspondientes a los controles infectados sin tratamiento de Fosfitos y los infectados tratados con Fosfitos, excepto en el cv Kennebec tratado con Fosfito de Ca para ambas dosis y con Fosfito de K a la mayor dosis.

Los resultados expuestos hasta el momento, con respecto a la expresión β 1-3 glucanasas básica y quitinasas inducibles, muestran tendencias y están en proceso de análisis. Estas tendencias indicarían muy preliminarmente que,

Ø las β 1-3 glucanasas básica podrían ser una de las moléculas involucradas en el aumento de la protección en ambos cultivares desde los primeros días de la aplicación de Fosfitos en follaje, persistiendo temporalmente hasta los 20 días en etapas tempranas del cultivo.

Ø las quitinasas podrían ser una de las moléculas involucradas en el aumento de la protección en hojas de cv Kennebec a los 21 días de la aplicación de Fosfitos en etapas tempranas del cultivo.

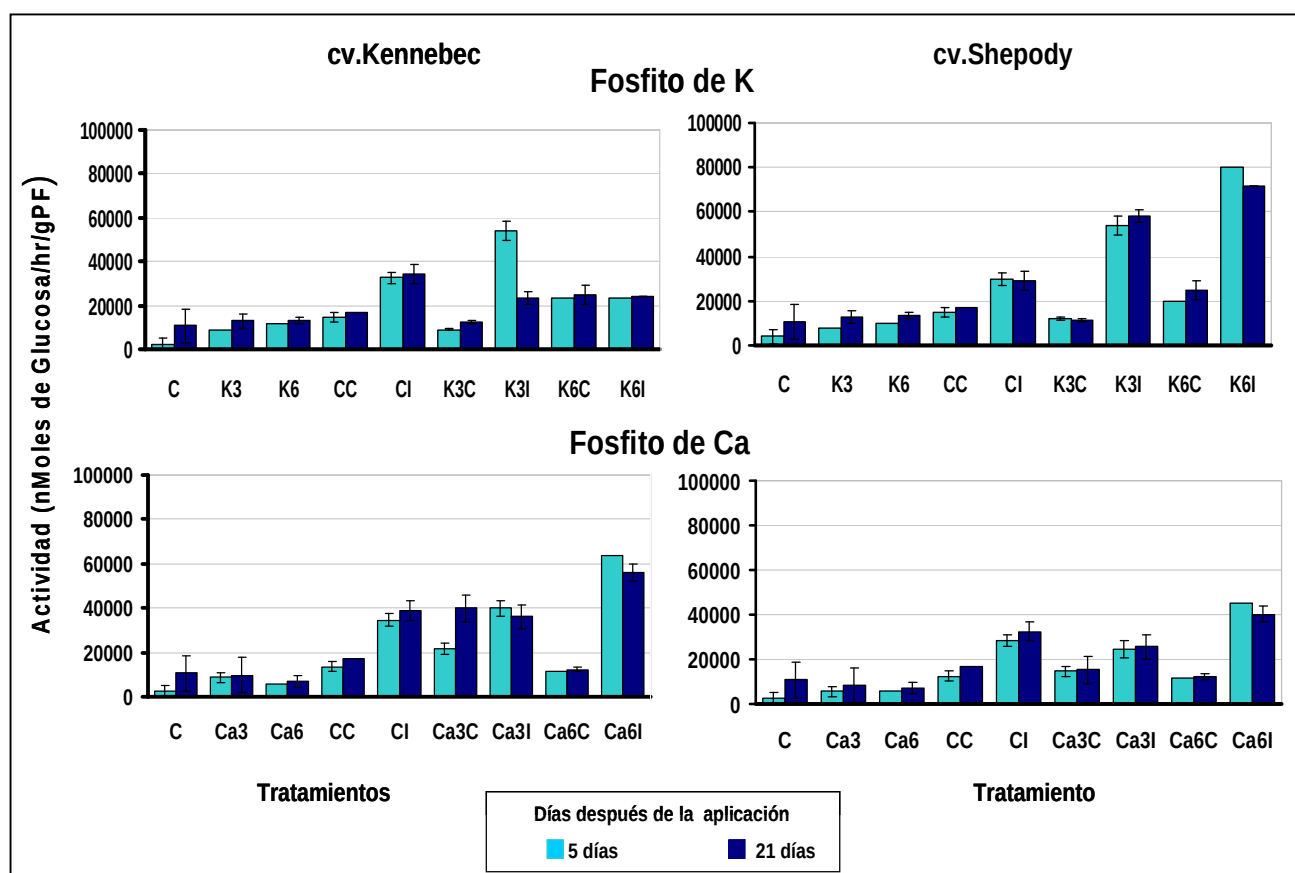
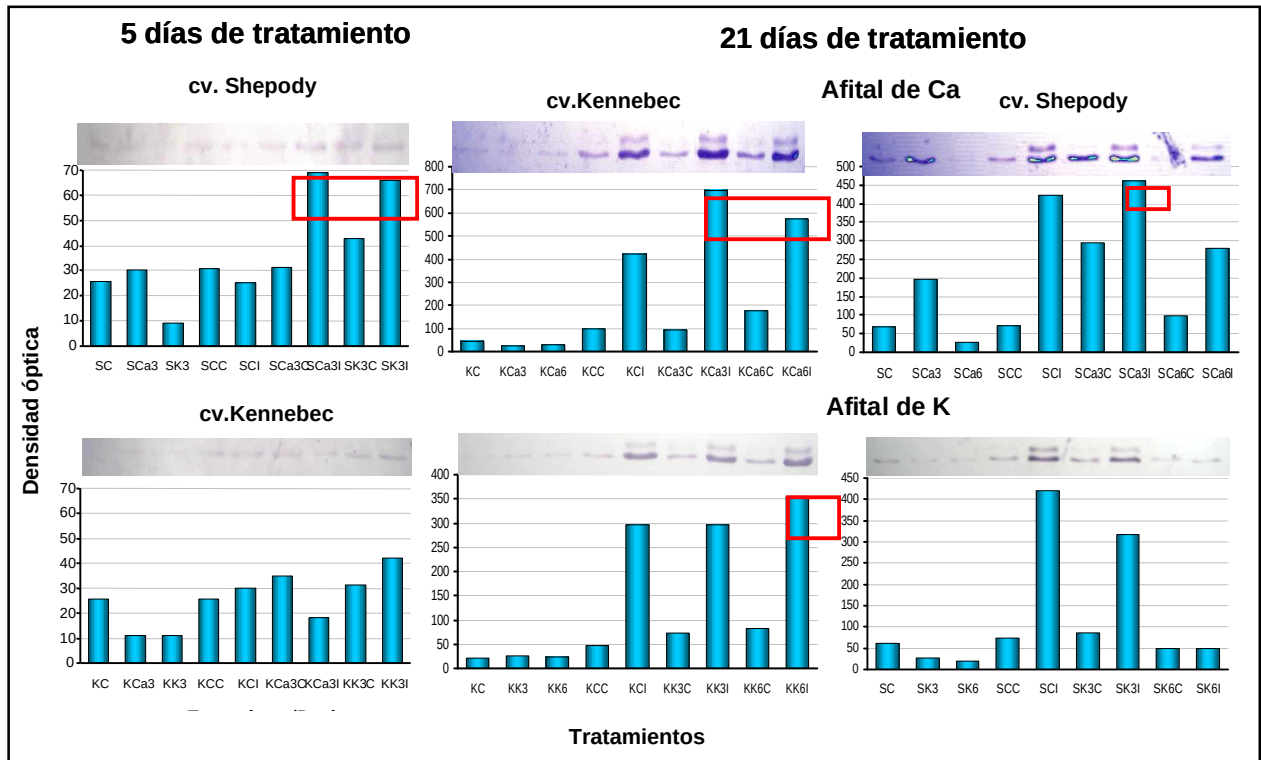


