



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**“MANEJO DE LA PODREDUMBRE MORENA (*Monilinia fructicola*) EN
DURAZNERO A TRAVÉS DEL USO DE FOSFITOS COMO
ACTIVADORES DE RESISTENCIA Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD
POSCOSECHA”**

Ing. Agr. ANDREA INES LEONE

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTORA: Dra. MARIEL S. MITIDIERI

CO-DIRECTOR: Dr. HUGO R. PERMINGEAT

2023

“MANEJO DE LA PODREDUMBRE MORENA (*Monilinia fructicola*) EN DURAZNERO A TRAVÉS DEL USO DE FOSFITOS COMO ACTIVADORES DE RESISTENCIA Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA”

Andrea Inés Leone

Ingeniera Agrónoma- Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Estación Experimental EEA INTA San Pedro, en el Laboratorio de Biología Molecular, dependiente de la Facultad de Cs. Agrarias, y en el campo de un productor frutícola de la zona de Álvarez- Piñero, durante el período comprendido entre el 1° de abril de 2016 y el 31 de julio de 2022, bajo la dirección de la Dra. Mariel Mitidieri, el Dr. Hugo Permingeat y con la valiosa colaboración de la Dra. Valeria Perotti.

Andrea I. Leone

- Tesista –

Mariel S. Mitidieri

- Directora-

Hugo R. Permingeat

- Co-Director -

Defendida: _____

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis doctoral llevó muchos años y tiempo de mi vida, requirió de mucho esfuerzo invertido, no sólo trabajo experimental sino personal. Pase por muchos procesos en todo este tiempo. Desde que lo inicié hasta terminarlo, pasaron aciertos, desaciertos, caídas vueltas a levantar, pérdidas, llegadas, encuentros, desencuentros, crecimiento, tristezas, alegrías. Pero finalmente llegamos a lo que tanto esperamos, el trabajo terminado producto de crecimiento y mucho esfuerzo. El logro no sólo es mío, sino que fue posible gracias al acompañamiento de muchas personas cercanas y no tan cercanas que decidieron confiar en mí, y a las que quisiera dedicarles unas líneas para agradecer desde lo más profundo de mi corazón.

A **Mariel**, mi directora por confiar en mí, por las horas dedicadas en el laboratorio, en su escritorio y de manera virtual. Por buscar todas las maneras para conseguir recursos para llevarlo adelante. Por enseñarme a ser autocrítica, a crear, a razonar, a ver más allá de lo que se ve a primera vista, por los desencuentros y por divertirnos en el proceso.

A **Hugo**, mi co-director por aceptar acompañarme en este desafío para ambos. Gracias por incentivar a que me presentara en cada subsidio y así obtener los recursos para terminar esta Tesis. Gracias porque me enseñaste y dejaste mucho en mi etapa de estudiante, que fue mi motivación para elegirte como co-director. Siempre te vi como un excelente profesional que me transmitió seguridad.

A **Vicky** y **Martín** de EEA INTA San Pedro, que me enseñaron todo lo que sabían y trabajaron a la par mía. Durante el trabajo de laboratorio y de campo, nos fuimos conociendo y se hicieron cercanos.

A **Vale Perotti** quería hacer mención especial. De manera desinteresada me regaló su valioso tiempo para darme una mirada crítica y profesional, aportando siempre lo mejor. Persona hermosa que conocí al hacer esta tesis y que me dejó de enseñanza la solidaridad, y “que se saca agua de las piedras”.

A **Alicia González**, que en paz descansa, quien me acompañó en los análisis estadísticos. Alicia me dejó la pasión por lo que hacía, la curiosidad, las ganas de aprender y de tomar desafíos.

A **Beatriz Masiero** de gran trayectoria como estadística en INTA Marco Juárez, quien colaboró conmigo en los análisis estadísticos y que conocí a través de **Daniel Tuesca**, a quien también le agradezco.

A mis compañeros del laboratorio de Biología molecular, especialmente a **Valen Palmieri** quien siempre me incentivó con una sonrisa y estuvo al pie en cada duda técnica o experimental que tenía. Agradecerles que me dieron un lugar en la mesada de trabajo y en la cámara de -80°C , con lo difícil que es encontrar lugar. Gracias por ese compañerismo cercano.

A mis compañeros de trabajo de la Cátedra de Fruticultura, quienes me acompañaron incentivándome a terminar esta Tesis y sostuvieron el trabajo de la cátedra durante mi licencia en el arduo trabajo de escritura.

A mis amigas por fuera del ámbito laboral quienes me tuvieron paciencia durante este tiempo, especialmente a mi amiga **Dani** que me reemplazó en mi trabajo del vivero, cada vez que me ausentaba por la Tesis. A ella mención especial porque siempre confió en mí y me impulsó siempre a terminarla en los momentos difíciles.

Por último, menciono a las personas más importantes en mi vida. Mis papás, **María Inés y Rafael**, que me dejaron las bases de quien soy, me enseñaron con su modelo la voluntad, la responsabilidad, el esfuerzo, la humildad; **mis hermanos** quienes también me muestran día a día el profesionalismo con que encaran cada proyecto; y a **Germán**, quien me acompaña en mi día a día y siempre me incentivó y recordó en cada momento difícil, el valor y significado de lo que estaba haciendo. A ellos les agradezco la confianza puesta en mí, la cercanía, el estímulo e incentivo a terminar. Y sobre todo la paciencia que conllevó ante semejante desafío y estrés.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones en revista con referato

Leone A., Permingeat H., Mitidieri, M. (2021). "Effect of phosphites on the content of total phenols and chlorogenic acid in peach-*Monilinia fructicola* pathosyste". *Agrociencia Uruguay*. 25 (NE1), Article 404. Disponible en: <http://agrocienciauruguay.uy/ojs/index.php/agrociencia/article/view/404>

Publicaciones en revista sin referato

Leone A., Brambilla V., Barbieri M., Mitidieri M. (2024). "Uso de fosfitos como estrategia de control de Podredumbre morena en durazneros ". *Revista de Fruticultura* N 97: 46 – 53.

Presentaciones a Congresos nacionales e internacionales

Durante el transcurso de esta Tesis se presentaron los siguientes trabajos a Congresos

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; Mitidieri, M." Efecto de la edad del fruto y de tratamientos con fosfitos sobre la infección por *Monilinia fructicola* en frutos de duraznero de la variedad Elegant lady". Congreso. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Facultad Ciencias Agrarias UNL. Santa Fe. 2016.

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; Mitidieri, M. "Efecto de la edad del fruto y de tratamientos con fosfitos sobre la infección por *Monilinia fructicola* en frutos de duraznero de la variedad Flordaking". Congreso. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Facultad Ciencias Agrarias UNL. Santa Fe. 2016.

Mitidieri, M.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Piris, E; Verón, R.; Celié, R.; Arpía, E.; **Leone, A.**; Barbosa, R. "Evaluación de aplicaciones preventivas con fosfitos de calcio y potasio para el control de podredumbre morena en duraznos". I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha: IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha. Concordia. Entre Rios. 2017.

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; Mitidieri, M. "Efecto de los fosfitos sobre cambios en la susceptibilidad a podredumbre morena en frutos de durazno cv. Elegant

lady". XX Congreso y XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2018.

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; Mitidieri, M. "Cambios en la susceptibilidad a podredumbre morena en frutos de durazno cv. Flordaking tratados con fosfitos en post-cosecha". XX Congreso y XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2018.

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; González, A.; Mitidieri, M. "Efecto de los fosfitos sobre el crecimiento "in vitro" de podredumbre morena". XXII Jornadas de Ciencia y Técnica- Divulgación de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR. Rosario. 2018.

Leone, A.; Barbieri, M.; Piris, E.; Brambilla, V.; Mitidieri, M. "Cambios en la susceptibilidad a podredumbre morena en frutos de durazno tratados con fosfitos." XXII Jornadas de Ciencia y Técnica- Divulgación de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR. Rosario. 2018.

Leone, A.I.; Permingeat, H.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Contenido de fenoles totales y ácido clorogénico en piel de frutos de durazno cv. Elegant Lady tratados con fosfitos". VIII Encuentro Latinoamericano Prunus Sin Fronteras. Montevideo. Uruguay. 2019.

Leone, A.I.; Permingeat, H.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Efecto de fosfitos sobre el contenido de fenoles totales y ácido clorogénico en piel de frutos de duraznero cv. Flordaking". VIII Encuentro Latinoamericano Prunus Sin Fronteras. Montevideo. Uruguay. 2019.

Leone, A.; Permingeat, H.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Inhibición de la germinación "in vitro" de conidios de *Monilinia fructicola* ante dosis crecientes de fosfito de calcio". 5º Congreso Argentino de Fitopatología: 59º Reunión APS División Caribe. Modalidad virtual. 2021.

Leone, A.; Permingeat, H.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Inhibición de la germinación "in vitro" de conidios de *Monilinia fructicola* ante dosis crecientes de fosfito de potasio". 5º Congreso Argentino de Fitopatología: 59º Reunión APS División Caribe. Modalidad virtual. 2021.

Leone, A.I.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Efecto de fosfitos de potasio y calcio sobre la calidad postcosecha de duraznos cv. Flordaking". IX Encuentro Latinoamericano

Prunus Sin Fronteras. Jujuy. 2022.

Leone, A.I.; Brambilla, V.; Barbieri, M.; Mitidieri, M. "Uso de fosfitos y su efecto sobre la calidad poscosecha en *Prunus persica* cv. Elegant lady ". IX Encuentro Latinoamericano Prunus Sin Fronteras. Jujuy. 2022.

INDICE

INDICE.....	I
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCION GENERAL.....	1
1.1. Importancia del cultivo de duraznero a nivel mundial y en la Argentina.....	1
1.2. Zonas productoras en Argentina y situación actual del cultivo del duraznero	3
1.3. Principales enfermedades que afectan el duraznero en la República Argentina.....	5
1.3.1. Enfermedades causadas por bacterias	6
1.3.2. Enfermedades causadas por hongos.....	6
1.4. Podredumbre morena (<i>Monilinia fructicola</i>).....	9
1.4.1. Síntomas y signos de la enfermedad	10
1.4.2. Ciclo de la enfermedad	11
1.4.3. Condiciones predisponentes	12
1.4.4. Manejo integrado de la enfermedad	13
1.4.5. Estrategias de control alternativas	15
1.5. Resistencia a fitopatógenos	16
1.5.1 Defensas constitutivas o no inducidas	17
1.5.2. Defensas activadas o inducidas	18
1.6. Inductores abióticos de resistencia: Fosfitos	19
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
CAPITULO I	23
EFFECTO DE FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO SOBRE LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS Y EL CRECIMIENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>M. fructicola</i>	23
2.1. INTRODUCCIÓN	23
2.2. MATERIALES Y METODOS.....	24
2.2.1. Aislamiento del patógeno	24
2.2.2. Cultivos monospóricos.....	24
2.2.3. Identificación molecular de <i>M. fructicola</i>	25
2.2.4. Efectividad <i>in vitro</i> de los fosfitos sobre el crecimiento micelial de <i>M. fructicola</i>	26
2.2.4.1. Análisis estadístico.....	28
2.2.5. Efectividad <i>in vitro</i> de los fosfitos sobre la geminación de conidios de <i>M. fructicola</i> ,	

mediante la técnica de microdilución en caldo.....	28
2.2.5.1. Preparación del Inóculo.....	28
2.2.5.2. Preparación del medio de cultivo líquido caldo papa dextrosa (PDB).....	29
2.2.5.3. Preparación de las soluciones de trabajo.....	29
2.2.5.4. Técnica de microdilución en caldo.....	30
2.2.5.5. Análisis estadístico.....	31
2.3. RESULTADOS	31
2.3.1. Identificación molecular de <i>M. fructicola</i>	31
2.3.2. Efectividad <i>in vitro</i> de los fosfitos sobre el crecimiento micelial de <i>M. fructicola</i>	32
2.3.3. Efectividad <i>in vitro</i> de los fosfitos sobre la geminación de conidios de <i>M. fructicola</i> , mediante la técnica de microdilución en caldo.....	38
2.3.3.1. Caracterización cualitativa de la actividad microbiana ante tratamientos.....	38
2.3.3.2. Unidades formadoras de colonias	39
2.4. DISCUSIÓN.....	41
2.5 CONCLUSIONES	42
CAPITULO II	44
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>M. fructicola</i>, EN DISTINTAS ETAPAS DEL CRECIMIENTO DEL FRUTO.	44
3.1 INTRODUCCION	44
3.2. MATERIALES Y METODOS.....	45
3.2.1. Experimento poscosecha	46
3.2.2. Experimento precosecha	47
3.2.3. Análisis estadístico	48
3.3. RESULTADOS	48
3.3.1. Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en 'Flordaking'	48
3.3.2. Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en cultivar Elegant Lady	54
3.3.3. Relación de la enfermedad con las variables climáticas	63
3.4. DISCUSIÓN.....	71
3.5. CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO III.....	76
EXPRESIÓN DE COMPUESTOS ASOCIADOS A MECANISMOS DE RESISTENCIA INDUCIDA A <i>M. fructicola</i>, EN FRUTOS DE DURAZNERO POSTERIOR A APLICACIONES DE FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO	76

4.1. INTRODUCCION	76
4.2. MATERIALES Y METODOS.....	77
4.2.1. Inóculo y material vegetal	77
4.2.2. Aplicación de tratamientos a campo	78
4.2.3. Determinación del contenido de metabolitos relacionados con los mecanismos de resistencia	78
4.2.3.1. Diseño del experimento.....	78
4.2.3.2. Determinación de fenoles totales	79
4.2.3.3. Determinación de ácido clorogénico (ACG).....	79
4.2.3.4. Análisis estadístico.....	80
4.2.4. Evaluación comparativa de actividad enzimática antioxidante (PPO, POD), relacionada con los mecanismos de resistencia	80
4.2.4.1. Diseño del experimento.....	80
4.2.4.2. Extracción enzimática	81
4.2.4.3. Actividad PPO	81
4.2.4.4. Actividad POD.....	82
4.2.4.5. Análisis estadístico.....	82
4.3. RESULTADOS	82
4.3.1. Determinación de fenoles totales y ACG en pulpa de frutos.	82
4.3.1.1. Cultivar Flordaking	82
4.3.1.2. Cultivar Elegant Lady	86
4.3.2. Determinación de fenoles totales y ACG en piel de frutos.	89
4.3.2.1. Cultivar Flordaking	89
4.3.2.2. Cultivar Elegant Lady	92
4.3.3. Actividad enzimática antioxidante relacionada con los mecanismos de resistencia	95
4.3.3.1. Actividad PPO	95
4.3.3.2. Actividad (POD)	99
4.4. DISCUSIÓN	102
4.5. CONCLUSIONES	106
CAPITULO IV	108
EFFECTO DE TRATAMIENTOS CON FOSFITOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN CON FUNGICIDA SOBRE EL DESARROLLO DE PODREDUMBRE MORENA Y CALIDAD POSCOSECHA DE FRUTOS	108
5.1. INTRODUCCION	108

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
5.2.1. Diseño del experimento y descripción de los tratamientos.....	110
5.2.2. Cosecha y variables a analizar	111
5.2.3. Determinaciones analíticas.....	111
5.2.4. Análisis estadístico	112
5.3. RESULTADOS	113
5.3.1. Efecto de tratamientos precosecha sobre el desarrollo de podredumbre morena en poscosecha	113
5.3.1.1. Cultivar Flordaking	113
5.3.1.2. Cultivar Elegant Lady	115
5.3.2. Efecto de tratamientos precosecha sobre parámetros calidad poscosecha	120
5.3.2.1. Cultivar Flordaking	120
5.3.2.2. Cultivar Elegant Lady	126
5.4. DISCUSIÓN.....	134
5.5. CONCLUSIONES	136
CAPITULO V	139
EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL DE LOS FOSFITOS.....	139
6. 1. INTRODUCCIÓN	139
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
6.3. RESULTADOS	143
6.4. CONCLUSIONES	146
7. CONCLUSIONES GENERALES	147
8. BIBLIOGRAFIA	148
ANEXO I.....	I
ANEXO II.....	VII

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad	FV: fruto verde
ACG: ácido clorogénico	g: gramos
AI: antes de la inoculación	g/L: gramos por litro
AIC: criterio de información de Akaike	°C: grados celsius
ANOVA: análisis de la variancia	H: herida
APG: agar papa glucosado	H°: ángulo de tono
B: toxicidad en insectos benéficos	h: hora
BCA: bloques completos aleatorizados	ha: hectárea
Cs: cosecha	HR: humedad relativa
CA: ácido cafeico	H ₃ PO ₃ : ácido fosforoso
C: croma	H ₃ PO ₃ : ácido fosforoso
C. toxicidad crónica	%I: porcentaje de inhibición
Ca: calcio	IA: impacto ambiental
CAT: catalasa	In: inoculación
CGA: ácido clorogénico	ISR: resistencia sistémica inducida
cm: centímetros	K: potasio
CMI: concentración mínima inhibitoria	L: luminosidad
cc/hl: centímetros cúbicos por hectolitro	L: lixiviación potencial
CS: suspensión encapsulada	LSD: mínima diferencia significativa
CV: coeficiente de variación	mg/mL: miligramos por mililitro
D: toxicidad en aves	mm: milímetros
DC: días de cosecha	mM: milimolar
DDPF: días después de plena floración	mL: mililitros
DI: días de inoculación	µL: microlitros
DT: toxicidad dérmica	µg/mL: microgramo por mililitro
FFCA: fosfito de calcio	µg/gpf: microgramo por gramo de peso fresco
EC: endurecimiento de carozo	MIP: Manejo Integrado de Plagas

EF: estado fenológico
EIQ: Environmental Impact Quotient
EIQc: coeficiente de impacto ambiental a campo
ENS: ensayo
FFK: fosfito de potasio
nm: nanómetro
Na₂CO₃: carbonato de sodio
Na₂MoO₄: molibdato de sodio
P: vida media en la superficie vegetal
p: probabilidad
P: fósforo
p.a.: principio activo
PCR: Polymerase Chain Reaction
PC: pasada de cosecha
POD: peroxidasa
PDB: caldo de papa y dextrosa
PPO: polifenoloxidasas
P₂O₅: pentaóxido de fósforo
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVPP: polivinilpolipirrolidona
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5 difeniltetrazolium
R: pérdida superficial potencial
rpm: revoluciones por minuto
Rep: repetición
ROS: Reactive Oxygen Species
S: vida media en el suelo
SAR: Systemic Acquired Resistance
SST: sólidos solubles totales
SY: Sistemicidad
Sup: superficie
T: testigo
t: tiempo de incubación
TDI: tiempo de inoculación
Tr: tratamiento
T° max: temperatura máxima
T° min: temperatura mínima
Tox: toxicidad
UFC: unidades formadoras de colonia
U/mg: unidades de enzima por miligramo
Z: toxicidad en abejas

RESUMEN

“MANEJO DE LA PODREDUMBRE MORENA (*Monilinia fructicola*) EN DURAZNERO A TRAVÉS DEL USO DE FOSFITOS COMO ACTIVADORES DE RESISTENCIA Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA”

La podredumbre morena causada por *Monilinia fructicola* (G.Winter) honey es una enfermedad muy destructiva en cultivos comerciales de frutales de carozo en el mundo y en la Argentina. Genera pérdidas directas ante la infección de flores y podredumbre de frutos en pre y poscosecha, así como pérdidas indirectas debidas al alto costo de aplicación de fungicidas durante el período de floración y de desarrollo de frutos hasta la poscosecha. Tradicionalmente, el control de enfermedades en cultivos frutales a lo largo del mundo depende del uso de fungicidas, pero esta práctica es cada vez menos aceptable por parte de los consumidores, ya que ocasionan daños al medio ambiente y a la salud humana.

Las nuevas estrategias de manejo incluyen el uso de inductores de resistencia como fosfatos de potasio, sodio o magnesio, fosetil aluminio, ácido salicílico, acibenzolar s-metílico, quitosano, silicato de potasio y fosfitos entre otros.

En el cultivo de duraznero, los tratamientos preventivos con activadores de resistencia, como fosfitos de potasio y calcio, reducen el crecimiento del patógeno y reducen la susceptibilidad del hospedante a *M. fructicola*. Estos activadores, mejoran la calidad post cosecha del fruto. Por lo tanto, la presente investigación se llevó a cabo con los siguientes objetivos: 1) Evaluar el efecto de fosfitos de potasio y calcio sobre el crecimiento y reproducción de *M. fructicola*; 2) Determinar el efecto de los tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la expresión de síntomas frente a la infección por *M. fructicola* en distintas etapas del crecimiento del fruto 3) Determinar el efecto de los tratamientos con fosfitos sobre la expresión de compuestos asociados a mecanismos de resistencia inducida a *M. fructicola*, en distintas etapas del crecimiento del fruto y en distintos cultivares de duraznero; 4) Evaluar el efecto de tratamientos precosecha con fosfitos y fosfitos en mezcla con fungicidas, sobre el desarrollo poscosecha de podredumbre morena y caracterizar el efecto de los tratamientos mencionados, sobre parámetros de calidad poscosecha de frutos; 5) Evaluar el impacto ambiental de diferentes estrategias de control incluyendo la aplicación de fosfitos.

Para evaluar el efecto de fosfitos sobre el crecimiento del patógeno se llevaron a cabo experimentos *in vitro* donde se probaron diferentes dosis de fosfito de potasio (FFK: 0,1%, 0,2% y 0,3%) y de calcio (FFCA: 0,1%, 0,2% y 0,3%). Previamente se aislaron diferentes cepas de *M. fructicola* a las que se les hizo estudio molecular mediante PCR. Los fosfitos se evaluaron

mediante el porcentaje de inhibición del tratamiento respecto al testigo. Para evaluar la efectividad sobre la germinación de conidios se utilizó la técnica de microdilución en caldo, en la cual se probaron ocho diluciones de ambos fosfitos, un testigo químico y un testigo con agua. Se midió la efectividad de los tratamientos sobre la germinación mediante el porcentaje de inhibición de unidades formadoras de colonias.

Para evaluar el efecto de los fosfitos sobre la expresión de síntomas, se cosechó fruta desde un mes de plena floración a cosecha en dos cultivares de duraznero, Flordaking y Elegant lady. Una vez cosechados se los pulverizó con diferentes dosis de fosfitos de potasio y calcio (0,1%, 0,2% y 0,3%) en laboratorio, y se incluyó un control negativo tratado con agua. A la mitad de los frutos se los inoculó con una suspensión de conidios (10^5 - 10^6) de *M. fructicola* con micropipeta en la zona de la sutura; mientras que a la otra mitad se le practicó una herida a una profundidad de 2 mm con un punzón estéril, previo a ser sumergido en la misma solución de conidios. Las variables analizadas fueron incidencia y severidad a los 3 y 7 días de inoculación, en cada muestreo o cosecha. Este experimento se repitió con aplicaciones de fosfitos en precosecha (pulverización en planta).

Para evaluar el efecto de los fosfitos sobre la expresión de compuestos asociados a los mecanismos de resistencia se midió fenoles totales y ácido clorogénico (ACG) en pulpa y piel de ambos cultivares de duraznero en tres estados fenológicos: fruto verde (FV), endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs). En las experiencias en las que se extrajeron metabolitos de la piel, se inocularon los frutos con una suspensión de conidios de *M. fructicola*; y se determinó la concentración de los mencionados metabolitos a 6 h de la inoculación. Se midió también actividad enzimática polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) en piel de frutos de ambos cultivares en dos estados fenológicos (EC y Cs) a tiempo 0 (sin inóculo) y a 6, 24 y 48 h de inoculados con una suspensión de conidios de *M. fructicola*. El contenido de fenoles totales y de ACG se expresó en $\mu\text{g/gpf}$ y las actividades enzimáticas en U/mg proteína.

Se hicieron también experimentos donde se evaluó el efecto de los fosfitos solos y en combinación con fungicidas sobre el desarrollo poscosecha de podredumbre morena y sobre parámetros de calidad poscosecha. Las aplicaciones de los tratamientos se hicieron a 30, 15 y 7 días antes de cosecha. Para esto se midió la incidencia y severidad de la enfermedad a 3 y 7 días de cosechado. También se cosecharon 20 frutos/tratamiento/repetición y se les evaluó color con colorímetro midiendo los valores CIE $L^*a^*b^*$ y calculando también los parámetros ángulo de tono ($H = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) y croma o saturación ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$); peso, calibre, firmeza con penetrómetro y sólidos solubles totales (SST) con un refractómetro.

Finalmente, para evaluar el impacto ambiental de los fosfitos se utilizó el Coeficiente de Impacto

Ambiental (EIQ), bajo tres estrategias fitosanitarias para el control de *M. fruticola*.

En los experimentos *in vitro* los fosfitos de potasio (FFK) en sus dosis más altas (0,2% y 0,3%) y fosfitos de calcio (FFCA) 0,3% resultaron ser más efectivos para inhibir el crecimiento del hongo. Los fosfitos de potasio fueron más efectivos que los fosfitos de calcio. Las diferentes cepas respondieron de manera diferente ante los fosfitos. Se encontró una concentración mínima inhibitoria (CMI) con fosfito de potasio al 0,5%, no así con el fosfito de calcio. Se requirieron dosis más altas de fosfitos para inhibir germinación de conidios respecto al crecimiento micelial del hongo.

En la evaluación de expresión de síntomas, ambos experimentos (poscosecha y precosecha) arrojaron diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo del fruto en ambos cultivares ante la infección con *M. fruticola*. También se manifestó diferencias entre frutos heridos y no heridos. 'Flordaking' presentó mayor predisposición a enfermarse con podredumbre morena en estado de cosecha, mientras que esa predisposición disminuyó al final del periodo de endurecimiento de carozo. Por otro lado, 'Elegant lady' manifestó un comportamiento más variable en la predisposición a la infección. Sin embargo, la susceptibilidad a podredumbre morena fue elevada en periodo de maduración del fruto. En la etapa de endurecimiento de carozo, fue variable su predisposición a contraer enfermedad con un pico entre los 73 y 75 días después de plena floración (DDPF), que se repitió en los diferentes años con condiciones climáticas diferentes. Los fosfitos arrojaron resultados variables en ambos cultivares; sin embargo, los FFK en sus tres dosis y FFCA 0,3% manifestaron mayor efectividad en 'Flordaking' a finales del periodo de endurecimiento del carozo y durante la etapa de maduración con valores de incidencia y severidad entre un 20 y un 15% menos respecto al testigo a 90 y 95 DDPF. 'Elegant lady' manifestó mayor efectividad de los FFK 0,2%, FFK 0,3% y FFCA 0,3% en periodo de endurecimiento de carozo, para la variable incidencia.

Ante la aplicación de fosfitos 'Flordaking' respondió con aumento de fenoles totales, e inducción de actividad enzimática PPO en ausencia del patógeno y a 6 h de inoculado, en estado de cosecha con aplicaciones de FFCA 0,3%. Por otro lado, en presencia de inóculo el ACG cayó en todos los tratamientos y estados de desarrollo, salvo FFCA 0,3% en EC. Además, indujo actividad POD a 6h de inoculación ante tratamientos de FFK 0,3%. 'Elegant lady' mostró una disminución de fenoles totales y un aumento de ACG en los estados de EC y Cs en respuesta a *M. fruticola*. La PPO y la POD no indujeron actividad ante aplicaciones de fosfitos.

Los tratamientos con fosfitos solos y en combinación con fungicida no arrojaron diferencias ante el desarrollo de la enfermedad en ninguno de los dos cultivares, sin embargo, se evidenció una clara tendencia de mayor efectividad de los FFK 0,3% en combinación con fungicidas. Estos

resultados quizás podrían mejorarse con el agregado de un coadyuvante.

Los fosfitos no tuvieron efecto sobre el color de piel para ninguno de los dos cultivares. Los tratamientos con fungicidas solos o en combinación con FFCa aumentaron los SST en frutos de ambos cultivares. Además, la combinación de FFCa + fungicidas mejoraron el peso de frutos 'Florfaking'. La combinación FFCa + fungicida tuvo mejores resultados como bioestimulantes que el FFK y manifestó mayor respuesta en el cultivar Flordaking, respecto a 'Elegant lady'.

A partir de esta investigación se puede confirmar el efecto directo de los fosfitos sobre el crecimiento de *M. fructicola in vitro*. Es escasa la información existente sobre el efecto de los fosfitos en el patosistema *M. fructicola* – *Prunus persica* (duraznero). Aplicaciones preventivas de fosfitos en poscosecha no afectan la curva de susceptibilidad del hospedante ante *M. fructicola*, pero podrían disminuir la expresión de síntomas en frutos en estado de cosecha y podrían tenerse en cuenta en planta de empaque dando protección al fruto frente a la enfermedad durante el almacenamiento. Por otro lado, el FFCA 0,3% podría presentar efecto indirecto sobre el hospedante al expresar compuestos asociados a los mecanismos de resistencia inducida, aunque no alcanza para contrarrestar la enfermedad.

El valor de impacto ambiental de las diferentes estrategias evaluadas fue muy bajo. El EIQ inicial de los FFK es menor al del Tebuconazole, debido al bajo riesgo al aplicador, consumidor y ecológico.

Dentro de un sistema productivo sustentable, los fosfitos podrían ser una alternativa de bajo impacto ambiental y a la salud humana, a tener en cuenta dentro del calendario de control bajo una estrategia de manejo integrado.

Palabras clave: *Monilinia fructicola*; inductores químicos; fosfitos; calidad poscosecha.

ABSTRACT

MANAGEMENT OF BROWN ROT (*Monilinia fructicola*) IN PEACHES THROUGH THE USE OF PHOSPHITES AS RESISTANCE ACTIVATORS AND ITS EFFECT ON POST-HARVEST QUALITY

Brown rot caused by *Monilinia fructicola* (G.Winter) honey is a very destructive disease in commercial stone fruit crops in the world and in Argentina. It generates direct losses due to the infection of flowers and rotting of fruits pre- and post-harvesting; and indirect losses, due to the high cost of applying fungicides during the period of flowering and fruit development until post-harvest.

Furthermore, it causes marketing problems that had intensified from the moment this pathogen became a quarantine disease for the European Union and Chile as well. Traditionally, the control of diseases in fruit crops throughout the world depended on the use of fungicides, but this practice is less acceptable by consumers, since it causes damage to the environment and the human health, as well.

New management strategies include the use of resistance inducers such as potassium, sodium or magnesium phosphates, aluminum fosetyl, salicylic acid, s-methyl acibenzolar, chitosan, potassium silicate and phosphites among others. In the peach crop, preventive treatments with resistance activators, such as potassium and calcium phosphites, have been demonstrated to reduce the growth of the pathogen and to reduce the host's susceptibility to *Monilinia fructicola*. These activators improve the post-harvest quality of the fruit.

Therefore, the present investigation was carried out with the following objectives: 1) to evaluate the effect of potassium and calcium phosphites on the growth and reproduction of *M. fructicola*; 2) to determine the effect of treatments with potassium and calcium phosphites on the expression of symptoms against *M. fructicola* infection at different stages of fruit growth; 3) to determine the effect of phosphites treatments on the expression of compounds associated with induced resistance mechanisms to *M. fructicola*, at different stages of fruit growth and in different peach cultivars; 4) to evaluate the effect of preharvest treatments with phosphites and phosphites mixed with fungicides on the postharvest development of brown rot and to characterize the effect of the aforementioned treatments on postharvest fruit quality parameters; 5) to evaluate the environmental impact of different control strategies including phosphites application.

To evaluate the effect of phosphites on the growth of the pathogen, "*in vitro*" experiments were

carried out with different doses of potassium phosphite (0.1%, 0.2% and 0.3%) and calcium phosphite (0.1%, 0.2% and 0.3%). To achieve this, different strains of *Monilinia fruticola* were previously isolated, and then subjected to molecular studies through PCR.

The phosphites were evaluated by the percentage of inhibition of the treatment with respect to the control. To evaluate the effectiveness on the germination of conidia, the broth microdilution technique was used, in which eight dilutions of both phosphites were tested, together with a chemical control and a water control. The effectiveness of the treatments on germination was measured by the percentage of inhibition of colony-forming units. To evaluate the effect of phosphites on the expression of symptoms, fruit was harvested from one month of full bloom to harvest in two different varieties of peach trees, 'Flordaking' and 'Elegant lady'.

Once harvested they were sprayed with different doses of potassium and calcium phosphites (0.1%, 0.2% and 0.3%) in the laboratory, and negative control treated with water was included. Half of the fruits were inoculated with conidia suspension (10^5 - 10^6) of *M. fructicola* with a micropipette in the suture area; while in the other half a 2 mm-depth wound was performed with a sterile awl, prior to being submerged in the same conidia solution. The variables analyzed in each sampling or harvest were severity and incidence of rot at 3 and 7 days of inoculation. This experiment was repeated with pre-harvest applications of phosphites (plant spraying).

To evaluate the effect of phosphites on the expression of compounds associated with resistance mechanisms, total phenols and chlorogenic acid (CGA) were measured in pulp and skin of both cv. peach tree in three phenological stages: green fruit (GF), stone hardening (SH) and harvest (H).

In the experiences in which metabolites were extracted from the skin, the fruits were inoculated with a suspension of conidia from *M. fructicola*; and the concentration of both the mentioned metabolites was determined 6 h after inoculation. Polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) enzymatic activities were also measured in the skin of fruits of both cultivars in two phenological stages (SH and H) at time 0 (without inoculum) and at 6, 24 and 48 h after inoculation with a suspension of conidia from *M. fructicola*. The content of total phenols and CGA was expressed in $\mu\text{g/gpf}$ and the enzymatic activities in U/mg protein.

The effect of phosphites alone and in combination with fungicide on the postharvest development of brown rot was evaluated. Compound applications were made 30, 15 and 7 days before harvest. For this, the incidence and severity of the disease was measured 3 and 7 days after harvesting. 20 fruits/treatment/replication were also harvested and their color was evaluated with a colorimeter by measuring the CIE $L^*a^*b^*$ values and also calculating the hue angle ($H = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) and chroma or saturation parameters ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$); weight, size, firmness with a

penetrometer and total soluble solids (TSS) with a refractometer.

Finally, to evaluate the environmental impact of phosphites, the Environmental Impact Coefficient (EIQ) was used, under three plant health strategies for the control of *M. fructicola*.

In the "*in vitro*" experiments, potassium phosphites in their highest doses (0.2% and 0.3%) and 0.3% calcium phosphites turned out to be more effective inhibiting the growth of the fungus. Potassium phosphites were more effective than calcium phosphites.

Different strains responded differently to phosphites. A minimum inhibitory concentration (MIC) was found with 0.5% potassium phosphite, but not with calcium phosphite. Higher doses of phosphites were required to inhibit fungal sporulation relative to fungal growth. In the evaluation of symptom expression, both experiments (postharvest and preharvest) yielded significant differences between the different stages of fruit development in both cultivars before infection with *M. fructicola*. There were also differences between injured and uninjured fruits.

'Flordaking' presented a greater predisposition to disease with brown rot in the harvest stage, while this tendency decreased at the end of the stone-hardening period. On the other hand, 'Elegant lady' showed a more variable behavior in predisposition to infection. However, the susceptibility to brown rot was high during the ripening period of the fruit. In the stone-hardening stage, their predisposition to contracting the disease was variable, with a peak between 73 and 75 DDPF, which was repeated in different years with different climatic conditions.

The phosphites gave variable results in both cultivars; however, FFK in its three doses and FFCA 0.3% showed greater effectiveness in 'Flordaking' at the end of the stone hardening period and during the maturation stage with incidence and severity values between 20 and 15% less compared to the control at 90 and 95 DDPF. 'Elegant lady' showed greater effectiveness of FFK 0.2%, FFK 0.3% and FFCA 0.3% in the stone hardening period, for the variable incidence.

Before phosphites application 'Flordaking' responded with an increase in total phenols, and induction of PPO enzymatic activity in the absence of the pathogen and 6 h after inoculation, in the harvest state with applications of 0.3% FFCA. On the other hand, in the presence of inoculum the GCA fell in all treatments and stages of development, except FFCA 0.3% in EC. Furthermore, it induced POD activity after 6 hours of inoculation with 0.3% FFK treatments. 'Elegant lady' showed a decrease in total phenols and an increase in ACG in the EC and Cs states in response to *M. fructicola*. PPO and POD did not induce activity when phosphites were applied.

Treatments with phosphites alone and in combination with fungicide did not show differences in the development of the disease in either of the cultivars. However, there was a clear trend for greater effectiveness of FFK in combination with fungicides. These results could perhaps be improved with the addition of an adjuvant.

The phosphites had no effect on skin color in either cultivar. Treatments with fungicides alone or in combination with FFCa increased TSS in fruits of both cultivars. Furthermore, the combination of FFCa + fungicides improved the weight of 'Florfaking' fruits. The FFCa + fungicide combination had better results as biostimulants than FFK and showed a greater response in the Flordaking cultivar, compared to 'Elegant lady'.

From this research, the direct effect of phosphites on *M. fructicola* in vitro growth can be confirmed. There is little information of phosphites effect on *M. fructicola* – *Prunus persica* (peach) pathosystem. Preventive applications of phosphites in postharvest do not affect the susceptibility curve of the host to *M. fructicola*, but could reduce the expression of symptoms in fruits at harvest stage and could be taken into account in the packing plant, giving protection to the fruit against the disease during the storage. On the other hand, 0.3% FFCA could present an indirect effect on the host by expressing compounds associated with induced resistance mechanisms, although it is not enough to counteract the disease.

The environmental impact value of the different strategies evaluated was very low. The initial EIQ of FFK is lower than that of Tebuconazole, due to the low risk to the applicator, consumer and ecology.

Within a sustainable production system, phosphites could be an alternative with low environmental and human health impact, to be taken into account within the control schedule under an integrated management strategy.

Keywords: *Monilinia fructicola*, chemical inducers, phosphites, post-harvest quality.

1. INTRODUCCION GENERAL

El duraznero, es un árbol frutal caducifolio perteneciente al orden Rosales, familia Rosáceas, subfamilia Prunoideas, e integra junto a otras especies, los frutales de carozo.

Su nombre científico, *Prunus persica* (L.) Batsch, sugiere que sería originario de Persia lo que actualmente se conoce como Irán, pero ya en la literatura China del 2000 A.C. se hacían descripciones de sus flores y frutos maduros, por lo cual, hoy es aceptado que su origen está en dicho país (Pinzón *et al.*, 2014). Probablemente, fue llevado de China a Persia por caravanas de comerciantes y luego pasó rápidamente a Europa (Westwood, 1982). En el siglo XVI ya se encontraba en México traído por los españoles (Pinzón *et al.*, 2014).

Dentro de la especie se pueden distinguir tres formas botánicas: *vulgaris*, duraznero; *leavis*, nectarina; *platycarpa*, paraguay. Las nectarinas y paraguayos son derivados mutagénicos del duraznero, caracterizándose por ausencia de pilosidad del fruto en el primer caso, y por forma aplastada del fruto en el segundo (Gariglio *et al.*, 2014).

El cultivo de esta especie se encuentra distribuido en todas las zonas templadas del mundo entre los 30° y 40° de latitud norte y sur (Baíza Abelar, 2004); con existencia de gran cantidad de variedades que fluctúan, según los requerimientos de frío invernal, entre 600 hasta 1500 horas de frío (Gariglio *et al.*, 2014). Por otra parte, debido a un intenso trabajo de mejoramiento, se viene ampliando el rango de variedades a bajos (200-450 horas) y muy bajos requerimientos de frío (menos de 100 horas), de manera que su cultivo en la actualidad llega a zonas de climas subtropicales (Fabiane, K., 2011; García *et al.*, 2014).

1.1. Importancia del cultivo de duraznero a nivel mundial y en la Argentina

La producción mundial de duraznos alcanzó 21.751.000 toneladas en el año 2019-2020 (Ernst, 2020). El principal productor es China, que en el año 2008 superó los 10 millones de toneladas (Pagliaricci y Ángel, 2012; Ernst, 2020). Durante el 2015 la producción argentina de duraznos fue de 266.000 toneladas (Dansa, 2016), mientras que en los años 2019-2020 Argentina ocupaba el quinto lugar a nivel mundial con una producción de 226 mil toneladas anuales (Ernst, 2020) (Figura I).

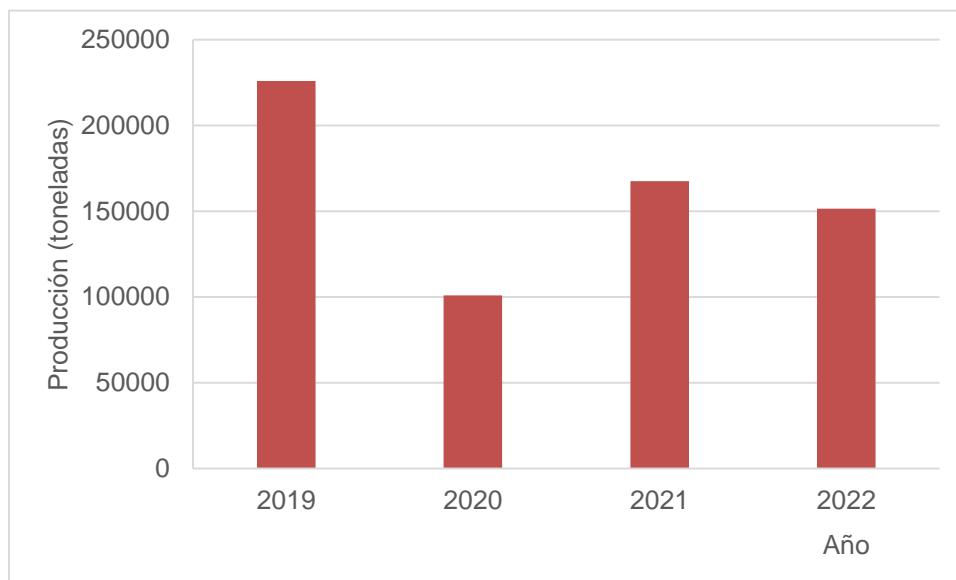


Figura I. Evolución de la producción argentina de durazno (toneladas). Período 2019-2022.
Fuente: FAO STAT (<https://www.fao.org/faostat/es/#home>).

La República Argentina, según datos del Censo Nacional Agropecuario (INDEC, 2018) posee una superficie implantada con durazneros de 19.307,4 ha, cifra que incluye variedades para consumo en fresco y para industria. El 52 % se destina a la industrialización y el 48 % para consumo en fresco.

Argentina es el primer productor de duraznos del Mercosur y se encuentra entre los principales oferentes del Hemisferio Sur, logrando que sus productos ingresen en los mercados septentrionales en contra-estación (Ernst, 2020). Durante el 2008, Argentina exportó más de 12,5 mil toneladas de durazno, colocándose en el décimo sexto lugar entre los exportadores a nivel mundial y segundo en Sudamérica, después de Chile (Pagliaricci y Angel, 2012). Sin embargo, durante el período 2011-2015, las estadísticas muestran que las exportaciones de este producto se mantuvieron relegadas (Dansa, 2016). Durante el 2020, la Argentina exportó 2.3 mil toneladas de durazno fresco, cuyos principales destinos fueron Brasil, Paraguay y Bolivia. Por otro lado, además de ofrecer sus productos a los países del Mercosur, se suman las demandas del Reino Unido, España y de los Países Bajos (Figura II) (Dansa, 2016). Argentina además es el cuarto productor y exportador a nivel mundial de duraznos en conserva (Ernst, 2020).



Figura II. Principales destinos de las exportaciones argentinas de duraznos en 2015. Fuente: DMA Área Frutas según datos del INDEC.

En cuanto a la importación, la participación de Argentina fue incipiente con 93 toneladas durante 2008, a diferencia de lo ocurrido durante la década de los `90 donde las importaciones alcanzaron un volumen cercano a 3 mil toneladas (Pagliaricci y Angel, 2012).

1.2. Zonas productoras en Argentina y situación actual del cultivo del duraznero

La superficie total con durazneros se distribuye espacialmente en 9 provincias. Mendoza abarca la mayor superficie del país con 13.346,2 ha y representa el 69 % a nivel nacional, le sigue en importancia Buenos Aires con 1.865,9 ha y el 10%, luego Salta (suma 1.588,9 ha y el 8%) y Río Negro (con 1.278,2 ha y el 7 %). Con menor superficie y representatividad de encuentran Jujuy (286,3 ha), Neuquén (217,2 ha), Santa Fe (205 ha), La Rioja (197,9 ha) y Catamarca (119,6 ha), en conjunto suman 1.026 ha y representan cada uno un 1 % del total. Finalmente, el resto de las provincias con escasa superficie suman 202,2 ha y aportan un 1% al total.

La región Bonaerense, constituida por la provincia de Buenos Aires y sur de Santa Fe, cultiva duraznos tempranos, semi-tempranos y nectarinas, ciruelos japoneses y europeos; especializándose en la producción de fruta para consumo en fresco, favorecida por la cercanía a los grandes centros de consumo y disposición de buenas vías de comunicación (Angel y López Serrano, 2014). El territorio no presenta condiciones ambientales ideales para el cultivo del duraznero, debido a la alta humedad relativa (mayor 65%) y precipitaciones de 1061,3 mm anuales, ambos factores determinantes para la presencia de enfermedades fúngicas y bacterianas que afectan a los *Prunus spp.* Aun así, la tecnología aplicada permite obtener rendimiento y producción de excelente calidad que compite con otras zonas productoras del país (Angel y López Serrano, 2014).

El sector se encuentra en crisis, con niveles de producción y calidad fluctuantes a través del tiempo y grandes pérdidas postcosecha (Ministerio de la Producción- Gobierno de Santa Fe, 2010). Sumado a esto, en los últimos años hubo una reducción de la superficie plantada con frutales. Sin embargo, algunos indicadores nos permiten ser optimistas ante esta situación, en especial en cultivos de duraznero, donde las empresas continúan renovando las plantaciones que van envejeciendo, por cultivares adaptados a las condiciones agroecológicas de la región y más demandados en el mercado consumidor (Angel y López Serrano, 2014; Valentini *et al.*, 2021). La mayor parte de la superficie plantada en el noreste de la provincia de Buenos Aires comprende a los cultivares Flordaking, June Gold, Ginart, Flavorcrest, Forastero; Flamecrest; Red Globe, Dixiland, Fayette y Late Dwarf. También se cultivan otros cultivares, como Rojo 2, Opedepe, Rubyprince, Aniversario inta, Southern Pearl, María Bianca, Elegant Lady, Summer Pearl, entre otros (Figura III) (Dini *et al.*, 2021). Además, cada año se introducen en el mercado nuevas variedades con el propósito de optimizar el rendimiento, ampliar el calendario de cosecha, mejorar la calidad global del fruto e incorporar resistencia o tolerancia a factores adversos que afecten negativamente la productividad. Así, en el año 2020 se introdujeron al mercado los cultivares 'Rosalinda INTA', 'Chamamé INTA', 'Biguá INTA', 'Tehuelche INTA', 'Milonga INTA' y 'Pampa INTA' (Valentini *et al.*, 2021).

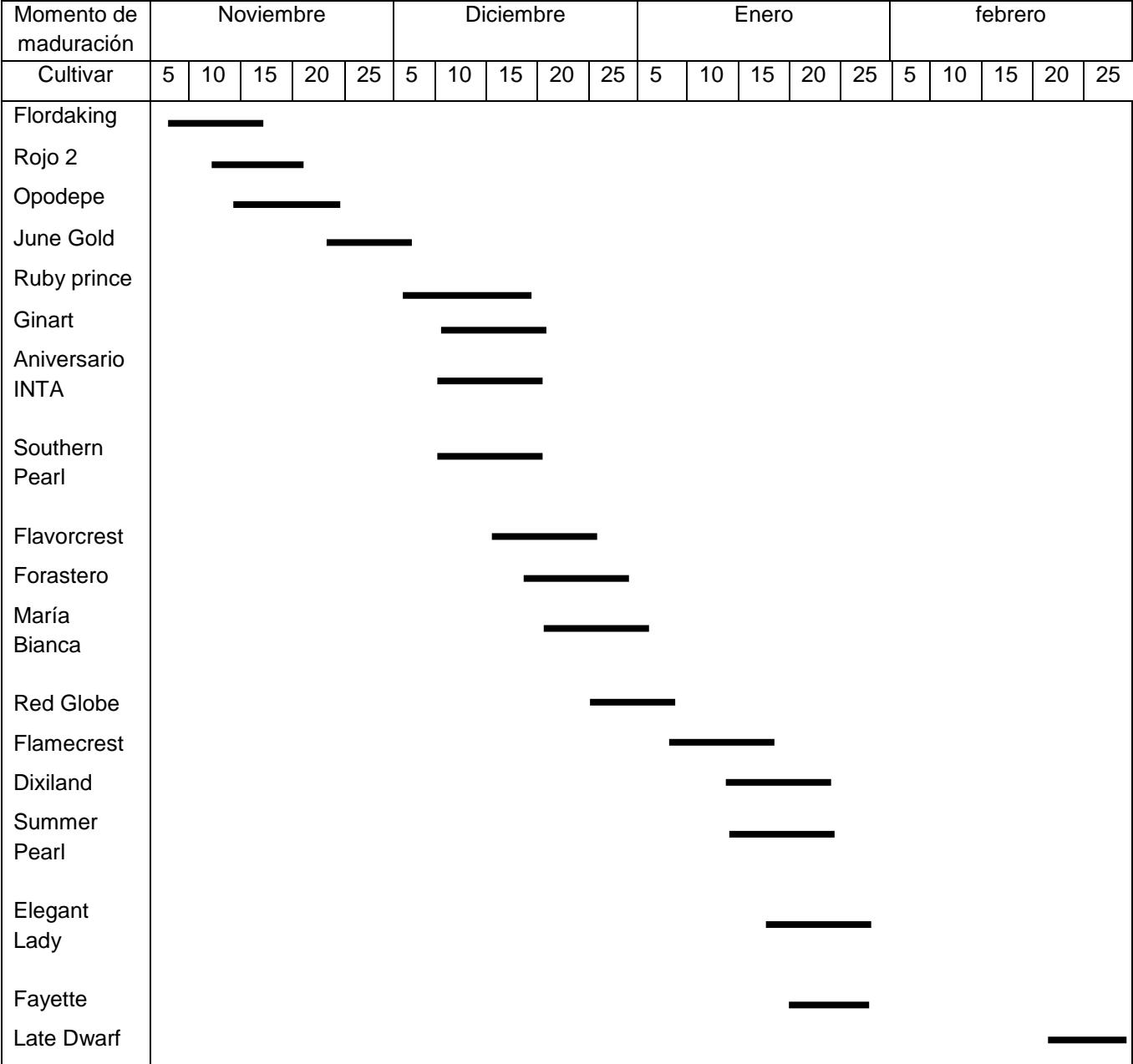


Figura III. Principales cultivares implantados y época de maduración en la provincia de Buenos Aires. Fuente: Dini *et al.*, 2021

1.3. Principales enfermedades que afectan el duraznero en la República Argentina

En este apartado se hará una breve descripción de las enfermedades más importantes que afectan al duraznero; para luego profundizar en una de ellas, podredumbre morena cuyo agente causal es *Monilinia fructicola*, ya que es la enfermedad que más daños causa a nivel productivo y comercial, y es el tema central de la tesis.

1.3.1. Enfermedades causadas por bacterias

1.3.1.1. Mancha bacteriana (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)

Los síntomas se observan en hojas, flores y frutos. En hojas, la lesión se caracteriza por manchas circulares que se oscurecen a medida que se extienden. A menudo, estas manchas se localizan a lo largo de la nervadura principal o en el ápice de la hoja (Figura IV). La zona que las rodea adquiere un color amarillo verdoso y la zona central termina por caer, dejando una perforación irregular en la hoja. Cuando el ataque es intenso provoca clorosis y defoliación prematura. En los brotes se observan canchales. En los frutos los síntomas comienzan a observarse de tres a cinco semanas después de la caída de los pétalos, como pequeñas lesiones de aspecto acuoso. Si el tiempo es muy húmedo, estas lesiones exudan goma (Mitidieri, 2012).



Figura IV. Síntomas iniciales y en estado avanzado en hojas. Fuente: Mitidieri, 2012

1.3.2. Enfermedades causadas por hongos

1.3.2.1. Torque (*Taphrina deformans* (Burk) Tulasne)

Este hongo puede afectar hojas, brotes, flores y frutos. El primer síntoma que se observa en la primavera es la formación de áreas rojizas sobre las hojas, para luego tomar un aspecto enrulado y caer en forma prematura (Figura V). Las flores y frutos atacados también caerán de manera temprana, aunque pueden encontrarse frutos afectados en la cosecha (Mitidieri, 2012).

Las condiciones predisponentes son bajas temperaturas y alta humedad al comienzo de la brotación, durante la primavera. La temperatura óptima para el crecimiento del hongo es de

20°C, con un mínimo de 8,9°C y un máximo entre 26 y 30°C. La humedad relativa requerida para la infección debe ser mayor a 95% (Mitidieri, 2012).



Figura V. Síntoma en hojas con enrollado característico. Fuente: Mitidieri, 2012.

El control de esta enfermedad es estrictamente preventivo y se basa en la aplicación en invierno de polisulfuro de calcio, o de productos cúpricos como oxiclورو de cobre, y/o fungicidas de síntesis como captan, ziram, o mancozeb (Nievas, 2016). Los momentos de aplicación para que el control sea efectivo son, en otoño a la caída de las hojas y en invierno después de la poda. En años muy húmedos, y en variedades muy susceptibles, se recomienda una tercera pulverización a fines de invierno, justo antes que las yemas foliares comiencen a abrir (Mitidieri, 2012).

1.3.2.2. Sarna (*Cladosporium carpophilum* Theum)

La sarna del duraznero es una enfermedad importante en regiones cálidas y húmedas de todo el mundo. En las provincias de Buenos Aires y Córdoba puede alcanzar valores de incidencia superiores a 80% de frutos afectados en variedades susceptibles y en años favorables al desarrollo de la enfermedad (Cragolini *et al.*, 2005). Este hongo ataca los distintos órganos aéreos de la planta. En las hojas, en la etapa inicial se observan manchas pequeñas de color pálido, que luego crecen y se vuelven de color castaño oscuro. Si la infección es severa se produce la caída de la hoja. En los frutos los síntomas comienzan como manchas pequeñas poco definidas; a medida que se desarrolla la enfermedad, las manchas se hacen circulares u ovals de color gris a gris oliváceo, llegando a medir de 2 a 3 mm (Figura VI) (Mitidieri, 2012).

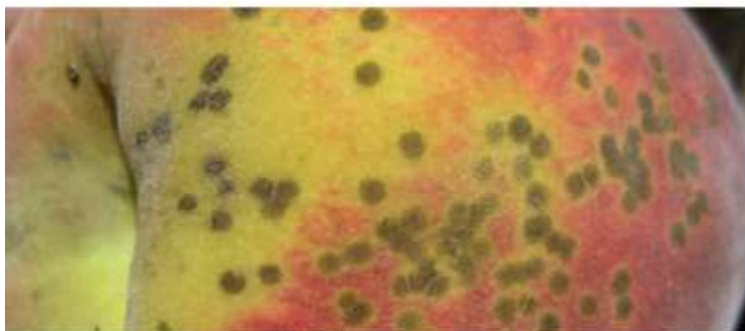


Figura VI. Síntomas de Sarna en frutos de duraznero. Fuente: Mitidieri, 2012.

Para obtener frutos de calidad se efectúan aplicaciones de fungicidas desde frutos pequeños hasta próximo a la cosecha, principalmente en variedades de maduración tardía. El momento óptimo de aplicación es de cuatro a seis semanas después de caída de pétalos, en función del momento en el cual se producen las mayores infecciones en los frutos (Cragnolini *et al.*, 2005).

1.3.2.3. Mal de la munición (*Wilsonomyces carpophilus* (Lèv) Adaskabeg, Owaga, & Butler

Esta enfermedad, también llamada viruela, causa muerte de yemas, las cuales quedan recubiertas de un exudado gomoso y lesiones en las ramas (Figura VII.A). Las lesiones en hojas y frutos comienzan con manchas rojizas que se expanden hasta formar manchas marrones de 3-10 mm de diámetro (Figura VII.B). En las hojas, la zona afectada cae (Mitidieri, 2012).

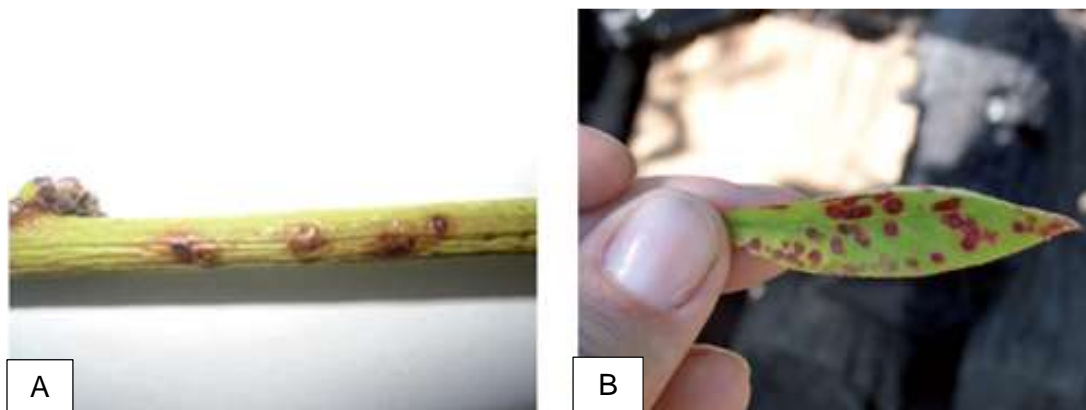


Figura VII. Síntomas de viruela. **A:** lesiones en ramas. **B:** síntomas en hojas. Fuente: Mitidieri, 2012.

Se requieren 24 horas de humedad continua para que se produzca la infección de los

brotos. El crecimiento del patógeno se produce con temperaturas entre 4 - 30°C, con un óptimo entre 15 - 20°C. Los tratamientos otoñales, a base de productos cúpricos o clorotalonil, reducen la supervivencia del patógeno de un año al otro. En caso de infecciones severas se recomienda una segunda aplicación en el momento de caída de envolturas florales (Mitidieri, 2012).

1.3.2.4. Tizón de brotes: *Phomopsis amygdali* (Del.) Tuset & Portilla

La enfermedad se manifiesta con lesiones alargadas (cancros) de color marrón o marrón rojiza que se pueden formar sobre las yemas o no (Figura VIII). Los síntomas pueden confundirse con los producidos por *Monilinia* spp; aunque en este caso, la infección comienza en una flor que muchas veces queda adherida a la rama por medio de goma (Mitidieri, 2012).



Figura VIII. Síntomas de *Phomopsis* - Cancros en ramas. Fuente: Mitidieri, 2012.

La infección ocurre por las yemas o botones florales a inicios de brotación y por las axilas de las hojas cuando caen en otoño. Las condiciones predisponentes para que se produzca la infección son alta humedad y temperaturas entre 27 y 29°C.

Esta afección se controla con tratamientos otoñales e invernales con productos cúpricos. Se recomiendan tratamientos preventivos a botón floral, caída de pétalos, caída de hojas y raleo de frutos (Mitidieri, 2012).

1.4. Podredumbre morena (*Monilinia fructicola*)

La podredumbre morena es el factor más limitante en la producción de frutales de carozo en el mundo (Bostock *et al*, 1999; Lee & Bostock, 2007). Se trata de una enfermedad fúngica, que causa pérdidas de pre y poscosecha en los frutales del género *Prunus*, en zonas donde las primaveras y veranos son húmedos y cálidos (Rossini *et al*, 2007; Mitidieri, 2012).

