

1. INTRODUCCION

1.1. IDENTIFICACION DEL PROBLEMA, CONTEXTUALIZACION A NIVEL LOCAL Y ABORDAJE.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cultivo hortícola más importante de la Argentina, donde anualmente se producen 80.000 hectáreas (SAGPyA 2007) distribuidas principalmente en las provincias de Córdoba y Buenos Aires, y en menor escala en las provincias de Tucumán, Mendoza, San Luis y Río Negro. La producción supera las $2,6 \times 10^6$ de toneladas, con un rendimiento promedio a nivel nacional de $29,5 \text{ t ha}^{-1}$. Este rendimiento es el más alto en toda Sudamérica, superando ampliamente el rendimiento que se obtiene en otros países donde el área cultivada es mucho mayor, como Brasil, Colombia y Perú.

En nuestro país, las zonas productoras fueron cambiando su importancia a lo largo de los años. A comienzos del Siglo XX se cultivó en el sur de Santa Fe. Posteriormente debido a sus mejores condiciones agroclimáticas, el Sudeste de Buenos Aires pasó a ser la principal zona productora. Luego de la crisis de precios de la campaña 88/89, la superficie de Buenos Aires cayó rápidamente mientras aumentaba la de Córdoba. Sin embargo, gracias a sus mejores rendimientos, Buenos Aires sigue conservando su importancia en el total de producción (SAGPyA 2007)

En la provincia de Buenos Aires se cultivan 27.000 ha con destino al mercado fresco y la industria, en los partidos de Balcarce, Gral. Alvarado, Gral. Pueyrredón, Lobería y Tandil, alcanzando los mayores rendimientos promedio a nivel nacional, $40,2 \text{ t ha}^{-1}$ (SAGPyA 2007). Estos logros son el resultado de importantes mejoras tecnológicas basadas en la introducción de nuevas variedades, el manejo de la calidad de los tubérculos-semilla, el riego, la fertilización y el control de plagas y enfermedades (Echeverría 2005; Caldiz 2007)

El control integrado de las enfermedades resulta crucial en el cultivo de papa, donde se llevan a cabo numerosas aplicaciones de agroquímicos, particularmente funguicidas, con el objeto de controlar la enfermedad Tizón tardío causado por el oomicete *Phytophthora infestans* Mont. De Bary. Esta enfermedad es la más importante a nivel global para el cultivo de papa (Abad & Abad 1995). En la actualidad la presencia del *P. infestans* en los cultivos puede ocasionar pérdidas promedios de rendimiento de hasta un 34%, tal como ha sido estimado para la región sudeste de la provincia de Buenos Aires para los últimos 10 años (Mantecón 2006). Asimismo los tubérculos infectados disminuyen su valor comercial e industrial, se ve reducida su almacenabilidad y también su valor como simiente en caso que se destinen a nueva plantación (Andreu et al. 2004). Dada la importancia de la enfermedad y sus características explosivas

bajo condiciones agro-ecológicas favorables para el desarrollo, deben aplicarse funguicidas preventivos, de contacto y sistémicos, con frecuencias que varían entre 3-10 días dependiendo de la susceptibilidad del cultivar. En la provincia de Buenos Aires, en los últimos 5 años se ha incrementado el número de aplicaciones, las dosis y además, muy recientemente se ha quebrado la resistencia a campo de dos cultivares muy resistentes, Innovator y Markies (Andreu & Caldiz 2006a). Entre las razones que han determinado este quiebre de resistencia se pueden mencionar el aumento del área cultivada con estas variedades; el aumento en la frecuencia de aparición de nuevas razas; y la alta agresividad de los aislamientos reinantes, debido a su capacidad adaptativa y de escape a la presión ejercida por los funguicidas (Huarte et al. 2002). Esta situación no sólo provoca aumentos en los costos de producción y de contaminación ambiental, sino que también determina la posibilidad de generar nuevas y más agresivas razas de *P. infestans*. Por lo tanto, las herramientas de control deben enmarcarse dentro de un control integrado y sustentable del cultivo, utilizando diferentes tácticas como: el uso de tubérculos-semilla sanos, la rotación de cultivos, la protección de los tubérculos-semilla en etapas tempranas del cultivo y el uso de funguicidas y dosis específicas (Andreu & Caldiz 2006b; Caldiz et al. 2007). Esto es particularmente importante en el caso de la Argentina, donde las variedades más cultivadas, como Kennebec, Spunta y Shepody son medianamente susceptibles o muy susceptibles a las razas de *P. infestans* presentes en el país (Andreu & Caldiz 2004). En este marco resulta fundamental el desarrollo de innovadoras tácticas de control que contribuyan a mantener la sustentabilidad del sistema agro-ecológico, particularmente en la pampa húmeda donde la aparición de la enfermedad es muy frecuente (Mantecón 2006)

Entre estas tácticas se puede citar la resistencia inducida (RI), tanto por la presencia de algún patógeno como por ciertos compuestos químicos de baja toxicidad. La RI consiste en la activación de la expresión de determinados genes, genes PR (pathogen related), tanto en la zona infectada o tratada, como en el resto de la planta (inducción sistémica de la resistencia adquirida o SAR, Buchanan et al. 2000). Esto determina que las infecciones por un amplio espectro de patógenos produzcan leves o nulos síntomas de la enfermedad. Tanto la resistencia inducida por patógenos, como por compuestos químicos, son en este contexto, defensas inespecíficas (Gozzo 2004). La RI representa una interesante oportunidad para formar parte del conjunto de estrategias en el manejo del Tizón tardío de la papa. Su interés radica en que, su adopción, permite principalmente una reducción en el uso de funguicidas (Mc Donald et al. 2001; Vallad & Goodman 2004). En primer lugar, porque la resistencia a la enfermedad es un fenómeno de resistencia natural, referido como un tipo de "inmunización" (Kuc 1987). Por otro parte, porque los modelos biológicos de resistencia inducida han demostrado, en otros cultivos, que este tipo de resistencia puede producir una respuesta perdurable en el tiempo y en un amplio espectro de sistemas planta-patógeno (Jeun et al. 2000).

En teoría, estos mecanismos implicarían la producción preventiva de compuestos de defensa que podrían resultar excesivos, en términos energéticos para la planta, a las necesidades para un control de enfermedades. Esto puede ocasionar una reducción en el rendimiento del cultivo. Es por ello que varios autores discuten la relación costo-beneficio que tendrían las plantas con la resistencia inducida (Heil 1999; Vallad & Goodman 2004, Van Hulten et al. 2006), ya que existen evidencias que muestran, para algunos cultivos, que el aumento de la resistencia a patógenos fue acompañado de una disminución en el crecimiento vegetativo y/o producción reproductiva (Cole 1999; Abbassi et al. 2002; Perez et al. 2003; Conrath et al., 2003; Schroetter et al. 2006). No obstante, los resultados de la resistencia inducida y su relación costo-beneficio son muy variables y dependen del sistema en estudio, las condiciones ambientales, fertilización, etc (Cipollini et al. 2003). Recientemente, en Argentina, Andreu et al. (2006) demostraron que el ácido DL-3-aminobutírico (BABA) y el Fosetil-AI (Aliette 80 WG, Bayer Crop Science) generan RI en el follaje y en los tubérculos de papa. Las aplicaciones de estos compuestos aumentaron significativamente los niveles de fitoalexinas, fenoles, aspartil proteasas y β -1-3 glucanasas en los tubérculos provenientes de plantas tratadas, con el consecuente aumento de la resistencia a la infección con *P. infestans*. Estudios sobre el efecto del BABA en el crecimiento y rendimiento del cultivo, mostraron no afectar negativamente estos parámetros, sino por el contrario, se obtuvo mayor número de tubérculos por planta y de mayor tamaño (Olivieri et al. 2007). Las limitantes en el uso de estos compuestos son: (a) el BABA no se encuentra registrado para su aplicación comercial, y (b) el Fosetil-AI, si bien provee una excelente protección al follaje y a los tubérculos por su traslado basípeta, es un fungicida con la capacidad de impactar negativamente en el medio ambiente.

