



Università degli Studi di Bologna  
Universidad Nacional del Comahue  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

MAESTRIA Y ESPECIALIZACION EN FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPLADO-FRIO

1ra. Edición – 2007/2009

TITULO: ***Phytophthora cactorum*: Caracterización, epidemiología e incidencia en la productividad y en la calidad de frutos de peral cv. Williams**

AUTOR: Ing. Agr. Victoria Ileana Rivero

DIRECTOR: Biólogo Dr. Alejandro Giayetto. Investigador Área Fitopatología, INTA EEA Alto Valle, Río Negro.

CO-DIRECTOR: Ing. Agr. Dra. Mirta N. Rossini. Investigadora Área Fitopatología, INTA EEA Alto Valle, Río Negro.

Tesis para optar al grado académico de  
**MAGISTER SCIENTIAE EN FRUTICULTURA  
DE CLIMA TEMPLADO-FRÍO**

## **DEDICATORIA**

A Isabella y Mauro

## **AGRADECIMIENTOS**

A las autoridades de INTA por proveer los medios para que este trabajo pudiera realizarse.

A mi director Alejandro Giayetto y co-directora Mirta Rossini por sus aportes en la elaboración de esta tesis.

A Juan Gastaldi, Coco García y Miguel por ofrecer sus chacras y su tiempo incondicionalmente.

A Sergio Ziaurriz, Valeria Pedreschi, Edgardo Fernández y Silvana Quizama por toda su ayuda en los ensayos a campo y los reconfortantes mates compartidos.

A los colegas del Alto Valle Este que colaboraron en la etapa de búsqueda y acompañamiento de plantaciones comerciales.

A Diana Vera por su paciencia, contención y colaboración en este proceso.

Al grupo de Poscosecha de la EEA Alto Valle por facilitar el uso de las instalaciones y del equipamiento, y por la ayuda brindada.

A Mariela Curetti, Cristina Sosa, Fernanda Menni, Cecilia Gittins, Patricia Bucki, Andrea Rodríguez, Rosa Holzmann, Teófilo Gomila, Ana Paula Candan y Ángel Muñoz por su colaboración y aportes.

## RESUMEN

La podredumbre de cuello causada por *Phytophthora* spp. es una de las enfermedades económicamente más significativas del cultivo del peral cv. Williams a nivel mundial. En el Alto Valle Este de Río Negro es frecuente observar plantas con sintomatología compatible con esta podredumbre. La única especie identificada hasta el presente en el Alto Valle ha sido *Phytophthora cactorum*. Períodos repetidos de saturación del suelo son altamente favorables para el desarrollo y la dispersión de este microorganismo, lo cual es favorecido por el sistema de riego gravitacional utilizado. Los objetivos del presente trabajo fueron: establecer la responsabilidad de *Phytophthora* spp. en el decaimiento del peral, determinar las especies de este género presentes en la zona, establecer sus efectos sobre el crecimiento, los rendimientos y la calidad de los frutos y verificar su difusión a través del agua de riego. En las temporadas 2007/2008 y 2008/2009 se relevaron en el Alto Valle Este, veintinueve plantaciones comerciales de peral cv. Williams para seleccionar plantas con síntomas de decaimiento compatible con daños de *Phytophthora* spp. De estas plantas se tomaron muestras de tejido cortical a nivel del cuello de las cuales se realizaron aislamientos del patógeno en laboratorio. En dos de las plantaciones relevadas se identificaron cinco plantas asintomáticas y cinco con síntomas de podredumbre de cuello y, confirmada en ellas la presencia de *Phytophthora*, se determinaron las especies involucradas mediante su aislamiento e identificación morfológica y morfométrica. En estas plantas se midió el área seccional del tronco, se determinó la producción de frutos por árbol y la carga frutal. En dos momentos de cosecha se extrajeron al azar 20 frutos por planta en los cuales se determinó: tamaño, color de epidermis, presencia de defectos, firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez titulable y producción de etileno. En dos épocas durante el período de irrigación de estos cultivos se determinó la presencia de *Phytophthora* spp. en muestras de agua en cercanía a plantas afectadas por este patógeno. *P. cactorum* fue el único agente causal detectado produciendo podredumbre de cuello de peral cv. Williams en los árboles muestreados del Alto Valle Este; las plantas afectadas por la enfermedad presentaron menor rendimiento y una tendencia a poseer menor carga frutal y frutos más pequeños; se observó influencia negativa de la presencia de *P. cactorum* sobre la calidad de los frutos, determinada por distintos índices de madurez y parámetros de calidad; los frutos provenientes de plantas afectadas en general manifestaron una mayor incidencia de 'asoleamiento', de daños por heladas primaverales y menor acidez titulable; se confirmó la presencia y dispersión de propágulos de *Phytophthora* spp. en el agua de riego.

Palabras clave: Alto Valle Este del Río Negro; *Pyrus communis* L.; Williams; decaimiento de peral; podredumbre de cuello; *Phytophthora* spp.; crecimiento; productividad; calidad de fruto; índices de madurez; DAS-ELISA; riego gravitacional.

## **ABSTRACT**

Collar rot caused by *Phytophthora* spp. is one of the most significant worldwide economical diseases in pear cv. Bartlett. In the upper Río Negro East Valley is frequent to observe symptoms of collar rot in pear plants. The only identified species in this zone has been *Phytophthora cactorum*. Repeated periods of soil saturation are highly favorable to the development and dispersion of this organism which is favored by the gravity irrigation system utilized. The objectives of this work were: to establish the responsibility of *Phytophthora* spp. on pear decline, to determine species of the genus present in the area, to establish its effect on growth, yields and fruit quality and to verify its dissemination through irrigation water. In 2007/2008 and 2008/2009 seasons twenty nine commercial orchards of pear cv. Bartlett were observed in the upper Río Negro East Valley to select plants with symptoms of decay consistent with damage caused by *Phytophthora* spp. Cortical tissue samples were taken from the neck of these plants, in laboratory isolates of the pathogen were conducted. In two of the observed orchards five asymptomatic plants and five plants with symptoms of collar rot were identified and, once the presence of *P. cactorum* was confirmed, the involved species were determined through isolation and morphological and morphometrical identification. In these trees sectional area of the trunk was measured, and fruit production and fruit load per tree were determined. At two times of harvest 20 fruits per tree were randomly extracted, in these fruits: fruit size, skin color, presence of defects, flesh firmness, soluble solids, acidity and ethylene production was determined. At two moments during irrigation, the presence of *Phytophthora* spp. was determined in water samples in the proximity to the plants affected by this pathogen. *P. cactorum* was the only causal agent of collar rot of pear cv. Bartlett in the sampled trees from the upper Río Negro East valley; plants affected by this disease showed lower yield and a tendency to present lower fruit load and smaller fruits; there was a negative influence of the presence of *P. cactorum* over fruit quality determined by different indices of maturity and fruit quality parameters; the fruits from diseased plants showed a higher incidence of sunburn, spring frost damage and lower acidity; the presence and dispersal of propagules of *Phytophthora* spp. in the irrigation water was confirmed.