Existen tres especies de *Monilinia*, perteneciente a la subdivisión Ascomycotina, que pueden causar podredumbre morena en durazneros: *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *Monilinia laxa* (Aderh. Y Ruhland) Honey y *Monilinia fructigena* Honey ex Whetzel (Mondino, 2014).

En Argentina se encuentran dos de las especies antes mencionadas: *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey y *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland).

Ambos patógenos causan en general síntomas similares, pudiendo provocar tizón de flores en primavera, podredumbre y decaimiento de frutos maduros al final del ciclo. *M. laxa*, usualmente produce tizón de flores y tallos de forma más severa, mientras que *M. fructicola* causa mayor decaimiento en frutos, y es en general el responsable de producir podredumbre marrón en duraznos, nectarinas y cerezas (Michailides *et al*; 2014).

M. fructicola es un verdadero problema, pudiendo ocasionar grandes pérdidas directas de producción, resultado de la infección de flores (tizón de flores y brotes) y de podredumbre de frutos en pre y poscosecha. También produce pérdidas indirectas debidas al alto costo de aplicación de fungicidas durante el período de floración y de desarrollo de frutos hasta la poscosecha (Emery *et al*; 2000). El daño más importante ocasionado por la enfermedad es la destrucción de la fruta, con severas pérdidas económicas (Zehr, 1982; Rossini *et al*, 2007). Sumado a esto, ha provocado problemas en la comercialización que se agudizaron, cuando el patógeno fue detectado en la Unión Europea y en el período que fue considerado plaga cuarentenaria (Rossini *et al*, 2007; Mitidieri, 2012). En Chile, mientras tanto, se derogó una ley que hizo obligatorio su control (Herrera Cid, 2014). Por todo esto, la podredumbre morena, causada por *M. fructicola*, es una de las enfermedades más importantes, que produce grandes pérdidas económicas en cultivos de duraznos en la Argentina.

1.4.1. Síntomas y signos de la enfermedad

El primer órgano que puede ser atacado por *M. fructicola* es la flor, produciendo un atizonado de la misma que puede luego originar lesiones o “cancros” en tallos, como consecuencia del avance del hongo, proveyendo de una importante fuente de inóculo para infecciones latentes en frutos verdes, que permanecerán invisibles y desarrollarán podredumbre marrón sobre frutos hacia el final de la estación y en poscosecha (Keske *et al*, 2011; Mondino, 2014). Las flores atacadas y los canchros pueden presentar exudación de goma, producidos en

reacción al ataque por la planta (Mondino, 2014) y además se puede producir la muerte de la porción distal del brote (Zehr, 1982; Mitidieri, 2012).

Ante condiciones de alta humedad, sobre flores atizonadas, canchales y frutos raleados (Hong *et al.*, 1997), se puede apreciar el signo del hongo, que consiste en micelio y conidios en cadena de color grisáceo. Éstos adquieren especial importancia en la epidemiología de la enfermedad al producir infecciones secundarias (inóculo secundario), pudiendo afectar la fruta (Mondino, 2014). La infección de la fruta se puede producir directamente a través de la cutícula, en la base de los tricomas, o a través de rajaduras o heridas provocadas por insectos (Rossini *et al.*, 2007). Llegada la etapa de madurez, los frutos infectados se pudren en planta o en poscosecha, desarrollando el síntoma de podredumbre morena, y dándole el nombre a la enfermedad. Ésta consiste en una lesión circular de color castaño, firme, que aumenta de tamaño rápidamente y toma la totalidad del fruto. Sobre la podredumbre se desarrolla la esporulación del hongo, de aspecto pulverulento y de color gris. El fruto podrido queda adherido a la planta momificado o puede caer al suelo y descomponerse (Mitidieri, 2012; Mondino, 2014).

1.4.2. Ciclo de la enfermedad

El patógeno sobrevive el invierno en los frutos momificados, caídos al suelo o pendientes del árbol, y en las lesiones de años anteriores (canchales), constituyendo el inóculo primario. Las infecciones primarias se producen a partir de conidios (Figura IX, flecha negra) y/o ascosporas (Figura IX, flecha celeste), en condiciones de alta humedad, a partir de momias adheridas al árbol o semienterradas en el suelo, las cuales dispersan con la lluvia y el aire e infectan flores en la primavera, pudiendo funcionar también como fuente de infecciones latentes en frutos (Luo y Michailides, 2001; Mitidieri, 2012; Mondino, 2014).

Las flores infectadas y los canchales desarrollan nuevos conidios que servirán de inóculo secundario para la fruta en el período de precosecha (Figura IX, flecha rosada). Otra fuente de inóculo secundario de suma importancia la constituyen los frutos raleados que quedan en el suelo, sobre los cuales se evidenció esporulación del hongo (Hong *et al.*, 1997).

Los frutos infectados sobre la planta se momifican. Durante las tareas de poda o con el movimiento de las ramas por acción del viento, algunos de los frutos momificados pueden caer al suelo y encontrar condiciones propicias para la producción de apotecios. Por otro lado, parte de las momias pueden permanecer sobre las plantas, produciendo conidios en la estación

vegetativa y reproductiva siguiente, que serán fuente de inóculo para las flores y frutos, de esta manera se reinicia el ciclo (Mondino, 2014). Algunos autores, sin embargo, plantean que los conidios producidos en la primavera temprana, sobre los frutos momificados, no sobreviven lo suficiente para causar podredumbre en frutos (Roberts y Dunegan, 1932; Emery *et al.*, 2000).

Los frutos de carozo inmaduros generalmente no exhiben síntomas o signos de la infección por el patógeno, a menos que el ingreso y colonización sean favorecidos por períodos prolongados de lluvia o alta humedad seguidas por heridas (Zehr, 1982, Emery *et al.*, 2000). Sin embargo, los frutos verdes, aún en ausencia de esas heridas, pueden hospedar infecciones latentes (asintomáticas) que pueden volverse activas cuando el fruto está maduro (Emery *et al.*, 2000). Dichas infecciones latentes adquieren suma importancia en regiones de clima húmedo, ya que pueden progresar rápidamente produciendo podredumbre en fruta (Emery *et al.*, 2000).

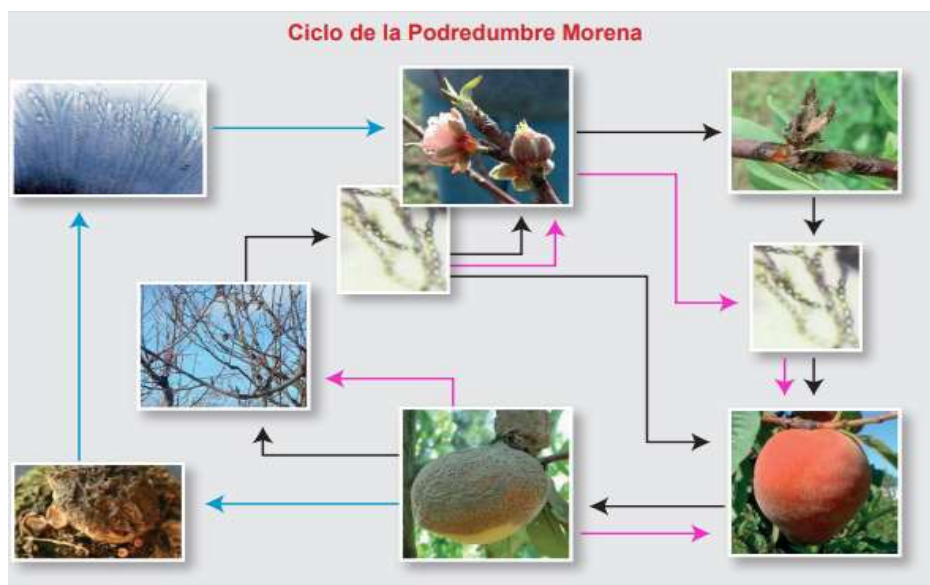


Figura IX. Ciclo sexual y asexual de podredumbre morena (Mondino, 2014). El hongo en su ciclo primario tiene dos vías: Las flechas celestes indican la vía sexual (producción de ascosporas); las flechas negras indican la vía asexual (producción de conidios); las flechas rosadas indican el ciclo del inóculo secundario.

1.4.3. Condiciones predisponentes

El factor más importante para que ocurra una infección es la humedad. Con valores de entre 70 y 80% de humedad relativa, sólo ocurre la infección de pistilos y estigmas de la flor,

mientras que próximos al 100% todos los órganos florales pueden ser atacados. Es por esto que períodos de lluvias, lloviznas y/o neblinas durante el período de floración incrementa la incidencia del atizonado de flores (Mondino, 2014).

Las temperaturas óptimas para el desarrollo de *M. fructicola* e infección de frutos se encuentran entre los 20 y 25°C. Son suficientes entre 3 a 5 horas de humedad para que la infección tenga éxito. Después de 24 horas de humedad, la infección es independiente de la temperatura entre valores de 5 a 30°C (Luo y Michailides, 2001; Rossini et al, 2007; Mitidieri, 2012).

Las heridas, además, predisponen a la infección de los frutos por *M. fructicola* (Mondino, 2014; Mitidieri, 2012; Rossini et al, 2007). Por otro lado, la severidad de infección de la fruta se incrementa con el aumento de la concentración de inóculo (Luo y Michailides, 2001).

Los conidios, principal fuente de infección, junto con las ascosporas, se forman con temperaturas mayores de 5°C y se dispersan por la lluvia y el viento. Los apotecios se producen con temperaturas medias (17 a 22°C) y alta humedad, dentro de los cuales se forman los ascos y ascosporas, las cuales son diseminadas con el viento. Esta fase sexual del patógeno no ha sido observada en la zona bonaerense (Mitidieri, 2012).

El potencial de inóculo y las condiciones de tiempo imperantes durante la etapa de floración en el cultivo, pueden influenciar significativamente el desarrollo posterior de la enfermedad (Luo y Michailides, 2001; Keske et al, 2011).

Dichas condiciones son frecuentes en nuestra región, Sublitoral del Paraná, que comprende una angosta franja en las cercanías del Río Paraná, que se extiende desde el norte de Buenos Aires hasta el sur de Santa Fe. Las temperaturas, lluvias y humedad relativa (HR^o) son favorables para el desarrollo del patógeno, haciendo de ésta la enfermedad fúngica más importante en durazneros, y una de las principales podredumbres de postcosecha junto con *Rhizopus* spp.

1.4.4. Manejo integrado de la enfermedad

Para lograr un manejo aceptable de la podredumbre morena es necesario realizar prácticas de saneamiento que ayudarán a prevenir los primeros ataques, en combinación con un programa de tratamientos preventivos (Mitidieri, 2012; Mondino, 2014). Para esto, es importante

considerar un conjunto de medidas de manejo tendientes a reducir la presión de inóculo como, retirar los frutos no cosechados, evitar dejar frutos momificados sobre las plantas, realizar podas oportunas, quemado de ramas enfermas (Mitidieri, 2012; Mondino, 2014) y erradicar posibles malezas hospederas de la enfermedad cercanas al cultivo (Zehr, 1982).

La podredumbre morena en pre y poscosecha es posible reducirla significativamente removiendo en su totalidad los frutos caídos al suelo luego de la práctica de raleo, los cuales constituyen una fuente de inóculo muy importante. Desafortunadamente, éste es un proceso costoso en tiempo y mano de obra, por lo que una alternativa es realizar pulverizaciones con agentes químicos o biológicos tendientes a suprimir la esporulación de *M. fructicola* sobre los mismos, o prácticas culturales a través de las cuales se acelere la descomposición de frutos raleados, como el disqueado (Hong *et al.*, 1997).

Las curas de otoño – invierno tienen como objetivo reducir la supervivencia de este y otros hongos sobre la planta.

Además, es recomendable realizar tratamientos preventivos durante el período de floración, desde el 5% de flores abiertas y en precosecha (Moreira y May-de Mio, 2009; Keske *et al.*, 2011; Mitidieri, 2012). En períodos de mucha humedad debe pulverizarse cada 15 o 20 días, aún próximo al momento de cosecha, respetando los tiempos de carencia para cada producto. Para evitar la aparición de cepas resistentes, es preferible realizar los primeros tratamientos con fungidas de amplio espectro dejando los específicos para las aplicaciones en que ya está avanzada la brotación (Tabla I) (Mitidieri, 2012).

Momento	Fungicidas
Inicio de floración	Azufre, Captan, Mancozeb, Clorotalonil
Plena floración hasta fruto (2 cm)	Carbendazim
30 días antes de la cosecha	Captan, Mancozeb, Clorotalonil
15 días antes de la cosecha	Estrobilurina (mezcla)
7 días antes de la cosecha	Tebuconazole

Tabla I. Propuesta de rotación de fungicidas en el control de podredumbre morena para evitar aparición de cepas resistentes a fungicidas (Mitidieri, 2012).

Tradicionalmente, el control de enfermedades en cultivos frutales a lo largo del mundo dependió del uso de fungicidas, pero esta práctica es cada vez menos aceptable por parte de los consumidores, ya que puede ocasionar daños al medio ambiente y a la salud humana (Spiers *et al.*, 2005). Por otro lado, el uso excesivo de algunos principios activos hizo que aparecieran cepas resistentes, como es el caso de *M. fructicola* a dicarboximidazoles y bencimidazoles, y produjo, además, mayores costos de producción (Zehr, 1982).

Debido a todo esto, y a la mayor presión ejercida por los consumidores por exigir la ausencia de residuos en frutos (Crisosto *et al.*, 2009) y a la reducida disponibilidad en el mercado de nuevos fungicidas, asociado a costosos requerimientos de registraci3n, es necesario encontrar estrategias alternativas para el control de la enfermedad, con miras a una fruticultura m1s sustentable (Y11nez-Ju11rez *et al.*, 2018).

1.4.5. Estrategias de control alternativas

Spiers *et al.* (2005) sugiere que el control de la enfermedad con aplicaciones reducidas de fungicidas es m1s efectivo y consistente cuando se utiliza junto con un sistema de manejo integrado, para disminuir la poblaci3n del pat3geno. Este enfoque requiere del uso de m1ltiples

estrategias, que incluye un mejor conocimiento de la epidemiología del patógeno y de la evolución de la susceptibilidad del hospedante en las distintas etapas de desarrollo del fruto, para optimizar el momento de aplicación de fungicidas. Requiere también la manipulación nutricional del árbol para aumentar la resistencia del hospedero a la enfermedad, la remoción de inóculo; tratamientos poscosecha; uso de control biológico y elicitors para reemplazar y/o reubicar a los fungicidas.

Las herramientas de manejo integrado de enfermedades incluyen desarrollo de cultivares resistentes a podredumbre morena e inducción de resistencia hospedera (Gradziel, 1994). La resistencia del hospedante a fitopatógenos es quizás la herramienta más efectiva en cuanto a costos y seguridad medioambiental para el manejo de enfermedades.

Actualmente, los cultivares comerciales de duraznero son en general susceptibles a podredumbre morena (dos Santos *et al.*, 2012), pero, se han identificado niveles mejorados de resistencia en algunos cultivares como “Bolinha” (Gradziel y Wang, 1993; Gradziel, 1994; Crisosto *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2012). Sin embargo, la comercialización de este cultivar, “Bolinha”, se ha desalentado, debido a la pobre coloración de la fruta en combinación con la alta caída de precosecha que presenta. Plántulas provenientes de la polinización abierta con cv. Bolinha son seleccionadas para resistencia a podredumbre morena e incorporadas dentro del Programa de mejoramiento de cultivares de California (Gradziel y Wang, 1993).

1.5. Resistencia a fitopatógenos

Plantas y patógenos, durante el curso de su co-evolución, han desarrollado una intrincada relación resultante de continuos intercambios de información molecular. Los patógenos han ido desarrollando estrategias ofensivas para parasitar plantas, y sucesivamente, las plantas han sido capaces de desarrollar una diversidad de mecanismos de defensa contra patógenos e insectos (Benhamou, 1996).

Es conocido que la resistencia es la regla y la susceptibilidad la excepción (Riveros Angarita, 2001). La resistencia puede ser definida como la habilidad de la planta para prevenir o restringir el crecimiento del patógeno y su multiplicación (Benhamou, 1996).

Varias líneas de evidencia indican que todas las plantas, aún si son resistentes o susceptibles, responden al ataque del patógeno a través de la inducción de una estrategia de resistencia coordinada, que finalmente conduce a la acumulación de genes de defensa. Sin

embargo, cuando la interacción planta-patógeno resulta en el establecimiento de la enfermedad, la colonización exitosa del parásito es probable sea causada por el retraso en la expresión de defensa de la planta, y no por la ausencia o inactivación de mecanismos de defensa. Se hace evidente que la velocidad y alcance de la respuesta de la planta a la señalización intracelular determina el resultado de la interacción planta-patógeno (Benhamou, 1996).

La resistencia a infecciones primarias puede resultar de la presencia de barreras de defensa preformadas; es decir, constitutivas o no inducidas, pero a menudo depende de mecanismos de resistencia activados o inducidos. Entonces, los mecanismos de defensa presentes en las plantas pueden ser constitutivos o pre-existentes, e inducibles en respuesta a un ataque, que desencadena reacciones de defensa a través de la liberación de elicitores, los cuales conducen a la expresión de la actividad anti-patogénica (Braga & Dietrich, 1987; Van Loon, 1997; Sandoval-Chávez *et al.*, 2015).

1.5.1 Defensas constitutivas o no inducidas

Los mecanismos de defensa constitutivos responden a la información genética propia de la especie o cultivar vegetal, la cual se expresa en la planta sin la mediación de un inductor (Favaro, 2014). Las defensas mediante las cuales las plantas pueden contrarrestar el ataque de los patógenos pueden ser estructurales, como barreras físicas que dificultan la entrada y propagación del mismo; o bioquímicas, como la producción de sustancias tóxicas para el patógeno o sustancias que generan condiciones que inhiben su desarrollo (Benhamou, 1996; Agrios, 2005; Sandoval-Chávez *et al.*, 2015).

Entre las defensas estructurales pre-existentes podemos mencionar: la calidad y cantidad de cera y de cutícula que cubren a las células epidérmicas, la estructura de las paredes celulares de éstas, tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas y, por último, la presencia de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculizan el avance del patógeno (Madriz Ordeñaña, 2002; Montes-Belmont, 2009). La existencia de una cubierta de pelos sobre la superficie de los frutos actúa también como barrera disminuyendo la infección.

Aún, ante la presencia de dichas estructuras, la mayoría de los patógenos logran penetrarlas.

Además de los mecanismos estructurales, como mencionamos anteriormente, las plantas presentan defensa bioquímica o metabólica, que consiste en la presencia de compuestos tóxicos

que se encuentran en su forma activa, tales como alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales, terpenos, etc. Ejemplos de éstas son la concentración de taninos en la nuez pecanera 'Wichita' que la hace más resistente a *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, o bien, la presencia de mayor cantidad de compuestos fenólicos en *Capsicum annuum* L. inmaduros en comparación con frutos maduros, que los hace menos susceptibles a *C. capsici* y *Alternaria alternata* (Sandoval-Chávez *et al.*, 2015).

1.5.2. Defensas activadas o inducidas

Los vegetales poseen en su constitución genética, genes que codifican para producir numerosas "armas químicas", extremadamente eficientes, que impiden o disminuyen el daño causado por los microorganismos (Gómez y Reis, 2011).

Los patógenos que logran superar las barreras primarias constitutivas deben enfrentar aún la respuesta inmune de las plantas (Favaro, 2014). La respuesta inmune es un mecanismo activo de defensa, que involucra cambios en el metabolismo celular provocados por la expresión diferencial de genes (Benhamou, 1996). Para que ocurra la inducción de la defensa de la planta es necesario el reconocimiento específico del patógeno.

En la activación están involucrados un gran número de pequeñas moléculas exógenas denominadas inductores o agentes inductores que, cuando son reconocidas por moléculas endógenas, tienen la función de activar o aumentar el nivel de resistencia de los vegetales, tanto a nivel local como en puntos distantes al sitio de infección, así como de participar de otras actividades fisiológicas (Gómez y Reis, 2011).

Los mecanismos de señalización de defensa sistémica incluyen la resistencia sistémica inducida (ISR), que se activa en respuesta a la colonización de la raíz por organismos benéficos, y a resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual se activa en respuesta a la infección por patógenos. Estos mecanismos de defensa permanecen inactivos o latentes hasta que se activan luego de la exposición y/o contacto con patógenos o agentes inductores. La inducción de SAR implica la generación de señales móviles que se translocan al tejido distal y prepara a la planta contra futuras infecciones. Esto requiere una comunicación cruzada cuidadosa y equilibrada entre varias fitohormonas, metabolitos y proteínas (Nativitas Lima, 2021).

La resistencia o susceptibilidad depende del tiempo que tarde el huésped en reconocer al patógeno y la rapidez con la que active sus mecanismos de defensa (Sandoval-Chávez *et al.*,

2015).

Frente a esta naturaleza de resistencia a enfermedades de la planta ha surgido la idea de acelerar la respuesta mediante la aplicación de inductores de resistencia, los cuales podrían proveer de un método alternativo de control, que es biológico, medioambiental y comercialmente viable (Benhamou, 1996; Gómez y Reis, 2011).

Dependiendo del tipo de agente inductor, existen dos tipos de inducción de resistencia: la **inducción biótica** y la **inducción abiótica**; la inducción biótica puede ser activada por la presencia de organismos como hongos, virus, bacterias, nematodos e incluso de insectos herbívoros. Mientras que, en la inducción abiótica, la resistencia puede ser generada por la presencia de moléculas sintéticas depositadas sobre los órganos vegetales, imitando así la presencia de un patógeno o insecto. Los inductores abióticos o químicos, se los llama también “fungicidas de cuarta generación” por su efecto completamente diferente de los fungicidas tradicionales. Existen numerosas sustancias que actúan como agentes inductores, producidos en forma sintética y a escala comercial. Entre ellas se encuentran fosfatos de potasio, sodio o magnesio, fosfitos de potasio y calcio, fosetil aluminio, ácido salicílico, acibenzolar s-metílico, quitosano, silicato de potasio, entre otros (Gómez y Reis, 2011; Nativitas Lima, 2021).

1.6. Inductores abióticos de resistencia: Fosfitos

Los fosfitos son sales derivadas de ácido fosforoso (H_3PO_3), que regularmente se combinan con cationes metales como potasio, sodio, calcio (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018).

El interés en el uso de fosfitos se incrementó debido a que tienen una rápida absorción por las plantas, un alto grado de solubilidad y alta capacidad de moverse desde las hojas hacia las raíces a través del floema, proporcionando control para algunas enfermedades radiculares e incrementando el efecto de ciertos fungicidas (Nativitas Lima, 2021). El ion fosfito al ser fácilmente transportado en las plantas vía xilema y floema, se lo ha utilizado en aplicación foliar, baño a la raíz y cuello de la planta, inyección al tronco (Ogoshi *et al*, 2013), a través de riego por goteo mezclado en la solución nutritiva en hidroponía, tratamiento a semilla, aplicación aérea en bajo volumen o como tratamiento en inmersión de semillas y frutos (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018).

Los fosfitos representan un insumo agrícola eficiente para proteger los cultivos contra organismos patógenos mediante la inducción de mecanismos de defensa, actuando como inductor de resistencia vegetal de importancia para los nuevos enfoques de manejo de

enfermedades (Nativitas Lima, 2021). Estos compuestos tienen un modo de acción complejo, que incluye la inhibición directa del crecimiento de patógenos (Smillie *et al.*, 1989, Reuveni *et al.*, 2003; Deliopoulos *et al.*, 2010) y la estimulación de las defensas de las plantas (Brackmann *et al.*, 2004; Boneti y Katsurayama, 2011; Yáñez-Juárez *et al.*, 2018; Nativitas Lima, 2021).

Las respuestas de defensa desencadenadas por los fosfitos incluyen la acumulación de fitoalexinas y la lignificación de la pared celular, así como la producción de enzimas líticas por la planta (Nativitas Lima, 2021).

El uso de fosfitos en la agricultura se viene investigando principalmente por su acción en el control de organismos fitoparásitos y como bioestimulador. Su eficacia fue probada y demostrada contra oomycetes (Graham, 2011; Ogoshi *et al.*, 2013; Yáñez-Juárez *et al.*, 2018); sin embargo, también se ha encontrado eficacia contra otros hongos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Venturia inaequalis*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinérea* en manzanas (Ferrer Laiva y Moggia Lucchini, 2005; Lutz *et al.*, 2015) y *M. fructicola* en duraznos (Ogoshi *et al.*, 2013).

Por lo mencionado en los apartados anteriores y como una manera de contribuir al manejo sostenible del cultivo de duraznero, se consideró necesario evaluar el efecto de los fosfitos en el desarrollo de la podredumbre morena en frutos y los posibles cambios en rendimiento y calidad derivados de su aplicación en pre y poscosecha.

Hipótesis

En el cultivo de duraznero, los tratamientos preventivos con activadores de resistencia, como fosfitos de potasio y calcio, reducen el crecimiento del patógeno y la susceptibilidad del hospedante a *M. fructicola*. Estos activadores mejoran la calidad poscosecha del fruto.

Objetivo general

Evaluar el efecto de tratamientos preventivos con fosfitos, sobre el crecimiento de *M. fructicola*, susceptibilidad del hospedante al patógeno y sobre parámetros de calidad post cosecha de frutos de duraznero.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de fosfitos de potasio y calcio sobre la germinación de conidios y el crecimiento micelial *in vitro* de *M. fructicola*, agente causal de la podredumbre morena en duraznero.
2. Determinar el efecto de los tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la expresión de síntomas frente a la infección por *M. fructicola*, en distintas etapas del crecimiento del fruto y distintos cultivares de duraznero.
3. Determinar el efecto de los tratamientos con fosfitos sobre la expresión de compuestos asociados a mecanismos de resistencia inducida frente a la infección por *M. fructicola*, en distintas etapas del crecimiento del fruto y en distintos cultivares de duraznero.
4. Evaluar el efecto de tratamientos precosecha con fosfitos y fosfitos en mezcla con fungicida, sobre el desarrollo de podredumbre morena y caracterizar el efecto de los tratamientos mencionados, sobre parámetros de calidad poscosecha de frutos, como tamaño, peso, color, firmeza y sólidos solubles totales.
5. Evaluar el impacto ambiental de los fosfitos.



Capítulo I

Efecto de fosfitos de potasio y calcio sobre la germinación de conidios y el crecimiento micelial *in vitro* de *Monilinia fructicola*

CAPITULO I

EFFECTO DE FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO SOBRE LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS Y EL CRECIMIENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *M. fructicola*

2.1. INTRODUCCIÓN

La podredumbre morena causada por *M. fructicola* continúa provocando daños relevantes a los durazneros a pesar de los productos químicos utilizados para su prevención en pre y poscosecha (Moreira *et al.*, 2002).

En el mercado existe una creciente demanda por obtener fruta libre de residuos, por lo que se están ensayando compuestos de menor impacto a la salud humana y al medio ambiente como alternativas de control, entre estos compuestos se encuentran los fosfitos.

Los mecanismos de acción involucrados en los efectos profilácticos de los fosfitos incluyen acción directa sobre el patógeno e indirecta sobre el hospedante (Smillie *et al.*, 1989, Reuveni *et al.*, 2003; Deliopoulos *et al.*, 2010; La Spada *et al.*, 2021). El ion fosfito, al entrar en contacto con los organismos fitopatógenos, afecta su crecimiento y reproducción, influyendo en la expresión de genes que codifican la síntesis de compuestos indispensables en la estructura y fisiología celular (Lai *et al.*, 2017; La Spada *et al.*, 2021; Morales-Morales *et al.*, 2022). Además, al entrar a las células del tejido vegetal (acción indirecta), activa los mecanismos de defensa que restringen la penetración y supervivencia de los patógenos en la planta (Brackmann *et al.*, 2004; Boneti y Katsurayama, 2011; Yáñez-Juárez *et al.*, 2018; La Spada *et al.*, 2021).

La mayor parte de los trabajos publicados sobre fosfitos están relacionados con el control de oomycetes (Brackmann *et al.*, 2004; Graham, 2011); sin embargo, estos compuestos también mostraron ser eficientes sobre el control de otros patógenos, por ejemplo, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Venturia inaequalis*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinérea* en manzanas (Ferrer Laiva y Moggia Lucchini, 2005; Lutz *et al.*, 2015), y *M. fructicola* en duraznos (Ogoshi *et al.*, 2013).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de fosfitos de potasio y calcio sobre el crecimiento micelial y reproducción *in vitro* de *M. fructicola*.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Aislamiento del patógeno

Se obtuvieron colonias de *M. fructicola* a partir de frutos con síntomas recolectados en la zona de San Pedro (Buenos Aires) y provincia de Mendoza. Los aislamientos se extrajeron de la zona de avance de la infección y se sembraron en cajas de Petri sobre medio Agar Papa Glucosado (APG), depositando cuatro o cinco cortes de pulpa de durazno por caja. Se trabajó bajo cámara de flujo laminar durante todo el proceso. Luego se incubó a 25°C por una semana, con 12 h de oscuridad y 12 h de iluminación con luz fluorescente (F36W/T8/154) (Muñoz *et al.*, 2008). Los aislamientos obtenidos se repicaron para descartar presencia de otros patógenos y luego se procedió a la obtención de cepas puras a través de cultivos monospóricos. Los aislamientos y cultivos monospóricos se realizaron en el laboratorio de Fitopatología de la Agencia de Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA) San Pedro.

2.2.2. Cultivos monospóricos

Dentro de la cámara de flujo laminar se colocó una gradilla con seis (6) tubos Eppendorf de 1,5 mL rotulados, para realizar las diluciones respectivas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} ; en cada tubo se colocó 900 μ L de agua destilada estéril. Paralelamente a esto, se agregó 5 mL de agua destilada estéril en la caja Petri que contenía el cultivo del hongo con esporulación abundante. La caja se movió lentamente con el fin de suspender las esporas en el volumen de agua añadido. Después, con una micropipeta se tomó 100 μ L de esta solución con esporas y se colocaron en el primer tubo Eppendorf. Luego de agitar vigorosamente para homogenizar la distribución de esporas en el volumen de agua del primer tubo con la concentración 10^{-1} , se tomó de éste 100 μ L de solución y se la pasó al Eppendorf de 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-6} . Posteriormente, se sembraron 50 μ L de cada dilución de esporas en una caja Petri con medio APG, distribuyendo uniformemente con un asa de vidrio previamente flameada. Finalmente, las cajas sembradas en medio APG se incubaron a 25°C por una semana. Pasado este tiempo, se escogieron las cajas en las cuales las colonias provenientes de esporas individuales habían crecido independientemente, las mismas fueron sembradas en nuevas cajas de Petri con medio APG.

2.2.3. Identificación molecular de *M. fructicola*

Para la caracterización molecular se realizó extracción de ADN a partir de un cultivo de siete días del micelio de una colonia de *Monilinia* (cepa 345) en placa de Petri (4 placas).

Se pasó un *tip* sobre dos placas de cultivo para levantar el micelio (sin agar) y se depositó la muestra sobre un mortero estéril, que se envolvió en papel de aluminio (mortero + pilón + micelio + un tubo Eppendorf) y se colocó en freezer (-20°C). Luego de 20 minutos se molió en mortero y se pasó al eppendorf frío. Allí se siguió el protocolo de extracción de ADN del kit DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN).

El primer paso fue agregar 400 µL de buffer AP1 + 4 µL de RNAsa A y se dejó incubar durante 30 min vortexeando cada 10 min. Esta incubación fue más prolongada a lo que recomienda el kit debido a que no se utilizó nitrógeno líquido, a fin de asegurar la ruptura del micelio. Luego se continuó el protocolo según recomienda el instructivo del kit.

Finalmente, el ADN obtenido se eluyó de la columna con 100 µL de buffer AE + una segunda elución con 50 µL del mismo buffer.

Se prepararon 2 mixes de PCR para cargar 1 y 10 µL de ADN.

Mix PCR 1 (para 1 µL de ADN)

dH ₂ O	11,3 µL
Buffer (10X) con KCl	2,5 µL
dNTPs (2 mM c/u)	2 µL
Cl ₂ Mg (25 mM)	3 µL
Laxa R ₂ (10 µM)	1,25 µL
M0368-5 (10 µM)	1,25 µL
M0368-8R (10 µM)	1,25 µL
M068-10R (10 µM)	1,25 µL
Taq Polimerasa (Thermo)	0,2 µL
	Vf = 24 µL
ADN	1 µL
	Vf = 25 µL



Mix x 5

56,5 µL
12,5 µL
10 µL
15 µL
6,25 µL
6,25 µL
6,25 µL
6,25 µL
1 µL
Vf = 120 µL

Mix PCR 2 (para 10 µL de ADN)

dH ₂ O	2,3 µL
Buffer (10X) con KCl	2,5 µL
dNTPs (2 mM c/u)	2 µL
Cl ₂ Mg (25 mM)	3 µL
Laxa R ₂ (10 µM)	1,25 µL

Mix x 5

11,5 µL
12,5 µL
10 µL
15 µL
6,25 µL

M0368-5 (10 μ M)	1,25 μ L	6,25 μ L
M0368-8R (10 μ M)	1,25 μ L	6,25 μ L
M068-10R (10 μ M)	1,25 μ L	6,25 μ L
Taq Polimerasa (Thermo)	0,2 μ L	<u>1</u> μ L
	Vf =15 μ L	Vf =75 μ L
<u>ADN</u>	<u>10 μL</u>	
	Vf = 25 μ L	



La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf.

Los tubos 1 a 4 fueron cargados con 1 μ L de ADN o agua miliQ (NT) y los tubos 5 a 8 fueron cargados con 10 μ L de ADN o agua (NT). Al cargar los productos (10 μ L) en el gel de agarosa 1,5 % de 8 calles no se cargó el control NT (muestra 8) para dejar un lugar para el marcador de peso molecular (100 pb). Las muestras 1, 2, 5, 6 fueron corridas con un ciclador marca Eppendorf y el resto con otro equipo al cual se quiso poner a prueba.

Identificación de las muestras en la PCR

- 1- Monilinia 345
- 2- NT
- 3- Monilinia 345
- 4- NT
- 5- Monilinia 345
- 6- NT
- 7- Monilinia 345
- 8- Marcador de peso molecular

Los cebadores (primers) utilizados (Côté et al., 2004), fueron los desarrollados para amplificar la misma región genómica que *M. laxa* y *M. fructigena*. Se usó un mismo primer reverso (M0368-5) y tres específicos por especie M0368-8R 5' GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA-3' específico para *M. fructigena* y *M. polistroma*; M0368 -10R 5' AGA TCA AAC ATC GTC CAT CT-3' específico para *M. fructicola* y Laxa-R2 5' TGC ACA TCA TAT CCC TCG AC-3' (específico para *M. laxa*).

2.2.4. Efectividad *in vitro* de los fosfitos sobre el crecimiento micelial de *M. fructicola*

Los tratamientos a evaluar consistieron en diferentes concentraciones de dos productos comerciales, fosfitos de potasio (FFK) (300cc/hl, CS P₂O₅ 7,2%; K 12,9%) y fosfitos de calcio (FFCa) (300cc/hl, CS P₂O₅ 29,7%, Ca 12,7%).

Una vez obtenidas las colonias de *M. fructicola*, a partir de dos cepas de San Pedro (341 y 345) y dos cepas de Mendoza (MS-1 y MS-2), las mismas fueron incubadas en medio APG a 25°C con 12h de oscuridad y 12h de iluminación con luz fluorescente (F36W/T8/154). Luego de siete días de crecimiento en dichas condiciones, se extrajeron discos de colonia de 5mm de diámetro con un sacabocado previamente esterilizado y se colocaron en el centro de cajas de Petri con medio APG enriquecido con diferentes concentraciones de FFK y FFCa (Tabla 1), con la acidez corregida al valor del tratamiento testigo. Los fosfitos, previamente esterilizados en autoclave, se añadieron al medio APG, cuando éste se encontraba al estado líquido y alcanzó una temperatura de 50°C (Zavala – León *et al.*, 2005).

Tratamiento	Producto	Dosis (%) fosfitos
1	APG + Agua destilada	
2	APG + Fosfito de potasio (FFK)	0,1
3	APG + Fosfito de potasio (FFK)	0,2
4	APG + Fosfito de potasio (FFK)	0,3
5	APG + Fosfito de calcio (FFCa)	0,1
6	APG + Fosfito de calcio (FFCa)	0,2
7	APG + Fosfito de calcio (FFCa)	0,3

Tabla 1. Tratamientos de FFK y FFCa ensayados en diferentes dosis (%). APG (Agar papa glucosado).

Las colonias se incubaron en cámara en condiciones de oscuridad y a 25°C. Se sembraron cuatro cajas de Petri por cepa (342, 345, MS-1 y MS-2) y tratamiento (Tabla 1).

Para evaluar el efecto de los fosfitos sobre el crecimiento del patógeno, se midió crecimiento radial de la colonia (cm), cada 48h, en los ejes horizontal y vertical, con ayuda de un calibre. Las mediciones se realizaron hasta que el crecimiento micelial del tratamiento testigo completó la caja.

Con los datos obtenidos de crecimiento de colonia (cm) se calculó el efecto de los fosfitos sobre el patógeno a través de la variable porcentaje de inhibición (I) del crecimiento con respecto al testigo, $I = (C - Tr) / C * 100$; siendo I: Porcentaje de Inhibición, C: Crecimiento radial en el control y Tr: Crecimiento radial en el tratamiento (Perera González *et al.*, 2010).

El experimento se repitió cuatro veces para las cepas de la provincia de Buenos Aires y

dos veces para las cepas de Mendoza.

2.2.4.1. Análisis estadístico

Se analizó cada experimento por separado y conjuntamente. Se hicieron test de normalidad para la variable, los cuales no fueron rechazados, por lo que se realizó un ANOVA mixto con medidas repetidas de los tratamientos (no testigo) con el paquete estadístico SAS *on demand*. Para las medidas repetidas se probaron distintos modelos para la matriz de variancias y covariancias mediante comparaciones con el Criterio de Información de Akaike (AIC) siendo ARH(1) (autoregresivo heterogéneo de orden 1) y antedependencia(1) los que mejor ajustaron. Además, se complementó con el test LSD de Fisher con un nivel de significancia del 5% para cada evaluación y promedio de evaluaciones de cepas y tratamientos.

2.2.5. Efectividad *in vitro* de los fosfitos sobre la geminación de conidios de *M. fructicola*, mediante la técnica de microdilución en caldo.

Se sometieron conidios de *M. fructicola* a diferentes concentraciones de FFK y FFCa, de manera de obtener una valoración cuantitativa de la capacidad de inhibición como agente microbiano y conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estos compuestos.

La CMI se define como la concentración más baja capaz de inhibir cualquier crecimiento fúngico visible (Llivicura Alvarado, 2018; Ortiz Bravo, 2018; Badaracco *et al.*, 2020).

Se evaluó el efecto de ocho diluciones de FFK y FFCa.

2.2.5.1. Preparación del Inóculo

Se utilizó un aislamiento del hongo *M. fructicola* (cepa 345), el cual fue sembrado en medio Agar Jugo V8 e incubado a 25°C durante 15 días hasta esporular (Figura 1).



Figura 1. *M. fructicola* esporulada en medio V8. Cepa 345 aislada de San Pedro, provincia de Buenos Aires.

Las esporas del hongo se obtuvieron inundando la superficie del cultivo con agua destilada estéril. La solución se agitó por tres a cinco minutos. Luego se filtró la suspensión con gasa estéril y se ajustó hasta obtener una concentración final de $1,5 - 2,5 \times 10^5$ UFC/mL⁻¹, usando una cámara de Neubauer.

2.2.5.2. Preparación del medio de cultivo líquido caldo papa dextrosa (PDB)

Se disolvió 12,5 g de harina de papa en un litro de agua destilada, se llevó a ebullición durante 30 minutos y filtró. Luego se añadió glucosa (20 g) y se ajustó el pH a 5,5. El caldo fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.2.5.3. Preparación de las soluciones de trabajo

Se prepararon soluciones stock de FFK (20,1%) y FFCa (42,4%). La solución stock a partir del tratamiento 2 se realizó utilizando alícuotas de la solución 2X del tratamiento 1 (*). Las concentraciones evaluadas de ambos fosfitos fueron: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 y 0,0125% (Tabla 2). Además, se incluyó un control positivo (testigo con agua) y un control químico con fungicida comercial Tebuconazole SC 43 % (Folicur).

Tratamiento	1X	2X	AGUA ESTERIL	Fosfitos	[1%]
1	0,5%	1%*	9.9 mL	100 µL	
2	0,4%	0,8%	2 mL	80 µL	8000 µL
3	0,3%	0,6%	4 mL	60 µL	6000 µL
4	0,2%	0,4%	6 mL	40 µL	4000 µL
5	0,1%	0,2%	8 mL	20 µL	2000 µL
6	0,05%	0,1%	9 mL	10 µL	1000 µL
7	0,025%	0,05%	9,5 mL	5 µL	500 µL
8	0,0125%	0,025%	9,75 mL	2 µL	250 µL

Tabla 2. Diluciones de trabajo. FFK y FFCa. * a partir de esta solución se prepararon el resto de las diluciones de trabajo.

2.2.5.4. Técnica de microdilución en caldo

Los productos a evaluar se prepararon agregando 100 µL a 99,9 ml de Caldo papa dextrosa (PDB) a concentración 2X (Tabla 2). La prueba de microdilución se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes del fungicida. Las concentraciones evaluadas fueron 0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% de FFK y FFCa respectivamente.

El inóculo se preparó en agua destilada estéril a una concentración final de esporas entre $1.5 - 2.5 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), realizando el conteo con cámara de Neubauer.

Se procedió a colocar los compuestos a ensayar (FFK, FFCa y fungicida comercial: Tebuconazole) en la placa plástica de 96 pocillos, el tratamiento testigo con agua, blanco con agua y blanco con caldo PDB. Luego se sembraron 100 µL del inóculo con pipeta múltiple en los diferentes tratamientos con FFK, FFCa, Tebuconazole y testigo con agua. Se selló la placa con *parafilm*, para evitar evaporación del medio, y se incubó a 25°C durante 48h (Ramirez y Marin, 2009).

Posterior a la incubación se adicionó 40 µL bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5difeniltetrazolium (MTT) para medir actividad metabólica. Las células vivas y metabólicamente

activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando actividad metabólica (Ramirez y Marin, 2009). De este modo se determinó el crecimiento o no de *M. fructicola* (Llivicura Alvarado, 2018), a través de observación visual (Ramirez y Marin, 2009).

Para determinar la efectividad de la prueba y como prueba confirmatoria se sembró por superficie en caja de Petri con APG, 20 μ L del contenido de cada celdilla, y se incubó por 48 h a 25°C. La siembra se hizo por triplicado y al final de la incubación se hizo un recuento de UFC (unidades formadoras de colonias).

2.2.5.5. Análisis estadístico

Se evaluaron unidades formadoras de colonias UFC a 48 h de la incubación por triplicado y se calculó el % de inhibición (I) en comparación con el tratamiento testigo. Se realizó análisis con el paquete estadístico SAS *on demand*, utilizando modelo lineal generalizado con distribución binomial y función de ligazón logit. Se complementó con el test LSD de Fisher con un nivel de significancia del 5%. Ambos fosfitos se analizaron por separado.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Identificación molecular de *M. fructicola*

Al observar el gel en luz UV se detectó una banda de 535 pb en las calles de las muestras 1 y 5 pertenecientes a las muestras Monilinia 345 (1 y 10 μ L) corridas en el termociclador Eppendorf. Las muestras cargadas en el otro termociclador no dieron ninguna banda.

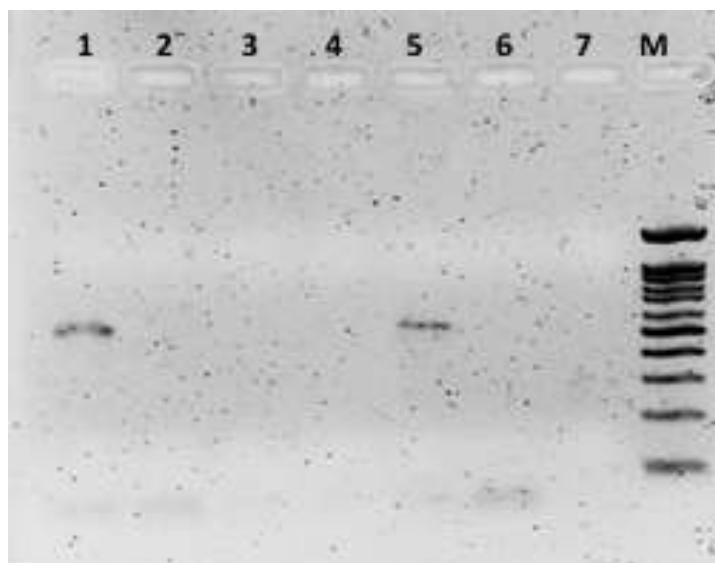


Figura 2. Foto gel muestra Monilinia 345

Ante estos resultados se afirma que la muestra Monilinia 345 con la que se trabajó en esta Tesis correspondió a un aislamiento de *M. fructicola*.

2.3.2. Efectividad *in vitro* de los fosfitos sobre el crecimiento micelial de *M. fructicola*

Se analizó el efecto de los tratamientos con FFK y FFCa, sobre cuatro cepas de *M. fructicola*, en diferentes tiempos de incubación (Tabla 3). Los datos que se muestran en la Tabla 3 corresponden a dos evaluaciones independientes del mismo experimento. Luego, se analizó también cada evaluación de la experiencia por separado, donde se muestran los resultados parciales por cepa (Anexo I).

Los resultados muestran que las cepas se comportaron de manera diferencial ante los tratamientos con fosfitos (Tabla 3) (Figura 2). También se manifestaron diferencias entre tratamientos en cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

FV	F
EVALUACIÓN	110,65**
CEPA	17,44**
EVALUACIÓN x CEPA	24,58**
TRATAMIENTO (Tr)	14,77**
EVALUACIÓN x Tr	3,65**
CEPA x Tr	4,16**
TIEMPO DE INCUBACIÓN (t)	9,80**

EVALUACIÓN x t	65,12**
CEPA x t	5,68**
Tr x t	1,58*

Tabla 3. ANOVA general para el efecto de tratamientos con FFK y FFCa sobre porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para las cepas 341, 345, MS-1 y MS-2. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las fuentes de variación correspondientes a **cepa**, **tratamiento** y **cepa x tratamiento**, son las que fueron comparadas con *test* LSD. Tr= Tratamiento; t= Tiempo de incubación.

En cuanto al efecto de los tratamientos, los FFK 0,2% y FFK 0,3% ejercieron mayor efecto, para las cepas 341 y 345. Para la cepa MS-1, los tratamientos de mayor efectividad fueron los FFK 0,2 %; los FFCa 0,2% y FFCa 0,3%; mientras que para la cepa MS-2, el tratamiento que mayor presión ejerció sobre *M. fructicola* fue el FFK 0,3%, le siguieron FFK 0,2% y FFCa 0,2% (Figura 2).

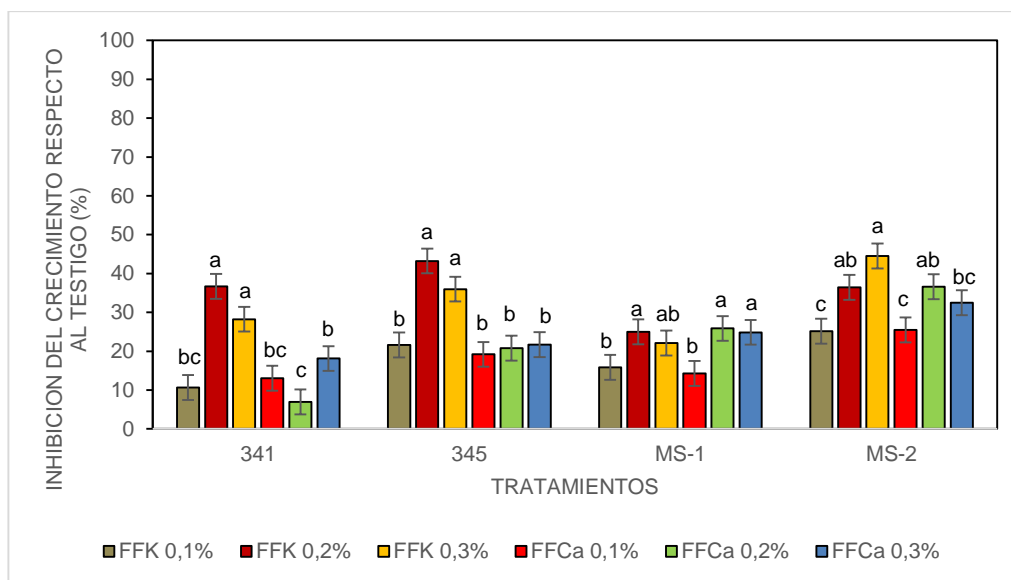
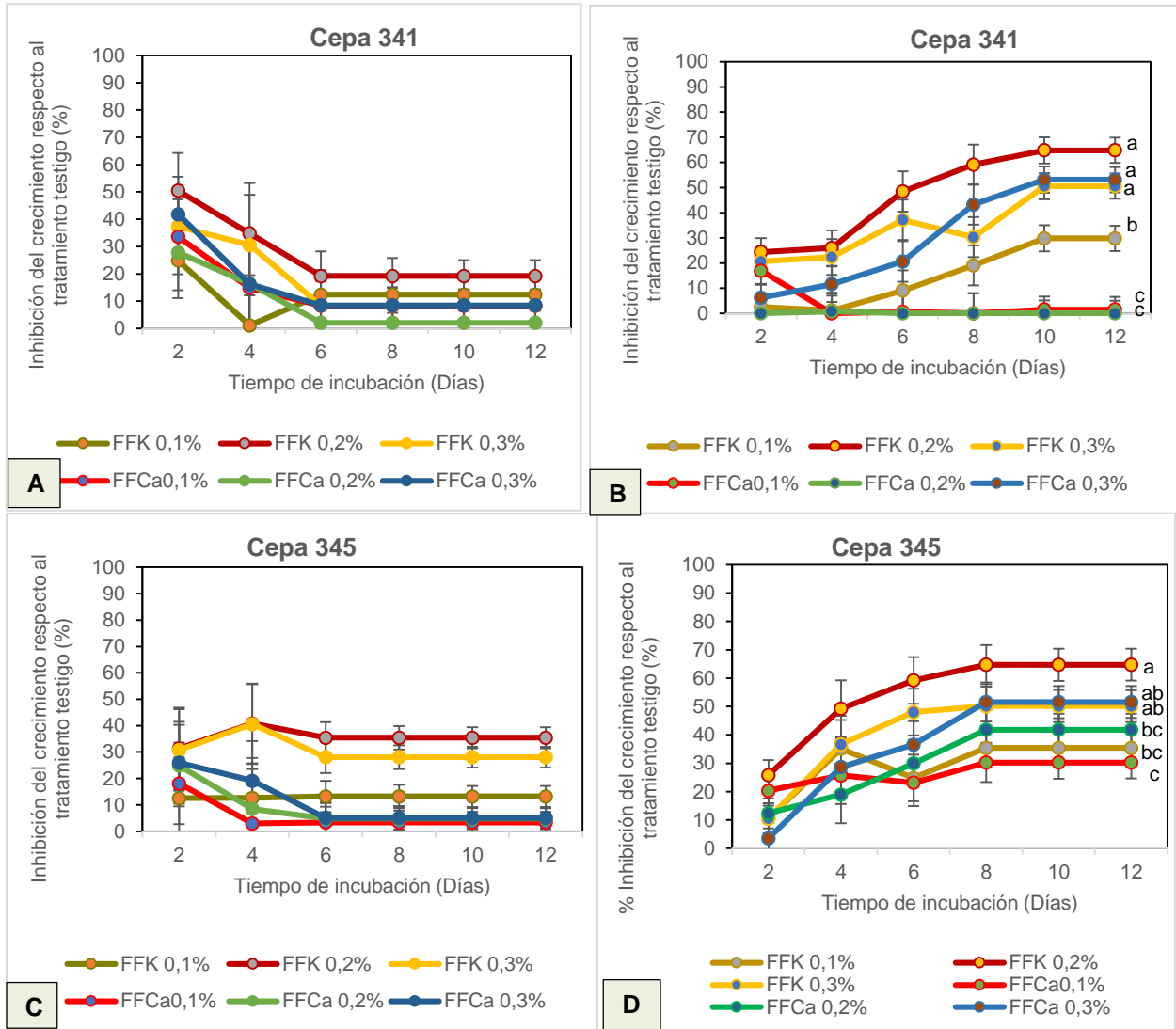


Figura 2. Efecto de los tratamientos con fosfitos de potasio (FFK) y calcio (FFCa), en diferentes dosis (0,1; 0,2 y 0,3%), sobre la inhibición del crecimiento del patógeno (%) en cuatro cepas distintas (341; 345, MS-1 y MS-2). Este gráfico corresponde al promedio de dos evaluaciones y todos los tiempos de incubación. Letras diferentes manifiestan diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

A continuación, se muestra el efecto de los tratamientos de fosfitos sobre cada cepa y en cada evaluación independiente del experimento (Figura 3).



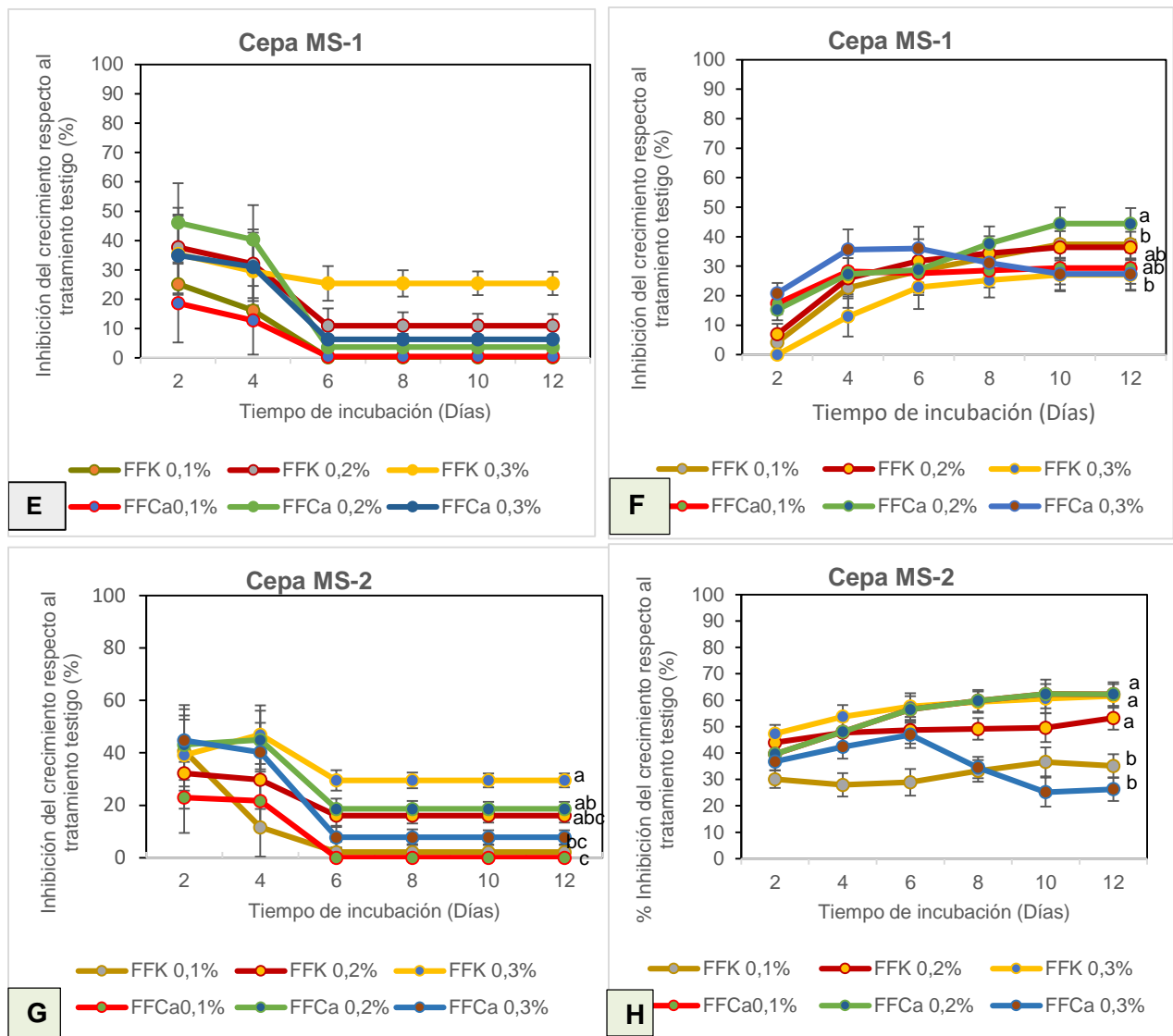


Figura 3. Efecto de tratamientos con fosfitos de potasio (FFK) y calcio (FFCa), a diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento de micelio de cuatro cepas de *M. fructicola*. Los gráficos correspondientes a las letras **A**; **C**; **E** y **G** corresponden a la primera evaluación del experimento, mientras que los gráficos **B**; **D**; **F** y **H**, corresponden a la segunda evaluación. Letras diferentes manifiestan diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Se evidencia además interacción entre evaluación \times tratamientos (Tabla 3), en la cual se observan mayores % I en la segunda evaluación respecto a la primera; aun así, las tendencias del efecto de los fosfitos sobre el crecimiento de las cepas son similares. Se observa que los FFK 0,2% y FFK 0,3% fueron más efectivos en el control del crecimiento *in vitro* de *M. fructicola*. Luego le siguieron en efectividad el FFCa 0,3% y FFCa 0,2% (Figura 4).

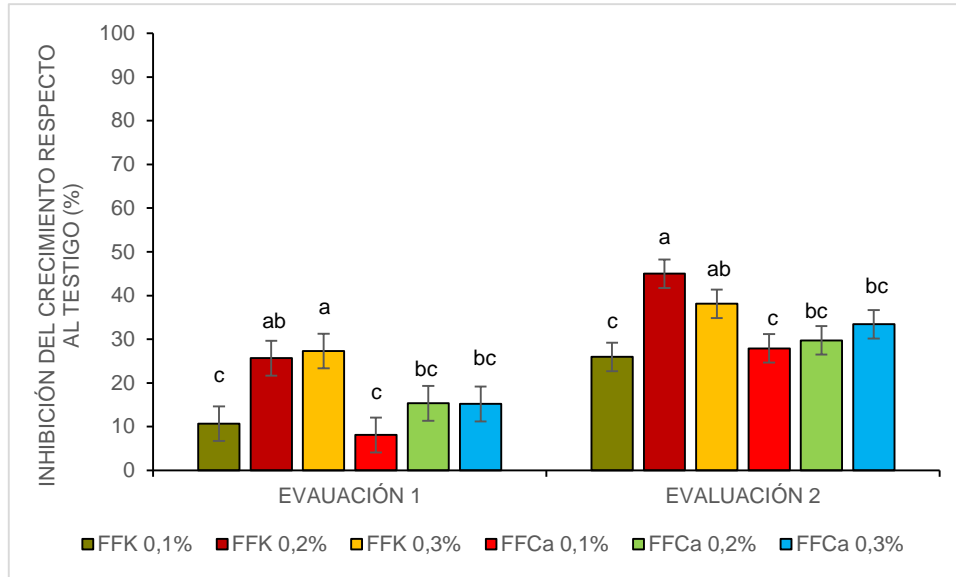


Figura 4. Efecto medio de los tratamientos con fosfitos de potasio (FFK) y calcio (FFCa), en diferentes dosis (0,1; 0,2 y 0,3%), sobre la inhibición del crecimiento de cuatro cepas de *M. fructicola* (%), para las dos evaluaciones del experimento. Letras diferentes manifiestan diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$) entre tratamientos para cada evaluación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

En la Figura 2 se muestra la interacción cepa \times tratamiento, pero también se manifestó interacción significativa evaluación \times cepa (Tabla 3). En la Figura 5 se grafica dicha interacción con el fin de observar el comportamiento de las cepas ante los tratamientos. Como se evidencia en ambas evaluaciones las cepas más sensibles a los tratamientos con fosfitos fueron las cepas 345 (cepa San Pedro) y MS-2 (cepa Mendoza). Ante esta respuesta se eligió trabajar con la CEPA 345 por ser más sensible ante los tratamientos y por ser originaria de la zona de San Pedro.