Fig 6. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la actividad total de β 1-3 glucanasas en hojas de papa.

Glucanasa



Quitinasas

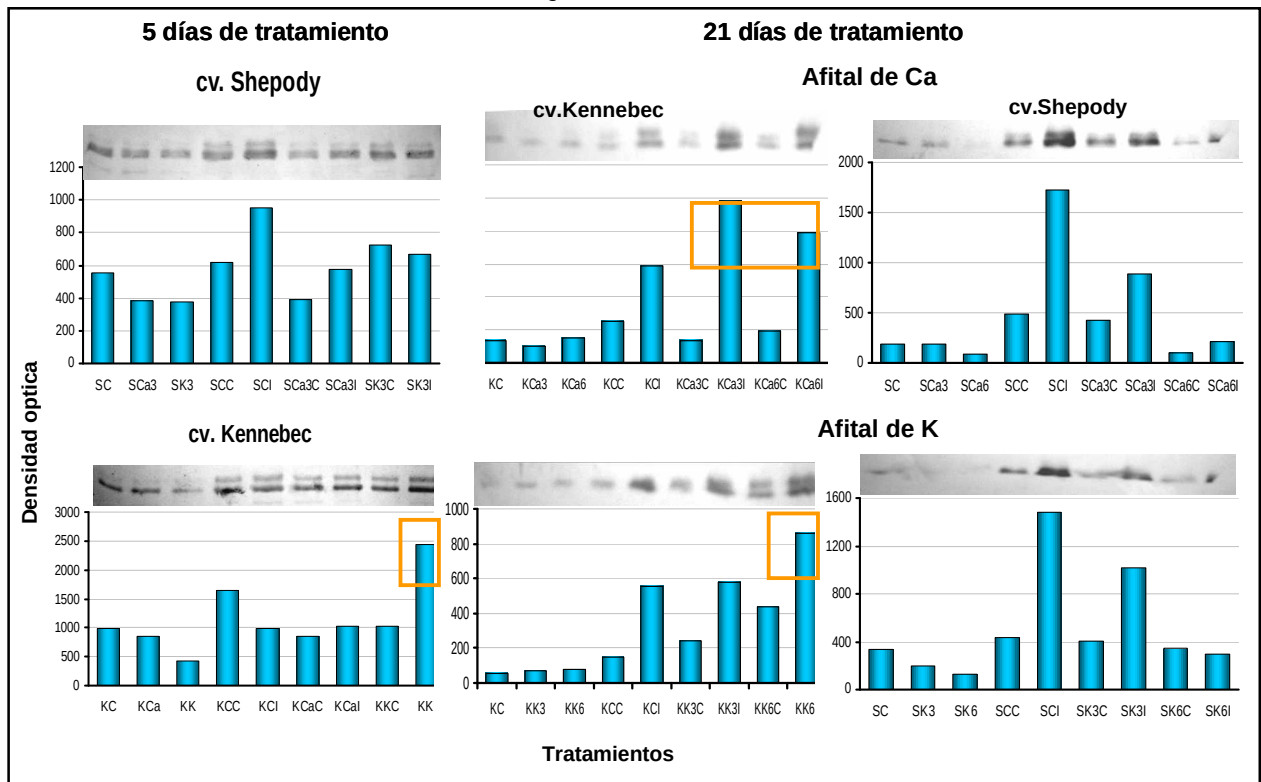


Fig. 7. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la expresión de β 1-3 glucanastas y quitinasas en hojas de papa.

7.1.2.3. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre el patrón de proteínas de pared de extractos de hojas.

A los 21 días del tratamiento foliar con Fosfito de K o Fosfito de Ca se extrajeron hojas para determinar posibles diferencias en el patrón de proteínas de pared celular. El revelado se realizó por tinción con Plata. En la Fig 8 se observa una diferencia importante en el contenido de una proteína de un peso molecular aproximado de 20-22 kDa en plantas tratadas con Fosfito de Potasio para ambos cultivares y con Fosfito de Calcio para el cv Kennebec.

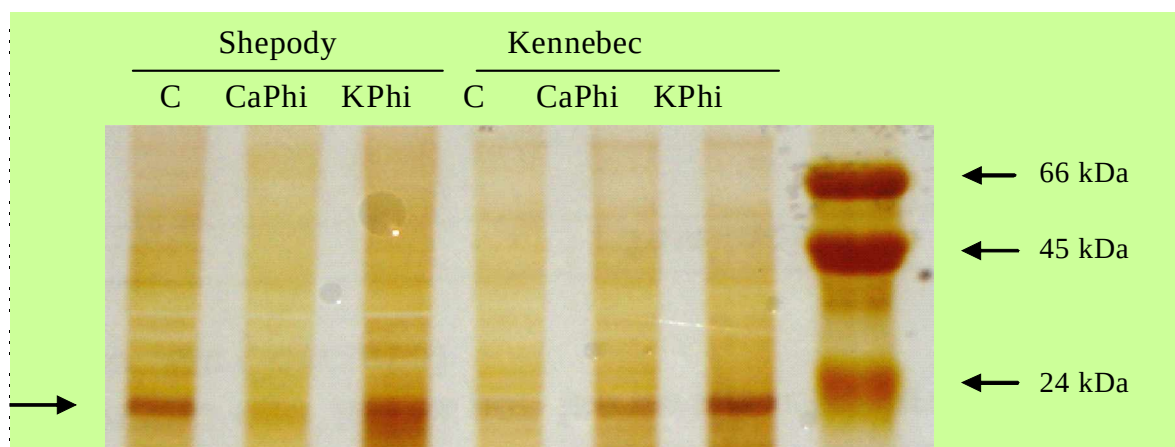


Fig 8. Efecto de la aplicación de Fosfitos sobre las proteínas de pared celular de hojas de papa tratadas con Fosfitos.

7.1.2.4. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre el verdor de las hojas.

Se evaluó el contenido de proteínas totales en una electroforesis en gel de acrilamida 15% SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Se sembró 5 mg de peso fresco de tejido y se reveló por tinción con Plata o con Coomassie Blue. En la Fig. 9 se observa mayor contenido de la proteína RUBISCO en hojas provenientes de plantas tratadas con Fosfitos de Calcio o Potasio respecto de las provenientes de plantas control, en ambos cultivares. La enzima RUBISCO es la proteína mayoritaria relacionada con el verdor en las hojas de plantas. Lo que correlaciona con el mayor verdor detectado en las plantas tratadas con Fosfito en invernáculo.