Sin embargo, existen una serie de compuestos Fosfitos biocompatibles, derivados del ácido fosforoso combinados con distintos elementos como Ca, K, Mn, Mg o Zn. Estos compuestos en la planta se transforman en ácido fosfónico y poseen movilidad acrópeta y basípeta, preponderantemente hacia el órgano destino (Guest & Grant 1991). Son benignos para el ambiente y salud humana (categoría III) de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.

Los Fosfitos fueron creados en la década del 30 como nutrientes alternativos hasta que se detectó que no eran tan efectivos como los fertilizantes de suelo (Mengdehl 1933). Posteriormente se descubrió que poseían una alta movilidad simplástica (traslocación por ambas vías, xilema y floema) y actividad contra *Plasmopsis vitícola* (Bugaret et al. 1980) y oomycetes (Bruin & Edgington 1983). Guest & Grant (1991) postulan que los Fosfitos tiene un complejo modo de acción. Por un lado, disminuyendo el crecimiento del patógeno e inhiben la esporulación, producido por una acción fungistática directa. Esto estaría influenciado por la concentración del Fosfito en la planta huésped y la efectividad de cualquier sistema de oxidación del Fosfito en la planta. La alteraciones metabólicas del patógeno conducirían a la inhibición de supresores (origen fúngico) de la respuesta de defensa en la plantas, liberando

inductores expuestos a receptores en la célula huésped. Por otro lado, también actuarían directamente sobre la planta huésped activando los mecanismos de defensa relacionados con barreras mecánicas y químicas.

La efectividad de estos compuestos en la planta está relacionada con: (1) el tiempo de aplicación que debe coincidir con un particular estadio de crecimiento de la planta. Es más favorable aplicarlos cuando la raíz, tubérculo, fruto son destino, (2) la edad de la planta, plantas más jóvenes tienen mayor traslocación y (3) condiciones climáticas, altas temperatura y baja humedad, se evapora, y no entra a la planta. Por baja temperatura, se reduce la actividad fisiológica de la planta, y no se trasloca. Existe un efecto estacional sobre la relativa concentración de Fosfitos en follaje y tubérculos. En consecuencia, las condiciones agroecológicas afectan la captación, actividad metabólica interna, traslocación, acumulación y concentraciones en los tejidos (Mc Donald et al. 2001)

En base a los antecedentes mencionados, se propuso el estudio del efecto de los Fosfitos (AFITAL) en la resistencia inducida en papa, a través de un estudio integrado de parámetros anatómo-histológicos y bioquímico-moleculares, que brindaran información sobre los mecanismos biológicos de la resistencia inducida al Tizón tardío por Fosfitos. Como así también, a través del estudio de parámetros fitopatológicos y fisiológicos, relacionados con el crecimiento y rendimiento del cultivo, que permitan conocer la real protección al Tizón tardío y posibles ventajas agronómicas sobre el cultivo, las cuales son de vital importancia para la adopción de estrategias que interesen al productor y resulten económicamente viables. En conclusión, el estudio integral de la resistencia al Tizón tardío, inducida por AFITAL-Agro-EMCODI), proporcionará evidencias para programas de implementación de estos compuestos en prácticas de Manejo Integrado del Cultivo (MIC), con menores costos económicos, ambientales y humanos. Por otro lado, proporcionará conocimientos generales sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la resistencia inducida en papa por Fosfitos.

1.2. RELEVANCIA DEL PROBLEMA

En la actualidad el productor agropecuario ha incrementado el rendimiento gracias a los avances tecnológicos en maquinarias, tecnología de producción de semilla, variedades, riego y uso de agroquímicos más eficaces. No obstante es frecuente observar una creciente utilización de insumos para mantener el campo limpio de malezas y protegido de enfermedades y plagas. Estos insumos son muy costosos, y esto implica que no todos los productores agropecuarios puedan implementar las estrategias actuales de control tal como el mercado actual las ofrece. El uso de algunos agroquímicos sistémicos de alto costo resulta peligroso por el desarrollo de cepas resistentes de los patógenos, y pone en desventaja a los pequeños y medianos

productores por sobre aquellos económicamente más solventes. Por ello la búsqueda de nuevas tecnologías a través de la resistencia inducida constituye una herramienta válida para el Manejo Integrado del Cultivo (MIC)

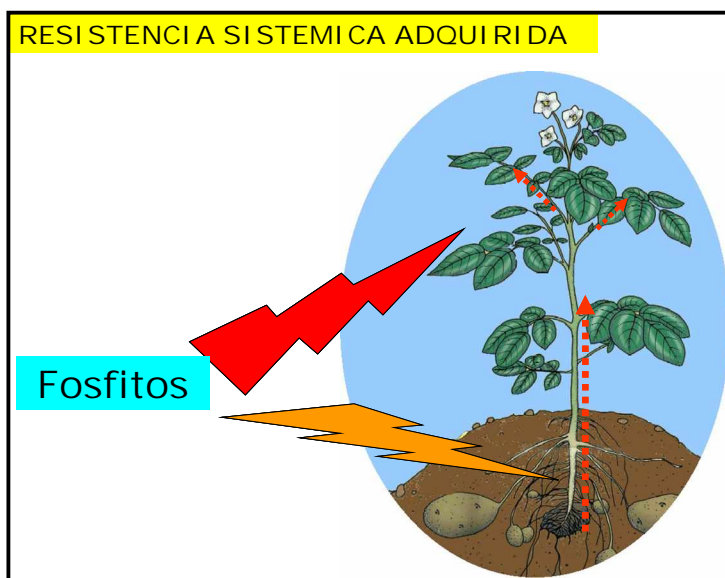
Las estrategias MIC involucran diversas tácticas mecánicas, químicas y biológicas. Entre ellas, reducir el uso de agroquímicos, utilizar agroquímicos más específicos, menos tóxicos y con el mínimo impacto ambiental. Una innovadora tecnología dentro de las estrategias de control integrado del cultivo es el uso de compuestos químicos biocompatibles que aumentan la resistencia a enfermedades en plantas a través del mecanismo de Resistencia Inducida (Sheng Ye et al. 1995; Shirasu et al. 1997; Sticher et al. 1997; Heil 1999; Gozzo 2003; Agonsior 2004; Borges et al., 2004; Vallad & Goodman 2004; Andreu & Daleo 2005; Olivieri et al. 2005, 2007). Esta es una alternativa promisoriosa, cuya base molecular radica en la estimulación de los mecanismos de defensa natural de las plantas. En la interacción planta-microorganismos, los inductores producen un aumento de la respuesta de defensa por la activación de las rutas biosintéticas de fenilpropanoides (fitoalexinas, lignina) o de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis "PRs" (glucanasas, quitinasas, peroxidasas, fenilalanina amonio-liasas y otras) (Eukerli et al. 1993; Fodor et al., 1997; Gozzo 2003; Van Loon et al. 1997), así como la producción de moléculas señales, tales como el ácido salicílico (SA), involucradas en la activación de los mecanismos de defensa en la planta. El ácido salicílico (SA) constituye una señal esencial en la resistencia inducida (Mauch-Mani & Métraux 1998). Se ha descrito que la aplicación exógena de SA y análogos del mismo, tales como INA y BTH son capaces de inducir mecanismos de defensa en las plantas (Cole 1999; Kogel et al. 1994).

El mecanismo de resistencia inducida implica muchos cambios celulares y bioquímicos en las plantas, lo cual podrían explicar su actividad contra diversos patógenos (Jeun et al. 2000; Kombrink et al. 2001; Mauch-Mani & Metraux 1998). Además, permitirían producir una respuesta más durable en el tiempo con respecto a la resistencia producida por un único Gen R en cultivares resistentes a enfermedades o un químico sistémico específico. Esta inespecificidad podría ser una ventaja en la aplicación de técnicas agrícolas, porque la inducción con un agente podría proteger a las plantas contra muchas enfermedades, causadas por bacterias u hongos y no necesitarían ser tratadas diferencial e individualmente (Sheng Ye et al. 1995; Sticher et al. 1997)

Posibles compuestos químicos biocompatibles, inductores de la resistencia inducida, lo constituyen compuestos Fosfitos, utilizados como nutricionales foliares defensivos en diferentes cultivos hortícolas (Reuveni & Reuveni, 1998; Cooke & Little, 2001). Se postula que aumentarían la performance de la planta otorgándoles mayor vigor y resistencia a las enfermedades. En papa, Johnson y cols, (2004) han reportado el efecto de la aplicación foliar de ácido fosforoso sobre la protección a *Phytophthora infestans*, *P. erythrosetptica* y *Pitium ultimum* en tubérculos postcosecha. Los autores describen una mayor protección en cultivares

resistentes, como Umatilla Russet a *P. infestans* y *P. erythrosetica*, y una menor protección en cultivares medianamente resistentes como Ranger Russet, a una dosis de 9.5 kg ha⁻¹.