Key words: upper Río Negro East Valley; *Pyrus communis* L.; *Bartlett*, pear tree decline; collar rot; *Phytophthora* spp.; tree growth; productivity; fruit quality; maturity indices; DAS-ELISA; gravity irrigation.

## RIASSUNTO

Il marciume del colletto causato da *Phytophthora* spp. è una delle malattie che più colpisce economicamente a livello mondiale i frutteti di pero cv. Williams. Nell'Alto Valle Este di Río Negro, spesso si osservano piante con segni compatibili con questo marciume. L'unica specie identificata in questa zona è stata *Phytophthora cactorum*. I periodi ripetuti di saturazione idrica del suolo sono altamente favorevoli allo sviluppo e la diffusione di questo patogeno, che sono favoriti dal sistema d'irrigazione utilizzato. Gli obiettivi di questo studio sono stati: stabilire la responsabilità di *Phytophthora* spp. nella scadenza del pero, caratterizzare gli specie presenti in questa regione, stabilire l'influenza sulla crescita, sulla resa e sulla qualità dei frutti. Nelle stagioni 2007/2008 e 2008/2009 nell'Alto Valle Este si sono rilevate ventinove frutteti commerciali di pero cv. Williams per selezionare piante con sintomi di scadenza compatibili con danni di *Phytophthora* spp. I campioni di tessuti sono stati prelevati di queste piante a livello del colletto dei quali sono stati condotti in laboratorio di isolati del patogeno. In due dei pereti rilevati sono state identificate cinque piante senza sintomi e cinque con sintomi di marciume al livello del colletto e, confermata la presenza di *Phytophthora*, specie sono state determinate per mezzo dell'isolamento e dell'identificazione morfologica e morfometrica. In queste piante è stata studiata l'area sezionale del tronco, sono stati determinati la produzione di frutti dell'albero e il carico di frutta. In due momenti della raccolta si sono presi campioni casuali di 20 frutti per pianta per determinare: la dimensione, il colore dell'epidermide, la presenza di difetti, la fermezza della polpa, il contenuto di solidi solubili, l'acidità titolabile, e la produzione dell'etilene. In due momenti d'irrigazione si sono estratte mostre d'acqua in prossimità di piante colpite da *Phytophthora* spp. per determinare la presenza di questo patogeno. *P. cactorum* è stato l'unico agente causale di marciume del colletto del pero cv. Williams negli alberi dell'Alto Valle Este; le piante colpite dalla malattia producono una minore resa e queste tendevano ad avere minore carico di frutta e frutti più piccoli; Se c'è stato un influsso negativo della presenza di *P. cactorum* nella qualità dei frutti, determinata da vari indici di maturità e qualità; i frutti di piante malate hanno mostrato nella generalità una maggiore incidenza di 'scottatura', di danni per gelate primaverili e minore acidità. E stata confermata la presenza e la dispersione di propagoli di *Phytophthora* spp. nelle acque d'irrigazione.

Parole chiavi: Alto Valle Este del Río Negro; *Pyrus communis* L.; Williams; scadenza del pero; marciume del colletto; *Phytophthora* spp.; crescita; produttività; qualità di frutto; indici di maturità; DAS-ELISA; irrigazione per gravità.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	
<b>1. EL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO</b>	1
1.1. Características generales	1
1.2. Aspectos históricos y productivos de la actividad frutícola	2
<b>2. EL PERAL (<i>Pyrus communis</i> L.)</b>	3
2.1. Clasificación botánica y características morfológicas	3
2.2. Producción de peras y superficie cultivada	4
2.3. Comercialización de peras	4
2.4. Peral cultivar Williams	5
2.5. Enfermedades que afectan al cultivo	5
2.5.1. <i>Virosis</i>	5
2.5.2. <i>Bacteriosis</i>	6
2.5.3. <i>Micosis</i>	6
<b>3. LA SITUACIÓN DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO POR <i>P. CACTORUM</i> EN PERALES DEL ALTO VALLE ESTE</b>	8
<b><u>ANTECEDENTES</u></b>	
<b>1. DECAIMIENTO DEL PERAL</b>	10
<b>2. <i>PHYTOPHTHORA CACTORUM</i></b>	10
2.1. Antecedentes de <i>P. cactorum</i> en Argentina	10
2.2. Ubicación taxonómica de <i>P. cactorum</i>	11
2.3. Hospedantes	12
2.4. Características morfológicas y morfométricas	12
2.4.1. <i>Características de la colonia</i>	12
2.4.2. <i>Características miceliares</i>	13
2.4.3. <i>Estructuras asexuales</i>	13
2.4.4. <i>Estructuras sexuales</i>	14
2.4.5. <i>Estructuras de resistencia</i>	14
2.5. Sintomatología de la podredumbre de cuello del peral causada por <i>P. cactorum</i>	15
2.5.1. <i>Síntomas en la canopia</i>	15
2.5.2. <i>Síntomas en el tronco</i>	15
2.5.3. <i>Síntomas en los frutos</i>	16
2.6. Epidemiología de <i>P. cactorum</i> en perales	17
2.7. Ciclo de vida de <i>P. cactorum</i>	18
2.8. Ciclo de la enfermedad: Interacción <i>Phytophthora cactorum</i> - <i>Pyrus communis</i>	19
2.8.1. <i>Inoculación</i>	20