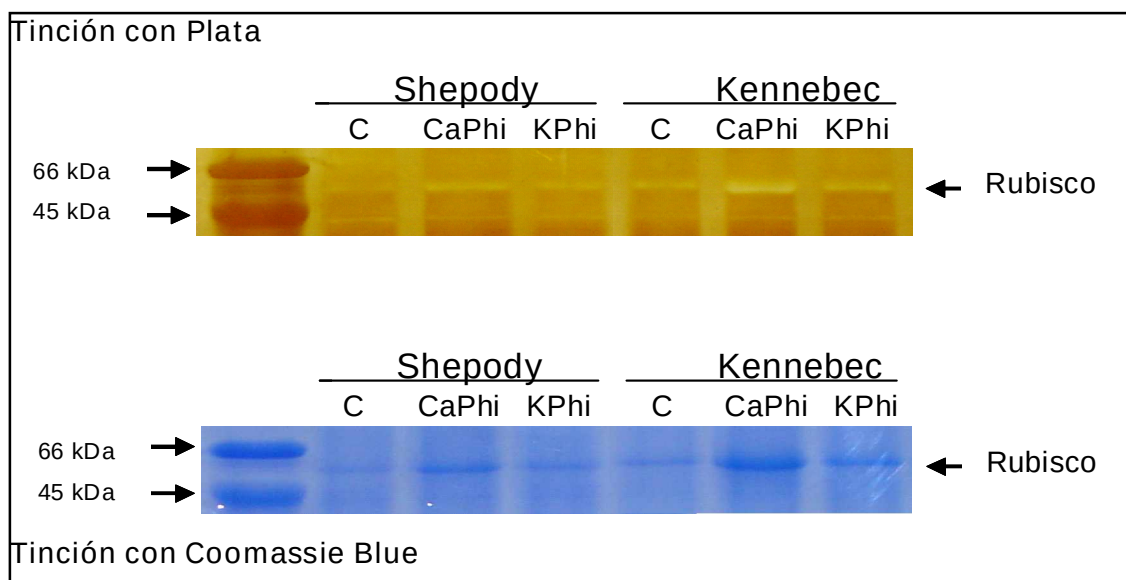


Fig 9. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito sobre la enzima Rubisco

7.1.2.5. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la presencia de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2

Frente al ataque de un patógeno, la planta puede inducir muchos mecanismos de defensa, uno de los que más tempranamente se induce es el sistema oxidativo. La explosión oxidativa (oxidative burst) se trata de una inducción de moléculas reactivas (especies reactivas de oxígeno o ROS) como H_2O_2 , O_2^- , etc. en el sitio de inicio de la infección de manera de bloquear el avance del patógeno. Si esta producción de ROS se extiende demasiado en el tiempo, esto puede ser nocivo para la planta misma y llevar a la necrosis del tejido. Para esto es que se activan las enzimas antioxidantes como por ejemplo las catalasas, de manera de controlar y posteriormente eliminar el exceso de ROS.

En la Fig 10 se puede observar puntos marrones o zonas de producción de H_2O_2 en las hojas provenientes de las plantas tratadas con Fosfito de Ca o Fosfito de K, a los tiempos de infección testeados (3 y 7 hs). No se observan puntos marrones en las hojas controles.

El incremento temprano en el contenido local de H_2O_2 podría llevar a un bloqueo más eficiente del ingreso del patógeno lo que indicaría un efecto importante de los Fosfitos en la resistencia temprana a *P. infestans*

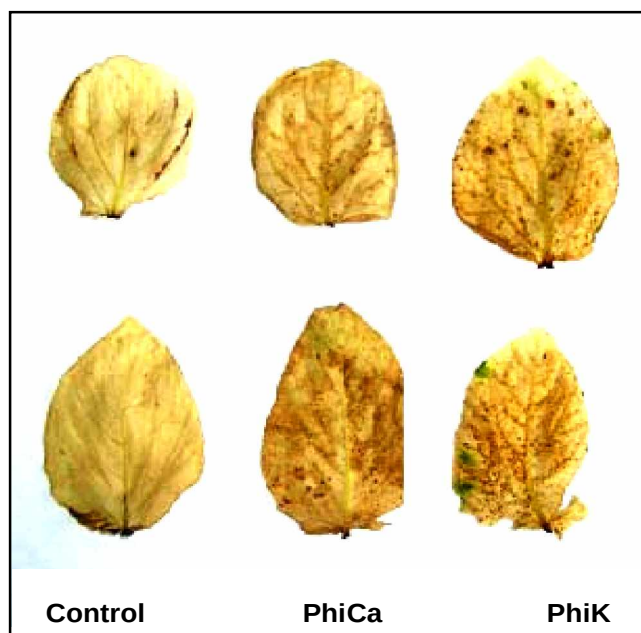


Fig 10. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la presencia H_2O_2 . Los puntos o manchas amarronadas indican presencia de H_2O_2 .