Estos antecedentes indican que los Fosfitos AFITAL, serían muy buenos candidatos para el estudio de los factores involucrados en la resistencia inducida en papa, específicamente, la resistencia sistémica adquirida y permitirían en un futuro establecer la posible extensión práctica de la resistencia inducida por Fosfitos dentro de estrategias de Manejo Integrado del Cultivo.



1.3. RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN

El Grupo Bioquímica Vegetal de la Universidad Nacional de Mar del Plata desde hace dos décadas estudia aspectos bioquímico-moleculares de las interacciones planta-patógeno. Los estudios se han llevado a cabo en el sistema papa-*Phytophthora infestans*, papa-*Fusarium* y papa-*Rhizoctonia*. Debido a que estos patógenos atacan tanto el tubérculo como el follaje, se han purificado proteínas relacionadas a la patogénesis como glucanasas (Tonón et al. 2001, 2002), quitinasas (Guevara et al. 1999; Machinandiarena et al. 2001), aspartil proteasas (Guevara et al. 2001, 2002, 2004), inhibidor de poligalacturonasas (Machinandiarena et al. 2001) e inhibidores de proteasas (Feldman et al. 2000; 2002; Machinandiarena et al. 2001) de los diferentes órganos de la planta. Esto ha permitido generar anticuerpos específicos, que han sido utilizados para conocer el patrón de expresión de estas proteínas en cultivares resistentes y susceptibles a las distintas enfermedades mediante la técnica de western blot (Tonón et al. 2002, Feldman et al. 2002). También, hemos analizado la acumulación de fitoalexinas antimicrobianas, glicoalcaloides y fenoles por técnicas colorimétricas y de finger printing

(Andreu et al. 1993, 1994, 2001; Tonon et al. 1998); y también calosa y lignina, por técnicas de microscopía óptica y electrónica (Wolski et al. 2007)

Por otra parte, se han purificado y caracterizado proteasas de *Fusarium* (Olivieri et al, 1998, 2004), poligalacturonasas y glucanasas extracelulares de aislamientos patógenos y no patógenos de *Rhizoctonia* (Machinandiarena et al 2005) También se aislaron, caracterizaron estructural y funcionalmente glucanos de la pared celular de *Rhizoctonia* (Wolski et al. 2004, 2005) y *P. infestans* (Andreu 1994; Andreu et al. 1998). Las diferentes moléculas fúngicas han mostrado distintas funciones, ya sea como inductores o supresores de la respuesta de defensa (Andreu et al. 1998), o como factores de virulencia o avirulencia en los distintos patosistemas (Machinandiarena et al. 2001, 2005). Los estudios realizados nos han permitido generar herramientas que pueden ser utilizadas para el análisis temporal de la respuesta de defensa local y sistémica de diferentes cultivares de papa en respuesta al ataque de organismos fitopatógenos.

Recientemente hemos comenzado estudios de resistencia inducida a enfermedades por compuestos químicos, sobre cultivares de papa de importancia industrial con diferente grado de resistencia-susceptibilidad al Tizón tardío (*P. infestans*): Shepody, muy susceptible; Kennebec, medianamente susceptible; Russet Burbank, medianamente resistente, Russet Ranger, resistente (Andreu & Caldiz, 2002, 2004) y en cultivares con resistencia horizontal: Bintje muy susceptible y Pampera, resistente. Estudios en cultivares industriales mostraron que, mediante cuatro aplicaciones del fungicida Fosetyl-Aluminio o del activador vegetal BABA (β -amino-butyric acid) a follaje en estadios de crecimiento vegetativo (20 días de emergencia) e inicio de tuberización (40, 55 días de emergencia), se obtiene una muy significativa protección al Tizón tardío, con 15 días de persistencia, bajo condiciones controladas en invernáculo. Cuando se determinó la severidad de la enfermedad en tubérculos in planta y postcosecha, se obtuvo hasta un 80% de protección. Se detectó un incremento en los niveles de proteínas de actividad de aspartil proteasas y glucanasas, como en el contenido de fitoalexinas y fenoles en discos de tubérculos de papa infectados con *P. infestans*. En consecuencia el efecto protector e inducción de respuesta sistémica parece persistir en el ciclo de la papa hasta el tubérculo. Estos tratamientos fueron más efectivos en cultivares medianamente susceptibles y medianamente resistentes (Andreu et al. 2004, 2006; Andreu & Daleo, 2005)

Cuando se probó la inducción de resistencia en el follaje de los cvs Pampeana y Bintje tratados con BABA como inductor químico, se observó nuevamente una actividad fungistática durante 15 días, con altos niveles de fitoalexinas y fenoles hacia el final del tiempo de persistencia en cultivar Pampeana. Se analizó la expresión y actividad de quitinasas básicas y aspartil proteasa a las 24 y 48 de la infección con *P. infestans* a los 3 y 20 días del tratamiento con el inductor. En el cv Pampeana, la inducción y actividad de estas enzimas fue alta en plantas con 3 días de tratamiento, pero disminuyó a los 20 días. En el cultivar Bintje el efecto del BABA sobre estas

enzimas fue menos evidente. El contenido de calosa y lignina fue significativamente mayor en Pampeana. El desarrollo foliar se vio incrementado en los cultivares tratados con los inductores, lo que también se correspondió con un incremento en el tamaño y número de los tubérculos en el cv. Pampeana (Olivieri et al. 2005, 2007). Estudios preliminares mostraron una moderada protección contra *Fusarium eumartii* en los tubérculos provenientes de plantas tratadas con BABA y Fosfitos (Lobato et al. 2005; Olivieri et al. 2007). Estos resultados nos conducen a continuar el estudio de los mecanismos de resistencia inducida por compuestos químicos como una interesante oportunidad para el control de las enfermedades vegetales en las prácticas agrícolas, además de contribuir al conocimiento básico de la resistencia a enfermedades en plantas.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

“Compuestos Fosfitos inducen mecanismos de defensa sistémicos perdurables; los cuales reducen el impacto de las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos en plantas de papa en cultivo y en tubérculos postcosecha e incrementan el rendimiento del cultivo”

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

“Evaluar el efecto de los nutricionales foliares Fosfitos de Calcio, Potasio y Cobre “AFITAL FOSFITO DE POTASIO, AFITAL FOSFITO DE CALCIO y AFITAL FOSFITO DE COBRE” (AGRO-EMCODI SA), como sustancias inductoras de resistencia a *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium eumartii*, en cultivares de papa Shepody y Kennebec (susceptibles). Específicamente, está referido a conocer las dosis y momentos de aplicación óptimos, grado de protección y tiempo de persistencia de la protección a las enfermedades fúngicas en el ciclo del cultivo de la papa, mediante la aplicación de AFITAL al momento de la plantación en tubérculo-semilla o durante el cultivo en follaje, para su implementación tecnológica en las prácticas agrícolas como un componente de estrategias de Manejo Integrado de Pesticidas”

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Objetivo tecnológico está referido a conocer las dosis y momentos de aplicación óptimos, grado de protección y tiempo de persistencia de la protección a las enfermedades fúngicas en el ciclo del cultivo de la papa, mediante la aplicación al momento de la plantación en tubérculo-semilla o durante el cultivo en follaje de AFITAL de Ca, K o Cu, para su implementación tecnológica en las prácticas agrícolas como un componente de estrategias de Manejo Integrado de Pesticidas

A -Por tratamiento con Fosfitos al TUBÉRCULO SEMILLA

- 1-a. Determinar el porcentaje de protección a Podredumbre seca, Podredumbre húmeda y Sarna Negra en tubérculo semilla.
- b. Determinar la dosis óptima de aplicación en tubérculos semillas.
- c. Evaluar los efectos fisiológicos sobre la emergencia de las plántulas.
- d. Determinar el porcentaje de protección a Rhizoctoniasis en base de tallo (estolón), Marchitamiento-Punta Seca y Tizón tardío en follaje, y el tiempo de persistencia de la protección para el Tizón tardío en follaje.
- e. Determinar los parámetros bioquímicos indicativos de una inducción de los mecanismos de defensa en tubérculo semilla.