2.8.2. <i>Prepenetración y penetración</i>	20
2.8.3. <i>Infección</i>	21
2.8.4. <i>Diseminación</i>	23
2.8.5. <i>Supervivencia</i>	23
2.9. <i>Antecedentes sobre la diseminación de P. cactorum y detección de propágulos en el agua de riego</i>	24
2.9.1. <i>Técnica de ‘trampa’</i>	25
2.9.2. <i>Técnica de filtrado, agitación y siembra</i>	25
2.8.3. <i>Técnica de ELISA</i>	26
<b>HIPÓTESIS</b>	28
<b>OBJETIVOS</b>	29
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	
<b>1. INCIDENCIA DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. EN PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN EL ALTO VALLE ESTE</b>	30
1.1. Área de estudio	30
1.2. Selección de plantas con síntomas	
1.3. Modalidad de muestreo y procesamiento de las muestras	30
1.4. Aislamiento del agente causal	31
<b>2. RELACIÓN ENTRE PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO Y EL AISLAMIENTO DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. EN EL ALTO VALLE ESTE</b>	32
<b>3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS DE <i>PHYTOPHTHORA</i></b>	33
3.1. Identificación por morfología y morfometría	33
3.1.1. <i>Características de la colonia</i>	33
3.1.2. <i>Características miceliares</i>	33
3.1.3. <i>Estructuras asexuales</i>	33
3.1.4. <i>Estructuras sexuales</i>	33
3.1.5. <i>Estructuras de resistencia</i>	34
3.2. Análisis estadístico	34
<b>4. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR <i>P. CACTORUM</i> SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PERAL cv. WILLIAMS</b>	35
4.1. Área de estudio y material experimental	35
4.2. Análisis de las alteraciones inducidas en el crecimiento vegetativo y en la productividad	36
4.2.1. <i>Área seccional del tronco (AST)</i>	36
4.2.2. <i>Producción de frutos</i>	36
4.2.3. <i>Carga frutal</i>	36
4.2.4. <i>Rendimiento</i>	36

4.3. Análisis estadístico	36
<b>5. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR <i>P. CACTORUM</i> SOBRE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PERAL cv. WILLIAMS</b>	37
5.1. Modalidad de muestreo	37
5.2. Evaluación de los índices de calidad y de madurez	37
5.2.1. <i>Tamaño de frutos</i>	37
5.2.2. <i>Presencia de defectos en los frutos</i>	37
5.2.3. <i>Color de la epidermis de frutos</i>	38
5.2.4. <i>Firmeza de la pulpa</i>	38
5.2.5. <i>Contenido de sólidos solubles (CSS)</i>	38
5.2.6. <i>Acidez total titulable (ATT)</i>	39
5.2.7. <i>Producción de etileno</i>	39
5.3. Análisis estadístico	39
<b>6. DETECCIÓN DE PROPÁGULOS DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. EN EL AGUA DE RIEGO</b>	40
6.1. Recolección y caracterización de las muestras de agua de riego	40
6.2. Prueba serológica	43
6.2.1. <i>Tratamiento de las muestras de agua de riego</i>	43
6.2.2. <i>Ensayo de diluciones y detección de propágulos de <i>Phytophthora</i> spp.</i>	43
6.2.3. <i>Detección de propágulos en muestras de agua de riego</i>	44
6.3. Siembra en medio AHM	45
6.4. Técnica de frutos trampa	45
6.5. Análisis Estadístico	46
<b><u>RESULTADOS</u></b>	
<b>1. INCIDENCIA DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. EN PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN EL ALTO VALLE ESTE</b>	47
<b>2. RELACIÓN ENTRE PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO Y EL AISLAMIENTO DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. EN EL ALTO VALLE ESTE</b>	50
<b>3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS DE <i>PHYTOPHTHORA</i></b>	54
3.1. Identificación por morfología y morfometría	54
3.1.1. <i>Características de la colonia</i>	54
3.1.2. <i>Características miceliares</i>	54
3.1.3. <i>Estructuras asexuales</i>	54
3.1.4. <i>Estructuras sexuales</i>	54
3.1.5. <i>Estructuras de resistencia</i>	54
<b>4. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE</b>	57