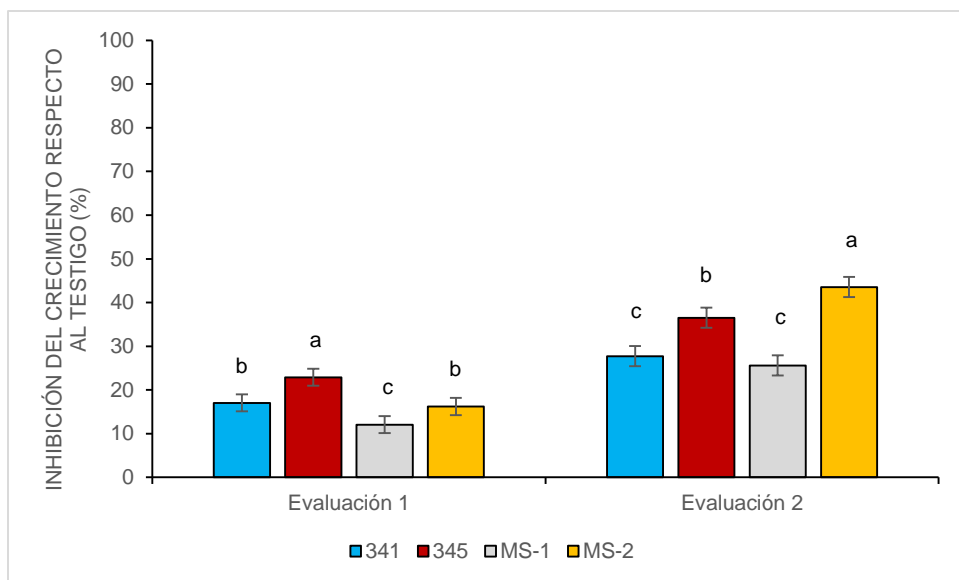


Figura 5. Respuesta de las cuatro cepas de *M. fructicola* sometidas a diferentes tratamientos de fosfitos de potasio (FFK) y calcio (FFCa), para cada evaluación del experimento. Letras diferentes manifiestan diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$) entre cepas para cada evaluación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Además, se hicieron dos evaluaciones más del experimento sobre las cepas 341 y 345, dónde sólo se ensayaron los FFK en diferentes dosis (Tabla 4). Al igual que en las experiencias previas, los FFK 0,2% y FFK 0,3%, fueron los más efectivos en controlar el crecimiento de *M. fructicola*, respecto a la dosis más baja (Figura 6).

FV	F
CEPA	0,15
TRATAMIENTO (Tr)	15,01**
CEPA x Tr	0,69
TIEMPO DE INCUBACIÓN (t)	1,85
CEPA x t	4,75**
Tr x t	0,89

Tabla 4. ANOVA para el efecto de tratamientos con fosfitos de potasio (FFK) a diferentes concentraciones, sobre % de inhibición del crecimiento del patógeno respecto al testigo, para las cepas 341 y 345. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las fuentes de variación correspondientes a tratamiento (Tr) fue comparada con test LSD. Tr= Tratamiento. t= Tiempo de incubación.

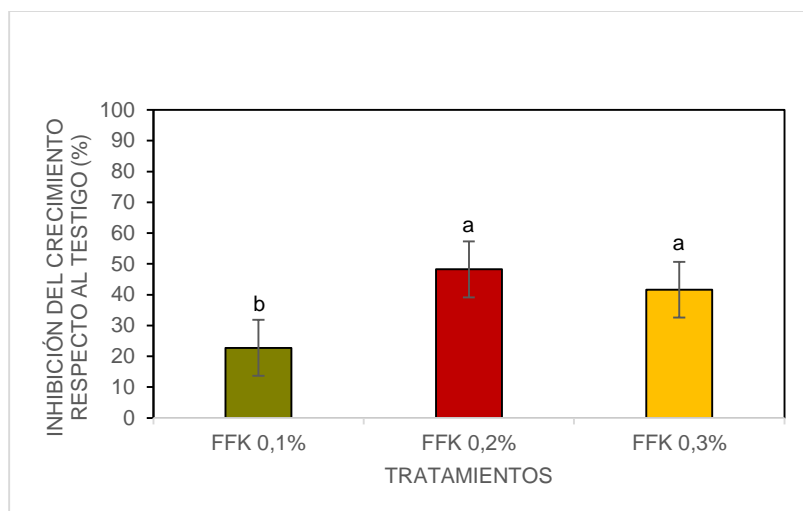


Figura 6. Efecto de los tratamientos con FFK, en diferentes dosis (0,1; 0,2 y 0,3%), sobre la inhibición del crecimiento de *M. fructicola* (%). Letras diferentes manifiestan diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media. Estos resultados corresponden a dos evaluaciones del experimento realizados en diferentes momentos, sobre las cepas 341 y 345.

2.3.3. Efectividad *in vitro* de los fosfitos sobre la geminación de conidios de *M. fructicola*, mediante la técnica de microdilución en caldo.

2.3.3.1. Caracterización cualitativa de la actividad microbiana ante tratamientos.

La figura 7 muestra las placas en donde se realizaron los ensayos de viabilidad mediante el método de MTT. Como puede observarse, existe una relación dosis-respuesta, en donde las concentraciones más altas (1, 2 y 3) inducen una alta caída de la viabilidad del hongo, mientras que, a dosis más bajas, no parece observarse efecto. En ambos casos se observa que el tratamiento químico (Folicur) no manifestó actividad contra el patógeno.

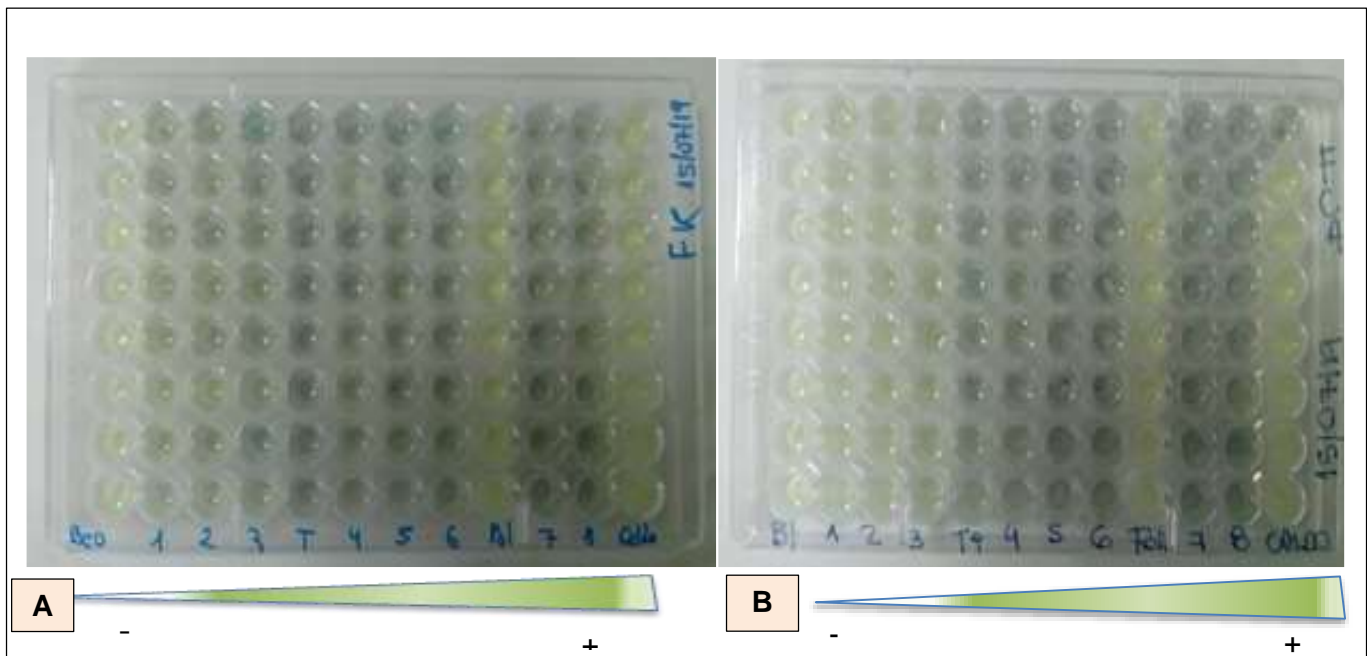


Figura 7. Ensayo de microdilución en placas. **A.** Evaluación de distintas concentraciones de FFK. **B.** Evaluación de distintas concentraciones de FFCa. Donde **1:** 0.5; **2:** 0.4; **3:** 0.3; **4:** 0.2; **5:** 0.1; **6:** 0.05; **7:** 0.025 y **8:** 0.0125%. **Bco.** blanco con agua. **T.** testigo con agua. **Fol.** fungicida comercial Tebuconazole (Folicur). **Caldo.** blanco con caldo PDB.

2.3.3.2. Unidades formadoras de colonias

Ambos fosfitos mostraron diferencias altamente significativas en el porcentaje de inhibición de germinación de conidios respecto al tratamiento testigo (Tabla 5). El FFK a la concentración 0,5% alcanzó valores de inhibición (I) del 100% (CMI), mientras que la dosis de 0,4% manifestó $I=65,20\% \pm 2,8$. Las demás diluciones presentaron $I \leq 28\%$ (Tabla 6). Por otro lado, las concentraciones 0,5 y 0,3% del FFCa mostraron I de $96,67\% \pm 0,94$ y $89,45\% \pm 1,72$, similar al fungicida comercial Tebuconazole $I=100\%$. Las otras dosis presentaron I de germinación menores al 50%. No se obtuvo una CMI para el FFCa (Tabla 7).

	FFK	FFCa
FV	F	F
Tratamiento	27,66**	45,11**
Repetición	22,28**	62,07**

Tabla 5. ANOVA del efecto de diferentes concentraciones de FFK y FFCa sobre porcentaje inhibición de germinación de conidios. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ** indican diferencias altamente significativas ($p < 0,01$).

Tratamientos	porcentaje de Inhibición germinación
FFK 0,5%	100 ± 0,45 a
FFK 0,4%	65,20 ± 2,8 b
FFK 0,3%	18,84 ± 2,27 d
FFK 0,2%	18,84 ± 2,27 d
FFK 0,1%	13,06 ± 1,94 de
FFK 0,05%	12,11 ± 1,87 e
FFK 0,025%	12,11 ± 1,87 e
FFK 0,0125%	27,68 ± 2,64 c
Folicur (Tebuconazole)	100 ± 0,45 a
Caldo	100 ± 0,45 a

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios, luego de los tratamientos con FFK, mediante la expresión de las medias y el error estándar de la media. * Medias con letras diferentes en cada columna, indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD ($P \leq 0,05$).

Tratamientos	% Inhibición germinación
FFCA 0,5%	96,67 ± 0,94 b
FFCA 0,4%	50 ± 3,64 d
FFCA 0,3%	89,45 ± 1,72 c
FFCA 0,2%	22,66 ± 2,47 f
FFCA 0,1%	10,60 ± 1,72 g
FFCA 0,05%	0 ± 0 h
FFCA 0,025%	35,93 ± 2,92 e
FFCA 0,0125%	40,54 ± 3 de
Folicur (Tebuconazole)	100 ± 0,04 a
Caldo	100 ± 0,04 a

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios, luego de los tratamientos con

FFCa, mediante la expresión de las medias y el error estándar de la media. * Medias con letras diferentes en cada columna, indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD ($P \leq 0,05$).

2.4. DISCUSIÓN

Existe evidencia de la efectividad de los fosfitos sobre Oomycetes. La eficacia de los FFK ha sido demostrada contra numerosas especies de hongos, como *Peronospora parasitica*, *Penicillium digitatum* (Cocco *et al.*, 2016), *Colletotrichum gleosporioides* (Ogoshi *et al.*, 2013). En frutos de pepita también se ha demostrado su eficiencia contra *Venturia inaequalis*, *Alternaria alternata* y *Phytophthora cactorum* (Amiri y Bompeix, 2011).

En este trabajo se investigó el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de fosfitos de potasio y calcio sobre *M. fructicola*. Las dosis más altas de fosfitos ensayadas para estudiar la inhibición del crecimiento de *M. fructicola* fueron menores a 1 mg/mL o 3 mL/L (0,3%), mientras que para estudiar la inhibición de germinación de conidios fue de 1,3 mg/mL o 5 mL/L (0,5%).

La concentración de 0,5% de FFK, la cual equivale a 1,3 mg/mL, inhibió completamente la germinación de conidios de *M. fructicola* a 48h de incubación a 25°C; mientras que, para los FFCa, a la misma dosis se obtuvo un 96,67% de inhibición de germinación de conidios. Amiri y Boimpex (2011) encontraron que la germinación de conidios de *Penicillium expansum* se inhibió totalmente a concentraciones de 4mg/ml, lo que equivale a 1,5% de FFK a 96 h de incubación. Es decir que para *P. expansum* se alcanzó la CMI a mayores dosis y mayores tiempos de incubación respecto a los hallado para *M. fructicola* en nuestro experimento. Lai *et al.* (2017) por otra parte, también probaron fosfitos de potasio *in vitro* para *P. expansum* en dosis más bajas respecto a las utilizadas por Amiri y Boimpex (2011), y observaron que los FFK en dosis crecientes hasta alcanzar concentraciones de 5 mmol/L, lo que equivale a concentraciones de 0,2% para nuestro experimento o 0,5 mg/mL FFK, mejoraron la actividad antimicrobiana sobre dicho patógeno, alcanzando un efecto inhibitorio estable en el desarrollo del hongo, y reduciendo la tasa de germinación de esporas por debajo del 15% respecto al control. En cuanto al crecimiento micelial del patógeno, Amiri y Boimpex (2011) observaron que la inhibición fue mayor del 92% 7 días luego de la incubación a concentraciones de 2 mg/mL o 0,76% FFK; mientras que a concentraciones de 1 mg/mL o 0,4% de FFK, la inhibición del crecimiento del hongo fue del 50% o menor. En este trabajo de tesis las dosis ensayadas sobre el crecimiento micelial de *M. fructicola* fueron menores respecto a las ensayadas para *P. expansum*. A dosis de 0,2% (0,5 mg/mL) y 0,3% (0,77 mg/mL) FFK observamos inhibiciones del 30 al 65% a 12 días de

incubación, mientras que para FFCa las inhibiciones encontradas fueron del orden del 30 y 60% dependiendo de la cepa de *M. fructicola*.

Ogoshi *et al.* (2013) también comprobaron la efectividad de FFK sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, ensayando dosis de 5 (0,5% FFK) y 10 mL/L (10% FFK), que inhibieron la germinación de conidios alrededor de 51,1% y 63,1% respectivamente; y la inhibición del crecimiento micelial en un 20,9% y 19,5%, valores más bajos respecto a los encontrados en nuestro trabajo para *M. fructicola*, aunque utilizaron dosis más altas de fosfitos. También existe evidencia de la efectividad de FFK *in vitro* con valores de EC90 500 µg/mL sobre la germinación de conidios y crecimiento micelial de *Alternaria alternata* (Reuveni *et al.*, 2003). En esta tesis, la dosis equivale a la concentración de 0,2% de FFK, con valores de efectividad antimicrobiana menores sobre *M. fructicola*, respecto a los alcanzados por Reuveni *et al.*, 2003.

A partir de los resultados expuestos, los tratamientos con fosfitos inhiben significativamente la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *M. fructicola*, lo que está de acuerdo con las investigaciones de otros autores en otros modelos experimentales. También, de acuerdo con Amiri y Bompeix (2011), fueron necesarias dosis mayores de fosfitos para producir la inhibición de conidios, respecto a la inhibición del crecimiento micelial.

2.5 CONCLUSIONES

Los fosfitos aplicados *in vitro* tienen efecto directo sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios de *M. fructicola*.

Todas las cepas de *M. fructicola* respondieron ante la aplicación de fosfitos *in vitro*, aunque con diferente susceptibilidad.

Los FFK tuvieron, en general, mayor efectividad *in vitro* respecto a los de FFCa. Para ambos fosfitos se necesitaron dosis más altas para inhibir la germinación de conidios respecto al crecimiento del micelio.

Los fosfitos de potasio y calcio, en dosis de 0,2 y 0,3%, podrían ser contemplados en el manejo preventivo de *M. fructicola*.



Capítulo II

Efecto de tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la expresión de síntomas frente a la infección con *M. fructicola*, en distintas etapas del crecimiento del fruto

CAPITULO II

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR *M. fructicola*, EN DISTINTAS ETAPAS DEL CRECIMIENTO DEL FRUTO.

3.1 INTRODUCCION

M. fructicola produce tizón de flores, que luego desarrolla en canchales en los tallos y hacen de fuente primaria de inóculo para infecciones latentes sobre frutos en estado inmaduro. Las infecciones latentes suelen permanecer invisibles, desarrollándose podredumbre sobre el final de temporada en estado de madurez de fruto, particularmente en cultivares de maduración temprana (Emery *et al*, 2000) y en poscosecha (Keske *et al*, 2011). Los frutos de carozo inmaduros generalmente no exhiben síntomas o signos de infección por *M. fructicola*, a menos que el ingreso y colonización se vean favorecidos por lluvia prolongada o humedad seguida de una herida. Sin embargo, aún sin herida, los frutos inmaduros pueden albergar infecciones asintomáticas (Emery *et al*, 2000).

Varios autores mencionan la existencia de un patrón estacional de susceptibilidad en frutales de carozo a *M. fructicola* durante el crecimiento del fruto. El fruto de durazno tiene una curva doble sigmoidea durante su crecimiento, con tres etapas definidas. La etapa I y III se caracterizan por un rápido crecimiento de las paredes del ovario, mientras que en la etapa II o fase intermedia, el crecimiento externo del fruto es escaso. Sin embargo, en esta etapa, se produce el crecimiento del embrión, del endosperma y esclerificación del endocarpio (Casierra *et al.*, 2004; Sozzi, 2007; Gariglio *et al.*, 2014), evento más importante en dicho periodo, la cual comienza a finales de la primera etapa de crecimiento del fruto, se acentúa en la segunda etapa, y en algunos casos, según la variedad, se prolonga hasta la tercera etapa (Casierra *et al.*, 2004). El proceso de desarrollo desde el cuaje hasta madurez tiene una duración variable de 55 a 270 días, entre variedades extremas, de acuerdo al ciclo del cultivar y requerimientos de horas de frío del mismo (Gariglio *et al.*, 2014). Según esto, la etapa II en el desarrollo del fruto es la más variable, mientras que las etapas I y III son similares en una variedad temprana y tardía. La etapa I tiene una duración aproximada de 4 a 5 semanas después de plena floración para los frutos de carozo en variedades tradicionales, mientras que la etapa II puede variar entre 1 a 9 semanas, según la variedad. Finalmente, la etapa III puede abarcar de 4 a 5 semanas antes de plena

madurez (Biggs y Northover, 1988).

Los frutos a inicios de su desarrollo son susceptibles a la infección, mientras que cercano a la etapa de endurecimiento de carozo y formación del embrión se vuelven resistentes, para luego perder esa resistencia en la etapa de maduración (Biggs y Northover, 1988; Northover y Biggs, 1990; Lee y Bostock, 2006; Keske *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2013; Mustafa *et al.*, 2021; Dini *et al.*, 2023).

La naturaleza específica y el momento de cambio de susceptibilidad -resistencia y viceversa- no están claros hasta el momento (Biggs y Northover, 1988; Gradziel, 1994; Mari *et al.*, 2003). Algunos autores sugieren que podría deberse a una resistencia mecánica por parte de los frutos inmaduros a la penetración de conidios, a la presencia de sustancias inhibitoras en tejidos verdes que previenen la penetración de *M. fructicola*, o una respuesta bioquímica por parte del hospedero a la penetración de conidios, inactivando, de esta manera, al patógeno (Mari *et al.*, 2003).

Determinar cómo las infecciones latentes desarrollan durante la temporada de crecimiento de los frutos es un paso importante para el manejo de la enfermedad (Keske *et al.*, 2011). Emery *et al.* (2000), mencionó que las infecciones latentes son más importantes en regiones templadas húmedas, donde la podredumbre de la fruta puede progresar rápidamente. Un mejor conocimiento de la evolución de la susceptibilidad del hospedante durante las distintas etapas del crecimiento del fruto es fundamental para un control más efectivo del patógeno, disminución del costo de producción y de los riesgos medioambientales.

Como se mencionó en el primer capítulo, los fosfitos tienen una acción directa sobre el patógeno e indirecta sobre el hospedante; éstos son absorbidos de forma rápida por la planta y presentan un alto grado de solubilidad y movilidad (Moor *et al.*, 2009; Ogoshi *et al.*, 2013; Yáñez-Juárez, 2017). Además, tienen carácter sistémico (ascendente y descendente), siendo absorbidos por las raíces, los tallos y las hojas (Ogoshi *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluaron los fosfitos en condiciones *in vivo* sobre plantas de duraznos.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de FFK y FFCa sobre la expresión de síntomas en frutos de dos cultivares de duraznero, en distintos estados de desarrollo y sometidos a inoculación en condiciones controladas.

3.2. MATERIALES Y METODOS

Para llevar adelante este objetivo, la metodología de trabajo se dividió en dos experimentos que se desarrollaron en forma simultánea.

1- evaluación del efecto de los tratamientos de fosfitos aplicados en poscosecha, en laboratorio en condiciones controladas, y

2- evaluación del efecto de los tratamientos de fosfitos aplicados en precosecha, mediante pulverizaciones en planta.

Las experiencias se hicieron sobre dos cultivares de duraznero de diferente ciclo de madurez y comportamiento ante la enfermedad. Se seleccionó 'Flordaking' de maduración temprana, y 'Elegant Lady', de maduración intermedia y con alta predisposición a la enfermedad.

3.2.1. Experimento poscosecha

A partir de un mes de plena floración a madurez, se recolectaron frutos de dos cultivares de duraznero, Flordaking y Elegant Lady, de dos lotes experimentales sin aplicación de fungicidas, ubicados en la Estación Experimental INTA San Pedro (Latitud: 33° 41' SUD, Longitud: 59° 41' W.G). El experimento se llevó a cabo durante los años 2015 y 2016, para 'Flordaking', y los años 2015, 2016 y 2017 para 'Elegant lady'. El primer año, las recolecciones se hicieron con frecuencia semanal, mientras que los años restantes se hicieron con frecuencia quincenal. En cada muestreo se extrajeron 1400 frutos, los cuales se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la EEA INTA San Pedro y asperjaron con dosis crecientes (0,1; 0,2 y 0,3%) de FFK (CS P 7,2%; K 12,9%) y FFCa (CS P₂O₅ 29,7%, Ca 12,7%). También se trataron frutos con agua, que sirvieron como controles negativos. Previo a la aplicación de tratamientos, se corrigió la acidez al valor del tratamiento testigo. A la mitad de los frutos (700) se los inoculó con 30 µL de una suspensión de conidios (10⁵ - 10⁶) de *M. fructicola* (cepa 345), con micropipeta en la zona de la sutura (Figura 8) (Northover y Biggs, 1990; Northover y Biggs, 1995); mientras que a la otra mitad se les practicó una herida (H) a una profundidad de 2 mm con un punzón estéril sumergido en la solución de conidios (Figura 9). Los muestreos se realizaron, desde un mes de plena floración hasta madurez, durante el primer año de experimentación, y constaron de 20 frutos/tratamiento/repetición, con cuatro repeticiones completamente aleatorizadas; mientras que para los otros años de experimentación se usó un diseño experimental con tres bloques completamente aleatorizados, con muestras de 20 frutos/tratamiento/repetición. Todos los años,

en cada muestreo semanal se midió con calibre (cm) a una submuestra de frutos y se observó estado de formación de carozo. Las variables analizadas fueron incidencia y severidad de podredumbre morena a los 3 (Dini *et al.*,2022) y 7 días de inoculación, en cada muestreo o cosecha (Cs). La variable incidencia se evaluó como el número de frutos afectados por la podredumbre del total muestreado y la variable severidad como porcentaje de tejido de fruto afectado.



Figura 8. Inoculación de frutos de duraznero en la zona de sutura con suspensión de conidios 10^5 - 10^6 de *M. fructicola*.



Figura 9. Herida del fruto e inoculación con punzón estéril a 2 mm de profundidad.

3.2.2. Experimento precosecha

A partir del año 2016, el ensayo se realizó en ambos cultivares, haciendo las aplicaciones de los tratamientos FFK y FFCa en diferentes dosis (0,1; 0,2 y 0,3%), sobre las plantas en el campo. Previamente se corrigió la acidez al valor del tratamiento testigo. De esta manera, los siete tratamientos se aplicaron sobre dos filas de plantas con un arreglo de tres bloques al azar; 14 plantas por bloque y dos plantas por tratamiento, con una frecuencia quincenal desde un mes de plena floración a cosecha. Al día siguiente de aplicar los tratamientos, se extrajeron 20 frutos por tratamiento por repetición y fueron llevados al laboratorio de EEA INTA San Pedro, donde se

determinó estado de desarrollo de los frutos, en base al tamaño con calibre, y evaluación de formación del carozo y embrión, según la facilidad de apertura del mismo con cuchillo (Lee y Bostock, 2006). Además, de la misma manera que en el experimento de poscosecha, a la mitad de la muestra se la inoculó con 30 μ L de una suspensión de conidios (10^5 - 10^6 /mL) de *M. fructicola* sobre la sutura de los mismos, con micropipeta. Por otro lado, a la mitad restante de la muestra (10 frutos por tratamiento por repetición) se les practicó una herida a dos mm de profundidad, con punzón estéril previo sumergido en la solución de conidios. Se evaluaron las variables incidencia y severidad a los tres y siete días de inoculados. En el año 2017, se repitió este mismo experimento para el cultivar Elegant Lady, por presentar mayor variabilidad en su comportamiento.

3.2.3. Análisis estadístico

Cada ensayo fue analizado de forma separada para las variables incidencia 3 días después de inoculación (DI), incidencia 7DI, severidad 3DI y severidad 7DI con análisis de modelo lineal generalizado mixto mediante el PROC GLIMMIX de SAS con distribución Beta (por tratarse de porcentajes) y función de ligazón *logit*. En todos los ensayos el modelo de análisis contempló la fuente de variación tratamiento, herida y días después de plena floración (DDPF) como efectos simples y las correspondientes interacciones dobles y triples. No se consideró modelo de medidas repetidas debido a que las observaciones en el tiempo (DDPF) fueron tomadas independientemente.

También, se realizó el análisis conjunto de todos los ensayos tomando solo la fecha de madurez con la misma distribución y función de ligazón, que además tiene en cuenta la heterogeneidad de variancias por ser modelo mixto.

Por otro lado, se hizo un análisis de regresión simple entre las variables incidencia y severidad a 7 días, y variables climáticas: temperatura mínima, temperatura máxima, heliofanía, humedad relativa y precipitaciones acumuladas, para ambos cultivares.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en 'Flordaking'

En ambos experimentos (tratamientos de poscosecha y precosecha), las variables incidencia (Tabla 8) y severidad (Tabla 9) presentaron diferencias significativas a lo largo del

desarrollo del fruto. Además, se evidenció un comportamiento diferencial ante la enfermedad, en los frutos heridos y no heridos, en los diferentes estados de desarrollo del fruto, para la incidencia en el experimento poscosecha (Figura 10) y a los siete días después de inoculación en experimento precosecha (Figura 11). La severidad en el experimento poscosecha (Figura 12), a tres y siete días después de inoculación, también mostró diferencias entre frutos heridos y no heridos en los distintos estados de desarrollo del fruto, pero no así en el experimento precosecha. Las diferencias ante el desarrollo de la enfermedad en frutos heridos y no heridos tendieron a minimizarse en etapas previas a la cosecha (90-95 DDPF). Dicho comportamiento, podría deberse a que la epidermis, primera barrera ante la entrada del patógeno, en estados avanzados de madurez es delgada y con microfisuras, siendo el fruto más susceptible a la enfermedad.

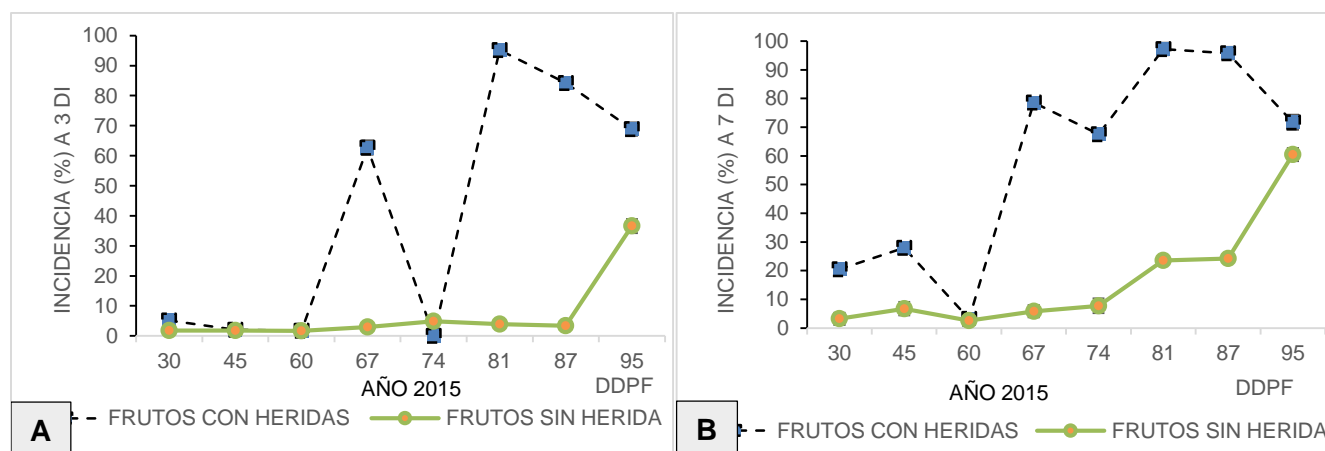
Respecto a los tratamientos con fosfitos, para las variables incidencia (Tabla 8) y severidad (Tabla 9), no se manifestaron diferencias significativas en ninguno de los dos experimentos. Sin embargo, hubo interacción estadísticamente significativa entre tratamientos y DDPF a siete días de inoculación para incidencia (Tabla 8) y severidad (Tabla 9), durante el primer año de experimentación poscosecha. Durante el segundo año se mantuvo dicha interacción a tres días de inoculación sólo para la variable incidencia (Tabla 8). Además, se manifestó triple interacción entre Tr x H x DDPF para los tratamientos poscosecha, a 3DI en el año 2015 para la variable incidencia (Tabla 8), la cual se muestra en el ANEXO II.

INCIDENCIA (%) 'Flordaking'						
FV	TRATAMIENTOS POSCOSECHA				TRATAMIENTOS PRECOSECHA	
	2015		2016		2016	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F	F	F
Tr	0,90	1,88	1,79	1,28	0,19	0,16
H	908,33**	1014,95**	20,44**	1,53	0,00	2,33
Tr x H	1,81	3,12**	1,32	0,33	0,51	0,16
DDPF	174,03**	185,45**	69,47**	152,32**	21,06**	91,9**
Tr x DDPF	1,09	2,47**	1,68*	1,27	0,18	0,40
H x DDPF	88,77**	66,82**	10,45**	4,78**	1,42	4,10**
Tr x H x DDPF	1,67**	1,03	1,41	0,39	0,52	0,53

Tabla 8. Análisis de variancia para la variable incidencia (%) de podredumbre morena, a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos cultivar Flordaking; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en poscosecha y precosecha, en dos años consecutivos. DI= días después de inoculación; Tr= Tratamiento; H= heridas; DDPF= días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticas significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

SEVERIDAD (%) 'Flordaking'						
FV	TRATAMIENTOS POSCOSECHA				TRATAMIENTO PRECOSECHA	
	2015		2016		2016	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F	F	F
Tr	0,87	0,91	0,94	1,42	0,41	0,09
H	220,89**	870,03**	17,51**	0,03	0,13	0,36
Tr x H	0,57	2,99**	0,52	0,36	0,33	0,14
DDPF	170,69**	216,94**	44,74**	341,03**	21,05**	116,93**
Tr x DDPF	1,01	1,98**	1,20	0,98	0,55	0,60
H x DDPF	24,65**	58,73**	10,49**	5,27**	0,07	1,31
Tr x H x DDPF	0,97	1,28	1,13	0,72	0,44	0,27

Tabla 9. Análisis de variancia para la variable severidad (%) de podredumbre morena, a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos cultivar Flordaking; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en poscosecha y precosecha, en dos años consecutivos. **DI=** días después de inoculación; **Tr=** Tratamiento; **H=** heridas; **DDPF=** días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticas significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).



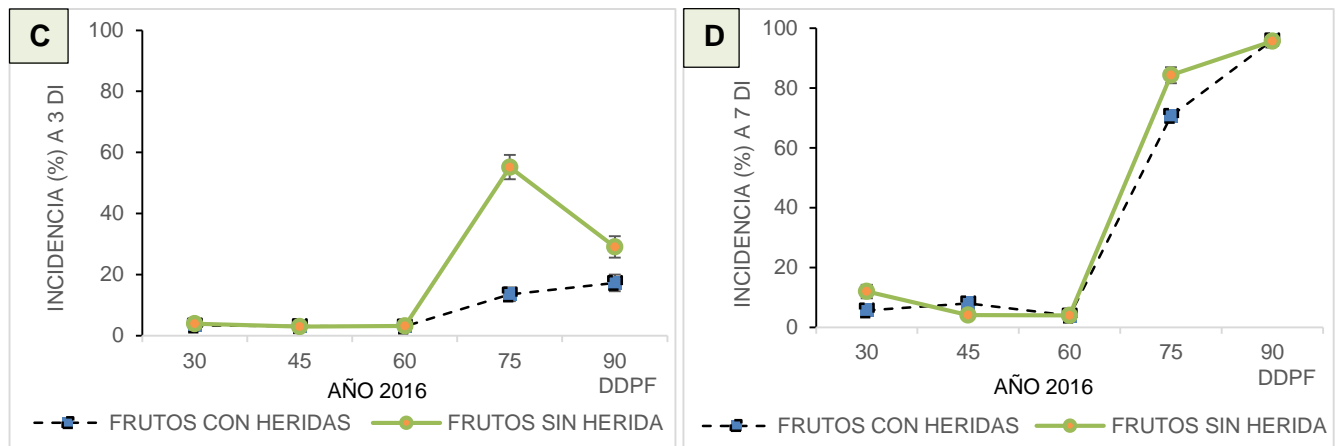


Figura 10. Incidencia (%) de podredumbre morena en frutos heridos y no heridos a lo largo de su desarrollo, durante dos años consecutivos. Experimento poscosecha. **A y B.** Incidencia (%) a 3 y 7 días de inoculación - año 2015. **C y D.** Incidencia (%) a 3 y 7 días de inoculación – año 2016. 'Flordaking'. **DI=** Días desde inoculación. **DDPF=** Días después de plena floración

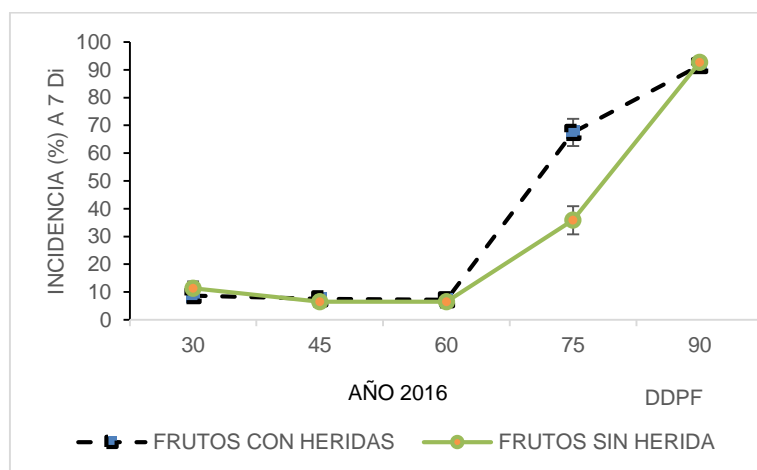


Figura 11. Incidencia (%) de podredumbre morena de frutos heridos y no heridos a lo largo de su desarrollo. Experimento precosecha 'Flordaking'. Año 2016. **DI=** Días desde inoculación. **DDPF=** Días después de plena floración.

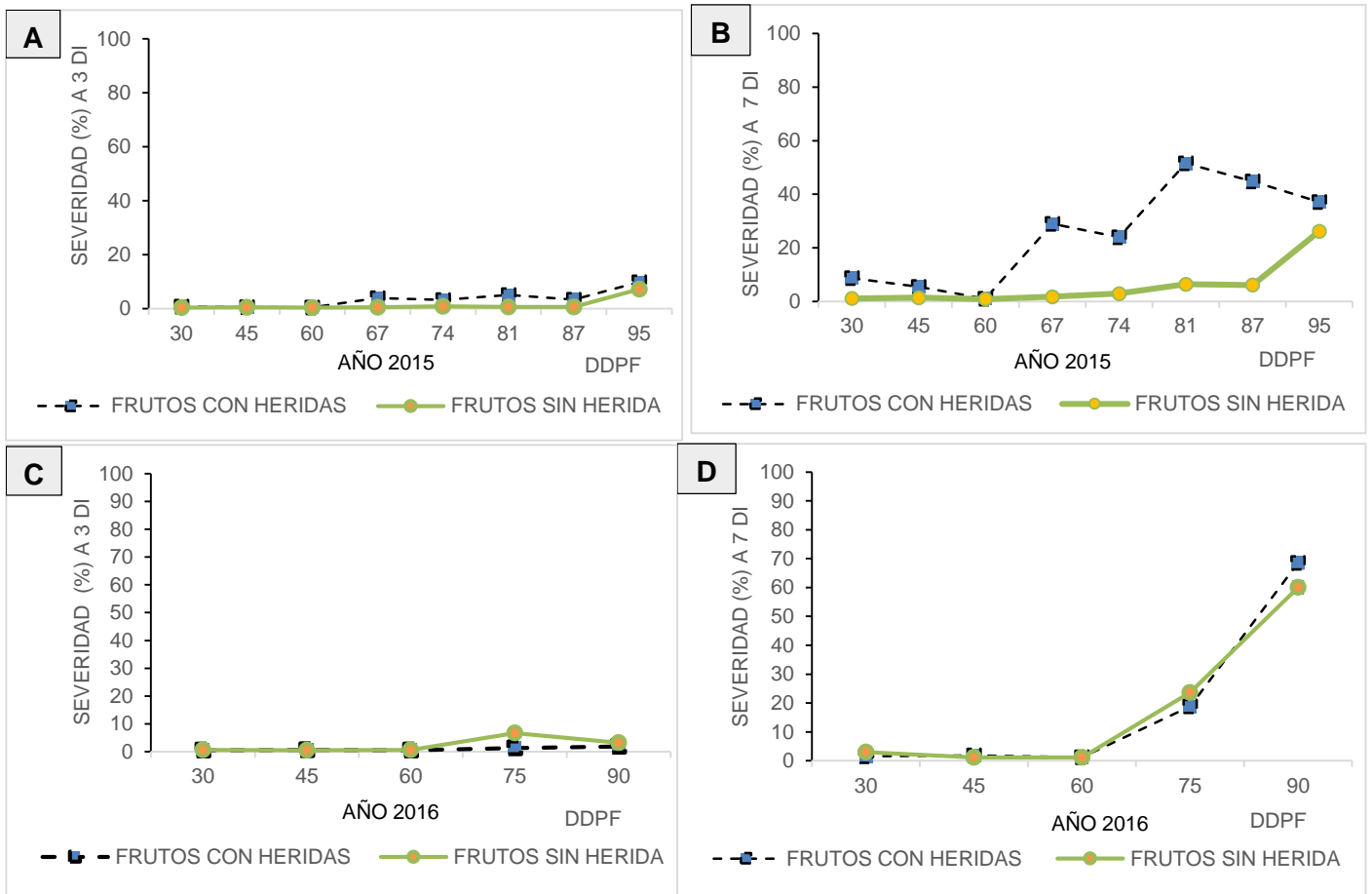


Figura 12. Severidad (%) de podredumbre morena en frutos heridos y no heridos a lo largo de su desarrollo, durante dos años consecutivos. Experimento poscosecha. **A y B.** Severidad (%) a 3 y 7 días de inoculación - año 2015. **C y D.** Severidad (%) a 3 y 7 días de inoculación – año 2016. Cultivar Flordaking. **DI=** Días desde inoculación. **DDPF=** Días después de plena floración.

En cuanto al comportamiento de los tratamientos a siete DI, el FFK 0,1% y 0,3% a 67 DDPF, y el FFK 0,3% a los 87 DDPF mostraron menores valores de incidencia respecto al testigo sin tratar. A 95 DDPF el FFCa 0,3%, redujo la incidencia en un 21% respecto al testigo (Tabla 10) en el año 2015. Al año siguiente, a tres DI los tratamientos más efectivos para la incidencia fueron FFK 0,3% y los fosfitos de calcio en sus tres dosis, a 90 DDPF.

TRATAMIENTOS POSCOSECHA				
AÑO	2015			2016
DDPF	67	87	95	90
DI	7 Dias			3 Dias
TESTIGO	44,09 ± 6,32 ab	73,77 ± 5,27 ab	69,30 ± 4,45 a	48,89 ± 7,17 a
FFK0,1%	20,60 ± 4,53 c	73,24 ± 5,61 abc	70,22 ± 4,41 a	21,60 ± 5,90 bc
FFK 0,2%	27,32 ± 5,71 bc	76,35 ± 5,29 ab	68,79 ± 4,49 a	36,82 ± 6,93 ab
FFK 0,3%	23,31 ± 4,69 c	57,12 ± 6,29 c	66,01 ± 4,64 a	19,19 ± 5,28 c
FFCa 0,1%	34,72 ± 6,31 bc	83,56 ± 3,77 a	69,69 ± 4,44 a	13,90 ± 4,27 c
FFCa 0,2%	54,87 ± 7,06 a	81,78 ± 4,31 a	70,32 ± 4,39 a	11,67 ± 3,74 c
FFCa 0,3%	27,20 ± 5,68 bc	60,64 ± 6,59 bc	48,14 ± 5,35 b	19,03 ± 5,23 c

Tabla 10. Estudio de la variable incidencia (%) de podredumbre morena en frutos ‘Flordaking’ ante distintos tratamientos poscosecha. Los resultados muestran las medias y sus correspondientes desvíos estándar. **DDPF=** Días después de plena floración o edad del fruto. **DI=** Días después de inoculación en condiciones controladas de laboratorio con *M. fructicola*. **FFK=** Fosfitos de potasio. **FFCa=** Fosfitos de calcio. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

Para la severidad, se manifestó comportamiento diferencial entre tratamientos poscosecha a siete DI, a 67 y 95 DDPF en el año 2015. A 67 DDPF los tratamientos más efectivos fueron los FFK en sus tres dosis respecto al testigo, mientras que a 95 DDPF el FFCa 0,3% se destacó con valores de severidad del 19% mientras que el testigo presentó 34% (Tabla 11).

TRATAMIENTOS POSCOSECHA		
AÑO	2015	
DDPF	67	95
DI	7 Dias	
TESTIGO	12,03 ± 2,05 a	34 ± 2,50 a
FFK0,1%	5,66 ± 1,30 c	35,5 ± 2,55 a
FFK 0,2%	5,76 ± 1,35 c	33,68 ± 2,50 a
FFK 0,3%	6,24 ± 1,36 bc	31,20 ± 2,40 a
FFCa 0,1%	9,94 ± 1,93 abc	34,6 ± 2,50 a
FFCa 0,2%	10,47 ± 1,91 ab	34,2 ± 2,50 a
FFCa 0,3%	7,53 ± 1,65 abc	19,3 ± 2,26 b

Tabla 11. Estudio de la variable severidad (%) de podredumbre morena en frutos ‘Flordaking’ ante distintos tratamientos poscosecha, a 67 y 95 DDPF. Los resultados muestran las medias y sus correspondientes desvíos estándar en frutos cv. Flordaking. Año 2015. **DDPF=** Días después de plena floración o edad del fruto. **DI=** Días después de inoculación en condiciones controladas de laboratorio con *M. fructicola*. **FFK=** Fosfitos de potasio. **FFCa=** Fosfitos de calcio. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

Para ambas variables se observa una manifiesta tendencia del fruto 'Flordaking' a contraer enfermedad con *M. fructicola* en la etapa final de madurez de fruto (etapa III). En etapas iniciales (Etapa I) del fruto, también se observa enfermedad a 7DI. Del mismo modo, en los experimentos se evidencia una menor predisposición del fruto a enfermarse a los 60 DDPF, coincidiendo con el final de endurecimiento del endocarpio y formación del embrión (etapa II).

3.3.2. Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en cultivar Elegant Lady

La variable incidencia manifestó interacción entre frutos heridos y DDPF todos los años para los experimentos de poscosecha y precosecha, a excepción de 3 DI en el año 2017 (Tabla 12 y 13). Los frutos manifestaron una mayor predisposición a enfermarse en los estados finales cercanos a cosecha, al igual que 'Flordaking'. Por otro lado, durante el período de formación del endocarpio (45 a 90 DDPF), se observó variabilidad en su comportamiento ante la enfermedad en los diferentes años, con un pico de incidencia cercano a los 73 - 75 DDPF y posterior caída entre 80 y 90 DDPF, que se hizo más notorio en frutos heridos y coincidiendo con el final de la etapa II (Figura 13).

Además, hubo interacción tratamientos x DDPF en los experimentos de poscosecha durante los años 2015 y 2017; y una interacción triple tratamiento x herida x DDPF en el año 2015 y a 7 DI en el año 2017 para los experimentos de poscosecha, la cual se muestra en el ANEXO II. En el año 2015 las diferencias entre tratamientos se manifestaron desde 52 DDPF a 73 DDPF, etapa II de desarrollo del fruto para esta variedad; mientras en 2017 las diferencias se expresaron sólo a los 73 DDPF. En el año 2015, los FFK 0,1%, 0,2% y 0,3% presentaron valores más bajos de incidencia ante la enfermedad a tres DI a 73 DDPF, manteniéndose dichas diferencias a siete DI, con valores de entre 30 y 50% menos respecto al testigo; a excepción del FFK 0,1%. Además, los FFK 0,1, 0,2 y 0,3% también manifestaron diferencias de incidencia respecto al testigo a siete DI a los 52 y 58 DDPF. Los FFCa 0,1 y 0,2% si bien manifestaron ser efectivos a tres y siete DI a 73 DDPF, y a 7DI a 58 DDPF, el FFCa 0,3% mostró un comportamiento más estable en el tiempo, desde los 52 a los 73 DDPF, a siete DI en el año 2015 y repitiendo la efectividad a los 73 DDPF del año 2017 (Tabla 14).

TRATAMIENTOS POSCOSECHA						
FV	2015		2016		2017	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F	F	F
Tr	3,05**	5,70**	2,08*	1,11	1,77	8,61**
H	292,13**	456,35**	93,57**	119,17**	22,43**	123,98**
Tr x H	1,83	6,37**	1,60	0,39	1,27	3,49**
DDPF	44,09**	168,71**	119,64**	124,24**	75,96**	145,31**
Tr x DDPF	1,37*	2,48**	0,93	0,51	2,22**	3,66**
H x DDPF	61,50**	92,44**	30,18**	19,53**	6,09**	13,96**
Tr x H x DDPF	2,16**	5,83**	1,40	0,98	0,91	1,53*

Tabla 12. Análisis de variancia para la variable incidencia (%) de podredumbre morena, medida a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos 'Elegant Lady'; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en poscosecha en diferentes años. **Tr:** Tratamiento; **H:** heridas; **DDPF:** días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

TRATAMIENTOS PRECOSECHA				
FV	2016		2017	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F
Tr	0,79	1,77	0,52	0,94
H	34,74**	41,69**	1,99	30,87**
Tr x H	0,94	0,72	0,08	0,84
DDPF	33,51**	28,88**	19,66**	67,17**
Tr x DDPF	1,06	0,94	0,82	0,56
H x DDPF	37,22**	14,35**	0,79	12,26**
Tr x H x DDPF	0,71	0,75	0,17	0,25

Tabla 13. Análisis de variancia para la variable incidencia (%) de podredumbre morena, medida a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos 'Elegant Lady'; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en precosecha en diferentes años. **Tr:** Tratamiento; **H:** heridas; **DDPF:** días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

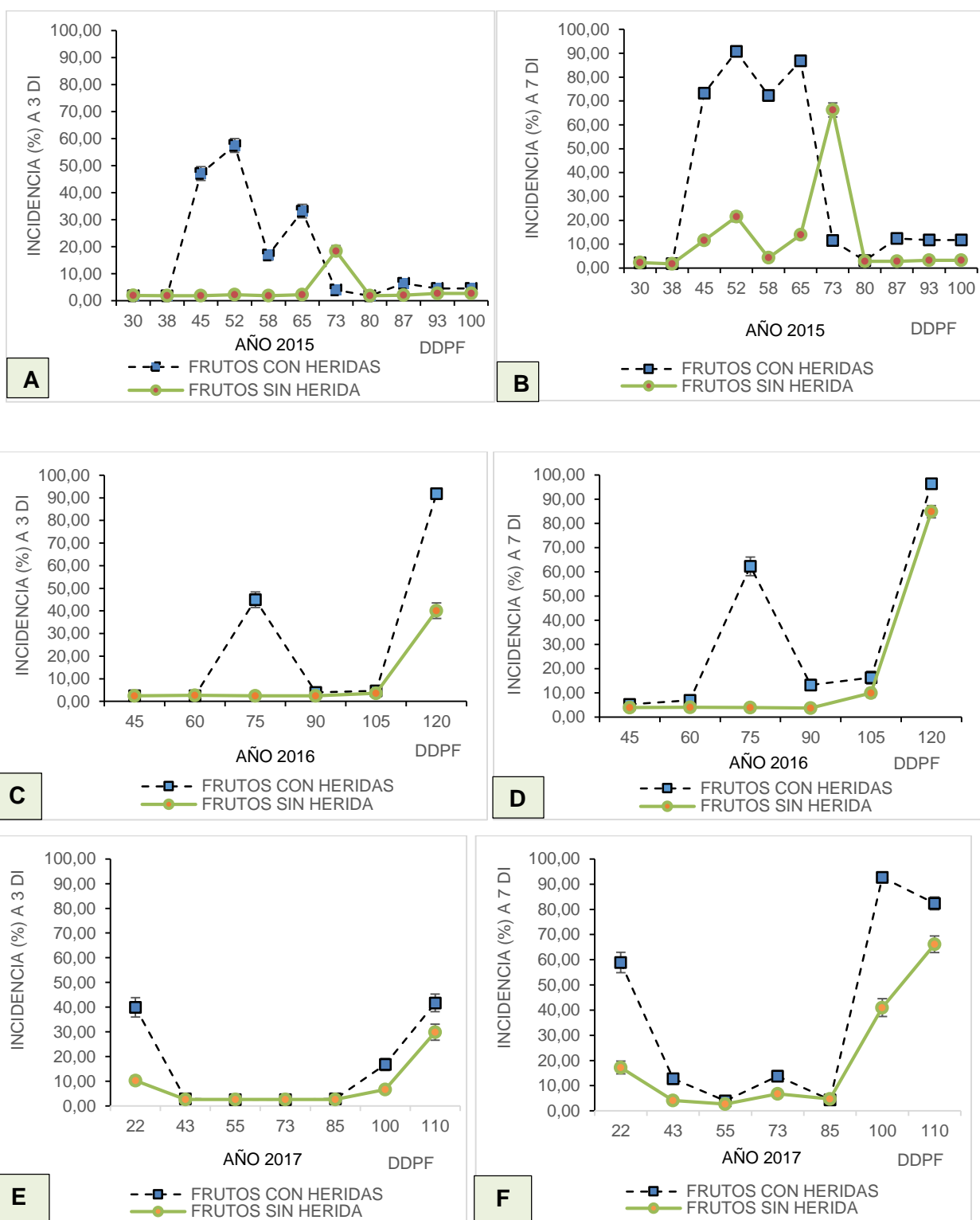


Figura 13. Incidencia (%) de podredumbre morena en frutos heridos y no heridos a lo largo de su desarrollo, ante tratamientos poscosecha con fosfitos, durante tres años consecutivos. **A y B.**

Incidencia (%) a 3 y 7 días de inoculación - año 2015. **C** y **D**. Incidencia (%) a 3 y 7 días de inoculación – año 2016. **E** y **F**. Incidencia (%) a 3 y 7 días de inoculación – año 2017. Cultivar Elegant Lady. **DI**= Días desde inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración.

TRATAMIENTOS POSCOSECHA							
AÑO	2015						2017
DI	3 Dias			7 Dias			7 Dias
DDPF	58	65	73	52	58	73	73
TESTIGO	9,15 ± 2,13 a	9,92 ± 2,52 ab	25,58 ± 4,06 a	76,32 ± 5,02 a	62,31 ± 6,07 a	60,95 ± 4,52 a	21,40 ± 5,07 a
FFK 0,1%	3,43 ± 1,08 c	8,23 ± 2,15 bc	9,22 ± 2,36 b	52,71 ± 5,84 bc	14,41 ± 3,38 c	48,04 ± 7,16 ab	14,66 ± 4,17 a
FFK 0,2%	5,64 ± 1,59 abc	11,85 ± 2,91 ab	9,60 ± 2,44 b	50,27 ± 5,20 c	20,33 ± 4,42 bc	31,40 ± 6,21 b	19,73 ± 4,88 a
FFK 0,3%	3,74 ± 1,16 bc	18,83 ± 4,18 a	3,68 ± 1,15 c	56,60 ± 6,72 bc	16,64 ± 3,81 bc	9,36 ± 2,37 c	13,37 ± 3,93 ab
FFCa 0,1%	4,54 ± 1,35 abc	9,88 ± 2,51 ab	9,45 ± 2,42 b	69,81 ± 6,13 ab	23,83 ± 4,68 bc	30,80 ± 6,23 b	4,02 ± 1,54 c
FFCa 0,2%	9,19 ± 2,36 a	8,97 ± 2,31 bc	6,57 ± 1,79 bc	75,07 ± 4,06 a	25,15 ± 5,46 bc	34,47 ± 6,09 b	5,37 ± 1,98 bc
FFCa 0,3%	7,69 ± 2,04 ab	4,39 ± 1,35 c	6,95 ± 1,88 bc	48,93 ± 6,07 c	27,97 ± 5,04 b	34,43 ± 6,21 b	3,84 ± 1,49 c

Tabla 14. Incidencia de podredumbre morena en frutos 'Elegant lady', a 3 y 7 días de inoculación en diferentes estados de desarrollo, para las campañas 2015 y 2017. Medias y desvíos del efecto de los tratamientos poscosecha de FFK y FFCa. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

Para la variable severidad, se observa interacción H * DDPF para todos los años en ambos experimentos, a excepción de 3 DI del año 2017 en experimentos de precosecha (Tabla 15 y Tabla 16). La predisposición a contraer enfermedad se iguala entre frutos heridos y no heridos a los 100 a 120 DDPF, etapas finales de madurez (Figura 14), al igual que ocurrió en 'Flordaking', pudiendo deberse a que la epidermis del fruto en esos estados es más fina y presenta microfisuras.

La respuesta ante *M. fructicola* de 'Elegant Lady' varió en los diferentes años de experimentación, sin embargo, se puede decir que se manifiestan momentos de mayor susceptibilidad o mayor resistencia. Durante la etapa II de formación del fruto, período que abarca desde los 45 DDPF a 90 DDPF aproximadamente, se observó presencia de la enfermedad en los diferentes años. Sin embargo, hubo una tendencia que se repitió, con un pico entre los 73 y 75 DDPF y posterior caída de la susceptibilidad entre los 85 y 90 DDPF, momento de finalización de la etapa II, e inicios de la etapa III en el desarrollo del fruto. Este comportamiento fue más marcado para frutos heridos, aunque también se dio en frutos no heridos. La predisposición a enfermarse volvió a aumentar en la etapa III de madurez del fruto, siendo muy marcada. En el año 2015 no fue tan pronunciado el pico de enfermedad en etapas finales de desarrollo respecto a los otros dos años de experimentos (Figura 14-B), debido a las escasas precipitaciones y a que los frutos se cosecharon antes (100 DDPF).

Además, hubo interacción Tr x DDPF en el año 2015 y a 3DI del año 2017 en los experimentos de poscosecha (Tabla 15). Por otro lado, se observó triple interacción Tr x H x DDPF para las experiencias de poscosecha en el año 2015 (Tabla 15), las cuales se podrán ver en el ANEXO II.

TRATAMIENTOS POSCOSECHA						
FV	2015		2016		2017	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F	F	F
Tr	2,53*	4,84**	0,61	1,50	1,15	2,00
H	171,47**	327,06**	22,30**	83,82**	4,91*	43,10**
Tr x H	1,47	4,10**	0,77	0,63	1,01	1,36
DDPF	42,59**	212,80**	142,75**	224,79**	66,66**	226,99**
Tr x DDPF	2,11**	3,16**	0,49	0,51	2,09**	1,13
H x DDPF	45,05**	87,06**	6,87**	16,58**	3,23**	11,41**
Tr x H x DDPF	1,75**	5,50**	1,01	0,92	0,88	0,75

Tabla 15. Análisis de variancia para la variable severidad (%) de podredumbre morena, medida a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos 'Elegant Lady'; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en poscosecha en diferentes años. **Tr:** Tratamiento; **H:** heridas; **DDPF:** días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

TRATAMIENTOS PRECOSECHA				
FV	2016		2017	
DI	3 DIAS	7 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
FV	F	F	F	F
Tr	0,49	1,12	0,61	0,75
H	7,53**	22,95**	0,15	29,44**
Tr x H	0,30	0,58	0,13	0,32
DDPF	8,74**	29,86**	29,33**	64,69**
Tr x DDPF	0,56	0,65	1,03	0,56
H x DDPF	8,46**	15,22**	0,43	8,67**
Tr x H x DDPF	0,30	0,74	0,22	0,26

Tabla 16. Análisis de variancia para la variable severidad (%) de podredumbre morena, medida a 3 y 7 días de inoculadas (DI) con *M. fructicola*, en frutos heridos y no heridos 'Elegant Lady'; sometidos a diferentes tratamientos de FFK y FFCa, aplicados en precosecha en diferentes años. **Tr:** Tratamiento; **H:** heridas; **DDPF:** días después de plena floración o edad del fruto. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas (prueba LSD de Fisher, $p < 0,01$).