7.1.2.6. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre el retardo de la senescencia.

Se detectó un retardo de la senescencia en plantas tratadas con Fosfitos en cultivos bajo condiciones de invernáculo. La Fig. 11 es una foto representativa de dicho evento.

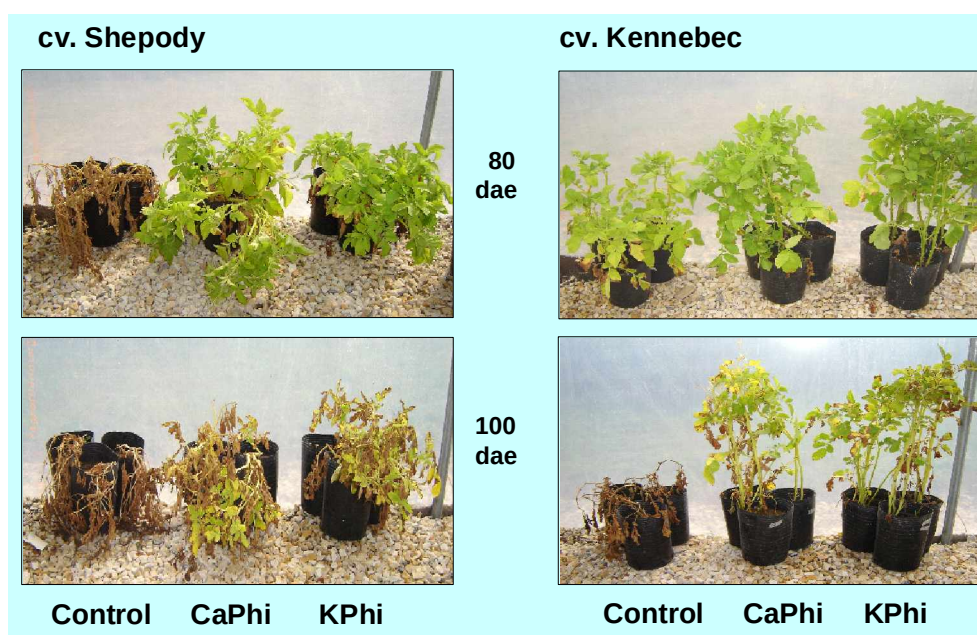


Fig 11. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de K o Fosfito de Ca sobre el retardo de la senescencia del cultivo

7.1.3. ETAPA 3: Evaluaciones en tubérculos postcosecha

7.1.3.1. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la maduración y brotación de los tubérculos.

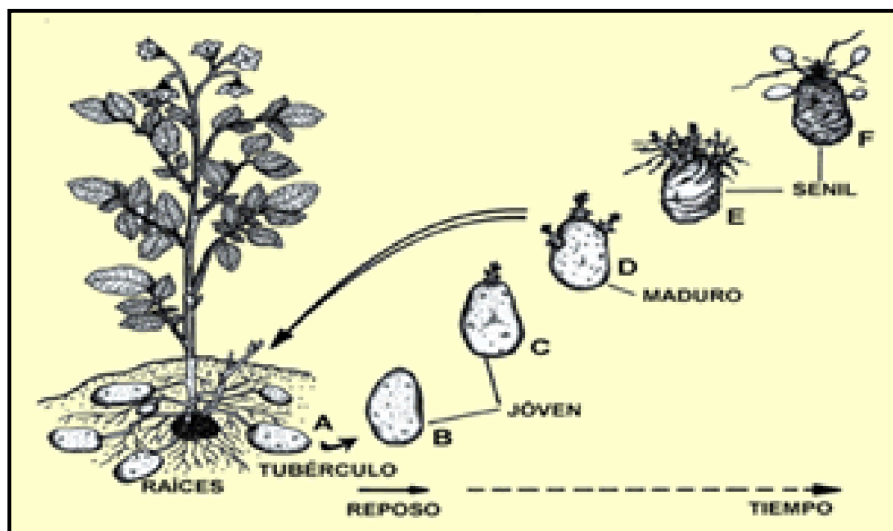


Fig 12. Etapas fenológicas en la maduración y brotación de los tubérculos

En la Fig 13 se pueden observar tubérculos poscosecha provenientes de plantas tratadas con 4 aplicaciones Fosfitos foliares a la dosis de 3lts.ha⁻¹ y control sin tratar. Los tubérculos de plantas tratadas muestran mayor tamaño de brotes apicales y mayor número de raíces, a igual tiempo de cultivo y cosecha con respecto al control. Esto nos indica una importante disminución en el tiempo de maduración de los mismos.