<b>PERAL cv. WILLIAMS</b>	
4.1. Área de estudio y material experimental	57
4.2. Análisis de las alteraciones inducidas en el crecimiento vegetativo y en la productividad	59
4.2.1. Área seccional del tronco (AST)	59
4.2.2. Producción de frutos	60
4.2.3. Carga frutal	61
4.2.4. Rendimiento	61
<b>5. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR PHYTOPHTHORA SPP. SOBRE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PERAL cv. WILLIAMS</b>	<b>63</b>
5.1. Evaluación de los índices de calidad y de madurez	63
5.1.1. Tamaño de los frutos	63
5.1.1.1. Masa	63
5.1.1.2. Diámetro superior a 67 mm	64
5.1.2. Presencia de defectos en los frutos	65
5.1.3. Color de la epidermis de frutos	65
5.1.4. Firmeza de la pulpa	67
5.1.5. Contenido de sólidos solubles (CSS)	68
5.1.6. Acidez Total Titulable (ATT)	69
5.1.7. Producción de etileno	70
<b>6. DETECCIÓN DE PROPÁGULOS DE PHYTOPHTHORA SPP. EN EL AGUA DE RIEGO</b>	<b>73</b>
6.1. Recolección y caracterización de las muestras de agua de riego	73
6.2. Prueba serológica	73
6.2.1. Tratamiento de las muestras de agua de riego	73
6.2.2. Ensayo de diluciones y detección de propágulos de <i>Phytophthora spp.</i>	74
6.2.3. Detección de propágulos en muestras de agua de riego	76
6.3. Siembra en medio AHM	78
6.4. Técnica de frutos trampa	78
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>79</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>98</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>99</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla I: Plantaciones de peral cv. Williams con síntomas de decaimiento relevadas en el Alto Valle Este.</b> Ubicación y determinación de la presencia de <i>Phytophthora</i> spp. y de su incidencia.	49
<b>Tabla II: Síntomas observados en las plantaciones de peral cv. Williams relevadas en el Alto Valle Este durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b>	51
<b>Tabla III: Caracteres morfométricos de <i>Phytophthora</i> spp. observados en los aislados obtenidos en las diez parcelas en las que se detectó la presencia del microorganismo.</b> Los valores corresponden a la media $\pm$ el Rango expresados en $\mu\text{m}$ .	55
<b>Tabla IV: Grado de desarrollo de la podredumbre de cuello (cm) en las plantas enfermas relevadas en las plantaciones N°1 y N°2.</b> Grado de desarrollo medio de la podredumbre por parcela, tamaño poblacional de plantas sintomáticas, plantas enfermas y total de plantas por parcela. Temporada 2007/2008.	57
<b>Tabla V: Principales características de las parcelas de peral cv. Williams empleadas en el estudio.</b>	58
<b>Tabla VI: Grado de severidad de las cinco plantas enfermas seleccionadas en las plantaciones N°1 y N°2 para este estudio.</b> Grado de desarrollo de la podredumbre de cuello y a la cantidad de ramas con podredumbre y/o muertas.	59
<b>Tabla VII: Efecto de <i>Phytophthora cactorum</i> sobre el incremento medio del AST entre las temporadas 2007/2008 y 2008/2009 de perales cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2.</b>	60
<b>Tabla VIII: Efecto de <i>Phytophthora cactorum</i> sobre el crecimiento y la productividad de perales cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b>	62
<b>Tabla IX: Porcentaje de frutos 'asoleados' y de frutos con daños de heladas de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporada 2008/2009.</b>	65
<b>Tabla X: Firmeza (N) y masa de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b>	68
<b>Tabla XI: Producción máxima de etileno (pico climatérico) en <math>\text{nl/g/h}</math> y días transcurridos hasta el pico climatérico en frutos de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2 cosechadas en la segunda pasada de cosecha. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b>	72
<b>Tabla XII: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras del ensayo de diluciones.</b> Los valores representan la media $\pm$ desvío estándar de 2 repeticiones por dilución, por suspensión utilizada (micelio, esporangio) y por tratamiento (M, SM).	75

**Tabla XIII: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras de agua de riego.** Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 repeticiones por muestra de agua de riego, por parcela del primer ensayo de detección.

76

**Tabla XIV: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras de agua de riego.** Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 repeticiones por muestra de agua de riego, por parcela del segundo ensayo de detección.

77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Fig. 1: Imagen satelital (Google Earth) de la zona del Alto Valle Este de Río Negro, donde se encuentran indicadas las plantaciones comerciales de peral cv. Williams con síntomas compatibles con los causados por <i>Phytophthora</i> spp., relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b>	31
<b>Fig. 2: Esquema de la Plantación comercial N°1.</b> Ubicación de las plantas enfermas (PE); ubicación de las PE, PAE y PPE de las cuales se extrajeron las muestras de agua de riego y/o de suelo y la numeración utilizada; sentido de riego en la parcela; plantas correspondientes a otra cultivar, no considerada en este estudio. Estas muestras fueron tomadas en dos momentos: 13/12/2008 y 26/03/2009.	41
<b>Fig. 3: Esquema de la Plantación comercial N°2.</b> Ubicación de las plantas enfermas (PE); ubicación de las PE, PAE y PPE de las cuales se extrajeron las muestras de agua de riego y/o de suelo y la numeración utilizada; sentido de riego en la parcela. Estas muestras fueron tomadas en dos momentos: 16/12/2008 y 20/03/2009.	42
<b>Fig. 4: Imagen satelital (Google Earth) donde se indican las plantaciones comerciales de peral cv. Williams con síntomas compatibles con los causados por <i>Phytophthora</i> spp., relevadas en la zona del Alto Valle Este de Río Negro durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b> En color rojo se señalan aquellas plantaciones que dieron positivo a la presencia de <i>Phytophthora</i> spp.	47
<b>Fig. 5: Síntomas en la canopia de plantas sintomáticas observados en las plantaciones comerciales relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b> <b>A</b> enrojecimiento prematuro del follaje en otoño; <b>B</b> Debilitamiento de ramas principales; <b>C</b> y <b>D</b> muerte de ramas principales y árboles.	52
<b>Fig. 6: Síntomas en el tronco y ramas de plantas sintomáticas que dieron positivo a la presencia de <i>Phytophthora</i> spp. en las plantaciones comerciales de peral cv. Williams relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.</b> <b>A, B, C</b> podredumbre húmeda a nivel del cuello; <b>D</b> tejido en la zona de avance de la podredumbre de color uniforme (quitando la corteza); <b>E, F, G</b> tejido en la zona de avance de la podredumbre formando líneas o vetas concéntricas (patrón atigrado); <b>H, I</b> exudados marrón rojizos presentes sobre la podredumbre de cuello.	53
<b>Fig. 7: Características de las estructuras asexuales y sexuales observadas.</b> <b>A, B, C</b> esporangios caducos con pedicelo corto y papila prominente ( <b>Pa</b> ) de <i>P. cactorum</i> ; <b>A</b> esporangio solitario ovoide; <b>B</b> esporangio solitario limoniforme; <b>C</b> grupo de esporangios; <b>D</b> y <b>E</b> oogonios con anteridios paráginos (ubicados lateralmente al oogonio); <b>F</b> oospora aplerótica conformada por un ooplasto ( <b>OP</b> ), una pared interna ( <b>PI</b> ) y una pared externa ( <b>PE</b> ).	56
<b>Fig. 8: Masa de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A) y</b>	62

**Nº2 (B). Temporada 2007/2008.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas), por pasada de cosecha y por parcela.

**Fig. 9: Masa media de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones Nº1 (A) y Nº2 (B). Temporada 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e del total de frutos por árbol de 5 árboles por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas) y por parcela.

63

**Fig. 10: Porcentaje de frutos con diámetro mayor a 67 mm de peral cv. Williams en las plantaciones Nº1 (A) y Nº2 (B). Temporada 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e del total de frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas) por parcela.