B-Por tratamiento con Fosfitos al FOLLAJE

- 2-a. Determinar el porcentaje de protección al Tizón tardío en follaje.

- b. Determinar los parámetros bioquímicos indicativos de una inducción de los mecanismos de defensa en follaje.
 - d. Determinar parámetros fisiológicos en follaje.
- 3-a. Determinar la protección en tubérculos post-cosecha frente al ataque del Tizón tardío y Podredumbre seca.
- b. Determinar los parámetros bioquímicos indicativos de una inducción de los mecanismos de defensa en tubérculo.
 - c. Determinar parámetros de calidad en tubérculos post-cosecha.
- 3.2.2. Objetivo económico está relacionado con la disminución de los costos de producción de papa evitando, mediante la adecuada aplicación de inductores de una respuesta tipo SAR; pérdidas por infecciones durante el cultivo y postcosecha, disminuyendo el costo de utilización de fungicidas y las eventuales pérdidas de materia por disminución en el rendimiento a campo (rendimiento posible y actual) o durante el almacenamiento, lo que disminuirá el rendimiento comercial del cultivo y en consecuencia, su aptitud para comercialización o industrialización.
- 3.2.3. Objetivo ambiental está relacionado con la disminución de residuos contaminantes en los suelos agrícolas causantes de efectos fitotóxicos en las plantas en general y residuales en los tubérculos, afectando directamente a la salud humana.
- 3.2.4. Objetivo científico es avanzar en el conocimiento bioquímico, fisiológico y fitopatológicos de la resistencia inducida por compuestos Fosfitos.

4. MATERIALES e INFRAESTRUCTURA

4.1. Materiales

4.1.1. Cultivares

Se utilizaron cultivares de papa de importancia agroindustrial Shepody y Kennebec, susceptibles y medianamente susceptible al Tizón tardío, respectivamente. En ensayos acampo se utilizaron también los cvs. Spunta, Bannock Russet y Gem Russet.

4.1.2. Organismos fitopatógenos

Phytophthora infestans. Se utilizó un aislamiento agresivo provisto por McCain Argentina provenientes cultivos de Balcarce. El mismo fue aislado de hojas de papa infectadas con síntomas visuales de Tizón tardío y caracterizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas, como la raza R₂ R₃ R₆ R₇ R₉. El micelio se cultiva sobre rodajas de papa con repiques semanales.

Fusarium solani spp *eumartii* 3122 pertenece a la colección de grupo Bioquímica Vegetal del Instituto de Investigaciones Biológicas. Se mantienen en medio agar papa glucosado.

Rhizoctonia solani AG3. fue provistos por el Laboratorio de Fitopatología de la EEA-INTA Balcarce y se mantienen en medio agar papa glucosado

Streptomyces scabies fue aislada de tejido y suelo infectado por Diagnósticos Vegetales SRL. Se mantiene en agar nutritivo y agar Kuster.

4.1.3. Fosfitos

Se utilizaron Fosfitos nutricionales foliares de la empresa AGRO-EMCODI SA.

§ AFITAL Fosfitos de Potasio: Anhídrido Fosfórico (P₂O₄) 30% y Oxido de Potasio (K₂O) 20%

§ AFITAL Fosfito de Calcio: Anhídrido Fosfórico (P₂O₄) 25% y Calcio (Ca) 8%

§ AFITAL Fosfito de Cobre: Anhídrido Fosfórico (P₂O₄) 25% y Cobre (Cu) 5%

Se disolvieron en agua a las dosis de 3, 4.5 y 6 lts/ha. El pH de la solución se estimó entre en 5.2 y 3, según la concentración y Fosfito utilizado. Se aplicaron con un pulverizador de 200 KPa (ESAC SA, Argentina)

4.1.4. Reactivos químicos

Acetato de Sodio, Metabisulfito de Sodio, Carbón activado Acrilamida (SIGMA), Bisacrilamida, SDS (Dodecil sulfato de sodio), Tris Base (Trizma Base-SIGMA), Acido clorhídrico, APS (Persulfato de amonio), Temed (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina), Glicina, β-

mercaptoetanol, Glicerol, Bromofenol blue, Leche descremada, Cloruro de Sodio, Tween 20 (SIGMA), BCIP (Boro cloro indol phosphate), NBT (nitrobluetetrazolium-SIGMA), Cloruro de Magnesio, Albúmina EGG (SIGMA), Ovoalbumina, Azida de Sodio, Membrana de Nitrocelulosa BIO-RAD, Coomassie (Brillant Blue R250- SIGMA), Laminarina (SIGMA), Molibdato de Amonio, Acido sulfúrico, Arsenato de Sodio, Sulfato de Sodio anhidro, Tartrato de Sodio y Potasio, Carbonato de Sodio, Bicarbonato de Sodio, Sulfato de Cobre, Glucosa (SIGMA), Dimetil aminobenzaldehído, Ácido acético glacial, Quitina, Metanol, Reactivo de Folin-Ciocalteu-Merck, Ácido Clorogénico (SIGMA), Aniline blue, Dimetilsulfóxido, Hidróxido de Sodio, Ácido tioglicólico. DAB (Sigma), Acido Clorhídrico, Safranina.

Anticuerpos: Quitinasas, β -1,3-Glucanasas

Anticuerpo 2° (antirabbit IgG, Fosfatasa Alcalina conjugada-SIGMA)

4.1.5. Material descartable

Tips de 1000, 200 y 20 ul, eppendorf, cajas de Petri descartables, guantes de latex, papel de filtro, parafilm, membranas de diálisis (SIGMA)

4.2. Infraestructura

4.2.1. Invernáculo climatizado

A partir de diciembre de 2004 se comenzó la construcción de un invernáculo climatizado de 50 mts² ubicado en McCain Southeast Research Farm-Balcarce. El mismo fue construido con nylon francés que permite una mayor radiación lumínica sobre las plantas. Consta de una antecámara y cámara de crecimiento principal. Se le adicionaron luces artificiales, para suplementar las horas de luz durante los días cortos de invierno y calefacción, lo que permitió realizar cultivos durante la época invernal. También posee aberturas laterales con tela antiáfidos, abertura senital y un sistema de refrigeración evaporativa para bajar la temperatura dentro del invernáculo durante el verano.

4.2.2. Infraestructura edilicia

El Instituto de Investigaciones Biológicas cuenta con 1200 mt² cuadrados distribuidos en nueve laboratorios, salas especiales y equipamiento adecuado para el desarrollo de proyectos de investigación en bioquímica y biología molecular. Se cuenta además con sala de seminarios, biblioteca, taller, lavadero, cuarto de cultivos de plantas, bacterias y hongos, de fotografía, droguero, sala de centrifugas, cuarto radioactivo, cuarto estéril, bioterio, invernáculo, cuarto de solventes, etc.