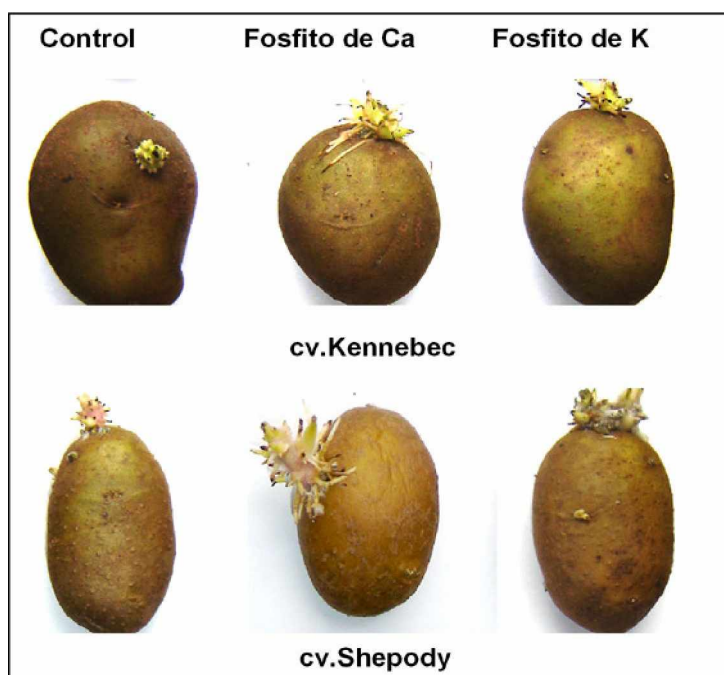


Fig. 13. Efecto de la aplicación de Fosfitos foliares sobre la maduración y brotación de los tubérculos.

7.1.3.2. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre a la protección a Podredumbre seca en tubérculos.

En la Fig. 14 se pueden observar cortes de tubérculos provenientes de plantas tratadas con 4 aplicaciones Fosfitos foliares a la dosis de 3 lts.ha⁻¹ y control sin tratar, e infectados artificialmente con *Fusarium solani* f ssp *eumartii*, agente causal de la podredumbre seca de los tubérculos, según se detalla en la sección 5.3.2. Los resultados indican una disminución en la severidad de la enfermedad por el tratamiento con Fosfitos, siendo más significativa en el cv Kennebec.