63

**Fig. 11: Color de la epidermis (ángulo HUE) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones Nº1 (A y C) y Nº2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas), por pasada de cosecha y por parcela.

65

**Fig. 12: Contenido de sólidos solubles (%) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones Nº1 (A y C) y Nº2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas), por pasada de cosecha y por parcela.

68

**Fig. 13: Contenido de acidez total titulable (g/l) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones Nº1 (A y C) y Nº2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas), por pasada de cosecha y por parcela.

69

**Fig. 14: Relación entre la absorbancia y el pH (A) y la absorbancia y la CE ( $\mu$ mohs) (B) de muestras de agua recolectadas en los dos ensayos de riego. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.**

72

## 1. EL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO

### 1.1. Características generales

El Alto Valle de río Negro es la región constituida por los valles irrigados ubicados en el curso inferior del río Neuquén y en el curso superior del río Negro, con una extensión de 65 km junto al río Neuquén y 120 km aguas abajo de la confluencia de los ríos Limay y Neuquén junto al río Negro (Worcel, 2006; INTA, 2009). Estos valles están limitados hacia el norte y hacia el sur por barrancas de formación sedimentaria. Los valores de altitud van desde 200 a 400 metros sobre el nivel del mar. Las menores altitudes se registran hacia el este del valle (Rodríguez y Muñoz, 2006). El clima es de tipo continental, templado y árido (Cordon *et al.*, 2000).

La precipitación media anual de la región para el período 1990-2004 fue de 243,7 mm. Este régimen pluviométrico no es apto para la realización de cultivos de secano por lo cual se han desarrollado técnicas de sistematización, distribución y manejo del agua para riego (Rodríguez y Muñoz, 2006).

La temperatura media anual del aire es de 15°C. El mes más caluroso es enero con temperaturas medias de 23,6°C. En el mes de julio la temperatura media es de 6,6°C siendo éste el mes más frío (Rodríguez y Muñoz, 2006).

Entre las adversidades climáticas de la región se encuentran las heladas primaverales, el viento, la elevada radiación solar y el granizo. Las heladas primaverales son mucho menos frecuentes que las invernales y otoñales pero de mayor interés agronómico ya que los frutales de pepita y carozo son más susceptibles al daño por bajas temperaturas durante ese período. La frecuencia anual media de heladas es de 67,5 y los valores medios para los meses de septiembre y octubre son 6,3 y 1,3 heladas/año respectivamente (Rodríguez y Muñoz, 2006).

El viento es un factor climático de importancia en la zona, principalmente durante los meses de octubre a diciembre. Puede producir quebrado de ramas, heridas en los frutos y su caída; asimismo, limita los momentos de intervención de determinadas prácticas de manejo de los frutales de pepita y carozo principalmente sanitarias. Su intensidad obliga a la utilización de cortinas rompevientos, para la cual se utilizan tradicionalmente diferentes especies de álamos, o cortinas artificiales. Los

vientos predominantes de la región son de los cuadrantes oeste y sudoeste (Cordon *et al.*, 2000).

Los valores de radiación global aumentan desde el ecuador, registrándose los más altos entre los 28° y 40° de latitud sur. La región del Alto Valle, ubicada a 67° 40' de longitud oeste y 39° 01' de latitud sur, se caracteriza por tener altos valores de radiación global y de insolación (Rodríguez, 2004; Rodríguez y Muñoz, 2006). El promedio de días con cielo claro es de 113,5 días/año, siendo enero (13,1 días) y febrero (13,7 días) los meses con mayor cantidad de días claros, mientras que junio presenta el número menor (6,1 días) (Cordon *et al.*, 2000).

El granizo es otra adversidad climática, que afecta el área con frecuencia e intensidad variable entre temporadas (INTA, 2009).

Los suelos de la región son típicos de desierto. Se caracterizan por su baja meteorización y son clasificados en suelos de barda, suelos de media barda, suelos de media costa y suelos de costa. Son de origen coluvial, de texturas no muy pesadas, entre arenosos y franco limoso, escasos en materia orgánica (menos del 1%), con velocidad de infiltración media a alta y con perfil profundo, sin gran desarrollo edáfico (Bestvater y Casamiquela, 1983; INTA, 2009).

## **1.2. Aspectos históricos y productivos de la actividad frutícola**

En 1884 un grupo de colonos franceses, aborígenes, presidiarios, peones y militares construyeron el primer canal de riego del Alto Valle, denominado "canal de los milicos", que fue la base de la producción agrícola que se iniciaría en esa época y se consolidaría con la llegada del ferrocarril en 1899 (Worcel, 2006).

El comienzo de la construcción del Dique Ballester en 1910 permitió asegurar el riego y los nuevos colonos se asentaron en la región como propietarios de pequeñas parcelas de tierra de entre 1 y 20 hectáreas. El principal cultivo realizado en estas parcelas era alfalfa, combinada con cultivos anuales como cereales y leguminosas. A mediados de la década del veinte comenzaron a producirse cambios significativos en la plantación de cultivos a favor de los perales y manzanos. Hacia 1930 se instalaron las primeras plantas procesadoras de fruta, favoreciendo al desarrollo agroindustrial en la región del Alto Valle y consolidando su poblamiento.

Dicha región se caracteriza por la presencia de parcelas productivas llamadas 'chacras' (Worcel, 2006).

En la actualidad el área bajo riego, en el Alto Valle, comprende unas 67.500 ha, de las cuales 37.500 ha se encuentran cultivadas. Los cultivos predominantes son los frutales de pepita con 16.000 ha ocupadas con manzanos y 15.000 ha con perales, seguidos por el cultivo de forrajeras (2.200 ha) y de frutales de carozo (1.900 ha) (Preiss *et al.*, 2007<sup>a</sup>).

La región del Alto Valle está conformada por 14 localidades. Al oeste de la misma se ubican Campo Grande, Cordero, Cinco Saltos, Cipolletti y Fernández Oro, siendo Cipolletti la ciudad donde se concentra la mayor actividad productiva y demás actividades vinculadas. En la zona centro del Alto Valle se ubican las localidades de Clte. Guerrico, Allen, Cervantes, Mainqué, Ing. Huergo y General Roca, ésta como centro productivo de dichas localidades. Hacia el este de la región del Alto Valle se encuentran las localidades de Gral. E. Godoy, Chichinales y Villa Regina, siendo esta última el epicentro agroindustrial de la producción frutícola de dicha región.