4.2. 3. Campo experimental

Se realizaron ensayos a campo en dos sitios experimentales:

A. McCain Southeast Research Farm-Balcarce, cito en ruta 226 km 41.5

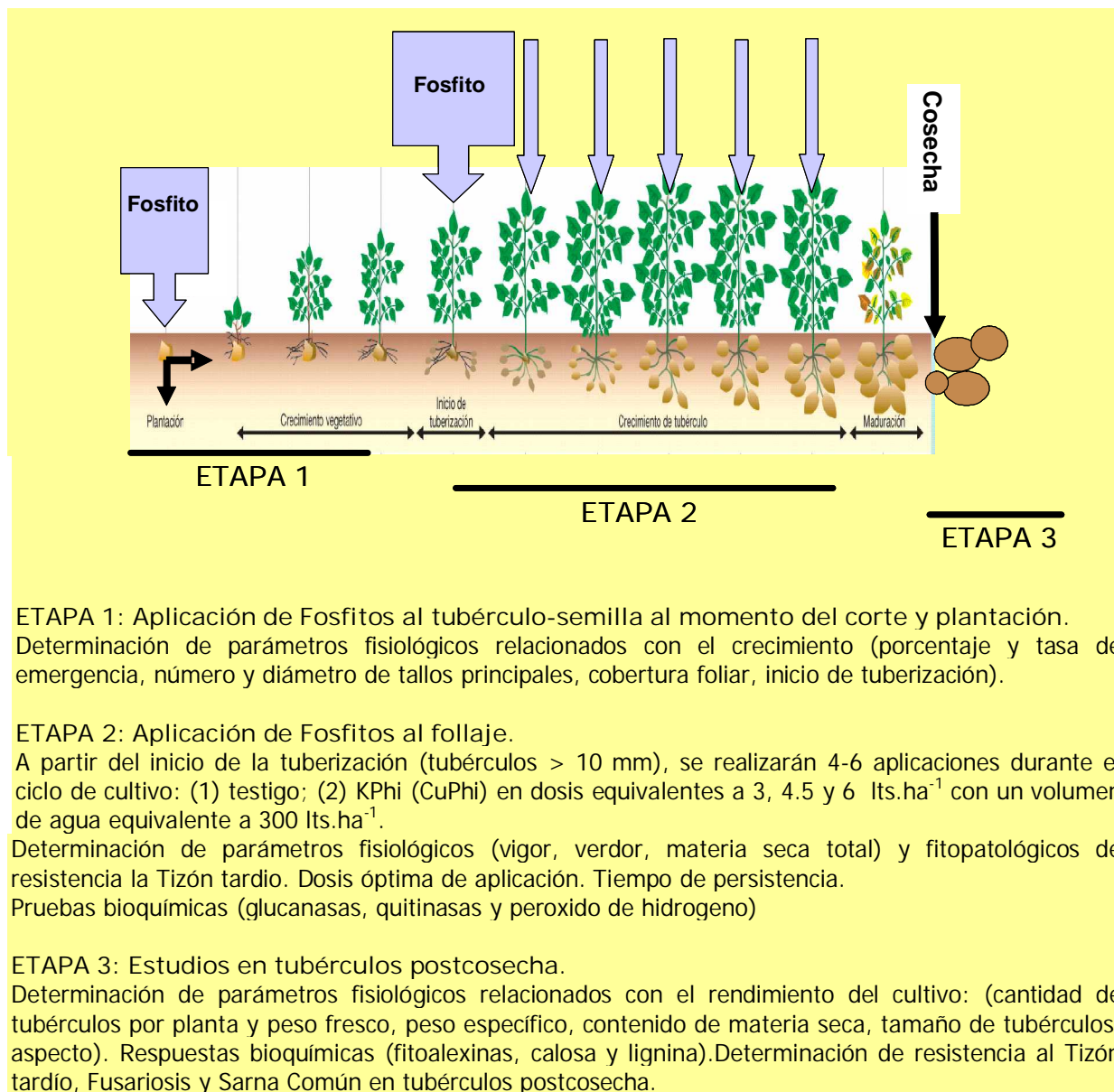
B. Unidad Integrada EEA Balcarce INTA, ruta 226 km 70

Las plantaciones se realizaron en forma mecánica en el mes de octubre, a una densidad equivalente a $5,2 \text{ pl m}^{-2}$, en parcelas de 4 surcos (0,85 m entre hileras) y 6 m de largo, en un diseño en bloques al azar totalmente aleatorizados con 4 repeticiones.

Luego de la "entrega" natural del follaje, se cosecharon de cada parcela los dos surcos centrales con sacadora de disco y se embolsaron manualmente.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL y METODOS

Para complementar con los objetivos propuestos las actividades han sido desagregadas en distintas etapas, las cuales se llevaron a cabo en bajo condiciones de crecimiento del cultivo en invernáculo y a campo.



ETAPA 1: Aplicación de Fosfitos al tubérculo-semilla al momento del corte y plantación. Determinación de parámetros fisiológicos relacionados con el crecimiento (porcentaje y tasa de emergencia, número y diámetro de tallos principales, cobertura foliar, inicio de tuberización).

ETAPA 2: Aplicación de Fosfitos al follaje.

A partir del inicio de la tuberización (tubérculos > 10 mm), se realizarán 4-6 aplicaciones durante el ciclo de cultivo: (1) testigo; (2) KPhi (CuPhi) en dosis equivalentes a 3, 4.5 y 6 lts.ha⁻¹ con un volumen de agua equivalente a 300 lts.ha⁻¹.

Determinación de parámetros fisiológicos (vigor, verdor, materia seca total) y fitopatológicos de resistencia la Tizón tardío. Dosis óptima de aplicación. Tiempo de persistencia.

Pruebas bioquímicas (glucanasas, quitinasas y peroxido de hidrogeno)

ETAPA 3: Estudios en tubérculos postcosecha.

Determinación de parámetros fisiológicos relacionados con el rendimiento del cultivo: (cantidad de tubérculos por planta y peso fresco, peso específico, contenido de materia seca, tamaño de tubérculos, aspecto). Respuestas bioquímicas (fitoalexinas, calosa y lignina). Determinación de resistencia al Tizón tardío, Fusariosis y Sarna Común en tubérculos postcosecha.

5.1. ETAPA 1.

5.1.1. Tratamiento al tubérculo semilla

Con el propósito de estudiar el posible efecto del Fosfito de calcio (Ca) y Fosfito de potasio (K), en la protección al Tizón tardío en estadios tempranas del cultivo (etapa muy susceptible). Tubérculos semillas sanos del cultivar Shepody y Kennebec (cultivos en invernáculo) o los cvs. Shepody, Gem Russet y Bannock Russet (cultivos a campo) fueron

cortados en trozos de 50 g con un solo brote y tratados inmediatamente por aspersión con una dosis de Fosfito de Ca o Fosfito de K de 3, 4,5 y 6 lts.ha⁻¹ Kennebec (cultivos en invernáculo) o 3 lt/ha (cultivos a campo) equivalentes a 1.2; 1.8 y 2.4 lts.t⁻¹ de tubérculo-semilla con un volumen de agua equivalente a 50 lts.t⁻¹ de tubérculo-semilla. Trozos sin tratar fueron los testigos de cada cultivar y para cada tratamiento. Los tubérculos-semilla fueron plantados en suelo libre de patógenos (cultivos en invernáculo) o en suelo a campo.

5.1.2. Evaluaciones

A. En cultivos de invernáculo: al momento del 80% de emergencia de los testigos, de cada cultivar, se evaluaron parámetros fisiológicos como la tasa de emergencia para cada tratamiento, y posteriormente en follaje, vigor y verdor de la plántula. Mediante pruebas fitopatológicas se evaluó la protección al Tizón tardío, Podredumbre seca y Rhizoctonias por infecciones en suelo. En el estadio temprano de crecimiento del cultivo (a los 20 días después de emergencia), se evaluó el porcentaje de protección al Tizón tardío en follaje mediante la prueba de hoja desprendida.

5.1.2.1. Pruebas Fitopatológicas

Infección en tubérculos-semilla y evaluación de protección al Tizón tardío y Podredumbre seca y Rhizoctonias

Tubérculos-semilla asperjados con Fosfitos fueron infectados mediante diferentes técnicas según el patógeno:

-Tizón tardío: mediante el asperjados de los tubérculos-semilla con una solución de esporangios/esporas *P. infestans* del orden de 10⁴ e inmediatamente plantados en suelo húmedo. Las macetas se mantuvieron a 18 °C hasta los 20 días después de la emergencia del control sin infectar. Al término de la incubación se evaluó el porcentaje de plantas emergidas para cada tratamiento.

-Podredumbre seca, a través de suelo infectado con el hongo *F. eumartii* mediante disco de agar papa con el micelio. Las macetas se mantuvieron a 25 °C durante 15 días. Al término de la incubación se evaluó el porcentaje de tubérculos-semillas con síntomas de Podredumbre seca en la zona del corte.

-Rhizoctonias a través de suelo infectado con el hongo *Rhizoctonia solani* mediante disco de agar papa con el micelio. Las macetas se mantuvieron a 18 °C durante 15 días. Al término de la incubación se evaluó el cancro en la base del tallo.