En cuanto a los tratamientos, se puede observar que los FFK 0,1 y 0,2%, y las tres dosis de FCCa, son los que mayor efecto ejercieron sobre el porcentaje de área dañada del fruto, a 3DI y los FFK y FCCa en sus tres dosis, a 7DI en el año 2015 (Tabla 17).

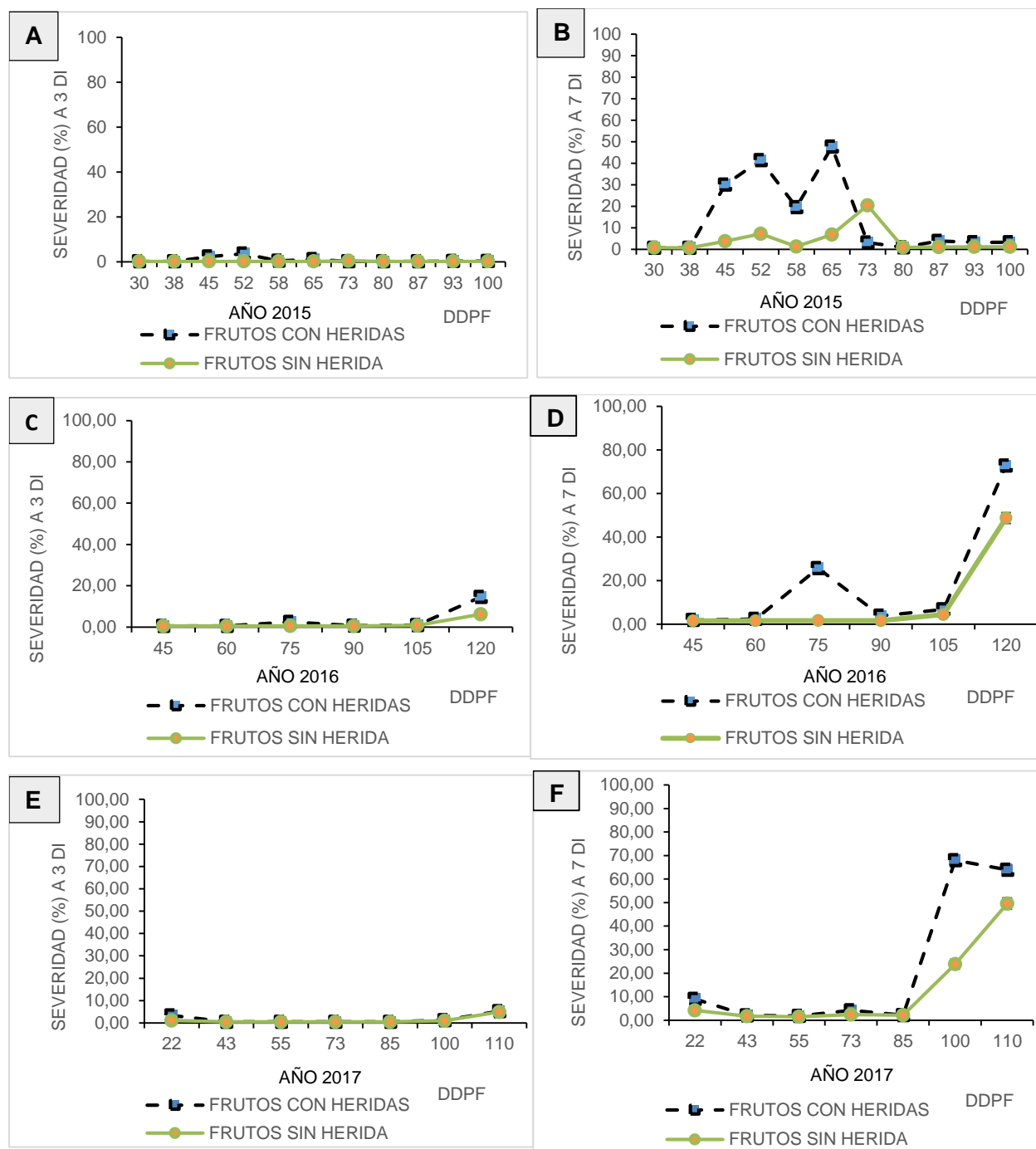


Figura 14. Severidad (%) de podredumbre morena en frutos heridos y no heridos a lo largo de su desarrollo, ante tratamientos poscosecha con fosfitos, durante tres años consecutivos. **A y B.** Severidad (%) a 3 y 7 días de inoculación, año 2015. **C y D.** Severidad (%) a 3 y 7 días de

inoculación, año 2016. **E y F.** Severidad (%) a 3 y 7 días de inoculación, año 2017. Cultivar Elegant Lady. **DI**= Días desde inoculación. **DDPF**= Días después de floración.

TRATAMIENTOS POSCOSECHA					
AÑO	2015				
DI	3 Dias			7 Dias	
DDPF	45	93	100	58	73
TESTIGO	0,93 ± 0,18 a	0,60 ± 0,11 a	0,60 ± 0,11 a	13,61 ± 1,89 a	22,88 ± 1,93 a
FFK0,1%	0,80 ± 0,15 ab	0,14 ± 0,04 d	0,14 ± 0,04 d	4,09 ± 0,91 b	9,75 ± 1,74 b
FFK 0,2%	0,47 ± 0,10 bc	0,32 ± 0,07 bc	0,32 ± 0,07 bc	5,06 ± 1,08 b	7,57 ± 1,55 b
FFK 0,3%	0,41 ± 0,08 c	0,39 ± 0,08 ab	0,39 ± 0,08 ab	4,29 ± 0,97 b	3,36 ± 0,79 c
FFCa 0,1%	0,76 ± 0,15 ab	0,19 ± 0,05 cd	0,19 ± 0,05 cd	4,46 ± 1,01 b	6,06 ± 1,35 bc
FFCa 0,2%	0,82 ± 0,16 ab	0,25 ± 0,06 bcd	0,25 ± 0,06 bcd	5,23 ± 1,20 b	7,46 ± 1,48 b
FFCa 0,3%	0,78 ± 0,15 ab	0,28 ± 0,07 bcd	0,28 ± 0,07 bcd	4,59 ± 1,01 b	10,22 ± 1,66 b

Tabla 17. Severidad de podredumbre morena en frutos 'Elegant Lady', a 3 y 7 días de inoculación en diferentes estados de desarrollo, para la campaña 2015. Medias y desvíos para los tratamientos poscosecha, de fosfitos de potasio (FFK) y fosfitos de calcio (FFCa). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Método LSD Fisher.

También se analizaron ambos cultivares en conjunto, con todos los años ensayados y los dos experimentos (tratamientos poscosecha y precosecha), en el estado de madurez del fruto (etapa III), con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos con fosfitos sobre la enfermedad en el estado más susceptible del fruto. En la Tabla 18 podemos observar que se manifestó diferencias entre tratamientos con fosfitos en ambos cultivares para la variable incidencia a siete DI, no así para la severidad. El tratamiento más efectivo ante la incidencia de ambos cultivares fue el FFK 0,2% (Figura 15).

Effect	F Value	Pr > F
Trat	2.20	0.0433
H	37.66	<.0001
Trat*H	1.12	0.3528
ENS	109.56	<.0001
ENS*Trat	1.39	0.0653
ENS*H	3.20	0.0029
ENS*Trat*H	1.01	0.4604

Tabla 18. Análisis de variancia para la variable incidencia a 7 días de inoculación, en estado de madurez de fruto, para todos los ensayos de poscosecha y precosecha durante los años, 2015, 2016, 2017, en ambos cultivares. **Tr**= tratamientos; **H**= herida. **ENS**= Ensayo. ** ($p < 0,01$) = diferencias estadísticamente significativas; * ($p < 0,05$) = diferencias significativas. Test LSD Fisher.

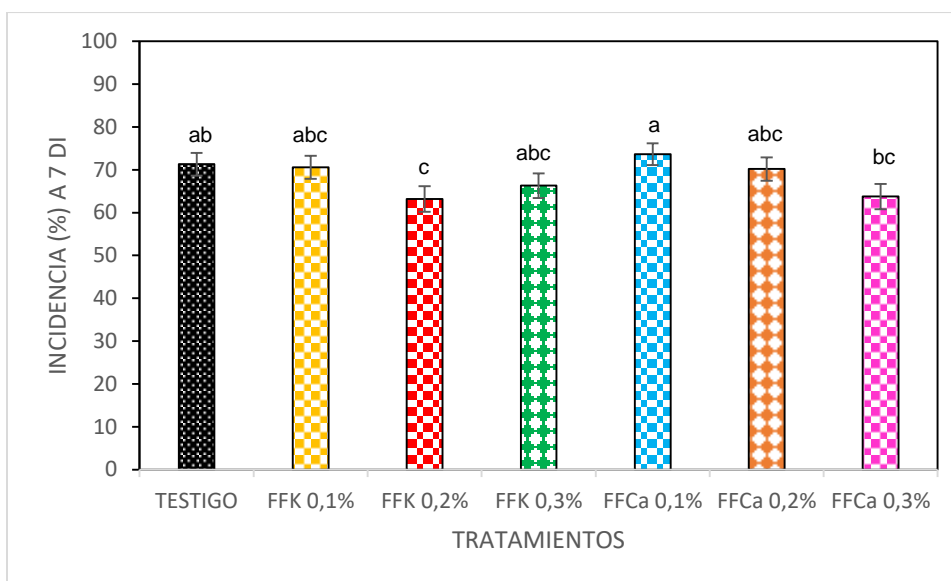


Figura 15. Incidencia de podredumbre morena a 7 días de inoculación en estado de madurez de fruto (etapa III) para ambos cultivares, luego de los diferentes tratamientos con fosfitos, durante todos los años de ensayo y en las dos condiciones (precosecha y poscosecha). Incluye frutos heridos y no heridos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Método LSD. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

3.3.3. Relación de la enfermedad con las variables climáticas

Se evaluó la relación entre el desarrollo de la enfermedad y las variables climáticas imperantes durante los años de experimentación.

A partir de los datos de incidencia y severidad en ambos cultivares, y variables climáticas de temperaturas máximas y mínimas (T° máx. y T° mín.), humedad relativa (HR), precipitaciones acumuladas y heliofanía efectiva (horas de luz), se hizo un análisis de regresión y se calcularon coeficientes de regresión de Pearson para observar la relación de estas variables climáticas con la incidencia y severidad de la enfermedad a siete días de la inoculación. Las variables climáticas se obtuvieron de la estación meteorológica de EEA INTA San Pedro. Las temperaturas mínimas y máximas, son un promedio de los datos registrados 15 días previos a la cosecha. En general, se pudo observar que las variables predictoras que mejor explicaron la evolución de la enfermedad con una relación positiva, tanto para incidencia como severidad y en los dos cultivares fueron las temperaturas máximas y mínimas (Figura 16, 17, 18 y 19). Para el cultivar Elegant lady a mayores precipitaciones acumuladas se observó una tendencia de aumento de niveles de enfermedad, si bien la regresión presentó un R^2 bajo.

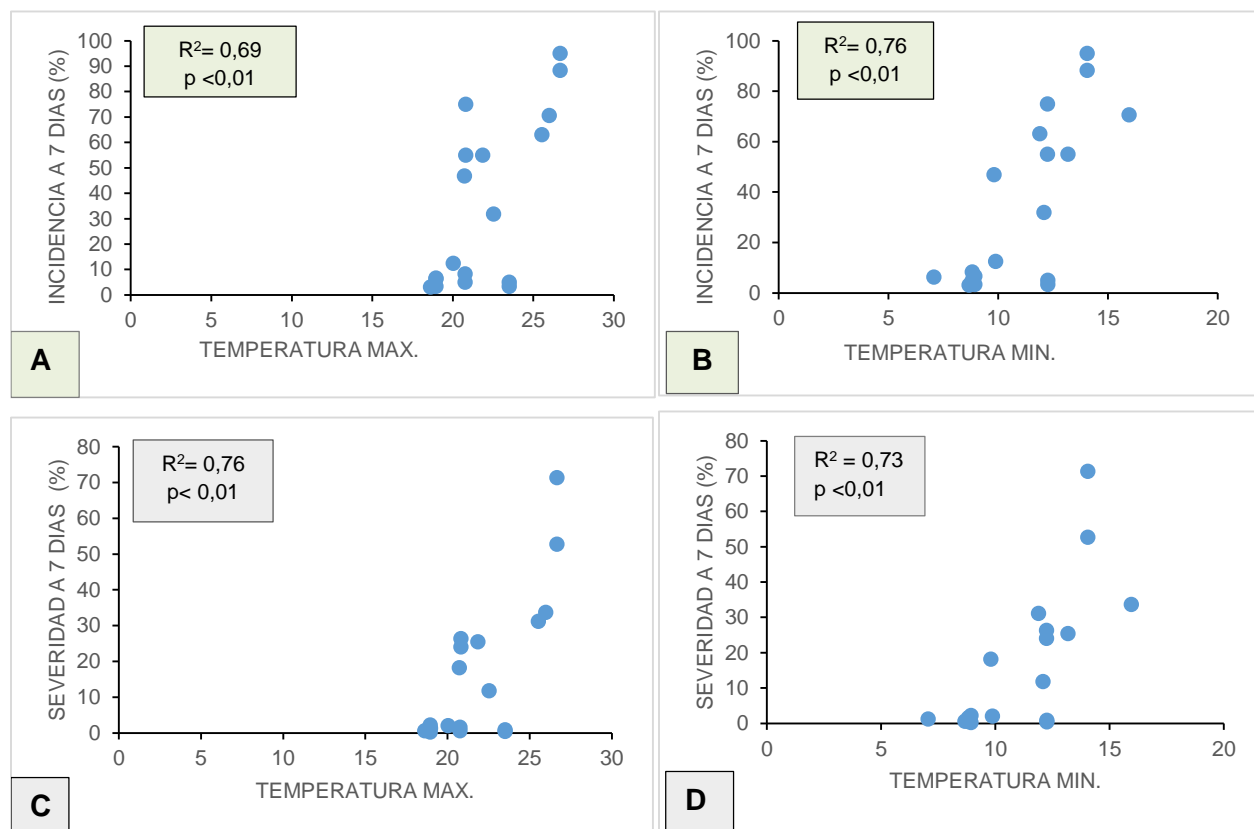


Figura 16. Relación entre las variables climáticas, la incidencia (%) y severidad en frutos 'Flordaking', sin tratamientos con fosfitos, a 7 días de inoculación. **A-** Relación temperatura máxima sobre incidencia; **B-** relación temperatura mínima sobre incidencia. **C-** Relación temperatura máxima sobre severidad; **D-** Relación temperatura mínima sobre severidad. R^2 : Coeficiente de correlación de Pearson. $p < 0,01$ indican diferencias altamente significativas.

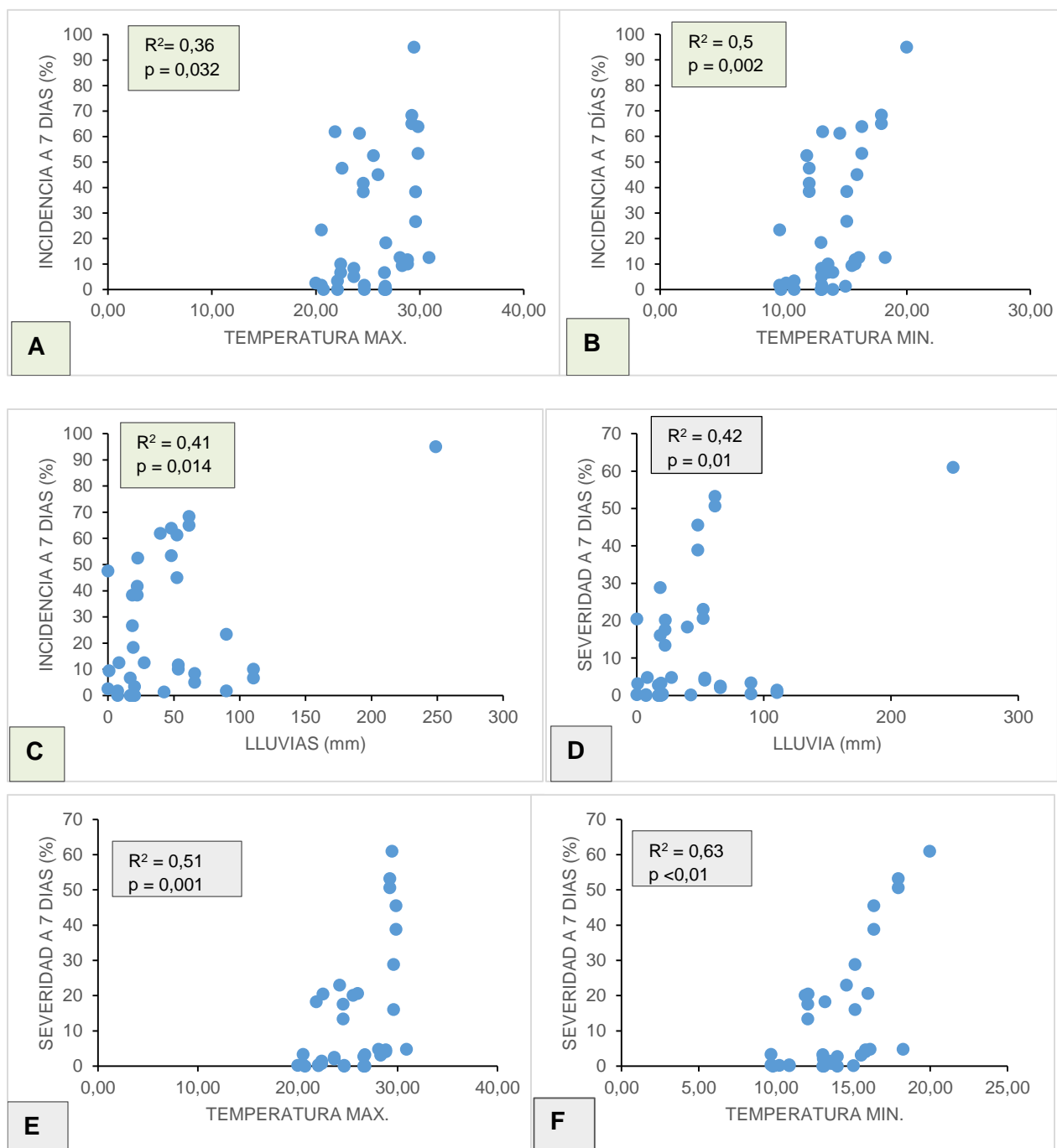


Figura 17. Relación entre las variables climáticas, la incidencia (%) y severidad (%) en frutos cv. Elegant Lady, sin tratamientos con fosfitos, a 7 días de inoculación. **A-** Relación temperatura máxima sobre incidencia; **B-** Relación temperatura mínima sobre incidencia y **C-** Relación de lluvias (mm) sobre severidad. **D-** Relación de lluvias (mm) sobre severidad; **E-** Relación de temperatura máxima sobre severidad; **F-** Relación de temperatura mínima sobre severidad. R^2 : Coeficiente de correlación. $p < 0,01$ indican diferencias altamente significativas.

En las figuras 18 y 20, se puede observar que en la etapa II de formación del embrión y lignificación del carozo, los niveles de enfermedad, severidad e incidencia, no siempre pueden ser explicados por las precipitaciones ocurridas y la humedad relativa. Mientras que, a inicios de formación del fruto y a cosecha, las precipitaciones si se relacionan con los picos de enfermedad. Para el cultivar Elegant Lady, durante la etapa II es más evidente la variabilidad en los picos de enfermedad con respecto a las precipitaciones, salvo a finales del periodo de endurecimiento del endocarpio, donde se evidencia una caída de niveles de enfermedad, independizándose de las variables climáticas que están ocurriendo en dicho momento (Figura 20-A; 20-B y 20-C). En cuanto a las temperaturas, en las gráficas se pueden ver como ya se mencionó, una tendencia de aumento de la enfermedad ante incrementos de temperaturas máximas y mínimas (Figura 19 y 21).

Como ya se comentó, *M. fructicola* en etapa III del fruto o madurez alcanzó altos niveles de expresión para ambos cultivares y diferentes años. En el año 2016, en ambas cultivares se alcanzó mayor incidencia y severidad a cosecha respecto a los otros años, pudiendo deberse a las altas precipitaciones ocurridas en dicho período. En 'Flordaking' se alcanzaron niveles de incidencia de 70% (2015) y 95% (2016). En el caso de 'Elegant lady', los niveles de incidencia a cosecha fueron de 12,5%; 95% y 68% para los años 2015, 2016 y 2017 respectivamente, resultados que se condicen con las precipitaciones ocurridas en dicho período. Sin embargo, durante la etapa II de desarrollo del fruto, los niveles más altos de incidencia se expresaron en el año 2015 respecto a los otros años, a pesar de que ocurrieron más precipitaciones en el 2016. En el 2015 en dicho período, se ocurrieron temperaturas mínimas y máximas apenas más altas respecto al 2016.

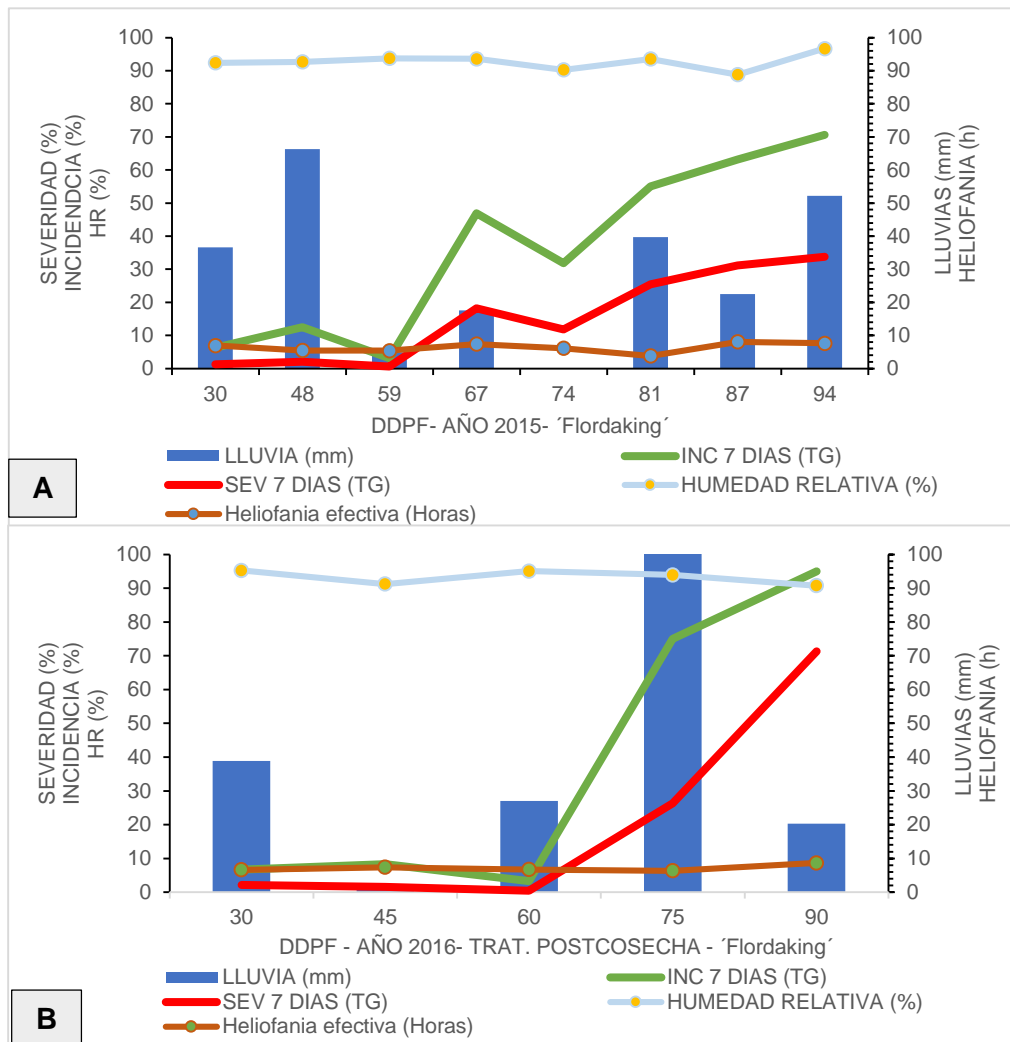


Figura 18. Relación entre la evolución de la incidencia y severidad de la podredumbre morena, a lo largo del desarrollo del fruto 'Flordaking' y las variables climáticas precipitaciones (mm), humedad relativa (%) y heliofania (horas). Experimentos de poscosecha **A-** año 2015 y **B-** año 2016.

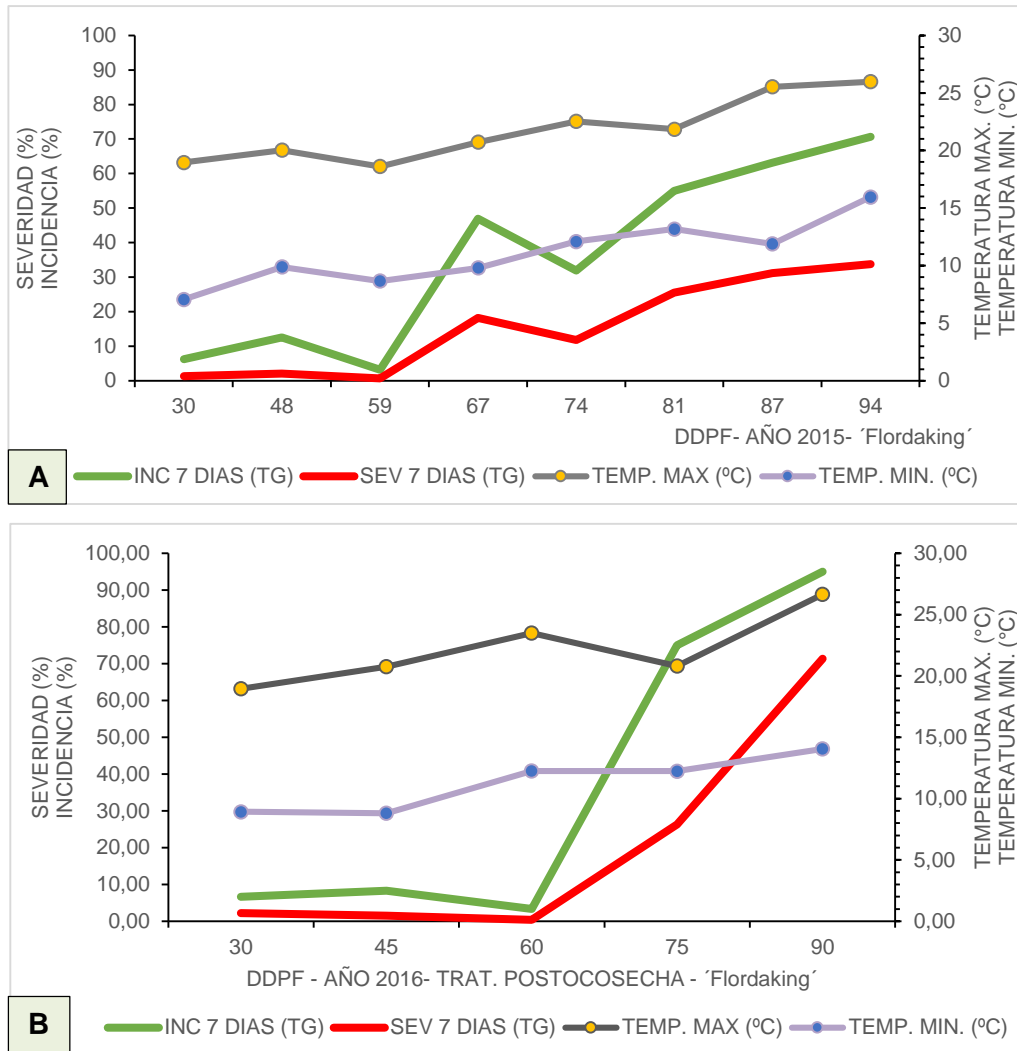


Figura 19. Relación entre la incidencia y severidad de podredumbre morena a lo largo del desarrollo del fruto 'Flordaking' y las temperaturas máximas y mínimas. Experimentos de poscosecha. **A-** año 2015 y **B-** año 2016.

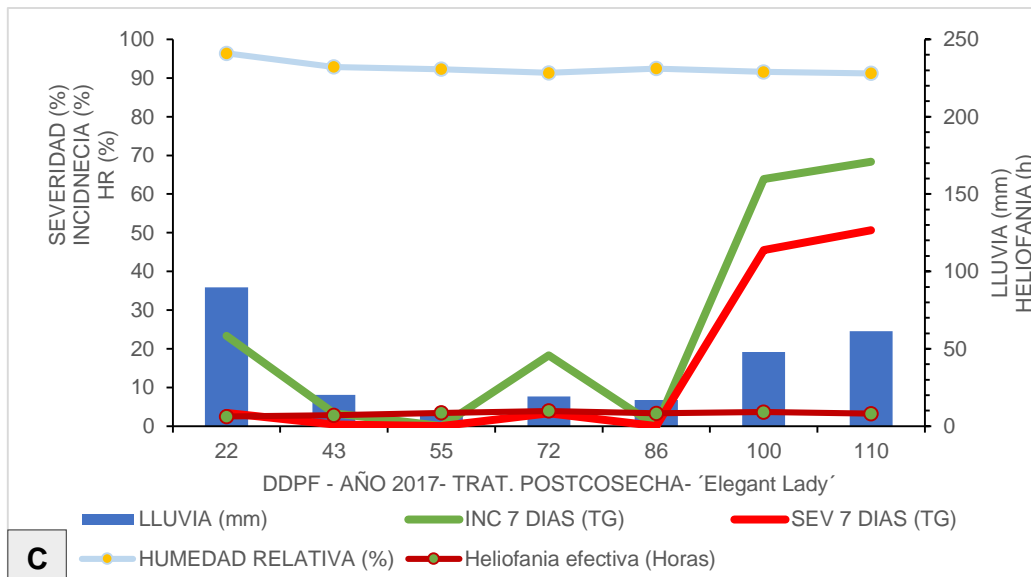
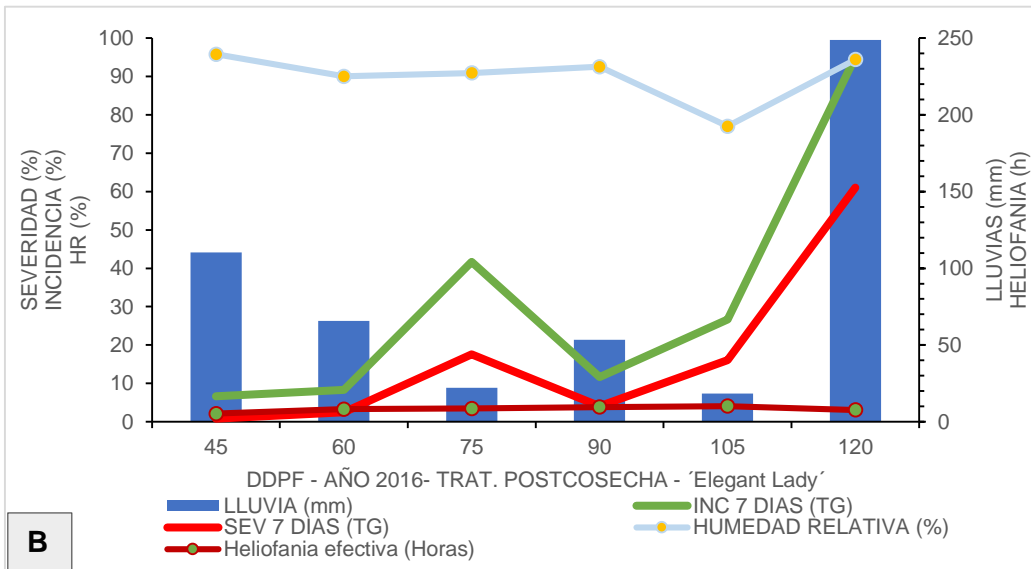
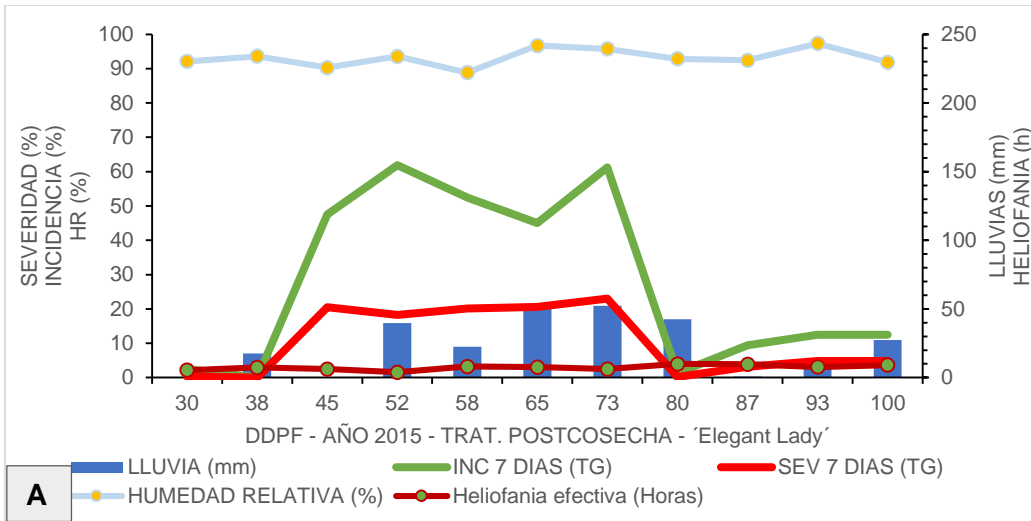
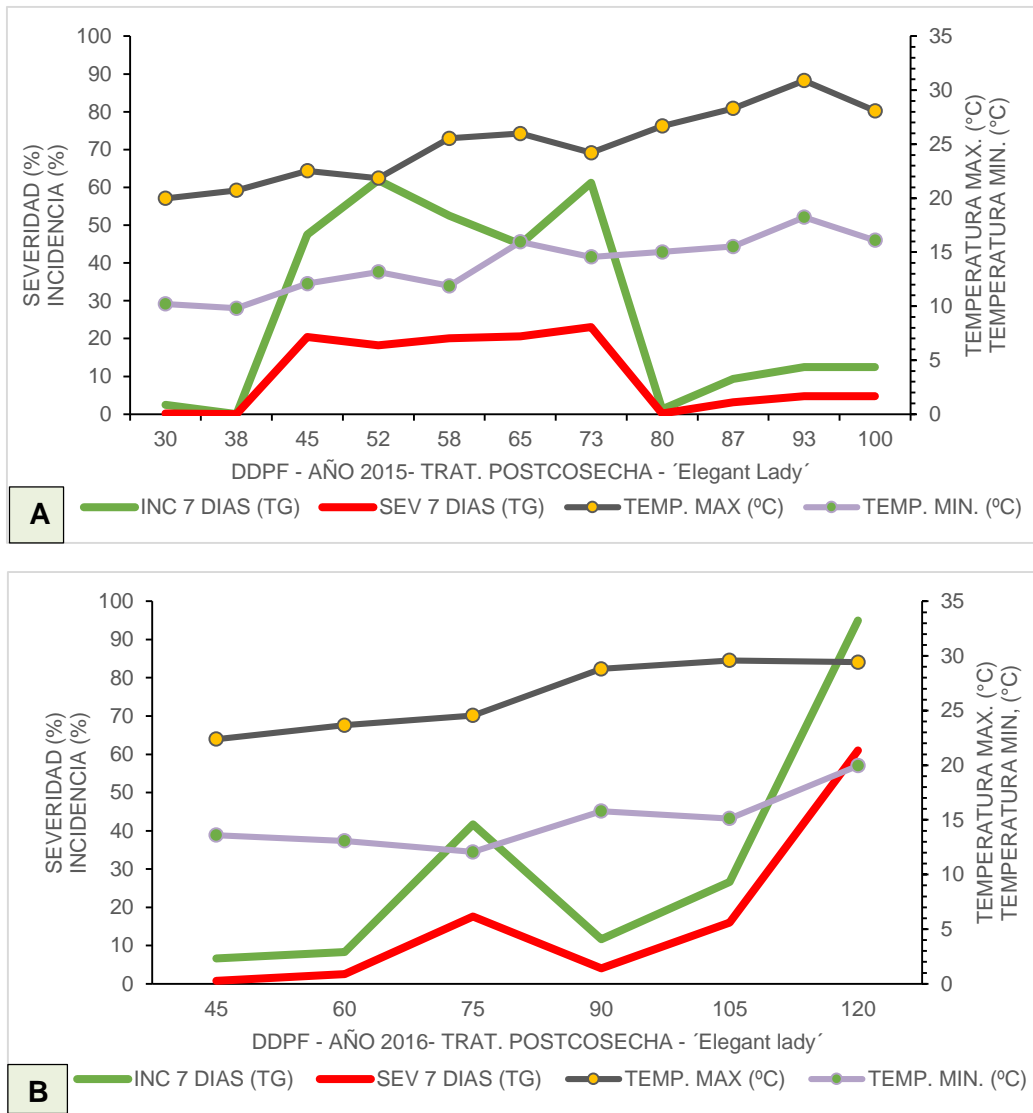


Figura 20. Relación entre la incidencia y severidad de podredumbre morena a lo largo del desarrollo del fruto 'Elegant lady', con las precipitaciones (mm), la humedad relativa (%) y la heliofanía (horas). Experimentos de poscosecha. **A-** año 2015; **B-** año 2016, y **C-** año 2017.



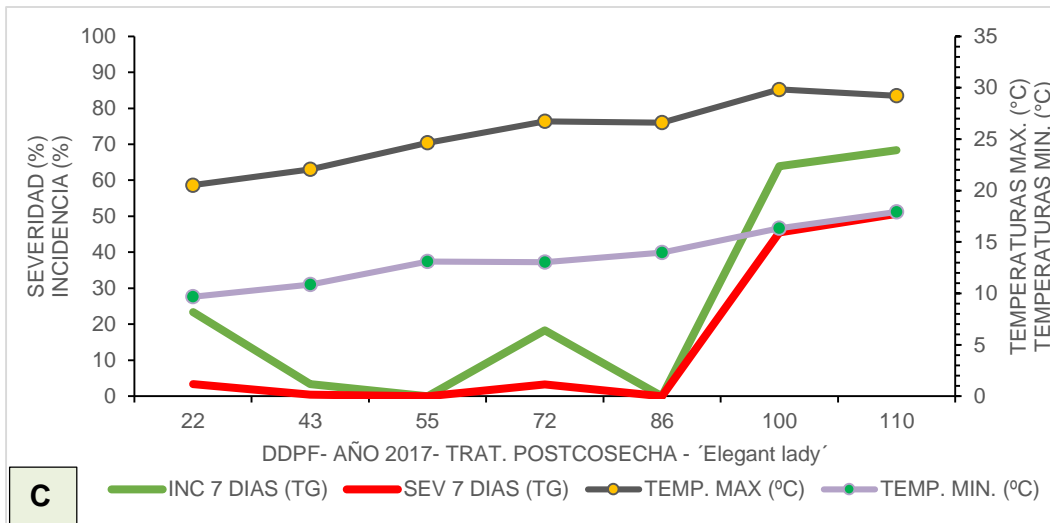


Figura 21. Relación entre la incidencia y severidad de la podredumbre morena a lo largo del desarrollo del fruto 'Elegant lady', con las temperaturas mínimas y máximas (°C). Experimentos de poscosecha. **A-** año 2015; **B-** año 2016, y **C-** año 2017.

3.4. DISCUSIÓN

Varios autores, observaron la existencia de un comportamiento diferencial en la susceptibilidad del fruto de durazno ante la inoculación de *M. fructicola*, con períodos de mayor predisposición a contraer enfermedad, coincidentes con etapa I y III del desarrollo del fruto (Mustafa *et al.*, 2021), dependiendo de la concentración de inóculo, y una mayor resistencia a comienzos de endurecimiento del carozo (Biggs y Northover, 1988; Chiu *et al.* 2013). Otros autores también observaron períodos de menor susceptibilidad, coincidente con la etapa II de desarrollo del fruto en duraznos (Mari *et al.*, 2003; Dini *et al.*, 2022) y damascos ante la infección con *M. laxa* (Mari *et al.*, 2003).

Por otro lado, Keske *et al.* (2011) reportó que *M. fructicola* puede infectar duraznos tempranos, en cualquier etapa del desarrollo de la fruta, en climas húmedos y subtropicales del sur de Brasil y con inóculo presente.

En Argentina no hay experiencias hechas sobre cómo es el comportamiento de diferentes estados de desarrollo de frutos de duraznero ante podredumbre morena. Es por esto que se decidió estudiar la respuesta de dos cultivares de duraznero, de diferente ciclo de maduración y susceptibilidad ante la inoculación con *M. fructicola*. En nuestro trabajo se pudo observar y comprobar dicho patrón estacional en la predisposición a contraer podredumbre morena, en

etapas I (división celular) y III (maduración) en frutos de duraznero, de acuerdo con los autores antes citados. En etapa I, se observó mayor incidencia de la enfermedad sólo ante condiciones climáticas favorables, como temperaturas predisponentes y precipitaciones abundantes. Sin embargo, en el período de mayor resistencia, cercano a lignificación del carozo (etapa II) (Biggs y Northover, 1988) ambos cultivares manifestaron diferente comportamiento. En 'Flordaking', se repite una caída de la enfermedad o comportamiento de mayor resistencia a los 60 DDPF, final de etapa II y comienzo de la III, como menciona la bibliografía; mientras que en 'Elegant lady', durante el período de lignificación del carozo (etapa II) de mayor duración (45 a 90 DDPF), se evidencia variabilidad en el comportamiento. En el año 2015, en etapa II se presentó mayor incidencia que se correspondió con altas precipitaciones. Igualmente, en los diferentes años, se repite un pico alrededor de los 73 DDPF con una gran caída de la predisposición ante la enfermedad, cercano a los 85-90 DDPF.

En este trabajo de tesis, además se observó una mayor tendencia a contraer enfermedad en frutos heridos respecto a frutos no heridos, aunque no en todos los casos. Dicha brecha de desarrollo de la enfermedad entre frutos heridos y no heridos, se achicó para ambos cultivares en estado de maduración. Esto podría deberse a que en dicho estado se generan microfisuras en la cutícula del fruto haciendo de heridas, de acuerdo con Dini *et al.*, 2023, donde menciona que la herida en frutos maduros aumenta la tasa respiratoria del fruto, la producción de etileno, lo que resulta en un ablandamiento de la pulpa, ruptura de membranas, pérdida de peso y agua del fruto, con desarrollo de enfermedades.

Un mejor conocimiento de la susceptibilidad del fruto en los diferentes estados fenológicos, permitiría un control más eficiente del patógeno, con menores costos de producción y riesgos ambientales.

En cuanto a las condiciones climáticas, si bien en los momentos de mayor susceptibilidad natural hay una relación entre las temperaturas máximas y mínimas y las precipitaciones ocurridas, en los momentos de mayor resistencia, la misma no siempre es explicada por las variables climáticas; coincidiendo con Biggs y Northover (1988) quienes tampoco observaron grandes diferencias en las variables climáticas ocurridas en los momentos de mayor susceptibilidad y resistencia del fruto.

El uso de fosfitos es altamente investigado en agricultura, principalmente por sus efectos contra fitopatógenos y como bioestimulante (Deliopoulos *et al.*, 2010). Como se explicó

anteriormente existe evidencia de sus efectos beneficiosos contra hongos y Oomycetes. Aplicaciones foliares de FFK en cultivos comerciales de manzana, desde floración a caída de pétalos indujo la reducción del número de frutos con síntomas de *Alternaria alternata* en un 60% respecto a árboles no tratados (Reuveni *et al.*, 2003). Los FFK también mostraron ser efectivos contra mildiu (*Plasmopara viticola*) en uva, en una dosis de 7 kg/ha (Speiser *et al.*, 2000); y contra *Colletotrichum gloeosporioides*, en plantines de café a una dosis de 10 mL/L (Ogoshi *et al.*, 2013) equivalente a una dosis del 1%, más elevada que las probadas en nuestra tesis. También fueron evaluados fosfitos de potasio (40% P₂O₅ - 20% K₂O) a dosis de 1,5 µL/mL para controlar mancha foliar por *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*) en manzanas, donde se observó un efecto curativo aplicado 48 h luego de la infección, reduciendo un 62% la severidad (Araújo *et al.*, 2010). Por otro lado, Boneti y Katsurayama (2005) encontraron muy buenos resultados en el control de sarna en manzana (*Ventura inaequalis*), con dosis de 3 mL/L de FFK (equivalente a 0,3% en las dosis utilizadas para esta tesis), aplicados siete días antes de la inoculación con el patógeno.

Existen algunos trabajos exploratorios en cuanto al efecto de los fosfitos sobre *M. fructicola* en Argentina (Mitidieri *et al.*, 2017; Mitidieri *et al.*, 2018). También existen reportes en Brasil, donde fueron aplicados FFK y FFCa con boro en poscosecha en duraznos. Se obtuvieron buenos resultados con los FFK sobre la incidencia de la enfermedad respecto al tratamiento testigo; éstos mostraron ser más efectivos respecto a los de calcio en combinación con boro (Moreira *et al.*, 2002). Sin embargo, aplicaciones de FFK (40% de P₂O₅; 20% de K₂O) en frutos de duraznos 'Magnum', por inmersión durante tres minutos, no fueron eficientes en la reducción de podredumbre morena causada por *M. fructicola* (Kaehler Sautter *et al.*, 2011).

En esta tesis, los fosfitos de potasio (P₂O₅ 7,2%; K 12,9%) y fosfitos de calcio (P₂O₅ 29,7%, Ca 12,7%) aplicados no alteraron el patrón de susceptibilidad de los frutos ante la infección con *M. fructicola* cuando fueron asperjados en precosecha, como observaron los autores antes mencionados en otros patosistemas. Aplicaciones poscosecha, en cambio, arrojaron resultados variables, donde los FFK 0,2%; 0,3% y FFCa 0,3% fueron más efectivos en 'Elegant Lady' con incidencias entre un 20% y un 40% menos respecto al tratamiento testigo a siete días de inoculación; mientras que para 'Flordaking' los FFK 0,3% y FFCa 0,3% presentaron menor incidencia de la enfermedad. En general los tratamientos poscosecha con fosfitos fueron más efectivos en 'Elegant lady' respecto a 'Flordaking' quizás debido a que éste último cultivar, al ser de ciclo corto, está menos expuesto en el tiempo a la enfermedad y tiene menos aplicaciones realizadas.

3.5. CONCLUSIONES

Se puede afirmar que el uso de fosfitos, según la bibliografía citada y los resultados arrojados en estas experiencias, presentan un efecto variable ante el control de podredumbre morena causada por *M. fructicola*.

Los cultivares Flordaking y Elegant lady tienen un comportamiento diferente frente a *M. fructicola* y su estudio permitió establecer en qué momento fenológico sería necesario hacer aplicaciones de fitosanitarios, de manera estratégica, para reducir el costo de producción y los riesgos medioambientales.

‘Flordaking’ se comportó de manera más homogénea a lo largo de los años y acorde a la bibliografía. Por otra parte, ‘Elegant lady’ presentó mayor variabilidad en su comportamiento, quizás debido a ser un cultivar de ciclo intermedio y estar el fruto expuesto a mayor número de factores durante la etapa II, que pueden afectar su susceptibilidad. Ante esto, es conveniente mantener protegido los duraznos de *M. fructicola* en las etapas iniciales de crecimiento y maduración. En el período intermedio de desarrollo del fruto, la protección debería estar supeditada a las condiciones climáticas previstas para la campaña. Según resultados de este trabajo, sería necesario contemplar aplicaciones preventivas entre los 70 y 75 DDPF, en ‘Elegant lady’, al haber manifestado un aumento de susceptibilidad en los tres años de ensayo.

Resultados de estas experiencias nos permiten concluir también y reafirmar que es de vital importancia evitar heridas que sirvan de vía de ingreso para patógenos al fruto. Por ello, es importante llevar adelante un manejo integrado de plagas y enfermedades, considerando que los insectos pueden ocasionar aumento de infección, con la consiguiente pérdida de rendimiento.

En el patosistema *M. fructicola-Prunus persica* la aplicación de fosfitos en poscosecha fue más efectiva que la aplicación en precosecha. Teniendo en cuenta estos resultados y la efectividad demostrada *in vitro* para reducir la germinación de conidios y crecimiento micelial del patógeno concluimos que los fosfitos podrían ser tenidos en cuenta en aplicaciones poscosecha en la planta de empaque dando protección al fruto frente a la enfermedad durante el almacenamiento; y generando además un efecto adicional de reducir el inóculo en las instalaciones de la planta de empaque.



Capítulo III

Expresión de compuestos asociados a mecanismos de resistencia inducida a *M. fructicola*, en frutos de duraznero posterior a aplicaciones de fosfitos de potasio y calcio

CAPÍTULO III

EXPRESIÓN DE COMPUESTOS ASOCIADOS A MECANISMOS DE RESISTENCIA INDUCIDA A *M. fructicola*, EN FRUTOS DE DURAZNERO POSTERIOR A APLICACIONES DE FOSFITOS DE POTASIO Y CALCIO

4.1. INTRODUCCION

El manejo tradicional de enfermedades en árboles frutales se basa en la aplicación de fitosanitarios desde floración a cosecha (Bostock *et al.*, 1999). La identificación de aislados de *Monilinia* spp. tolerantes a benzimidazoles y dicarboximidas y la reducida disponibilidad en el mercado de nuevos fungicidas debido al elevado costo de registro que presentan, han hecho necesario ir en la búsqueda de alternativas de control. Tales estrategias incluyen desarrollo de cultivares resistentes a podredumbre morena, control biológico e inducción de resistencia hospedera (Gradziel, 1994).

La selección de genotipos resistentes aún es muy limitada, a pesar de estar en muchos programas de mejoramiento genético, debido a la falta de conocimiento de buenas fuentes de resistencia o inmunidad (Dini, 2019). La resistencia del duraznero a *Monilinia* sp. es una característica cuantitativa (poligénica), difícil de transmitir a la progenie y altamente influenciados por el medio ambiente (Raseira y Franzon, 2014; Dini, 2019).

En general, las plantas contrarrestan el ataque de patógenos ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, que producen sustancias tóxicas para el patógeno o generan condiciones adversas para el mismo; como, por ejemplo, los compuestos fenólicos (Hernández Navarro, 2008).

Los principales fenoles en la epidermis y capas celulares subepidérmicas en el duraznero, incluyen los fenilpropanoides, como ácido clorogénico (CGA) y cafeico (CA), y los flavonoides catequina y epicatequina (Bostock *et al.*, 1999).

La infección de un patógeno induce el aumento de compuestos fenólicos en la planta como mecanismo de protección del tejido dañado. El incremento en el contenido de fenoles y acumulación de fitoalexinas estimularon la resistencia en plantas de café inoculadas con

Hemileia vastatrix y *Pseudomonas syringae*. Además, se observaron altos niveles de resistencia a *M. fructicola* en duraznos californianos asociado a gran cantidad de compuestos fenólicos (Hernández Sánchez *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2013).

Las plantas presentan una serie de mecanismos de defensa desencadenados una vez que el patógeno entra en contacto con el tejido. En algunos modelos de interacción hospedero-patógeno se ha demostrado el papel de enzimas como peroxidadas (POD), polifenoloxidasas (PPO) y glucanasas (Caicedo *et al.*, 2009). Así, las peroxidadas están involucradas en las respuestas a enfermedades porque catalizan la oxidación de fenólicos para la formación de lignina. Además, están involucradas en reacciones oxidativas de la superficie celular como generadoras de radicales libres y peróxido de hidrógeno, los cuales son tóxicos para muchos organismos, desempeñando una función importante en defensa vegetal (Caicedo *et al.*, 2009). Por otro lado, la polifenoloxidasa (PPO) se ha relacionado con alto grado de susceptibilidad de las plantas a enfermedades, la cual ha sido observada después de la infección de virus, bacterias, hongos y daños mecánicos (Hernández Sánchez *et al.*, 2002).

Elucidar los mecanismos bioquímicos en la interacción hospedero-patógeno contribuye al entendimiento de cómo responde la planta a la presencia del hongo, necesario para el manejo de la enfermedad (Caicedo *et al.*, 2009).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de los FFK y FFCa sobre la expresión de compuestos relacionados con los mecanismos de resistencia frente a la infección de *M. fructicola*, en diferentes estadios de desarrollo del fruto de duraznero.

Para alcanzar este objetivo, primero se determinó el contenido de metabolitos relacionados con los mecanismos de resistencia inducida, y luego se hizo una evaluación comparativa de la actividad de enzimas del sistema antioxidante, como la POD y de PPO.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Inóculo y material vegetal

Se utilizó un aislamiento del hongo *M. fructicola* proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de la EEA INTA San Pedro (33°44'12.7"S, 59°47'58.2"W), el cual fue sembrado en medio APG e incubado a 25°C durante 15 días hasta esporular. Las esporas del hongo se

obtuvieron inundando la superficie del cultivo con agua destilada estéril. Luego se filtró la suspensión con gasa estéril y se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios mL⁻¹ usando un hemacitómetro.

El material vegetal consistió en frutos de durazno (*Prunus persica*, L. Batsch) de los cultivares Flordaking y Elegant Lady, cosechados en dos lotes experimentales de EEA INTA San Pedro sin riego, tratados con fosfitos y cosechados en los estados de desarrollo: endurecimiento de Carozo (EC), que es el momento de mayor resistencia a contraer enfermedad, y el estado de cosecha(Cs), que es el momento de mayor susceptibilidad a *M. fructicola*. Ambos estadios correspondieron a 60 días después de plena floración (DDPF) y 93 DDPF para 'Flordaking', 55 DDPF y 110 DDPF para 'Elegant Lady'.

Para determinar el estadio de desarrollo en el que se encontraban los frutos al momento de muestrear, se midió diámetro con calibre y se evaluó el estado de desarrollo del embrión, por la facilidad de división del carozo y embrión utilizando un cuchillo. De esta manera, los frutos en estado de FV (etapa I de división celular), el carozo y embrión fueron rápida y fácilmente escindidos con un cuchillo. En los frutos en etapa II (EC), el endocarpio se encontró endurecido, con lo cual éste y el embrión no fueron escindidos por el cuchillo (Lee y Bostock, 2006). Por último, los frutos en estado de madurez o cosecha (Etapa III) tenían tamaño comercial por expansión celular y color.

4.2.2. Aplicación de tratamientos a campo

Se aplicaron fosfitos, quincenalmente, desde un mes después de plena floración hasta la cosecha, en ambos cultivares. Se ensayaron tres tratamientos: a) 0,3% FFK (300cc / hl, CS P2O5 7,2%; K 12,9%), b) 0,3% FFCa (300cc / hl, CS P2O5 29,7%, Ca 12,7%) y c) control (agua), en un diseño de bloque con tres repeticiones.

4.2.3. Determinación del contenido de metabolitos relacionados con los mecanismos de resistencia

4.2.3.1. Diseño del experimento

Al día siguiente de la aplicación a campo de los fosfitos fueron cosechados 20 frutos por tratamiento por repetición, en ambos cultivares. Luego fueron llevados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de Zavalla, en donde se llevó a cabo la extracción

y determinación de fenoles en base a la metodología descrita por Coseteng y Lee (1987); y ACG a través del procedimiento descrito por Mapson *et al.* (1963) modificado.

Se obtuvieron extractos a partir de la pulpa de cada muestra de frutos, durante dos años consecutivos (2017 y 2018), los cuales fueron almacenados en frascos de vidrio color caramelo y cierre hermético, en heladera para cuantificar fenoles totales y ácido clorogénico a partir de medidas espectrofotométricas.

En el año 2018 se obtuvieron extractos a partir de la piel de frutos, inoculados con *M. fructicola* en condiciones controladas de laboratorio y sin inocular; en ambos cultivares. De la muestra de frutos recolectada, 10 frutos por tratamiento y por repetición fueron inoculados sobre la sutura, con 30 μ L de una suspensión de conidios de *M. fructicola*; mientras que los otros 10 no fueron inoculados. Los frutos inoculados y sin inocular fueron mantenidos a temperatura ambiente por 6 horas antes de ser llevados al laboratorio para la extracción de fenoles totales y ACG.

4.2.3.2. Determinación de fenoles totales

La extracción y determinación de fenoles totales se llevó a cabo según Coseteng y Lee (1987).

Una muestra de 50 g de pulpa de duraznos fue homogeneizada con 100 mL de solución de etanol al 80% y hervida durante cinco minutos. Luego se la centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos de donde se obtuvo un residuo y sobrenadante. Al residuo se le adicionó nuevamente 100 mL de etanol al 80%, se lo llevó a hervir por diez minutos para la extracción de fenoles, y se volvió a centrifugar durante otros cinco minutos, obteniendo otro sobrenadante. Se combinaron ambos extractos o sobrenadantes y se los llevó a un volumen final de 250 mL con etanol.

Al extracto con alcohol se lo diluyó para obtener una lectura de absorbancia dentro del rango de 10 a 100 μ g/mL. A un mililitro del extracto se le añadió 10 mL de agua destilada, 2 mL de fenol Folin-Ciocalteau, se mezcló la muestra, después de 5 minutos se agregó 2 mL de solución saturada de Na_2CO_3 y luego se agitó con vortex. Se midió absorbancia a 640 nm (A640nm) después de 1 h. La cantidad de compuestos fenólicos totales se calculó a partir de una curva estándar de catecol (1 mg/ 5mL etanol 80%) preparada en el mismo momento.

4.2.3.3. Determinación de ácido clorogénico (ACG)

Para obtener una lectura de absorbancia < 1 fue necesario diluir el extracto de alcohol. El contenido de ACG se determinó de la siguiente manera: a 5 mL del extracto de alcohol diluido, se le agregaron 1 mL de solución de Na_2MoO_4 (50 g/L) y 1 mL de etanol (500 mL/L). Después de mezclar, una alícuota de 5 mL de la solución preparada se mezcló con 1 mL de solución de etanol (500 mL/L).

Se cuantificó el contenido de ácido clorogénico a través de medidas espectrofotométricas, haciendo lecturas de absorbancia a 370 nm. La concentración de ACG se calculó a partir de una curva estándar (10-50 $\mu\text{g/mL}$) preparada en el mismo momento.

4.2.3.4. Análisis estadístico

El contenido de fenoles totales y ácido clorogénico en pulpa se analizó en forma conjunta para ambos años, mientras que la evaluación en piel fue de un solo año. El diseño utilizado fue BCA con tres factores: estado de fruto (EF), año y tratamiento, para metabolitos en pulpa; y estado de fruto, inoculación y tratamiento para metabolitos en piel de frutos. El test para comparación de medias fue el Test LSD Fisher al 5% de significación. El paquete estadístico utilizado fue INFOSTAT (Di Rienzo, 2010).