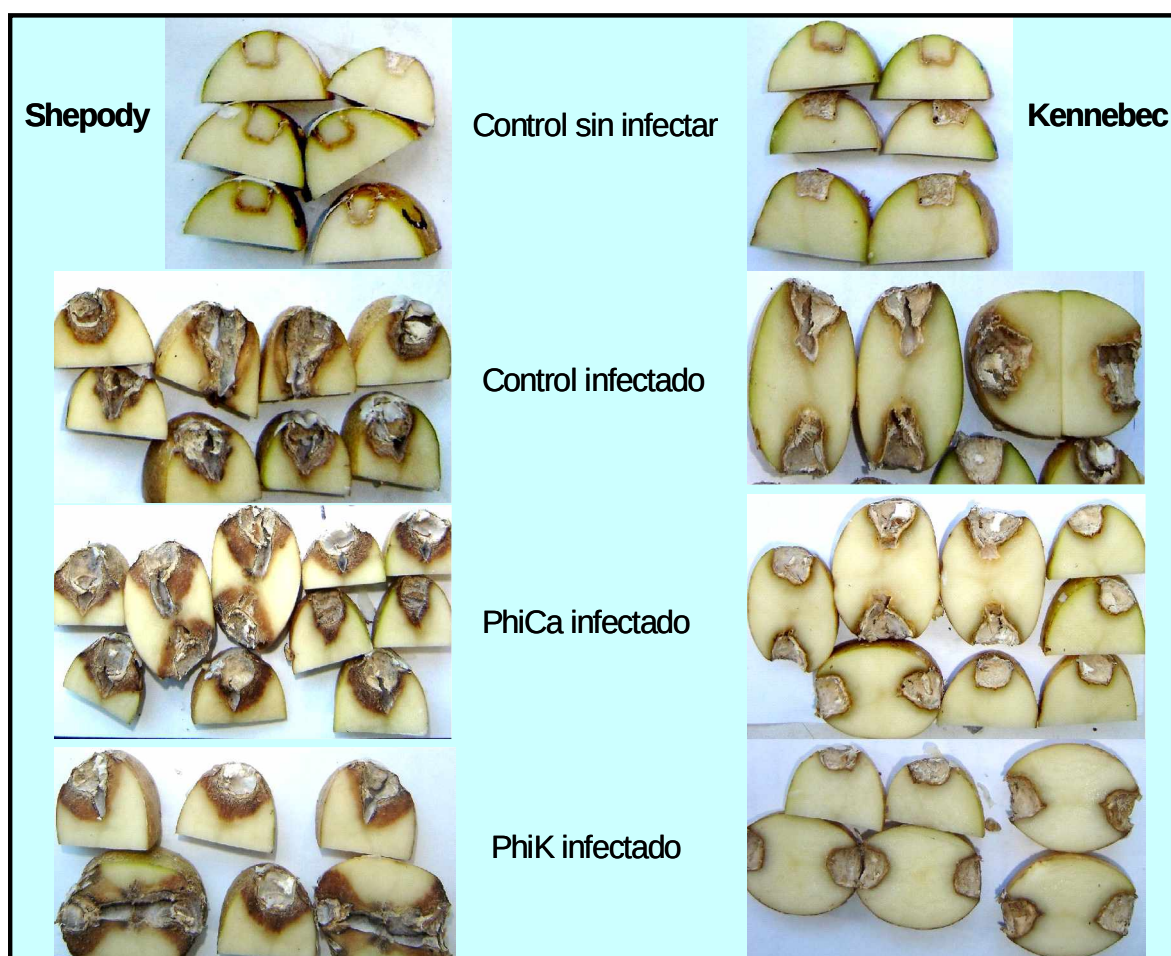


Fig. 14. Efecto de la aplicación de Fosfitos foliares a la protección a Podredumbre seca de los tubérculos.

7.1.3.3. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre la acumulación de serin proteasa fúngica en tubérculos infectados con *Fusarium solana* f sp *eumartii*.

La acumulación de esta serin proteasa fúngica en los tubérculos susceptibles a *F. eumartii* 3122 está relacionada con la magnitud de la lesión causada por el hongo durante la infección. En

consecuencia en los tubérculos infectados con este mismo aislamiento, procedentes de plantas tratadas y sin tratar, se determinó la actividad serin proteasa fúngica (FESP), a los fines de cuantificar indirectamente el aumento de la resistencia a *F. eumartii* 3122 por el tratamiento foliar con Fosfito de Ca o Fosfito de K.

En la Fig 15 se puede observar una reducción del 50 % en actividad de FESP en tubérculos infectados provenientes de plantas tratadas con Fosfito de K con respecto a los tubérculos infectados provenientes de plantas control (sin tratar), en los cvs. Shepody y Kennebec, y con Fosfito de Ca para el cv. Kennebec únicamente.

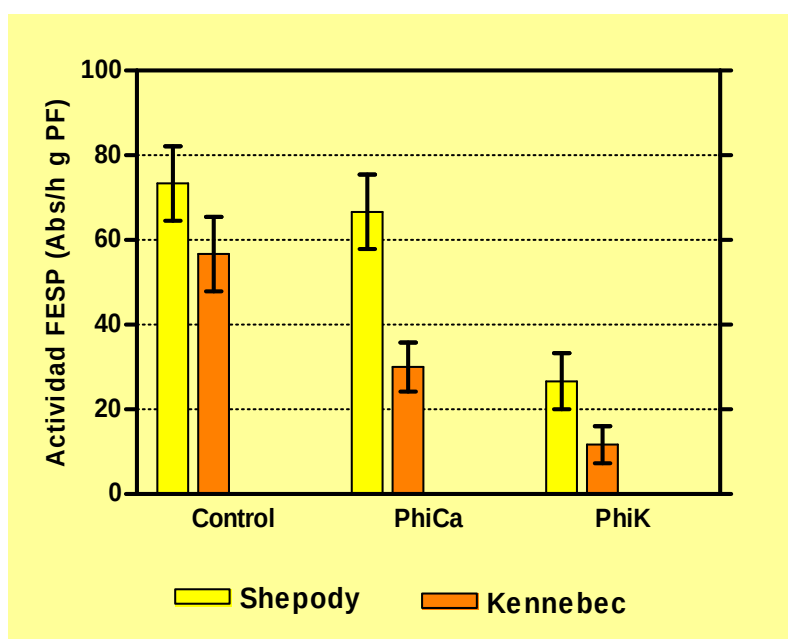


Fig. 15. Efecto de la aplicación de Fosfitos foliares sobre la actividad de serin proteasa fúngica FESP en tubérculos infectados con *Fusarium eumartii*.

7.1.3.4. Efecto de la aplicación foliar de Fosfito de Ca y Fosfito de K sobre a la protección a Tizón tardío en tubérculos.