B. En cultivos a campo: al momento del 80% de emergencia de los testigos, de cada cultivar, se evaluaron parámetros fisiológicos de crecimiento y rendimiento.

5.1.2.2. Pruebas fisiológicas

-Porcentaje de emergencia: se determinó el porcentaje de plantas emergidas a partir del tiempo en el que alguno de los tratamientos alcanzó el 80% de emergencia y luego se relativizó al resto de los tratamientos.

-Tasa de emergencia: se determinó el porcentaje de plantas emergidas por tratamiento cada 7 días después de la plantación. Se realizó una curva para evaluar la tasa o velocidad de emergencia entre tratamientos.

-Cobertura foliar: se considerada como el área ocupada por una planta entera, es una medida altamente correlacionada con el área foliar, y esta a su vez con el rendimiento del cultivo. Se realizaron mediciones con un bastidor cuadrículado de área conocida, el cual se colocó sobre las plantas cultivadas a una altura de 90 cm, y luego se estimó el porcentaje ocupado por el follaje de cada planta. El proceso se repitió para una submuestra de $n=30$ plantas. Estas mediciones se realizaron a partir de los 15 días de emergencia y cada 7 días hasta la etapa de inicio de tuberización, momento de máxima cobertura foliar.

-Número y diámetro de tallos principales: se determinó el número y diámetro de tallos principales a partir del momento de la floración. El número de tallos por unidad de área es una medida de la densidad del cultivo en papa, la cual afecta directamente al rendimiento del cultivo. Se consideraron tallos principales aquellos que nacen directamente del tubérculo semilla, y la forma de estimarlos fue el conteo de los tallos sobre el suelo, no considerando las ramificaciones laterales. Luego se los relativizó a números de tallos m^{-2} (Pozo 2000).

-Inicio de la tuberización: Se consideró inicio de tuberización cuando el tamaño de tubérculo llegue a 10 mm, tomando en cuenta el 80% de una unidad experimental. Para ello se realizaron observaciones cada 7 días a partir de los 35 días después de plantación (Corapse-Leon et al. 2002)

5.2. ETAPA 2. Tratamiento al follaje

A. En cultivos de invernáculo: con el propósito de estudiar la posible protección en follaje por los compuestos Fosfito de Ca y Fosfito de K, la inducción de los mecanismos de defensa y efectuar una primer aproximación de tratamiento óptimo que incluya:

- 1- la/s dosis óptima de aplicación,
- 2-tiempo de persistencia de la/s misma/s,
- 3-número de aplicaciones,
- 4-etapa en el ciclo del cultivo.

A partir de los 35 días de emergencia hasta la maduración de cultivo se realizaron dos aplicaciones foliares a diferentes dosis de los Fosfito de Ca o Fosfito de K (3, 4.5 y 6, lts/ha),

con un intervalo de 30 días. Luego de cada aplicación se realizaron 4 muestreos del material tratado (a los 5, 14, 21, 33 días) para pruebas fitopatológicas y bioquímicas.

5.2.1. Evaluaciones

5.2.1.2. Pruebas fitopatológicas

-Prueba de hoja cortada (Andreu 2004)

A diferentes tiempo de cada aplicación foliar se extrajeron hojas de las plantas tratadas y de las plantas control y se sometieron a la prueba de hoja cortada en el laboratorio. Las hojas fueron infectadas artificialmente bajo condiciones controladas para el desarrollo de la enfermedad Tizón tardío. Para ello, se tomarán dos hojas por planta sobre 10 plantas por tratamiento. Las hojas fueron colocadas en cajas de Petri sobre agar agua y se inocularon con 50 µl de una suspensión de esporangios/esporas de 10^3 esporangios ml^{-1} . Entre el 4-7 día de la infección se examinó el desarrollo de la enfermedad por estimación visual del área foliar con síntomas de Tizón tardío. Posteriormente, se evaluó la severidad de la enfermedad estimando el área foliar lesionada a través de la siguiente escala: (1) sin lesión, (2) pocos círculos, 1 a 2 mm de lesión, (3) menos del 5% del área afectada, (4) 5-10% del área afectada, (5) 10- 25% del área afectada, (6) 25-50% del área afectada, (7) 50-75% del área afectada, (8) 75-85% del área afectada, (9) 85-95 % del área afectada, y (10) 95-100% del área foliar infectada. Finalmente se aplicará la siguiente fórmula: Area foliar lesionada (%)= $X_2 \cdot 100 / X_1$, donde (X_1) es el área foliar total: $a \cdot b / 2$, y (X_2) es el área de la mancha: $a \cdot b / 2$; (a) alto mayor, (b) ancho mayor. A partir de los valores de severidad de la enfermedad correspondiente al área foliar lesionada, se determinará el porcentaje de protección de acuerdo a la siguiente fórmula: Protección (%)= $100 (1 - x/y)$; donde: (x), valor de severidad de la enfermedad en plantas tratadas, (y) valor de severidad de la enfermedad en plantas control.

En la Tabla 1 se expresan los porcentajes de protección teóricos resultantes de la aplicación de la fórmula precedente para cada valor de x (tratadas T) e y (control C) posibles.

Tabla 1. Porcentajes de protección teóricos, según Andreu (2004)

T(x)	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%	C(y)	P%
8	10	20	9	11												
7	10	30	9	22	8	12										
6	10	40	9	33	8	25	7	14	6							
5	10	50	9	44	8	37	7	29	6	17	5					
4	10	60	9	55	8	58	7	43	6	33	5	20	4			
3	10	70	9	66	8	60	7	58	6	50	5	40	4	25	3	
2	10	80	9	78	8	75	7	71	6	60	5	55	4	50	3	33
1	10	99	9	90	8	87	7	86	6	83	5	80	4	75	3	67*

Referencias: T (x), valores de severidad en plantas tratadas; C (y), valores de severidad en plantas control, y P%, porcentaje de protección.

Mediante las pruebas fitopatológicas se determinó el grado de protección de cada Fosfito a las diferentes dosis. Luego de los 4 muestreos de la primer y segunda aplicación, se estimó el

tiempo de persistencia de cada tratamiento (compuesto y dosis) en las diferentes etapas de fenológicas del desarrollo del cultivo.

5.2.1.2. Pruebas bioquímicas

Métodos de evaluación bioquímica para la caracterizar cuali y cuantitativamente las moléculas involucradas en los mecanismos de defensa inducida.

Se cuantificó el contenido y la actividad de moléculas relacionadas previamente con un aumento en la resistencia a *P. infestans* como: las actividades y patrones de inducción de proteínas glucanasas y quitinasas, el contenido de fenoles, análisis de contenidos de extracto de pared celular y la generación de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 .

Para estos estudios se extrajeron hojas provenientes de follaje tratado con Fosfitos (PhiCa o PhiK) o sin tratar, infectado y sin infectar. En estas "muestras" fueron subdivididas en diferentes "submuestras" para su tratamiento y análisis. A continuación se detalla los tratamientos a partir de los cuales se realizaron las determinaciones bioquímicas (Tabla2)

Tabla 2: Submuestras según el tratamiento en invernáculo y en el laboratorio

Submuestra	Tratamiento a la planta (Invernáculo)	Tratamiento a la hoja (Laboratorio)
C	Sin tratamiento	Sin infectar. Procesada inmediatamente al corte
K3	Fosfito de K. Dosis 3lts/ha	Sin infectar. Procesada inmediatamente al corte
K6	Fosfito de K. Dosis 6lts/ha	Sin infectar. Procesada inmediatamente al corte
Ca3	Fosfito de Ca. Dosis 3lts/ha	Sin infectar. Procesada inmediatamente al corte
Ca6	Fosfito de Ca. Dosis 6lts/ha	Sin infectar. Procesada inmediatamente al corte
CC	Sin tratamiento	Sin infectar. Procesada a los 3 días del corte
CI	Sin tratamiento	Infectada. Procesada a los 3 días de la infección
K3C	Fosfito de K. Dosis 3lts/ha	Sin infectar. Procesada a los 3 días del corte
K6C	Fosfito de K. Dosis 6lts/ha	Sin infectar. Procesada a los 3 días del corte
Ca3C	Fosfito de Ca. Dosis 3lts/ha	Sin infectar. Procesada a los 3 días del corte
Ca6C	Fosfito de Ca. Dosis 6lts/ha	Sin infectar. Procesada a los 3 días del corte
K3CI	Fosfito de K. Dosis 3lts/ha	Infectada. Procesada a los 3 días de la infección
K6CI	Fosfito de K. Dosis 6lts/ha	Infectada. Procesada a los 3 días de la infección
Ca3CI	Fosfito de Ca. Dosis 3lts/ha	Infectada. Procesada a los 3 días de la infección
Ca6CI	Fosfito de Ca. Dosis 6lts/ha	Infectada. Procesada a los 3 días de la infección