4.2.4. Evaluación comparativa de actividad enzimática antioxidante (PPO, POD), relacionada con los mecanismos de resistencia

4.2.4.1. Diseño del experimento

Al día siguiente de aplicar los tratamientos a campo se recolectaron 50 frutos por tratamiento de cada réplica y cultivar, y se llevaron al laboratorio. Las muestras se trasladaron de inmediato al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta ser procesadas. De cada muestra de 50 frutos por tratamiento por repetición, se tomó un subgrupo de 12 frutos, a los cuales se les extrajo la piel y se guardó dicho tejido en paquetes de 2 g a -80°C hasta su utilización. Los frutos restantes (38 frutos) de las muestras iniciales fueron inoculados en forma artificial con 30 μL de una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} de *M. fructicola*; los cuales fueron sometidos al mismo procedimiento de extracción del epicarpio luego de 6, 24 y 48 h de inoculados, para ser guardados a -80°C hasta su utilización.

Cada muestra de 2 g de piel crioconservada fue sometida a una extracción proteica para determinar comparativamente actividades enzimáticas de PPO y POD por espectrofotometría.

En la Tabla 19 se muestran los momentos de evaluación de las actividades enzimáticas de POD y PPO.

Estado	TDI			
	AI (antes de la inoculación) / 0 horas	6 horas	24 horas	48 horas
Endurecimiento de carozo (EC)	AI (antes de la inoculación) / 0 horas	6 horas	24 horas	48 horas
Cosecha (Cs)	AI (antes de la inoculación) / 0 horas	6 horas	24 horas	48 horas

Tabla 19. Momentos de evaluación de la actividad enzimática POD y PPO para los dos cultivares ‘Flordaking’ y ‘Elegant Lady’. **TDI**= Tiempo de inoculación; **AI** = Antes de inoculación o tiempo 0.

4.2.4.2. Extracción enzimática

El material vegetal (2 g de epicarpio de frutos) se pulverizó en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se homogenizó con 2,5 volúmenes de buffer fosfato sódico 100 mM, pH 6,4; 0,2 g de polivinilpirrolidona (PVPP) y 50 µL PMSF 1mM. Los extractos se centrifugaron a 8000 RPM por 30 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se filtró con filtros de 0,2 micrones (Millipore).

4.2.4.3. Actividad PPO

La actividad de la PPO se determinó según el protocolo descrito por Chunchua *et al* (2001), que se basa en la determinación del cambio de absorbancia a 420 nm producido por la oxidación de un sustrato de la enzima como el catecol. Se realizó el monitoreo a 420 nm a temperatura ambiente durante 1 min, considerándose para la cuantificación, en todos los casos, la pendiente inicial observada durante los primeros 10 segundos. La reacción mezcla contenía 10 µL de extracto, 340 µL del buffer (Na₂HPO₄, 100 mM), 50 µL de piruvato de sodio y 100 µL de catecol.

4.2.4.4. Actividad POD

Para la determinación de la actividad POD se empleó el método descrito por Chance y Maehly (1995). Se utilizaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno y se determinó la velocidad de oxidación del guayacol midiendo el incremento de absorbancia a 460 nm durante 2 minutos en buffer fosfato sódico 100 Mm, pH=6.4.

El contenido de proteína de cada ensayo enzimático se determinó según Bradford (1976), utilizando una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EE. UU.) como estándar.

4.2.4.5. Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las actividades enzimáticas PPO, POD expresadas en U/mg proteínas y la concentración de proteínas, expresada en miligramos por gramo peso fresco (mg gpf^{-1}), se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza factorial ANOVA y la significancia de las diferencias entre medias se estimó mediante el test LSD Fisher 5%. Se utilizó el paquete estadístico SAS.

Para llevar a cabo el análisis de varianza fue necesario partir de dos supuestos: 1) la variable estudiada tiene una distribución normal, y 2) existe homogeneidad de varianza. Todas las variables resultaron tener una distribución normal (Shapiro-Wilks modificado) y presentar homogeneidad de varianzas (Test F-Snedecor).

Las actividades enzimáticas de ambas enzimas se analizaron, en primer lugar, en ambos estados de desarrollo EC y Cs por separado; y en segundo lugar, en conjunto para cada cultivar.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Determinación de fenoles totales y ACG en pulpa de frutos.

4.3.1.1. Cultivar Flordaking

El contenido de fenoles totales y el de ACG (Figura 22) en pulpa de frutos tratados con agua (testigo) mostró diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo del fruto y entre campañas (Tabla 20). El contenido de fenoles totales en pulpa, durante el estado de cosecha manifestó una caída considerable respecto a los estados de FV y EC (Figura 22- A). El

ACG evidenció un pico en EC (Figura 22- B).

Durante el segundo año de experimentación, el contenido de ACG fue menor respecto al primer año, pudiendo deberse a un efecto dilución por mayores precipitaciones ocurridas, en especial durante la etapa de cosecha (Figura 25).

En cuanto al efecto de los fosfitos sobre el contenido de fenoles totales en pulpa no manifestó una respuesta clara. En el estado de fruto verde (FV) y endurecimiento de carozo (EC) del primer año, los tratamientos testigo con agua y FFCa 0,3% presentaron niveles más altos respecto al FFK 0,3%. Todos los tratamientos presentaron menores contenidos de fenoles totales en el periodo de cosecha en ambos años (Figura 23). Por otro lado, los tratamientos con fosfitos no tuvieron efecto sobre el contenido de ACG (Tabla 20) (Figura 24). Para ambos metabolitos los niveles generales observados fueron menores el segundo año.

PULPA DEL FRUTO	FENOLES TOTALES	AC. CLOROGENICO
FV	F	F
AÑO	42,86**	28,69**
ESTADO DE FRUTO (EF)	126,37**	13,95**
TRATAMIENTO (Tr)	16,58**	1,30
EF x Tr	5,73**	0,91
EF x AÑO	1,35	9,32**
AÑO x Tr	5,02**	0,59
EF x AÑO x Tr	3,14*	0,66

Tabla 20. Análisis de la variancia para el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/g}$ pulpa) y ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en frutos 'Flordaking', durante dos campañas consecutivas (2016-2017 y 2018-2019). **EF**= estado de fruto; **Tr**= tratamiento. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); * indican diferencias altamente significativas ($p < 0,01$).

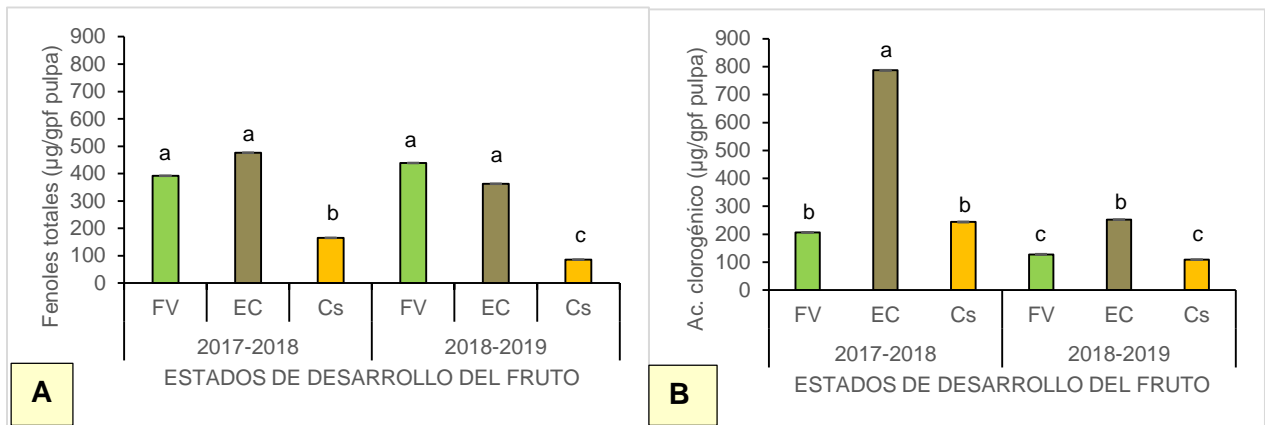


Figura 22. Evolución en el contenido de fenoles totales y ACG en pulpa de frutos sin tratamientos con fosfitos (testigo) 'Flordaking', en diferentes estados de desarrollo y durante dos campañas consecutivas (2016-2017 y 2018-2019). **FV=** Fruto verde; **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. **A-** Fenoles totales (µg/g fruta fresca), **B-** Ácido clorogénico (µg/g fruta fresca). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

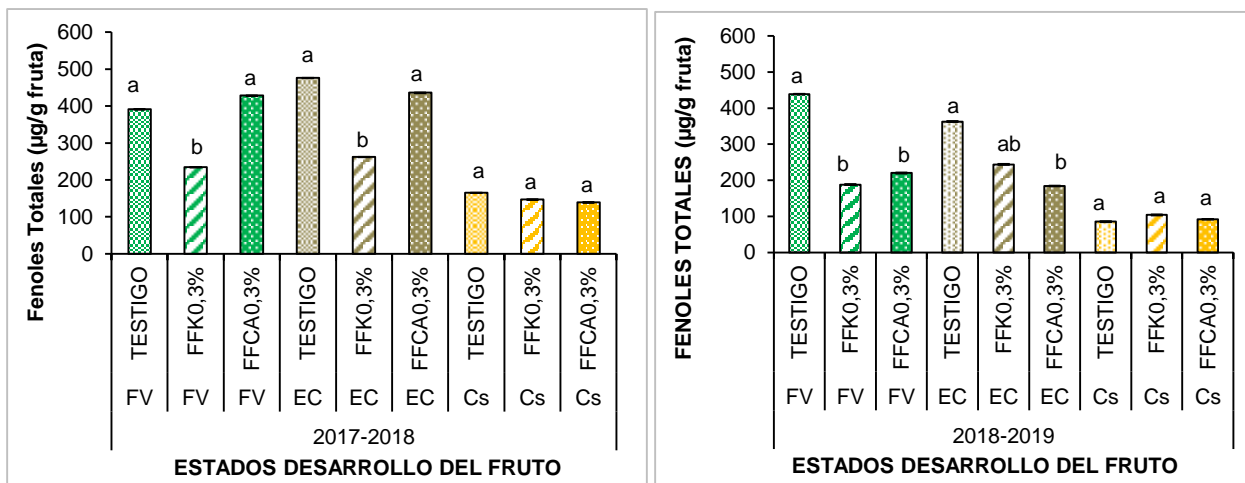


Figura 23. Contenido de fenoles totales (µg/gpf) en pulpa de frutos 'Flordaking', sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y fosfitos de calcio, en diferentes estados de desarrollo y durante dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019). **FV=**Fruto verde; **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos para cada estado de desarrollo del fruto. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

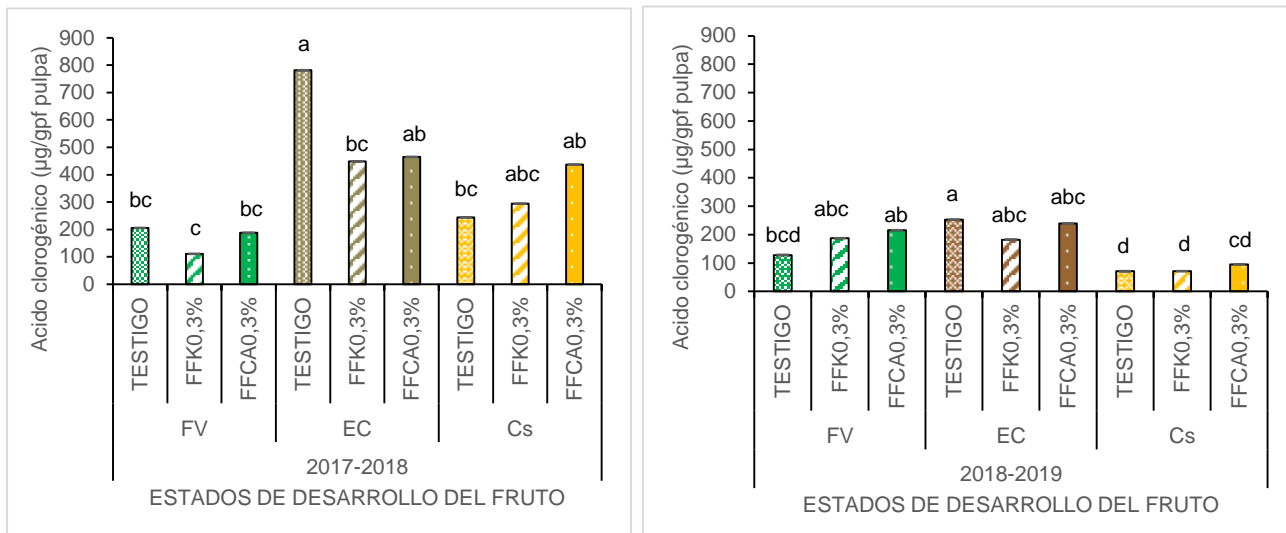


Figura 24. Contenido de ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en pulpa de frutos 'Flordaking' sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y fosfitos de calcio, en diferentes estados de desarrollo y durante dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019). **FV**=Fruto verde; **EC**= Endurecimiento de carozo; **Cs**= Cosecha. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) de los tratamientos para cada estado de desarrollo y campaña.

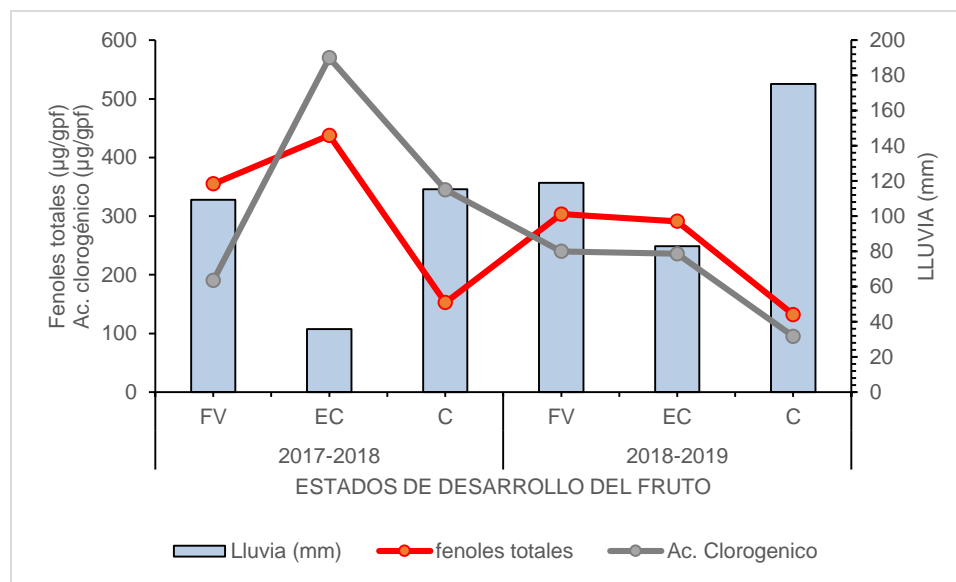


Figura 25. Relación entre el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$), ACG ($\mu\text{g/gpf}$) y las precipitaciones (mm) ocurridas en diferentes estados de desarrollo de frutos 'Flordaking', en dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019). **FV**=Fruto verde; **EC**= Endurecimiento de carozo; **Cs**= Cosecha.

4.3.1.2. Cultivar Elegant Lady

El contenido de fenoles totales (Figura 26- A) y ACG (Figura 26- B) en pulpa de frutos sin tratamientos con fosfitos (testigo con agua) mostró diferencias significativas en los diferentes estados de desarrollo del fruto y en ambas campañas. El mayor contenido de ambos metabolitos se encontró en EC, mientras que en Cs fue menor en ambas campañas. En el segundo año el contenido de fenoles fue casi el doble respecto al primer año (Figura 26-A). Esto se podría explicar ante la caída de mayores precipitaciones con acumulación de agua libre en el lote experimental, generando quizás un estrés abiótico con acumulación de fenoles (Figura 29). Ninguno de los dos metabolitos presentó diferencias en pulpa ante tratamientos con fosfitos, sin embargo, se observó una triple interacción en el contenido de fenoles totales entre estado de desarrollo del fruto, año y tratamientos (Tabla 21, Figura 27).

PULPA DEL FRUTO	FENOLES TOTALES	AC. CLOROGENICO
FV	F	F
AÑO	160,21**	6,06*
ESTADO DE FRUTO (EF)	56,02**	33,40**
TRATAMIENTO (Tr)	5,43	0,24
EF x Tr	5,45**	0,33
EF x AÑO	9,22**	1,51
AÑO x Tr	3,67	1,69
EF x AÑO x Tr	6,97**	1,13

Tabla 21. Análisis de la variancia para el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) y ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en frutos 'Elegant Lady', durante dos campañas consecutivas (2016-2017 y 2018-2019). **EF**= estado de fruto; **Tr**= tratamiento. Los ** indican diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

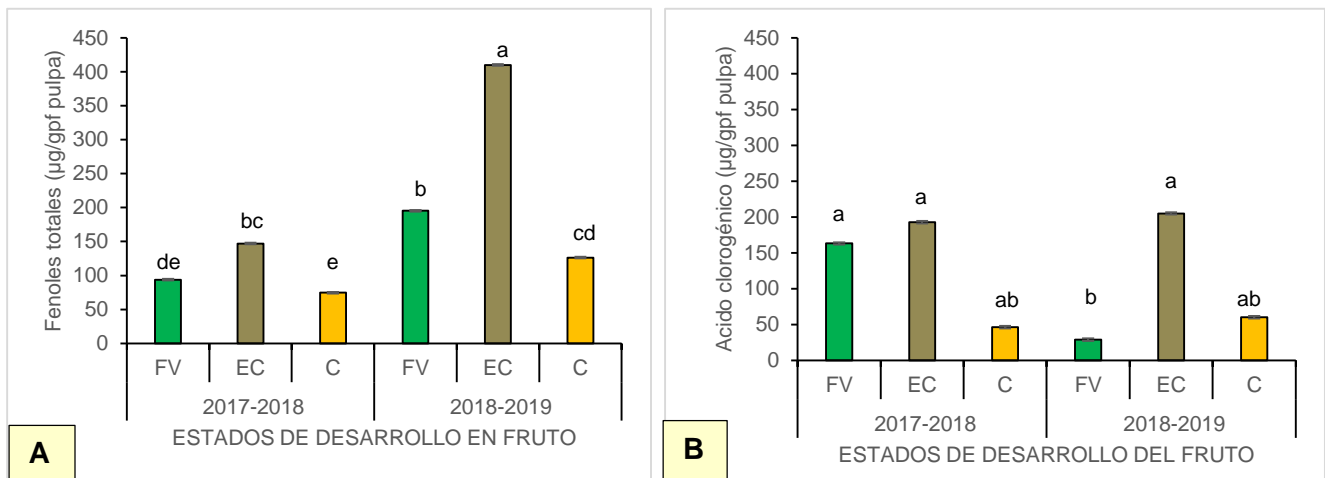


Figura 26. Evolución en el contenido de fenoles totales y ACG en pulpa de frutos ‘Elegant lady’ en ausencia de fosfitos, en diferentes estados de desarrollo y durante dos campañas consecutivas (2016-2017 y 2018-2019) en frutos sin tratar con fosfitos. **FV=** Fruto verde; **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. **A-** Fenoles totales (µg/gpf), **B-** ACG (µg/gpf). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

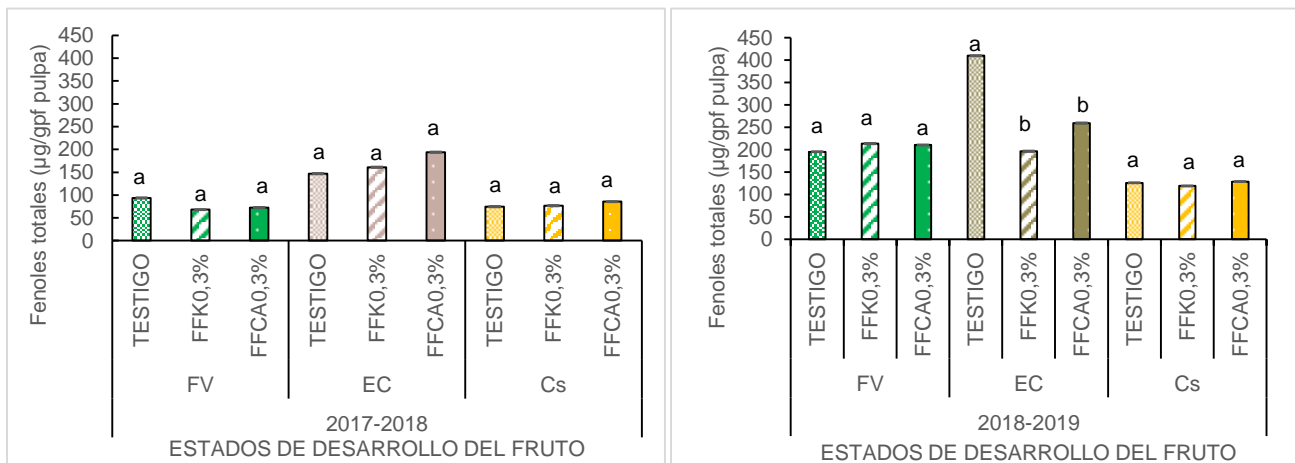


Figura 27. Contenido de fenoles totales (µg/gpf) en pulpa de frutos ‘Elegant lady’, sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y fosfitos de calcio, en diferentes estados de desarrollo y dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos para cada estado de desarrollo del fruto y cada año. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

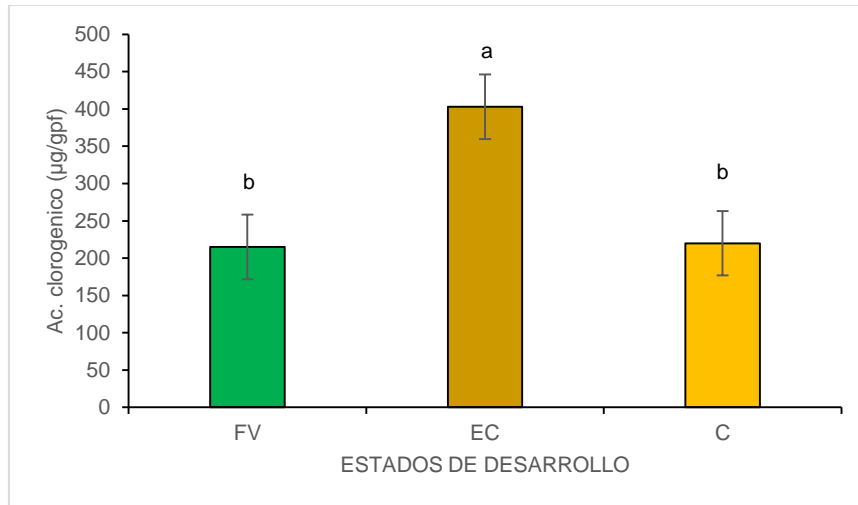


Figura 28. Contenido de ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en pulpa de frutos 'Elegant lady', sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y fosfitos de calcio, en diferentes estados de desarrollo. Los promedios corresponden a las dos campañas (2017-2018 y 2018-2019). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

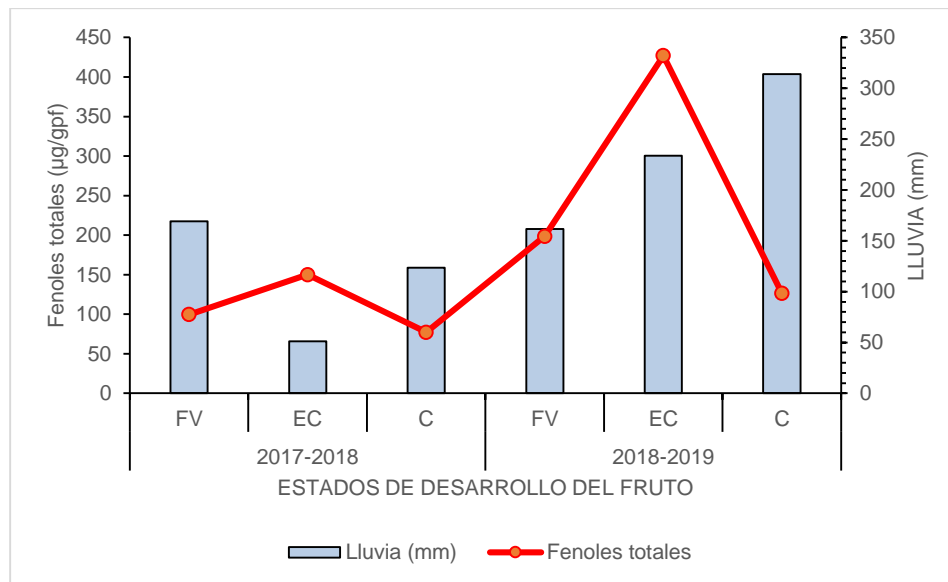


Figura 29. Relación entre el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) y las precipitaciones (mm) ocurridas en diferentes estados de desarrollo de frutos 'Elegant lady', en dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019). **FV**=Fruto verde; **EC**= Endurecimiento de carozo; **C**= Cosecha.

4.3.2. Determinación de fenoles totales y ACG en piel de frutos.

Para la determinación de metabolitos en piel de frutos se inoculó a un grupo de duraznos mediante el proceso ya descrito en materiales y métodos, la evaluación de los mismos se hizo a 6h de inoculados con *M. fructicola*.

4.3.2.1. Cultivar Flordaking

En piel de frutos testigos y en ausencia de inóculo el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) y ACG ($\mu\text{g/gpf}$) mostró diferencias entre los estados de desarrollo del fruto (Tabla 22). Lo mismo se observó en pulpa, siendo máximo en los estados de EC y FV, mínimo en Cs con diferencias significativas para fenoles (Figura 30- A). El ACG manifestó bajo contenido en FV y Cs (Figura 30-B).

En cuanto al efecto de los fosfitos se observó mayor contenido de fenoles en piel de frutos tratados con fosfitos con diferencias significativas respecto a frutos sin tratar (Figura 31). En estado de EC en frutos en ausencia y presencia de inóculo, los FFK 0,3% mostró mayor contenido de fenoles totales; y en estado de FV en frutos inoculados ambos fosfitos manifestaron mayores valores de fenoles (Figura 32). Además, se puede observar que en presencia del patógeno el contenido de fenoles en los frutos tratados con fosfitos se mantuvo y fue mayor, mientras que en el testigo cayó en los estados de EC y FV. En estado de Cs los fosfitos no tuvieron efecto sobre frutos inoculados.

Los tratamientos con fosfitos no expresaron diferencias en el contenido de ACG. Por otro lado, este metabolito sufrió una caída ante la presencia del patógeno (Figura 33). Este patrón se dio en todos los estados de desarrollo del fruto y para todos los tratamientos, a excepción del FFCa 0,3% en EC. Este resultado podría deberse a la posibilidad de que el patógeno desarrollara vías de ataque que contrarrestan la defensa del fruto.

PIEL DE FRUTO	FENOLES TOTALES	AC. CLOROGENICO
FV	F	F
ESTADO (EF)	103,44**	10,51**
INOCULACIÓN (In)	0,84	15,79**
TRATAMIENTO (Tr)	6,58**	0,28
In x Tr	0,26	2,40
EF x Tr	2,34	2,80*

EF x In	1,74	0,22
In x Tr x EF	1,09	3,35*

Tabla 22. Análisis de la varianza para el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) y ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de frutos 'Flordaking'. **EF**= estado de fruto; **In**= Inoculación; **Tr**= tratamiento. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

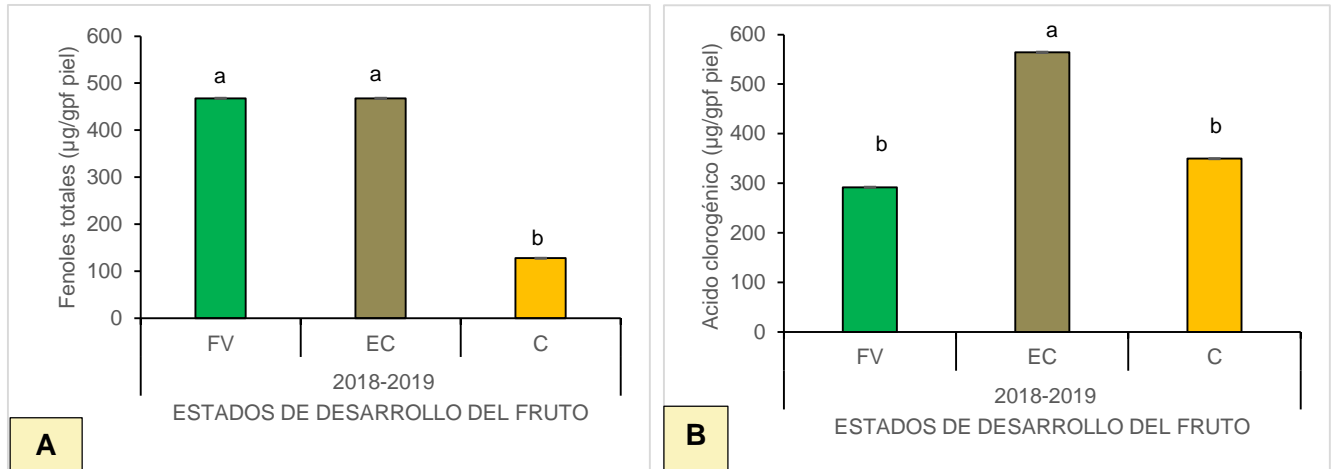


Figura 30. Evolución en el contenido de fenoles totales y ACG en piel de frutos 'Flordaking', tratados con agua (testigo) y en ausencia de inóculo, en diferentes estados de desarrollo. **A**- Fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$); **B**- Acido clorogénico ($\mu\text{g/gpf}$). **FV**= Fruto verde; **EC**= Endurecimiento de carozo; **C**= Cosecha. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$).

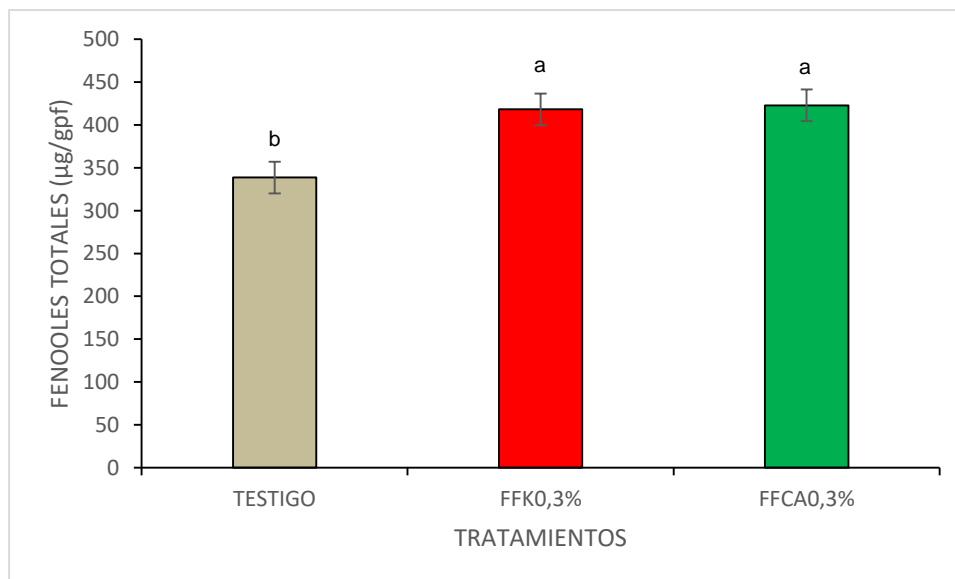


Figura 31. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de fruta 'Flordaking' tratada con fosfitos

de potasio (FFK0,3%) y fosfitos de calcio (FFCa 0,3%). Los promedios corresponden a todos los estados de desarrollo del fruto, en presencia y ausencia del inóculo de *M. fructicola*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

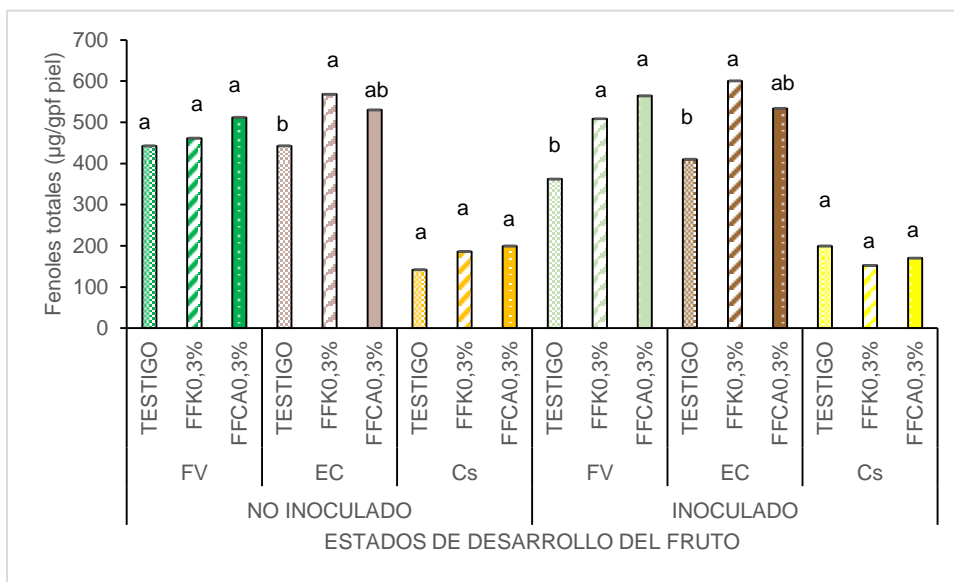


Figura 32. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de fruta 'Flordaking' tratada con fosfitos de potasio (FFK0,3%) y fosfitos de calcio (FFCa 0,3%), en ausencia y presencia de inóculo de *M. fructicola*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos dentro de la combinación EF \times In. **EF**= Estado del fruto; **In**= inoculación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

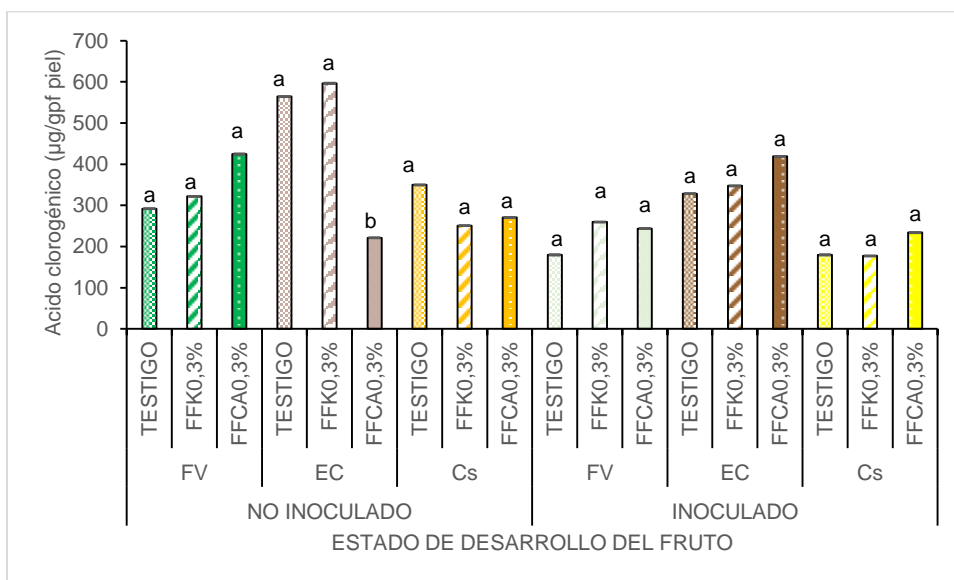


Figura 33. Contenido de ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de fruta 'Flordaking' tratada con fosfitos de potasio

(FFK0.3%) y fosfitos de calcio (FFCa0.3%), en ausencia y presencia de inóculo de *M. fructicola*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos dentro de la combinación EF x In. **EF**= Estado del fruto; **In**= inoculación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

4.3.2.2. Cultivar Elegant Lady

Ambos metabolitos manifestaron un comportamiento diferencial a lo largo de las etapas de desarrollo del fruto (Tabla 23). Los fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de frutos sin tratamientos con fosfitos (testigo con agua) y en ausencia de inóculo, alcanzaron un máximo en EC con caída en FV y C (Figura 34- A); el ACG presentó niveles más altos en FV y EC, con caída a Cs (Figura 34-B).

El contenido de fenoles totales no fue afectado por los tratamientos con fosfitos (Tabla 23). En cuanto a la concentración de fenoles totales en piel de frutos inoculados, ésta disminuyó más de la mitad comparado con frutos no inoculados en estados de EC y Cs (Figura 35). Para el ACG, se evidenciaron diferencias entre tratamientos, donde el tratamiento testigo y FFCa 0,3% manifestaron los valores más altos del metabolito (Figura 36). El contenido de ACG en piel aumentó ante la presencia del inóculo, con diferencias significativas respecto a los frutos en ausencia del patógeno (Figura 37), en contraposición a lo que ocurrió en Flordaking.

PIEL DE FRUTO	FENOLES TOTALES	AC. CLOROGENICO
FV	F	F
ESTADO (EF)	238,27**	14,36**
INOCULACIÓN (In)	318,60**	0,30
TRATAMIENTO (Tr)	0,33	3,62*
EF x In	134,97**	10,47**
EF x Tr	0,17	1,43
In x Tr x EF	1,28	1,34

Tabla 23. Análisis de la variancia para el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/gpf}$) y ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de frutos 'Elegant lady'. **EF**= estado de fruto; **In**= Inoculación; **Tr**= tratamiento. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

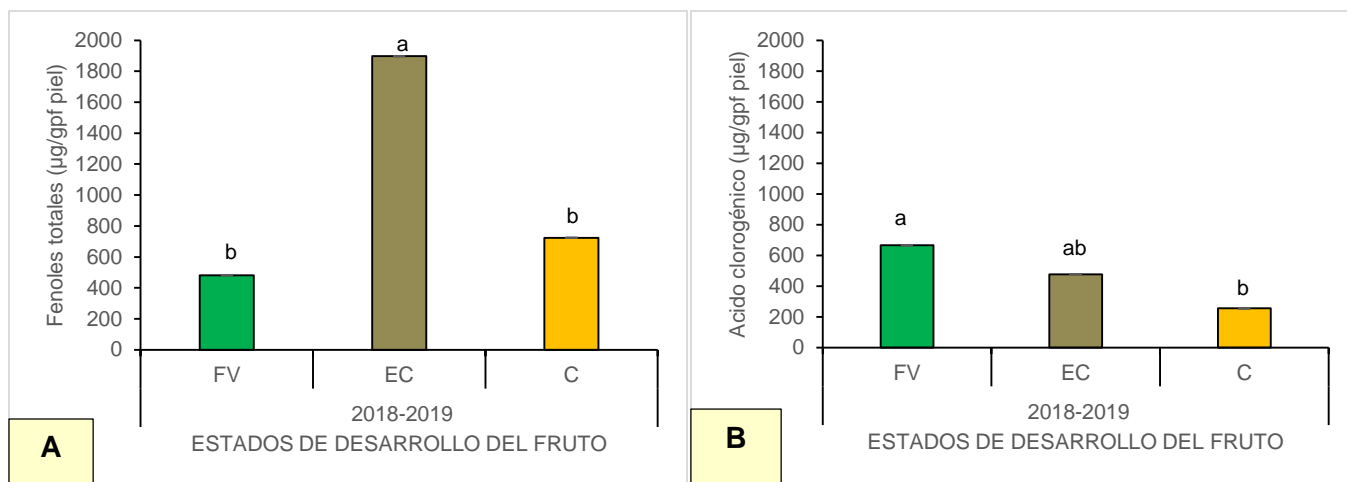


Figura 34. Evolución en el contenido de fenoles totales y ACG en piel de frutos ‘Elegant lady’, en ausencia de fosfitos y de inóculo, en diferentes estados de desarrollo. **A-** Fenoles totales (µg/g fruta fresca); **B-** ACG (µg/g fruta fresca). **FV=** Fruto verde; **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$).

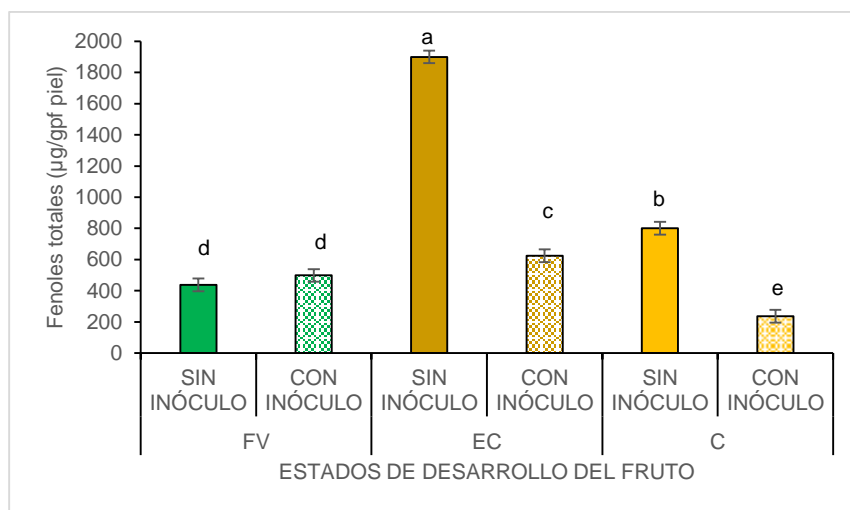


Figura 35. Contenido de fenoles totales (µg/g fruta fresca) en piel de frutos ‘Elegant lady’, tratados con fosfitos en ausencia y presencia de inóculo de *M. fructicola*. **FV=** Fruto verde; **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. **In=** inoculados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) para la combinación EF × In. **EF=** Estado del fruto; **In=** Inoculación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

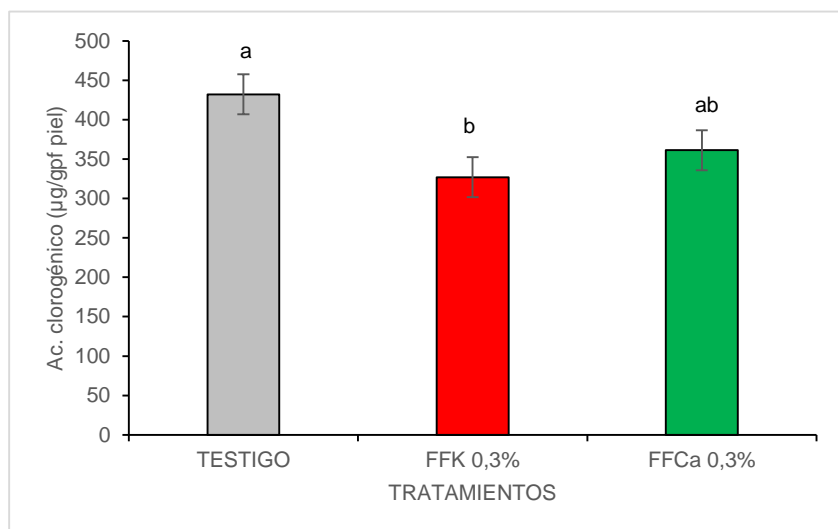


Figura 36. Contenido de ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de frutos cultivar Elegant lady tratados con fosfitos de potasio (FFK 0,3%) y fosfitos de calcio (FFCa 0,3%). Los promedios corresponden a todos los estados de desarrollo del fruto, en presencia y ausencia del inóculo de *M. fructicola*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

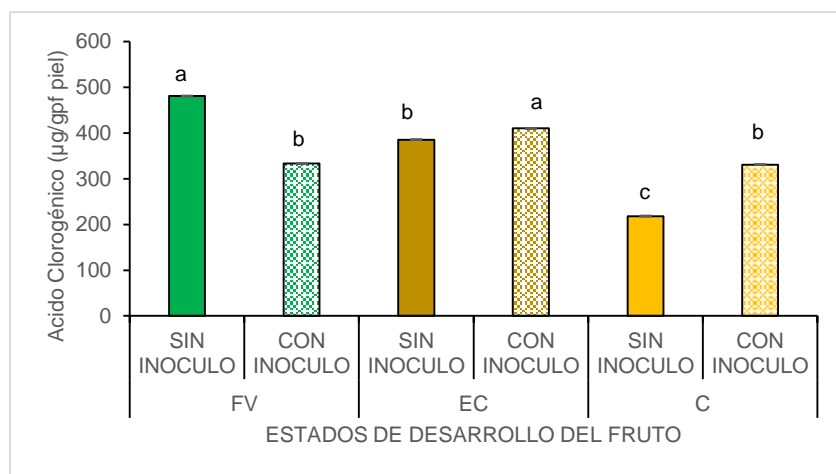


Figura 37. Contenido de ACG ($\mu\text{g/gpf}$) en piel de frutos cultivar Elegant lady, tratados con fosfitos en ausencia y presencia de inóculo de *M. fructicola*. **FV**= Fruto verde; **EC**= Endurecimiento de carozo; **Cs**= Cosecha. **In**= Inoculados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) para la combinación EF \times In. **EF**= Estado del fruto; **In**= Inoculación. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

4.3.3. Actividad enzimática antioxidante relacionada con los mecanismos de resistencia

Haciendo referencia a lo ya mencionado en materiales y métodos las actividades enzimáticas se midieron en dos momentos diferentes del estado de desarrollo del fruto, de mayor resistencia natural ante la enfermedad (EC) y de mayor susceptibilidad natural (Cs) según la bibliografía. Para el cultivar Flordaking se midió a 60 días DDPF y 93 DDPF, mientras para 'Elegant lady' se midió a 55 y 110 DDPF. Es necesario mencionar en esta instancia, que 55 DDPF, momento en que se midió actividad enzimática en 'Elegant Lady', coincide con inicios de lignificación del carozo (EC) para el cultivar, y si bien según los resultados encontrados en esta tesis la incidencia de podredumbre morena fue baja, concluimos que el momento de mayor resistencia fue entre 80 y 90 DDPF, como ya se mencionó en el capítulo II.

4.3.3.1. Actividad PPO

4.3.3.1.1. Cultivar Flordaking

La actividad PPO mostró diferencias entre los tratamientos en estado de EC. Además, manifestó interacción entre TDI × Tr en estado de Cs (Tabla 24). En estado de EC (60 DDPF) el tratamiento testigo con agua mostró mayor actividad enzimática (Figura 38), luego le siguió el FFCa 0,3% sin diferencias estadísticas con el testigo. Por otro lado, en el estado de Cs (93 DDPF) el tratamiento con FFCa mostró mayor actividad enzimática en relación al testigo ($p < 0,05$) a tiempo 0 (AI) y a 6h de inoculación; sin embargo, luego a 24 y 48 h dicha actividad enzimática cayó (Figura 39). Se observó a cosecha una tendencia en el aumento de la actividad enzimática en los frutos tratados con fosfitos, a excepción de 24 y 48 h de inoculación.

FV	ESTADO DE DESARROLLO	
	EC	Cs
Tiempo desde la inoculación (TDI)	1,38	15,11*
Tratamiento (Tr)	4,51*	10,73**
TDI × Tr	0,93	3,62*

Tabla 24: Análisis de variancia para la actividad PPO ($U\ mg^{-1}proteína$) en dos estados de desarrollo del fruto 'Flordaking'. **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. Los ** indican diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

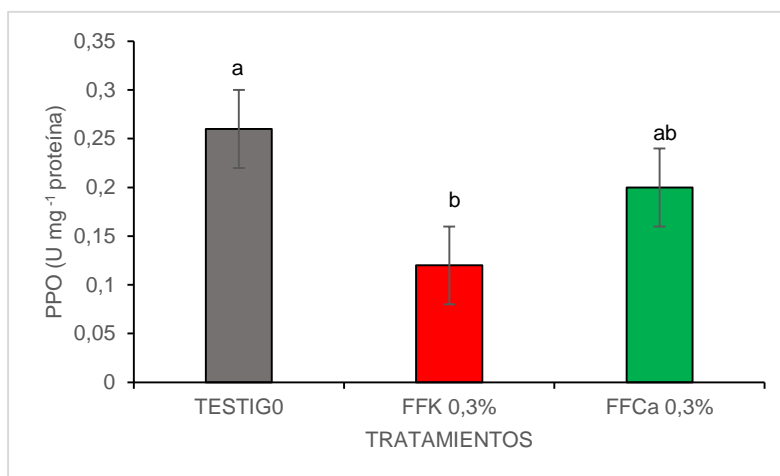


Figura 38. Actividad enzimática PPO (U mg^{-1} proteína) en piel de frutos de 'Flordaking' sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos y a diferentes tiempos de inoculación, en estado de endurecimiento de carozo (EC). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos.

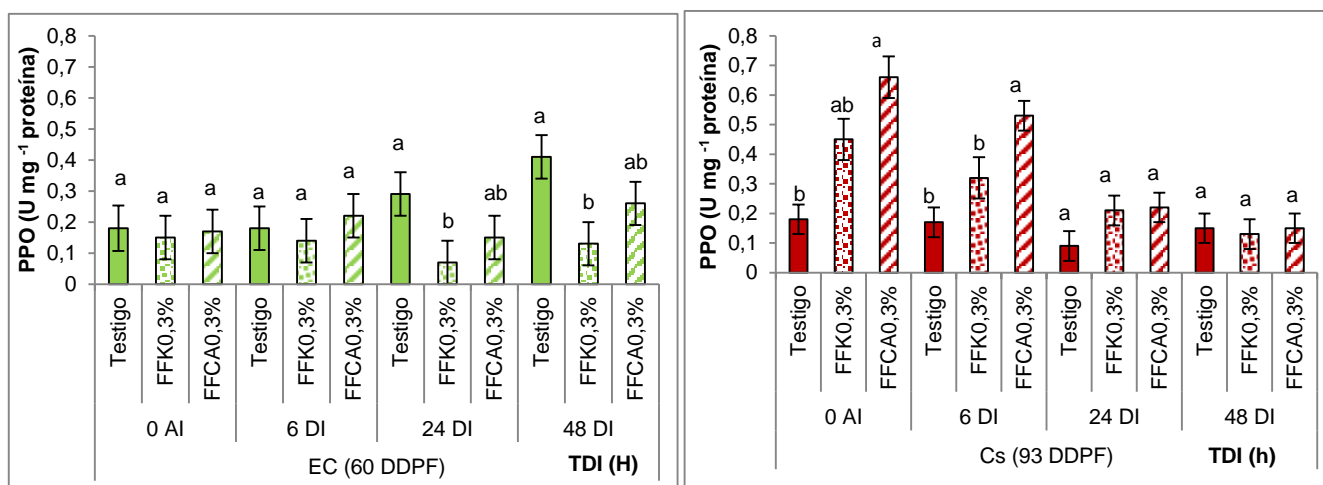


Figura 39. Actividad enzimática PPO (U mg^{-1} proteína) en piel de frutos de 'Flordaking' sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos y a diferentes tiempos de inoculación, en estado de endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) para la combinación $\text{TDI} \times \text{Tr}$ **TDI**= Tiempo desde la inoculación; **Tr**= Tratamiento. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

4.3.3.1.2. Cultivar *Elegant lady*

La actividad enzimática PPO en 'Elegant lady', a diferencia de 'Flordaking', no manifestó

cambios significativos entre tratamientos, como tampoco en los diferentes tiempos desde la inoculación en los estados de EC y de cosecha (Tabla 25). Sin embargo, en la figura 40 se observa en estado de endurecimiento de carozo, mayor actividad PPO ante tratamientos con FFCa 0,3% en ausencia de inóculo.

	ESTADO DE DESARROLLO	
FV	EC	Cs
Tiempo desde la inoculación (TDI)	1,48	2,49
Tratamiento (Tr)	0,02	0,00
TDI x Tr	1,90	1,99

Tabla 25: Análisis de variancia para la actividad PPO ($U\ mg^{-1}proteína$) en dos estados de desarrollo del fruto 'Elegant lady'. **EC=** Endurecimiento de carozo; **Cs=** Cosecha. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

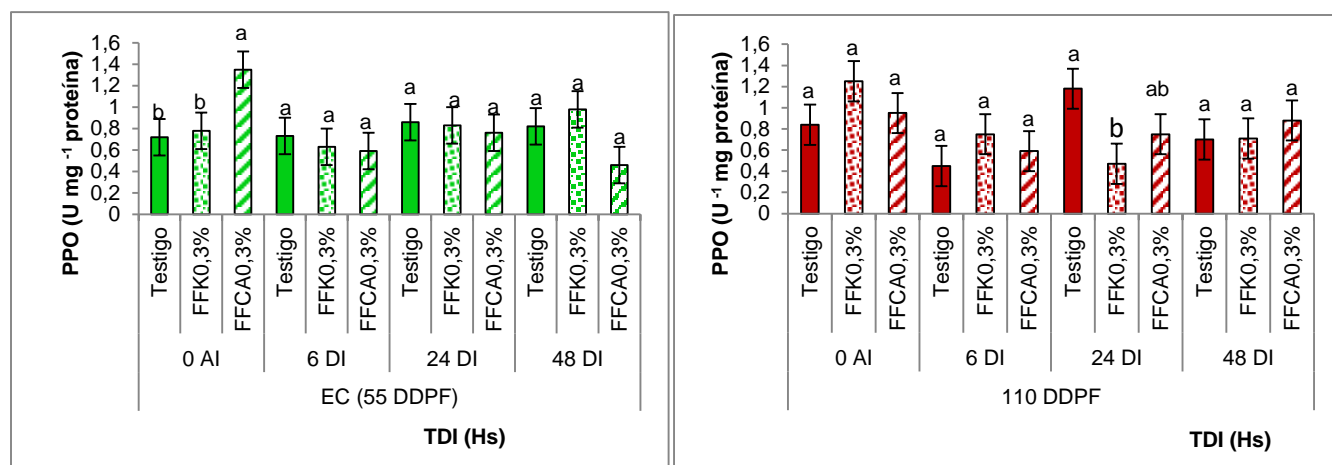


Figura 40. Actividad enzimática PPO ($U\ mg^{-1}\ proteína$) en piel de frutos de 'Elegant Lady' sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos y a diferentes tiempos de inoculación, en estado de endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p\leq 0,05$) para la combinación TDI x Tr **TDI=** Tiempo desde la inoculación; **Tr=** Tratamiento. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

'Elegant Lady' presenta valores más altos de PPO ($U\ mg^{-1}\ proteína$) en piel de duraznos sin tratar respecto a 'Flordaking' (Figura 41). Ante aplicaciones de fosfitos el contenido de la enzima cae a cosecha para 'Elegant Lady' sin diferencias estadísticas respecto a EC, sin embargo, en 'Flordaking' el contenido de la enzima es mayor a cosecha, con diferencias respecto a endurecimiento de carozo (Figura 42).

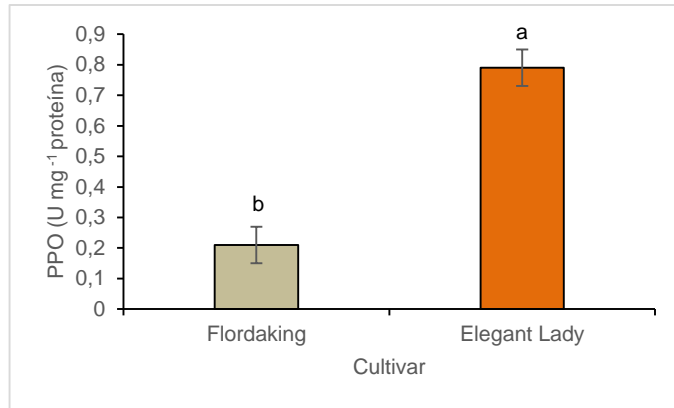
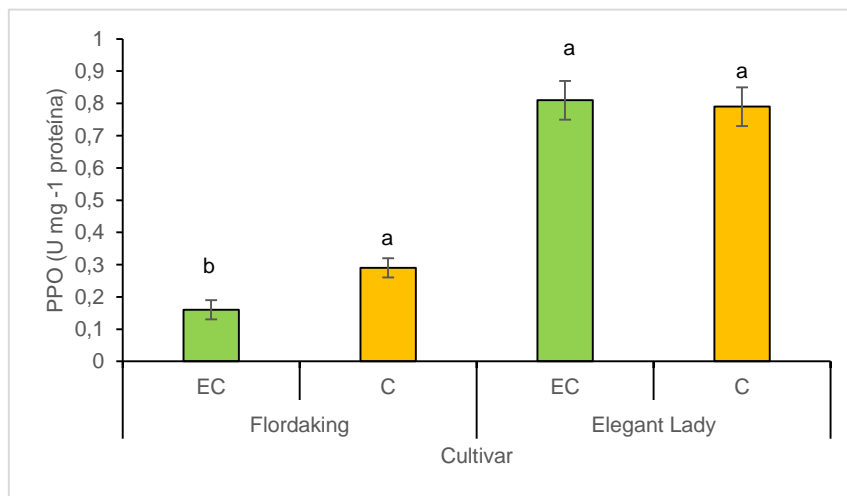


Figura 41. Actividad enzimática PPO (U mg⁻¹ proteína) en piel de frutos de ambos cultivares sin tratar, en ambos estados de desarrollo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.



42. Actividad enzimática PPO (U mg⁻¹ proteína) en piel de frutos tratados con fosfitos de potasio y calcio, en endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs), para ambos cultivares. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) para la interacción cultivar x estados de desarrollo. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

4.3.3.2. Actividad (POD)

4.3.3.2.1. Cultivar Flordaking

Se obtuvieron diferencias significativas en la interacción TDI × Tr en estado de cosecha (Tabla 26). En la Figura 43 se puede observar un aumento de la actividad POD a 6h de inoculación en frutos tratados con FFK 0,3%; dicha respuesta no se mantuvo con el tiempo de inoculación. Los tratamientos con fosfitos no manifestaron inducción de actividad POD en ninguno de los dos estados de desarrollo estudiados (Tabla 26 - Figura 43).

	ESTADO DE DESARROLLO	
FV	EC	Cs
Tiempo desde la inoculación (TDI)	0,21	4,15**
Tratamiento (Tr)	0,37	1,02
TDI × Tr	0,92	2,81*

Tabla 26. Análisis de variancia para la actividad POD (U mg⁻¹ proteína) en dos estados de desarrollo del fruto 'Flordaking'. **EC**= Endurecimiento de carozo; **Cs**= Cosecha. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,01). Los * indican diferencias estadísticamente significativas.