La región del Alto Valle Este concentra casi el 25 % de la superficie bajo riego del Alto Valle y los principales cultivos son el manzano y el peral con 4.000 y 3.600 ha plantadas respectivamente, que equivalen aproximadamente al 90% del área destinada a la actividad agropecuaria. Le sigue en importancia el cultivo de frutales de carozo con 500 ha. 'Williams' es la cultivar de pera que ocupa la mayor superficie plantada en el Alto Valle Este (Preiss *et al.*, 2007<sup>a, b, c, d y e</sup>). Existen en esta zona 500 productores de los cuales el 60% posee chacras con superficies menores a 15 has (Preiss *et al.*, 2007<sup>c, d y e</sup>).

## **2. EL PERAL (*Pyrus communis* L.)**

### **2.1. Clasificación botánica y características morfológicas**

El peral común o peral europeo (*Pyrus communis* L.) proviene de Asia Central y Asia Menor y sus ancestros serían *P. caucasica* Fed. y *P. novalis* Jacq (Jeffers y Wilcox, 1990; Jackson, 2003).

*P. communis* se encuentra clasificado en la Subdivisión Angiosperma; Clase Dicotiledónea; Subclase *Rosidae*; Orden Rosales; familia *Rosaceae*; Subfamilia

*Maloideae* y Género *Pyrus* (Giayetto y Villarreal, 2010). El árbol del peral europeo es piramidal, puede alcanzar los 20 metros de altura y tiene una vida media de 65 años. Las flores blancas o blanco rosadas forman corimbos umbeliformes en la terminación de las ramillas en grupos de 3 a 7 y son hipóginas porque poseen ovario ínfero, el cual da origen a un pomo como fruto. La piel de dicho fruto es más o menos lisa, de color verde, que se torna parda o amarillenta al madurar. La pulpa de la pera es dura, ácida al comienzo, blanda y dulce a la madurez (Jeffers y Wilcox, 1990; Giayetto y Villarreal, 2010).

## **2.2. Producción de peras y superficie cultivada**

Argentina es el primer país productor y exportador de peras del Hemisferio Sur. Asimismo, el volumen exportado de peras se encuentra en el primer lugar entre las exportaciones argentinas de frutas (SAGPyA, 2005) con una producción que supera las 800.000 toneladas (Zubeldía, 2007). El 80% del volumen total nacional de pera es producido en las provincias de Río Negro y Neuquén (Zubeldía, 2007, FunBaPa, 2008), siendo el Alto Valle de Río Negro el que concentra el 84% de la superficie cultivada con 15000 hectáreas netas de pera (Avellá y Viñuela, 2009; Preiss *et al.*, 2007<sup>b</sup>). La cultivar Williams ocupa el 46% de esta superficie, destacándose entre las demás peras debido a su gran aceptación internacional (Avellá y Viñuela, 2009; Bruzone, 2009).

## **2.3. Comercialización de peras**

Argentina se ha consolidado como principal exportador en contra-estación de peras, siendo los mercados de Estados Unidos y Europa los principales destinos (Preiss y Díaz, 2003; Segovia, 2003). Más del 95% de las exportaciones nacionales de pera provienen de la región del Alto Valle de Río Negro (Preiss y Díaz, 2003). La producción de pera se destina fundamentalmente al mercado en fresco, con un volumen en 2008 del 74% respecto del total producido. El 61% es para exportación, el 13% tiene como destino el mercado interno y el 26% restante se envía a la industria (FunBaPa, 2008). 'Williams' es la principal cultivar comercializada en los mercados externos y nacional, alcanzando el 40% y el 55% respectivamente del total de peras (SAGPyA, 2005; FunBaPa, 2008).

El principal comprador de peras es el mercado Europeo, quien en 2008 absorbió el 63% de las ventas nacionales, siendo Rusia e Italia los principales

demandantes. Brasil ocupa el tercer lugar con el 23% del total de pera egresada de nuestro país (Preiss y Díaz, 2003; SEFRN, 2007; FunBaPa, 2008; Bruzone, 2009).

#### **2.4. Peral cultivar Williams**

'Williams', también conocida como 'Williams Bon Chrétien' o 'Bartlett', se ha convertido en la cultivar de pera con mayor demanda en el mercado en fresco a nivel mundial, debido a sus cualidades organolépticas (Avellá y Viñuela, 2009; Jackson, 2003).

Esta cultivar tiene su origen en Inglaterra en el año 1799 y habría sido introducida en Argentina en 1817. El peral cv. Williams encuentra en la región del Alto Valle condiciones óptimas para su desarrollo, donde florece a fines de septiembre o principios de octubre, con una fecha media del 26 de septiembre según registros históricos de los últimos 35 años (Benítez *et al.*, 1998; Benítez, 2001). El fruto de esta cultivar es piriforme, de tamaño medio a grande, de 230 a 235 g, 105 mm de altura y 65 mm de calibre (Benítez, 2001; Red Agraria, 2009). Las condiciones para el inicio de cosecha de esta pera en el Alto Valle se producen alrededor del 10 de enero, con frutos de 106 días de edad media; valores mínimos de calibre de 64 a 65 mm; valores de firmeza inferiores a 88,9 a 93,3 Newton (20-21 libras); valores de sólidos solubles superiores al 10%; valores de acidez titulable de 3-4 g/L y valores de degradación de almidón de 20 a 25% (Benítez, 2001; Red Agraria, 2009).