En la Fig. 16 A se puede observar rodajas de tubérculos provenientes de plantas tratadas con 4 aplicaciones Fosfitos foliares a la dosis de 3lts.ha⁻¹ y control sin tratar, e infectados artificialmente con *Phytophthora infestans*, agente causal del Tizón tardío, según se detalla en la sección 5.3.2. Los resultados indican una disminución en la severidad de la enfermedad por el tratamiento con Fosfitos. En la Fig 16 B se grafican los resultados del diámetro de la colonia de *P. infestans* sobre las rodajas de papa infectadas de los cvs Shepody y Kennebec, mostrando una disminución significativa del diámetro de la colonia por el tratamiento con Fosfito de K y Fosfito de Ca en ambos cultivares.

En la Fig.. 16 C se muestran los valores de acumulación de fitoalexinas antimicrobianas responsables de parte de la defensa a patógenos en plantas. Los resultados indican un 100% de acumulación mayor en tubérculos de ambos cultivares tratados con Fosfito de K y un 25 % por Fosfito de Ca.

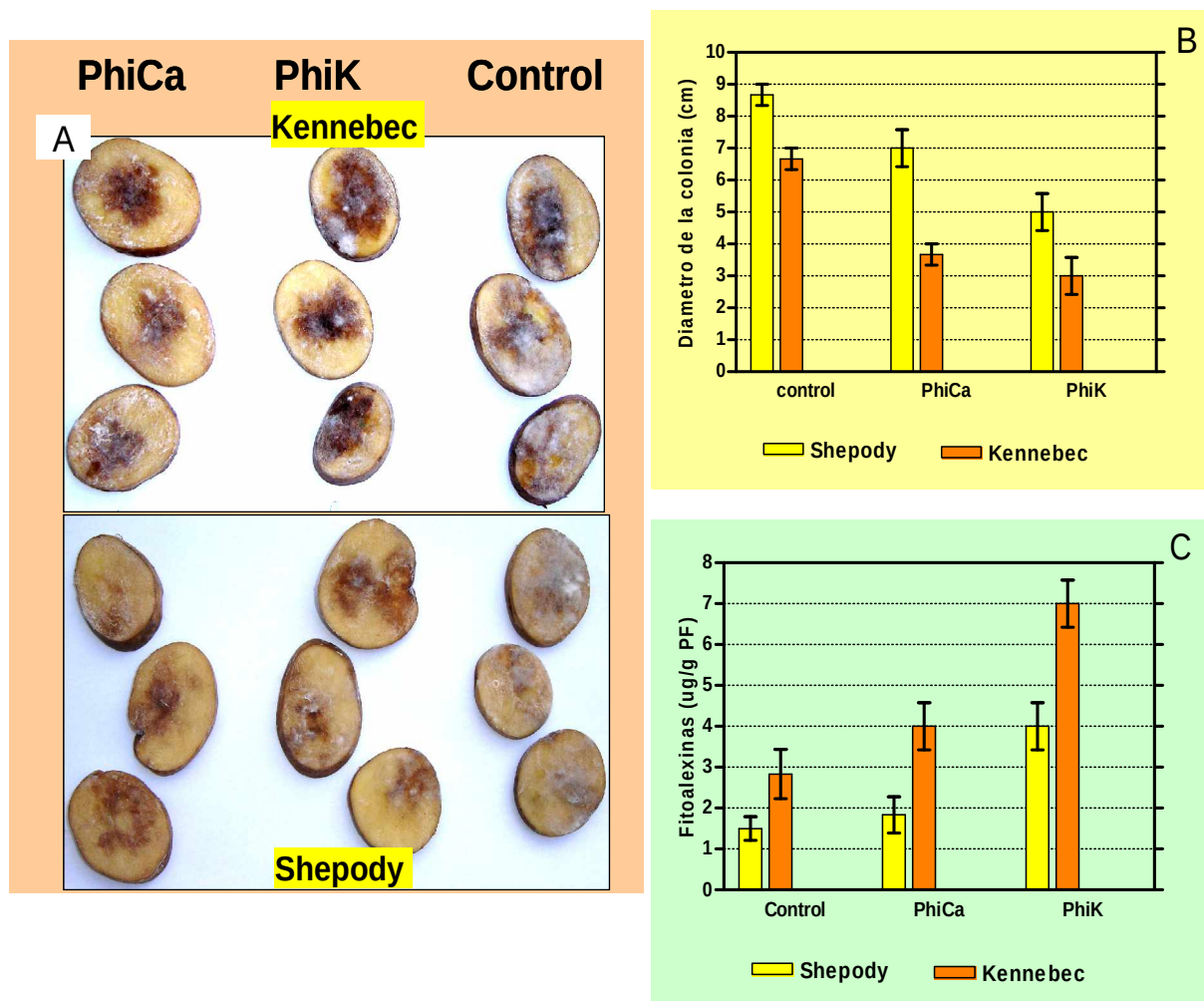


Fig 16: efecto de cuatro aplicaciones foliares de Fosfito de Ca o Fosfito de K sobre la protección al Tizón tardío y acumulación de fitoalexinas en tubérculos postcosecha.