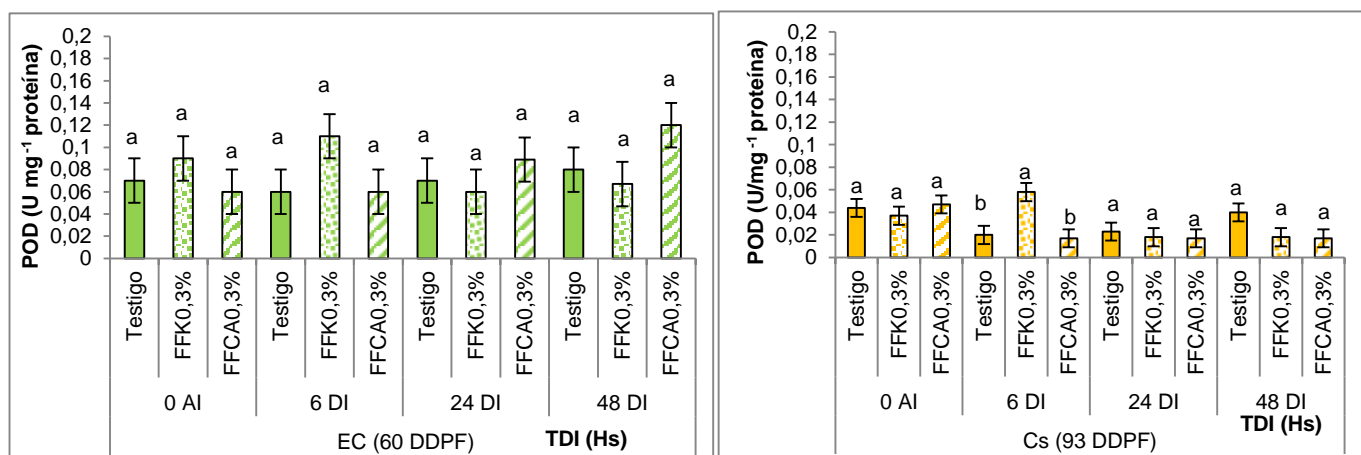


Figura 43. Actividad enzimática POD (U mg⁻¹ proteína) en piel de frutos 'Flordaking', sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos con diferentes tiempos de inoculación, en estado de endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs). **TDI**= Tiempo de inoculación (h); **AI**= Antes de inoculación o tiempo 0; **DI**= Después de inoculación (DI): 6, 24 y 48 horas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, p≤ 0,05) de tratamientos

para cada TDI. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

4.3.3.2.2. Cultivar *Elegant lady*

Los frutos de 'Elegant Lady', no manifestaron diferencias entre tratamientos para la inducción POD en ninguno de los dos estados de desarrollo (Tabla 27). Sin embargo, se evidenció mayor actividad enzimática en tiempo 0 desde la inoculación para el FFCa 0,3% en estado de cosecha, aunque sin diferencias con el testigo (Figura 44). En presencia del patógeno no hubo inducción por parte de ninguno de los tratamientos.

FV	ESTADO DE DESARROLLO	
	EC	Cs
Tiempo desde la inoculación (TDI)	0,90	2,39
Tratamiento (Tr)	0,19	1,60
TDI x Tr	1,20	1,28

Tabla 27. Análisis de variancia para la actividad POD ($U\ mg^{-1}\ proteína$) en dos estados de desarrollo del fruto 'Elegant Lady'. **EC**= Endurecimiento de carozo; **Cs**= Cosecha. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los * indican diferencias estadísticamente significativas.

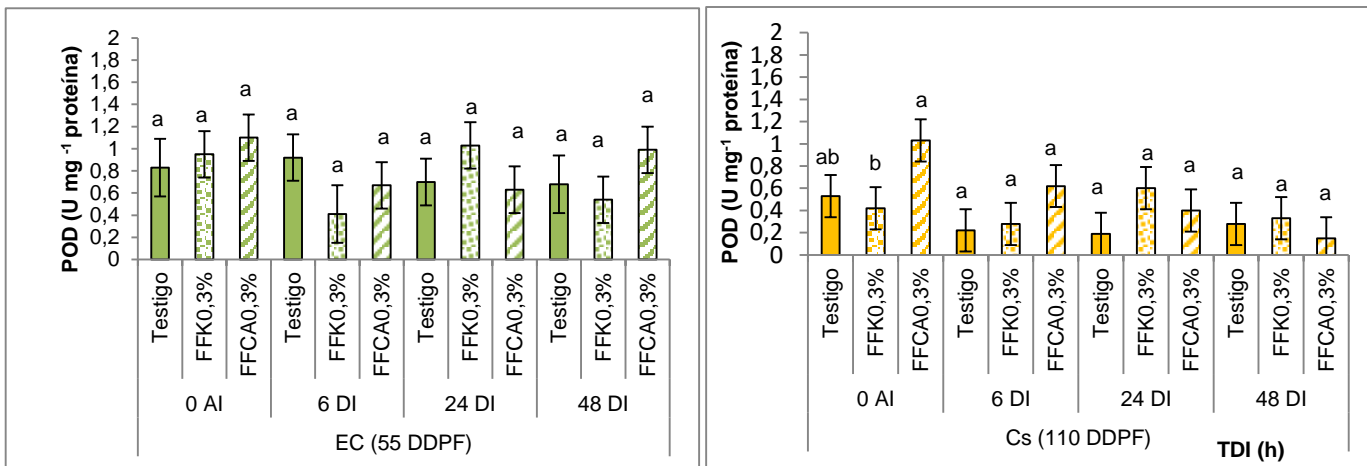


Figura 44. Actividad enzimática POD ($U\ mg^{-1}\ proteína$) en piel de frutos 'Elegant Lady', sometidos a diferentes tratamientos con fosfitos, en diferentes tiempos de inoculación; en estado de endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs). **TDI**= Tiempo de inoculación (h); **AI**= Antes de inoculación o tiempo 0; **DI**= Después de inoculación (DI): 6, 24 y 48 horas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) entre tratamientos dentro de cada TDI. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

En frutos sin tratar 'Elegant Lady' presenta mayor actividad enzimática POD respecto a Flordaking (Figura 45). En ambos cultivares, la actividad POD cayó en estado de cosecha respecto a endurecimiento de carozo, con diferencias significativas (Figura 46).

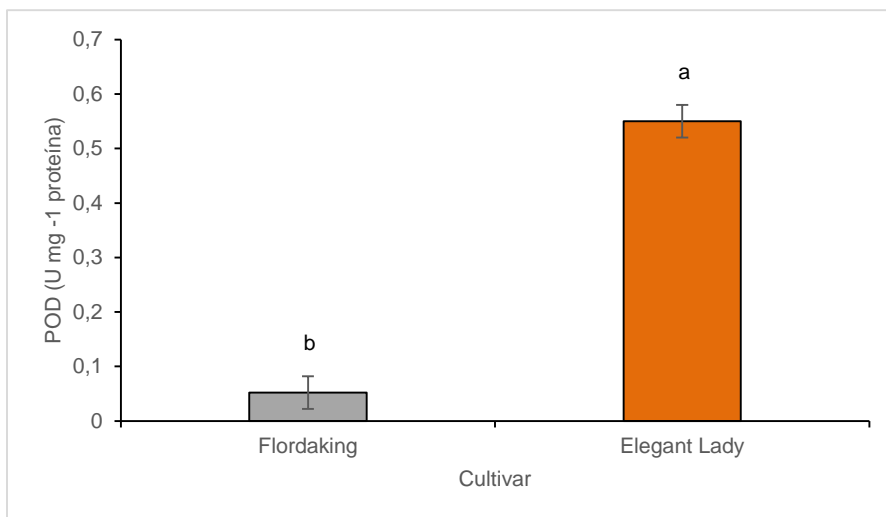


Figura 45. Actividad enzimática POD (U mg⁻¹ proteína) en piel de frutos de ambos cultivares sin tratar, en ambos estados de desarrollo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

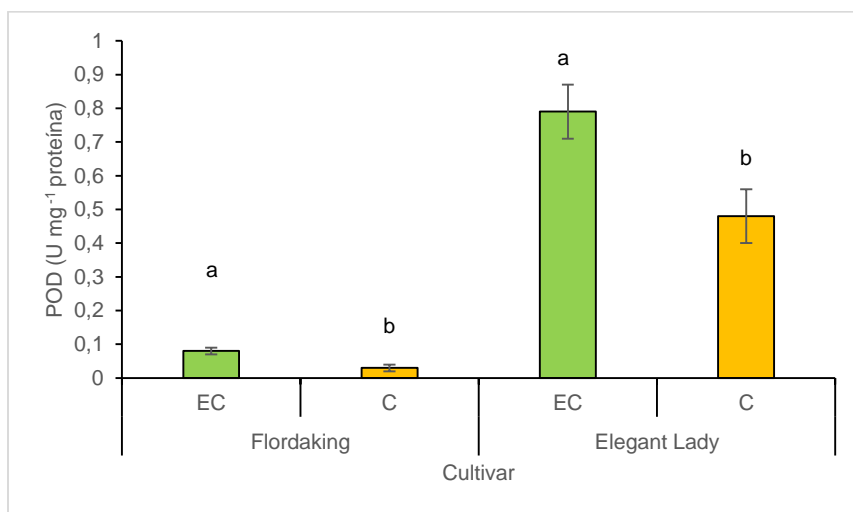


Figura 46. Actividad enzimática POD (U mg⁻¹ proteína) en piel de frutos tratados con fosfitos de potasio y calcio, en endurecimiento de carozo (EC) y cosecha (Cs), para ambos cultivares. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$) para la interacción cultivar x estados de desarrollo. Las barras verticales representan \pm el error estándar

de la media.

4.4. DISCUSIÓN

Es conocido el rol de los fenoles como sustancias capaces de inhibir el crecimiento de patógenos o generar condiciones adversas para la supervivencia del mismo en tejidos del hospedante (Hammerschmidt, 2014). La acumulación de estos metabolitos y otras respuestas de defensa generalmente se disparan ante estrés abiótico y biótico como, por ejemplo, cuando la planta es atacada por un patógeno; ésta es más rápida y de mayor magnitud cuando la interacción es de tipo incompatible (Hernández Sánchez *et al.*, 2002; Hernández Navarro, 2008).

En durazno, altos niveles de resistencia a *M. fructicola* se asociaron con gran cantidad de compuestos fenólicos, siendo el ácido cafeico y ACG los más implicados en esta reacción (Gradziel *et al.*, 1998; Chiu *et al.*, 2013); tales compuestos inhiben la producción de cutinasa, enzima que secretan los patógenos para facilitar su entrada (Hernández Navarro, 2008). Además, los productos de oxidación del ACG son capaces de inhibir las poligalacturonasas y la formación de apresorios, inactivando enzimas involucradas en la patogénesis. Esto sugiere que el ACG ejerce un papel en la resistencia a contraer enfermedad al interferir con los procesos fúngicos necesarios para la infección y no como un compuesto antimicrobiano (Hammerschmidt, 2014).

Existe bibliografía que menciona un mayor contenido de ACG, cafeico y otros fenoles, como catequina y epicatequina, en etapa II de desarrollo de frutos de durazno, respecto a las etapas I y III, con un posible papel en la detención de infecciones latentes durante el desarrollo de la fruta (Lee y Bostock, 2007; Chiu *et al.*, 2013; Mustafa *et al.*, 2021). En concordancia con lo mencionado por dichos autores, en este trabajo se observó también un patrón estacional en el contenido de fenoles totales y ACG a lo largo del desarrollo del fruto en ambos cultivares y en ambos tejidos (epicarpio y mesocarpio). En EC y formación del embrión (etapa II) el contenido de ambos metabolitos se hizo máximo y en estado de maduración, previo a la cosecha (etapa III) fue mínimo. Estas variaciones acompañan la curva de menor y mayor susceptibilidad del fruto ante la enfermedad. La caída en el contenido de fenoles y ACG que se observó en esta tesis coincide con reportes existentes en los cuales, el perfil fenólico en la piel de la fruta cambió notablemente durante la maduración con una reducción constante del contenido en frutos maduros que se volvieron al mismo tiempo más susceptibles a infecciones (Sanzani *et al.*, 2014).

El uso de fosfitos es altamente investigado, e incluso es usado comercialmente como alternativa de menor costo para el control de enfermedades, amigable con el medio ambiente y de bajo riesgo para la salud humana. Estos compuestos son usados como elicitores abióticos que inducen una respuesta de defensa en el fruto. Su modo de acción puede ser directamente en el patógeno, como comprobamos en el capítulo I de esta tesis; o indirecta, estimulando las respuestas de defensa en el hospedante. El uso de fosfitos redujo la incidencia de podredumbres en cultivares de manzana Gala y Fuji. En duraznos, la información sobre el uso de fosfitos como elicitores es escasa (Kaehler Sautter *et al.*,2011). Al respecto, Nativitas-Lima (2021) observó un aumento de fenoles totales en frutos de nectarinas en estado de madurez fisiológica inoculados con *M. fructicola*, en plantas tratadas con FFK (3,5 mL/L), respecto al testigo sin inductor. Esto se condice con una disminución del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y la severidad final (mm) de *M. fructicola* encontrada por el autor en frutos de nectarinas con una disminución de la misma ante tratamientos de FFK combinados con fungicidas en dosis reducida y ante tratamientos de fosfitos solos.

En esta tesis la aplicación de fosfitos también indujo mayor contenido de fenoles totales en piel de frutos 'Flordaking' inoculados con *M. fructicola* y sin inocular, respecto al testigo sin inductor. Sin embargo, dicha inducción no alcanzó para contrarrestar la enfermedad. Por otra parte, en el cultivar Elegant lady ante la presencia de inóculo el contenido de fenoles totales cayó, con lo cual, el patógeno desarrolló vías de ataque que quebraron las defensas del fruto.

El ACG ante la presencia de inóculo disminuyó en todos los tratamientos y estados de desarrollo en el cultivar Flordaking, excepto cuando fueron tratados con FFCa 0,3% en EC; en cambio en Elegant Lady aumentaron en EC y Cs.

En cuanto al rol de las enzimas antioxidantes, algunas se relacionan con el grado de susceptibilidad de las plantas a enfermedades. Se ha observado un aumento de la actividad PPO después de la infección de virus, bacterias, hongos y daños mecánicos (Hernández Sánchez *et al.*, 2002). La PPO cataliza la oxidación de polifenoles a quinonas (compuestos antimicrobianos) y participa en la lignificación de las células vegetales durante el ataque de patógenos (Nativitas-Lima, 2021). Algunos modelos de interacción hospedero-patógeno han aportado evidencias del papel de la enzima POD como parte de los mecanismos de defensa. Se han involucrado en respuesta a enfermedades porque al igual que las PPO, catalizan la oxidación de compuestos fenólicos para la polimerización de lignina; además participa en el sistema de defensa al neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteger a las células del estrés oxidativo

(Nativitas- Lima, 2021). En estudios realizados en manzanas se encontró que el aumento en su actividad es un factor especialmente importante a través de la lignificación, la cual está relacionada con la resistencia del fruto frente a la infección con *Penicillium expansum* (Caicedo *et al.*, 2009).

Aunque existen diversos reportes de interacciones hospedero-patógeno en los que enzimas del tipo POD han estado involucradas como posible mecanismo de defensa, no existen muchos reportes de estudios en *Prunus persica* L. Bastch y *M. fructicola*, que aporten al conocimiento de esta interacción particular. Nativitas-Lima (2021) encontró inducción POD en presencia de FFK sólo y en combinación con fungicida en dosis reducida (75% de la dosis comercial) para el patosistema *M. fructicola* - nectarinas; también encontró aumento de actividades PPO y catalasa ante la aplicación de fosfito de potasio.

En los experimentos realizados en el marco de esta tesis doctoral, en estado de cosecha se evidenció efecto inductivo de los FFCa sobre la actividad PPO (U mg⁻¹ proteína) a 6 h de inoculación para el cultivar. En ausencia del patógeno también se observó efecto inductivo del FFCa en estado de cosecha en 'Flordaking'. En 'Elegant Lady' no hubo efecto inductivo PPO por lo que se podría decir que quizás los fosfitos tendrían mayor efectividad para Flordaking. Hernández Sánchez, *et al.*, (2002) también infirió la participación de los fenoles, fenilalaninamonoliase (PAL) y PPO en el mecanismo de defensa del duraznero ante el ataque de la cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev. var. *persicae* Wor.), lo que ocurre principalmente en las primeras 24 h después de la inoculación para evitar el establecimiento del patógeno, sobre todo en los genotipos tolerantes. Según los resultados encontrados en 'Flordaking' podríamos decir que la PPO quizás también forma parte del mecanismo de defensa del patosistema *M. fructicola* - *Prunus persica*, para evitar el establecimiento del patógeno, aunque luego el patógeno supere dichas barreras.

Por otro lado, en estos estudios si bien no se observaron diferencias en la actividad enzimática POD ante los diferentes tratamientos, 'Flordaking' a 6 h de inoculación manifestó inducción POD ante tratamientos con FFK 0,3% en estado de cosecha; de acuerdo con Nativitas – Lima (2021), quien encontró inducción de POD en nectarinas en estado de madurez fisiológica ante tratamientos con FFK y en presencia del patógeno.

Además, en el marco de esta tesis se evidenciaron mayores niveles de actividad POD en estado de EC y formación del embrión respecto al estado de cosecha, con diferencias

significativas en ambos cultivares. Esto coincide con altos niveles de compuestos fenólicos y menor susceptibilidad ante *M. fructicola*, pudiendo formar parte de la defensa pasiva del hospedero, ante el posible ataque de patógenos o como defensa constitutiva durante la formación del embrión.

Los valores encontrados por Nativitas –Lima (2021) en la expresión de fenoles totales, PPO y POD en nectarinas tratadas con FFK solo y en combinación con fungicida, son más elevados que los encontrados en el presente trabajo. Los contenidos de fenoles, PPO y POD expresados en las nectarinas fueron de 1,2mg gpf^{-1} , 4 U mg^{-1} proteína, y 5,5 U mg^{-1} proteína respectivamente, mientras que los encontrados en duraznos en este trabajo fueron de 0,2mg gpf^{-1} , 0,45 U mg^{-1} proteína, 0,42 U mg^{-1} proteína para Flordaking y 0,9 mg gpf^{-1} , 1,3 U mg^{-1} proteína, 0,03 U mg^{-1} proteína para Elegant lady.

Nativitas-Lima (2021) observó buenos resultados ante la aplicación de FFK solo y en combinación con fungicida con menores niveles en el desarrollo de la enfermedad a diferencia de los resultados encontrados en esta tesis. Esto podría deberse a que se trabajó sobre diferentes cultivares de durazneros, y de acuerdo a los resultados volcados en esta tesis los mismos pueden expresar respuestas diferentes. El autor trabajó sobre nectarina, variedad botánica diferente a los durazneros (*Prunus persica* var. nucipersica) mientras que en esta experiencia se evaluó el efecto de los fosfitos sobre dos cultivares de duraznero. Las nectarinas son una variedad de duraznero sin pilosidad con lo cual la anatomía superficial de la fruta es diferente a la del durazno (Manganaris *et al*, 2006). Por otro lado, el autor en sus experiencias utilizó dosis más altas de fosfitos y coadyuvante mientras que en los ensayos de esta tesis no se usó ningún adherente que disminuya la tensión superficial y mejorase la permanencia de la gota sobre la epidermis.

La alta susceptibilidad del fruto en estado previo a la cosecha, podría explicarse debido a que durante la maduración los mecanismos de resistencia dentro del fruto (concentración de fenoles y cambios estructurales) ante la presencia del patógeno, suelen declinar, haciendo lugar a las infecciones latentes que se produjeron en el campo. Durante el crecimiento del fruto en la etapa III, se generan microfisuras lo que provoca un aumento en la transpiración del fruto, ablandamiento acelerado del mismo y ofrece potenciales entradas al hongo (de Oliveira Lino *et al*, 2015). Los patógenos ganan vías de entrada ante las fisuras de la cutícula, daños por insectos o incluso por estomas y lenticelas (Mustafa *et al*, 2021; Bowen *et al.*, 2022). En esta etapa del desarrollo del fruto la cutícula deja de jugar su rol de barrera física ante los patógenos (de Oliveira

et al, 2015).

4.5. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del fruto de durazno se producen cambios en los contenidos de fenoles totales y ACG, con pico en estado II y caída durante la maduración (etapa III). En general, se puede decir que la curva de susceptibilidad del fruto ante *M. fructicola* acompaña dichos cambios.

En el patosistema *Prunus persica* L. Bastch – *M. fructicola*, los diferentes cultivares manifiestan diferente comportamiento ante la aplicación de fosfitos y en la inducción de mecanismos de defensa. Ante la aplicación de fosfitos 'Flordaking' respondió con aumento de fenoles totales en estado de fruto verde y endurecimiento de carozo; e inducción de actividad enzimática PPO en ausencia del patógeno y a 6 h de inoculado, en estado de cosecha con aplicaciones de FFCa 0,3%. Además, indujo actividad POD a 6 h de inoculación ante aplicaciones de FFK 0,3%. Elegant lady, por otra parte, mostró una disminución del contenido de fenoles totales y un aumento del contenido de ACG en estado de EC y Cs en respuesta a *M. fructicola*. No indujo actividad enzimática ante aplicación de fosfitos.

Según los resultados obtenidos, en el patosistema estudiado hay una tendencia de los FFCa en ejercer un mayor papel en la inducción de mecanismos de defensa (efecto de acción indirecto) respecto a los FFK.

El uso de fosfitos solos como inductores no es suficiente para el manejo de *M. fructicola*.



Capitulo IV

Efecto de tratamientos con fosfitos solos y en combinación con fungicida sobre el desarrollo de podredumbre morena y calidad poscosecha de frutos

CAPITULO IV

EFFECTO DE TRATAMIENTOS CON FOSFITOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN CON FUNGICIDA SOBRE EL DESARROLLO DE PODREDUMBRE MORENA Y CALIDAD POSCOSECHA DE FRUTOS

5.1. INTRODUCCION

Los fosfitos son sales inorgánicas estériles originadas de la neutralización del ácido fosforoso por una base (Thao & Yamakawa, 2009; Deliopoulos *et al.*, 2010; Yáñez-Juárez *et al.*, 2017; Estrada-Ortíz *et al.*, 2011). El interés por el uso de fosfitos se fue acrecentando, debido a que tiene una rápida absorción por las plantas, un alto grado de solubilidad y alta capacidad de moverse desde las hojas hacia las raíces por el floema (Thao & Yamawaka, 2009; Estrada-Ortíz *et al.*, 2011; Ogoshi *et al.*, 2013), generando control para algunas enfermedades radiculares e incrementando el efecto de algunos fungicidas (Nativitas-Lima, 2021). El fosfito pertenece al grupo químico de los fosfonatos, categoría toxicológica III de bajo impacto ambiental (Velandia Monsalve *et al.*, 2012). El fosfito representa un insumo agrícola eficiente para proteger los cultivos contra organismos patógenos mediante la inducción de mecanismos de defensa, actuando como inductor de resistencia vegetal de importancia para los nuevos enfoques de manejo de enfermedades.

Algunas investigaciones señalan que la eficiencia en el control de enfermedades es mayor con fungicidas respecto a los fosfitos (Yáñez-Juárez *et al.*; 2017), aunque también existen reportes de un mayor control del inductor en combinación con el fungicida (Walters *et al.*, 2013; Romanazzi *et al.*, 2016; Boneti y Katsurayama, 2005). La combinación de fosfito con dosis reducida de myclobutanil mejoró significativamente la eficiencia en el control de *Venturia pyrina* en hojas y frutos de pera, en comparación con la aplicación de cada producto por separado; lo mismo observó Nativitas-Lima (2021) en sus experiencias donde los parámetros epidemiológicos (severidad y tasa de crecimiento) de *M. fructicola* disminuyeron en la combinación de FFK (3 mL/L) con dosis reducida de fungicida (75% de la dosis recomendada comercialmente) en nectarinas.

Los fosfitos no sólo son utilizados para control de enfermedades, sino que también son ofrecidos en el mercado como bioestimulantes (Deliopoulos *et al.*, 2010; Yommi, 2021). Actualmente hay un mayor interés por su acción bioestimulante, debido a una creciente

conciencia por parte de los consumidores y reclamo por alimentos inocuos, que conllevan a la necesidad de contar con estrategias que permitan reducir el uso de pesticidas y hacer un manejo más racional y amigable con la salud humana y el ambiente (Yommi, 2021).

Entre las sustancias bioestimulantes se encuentran los ácidos fúlvicos y húmicos, compuestos que contienen nitrógeno y proteínas hidrolizadas, extractos de algas y de hierbas, quitosano y otros polímeros, compuestos inorgánicos, hongos y bacterias benéficos. Los fosfitos se encuentran en la categoría de compuestos inorgánicos, con actividad bioestimulante, aunque su modo de acción aún no se conoce (Yommi, 2021). La bibliografía menciona que estos compuestos mejoran la absorción y asimilación de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del producto, y que tienen un papel potenciador en diferentes procesos metabólicos de las plantas, mejorando el rendimiento y calidad de los frutos (Gómez-Merino y Trejo-Téllez; 2015).

Aplicaciones de calcio son utilizadas como una herramienta dentro del manejo integrado en la producción de duraznos, las cuales son amigables con el medio ambiente aumentando la firmeza del tejido en frutos y la resistencia a podredumbre morena. Los efectos beneficiosos de estas pulverizaciones con calcio antes de la cosecha dependen de muchos factores, como el tipo de sal utilizada y período de suministro, así como las condiciones de crecimiento y el cultivar (Manganaris *et al.*, 2006).

Los antecedentes del uso de fosfitos en frutales como bioestimulante son muy escasos. En cítricos, el asperjado con FFK durante el cuajado de los frutos aumenta el porcentaje de cuaje y tamaño final de los frutos con incremento del rendimiento; en palta también promueve el aumento del tamaño de frutos. El asperjado de plantas de manzano con FFCa, previo a la cosecha mejoró el color rojo de la fruta en 'Starking Delicious' y 'Braeburn', con aumento del contenido de antocianinas y también de flavonoides, mientras que el asperjado de plantas de durazno con fosfitos mejoró la firmeza de los frutos (Yommi, 2021).

La valoración de la calidad de los frutos a través de atributos de apariencia, textura y sabor en el momento de la cosecha es esencial, para la aceptación del producto fresco por parte del consumidor. La apariencia es uno de los atributos de calidad más apreciada donde las variables color y tamaño son los más valorados por el consumidor (Ortiz de Zárate *et al.*, 2007).

A diferencia del capítulo II, en este apartado de la tesis se quiso evaluar el uso de fosfitos

en un lote comercial de un productor frutícola, con un programa sanitario ya instalado de años; y no en un lote experimental donde en general no se usan aplicaciones fungicidas.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de tratamientos precosecha con fosfitos, solos y en combinación con fungicidas, sobre el desarrollo de *M. fructicola* y sobre parámetros de calidad poscosecha en frutos de duraznero.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Diseño del experimento y descripción de los tratamientos

El experimento se llevó adelante durante los años 2019 y 2020 para el cultivar Flordaking en un lote comercial de Piñero (latitud 33°05'05"S, longitud 60°42'57"W); y en los años 2019, 2020 y 2021 para 'Elegant lady' en un lote comercial de Álvarez (latitud 33°7'45"S, longitud 60°48'23"W), sur de la provincia de Santa Fe.

Se evaluaron 42 plantas de duraznero de 'Flordaking' y 'Elegant Lady' injertadas sobre cuaresmillo, sobre los que se aplicaron tratamientos a campo en diferentes estadios fenológicos del cultivo. Los tratamientos fueron: T1 Testigo con agua; T2 FFK 0,3%; T3 FFK 0,3% + fungicidas; T4 FFCa 0,3%; T5 FFCA 0,3% + fungicidas y T6 fungicidas. El fungicida en cada aplicación correspondió al utilizado por el productor quien fue rotando (Tabla 27). Las aplicaciones se realizaron en plena floración, 30, 15 y 7 días previo a la cosecha para cada cultivar. Cada tratamiento se evaluó en parcelas de dos plantas con tres repeticiones en bloques completos al azar.

Momento de aplicación	Fungicida comercial (Principio activo)				
	Flordaking		Elegant Lady		
	2019	2020	2019	2020	2021
Plena floración	Ziram (200gr/hl, PM 90%)	Ziram (200gr/hl, PM 90%)	Ziram (200gr/hl, PM 90%)	Ziram (200gr/hl, PM 90%)	Ziram (200gr/hl, PM 90%)
30 días antes de cosecha	Carbendazim (50cc/hl, SC 50%)	Carbendazim (50cc/hl, SC 50%)	Carbendazim (50cc/hl, SC 50%)	Carbendazim (50cc/hl, SC 50%)	Carbendazim (50cc/hl, SC 50%)

15 días antes de cosecha	Captan (150g/hl, WP 80%)	Captan (150g/hl, WP 80%)	Captan (150g/hl, WP 80%)	Captan (150g/hl, WP 80%)	Captan (150g/hl, WP 80%)
7 días antes de cosecha	Tebuconazole (30cc/hl, SC 43%)	Tebuconazole (30cc/hl, SC 43%)	Tebuconazole (30cc/hl, SC 43%)	Tebuconazole (30cc/hl, SC 43%)	Tebuconazole (30cc/hl, SC 43%)

Tabla 27. Cronograma de aplicación utilizado en las parcelas de 'Flordaking' y 'Elegant Lady', durante los años 2019 y 2020.

5.2.2. Cosecha y variables a analizar

Se recolectaron 20 frutos por parcela en los cuales se evaluó incidencia de podredumbre morena a tres y siete días de cosecha previamente almacenados a temperatura ambiente (25°C) simulando condiciones de mercado (Moreira y May-de Mio, 2009); y otros 20 frutos por parcela a los que se le midió parámetros de calidad poscosecha.

Para decidir el momento de recolección de frutos en cada año de experimentación se consideró la fecha probable de cosecha de acuerdo al ciclo de cada cultivar, y el estado de madurez según color de fondo y según el porcentaje de color rojo. En el año 2019, la cosecha de frutos se hizo en dos pasadas con una diferencia de una semana para el cultivar Elegant lady y en una pasada en 'Flordaking'; mientras que las cosechas 2020 y 2021 se hizo de una sola vez para ambos cultivares.

Las variables analizadas en la experimentación fueron, incidencia de la podredumbre morena a 3 y 7 días en poscosecha y variables de calidad como: color de superficie, peso medio de frutos, diámetro medio de frutos, SST (°Brix) y firmeza de pulpa (kg/cm²). Además, en el año 2021 se evaluó rendimiento en 'Elegant Lady'.

5.2.3. Determinaciones analíticas

Las evaluaciones de calidad poscosecha se hicieron sobre 20 frutos por parcela según la siguiente metodología.

Medición de color de piel (epicarpio).

Se utilizó un espectrofotómetro Minolta CM-508d (iluminante D65, 10°), midiendo los valores CIE $L^*a^*b^*$ y calculando también los parámetros ángulo de tono ($H = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) y croma o saturación ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$). Las medidas se tomaron en dos zonas de la epidermis de cada fruto (cara interna y cara externa) y se promediaron. La luminosidad (L^*) puede variar entre 0 (negro) y 100 (blanco). El ángulo de tono puede tomar valores entre 0° para el rojo, 90° para el amarillo y 180° para el verde. En cuanto al croma, mayor valor significa mayor vivacidad o intensidad del tono (Ortiz de Zárate *et al.*, 2007).

Calibre

Se midió el diámetro de cada fruto en la zona ecuatorial, transversal a la zona del fruto, utilizando un calibre manual. Además, se les determinó el peso fresco con balanza digital.

Firmeza

Se utilizó un penetrómetro Effegi GY-3 provisto con una punta de 7,9 mm de diámetro. Dicha determinación se realizó en cada fruto tanto en la cara interna como externa previa remoción de la piel, presentándose el promedio de ambas medidas y expresándose en kg/cm². El equipo mide la fuerza máxima necesaria para penetrar la pulpa hasta una profundidad de 8 mm.

Sólidos solubles totales

La determinación de los sólidos solubles de la pulpa de cada fruto se realizó con un refractómetro portátil con rango de 0 a 32° Brix.

5.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones por cultivar. A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de la varianza para variable normal en las variables de calidad, habiéndose testado previamente esa distribución en todos los casos (Test Shapiro-Wiks modificado), se utilizó el *test* de LSD con una significancia del 5% para la separación de medias, con el programa SAS. Las variables incidencia y severidad fueron analizadas con modelo lineal generalizado mixto, distribución Beta y función de ligazón *logit*.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Efecto de tratamientos precosecha sobre el desarrollo de podredumbre morena en poscosecha

5.3.1.1. Cultivar Flordaking

Se evaluó el efecto de tratamientos con fosfitos solos y en combinación con fungicidas de síntesis química, sobre el desarrollo de la enfermedad y parámetros de calidad poscosecha durante dos años consecutivos (2019- 2020) en un lote comercial en la zona de Álvarez, prov. Santa Fe.

Los tratamientos con fosfitos solos o en combinación con fungicidas de síntesis química aplicados en precosecha, no manifestaron diferencias estadísticas con respecto al testigo para el desarrollo de la enfermedad en poscosecha en ninguno de los dos años. Como se observa en la Figura 43, la incidencia de la enfermedad fue baja, con valores de 1,5 a 10% alcanzados a 7 días de cosecha para los años 2019 y 2020 respectivamente, los tratamientos no manifestaron diferencias respecto al testigo. Aun así, se evidencia un mejor comportamiento de FFK en combinación con el fungicida.

La baja incidencia de la enfermedad podría deberse a que el experimento se hizo sobre un lote comercial, donde todos los años realizan las pulverizaciones adecuadas según el calendario sanitario estipulado, manteniendo bajo el nivel de inóculo de *M. fructicola*.

También se evaluó severidad de podredumbre morena a 3 y 7 días para ambos años, y no se observaron diferencias significativas de los tratamientos respecto al testigo (Tabla 29). De igual modo, en el año 2020 se observó la misma tendencia de un mejor comportamiento de fosfitos + fungicidas para la severidad (Figura 44).

	INCIDENCIA			
AÑO EXPERIMENTACIÓN	2019		2020	
Días de cosecha (DC)	3 Días	7 Días	3 Días	7 Días
Efecto	F	F	F	F
Repetición (Rep)	0,94	0,64	0	0,67
Tratamiento (Tr)	0,46	0,25	0,21	0,81

Tabla 28. Análisis de variancia para la incidencia (%) de podredumbre morena a 3 y 7 días de cosecha en el cultivar Flordaking durante dos años consecutivos, ante la aplicación de tratamientos precosecha con fosfitos.

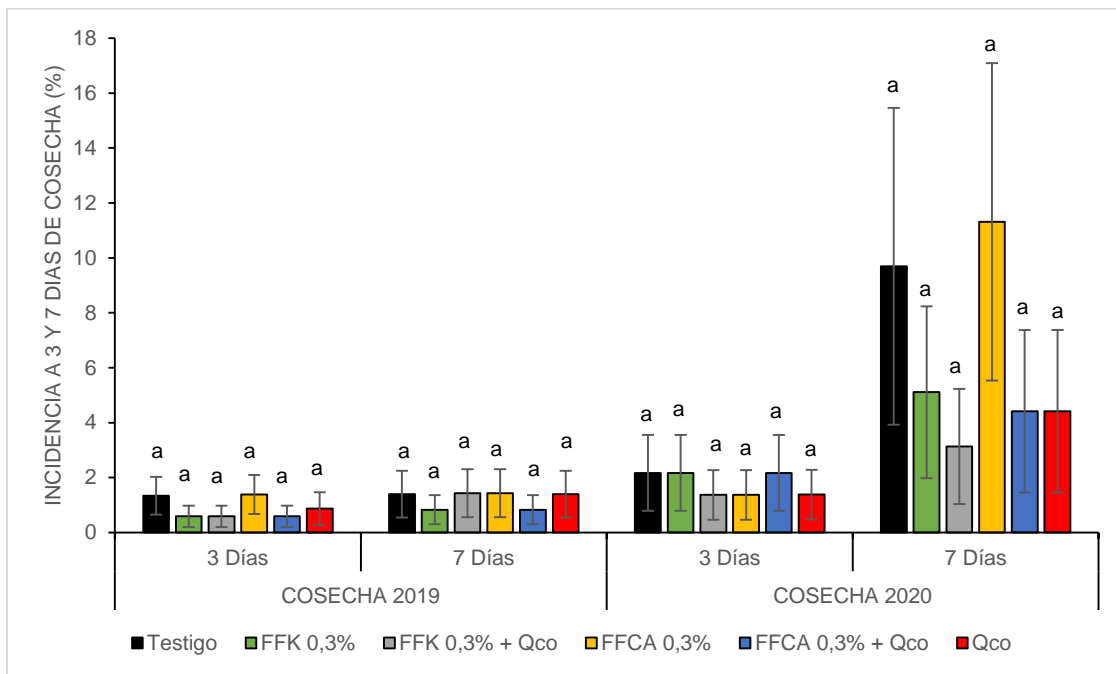


Figura 43. Incidencia (%) de *M. fructicola* a 3 y 7 días de cosecha en frutos cultivar Flordaking. Efecto de tratamientos precosecha con fosfitos de potasio y calcio, solos o en combinación con fungicidas de síntesis química. Campañas 2019 y 2020. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

	SEVERIDAD			
AÑO EXPERIMENTACIÓN	2019		2020	
Días de cosecha (DC)	3 Días	7 Días	3 Días	7 Días
Efecto	F	F	F	F
Repetición (Rep)	0,75	0,56	0,02	0,3
Tratamiento (Tr)	0,37	0,23	0,2	0,41

Tabla 29. Análisis de variancia para la severidad (%) de podredumbre morena a 3 y 7 días de cosecha en el cultivar Flordaking durante dos años consecutivos, ante aplicación de tratamientos precosecha con fosfitos.

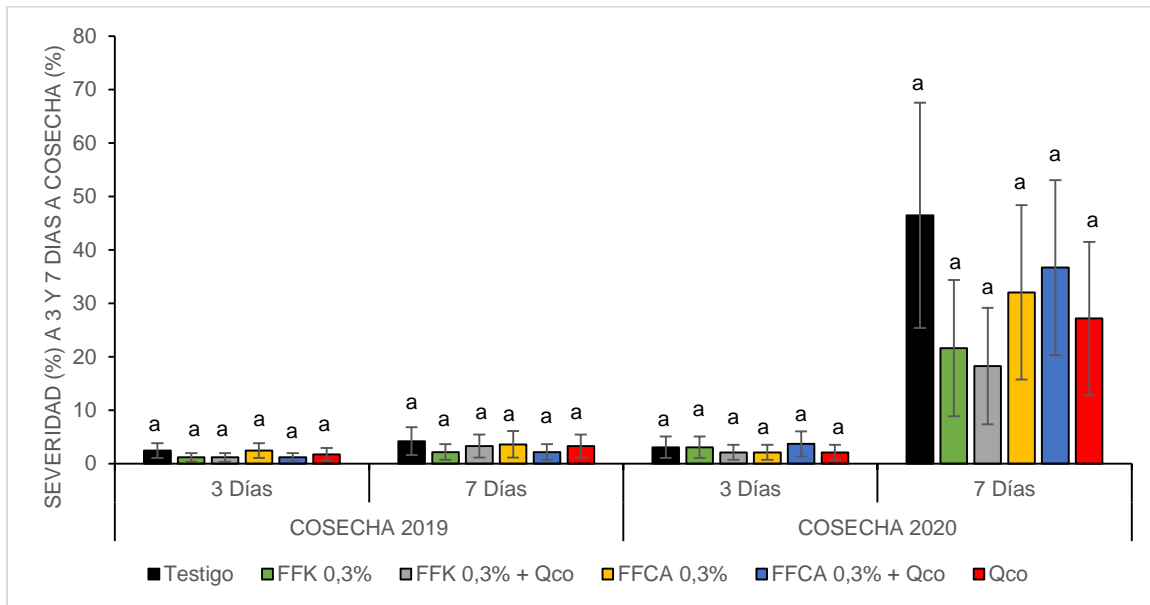


Figura 44. Severidad (%) de *M. fructicola* a 3 y 7 días de cosecha en frutos cultivar Flordaking tratados en precosecha con fosfitos de potasio y calcio, solos o en combinación con fungicidas de síntesis química. Campañas 2019 y 2020. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

5.3.1.2. Cultivar Elegant Lady

Se evaluó el efecto de tratamientos con fosfitos solos y en combinación con fungicidas de síntesis química, sobre el desarrollo de la enfermedad y parámetros de calidad poscosecha durante tres años consecutivos (2019- 2020 y 2021) en un lote comercial en la zona de Piñero, provincia de Santa Fe.

Durante el primer año de experimentación (2019) la cosecha se realizó en dos veces de acuerdo iban madurando los frutos, con siete días de diferencia entre ambas pasadas. La recolección de frutos a evaluar en los dos años siguientes se hizo en una sola pasada.

En general no se evidenció diferencias entre tratamientos precosecha sobre la incidencia en poscosecha (Tabla 30), salvo en la primera pasada de cosecha del 2019 (Figura 45–A), donde se manifestó mejor comportamiento del tratamiento con FFK + fungicidas a 3 y 7 días y fungicida sólo a 3 días de cosecha. En la segunda pasada no se observó dicho comportamiento, habiendo pasado más de diez días de la última aplicación de los tratamientos. Si bien en los años restantes de experimentación no se evidenció diferencias estadísticas entre tratamientos, se volvió a observar una tendencia a incidencias más bajas en el tratamiento FFK + fungicidas a 7 de cosecha en el año 2020 (Figura 45-B).

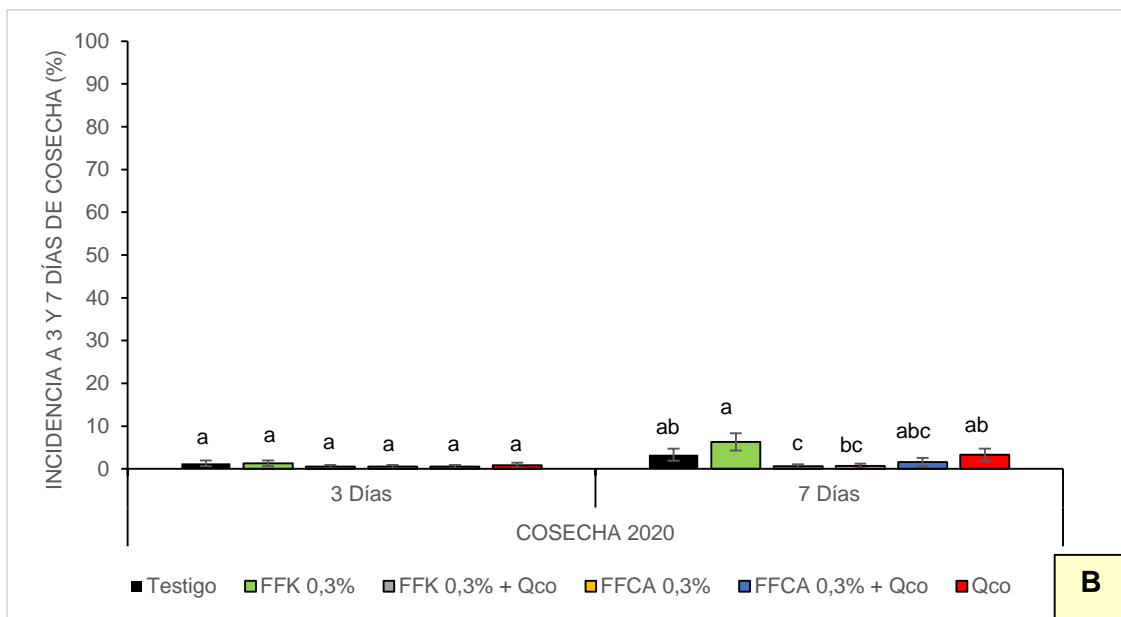
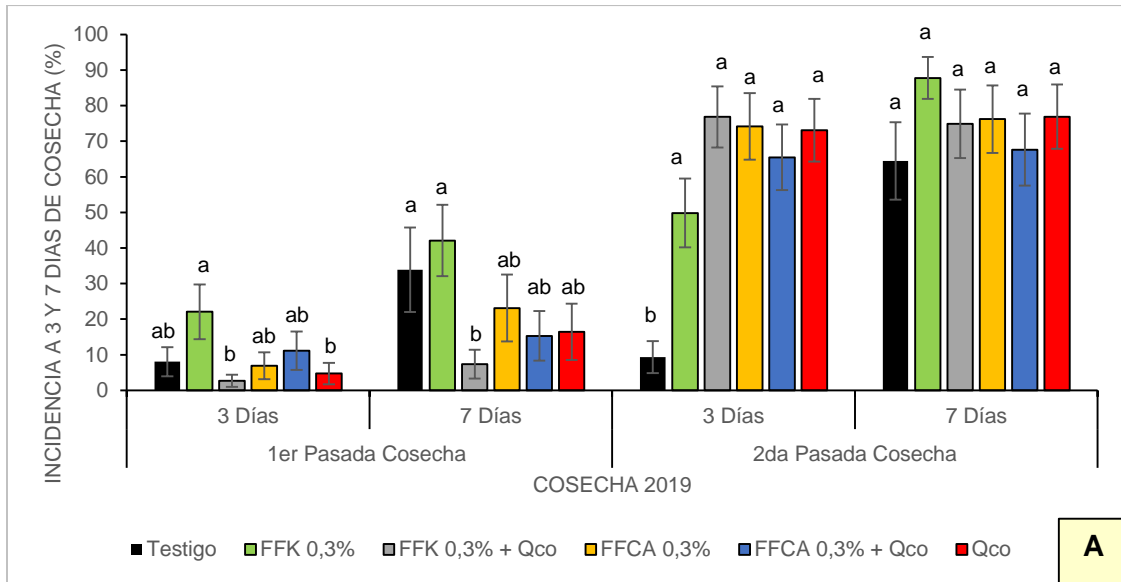
AÑO EXPERIMENTACIÓN	INCIDENCIA					
	2019		2020		2021	
	3 Dias	7 Dias	3 Dias	7 Dias	3 Dias	7 Dias
Dias de cosecha (DC)						
Efecto	F	F	F	F	F	F
Repetición (Rep)	4,71*	2,88	0,92	5,40*	6,11*	4,18*
Tratamiento (Tr)	3,09*	2,21	0,45	2,73	2,14	0,92
Pasada de cosecha (PC)	58,64**	56,24**	-	-	-	-
Tr x PC	4,94**	1,05	-	-	-	-

Tabla 30. Análisis de variancia para la incidencia (%) de podredumbre morena a 3 y 7 días de cosecha en el cultivar Elegant lady durante tres años consecutivos, previa aplicación de tratamientos precosecha. **DC=** Días de cosecha; **Rep=** Repetición; **T=** Tratamiento; **PC=** Pasada de cosecha. Los * indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,5$); los ** indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,1$).

INCIDENCIA (%)	3 días	7 días
1er Pasada Cosecha 2019	8,04 ± 4,10	33,90 ± 11,86
2da Pasada Cosecha 2019	9,32 ± 4,51	64,45 ± 10,90
2020	1,31 ± 0,67	3,35 ± 1,42
2021	7,84 ± 3,24	22,00 ± 8,13

Tabla 31. Incidencia de podredumbre morena a 3 y 7 días de cosecha, frutos cultivar Elegant

Lady, en ausencia de tratamientos (testigo). Se muestran las medias y desvíos estándar para las mediciones.



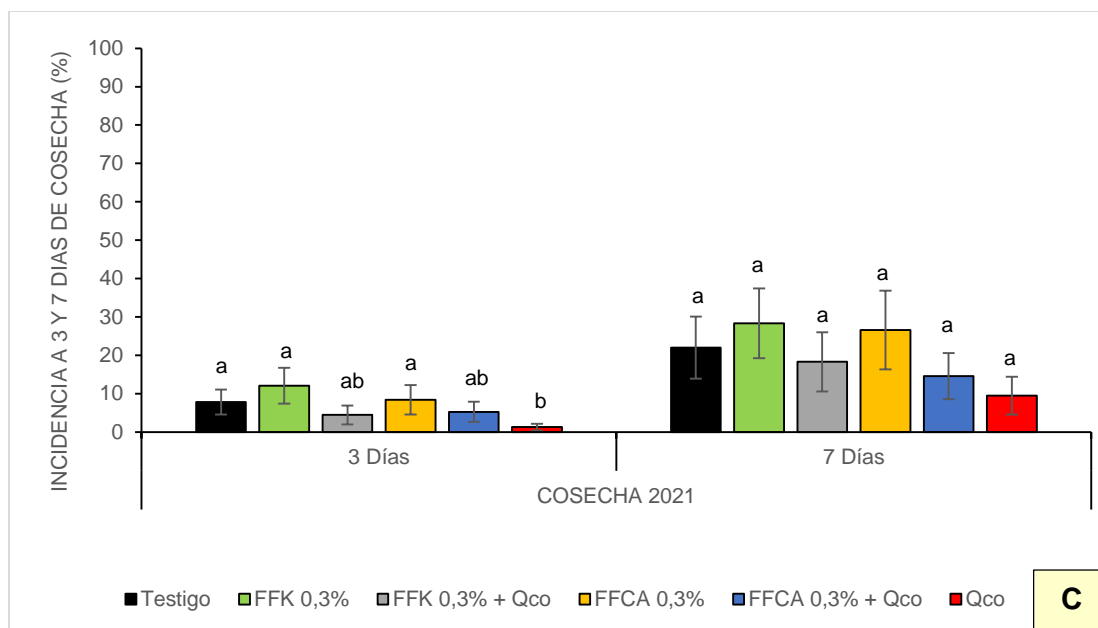


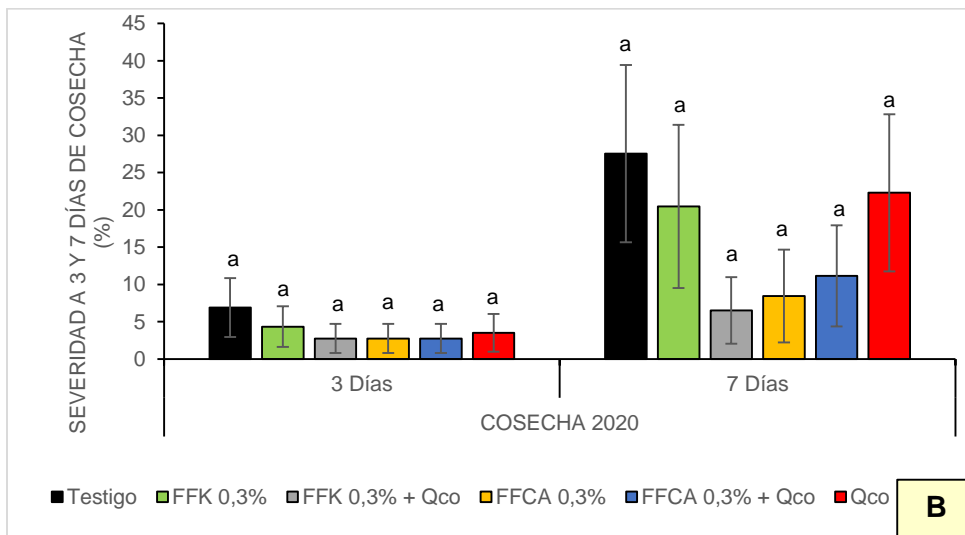
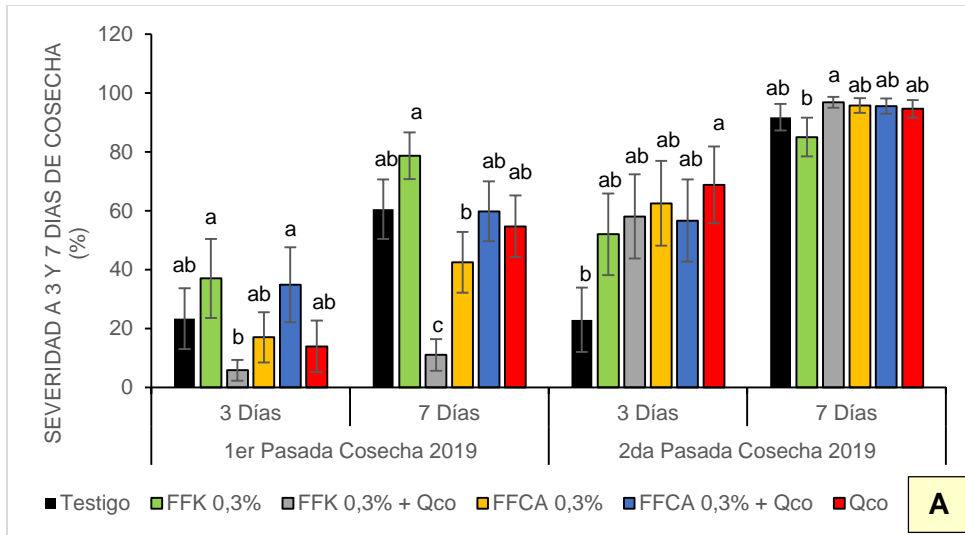
Figura 45. Incidencia (%) de *M. fructicola* a 3 y 7 días de cosecha en frutos cultivar Elegant lady, tratados en precosecha con fosfitos de potasio y calcio, solos o en combinación con fungicidas de síntesis química. Campañas **A-** 2019, **B-** 2020 y **C-** 2021. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Para la variable severidad tampoco se observó diferencias entre tratamientos (Tabla 32) en los diferentes años, aunque en el año 2019 los tratamientos tuvieron diferente comportamiento en ambas pasadas de cosecha y a 7 días el tratamiento FFK + fungicidas presentó menor severidad en frutos (Figura 46-A). La misma tendencia de dicho tratamiento ante la severidad se mantuvo el año 2020 (Figura 46-B), aunque en el 2021 el tratamiento que manifestó mejor comportamiento fue el que incluyó fungicidas (Figura 46-C).

AÑO EXPERIMENTACIÓN	SEVERIDAD					
	2019		2020		2021	
	3 Días	7 Días	3 Días	7 Días	3 Días	7 Días
Días de cosecha (DsC)						
Efecto	F	F	F	F	F	F
Repetición (Rep)	1,59	0,21	0,69	1,18	4,18*	5,16*
Tratamiento (Tr)	1,24	0,89	0,34	0,94	1,68	1,39
Pasada de cosecha (PC)	17,27**	65,89**	-	-	-	-
Tr x PC	1,87	4,63**	-	-	-	-

Tabla 32. Análisis de variancia de la severidad (%) de podredumbre morena a tres y siete días de cosecha en el cultivar Elegán lady durante tres años consecutivos, previa aplicación de

tratamientos precosecha. **DC=** Días de cosecha; **Rep=** Repetición; **Tr=** Tratamiento; **PC=** Pasada de cosecha. Los * indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,5$); los ** indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,1$).



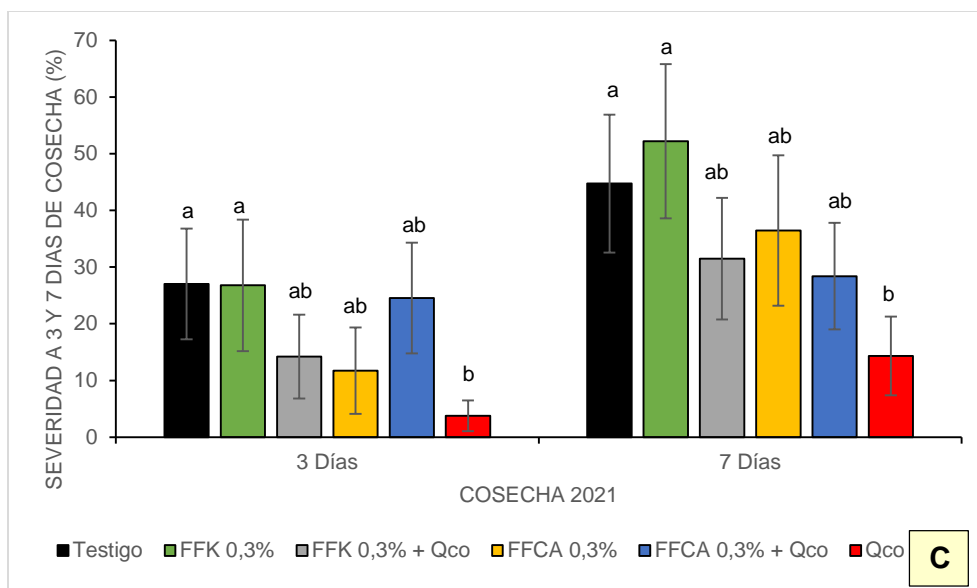


Figura 46. Severidad (%) de *M. fructicola* a 3 y 7 días de cosecha en frutos cultivar Elegant lady, tratados en precosecha con fosfitos de potasio (FFK) y calcio (FFCa), solos o en combinación con un fungicida de síntesis química. Campañas **A-** 2019, **B-** 2020 y **C-** 2021. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher, $p \leq 0,05$). Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

5.3.2. Efecto de tratamientos precosecha sobre parámetros calidad poscosecha

5.3.2.1. Cultivar Flordaking

Color

En ambos años el parámetro H mostró diferencias significativas ante la aplicación de tratamientos, mientras que el parámetro C sólo en el año 2019 (Tabla 33). Los tratamientos fungicida y FFCa + fungicida presentaron ángulo de tono (H) más bajos respecto a los otros tratamientos, con valores entre 79 y 81 manifestando color de piel amarillo en ambos años de experimentación, respecto a los demás tratamientos que presentaron menos color. El croma o vivacidad de color (C) manifestó valores más altos ante los tratamientos FFK 0,3%, FFK + fungicida, aunque sin diferenciarse del tratamiento testigo (Tabla 35).

‘Flordaking’ - Parámetro de calidad: COLOR						
	2019			2020		
FV	L	H	C	L	H	C
Tratamiento	0,68	2,52 *	3,39 **	1,87	3,28 **	1,02
Repetición	2,59	2,21	0,70	7,78 **	1,06	6,57 **

Tabla 33 Análisis de la variancia de diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre el color de frutos ‘Flordaking’ durante los años 2019 y 2020. **L:** Luminosidad; **H:** Hue o ángulo de tono; **C:** croma o vivacidad. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

Peso y calibre

Las variables de calidad peso y calibre manifestaron diferencias ante los tratamientos en el año 2019 (Tabla 34).

Los tratamientos de FFK + fungicida, FFCa + fungicida y fungicida solo, manifestaron los valores más altos para el variable peso respecto al testigo. Para el año 2020 no se obtuvieron los datos de esta variable (Tabla 36).

En cuanto al calibre, en la tabla 36 se puede observar que el tratamiento con fungicida manifestó valores más altos respecto al testigo en los dos años de experimentación, y el FFK + fungicida en el año 2019.

‘Flordaking’							
	2019				2020		
FV	PESO	CALIBRE	FIRMEZA	SST	CALIBRE	FIRMEZA	SST
Tratamiento	2,77 **	2,72 *	4,85 **	2,37 *	2,10	2,58 *	1,26
Repetición	1,84	1,10	24,01 **	6,21 **	6,36 **	6,82 **	4,38 *

Tabla 34. Análisis de la variancia de diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre

el peso, calibre firmeza y sólidos solubles totales (SST) de frutos 'Flordaking' durante los años 2019 y 2020. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los **indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

Firmeza y sólidos solubles totales (SST)

La variable firmeza manifestó diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambos años de experimentación ante diferentes tratamientos; mientras que la variable SST sólo manifestó diferencias el año 2019 (Tabla 34).

La firmeza presentó valores más altos con FFCa 0,3%, aunque sin diferencias respecto al testigo en el año 2019, mientras que en el año 2020 la mayor firmeza la presentó el tratamiento con FK 0,3% con diferencias respecto al testigo (Tabla 37).

Durante ambas campañas los SST fueron mayores ($p < 0,05$) en el tratamiento con fungicidas, sin diferencias con el tratamiento testigo en el año 2019 y con diferencias en el año 2020 (Tabla 37).