#### **2.5. Enfermedades que afectan al cultivo**

A continuación se citan las enfermedades que presentan mayor incidencia sobre el cultivo del peral en el Alto Valle de Río Negro:

##### **2.5.1. Virosis**

*Apple Stem Pitting Virus* (ASPV) es responsable de dos enfermedades existentes en la región: *Pear Stony Pit* y *Pear Vein Yellow*s. *Pear Stony Pit* es de gran importancia económica ya que la fruta pierde su calidad estética afectando su comercialización (Cichón *et al.*, 1996; Rossini, 2007). Se han observado estas afecciones en el Alto Valle de Río Negro en algunas temporadas sobre frutos de plantas adultas, principalmente de 'Packham's Triumph' (Registros del laboratorio de Fitopatología, EEA Alto Valle – INTA). *Pear Vein Yellow*s es una enfermedad

potencialmente peligrosa ya que ante una combinación cultivar/portainjerto de elevada sensibilidad podría causar importantes pérdidas económicas (Rossini y Pérez, 2009). En el Alto Valle de Río Negro se lo aisló de hojas sintomáticas de peral cv. Williams (Rossini, 2007; Rossini *et al.*, 2010).

### **2.5.2. Bacteriosis**

Entre las bacteriosis de importancia en la región se encuentra la agalla de corona producida por *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith y Townsend) Conn. Esta bacteria induce la formación de tumores globosos en el cuello y raíces de las plantas afectadas, produciendo daños considerables en plantas jóvenes y debilitando las plantas adultas, las cuales quedan expuestas al ataque de otros patógenos. *A. tumefaciens* ha sido aislada en varias oportunidades en la región del Alto Valle de Río Negro (Rossini y Pérez, 2009).

Otra enfermedad presente es el tizón de las flores causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall. Si durante la primavera se producen lluvias o elevada humedad relativa y bajas temperaturas esta bacteria produce muerte de hojas, flores, frutos y, en ataques severos, también afecta dardos (Cichón *et al.*, 1996; Rossini y Pérez, 2009). En el Alto Valle se la ha observado, hasta el momento, sólo en la cv. Packham's Triumph (Cichón *et al.*, 1996).

### **2.5.3. Micosis**

La sarna del peral (*Venturia pyrina* Aderhold) produce manchas pardas circulares que luego toman color verde-oliváceo-grisáceo y aspecto aterciopelado y que finalmente necrosan el tejido. Estas manchas pueden aparecer en hojas, ramitas, flores y frutos (Agrios, 1996; Cichón *et al.*, 1996). En el Alto Valle de Río Negro, la precipitación media anual y la baja humedad relativa del aire determinan que sea una zona con baja incidencia de sarna del peral, a diferencia de las demás regiones productoras de frutales de pepita (Rossini, 2007).

El oídio del manzano y del peral (*Podosphaera leucotricha* (Ell. y Ev.) Salmon) afecta a los órganos aéreos jóvenes de la parte aérea del árbol, los que son cubiertos por manchas pulverulentas de color blanco, deteniendo su crecimiento en las zonas afectadas. En peral los síntomas se manifiestan en los frutos y raramente en los órganos vegetales de la planta (Fernández Valiela, 1978; Cichón *et al.*, 1996; Rossini,

2001). Los manzanos y perales de la zona del Alto Valle de Río Negro son particularmente afectados debido a la escasez de precipitaciones (Rossini, 2001).

La podredumbre de cuello, corona y/o raíces causada por *Phytophthora* spp. en pomáceas es una de las enfermedades más importantes y está ampliamente distribuida en el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996; Bush, 2002; Bhat *et al.*, 2006). Esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas y generalmente provoca la muerte de los árboles afectados (Harris, 1991; Guzmán Lyon, 2003; Causin *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2006).

### 3. LA SITUACIÓN DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO POR *P. CACTORUM* EN PERALES DEL ALTO VALLE ESTE

En el Alto Valle Este es frecuente observar síntomas de podredumbres de cuello en plantas de perales. Si bien existen en otras zonas productivas del mundo registros de ataques de diversas especies de *Phytophthora* en montes de peral, en la región del Alto Valle sólo se ha identificado *P. cactorum*. Asimismo sólo existe en la región un trabajo de relevamiento realizado por Rossini *et al.* (1997) en manzanos y perales y este estudio se llevó a cabo hace 13 años, no existiendo actualizaciones del mismo. Por tal motivo es menester generar información local que ratifique o rectifique a *P. cactorum* como única especie presente en perales cv. Williams.

Los síntomas producidos por *P. cactorum* en la canopia podrían confundirse con alteraciones provocadas por otras enfermedades o por factores abióticos. Si bien las manchas oleosas en el tronco y las líneas concéntricas formadas en el tejido floemático son síntomas propios de *P. cactorum*, su detección requiere un mínimo entrenamiento necesario para evitar diagnósticos erróneos.

El avance de esta enfermedad implica un debilitamiento progresivo de la planta afectada y una reducción en los kilos de frutos obtenidos, culminando en la muerte del árbol; situación que trae aparejada una disminución progresiva de la rentabilidad debido a la reducción en los rendimientos. Asimismo el reemplazo de un ejemplar en plena producción conlleva años ya que se trata de plantas leñosas y plurianuales. Sin embargo, no hay estudios en la región o en el país que cuantifiquen la reducción del crecimiento y del rendimiento en perales afectados.

El estado fisiológico de la fruta al momento de la cosecha es el principal factor condicionante de la 'vida' de dichos frutos durante la poscosecha y por ende de su comercialización. Este estado es cuantificado a través de índices de calidad tales como tamaño de fruto, firmeza, color, contenido de sólidos solubles y acidez titulable que son usados en la región como procedimiento estándar para determinar la fecha óptima de cosecha; de esta manera se garantiza el mantenimiento de los parámetros de calidad del fruto durante la conservación. Asimismo, es frecuente iniciar la cosecha de la pera cv. Williams con tamaños inferiores a los 67 mm debido a razones climáticas (bajas temperaturas) que no favorecen el crecimiento normal del fruto; y a cuestiones varietales (período de crecimiento del fruto de apenas 100 días). Los calibres resultantes no alcanzan a cubrir las expectativas de los mercados

compradores y esto repercute directamente en los precios obtenidos en la venta. Si bien la podredumbre de cuello causada por *P. cactorum* afectaría la calidad de frutos de esta cultivar, no existen antecedentes que evalúen esta situación al momento de la cosecha comercial.