El cronograma de análisis de las submuestras para las distintas determinaciones bioquímicas, se realizó de acuerdo a los tiempos estimados de máxima inducción o acumulación de los mismos según se detalla a continuación:

Tiempo de infección (días)					
0	1	2	3	4	5
H ₂ O ₂			Glucanasas Quitinasas		

-Tinción de H₂O₂ con DAB: hojas de plantas de papa provenientes de plantas tratadas con Fosfito de Ca o Fosfito de K o agua como control, fueron inoculadas por esprayado con una suspensión de esporas y esporangios de *Phytophthora infestans*, a los tres días del tratamiento. Después de 3 o 7 hs de inoculación fueron sumergidas en una solución de DAB al 1%. Después del tiempo suficiente para obtener la reacción de precipitación de DAB en presencia de H₂O₂, las hojas fueron decoloradas por calentamiento en etanol 96%. Los puntos o manchas amarronadas indican presencia de H₂O₂.

-Extracción de β -1,3-glucanasas: las submuestras se homogenizaron en mortero, con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,2 y metabisulfito (0.1%). Por cada gramo de tejido se utilizó dos volúmenes de buffer. El homogenato se filtró con muselina y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante de las muestras se dializó toda la noche contra buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,2 y posteriormente se conservaron a -20°C para luego determinar actividad enzimática.

-Determinación de la actividad de β -1,3-glucanasas: se determinó midiendo la velocidad de producción de azúcares reductores, utilizando laminarina como sustrato, como se describe en Wolski et al. (2005). Los azúcares reductores liberados se determinaron por el método colorimétrico de Somogyi (Somogyi 1952) y Nelson (Nelson 1944). Como estándar se utilizó glucosa. Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0-4°C.

-Electroforesis en geles de poliacrilamida: los mismos extractos de proteínas realizados para determinar la actividad enzimática de glucanasas y quitinasas se utilizaron para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida. Los mismos se llevaron a cabo en condiciones disociantes según lo descrito por Laemmli (1970). Se prepararon geles de separación de acrilamida 12% y las muestras se desnaturalizaron. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% en metanol 50% y ácido acético 10%

-Immunoblot (Western Blot): los extractos de proteínas totales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con una celda de transferencia semi-seca (Trans-Blot, Bio-Rad,

Hercules, CA, USA), dicha membrana se incubó con el suero conteniendo el anticuerpo primario y luego el con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina como se describe en Wolski et al. (2005). La unión del anticuerpo se detectó revelando con 5-bromo-4-cloroindolil-fosfato (BCIP) y nitrobluetetrazolium (NBT), según lo descrito por Turner (1986), hasta la aparición de bandas violáceas. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (TN-Image, Image Analysis Software, CompuServe, IBMAPP, Rockville, MD, USA). Los anticuerpos utilizados fueron: 1- anticuerpo anti- β -1,3-glucanasa básica, producido a partir de β -1,3-glucanasa básica (36Kda) purificada de fluido intercelular de hojas de papa infectadas con *Phytophthora infestans*, provistos gentilmente por el Dr. Kombrink (Max-Plant Institut, Alemania) (Kombrink et al. 1988).

-Extracción y análisis cuantitativo de fenoles: las submuestras se homogenizaron en metanol 80% y se dejaron durante una noche a 4°C. El homogenato se filtró través de tela de nylon y el filtrado se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se utilizó para la determinar el contenido de fenoles como describe Kritzman & Chet (1980). A 100 μ l del sobrenadante se le adicionó 1ml de bicarbonato de sodio saturado y se agitó en vortex. Luego se le adicionó 3 ml de una solución diluida (1/8) de carbonato de sodio (2%), tartrato de sodio (0.4%) y sulfato de cobre (0.5%). Las submuestras se incubaron durante 7 min a 37 °C y por último se le adicionó 100 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N). Las muestras se dejaron por 30 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de las mismas a 650 nm. La curva estándar se llevó a cabo con ácido clorogénico.

-Extracto de pared: se evaluó el patrón de proteínas de pared de extractos de hojas de plantas tratadas con Fosfitos de Calcio o Potasio en dosis de 3 l/ha. Las muestras fueron tomadas a los 21 días de tratamiento. El análisis se realizó mediante una electroforesis en gel de acrilamida 15% SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes. Las muestras fueron dializadas luego de la homogenización y posteriormente se concentraron 5X por precipitación con Acetona y resuspensión en Buffer Tris-HCl 50 mM pH 8. Se sembró 7,5 μ g de proteínas determinadas por el método de Bradford. El revelado se realizó por tinción con Plata.

B. En cultivos a campo: con el propósito de corroborar la dosis óptima de aplicación y tiempo de persistencia determinada bajo condiciones de invernáculo, se realizaron ensayos a campo con los compuestos Fosfito de Ca y Fosfito de K a la dosis de 3 lts. ha^{-1} . Las pulverizaciones se realizaron con una mochila de aspersión manual cada 15 días a partir de inicio de tuberización.

-Lote experimental en McCain Southeast Research Farm-Balcarce, los cvs. Shepody, Kennebec, Gem Russet y Bannock Russet fueron tratados con 4 aplicaciones de Fosfito de K. Para

determinar la protección al tizón tardío se realizaron pruebas de hojas cortada como se describe en la sección 5.2.1.2.

-Lote experimental en la Unidad Integrada EEA Balcarce INTA, los cvs. Spunta y Kennebec fueron tratados con 6 aplicaciones de Fosfito de K o Fosfito de Ca. Para determinar la protección al tizón tardío se espero la infección natural a campo. En cada parcela se tomaron lecturas del porcentaje de infección por *P. infestans*, a partir de las primeras manifestaciones de síntomas de la enfermedad en el testigo.

Con los valores de porcentaje de infección se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n (X_{i+1} + X_i)/2 (t_{i+1} - t_i)$$

Donde X_i , es la proporción de tejido afectado en la observación i ,

t_i , es el tiempo en días en la observación i ,

n , es el número de observaciones

5.2. 3. Información general sobre los ensayos de control de Tizón tardío a campo

Lote: Unidad Integrada EEA Balcarce INTA

Ensayo de Fosfito de potasio y Fosfito de calcio en follaje

Variedades: Spunta y Kennebec

Fecha de Plantación: 30/10/06

Fechas de aplicaciones (6): 4/12/06; 18/12/06; 28/12/06; 8/01/07; 19/01/07; 29/12/07

Fertilización (kg/ha)18-46-0: 200

Irrigación: 10 riegos de 30 mm, a intervalos semanales

Fecha de cosecha: 9/04/07

Se realizaron unicamente aplicaciones de insecticidas para el control de bicho moro.

Lote: McCain Southeast Research Farm - Balcarce

Ensayo de Fosfito de potasio en semilla y en follaje

Variedades: Bannock Russet, Gem Russet, Shepody y Kennebec

Tratamientos:*con Fosfito de potasio en la semilla: 3 lts.ha⁻¹

* convencional en la semilla: -Acrobat: 4 kg.ha⁻¹

-Celest: 250cc tn⁻¹

Fecha de plantación: 10/11/06

Fechas de aplicaciones en follaje (4): 15/01/07; 29/01/07; 15/02/07, 01/03/07

Fecha de cosecha 26/03/07

Fertilización: En pre-plantación (19/10/06): Sulpomag (80kg.ha⁻¹), Urea(170kg.ha⁻¹)

En plantación (10/11/06): Urea (100kg.ha⁻¹)

5.3. ETAPA 3: Evaluaciones en tubérculos postcosecha

A. En cultivos de invernáculo: a partir de cultivos bajo condiciones de invernáculo, se cosecharon los tubérculos y a partir de cada submuestra, n=30 plantas, se efectuaron pruebas agronómicas de importancia comercial, pruebas fitopatológicas de resistencia al Tizón tardío y Podredumbre seca y pruebas bioquímicas de acumulación de moléculas relacionadas con la defensa con actividad antimicrobial como las fitoalexinas. También se determinó la actividad de serin proteasa fungica, cuya inducción está directamente relacionada con la infección por *Fusarium solani* en tubérculos de papa.