AÑO DE COSECHA	COSECHA 2019			COSECHA 2020		
TRATAMIENTOS	L	H	C	L	H	C
TESTIGO	67,27 ± 0,59 a	87,19 ± 1,24 a	40,50 ± 0,38 ab	67,52 ± 0,69 a	86,43 ± 1,59 ab	39,82 ± 0,48 a
FFK 0,3%	67,90 ± 0,59 a	87,21 ± 1,24 a	40,73 ± 0,38 a	66,83 ± 0,69 ab	86,63 ± 1,58 a	39,06 ± 0,47 ab
FFK 0,3% + QCO	66,64 ± 0,59 a	85,61 ± 1,24 a	40,49 ± 0,38 ab	66,58 ± 0,69 ab	85,57 ± 1,58 ab	38,98 ± 0,47 ab
FFCA 0,3%	67,19 ± 0,60 a	86,14 ± 1,26 a	39,23 ± 0,38 c	67,51 ± 0,69 a	85,36 ± 1,58 ab	39,44 ± 0,47 ab
FFCA 0,3% + QCO	66,97 ± 0,69 a	86,18 ± 1,94 ab	39,13 ± 0,44 c	65,17 ± 0,69 b	79,69 ± 1,58 c	39,21 ± 0,48 ab
QUIMICO	66,53 ± 0,63 a	81,75 ± 1,31 b	39,44 ± 0,40 bc	65,80 ± 0,69 ab	82,23 ± 1,58 bc	38,40 ± 0,47 b

Tabla 35. Estudio del color evaluado en tres parámetros: L=luminosidad o claridad de la epidermis; H= ángulo de tono y C= croma (vivacidad e intensidad del color), en frutos cultivar Flordaking ante tratamientos precosecha, durante dos años consecutivos. Se muestran las medias y los desvíos estándar. Los * indican diferencias estadísticas significativas (p<0,5); los ** indican diferencias estadísticas significativas (p<0,1).

AÑO	COSECHA 2019		COSECHA 2020	
	TRATAMIENTO (T)	PESO	CALIBRE	PESO
TESTIGO	86,34 ± 3,91 c	53,81 ± 0,89 b	-	6,57 ± 0,07 ab
FFK 0,3%	93,84 ± 3,91 abc	55,24 ± 0,89 b	-	6,45 ± 0,07 b
FFK 0,3% + QCO	102,23 ± 3,91 a	56,88 ± 0,89 a	-	6,47 ± 0,07 b
FFCA 0,3%	89,77 ± 3,94 bc	53,22 ± 0,91 b	-	6,49 ± 0,07 ab
FFCA 0,3% + QCO	101,11 ± 4,52 ab	55,83 ± 1,04 ab	-	6,37 ± 0,07 b
QUIMICO	100,71 ± 4,13 ab	56,68 ± 0,95 a	-	6,67 ± 0,07 a

Tabla 36. Estudio de las variables peso (g) y calibre (mm) en frutos cultivar Flordaking ante diferentes tratamientos precosecha, durante dos años consecutivos (2019 y 2020). Los tratamientos son: **Testigo**= agua; **FFK 0,3%**= fosfito de potasio; **FFK 0,3%+ Qco**= fosfito de potasio en combinación con fungicidas; **FFCA**= fosfito de calcio; **FFCA+ Qco**= fosfito de calcio en combinación con fungicidas y **Químico**= fungicida sintético utilizado por el productor. Se muestran las medias y desvíos estándar de las variables. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas, $p < 0,5$.

AÑO	COSECHA 2019		COSECHA 2020	
	FIRMEZA	SST	FIRMEZA	SST
TESTIGO	4,10 ± 0,23 ab	9,09 ± 0,21 ab	3,77 ± 0,17 b	10,13 ± 0,18 b
FFK 0,3%	3,87 ± 0,23 bc	9,25 ± 0,21 ab	4,31 ± 0,17 a	10,14 ± 0,18 b
FFK 0,3% + QCO	3,3 ± 0,23 c	9,2 ± 0,21 ab	3,66 ± 0,17 b	10,25 ± 0,18 ab
FFCA 0,3%	4,66 ± 0,24 a	8,71 ± 0,21 bc	3,96 ± 0,17 ab	10,25 ± 0,18 ab
FFCA 0,3% + QCO	3,18 ± 0,27 c	8,44 ± 0,25 c	3,49 ± 0,17 b	10,36 ± 0,18 ab
QUIMICO	3,72 ± 0,25 bc	9,38 ± 0,23 a	3,96 ± 0,17 ab	10,70 ± 0,18 a

Tabla 37. Estudio de las variables firmeza (kg/cm²) y SST (°Brix) en frutos cultivar Flordaking ante diferentes tratamientos precosecha durante dos años consecutivos (2019 y 2020). **SST**= sólidos solubles totales. Los tratamientos son: **Testigo**= agua; **FFK 0,3%**= fosfito de potasio; **FFK 0,3% + Qco**= fosfito de potasio en combinación con fungicidas; **FFCA**= fosfito de calcio; **FFCA + Qco**= fosfito de calcio en combinación con fungicidas y **Químico**= fungicida sintético utilizado por el productor. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05). Se muestran las medias y desvíos estándar de las variables.

5.3.2.2. Cultivar Elegant Lady

Color

Los parámetros L y H presentan diferencias significativas ante los tratamientos en el año 2019 y 2020, mientras que el croma solo manifiesta diferencias en los años 2020 y 2021 (Tabla 38). Como se observa en la Tabla 39, en el año 2019 el ángulo de tono (H) disminuyó entre la primera y segunda pasada de cosecha, al avanzar el estado de madurez de los frutos. En la primera pasada 2019 el tratamiento testigo manifestó los valores más bajos de L y H, lo que nos dice que presentó colores más oscuros; mientras que los valores más altos de ambos parámetros los presentó el tratamiento con fungicida. En la segunda pasada de cosecha del 2019, los valores más bajos de H, con colores más rojizos los presentaron los tratamientos testigo, FFCa y fungicida solo. En el año 2020 los valores más oscuros y rojizos, (parámetros L y H), los manifestó el tratamiento FFCa; en cuanto al parámetro L los tratamientos FFCa y FFCa+ fungicida también manifestaron valores bajos de L con tonos más oscuros.

El croma (C), durante el primer año de experimentación, tendió a aumentar de una pasada a otra de cosecha al avanzar el estado de madurez. Esto indica que los frutos en un estado de madurez más avanzado presentaron mayor saturación del color. Según los resultados encontrados, el croma presentó valores más altos en el año 2020 ante tratamientos con fungicida, en el año 2021 el tratamiento que presentó croma más elevado fue el FFK, aunque sin diferencias con el testigo (Tabla 39)

‘Elegant Lady’ - Parámetro de calidad: COLOR

	1 ^{er} pasada 2019			2 ^{da} pasada 2019			2020			2021		
FV	L	H	C	L	H	C	L	H	C	L	H	C
Tratamiento	3,34 **	5,38 **	0,66	3,98 **	6,23 **	1,29	2,95 *	4,52 **	3,56 **	0,35	0,80	3,98 **
Repetición	4,47 *	6,52 **	1,51	4,35 *	5,12 **	0,46	18,83 **	35,47 **	6,16 **	1,68	2,22	0,97

Tabla 38. Análisis de la variancia de diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre el color de frutos ‘Elegant Lady’ durante los años 2019 (dos pasadas de cosecha), 2020 y 2021. **L:** Luminosidad; **H:** Hue o ángulo de tono; **C:** croma o vivacidad. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

AÑO DE COSECHA	1er PASADA - COSECHA 2019			2 da PASADA - COSECHA 2019			COSECHA 2020			COSECHA 2021		
	L	H	C	L	H	C	L	H	C	L	H	C
TESTIGO	52,93 ± 0,93 c	64,21 ± 2,03 c	40,13 ± 0,67 a	54,71 ± 0,89 b	62,42 ± 1,90 b	41,90 ± 2,41 b	55,24 ± 0,91 a	66,57 ± 2,18 abc	39,36 ± 0,59 bc	45,87 ± 0,89 a	50,77 ± 2,4 b	26,67 ± 0,34 ab
FFK 0,3%	54,89 ± 0,93 bc	69,55 ± 2,04 bc	41,57 ± 0,68 a	59,29 ± 0,89 a	76,77 ± 1,90 a	44,91 ± 2,41 ab	55,74 ± 0,91 a	67,76 ± 2,18 ab	40,79 ± 0,59 ab	46,92 ± 0,89 a	54,91 ± 2,4 ab	27,49 ± 0,34 a
FFK 0,3% + QCO	55,83 ± 0,93 ab	76,1 ± 2,03 a	41,25 ± 0,67 a	59,43 ± 0,89 a	72,56 ± 1,90 ab	44,69 ± 2,41 ab	53,41 ± 0,91 ab	64,42 ± 2,18 bc	38,30 ± 0,59 c	45,37 ± 0,89 a	54,40 ± 2,4 ab	25,64 ± 0,34 c
FFCA 0,3%	56,48 ± 0,93 ab	73,87 ± 2,03 ab	41,08 ± 0,67 a	57,88 ± 0,89 a	69,43 ± 1,90 b	43,13 ± 2,41 b	52,34 ± 0,91 b	58,34 ± 2,18 d	40,38 ± 0,59 ab	45,91 ± 0,89 a	54,69 ± 2,4 ab	26,49 ± 0,34 bc
FFCA 0,3% + QCO	55,61 ± 0,93 ab	72,56 ± 2,03 ab	40,85 ± 0,67 a	58,37 ± 0,89 a	72,13 ± 1,90 ab	44,80 ± 2,41 ab	52,39 ± 0,91 b	60,69 ± 2,18 cd	40,34 ± 0,59 ab	45,96 ± 0,89 a	54,16 ± 2,4 ab	26,49 ± 0,34 bc
QUIMICO	57,99 ± 0,93 a	76,90 ± 2,03 a	41,55 ± 0,67 a	59,16 ± 0,89 a	70,25 ± 1,90 b	49,93 ± 2,41 a	55,42 ± 0,91 a	71,01 ± 2,18 a	41,32 ± 0,59 a	46,38 ± 0,89 a	50,77 ± 2,4 a	25,68 ± 0,34 c

Tabla 39. Estudio de la variable color evaluada en tres parámetros: **L**= luminosidad o claridad de la epidermis; **H**= ángulo de tono y **C**= croma (vivacidad e intensidad del color), en frutos cultivar Elegant lady ante tratamientos precosecha durante tres años consecutivos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Se muestran las medias y desvíos estándar de las variables.

Peso y Calibre.

El peso se evaluó en los años 2019 y 2021, mientras que el calibre en los años 2019 y 2020. En ambos años, tanto el peso como el calibre manifestaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 40 y 41). Para las variables peso y calibre, se observó un aumento de las mismas en el año 2019 entre ambas pasadas de cosecha (Tabla 42).

No hay una respuesta clara del calibre ante los tratamientos con fosfitos, ya que en el año 2020 los mayores calibres lo manifestaron los frutos tratados con fosfitos, mientras que el año 2021 lo manifestaron los frutos tratados con fosfitos + fungicidas. En cuanto al peso tampoco se evidenció una respuesta clara por parte de los tratamientos en los diferentes años de experimentos.

Firmeza y SST

Las variables de calidad firmeza y SST se midieron los tres años de experimentación. En caso de la firmeza manifestó diferencias entre tratamientos en la primera pasada del año 2019, en el 2020 y 2021; en el caso de los SST manifestó diferencias entre tratamientos todos los años de experimentación (Tabla 40 y 41).

La firmeza manifestó una caída entre ambas pasadas de cosecha en el primer año de experimentación, relacionada a un ablandamiento según avanza el estado de madurez del fruto (Tabla 43). No se observó una respuesta clara respecto a algún tratamiento sobre un aumento de firmeza.

En cuanto al contenido de SST, el FFCa 0,3% + fungicidas se destacó entre los tratamientos en los diferentes años de experimentación, con mayor contenido respecto al testigo (Figura 43). Además, se observó una tendencia a que los tratamientos con fosfitos solos retrasen la acumulación de SST respecto al testigo, con diferencias estadísticamente significativas en el FFCa.

‘Elegant Lady’								
	1 ^{er} pasada 2019				2 ^{da} pasada 2019			
FV	PESO	CALIBRE	FIRMEZA	SST	PESO	CALIBRE	FIRMEZA	SST
Tratamiento	4,28 **	4,56 **	11,17 **	4,10 **	1,16	1,93	1,35	10,84 **
Repetición	4,77 *	2,02	3,05 *	9,50 **	0,46	1,71	31,22 **	7,17 **

Tabla 40. Análisis de la variancia de diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre el peso, calibre firmeza y sólidos solubles totales (SST) de frutos ‘Elegant Lady’ durante el 2019 en dos pasadas de cosecha. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

‘Elegant Lady’						
	2020			2021		
FV	CALIBRE	FIRMEZA	SST	PESO	FIRMEZA	SST
Tratamiento	13,95 **	5,02 **	10,59 **	8,60 **	9,27 **	9,38 **
Repetición	27,90 **	31,44 **	8,26 **	1,90	4,06 *	1,35

Tabla 41. Análisis de la variancia de diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre el peso, calibre firmeza y sólidos solubles totales (SST) de frutos ‘Elegant Lady’ durante los años 2020 y 2021. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los ** indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

AÑO	PRIMERA PASADA COSECHA 2019		SEGUNDA PASADA COSECHA 2019		COSECHA 2020		COSECHA 2021	
TRATAMIENTOS	PESO	CALIBRE	PESO	CALIBRE	PESO	CALIBRE	PESO	CALIBRE
TESTIGO	118,83 ± 3,42 a	6,04 ± 0,063 a	122,08 ± 3,22 ab	6,08 ± 0,056 a	-	6,72 ± 0,06 b	151,41 ± 4,32 b	6,54 ± 0,06 b
FFK 0,3%	99,47 ± 3,45 c	5,66 ± 0,063 c	119,42 ± 3,22 ab	6,02 ± 0,056 ab	-	6,93 ± 0,06 a	151,69 ± 4,32 b	6,65 ± 0,06 b
FFK 0,3% + QCO	101,31 ± 3,42 bc	5,72 ± 0,063 bc	122 ± 3,22 ab	6,02 ± 0,056 ab	-	6,37 ± 0,06 c	174,54 ± 4,32 a	6,94 ± 0,06 a
FFCa 0,3%	103,58 ± 3,42 bc	5,74 ± 0,063 bc	120,25 ± 3,22 ab	6,12 ± 0,056 a	-	6,97 ± 0,06 a	154,67 ± 4,32 b	6,65 ± 0,06 b
FFCa 0,3% + QCO	105,42 ± 3,42 bc	5,78 ± 0,063 bc	114,33 ± 3,22 b	5,89 ± 0,056 b	-	6,61 ± 0,06 b	180,01 ± 4,32 a	6,98 ± 0,06 a
QUIMICO	110,15 ± 3,42 ab	5,84 ± 0,063 b	124,33 ± 3,22 a	6,07 ± 0,056 a	-	6,55 ± 0,06 b	154,78 ± 4,32 b	6,59 ± 0,06 b

Tabla 42. Estudio de las variables peso (g) y calibre para frutos cultivar Elegant lady ante diferentes tratamientos precosecha, durante tres años consecutivos. Los tratamientos son: **Testigo**= con agua; **FFK 0,3%**= Fosfito de potasio; **FFK 0,3%+ Qco** = Fosfito de potasio + fungicidas de síntesis química (fungicida); **FFCa 0,3%**= Fosfito de calcio; **FFCa 0,3%+ Qco**= Fosfito de calcio + fungicidas de síntesis química (fungicida); **Químico**= fungicida o producto de síntesis química utilizado por el productor. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Se muestran las medias y desvíos estándar de las variables.

AÑO	PRIMERA PASADA COSECHA		SEGUNDA PASADA - COSECHA		COSECHA 2020		COSECHA 2021	
	2019		2019					
TRATAMIENTOS	FIRMEZA	SST	FIRMEZA	SST	FIRMEZA	SST	FIRMEZA	SST
TESTIGO	6,91 ± 0,22 c	12,16 ± 0,16 c	5,99 ± 0,21 b	11,54 ± 0,12 b	6,87 ± 0,22 ab	12,97 ± 0,16 b	-	12,77 ± 0,16 ab
FFK 0,3%	7,12 ± 0,23 c	12,34 ± 0,16 bc	6,63 ± 0,21 a	11,49 ± 0,12 b	6,8 ± 0,21 ab	13,01 ± 0,16 b	-	12,33 ± 0,16 cd
FFK 0,3% + QCO	7,90 ± 0,23 b	13,11 ± 0,16 a	6,47 ± 0,21 ab	11,95 ± 0,12 a	7,24 ± 0,22 a	13,01 ± 0,16 b	-	12,47 ± 0,16 bc
FFCa 0,3%	8,47 ± 0,23 ab	12,44 ± 0,16 bc	6,18 ± 0,21 ab	11 ± 0,12 c	6,04 ± 0,21 c	12,04 ± 0,16 c	-	11,80 ± 0,16 e
FFCa 0,3% + QCO	8,43 ± 0,23 ab	12,66 ± 0,16 ab	6,08 ± 0,21 ab	11,89 ± 0,12 a	6,36 ± 0,22 bc	13,65 ± 0,16 a	-	13,09 ± 0,16 a
QUIMICO	8,76 ± 0,23 a	12,61 ± 0,16 b	6,41 ± 0,21 ab	12,10 ± 0,12 a	7,25 ± 0,21 a	13,27 ± 0,16 ab	-	12 ± 0,16 de

Tabla 43. Estudio de las variables firmeza (kg/cm^2) y SST ($^{\circ}\text{Brix}$) para frutos cultivar Elegant lady ante diferentes tratamientos precosecha, durante tres años consecutivos. **SST**= sólidos solubles totales. Los tratamientos son: **Testigo**= con agua; **FFK 0,3%**= Fosfito de potasio; **FFK 0,3%+ Qco** = Fosfito de potasio + fungicidas de síntesis química (fungicida); **FFCa 0,3%**= Fosfito de calcio; **FFCa 0,3%+ Qco**= Fosfito de calcio + fungicidas de síntesis química (fungicida); **Químico**= fungicida o producto de síntesis química utilizado por el productor. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Se muestran las medias y desvíos estándar de las variables.

Rendimiento

El rendimiento fue evaluado el último año de experimentación (2021) para el cultivar Elegant lady, debido a que se realizó en un lote comercial de un productor frutícola con la limitante que eso implica. El propósito fue que las plantas evaluadas llevaran tres años consecutivos de aplicaciones con fosfitos.

No se evidenciaron diferencias entre tratamientos (Tabla 44). Sin embargo, todos los tratamientos presentaron mayor carga (kg/planta) respecto al testigo. El tratamiento FFCa 0,3% manifestó mayor rendimiento, le siguieron los tratamientos de fosfitos en combinación con fungicidas (Figura 47).

RENDIMIENTO (Kg)	
EFFECTO	F
TRATAMIENTO	0,58
REPETICION	1,74

Tabla 44. Análisis de la variancia de la variable rendimiento para el cultivar Elegant lady ante diferentes tratamientos precosecha en el año 2021.

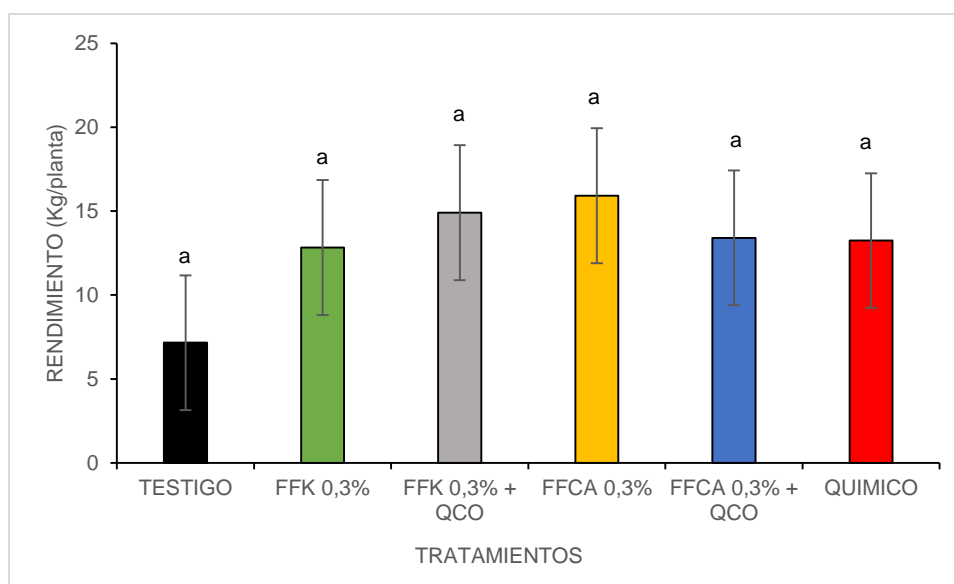


Figura 47. Evaluación del rendimiento (kg/planta) en el cultivar Elegant lady para distintos

tratamientos de precosecha con fosfitos. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

5.4. DISCUSIÓN

La eficacia de los fosfitos en el control de patógenos depende del tiempo de aplicación, el cultivo, la ubicación, la incidencia de la enfermedad (Nativitas-Lima, 2021) y de la formulación (Nativitas-Lima, 2021, Araujo *et al*, 2010).

En Argentina casi no hay experiencias realizadas en el uso precosecha de fosfitos solos y en combinación con fungicidas en el control de podredumbre morena en duraznero, salvo Mitidieri *et al.* (2017) quien no observó efectos de FFK y FFCa solos o en combinación con fungicida en el control de esta patología. En el presente trabajo de tesis, los tratamientos precosecha (asperjado de la planta) con fosfitos solos o en combinación con fungicida no manifestaron diferencias con el testigo en el desarrollo poscosecha de la podredumbre morena (*M. fructicola*) en ninguno de los dos cultivares, en concordancia con lo ya observado en esta tesis en el capítulo II, y de acuerdo con Mitidieri *et al.* (2017). Nativitas –Lima (2021) observó resultados diferentes a los alcanzados en esta tesis al encontrar menor desarrollo de podredumbre morena ante aplicaciones reducidas de fungicidas en combinación con fosfitos de potasio. Si bien no hubo diferencias entre tratamientos, el FFK en combinación con los fungicidas manifestó menor incidencia y severidad de la enfermedad respecto al FFCa. Éste resultado es consistente con los ensayos de laboratorio, en los que se observó un mayor efecto del FFK sobre la inhibición de la germinación de conidios y el crecimiento micelial que el FFCa.

Los resultados reportados en esta tesis podrían haber sido diferentes si se hubiera agregado coadyuvante a la mezcla, a fin de alcanzar una mayor retención del fosfito sobre la piel de la fruta y obtener quizás mejores resultados de los mismos. En este trabajo de tesis se decidió no usar coadyuvante para poner foco en el efecto de los fosfitos, ya que el agregado de coadyuvante (COA Silwet Stik2 0,055%) podría ejercer un efecto sobre el patógeno. Brambilla *et al.* (2022), mostró como el agregado de coadyuvante potenció el efecto del aceite de *Melaleuca alternifolia* sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fructicola* y, además, observaron un efecto de inhibición respecto al testigo por parte del coadyuvante.

Según nuestros resultados, el FFCa manifestó menor efectividad respecto al FFK en el control de *M. fructicola*, al igual que observaron Moreira y May de Mio (2009). Moreira *et al* (2002) también observaron un control significativo del FFK sobre podredumbre morena en durazno aplicado en precosecha, no así para FFCa.

Los fosfitos también pueden desencadenar efectos benéficos actuando como bioestimulantes (Nativitas-Lima, 2021; Yommi, 2021; Gómez–Merino y Trejo-Téllez, 2015). Los casos de aplicación de bioestimulantes reportados en la bibliografía internacional sobre frutales son más escasos respecto a cultivos hortícolas, debido a que los estudios en plantas frutales son más complejos y requieren de mayor cantidad de años de experimentación para sacar conclusiones confiables; además las respuestas pueden variar debido a las reservas de nutrientes almacenados en las raíces y a las condiciones ambientales particulares de cada temporada (Yommi, 2021).

Existe bibliografía donde los fosfitos usados como bioestimulantes mejoran la asimilación de nutrientes y aplicados vía foliar aumentaron el rendimiento y la calidad de varias especies de frutales (Estrada-Ortíz *et al*, 2011); así como incrementaron la intensidad floral, tamaño de frutos y SST (Thao & Yamawaka, 2009).

Para evaluar el efecto de los fosfitos sobre la coloración de la piel de la fruta, se evaluaron los parámetros ángulo de tono (H), luminosidad (L) y croma (C). El H es el mejor indicador de cambios de color durante la maduración de la fruta (Bizjack *et al.*, 2013).

Existen reportes donde el H y la L disminuyeron con el avance de maduración indicando mayor intensidad de colores rojizos (H) y piel más oscura (L) (Rodríguez-Félix *et al.*, 2011; Bizjak *et al.*, 2013); en nuestros experimentos el H tendió a disminuir entre ambas pasadas de cosecha en el año 2019. Por otro lado, el C (saturación de color) aumentó entre ambas pasadas conforme con el avance en la maduración de los frutos. De acuerdo a los resultados de esta tesis los tratamientos con fosfitos no influyeron sobre el color de la piel con respecto al testigo, en coincidencia con Moreira y May de Mio (2009), quienes tampoco encontraron diferencias en relación al testigo para la coloración de frutos de durazneros. Para la variable peso y calibre no se observaron diferencias para 'Elegant lady', cultivar de maduración intermedia, al igual que lo encontrado por Moreira y May de Mio (2009) en

duraznos tardíos. El cultivar Flordaking de maduración temprana, manifestó mayor peso con FFCa + fungicidas respecto al testigo y mayor calibre con el tratamiento con fungicidas. Los SST en el tratamiento con fungicidas para 'Flordaking', y con FFCa + fungicidas para 'Elegant lady' aumentaron. En este último cultivar, además se observó una disminución en los SST en frutos tratados con fosfitos, similar a lo observado por Moreira y May de Mio (2009), quienes reportaron un descenso de SST ante la aplicación de fosfitos en duraznos tardíos. Moor *et al*, (2008), también menciona cambios de sabor ante aplicación de fosfitos con aumento de acidez titulable y caída de azúcares (SST) en frutos de frutillas.

La variable firmeza no manifestó diferencias respecto al tratamiento testigo en coincidencia con los resultados de Moreira y May de Mio (2009) en durazno y, de Yommi (2021) en kiwi, quien tampoco encontró efecto de fosfitos sobre la firmeza como tampoco sobre el contenido de SST en frutos de esta planta.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos respecto al testigo en el rendimiento (kg/planta), debido a la variabilidad entre plantas (característica propia de ensayos realizados en frutales). A partir de esta experiencia no se podrían sacar conclusiones sobre el efecto de los fosfitos para la variable rendimiento ya que se evaluó un solo año y el tratamiento FFCa 0,3% fue subvalorado ante la pérdida de fruta en la parcela. Sin embargo, se observó una clara tendencia de aumento en el rendimiento ante tratamientos de FFCa 0,3% y ambos fosfitos en combinación con fungicidas. Este resultado está de acuerdo con lo que cita la bibliografía sobre mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por parte de los fosfitos, que se traduce en aumentos de rendimientos (Estrada-Ortíz *et al*, 2011). Percival y Noviss (2010) encontraron mayores rendimientos en plantas tratadas con FFK en combinación con myclobutanil en plantas de pera.

5.5. CONCLUSIONES

Los tratamientos con fungicidas solos o en combinación con FFCa aumentaron los SST en frutos de ambos cultivares. Además, la combinación de fosfito de calcio con fungicidas aumentó el peso de frutos cultivar Flordaking. Se podría decir que la combinación de FFCa con fungicidas tuvo mejores resultados como bioestimulante que el FFK, y

manifestó mayor respuesta en el cultivar Flordaking, respecto al cultivar Elegant lady.

Estos resultados validan la importancia de evaluar combinaciones de tratamientos, que en el caso de los fosfitos y fungicidas podrían tener un efecto sinérgico a favor de la sanidad y calidad de los frutos.

Si bien el FFCa combinado con el fungicida mejoró algunas variables de calidad poscosecha no se podrían sacar conclusiones contundentes, debido a la variabilidad de las respuestas.

Las aplicaciones de fosfitos podrían ayudar al control poscosecha de podredumbre morena, aunque sin modificar los parámetros de calidad.



Capítulo V

Evaluación de impacto ambiental de los fosfitos.

CAPITULO V

EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL DE LOS FOSFITOS

6. 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más conflictivos de la producción agrícola está centrado en el uso de agroquímicos, ya que los agricultores necesitan realizar aplicaciones para obtener fruta de calidad y generar recursos económicos. A su vez, los vecinos sienten que están siendo sometidos a un bombardeo químico cuyos resultados generalmente desconocen en profundidad (Barbieri, 2020).

Actualmente existe una creciente preocupación por los problemas de contaminación que se generan en el periurbano productivo, que, además está sujeto a dinámicas territoriales complejas, haciéndose cada vez más difícil para el pequeño productor ser competitivo. Es importante preservar la agricultura periurbana, lo que implica abordar las complejas dinámicas socioeconómicas y ambientales que estructuran los espacios periurbanos, así como considerar la lógica de las redes de actores presentes en el territorio y los ciclos específicos vinculados con sus actividades productivas.

En términos de legislación y reglamentación 21 de las 23 provincias argentinas poseen Leyes de Agroquímicos que en gran medida abordan temas vinculados al uso, aplicación y capacitación. Los objetivos que tienen todas estas legislaciones provinciales son la protección de la salud humana, de los recursos naturales y de la producción agrícola, a través de la correcta y racional utilización de productos fitosanitarios, como así también evitar la contaminación de los alimentos y del medio ambiente, promoviendo su correcto uso mediante la educación e información planificada. Los municipios han redactado diferentes marcos normativos en donde dejan expresado para el caso de la provincia de Santa Fe (Ley -11273), límites de 3000 metros para aplicaciones aéreas y 500 metros para aplicaciones terrestres (Cid, 2013).

Durante varios años, debido a una creciente concientización ambiental, se ha puesto el foco en los programas de Manejo integrado de plagas (MIP) y métodos alternativos al

control de enfermedades, plagas y malezas, con el fin de reducir el uso de pesticidas en los sistemas agropecuarios, resguardar la seguridad alimentaria y, disminuir la contaminación de aguas subterráneas (Kovach *et al.*, 1992).

Los montes frutícolas de la zona de San Pedro (Provincia de Buenos Aires), Soldini, Álvarez, Piñeiro (Provincia de Santa Fe), quedaron inmersos en lo que se denomina periurbano con su problemática asociada. Es por esto que se buscan formas de producción más sustentables para poder seguir produciendo en estos territorios.

Tradicionalmente, la elección de fitosanitarios se realiza en función del precio y su eficacia, pero no se considera el comportamiento que tienen los mismos una vez que penetran al suelo, lo cual determina su destino e impacto en el ambiente (Gaona *et al.*, 2017).

Entre los efectos negativos causados por el mal uso de los fitosanitarios, se mencionan fitotoxicidad, contaminación de agua, suelo, aire y alimentos, muerte de fauna benéfica y daños a la salud, entre otros (Rovai *et al.*, 2022). Predecir el comportamiento de los fitosanitarios liberados en el ambiente es necesario para anticipar, y por ende evitar o minimizar, los posibles efectos adversos sobre el agua subterránea, la salud humana y el ambiente en general (Gaona *et al.*, 2017).

Debido a la falta de información respecto al impacto ambiental producido por los fosfitos y al interrogante que todos nos hacemos ante este punto, se decidió agregar un capítulo de cierre del trabajo dónde se evalúa el impacto de los fosfitos en el sistema productivo de duraznos.

Existen diversos indicadores para predecir el impacto ambiental (IA) de los fitosanitarios., entre ellos el más conocido es el EIQ (Environmental Impact Quotient) o Coeficiente de Impacto Ambiental (Kovach *et al.*, 1992). El EIQ puede ser utilizado en los MIP para comparar diferentes plaguicidas o estrategias de control y seleccionar aquella con menor impacto en el ambiente, como también comparar diferentes sistemas productivos y el uso de fitosanitarios asociados a los mismos (Gaona *et al.*, 2017).

El EIQ es un indicador que considera el riesgo sobre todos los componentes del

ecosistema, incluyendo el trabajador agrícola, el consumidor y un componente ecológico. Este último considera el efecto en peces, aves, abejas, artrópodos benéficos y plantas (Gaona et al., 1017). Constituye una herramienta metodológica sencilla para establecer criterios de sustentabilidad y realizar una mejora continua de los distintos sistemas agrícolas presentes en el territorio (Mansilla Ferro, 2017). Es además un indicador práctico, vital para proveer a técnicos y productores de información sobre el impacto y costos de la incorporación de diferentes paquetes tecnológicos; por éste motivo en el marco de esta tesis, se seleccionó dicho método en la evaluación del impacto ambiental de los fosfitos (Rovai et al., 2022).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el impacto ambiental que podría ocasionar la incorporación de los fosfitos en el manejo de *M. fructicola* en el cultivo de duraznero.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo se diseñaron tres estrategias fitosanitarias para el control de *M. fructicola*. Una estrategia convencional con cuatro aplicaciones de Tebuconazole (SC 43 g/100mL) en dosis de 30 cm³/hL; una estrategia con cuatro aplicaciones de FFK (CS P2O5 7,2%; K 12.9%), a una dosis de 300 cm³/hL; y una estrategia de cuatro aplicaciones de la combinación de FFK + Tebuconazole. Las aplicaciones fueron a los 30, 15, 7 y 1 día antes de cosecha con un volumen de caldo de 500 L ha⁻¹.

Las estrategias evaluadas en este apartado de la tesis, no son las utilizadas por el productor, ya que en general hace una rotación de p.a.; sino que en este capítulo lo que se pretendió es comparar los FFK con un fungicida convencional muy utilizado por el productor frutícola en el control de esta enfermedad.

El procedimiento para el cálculo del EIQ se basa en una ecuación que conjuga los tres componentes principales de los sistemas de producción agrícola: el trabajador, el consumidor y la biota. La ecuación que describe el coeficiente de impacto ambiental se desglosa de la siguiente manera:

$$EIQ = \{C[(DT*5)+(DT*P)] + [(C*((S+P)/2*SY)+(L)] + [(F*R)+(D*((S+P/2*3)+(Z*P*3)+B*P*3)]\} /$$

3

donde **DT**= Toxicidad dérmica, **C**= Toxicidad crónica, **SY**= Sistemicidad, **L**= Lixiviación potencial, **R**= Pérdida superficial potencial, **D**= Toxicidad en aves, **S**=Vida media en el suelo, **Z**= Toxicidad en abejas, **B**= Toxicidad en insectos benéficos y **P**= Vida media en la superficie vegetal.

El riesgo para el trabajador se define como la suma de la exposición del aplicador ($DT*5$) más la exposición del cosechador ($DT*P$) multiplicada por el efecto a largo plazo sobre la salud, denominado toxicidad crónica (C). El componente consumidor se obtiene sumando el potencial de exposición del consumidor ($C*((S+P)/2)*SY$) más el efecto potencial sobre el agua superficial (L). El componente ecológico del modelo se obtiene sumando los efectos de los químicos en los peces ($F*R$), aves ($D*(S+P)/2*3$), abejas ($Z*P*3$), y artrópodos benéficos ($B*P*5$). Algunas variables de la fórmula se ponderan. En el impacto al trabajador agrícola, la toxicidad dermal aguda se pondera por un factor de 5, debido a la mayor probabilidad de exposición del aplicador al producto concentrado. En el componente del consumidor, las variables no se ponderan. Por otro lado, en el componente ecológico, la toxicidad a las aves y abejas se pondera por 3, para asignar mayor probabilidad de exposición de los organismos terrestres con respecto a los acuáticos. Para los artrópodos benéficos se pondera por 5, considerando que pasan más tiempo en el cultivo (Mendoza *et al.*, 2014).

En la fórmula cada componente está formado por variables cuyos datos de entrada han sido transformadas en calificaciones numéricas o categorías de peligro en una escala arbitraria de 1 a 5, según el criterio establecido por Kovach *et al.* (1992), que se describe en la Tabla 45.

Una vez establecidos los coeficientes de IA para cada uno de los plaguicidas, se determina el impacto ambiental a campo (EIQc), que nos permite comparar con precisión diferentes estrategias de manejo químico utilizadas para el control dentro del sistema productivo. El IQc se calcula según la siguiente ecuación:

EIQ a campo= $EIQ * i.a * dosis * frecuencia$ de uso, donde **EIQ**= coeficiente de impacto ambiental, **i.a** =porcentaje de ingrediente activo del producto formulado; **dosis**= cantidad de producto comercial aplicado en campo; **frecuencia**= número de aplicaciones.

Modo de accion (SY)		Toxicidad Pescados 96 hs LC50 (F)	
No Sistémico	1	> 10 ppm	1
Herbidas	1	1 - 10 ppm	2
Sistémico	3	< 1 ppm	3
Toxicidad Dermal LD50 (DT)		Toxicidad en aves 3 dias LC50 (D)	
> 2000	1	> 1000 ppm	1
200 – 2000	3	100 - 1000 ppm	3
0 – 200	5	1 - 100 ppm	5
Efectos sobre la salud a largo término		Toxicidad en beneficos (B)	
Poco o nada	1	bajo impacto	1
Posible	3	impacto moderado	3
Definitive	5	impacto severo	5
		herbidas post emergentes	3
Vida media en sup. de la planta (P)		Toxicidad En abejas (Z)	
1 - 2 semanas	1	No tóxico	1
2 - 4 semanas	3	moderadam. Tóxico	3
> 4 semanas	5	altamente tóxico	5
Herbidas preemergentes	1		
Vida media en el suelo (S)		Agua subt. Y potencial de escorrentía (L)	
T 1/2 <30 días	1	Baja	1
T 1/2 = 30 - 100 días	3	Media	3
T 1/2 > 100 días	5	Alta	5

Tabla 45. Criterios de ponderación de las variables usadas en el cálculo de EIQ teórico (Fuente: Kovach *et al.*, 1992).

6.3. RESULTADOS

A partir de la hoja de seguridad y marbete de los FFK y Tebuconazole, es que se obtuvieron los valores numéricos de la ecuación para el cálculo del EIQ de cada producto. A continuación, se muestran los valores de cada componente de la ecuación de EIQ para los FFK (Tabla 46) y tebuconazole (Tabla 47), y los EIQ.

DATOS	REFERENCIA	Valor
DT	Toxicidad dermal	1
C	Toxicidad crónica	1
SY	Sistemicidad	3
F	Toxicidad pescados	1
L	Potencial lixiviación	1
R	Potencial de pérdida en superficie	1
D	Toxicidad en Aves	1
S	Vida media en el suelo	1
Z	Toxicidad en Abejas	1
B	Toxicidad en artrópodos benéficos	1
P	Vida media en sup planta	1

Tabla 46. Valores de cada componente de la ecuación de EIQ para FFK. **Tox=** Toxicidad; **Sup=** superficie. **EIQ=** 5,55

DATOS	Referencia	Valor
DT	Toxicidad dermal	1
C	Toxicidad crónica	1
SY	Sistemicidad	3
F	Toxicidad en pescados	2
L	Potencial lixiviación	1
R	Potencial de pérdida en superficie	3
D	Toxicidad en aves	1
S	Vida media en el suelo	3
Z	Toxicidad en abejas	1
B	Toxicidad en artrópodos benéficos	1
P	Vida media en sup planta	1

Tabla 47. Valores de cada componente de la ecuación de EIQ para Tebuconazole (Folicur).
Tox= Toxicidad; **Sup=** superficie. **EIQ=7,44.**

Luego se calculó el EIQ de campo (Tabla 48) teniendo en cuenta EIQ correspondiente al producto, el porcentaje de principio activo (p.a.) de la formulación aplicada, la dosis en kg o L ha⁻¹ y el número de aplicaciones realizadas en el cultivo. En el caso de tratamientos compuestos por mezclas de dos o más activos se sumaron los EIQC de cada uno.

p.a.	EIQ	% p.a. formul	dosis	N° aplic.	EIQ campo
Tebuconazole	7,44	0,43	0,15	4	1,91
FFK	5,55	0,2	1,5	4	6,66

Tabla 48 Valores de EIQ de campo para las diferentes estrategias.

Para la estrategia donde se combinaron los dos p.a. se suman los dos EIQ de cada producto, alcanzando en este caso un EIQ final de 8,57.

El valor de impacto ambiental de las diferentes estrategias evaluadas es <25 con lo cual es muy bajo. La estrategia del fungicida en éste caso en particular tiene menor EIQ de

campo respecto a la de los FFK, debido a que la dosis utilizada con el Tebuconazole es menor respecto a la del FFK. Sin embargo, el EIQ inicial de los FFK es menor a la del Tebuconazole, debido al bajo riesgo al aplicador, consumidor y ecológico. Por otra parte, el Tebuconazole presenta toxicidad en pescados, un potencial medio de pérdida en superficie y vida media en el suelo de 30 a 100 días.

6.4. CONCLUSIONES

El FFK mostró un muy bajo impacto ambiental en este sistema productivo y muy bajo riesgo para el trabajador (aplicador), por su baja toxicidad dermal y crónica. También manifestó muy bajo riesgo para el consumidor ante una baja exposición del mismo, al presentar baja toxicidad crónica, baja vida media en el suelo y en la superficie del vegetal, al ser sistémico y presentar bajo potencial de lixiviación en el suelo. Por otro lado, el riesgo ecológico también fue bajo dada su baja toxicidad en peces, aves, abejas y bajo potencial de escurrimiento sobre aguas subterráneas. Por otra parte, debido a que el durazno es una fruta muy susceptible a podredumbre morena y es necesario protegerlo hasta final de ciclo del cultivo, la única opción posible es con productos como los fosfitos que no tienen periodo de carencia.

7. CONCLUSIONES GENERALES

En base a la hipótesis planteada en esta tesis se podría concluir que:

1. Los fosfitos presentan efecto directo sobre el crecimiento del patógeno *in vitro*.
2. Aplicaciones preventivas de fosfitos en poscosecha no afectan la curva de susceptibilidad del hospedante ante *Monilinia fruticola*, pero podrían disminuir la expresión de síntomas en frutos en estado de cosecha.
3. Aplicaciones preventivas en poscosecha de FFCa 0,3% podrían presentar efecto indirecto sobre el hospedante al expresar compuestos asociados a los mecanismos de resistencia inducida como el aumento de fenoles totales y PPO en estado de cosecha.
4. Los FFK no manifestaron efectos inductivos sobre el hospedante como los FFCA.
5. Se manifestaron mayores efectos inductivos de los fosfitos sobre el hospedante en Flordaking respecto a Elegant lady.
6. Los tratamientos preventivos de FFCa en combinación con fungicida aumento el peso de frutos en 'Flordaking' y SST en 'Elegant lady'. Los fosfitos por sí solos no manifestaron actividad bioestimulante marcada.
7. Las aplicaciones de fosfitos podrían ayudar al control poscosecha de podredumbre morena, aunque sin modificar los parámetros de calidad.
8. Aplicaciones de fosfitos para el control de podredumbre morena, mostraron tener un muy bajo impacto ambiental, muy bajo riesgo para el trabajador y consumidor, lo que lo hace una estrategia de control posible a tener en cuenta en frutos de durazno en etapas cercanas a cosecha, ya que dichos productos no tienen periodo de carencia.

Ante los resultados expuestos, si bien pudo demostrarse un efecto directo sobre el crecimiento del patógeno, los fosfitos no deberían ser utilizados solos ni podrían reemplazar a los fungicidas en un programa de manejo de la podredumbre morena. Tampoco demostraron tener un efecto marcado sobre la calidad de los frutos de duraznero. Para futuras investigaciones sería importante ensayar mayores dosis de fosfitos a las evaluadas, así como mezclas de fosfitos con fungicidas de otras

familias en combinación con coadyuvantes; ensayar el uso de estos productos como desinfectantes en plantas de empaque; también conocer el efecto in vitro sobre otros patógenos que afectan al duraznero, tanto los que afectan órganos aéreos como los que afectan sistema radicular. Para tener un mejor entendimiento de los efectos de los fosfitos sobre el rendimiento, se requieren más años de estudio, ya que es un parámetro afectado por múltiples factores. Sería interesante evaluar diferentes cultivares de duraznero, ya que responden de diferente manera ante aplicaciones de fosfitos.

8. BIBLIOGRAFIA

Agrios G N (2005). Plant pathology. Elsevier.

Amiri A, Bompeix G (2011). Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. Crop Protection, 30(2): 222-227.

Angel N, López serrano F (2014). Producción de duraznos en la Provincia de Buenos Aires e importancia de podredumbre morena en cultivo de Prunus (pp.27-32). En Mitidieri M S, Castillo J A (eds). Producción de durazno en la Provincia de Buenos Aires e importancia de podredumbre morena en cultivo de Prunus. Manejo de la Podredumbre Morena (*Monilinia fructicola* y *M. laxa*) en huertos frutales de Uruguay, Chile, Bolivia, Brasil y Argentina. Ed. RedFrut-san.

Araujo, L, Valdebenito- Sanhueza R, Stadnik M (2010). Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35 (1): 054-059.

Badaracco P, Sortini M, Pioli RN (2020). Estudio de compuestos vegetales con potencial acción antifúngica sobre patógenos de plantas cultivadas. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* 36 (3): 244-252.

Baiza abelar VH (2004) Guía técnica del cultivo del melocotón. Ed. Jorge Escobar de León (FRUTAL ES). El Salvador. 46pp.

Barbieri M O (2020). Validación de la técnica de volumen de caldo ajustado para aplicaciones de invierno en nectarinos, su eficacia biológica e impacto ambiental (Doctoral dissertation, Universidad Blas Pascal).

Benhamou N (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in plant science*, 1(7): 233-240.

Biggs A R, Northover J (1988). Early and late-season susceptibility of peach fruits to *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 72: 1070-1074.

Bizjak J, Weber N, Mikulic-Petkovsek M, Slatnar A, Stampar F (2013). Influence of Phostrade Ca on color development and anthocyanin content of 'Braeburn' Apple (*Malus domestica* Borkh.). *Hortscience* 48(2): 193–199.

Boneti J I, Katsurayama Y. (2005). Viabilidade do uso de fosfitos no controle da sarna-da-macieira. *Agropec. Catarin.*, v.18, n.2, p. 51-54.

Boneti J I S, Katsurayama Y (2011) Uso dos fosfitos e compostos naturais no controle das doenças da macieira. *Anais do Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado*, 54-6.

Bostock R M, Wilcox S M, Wang G, Adaskaveg J E. (1999). Supression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit phenolic acids. Physil. Mol. Plant Pathol. 54: 37-50.

Bowen J, Brummell D A, Gapper N E. (2022). "Biotechnological approaches for reducing fruit losses caused by pathogenic infection". Current Opinion in Biotechnology. 78:102795.

Brackmann A, Giehl R F H, Sestari I, Steffens CA. (2004). Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs Fuji durante o armazenamento refrigerado. Ciência Rural 34:1039-1042.

Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.

Braga M R, Dietrich S M C (1987) Defensas químicas de plantas: Fitoalexinas. Acta bot. bras 1: 3-16

Brambilla M V, Barbieri M O, Piris E B, Mitidieri M S (2022). Efecto del aceite de Melaleuca alternifolia en combinación con un coadyuvante sobre la inhibición "in vitro" del crecimiento de *Monilia fructicola*. Disponible en: https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/13296/INTA_CRBsAsNorte_EEASanPedro_Brambilla_MV_et-al_Efecto_del_aceite_de_Melaleuca.pdf?sequence=2&isAllowed=y Último acceso: 22 de abril 2023.

Censo Nacional Agropecuario INDEC (2018). https://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2021/10/numeros_durazno_2021.pdf. Último acceso 15 de abril 2023.

Casierra-Posada F, Barreto V E, Fonseca O L (2004). Crecimiento de frutos y ramas de duraznero (*Prunus persica* L. Batsch, cv. 'Conservero') en los altiplanos colombianos. Agronomía Colombiana, 22(1): 40-45.

Caicedo O, Higuera B, Martínez S. (2009). Inducción de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patógeno causal de la antracnosis. *Revista Colombiana de Química* 38(1): 25-42.

Cid A R E (2013). Las aplicaciones de agroquímicos en zonas periurbanas. Publicación del Instituto de Ingeniería Rural, INTA Castelar. Disponible en: <https://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/AplicacionesAgroquimicosPeriurbanoCid.pdf> Último acceso 20 de abril 2023.

Cocco M, Almirón N, Meier G. (2016). Alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de *Geotrichum citri-aurantii* y *Penicillium digitatum* en poscosecha de naranjas y mandarinas. *Poscosecha de*, 16.

Coseteng M Y, Lee C Y (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52(4): 985-989.

Cragolini C I, Novo R J, March G J, Conles M Y, Balzarini M. (2005). Momentos de aplicación y eficiencia de fungicidas en el control de la sarna del duraznero. *Agriscientia* XXII. 2: 37-45.

Crisosto C H, Gradziel T, Ogundiwin E, Bostock R, Michailides T J (2009). Development of predictive tools for Brown and Sour Rot resistance in peaches and nectarines. *California Tree Fruit Agreement. Annual Research Report*. 87-94.

Chance B, Maehly A C (1955) *MethodsEnzymol.*2: 764-775.

Chiu C M, You B J, Chou C M, Yu P L, Yu F Y, Pan S M, Bostock R M, Chung K R, Lee M H (2013). Redox status-mediated regulation of gene expression and virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Plant Pathology*, 62(4): 809-819.

Chunhua S, Ya D, Bingle X, Xiaolong X, Yongshu X, Qingliang L (2001). The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. Plant Mol Biol Rep. 19:381a-381h.

Dansa A M (2016). Mercados agropecuarios. Publicación de la Subsecretaría de Mercados Agropecuarios N°1. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/s_mercados_agroindustriales/archivos/mercados_agropecuarios_01.pdf. Último acceso 15 de abril 2023.

Deliopoulos T, Kettlewell P. Hare M (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. Crop Protection 29: 1059 – 1075.

de Oliveira Lino L, Génard M, Signoret V, Quilot-Turion B (2015). Physical host factors for brown rot resistance in peach fruit. In International Symposium on Innovation in Integrated and Organic Horticulture (INNOHORT) 1137: 105-112.

Di Rienzo J, Balzarini M, Gonzalez L, Casanoves F, Tablada M, y Walter Robledo C (2010). Infostat: software para análisis estadístico.

Dini M. (2019). Resistência à podridão-parda no pessegueiro.

Dini M., Raseira M.d.C.B., Scariotto S., Ueno B. (2022). Breeding Peaches for Brown Rot Resistance in Embrapa. Agronomy 12, 2306. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102306>

Dini M., Raseira M.d.C.B., Corre M.-N., Signoret V., Quilot-Turion B. (2023) Influence of Fruit Wounding on Subsequent *Monilinia laxa* Infection of Nectarines. Agronomy, 13, 1235. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051235>

Dos Santos J, Bassols Raseira M C, Zanandrea L (2012). Resistência à podridão parda em pessegueiro. Bragantia 71(2): 219 - 225. [fecha de Consulta 16 de Febrero de 2024]. ISSN: 0006-8705. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90823117019>

Emery K M, Michailides T J, Scherm H. (2000). Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. Plant Disease. 84:853-857.

Ernst, B. (2020). Fruticultura Argentina: Importancia y características. https://eperu.cancilleria.gob.ar/userfiles/1-fruticultura_argentina_dic_2020.pdf. Último acceso 15 de abril 2023.

Estrada-Ortiz E, Trejo-Téllez L, Gómez-Merino F, Núñez-Escobar R, Sandoval-Villa M (2011). Respuestas bioquímicas en fresa al suministro de fósforo en forma de fosfito. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(3): 129-138.

Fabiane KC (2011) Reação de pessegueiros a *Monilinia fructicola* (wint.) Honey e sua relação com os componentes bioquímicos. Tesis de posgrado para obtener título de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Tecnológica Federal de Paraná, Campus Pato Branco. Brasil. 129 pp.

FAO. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations; Statical Division. Roma. Disponible en: <<http://faostat3.fao.org/home/E>> Aceso en: febrero 2024.

Favaro M A (2014). Estudio de la respuesta de defensa en cítricos resistentes-tolerantes a la cancrrosis bacteriana. Disponible en: <http://rehip.unr.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/2133/11597/Tesis%20con%20car%20a1tulas.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Último acceso 17 de abril 2023.

Ferrer Leiva S M, y Moggia Lucchini C 2005. Efecto del acondicionamiento de prealmacenaje por inmersión con fosfito de potasio, tiabendazol, DPA y fludioxonil sobre la incidencia de pudriciones totales en manzana Pink lady (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). (Escuela de Agronomía).

Franzon R.C, Raseira M.C.B. (2014) Origem e história do pessegueiro. In: RASEIRA, M.C.B.; PEREIRA, J.F.M.; CARVALHO, F.L.C. Pessegueiro. Brasília: Embrapa, p.

19-23.

Gaona L, Bedmar F, Gianelli V, Faberi A (2017). Evaluación del riesgo de impacto ambiental de plaguicidas mediante el Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ). Productividad y medio ambiente, 27.

García MS, Leva P, Maio S, Tóffoli G, Gariglio N (2014). Cuantificación del riesgo de daños ocasionados por heladas tardías en Rafaela (Santa Fe, Argentina). Agrociencia (Uruguay), 18(2), 28-32. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482014000200003&lng=es&tlng=es. Último acceso 15 de abril 2023.

Gariglio N F, Bouzo C A, Travadelo M R (2014). Cultivos frutales y ornamentales para zonas templado-cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL, colección Cátedra. Santa Fe, Argentina. 292 p. ISBN: 978-887-657-924-7.

Gómez D E, Reis E M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. Rev. QuímicaViva 10 (1): 6-17.

Gómez –Merino F, Trejo-Téllez L. (2015). Biostimulant activity of phosphite in horticulture. Scientia Horticulturae 196: 82–90.

Gradziel T M (1994) Changes in susceptibility to brown rot with ripening in three clingstone peach genotypes. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 119: 101-105.

Gradziel T M, Wang D (1993). Evaluation of brown rot resistance and its relation to enzymatic browning in clingstone peach germplasm. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 118: 675-679.

Gradziel T M, Thorpe M A, Bostock R M, Wilcox S (1998). Breeding for brown rot (*Monilinia fructicola*) resistance in clingstone peach with emphasis on the role of fruit phenolics. Proc. Fourth Intern. Peach Symposium. Ed. R. Monet. Acta Hort. 465:161-170.

Hammerschmidt R (2014). Chlorogenic acid: A versatile defense compound. Physiological and Molecular Plant Pathology 88: 3 – 5.

Hernández-Sánchez E, Soto-Hernández M, Rodríguez-Alcázar J, Colinas-León T (2002). Contenido de fenoles y actividad enzimática asociados con el daño provocado por cenicilla en hojas de durazno. *Revista fitotecnia mexicana*, 25(2): 153-153.

Hernández Navarro A (2008). Contenido de fenoles libres en chile (*Capsicum annum* L.) CM-334 inoculado con *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* (Master's thesis). Disponible en: http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/1567/Hernandez_Navarro_A_MC_Fitopatologia_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Último acceso el 17 de abril 2023.

Herrera Cid R. (2014). Producción de durazno e importancia de podredumbre morena en cultivo de *Prunus* del Cono Sur. Acciones para permitir la exportación a la Unión Europea (pp. 8-10). En: Mitidieri M, Castillo J A (eds.) Manejo de la podredumbre morena (*Monilinia fructicola* y *M.laxa*) en huertos frutales de Uruguay Chile, Bolivia, Brasil y Argentina. https://www.researchgate.net/publication/277721033_Manejo_de_la_Podredumbre_Morena_a_Monilinia_fructicola_y_M_laxa_en_huertos_frutales_de_Uruguay_Chile_Bolivia_Brasil_y_Argentina/link/557221c008aeb6d8c017374e/download. Último acceso 15 de abril 2023.

Hong C X, Holtz B A, Morgan D P, Michailides T J (1997). Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease* 81: 519-524.

Keske C, Amorim L, May-de-Mio L. (2011). Peach brown rot incidence related to pathogen infection at different stages of fruit development in an organic peach production system. *Crop Prot.* 30: 802-806

Kovach J, Petzoldt C, Degni J, Tette J (1992). A method to measure the environmental impact of pesticides.

La Spada F, Aloï F, Coniglione M, Pane A, Cacciola SO (2021). Natural Biostimulants Elicit PlantImmune System in an Integrated Management Strategy of the Postharvest Green Mold of Orange Fruits Incited by *Penicillium digitatum*. Front. Plant Sci. 12:684722. doi: 10.3389/fpls.2021.684722

Lee M H, Bostock R M (2006). Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 96(10): 1072-1080.

Lee M H, Bostock R M (2007). Fruit exocarp phenols in relation to quiescence and development of *Monilinia fructicola* infections in *Prunus* spp.: A role for cellular redox?. Phytopathology 97:..269-277.

Luo Y, Michailides T J (2001). Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. APS 91:864-872

Lutz M, Sosa M, Vera Ñ, Carmona M. (2015). Efecto del fosfito de potasio en el control de las enfermedades de postcosecha en manzanas, en el alto valle de río negro.

Llivicura Alvarado M A (2018). Comparación in vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*); frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Bachelor's thesis). Universidad Politécnica Salesiana, 127.

Madriz Ordeñaña K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63: 22 – 32.

Manganaris G A, Vasilakakis M, Diamantidis G, Mignani I (2006). Effect of in-season calcium applications on cell wall physicochemical properties of nectarine fruit (*Prunus persica* var. nectarina Ait. Maxim) after harvest or cold storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(15): 2597-2602.

Mansilla Ferro C. F. (2017). Impacto ambiental de la aplicación de plaguicidas en siete modelos socio-productivos hortícolas del Cinturón Verde de Mendoza (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias).

Mapson L W, Swain T, Tomalin A W (1963). Influence of variety, cultural conditions and temperature of storage on enzymic browning of potato tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(9): 673-684.

Mari M, Casalini L, Baraldi E, Bertolini P, Pratella G C (2003) Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phenological stages". *Postharvest Biology and Technology* 30:105/109.

Méndez Leiva W, Arauz L F, Ríos R (2010). Evaluación de fungicidas convencionales e inductores de resistencia para el combate de mildiú vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*) en melón (*Cucumis melo*). *Agronomía Costarricense*, 34(2), 153-164.

Mendoza G, Sánchez J, Becerra V (2014). Impacto ambiental de tres estrategias fitosanitarias para el control de *Lobesia botrana*. In *37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2)* (p. 05009). EDP Sciences.

Mondino P. (2014). Sintomatología, Etiología, características epidemiológicas de la enfermedad. (pp. 35-42). En: Mitidieri M, Castillo J. A. (Eds) Manejo de la Podredumbre Morena (*Monilinia fructicola* y *M. laxa*) en huertos frutales de Uruguay, Chile, Bolivia, Brasil y Argentina.
https://www.researchgate.net/publication/277721033_Manejo_de_la_Podredumbre_Morena_a_Monilinia_fructicola_y_M_laxa_en_huertos_frutales_de_Uruguay_Chile_Bolivia_Brasil_y_Argentina/link/557221c008aeb6d8c017374e/download. Último acceso 15 de abril 2023.

Montes-Belmont R (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Mic.* vol.29: 73-82. [citado 2024-02-16]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000100010&lng=es&nrm=iso. ISSN 0187-3180.

Moor U, Pořldma P, Tořnutare T, Karp K, Starast M, Vool E (2009). Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Horticulturae* 119: 264–269.

Morales-Morales E. J., Martřnez-Campos Ā. R., L3pez-Sandoval J. A., Castillo Gonz3lez A. M., y Rub3-Arriaga M. (2022). Los fosfitos y sus aplicaciones en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agr3colas*, 13(2), 345-354.

Moreira L., May -de Mio, L., Valdebenito- Sanhueza, R., Lima, M. & Possamai, J. 2002. Controle em p3s-colheita de *Monilinia fructicola* em p3essegos. *Fitopatologia Brasileira* 27:395-398.

Moreira L, May -de Mio L (2009). Controle da podrid3o parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pr3 e p3s-colheita. *Ci3nc. agrotec.*, Lavras 33 (2): 405-411.

Michailides T, Luo Y, Ma Z, Morgan D P. (2014). Brown rot of dried plum in California: New insights on an old disease. *APS net Features*. doi: 10.1094/APSnetFeature-2007-0307. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/BrownRot.aspx>. 3ltimo acceso 15 de abril 2023.

MINISTERIO DE LA PRODUCCI3N. GOBIERNO DE SANTA FE (2010). Cadena frutihort3cola Santafesina.
<https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/66061/320661/file/descarga>
3ltimo acceso 15 de abril 2023.

Mitidieri M S. (2012). Protecci3n del cultivo: Enfermedades que afectan el duraznero en la Regi3n pampeana (pp.147-161). En: Valentini G, Gonz3lez J, Gordo, M. (eds.) *Producci3n del duraznero en la Regi3n Pampeana*, Argentina. Ediciones INTA.

Mitidieri M S, Brambilla M V, Barbieri M O, Piris E B, Veron R A, Celie, R E, Arpia N E, Leone A, Barbos R F (2017) Evaluaci3n de aplicaciones preventivas con fosfitos de calcio

y potasio para el control de podredumbre morena en duraznos. Póster. I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Postcosecha. IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha. Concordia, Entre Ríos, 25 al 27 de octubre de 2017. Disponible en: https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/1829/INTA-CRBsAsNorte_EEASAnPedro_Mitidieri_MS_Evaluacion_aplicaciones_preventivas.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Último acceso el 17 de abril 2023.

Mitidieri M S, Brambilla M V, Piris E B, Barbieri M O, Celie, R E, Arpia N E (2018) Evaluación de alternativas a los fungicidas de síntesis química para el control de enfermedades de postcosecha en durazno. Revista de Fruticultura, 60: 40-45.

Muñoz Z, Moret A, Bech J (2008). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Monilinia* spp. y pruebas de patogenicidad sobre manzana. Agrociencia, 42(1): 119-128.

Mustafa, M.H.; Bassi, D.; Corre, M.-N.; Lino, L.O.; Signoret, V.; Quilot-Turion, B.; Cirilli, M. 2021. Phenotyping Brown Rot Susceptibility in Stone Fruit: A Literature Review with Emphasis on Peach. Horticulturae, 7, 115. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7050115>

Nativitas Lima I. (2021) Mecanismos de resistencia para el manejo de *Monilinia fructicola* en *Prunus persica* (Doctoral dissertation).

Nievas W. (2016). Torque del duraznero. Una enfermedad a tener en cuenta en un año niño. Revista Fruticultura & Diversificación N° 77: 1-4.

Northover J, Biggs A R (1990). Susceptibility of immature and mature sweet and sour cherries to *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 74(4): 280-284.

Northover J, Biggs A R (1995). Effect of conidial concentration of *Monilinia fructicola* on brown rot development in detached cherries. Canadian Journal of Plant Pathology, 17(3): 205-214.

Ogoshi C, Abreu M, Silva B, Neto H, Ribeiro Júnior P, Resende M. (2013) Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. *Biosci. J.*, Uberlândia 29(1):1558-1565.

Ortiz Bravo D C (2018). Comparación in vitro de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de citronella (*Cymbopogon nardus*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) frente al agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Bachelor's thesis). Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16596>. Último acceso 17 de abril 2023.

Ortiz V, Güemes D R, Piagentini A M, Gariglio N F, Pirovani M E (2007). Comparación de la calidad de duraznos de diferentes variedades cultivadas en la región centro-este de la provincia de Santa Fe. *FAVE: Sección Ciencias Agrarias*, 5(1): 27-33.

Pagliaricci L, Ángel N. (2012). Mercado y Comercialización. (pp. 33-42). En: G. Valentini G, González J, Gordo M (eds.) Producción del duraznero en la Región Pampeana, Argentina. Ed. INTA. Buenos Aires.

Perera González S D, Hernández Hernández J M, Piedra Buena Díaz A, Duque Yanes M (2012). Eficacia in vitro del sorbato potásico sobre el crecimiento micelial de diez especies fúngicas componentes del complejo de la pudrición de corona (crown rot) del plátano. Disponible en: https://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/subt_465_Eficacia_in_vitro_sorbato_crown_rot.pdf. Último acceso 17 de abril 2023.

Percival G, Noviss K. (2010). Evaluation of Potassium Phosphite and Myclobutanil Combinations for Pear Scab (*Venturia pirina*) Suppression. *Arboriculture & Urban Forestry*. 36 (2): 86–92.

Pinzón E H, Cruz Morillo A, Fischer G (2014) Aspectos fisiológicos del duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch) en el trópico alto. Una revisión. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 17(2): 401-411.

Ramirez L S, Marin Castaño D (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, XV (42): 263-268.

Reuveni M, Sheglov D, Cohen Y (2003). Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. *Plant disease*, 87(8): 933-936.

Roberts J W, Dunegan J C (1932). Peach brown rot. *USDA Tech. Bull.* 328:59.

Rodríguez-Félix A, Fortiz Hernández J, Villegas Ochoa M. (2011). Cambios en enzimas pectolíticas durante la maduración del durazno 'Flordaprince' *Interciencia*. 36 (1): 65-70.

Romanazzi G, Sanzani S M, Bi Y, Tian S, Martínez P G, Alkan N (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 82-94.

Rossini, M, Giayetto A, Pagella E. (2007). *Monilinia fructicola* un problema para la exportación de frutas de carozo argentinas. *Fruticultura y Diversificación* 54: 20-25.

Rovai E L, Viglianco A I, Cragolini C I, Conles M, Reynoso C, Soratti R, Altamirano T (2022) Impacto ambiental de diferentes manejos fitosanitarios en viñedos de Colonia Caroya, Córdoba. *Nexo agropecuario*, 10(2): 32-37.

Riveros Angarita A S (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas*. 61:4-11.

Sanzani S, Schena L, Ippolito A. (2014). Effectiveness of Phenolic Compounds against Citrus Green Mould. *Molecules* 19, 12500-12508; doi:10.3390/molecules190812500

Sandoval-Chávez R A, Martínez-Peniche R Á, Hernández-Iturriaga M, Teixidó-Espasa N, Usall-Rodié J, Viñas-Almenar I, Torres-Sanchis R (2015). Mechanisms of resistance in postharvest fruit-pathogen interaction. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 21(3), 185-198.

Sautter C K, Brackmann A, Anese R D O, Weber A, Rizzatti M R, Pavanello E P (2011). Control of brown rot and physical-chemical characteristics in 'Magnum' peaches postharvest treated with abiotic elicitors. *Revista Ceres*, 58: 172-177.

Smillie R, Grant B R, Guest D (1989). The mode of action of phosphite: Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79: 921-926.

Sozzi G O (2007). Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento (No. 634.04). Editorial Facultad de Agronomía, UBA.

Speiser B, Berner A, Häseli A, Tamm L (2000). Control of downy mildew of grapevine with potassium phosphonate: effectivity and phosphonate residues in wine. *Biological agriculture & horticulture*, 17(4): 305-312.

Spiers T M, Elmer P A G, Wood P N, Reglinski T, Tate K G (2005). Multiple strategies for effective pathogen control. *N. Z. Plant Protect.* 58: 62-67.

Thao H T B, Yamakawa T (2009). Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or biostimulator?. *Soil science and plant nutrition*, 55(2): 228-234.

Van Loon L C (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765.

Velandia Monsalve J, Viteri Rosero S, Rubio Cárdenas N, Tovar Duarte F. (2012). Efecto del fosfito de potasio en combinación con el fungicida metalaxyl + mancozeb en el control de Mildeo veloso (*Peronospora destructor* Berk) en cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 65 (1): 6317-6325.

Walters D R, Ratsep J, Havis N D (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5): 1263-1280.

Westwood, M N. (1982) Fruticultura en zonas templadas. Mundi Prensa. Madrid. 461 pp.

Yáñez-Juárez M G, López-Orona C A., Ayala-Tafoya F, Partida-Ruvalcaba L, Velázquez-Alcaraz T J, Medina López R (2018). Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems. Revista Mexicana de Fitopatología 36 (1): 79-94. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-7

Yommi A K (2021) Aplicación de fosfito en kiwi "Hayward" y su efecto sobre la calidad y el desarrollo de podredumbre gris (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata).

Zavala-León M J, Tun-Suárez J M, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E, Gutiérrez-Alonso O, Vázquez-Calderón M, Méndez-González R (2005). Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. Revista chapingo serie horticultura, 11(2): 251-255.

Zehr E I (1982). Control of Brown Rot in Peach orchards. Plant Disease. 66. Nº12: 1101-1105.

ANEXO I

Efectividad in vitro de los fosfitos sobre el crecimiento micelial de *M. fructicola*

A continuación, se presentan los resultados parciales de dos repeticiones independientes (Tabla 1) del experimento, donde se evalúan tratamientos de FFK y FFCa en diferentes dosis, sobre la inhibición del crecimiento de *M. fructicola* en cuatro cepas, y en diferentes tiempos de incubación. Luego, se detallan los resultados de cada cepa, de manera individual de ambas repeticiones. En la primera repetición del experimento se observó diferencias entre tratamientos sólo para la cepa MS-2 (Tabla 2), donde el FFK0,3% se destacó, con un 34% de inhibición del crecimiento respecto al tratamiento testigo (Tabla 3). Por otro lado, en la segunda repetición del experimento, se puede observar en la Tabla 4, que en todas las cepas se manifestó diferencias entre tratamientos, excepto para la cepa MS-1. En general se observó diferencias en los tiempos de incubación para todas las cepas y en ambas repeticiones, excepto la cepa 345 de la primera repetición.

	1er repetición	2da repetición
FV	F	F
Tratamiento (T)	3,85**	4,76**
Cepa	12,66**	14,62**
T x Cepa	7,54**	0,62**
Tiempo de incubación (t)	22,09**	33,22**
T x t	1,02	1,52*

Tabla 1. Análisis de variancia de dos repeticiones independientes del experimento donde se evalúa efecto de tratamientos con fosfitos a diferentes dosis, sobre el crecimiento de cuatro cepas distintas de *M. fructicola*. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los **indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

CEPA	341	345	MS-1	MS-2
FV	F	F	F	F
Tratamiento (T)	0,47	2,76	1.48	3,05 *
Tiempo de incubación (t)	13,38**	0,89	13.28**	11,82 **
T x t	0,36	0,7	0.73	1,47

Tabla 2. Análisis de variancia del efecto de diferentes tratamientos con fosfitos sobre el

porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al tratamiento testigo, sobre cada cepa individual de *M. fructicola*, correspondiente a la primera repetición del experimento. T= tratamiento; t= Tiempo de incubación. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). Los **indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

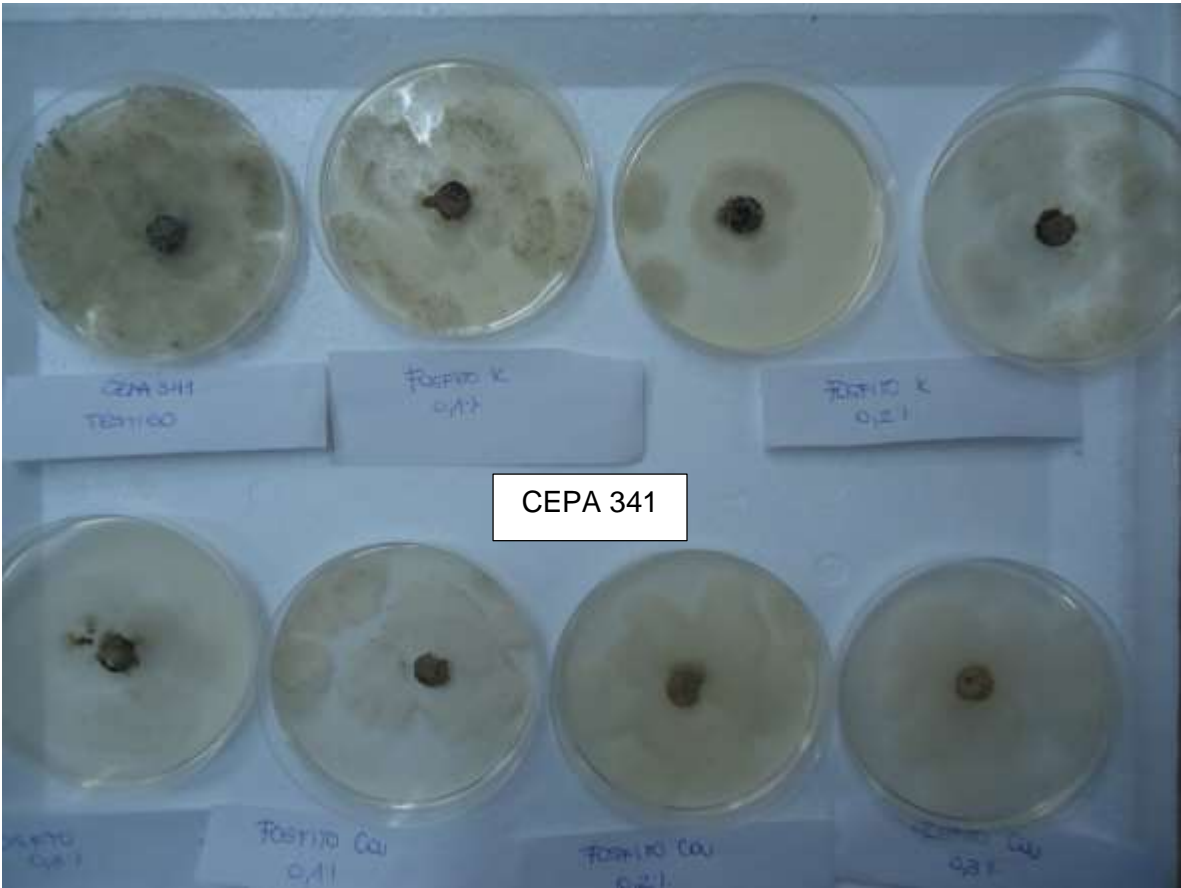
TRATAMIENTO	MS-2
FFK 0,1%	10,15 ± 5,74 bc
FFK 0,2%	21,04 ± 5,74 abc
FFK 0,3%	34,01 ± 5,74 a
FFCa0,1%	7,44 ± 5,74 c
FFCa 0,2%	27,09 ± 5,74 ab
FFCa 0,3%	19,34 ± 5,74 abc

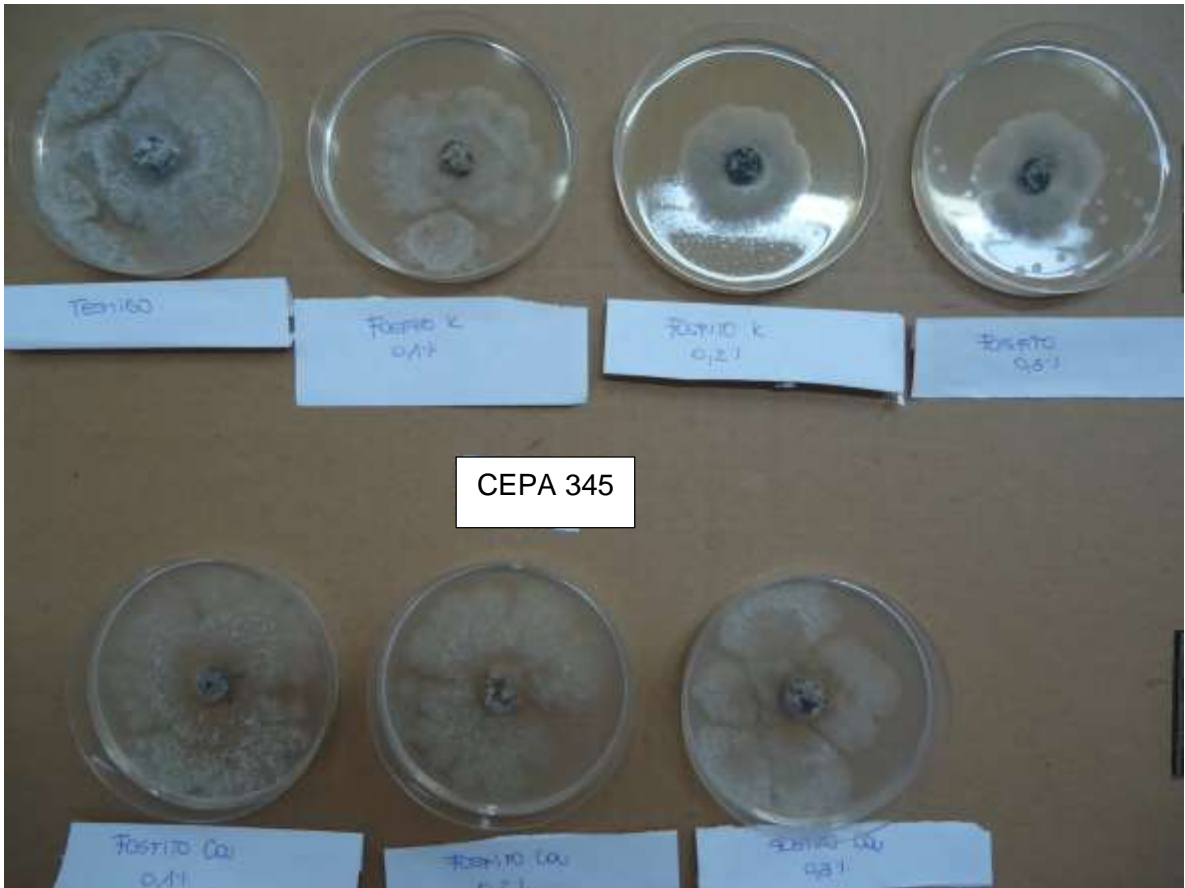
Tabla 3. Efecto de los tratamientos con FFK y FFCa en diferentes dosis sobre la inhibición del crecimiento de la cepa MS-2 de *M. fructicola*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

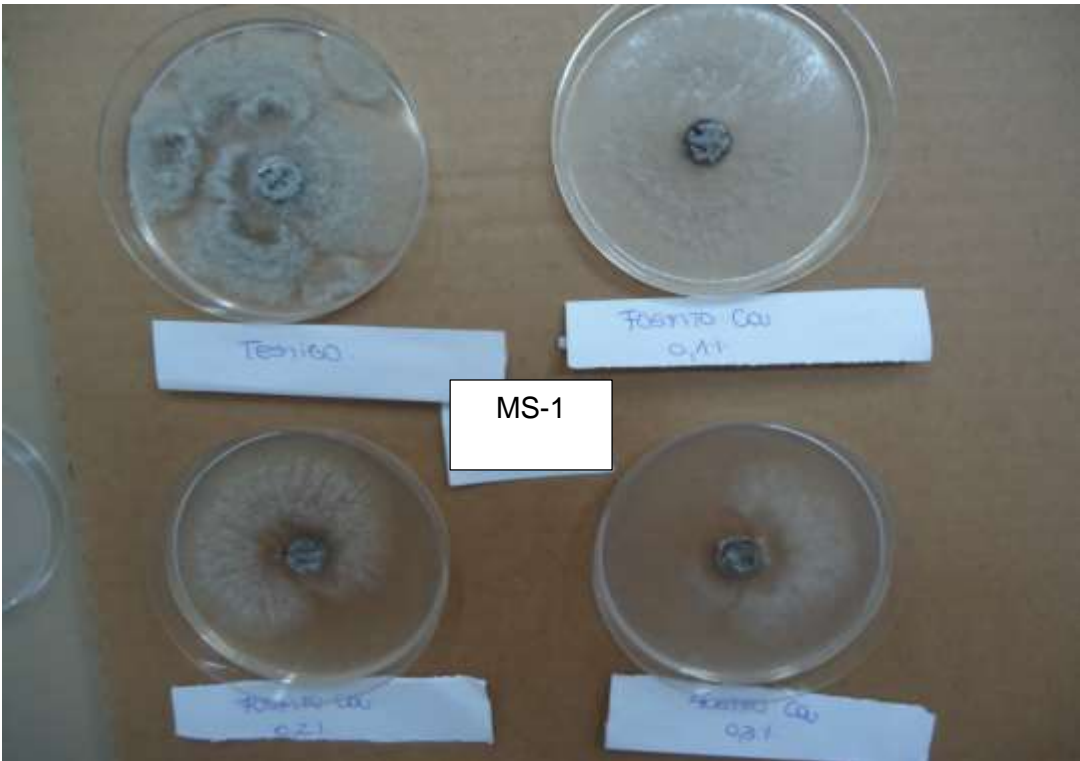
CEPA	341	345	MS-1	MS-2
FV	F	F	F	F
Tratamiento (T)	13,57**	2,93*	0,78	9,61**
Tiempo de incubación (t)	15,88**	48,69**	42,90**	8,91**
T x t	3,78**	1,98*	1,70*	1,97*

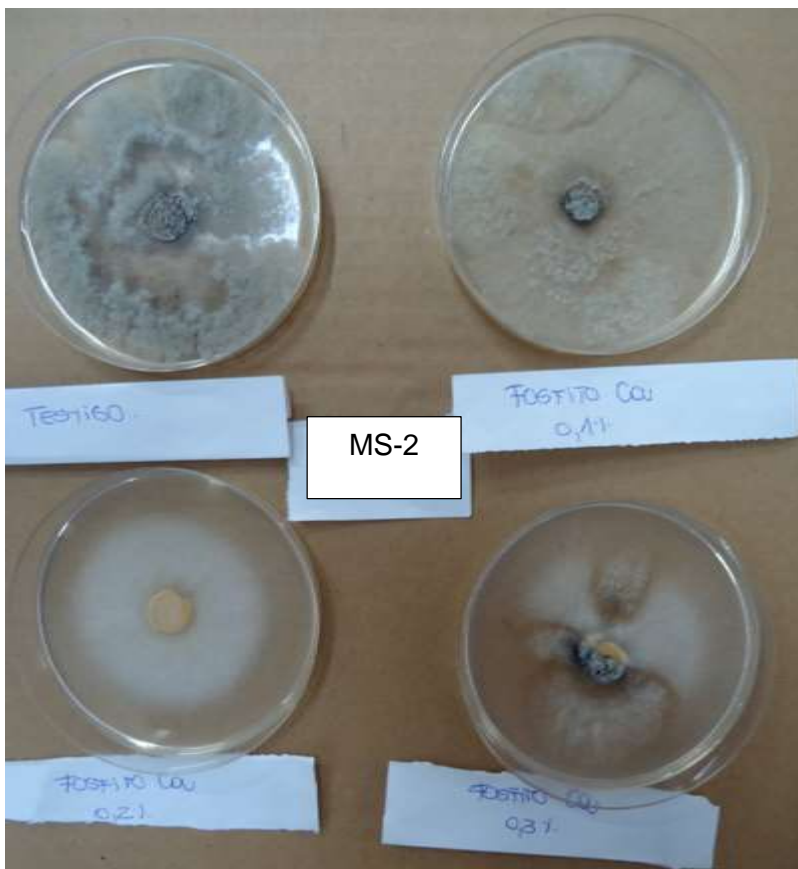
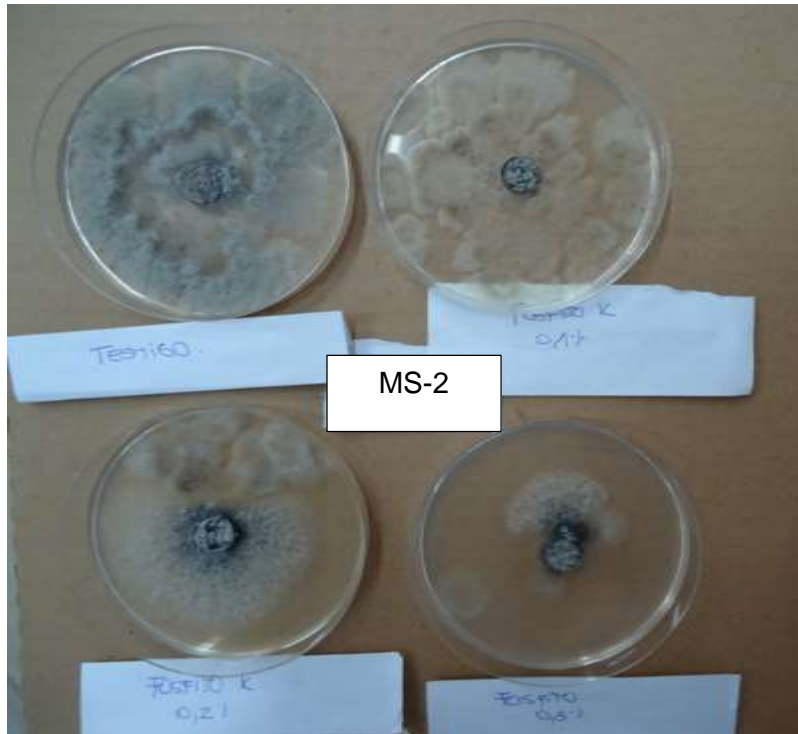
Tabla 4. Análisis de la variancia del efecto de diferentes tratamientos con fosfitos sobre % de inhibición del crecimiento respecto al tratamiento testigo, sobre cada cepa individual de *M. fructicola*, correspondiente a la primera repetición del experimento. T= tratamiento; t= Tiempo de incubación. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). Los **indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$). La fuente de variación correspondiente a tratamiento, fue comparada con test LSD.

A continuación, se muestra material fotográfico del efecto de fosfitos sobre el crecimiento de la cepa 341, 345, MS-1 y MS-2.





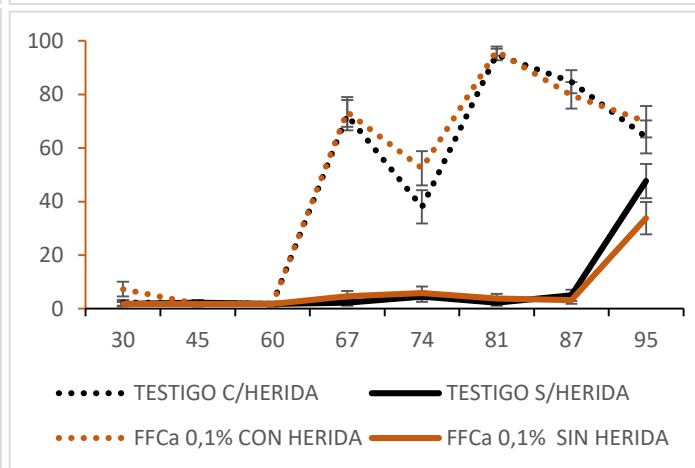
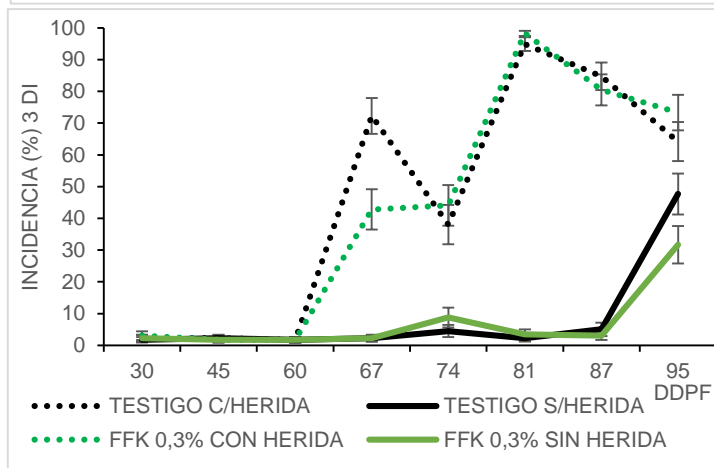
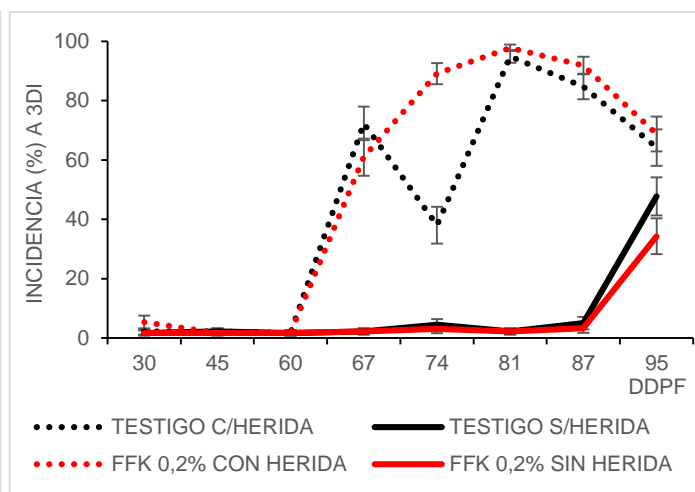
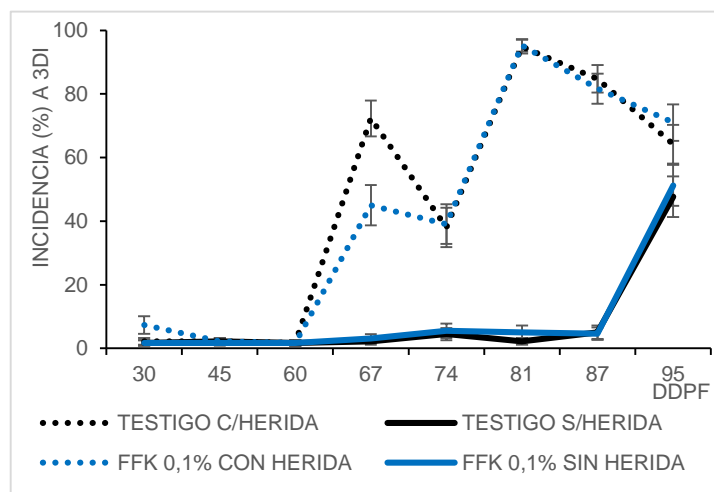




ANEXO II

Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en 'Flordaking'

A continuación, se muestran las triples interacciones para la variable incidencia (%) en frutos 'Flordaking' a 3 DI correspondientes a los tratamientos poscosecha del año 2015.



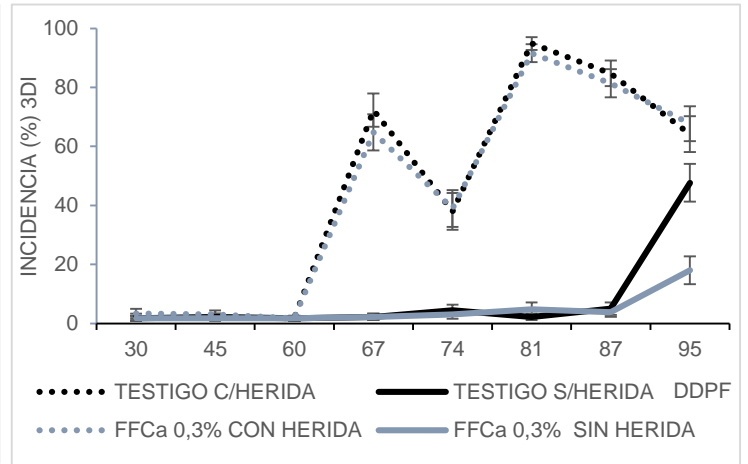
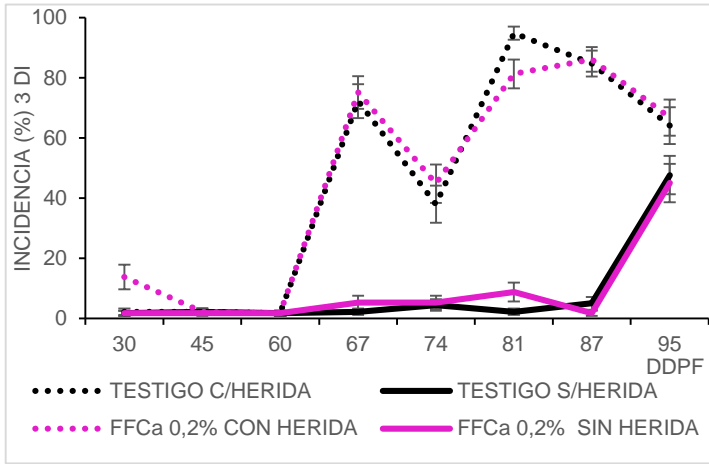
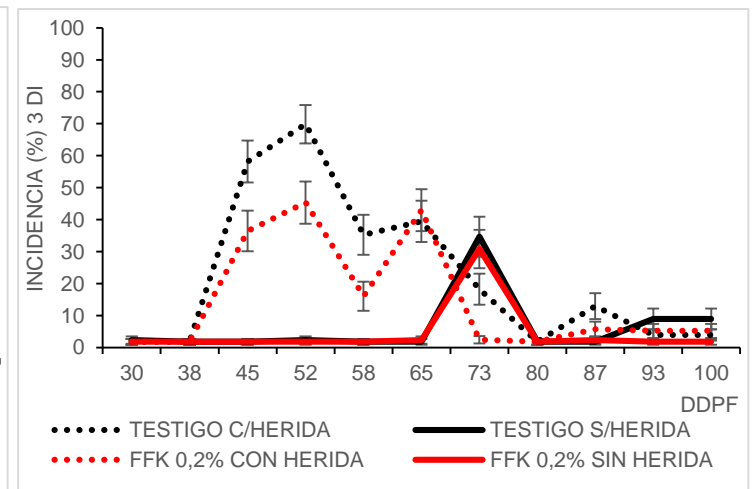
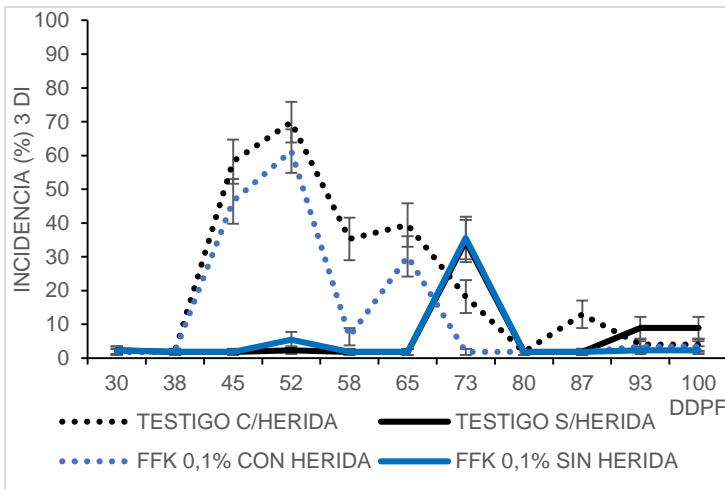


Figura 1. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la incidencia (%) a 3 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2015. 'Florfaking'. **DI**= Días de inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Efecto de tratamientos con fosfitos sobre incidencia y severidad en cultivar *Elegant Lady*

En las siguientes figuras se muestran la interacción manifestada entre DDPF, tratamientos y frutos heridos / no heridos, a 3 y 7 días de la inoculación, para las variables incidencia y severidad en tratamientos poscosecha en el año 2015.



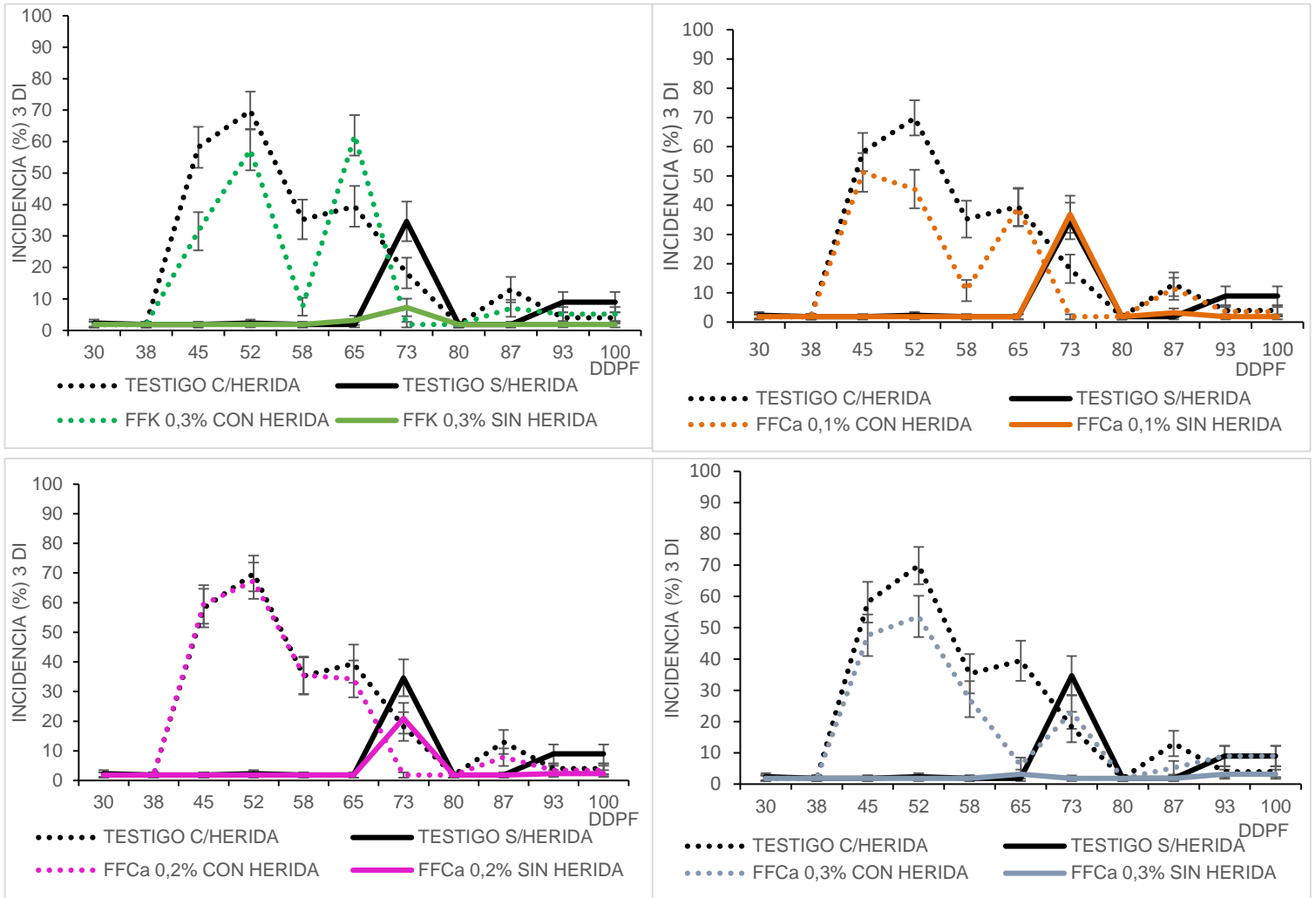


Figura 2. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la incidencia (%) a 3 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2015. 'Elegant Lady'. **DI**= Días de inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

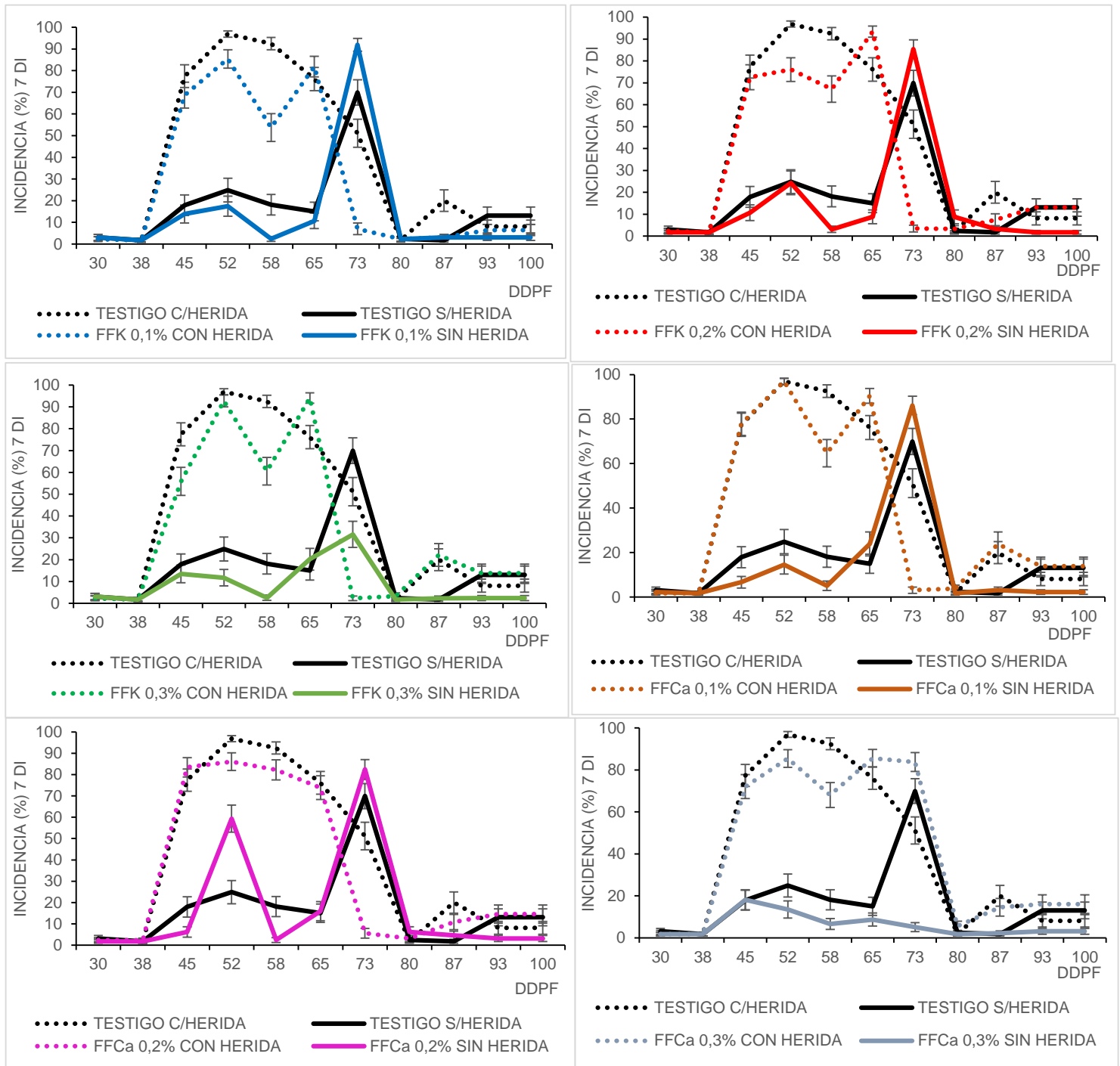


Figura 3. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la incidencia (%) a 7 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2015. 'Elegant Lady'. **DI**= Días de inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

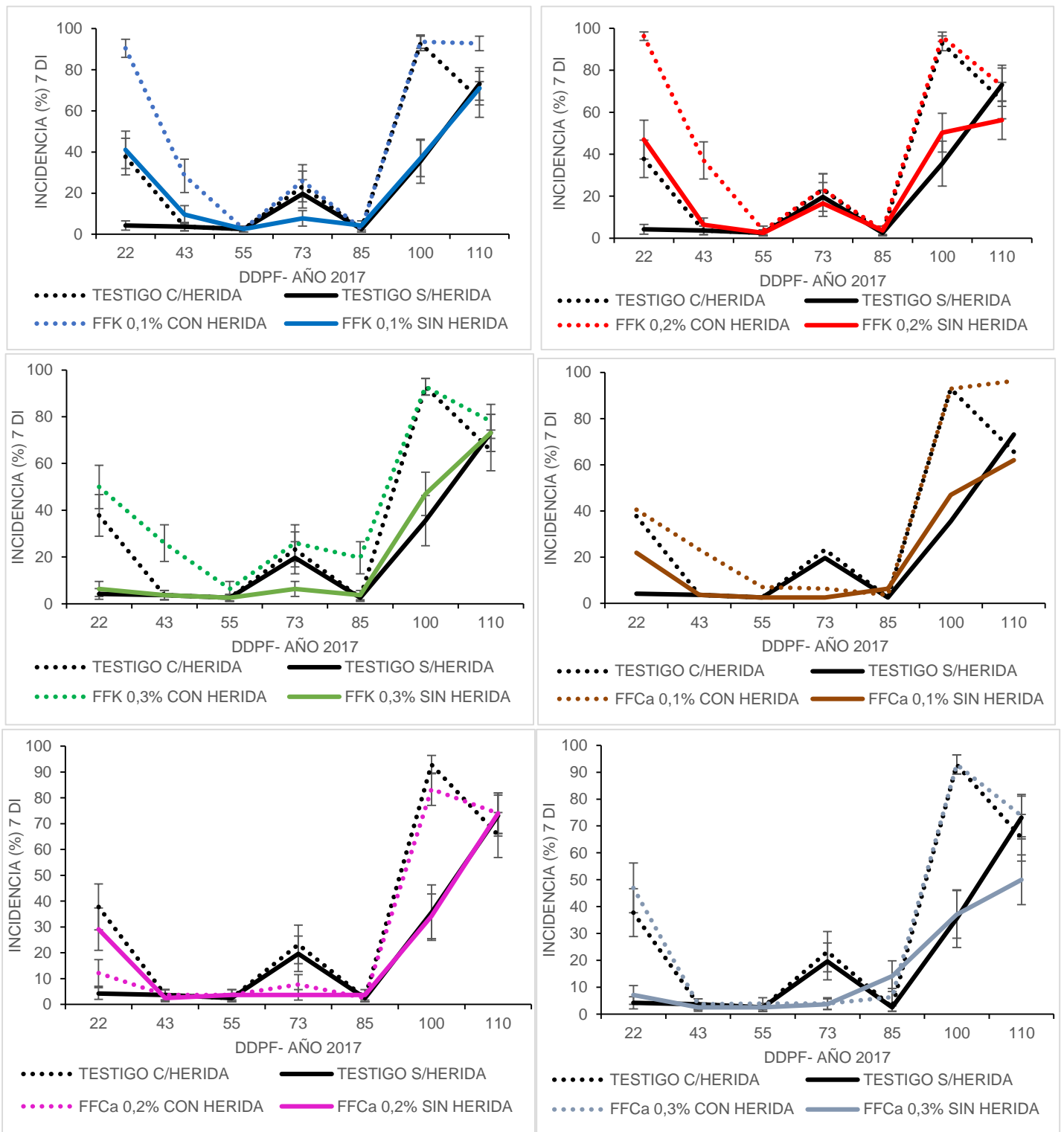


Figura 4. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la

incidencia (%) a 7 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2017. 'Elegant Lady'. **DI**= Días de inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

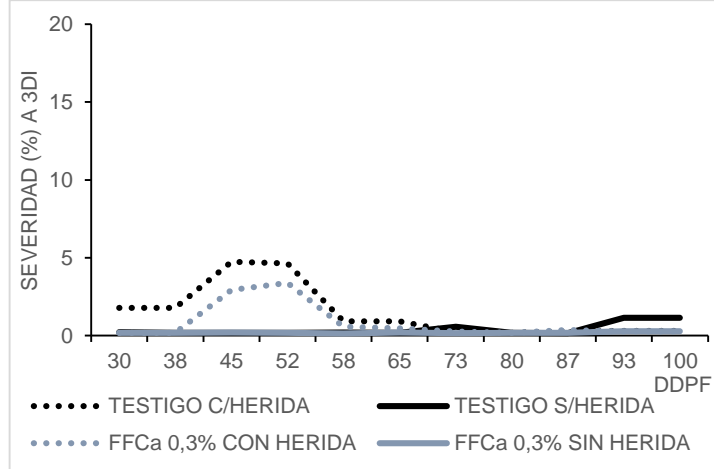
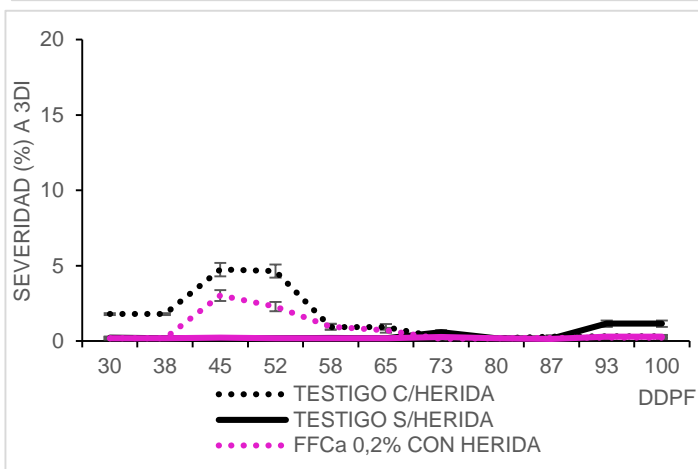
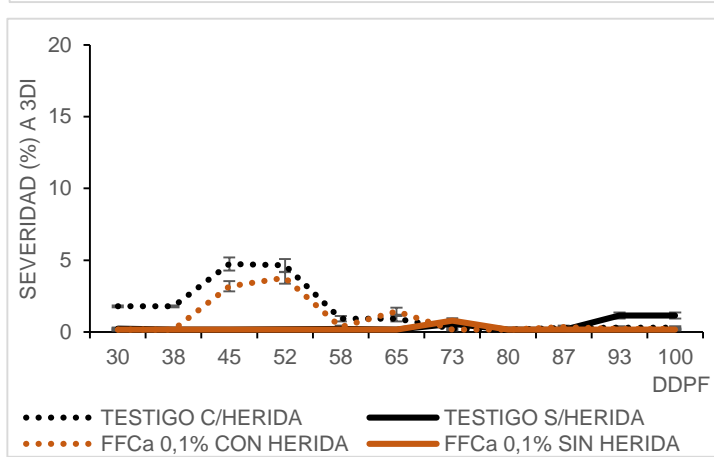
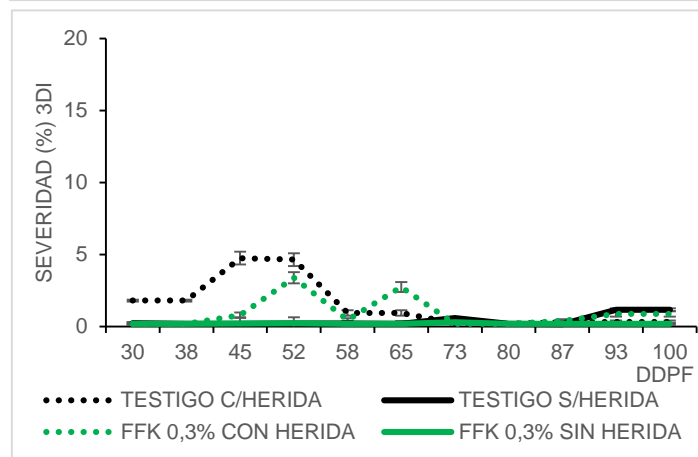
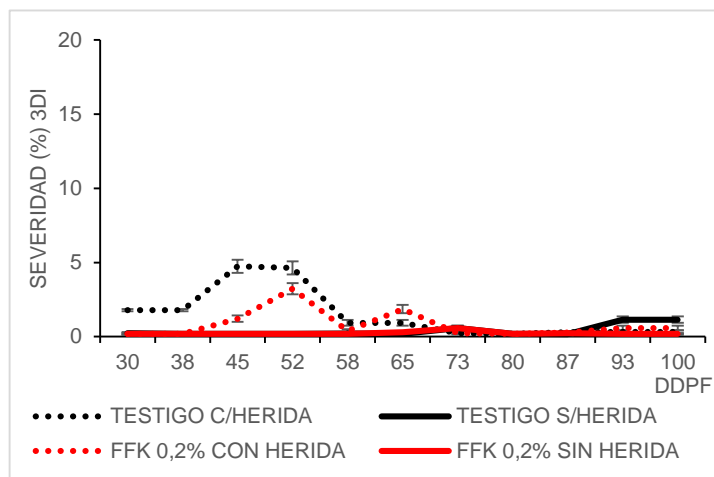
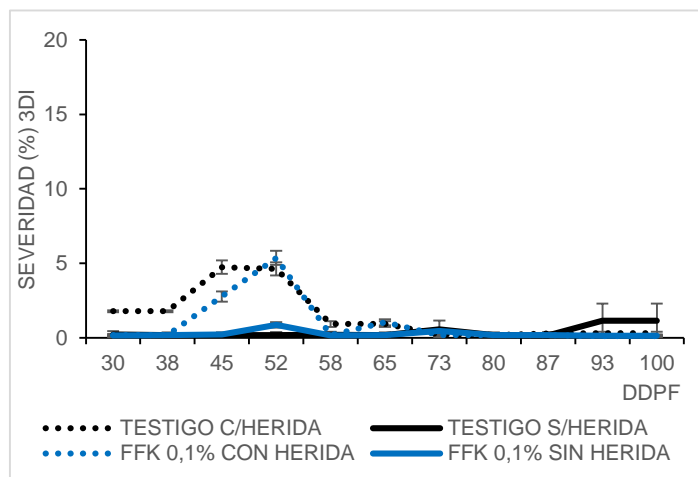
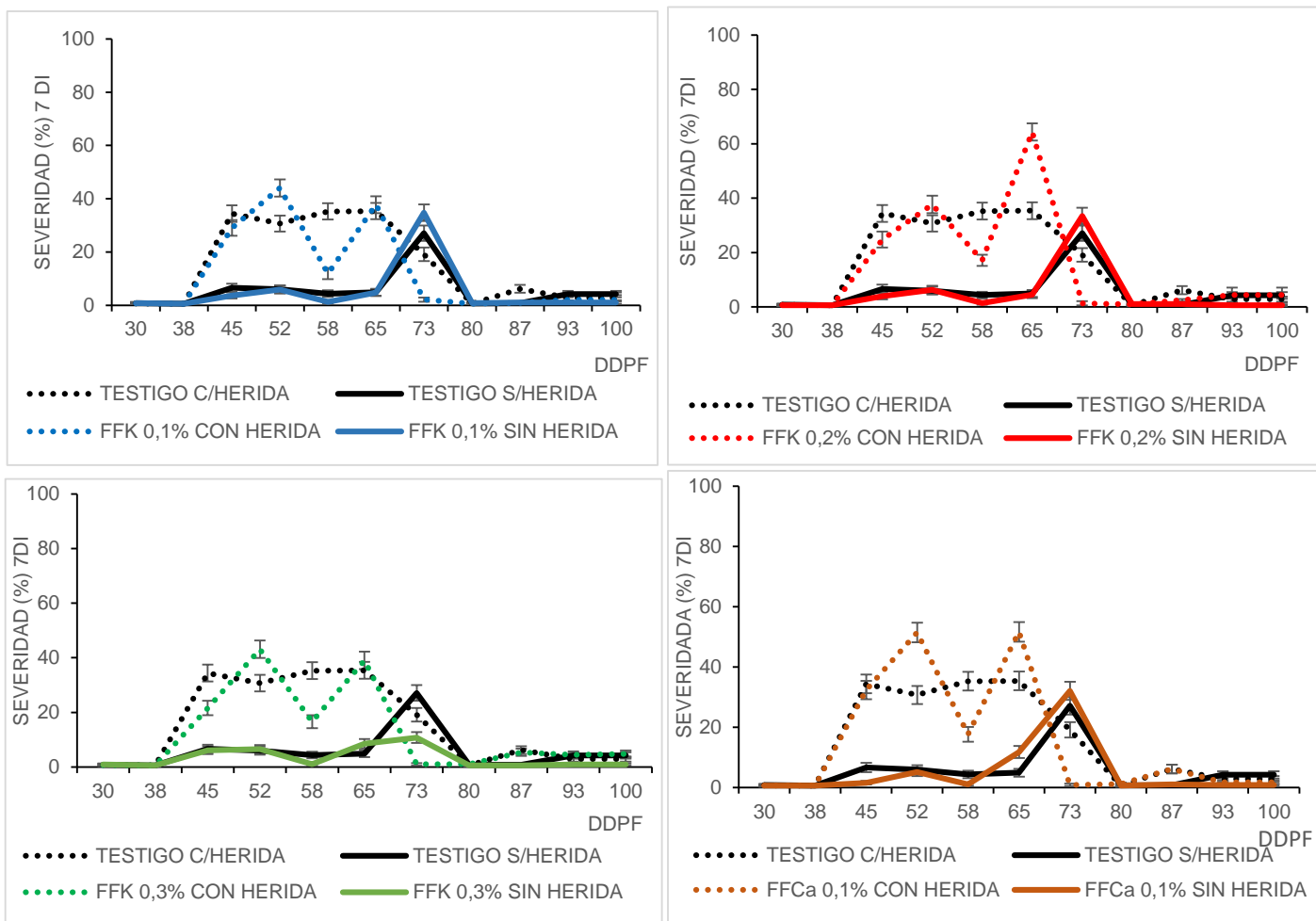


Figura 5. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la severidad (%) a 3 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2015. 'Elegant Lady'. **DI=** Días de inoculación. **DDPF=** Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.



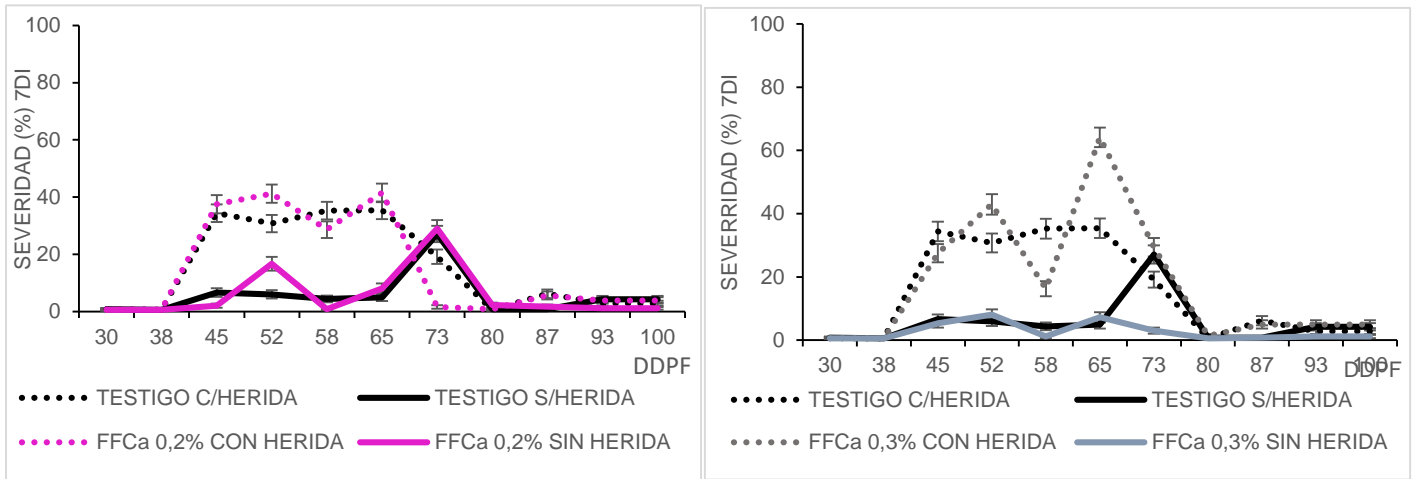


Figura 6. Efecto de los diferentes tratamientos con fosfitos de potasio y calcio sobre la severidad (%) a 7 DI en frutos heridos y no heridos, a lo largo de su desarrollo. Tratamientos poscosecha. Año 2015. 'Elegant Lady'. **DI**= Días de inoculación. **DDPF**= Días después de plena floración. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.