5.3.1. Pruebas agronómicas

-cantidad de tubérculos por planta: a partir de 3 submuestras 10 plantas se contó la cantidad de tubérculos por planta.

-tamaño de los tubérculos: en cada submuestra los tubérculos se clasificaron en intervalos de clase por el tamaño: (1): > 5 cm; (2), < 5 cm; (3): < 3.5 cm; (4): < 2,5 cm

-peso específico: se determinó por el método de peso sumergido.

-materia seca: se determinó mediante método gravimétrico por secado en estufa a 105 °C durante 24 hs de los mismos

-aspecto: se evaluó por apreciación visual utilizando una escala de 0 (tubérculos no comerciales por malformaciones y defectos) a 9 (tubérculos con piel lisa, ojos superficiales, sin malformaciones ni defectos)

-presencia de malformaciones: a partir del análisis de aspecto.

5.3.2. Pruebas fitopatológicas

A partir de los 2 meses se realizaron pruebas fitopatológicas de control a Tizón tardío, Podredumbre seca y Sarna común.

-Infección de tubérculos con *P. infestans* y evaluación de protección al Tizón tardío

Los tubérculos procedentes de plantas tratadas serán infectados artificialmente mediante dos técnicas diferentes: (1) Mediante pulverización de los tubérculos enteros con una suspensión de esporangios/esporas de 10^4 esporangios ml^{-1} . Los tubérculos inoculados serán incubados a 18°C y condiciones de alta humedad relativa (> 95%) durante 25 días posteriores a la inoculación. Al término de la incubación se evaluará la incidencia de Tizón tardío como porcentaje de tubérculos enfermos (0: baja incidencia a 100: alta incidencia); luego se cortarán longitudinalmente evaluando la severidad de la enfermedad como porcentaje de tejido necrótico interno con síntomas de Tizón tardío (0: sin síntomas a 5: $\geq 50\%$ del área con síntomas). (2) Mediante el corte del tubérculo en rodajas de 1 cm de espesor. Las rodajas serán inoculadas con una gota de 50 μl de una suspensión de esporangios/esporas de 10^4

esporangios ml^{-1} y luego serán incubadas a 18°C y alta humedad relativa durante 7 días. Al cabo del período de incubación se medirá el diámetro de crecimiento de la colonia sobre la superficie de rodaja de papa (Andreu 2004).

-Infección de tubérculos con *F. solani* ssp *eumartii* y evaluación de protección a la Podredumbre seca

Los tubérculos procedentes de plantas tratadas fueron infectados artificialmente mediante la técnica del sacabocado, por la cual se extrae un cilindro de parénquima y en el fondo de la cavidad se coloca un disco de agar conteniendo micelio y conidios del hongo. Posteriormente, la cavidad se completa con el cilindro de parénquima extraído previamente y la herida en la superficie del tubérculo se sella con parafina para impedir la entrada de bacterias. Los tubérculos inoculados se incubaron a 25°C durante 14 días. Al término del período de incubación, se evaluó la incidencia de Podredumbre seca como porcentaje de tubérculos enfermos (0: baja incidencia a 100: alta incidencia). Posteriormente, se cortaron longitudinalmente a fin de evaluar la severidad de la infección, mediante la cuantificación del área con síntomas de Podredumbre seca como porcentaje de tejido necrótico (0: sin síntomas a 5: $\geq 50\%$ del área con síntomas)

5.3.3. Pruebas bioquímicas

-Producción de fitoalexinas: Las fitoalexinas son compuestos terpenoides con actividad antimicrobial sintetizados por las plantas huéspedes en respuesta a patógenos. La acumulación de estos compuestos está relacionada con el grado de resistencia del hospedante. En consecuencia en los tubérculos infectados con *P. infestans*, procedentes de plantas tratadas y sin tratar con Fosfitos, se determinó la acumulación de fitoalexinas, a los fines de cuantificar indirectamente el aumento de la resistencia al Tizón tardío como consecuencia de los tratamientos foliares con Fosfitos. El tejido de tubérculo infectado proveniente de los distintos tratamientos se homogenizó en una mezcla de cloroformo: acetona: metanol (CAM) en una proporción 50:5:45, respectivamente. Los homogenatos se mantuvieron a 4°C durante una noche, se filtraron y lavaron varias veces con CAM y se evaporaron por presión reducida hasta sequedad. Los residuos se resuspendieron en una mezcla de cloroformo: ácido acético 0,2 M (1:1), obteniéndose dos fases, la fase clorofórmica inferior conteniendo las fitoalexinas y la acética superior. La fase inferior se evaporó por presión reducida hasta sequedad y luego las fitoalexinas se disolvieron en 1 ml de ciclohexano y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min. La fase sulfúrica (inferior) se midió a 500 nm, 10 minutos después del agregado de ácido sulfúrico concentrado. Se utilizó ácido sulfúrico concentrado como blanco (Andreu et al. 2001).

-Serin Proteasa fungica: la Serin proteasa fúngica es una proteasa de la familia de las subtilisinas, que se encuentra asociada al éxito en la colonización de los tejidos de papa por parte del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* 3122 a través de la degradación de proteínas de defensa. 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, a los fines de cuantificar indirectamente el aumento de la resistencia a *F. eumartii* 3122 por el tratamiento foliar con PhiCa o PhiK. La Serin proteasa fúngica se extrajo a partir de fluido intercelular del tejido de tubérculos que rodeaba el sitio de infección (aproximadamente 8 mm alrededor de esta zona). El tejido se cortó en trozos de 1 cm³ y se lavaron 4 o 5 veces con agua destilada con agitación suave. Luego se colocaron en un gran volumen de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, conteniendo 0.6 M de NaCl y 0.1 % (v/v) de β -mercaptoetanol. Se sometió a vacío por tres períodos de 10 s con intervalos de 30 s. Los trozos se secaron sobre papel de filtro y se colocaron en un filtro de vidrio fritado inserto en un tubo de centrifuga. Se centrifugo a 2.800 rpm durante 20 min y el extracto recuperado fue utilizado inmediatamente o almacenado a -20 °C. La actividad proteolítica fue determinada en la siguiente mezcla de incubación: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 % de azocaseína como sustrato y extracto enzimático, en un volumen final de 0.5 ml. La incubación se realizó a 42 °C por 45 min. La reacción se detuvo por el agregado de 0.5 ml de TCA (ácido tricloroacético) 10 %. Después de 30 min a 4 °C, el material insoluble se separa por centrifugación a 8000 rpm durante por 15 min. La actividad proteolítica se mide como el incremento de la absorbancia de la fracción soluble a 335 nm (Olivieri et al. 2002).

6. SERVICIOS CONTRATADOS

PROPAPA. Unidad Integrada EEA Balcarce INTA

Ensayos a de protección al tizón tardío y rendimiento a campo.

Responsables: Ing Agr. Silvia Capezio y Marcelo Huarte.

Laboratorio Fertilab

Análisis de suelos de invernáculo.

Análisis de macro y microelementos en tubérculos provenientes de plantas tratadas con Fosfitos.

Responsable: Ing Agr. Enrique Manzo

Diagnosticos Vegetales SRL

Rotura química de dormición de tubérculos para plantación.

Responsable: Ing Agr. Ana Escarra.

Preparación de sustrato para plantas de papa en condiciones de crecimiento de invernáculo.

Responsable: Ing Agr. Maximo

Laboratorio de nutrición y evaluación de calidad de forrajes. Unidad Integrada EEA Balcarce INTA.

Análisis de macromoléculas de pared celular de follaje de plantas de papa tratadas con Fosfitos

Análisis de macromoléculas de pared celular de tubérculos de papa provenientes de plantas tratadas con Fosfitos.

Responsable: Ing. Agr. Susana Guaita