La pera es un fruto climatérico y la mayor parte de los procesos de maduración es regulada por la producción autocatalítica de etileno. Para mantener la calidad de los frutos durante la conservación, los frutos deben cosecharse en óptimas condiciones sanitarias. Ya que hay antecedentes que mencionan que el nivel de etileno en el fruto puede incrementarse como respuesta a la presencia de patógenos, y que este 'etileno por estrés' aceleraría la maduración y causaría pérdida de calidad del fruto durante la conservación.

Períodos repetidos de saturación del suelo son altamente favorables al desarrollo de *Phytophthora* spp. en frutales de pepita. Además, el anegamiento puede aumentar la severidad de la enfermedad debido a una disminución en la resistencia del hospedante a la colonización por *Phytophthora* spp. y a un incremento en la liberación y dispersión de zoosporas y en la cantidad de inóculo formado.

El agua utilizada para irrigar frutales de pepita es un medio óptimo para la diseminación de los propágulos de *Phytophthora* spp. El factor anegamiento adquiere particular importancia en la región del Alto Valle ya que el principal método de riego utilizado es el gravitacional. Se aplican grandes volúmenes de agua registrándose láminas de riego hasta tres veces superiores a las que debieran aplicarse sometiendo al suelo a períodos de anoxia; a esto se suma en muchos casos el uso ineficiente del agua de riego y la existencia de deficiencias en el sistema de drenaje. Si bien hay reportes en otros lugares del mundo en los que se ha detectado la presencia y dispersión de *Phytophthora* spp. desde plantas afectadas hacia plantas sanas a través del agua de riego, no se cuenta con información en el país que pueda constatar este hecho.

## 1. DECAIMIENTO DEL PERAL

La presencia de síntomas de decaimiento en la parte aérea de perales y otros frutales de hoja caduca podría deberse a diferentes alteraciones que estarían afectando el sistema vascular del árbol (Rossini y Di Masi, 1996). Dichas alteraciones podrían ser provocadas por factores abióticos tales como daño por frío (Utkhede, 1986; Jeffers y Wilcox, 1990) o asfixia radical (Jeffers y Wilcox, 1990; Rossini y Di Masi, 1996; Rossini *et al.*, 1997; Guzmán Lyon, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). Asimismo, esta sintomatología podría ser causada por deficiencias nutricionales (Harris, 1991; Tomlinson *et al.*, 2005) y por otras enfermedades (Lindquist, 1938; Bielenin y Jones, 1988; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Tomlinson *et al.*, 2005). Entre los problemas sanitarios causales de la sintomatología asociada al decaimiento del peral, se atribuye especial responsabilidad a las podredumbres provocadas por ataques de *Phytophthora* spp. (Erwin y Ribeiro, 1996).

## 2. PHYTOPHTHORA CACTORUM

*P. cactorum* (Lebert and Cohn) Schröter fue determinada como el principal agente causal de la podredumbre de cuello del peral en el mundo (Bolay, 1992; Villegas, 1998; Elena y Paplomatas, 1999) si bien existen antecedentes de *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* y *P. syringae* produciendo una sintomatología similar en este cultivo (Cameron, 1962; Waterhouse y Waterston, 1964<sup>a</sup> y<sup>b</sup>; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Elena y Paplomatas, 1999).

### 2.1. Antecedentes de *P. cactorum* en Argentina

Lindquist (1938) aisló por primera vez *P. cactorum* de troncos y raíces de manzanos en La Plata (Argentina). En 1942 se describió la enfermedad causada por este microorganismo en plantaciones de manzano en Córdoba (Frezzi, 1950). En 1981, Feldman y Gracia aislaron este patógeno de plantaciones de peral cv. Williams en Mendoza. Asimismo, Alcoba *et al.* (2005) lograron aislarlo de perales en la provincia de Jujuy.

En la región del Alto Valle de Río Negro *P. cactorum* fue aislado por primera vez por Frezzi (1945) de plantaciones de manzano con podredumbre de tronco y raíces y en 1946 de plantas adultas de peral con podredumbre de cuello y gomosis del tronco en Cipolletti. Bergna y Sarasola describieron en 1960 los síntomas de esta

enfermedad en manzanos 'Red Delicious' y 'Golden Delicious' (Enriquez, 1978). Bergna (1982) aisló *P. cactorum* en plantaciones comerciales de peral cvs. Williams, Packham's Triumph, Red Bartlett y Clapp' Favorite en la misma región.

La única especie aislada tanto en perales como en manzanos en Argentina es *P. cactorum* (Lindquist, 1938; Frezzi, 1950; Feldman y Gracia, 1981; Bergna, 1982; Rossini *et al.*, 1997; Alcoba *et al.*, 2005).

## 2.2. Ubicación taxonómica de *P. cactorum*

*P. cactorum* pertenece al género *Phytophthora*, el cual comprende aproximadamente 60 especies y todas son parásitas de plantas que difieren en sus características reproductivas e infectivas (Erwin y Ribeiro, 1996; Agustí Alcals, 2007). Frezzi (1950) describió para la Argentina once especies aisladas de 78 hospedantes distintos de diversas procedencias. El nombre del género *Phytophthora* deriva del griego y significa *phyto*: planta y *phthora*: destructor o 'destructor de plantas'. Este género fue creado por Anton de Bary en 1876 con *P. infestans* como la especie tipo (Fernández Valiela, 1979; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los géneros *Phytophthora* y *Pythium* comprenden a los patógenos de plantas más destructivos y que están ampliamente distribuidos en el mundo (Smith *et al.*, 1992; Flores, 2007). A los integrantes de ambos géneros se los denomina 'water molds' debido a que -por su capacidad de formar zoosporas flageladas- son ecológicamente favorecidos por la presencia de agua libre tanto en el suelo como en el follaje (Ristaino y Gumpertz, 2000; Flores, 2007). *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. están estrechamente relacionados, siendo la zoosporogénesis el factor más importante que los diferencia (Smith *et al.*, 1992; Bush, 2002; Flores, 2007). Ambos géneros se encuentran ubicados dentro de la Familia *Pythiaceae*, la cual reúne aquellos parásitos facultativos cuyos esporangios se forman en hifas somáticas o en esporangióforos de crecimiento indeterminado (Agrios, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996; Dick, 2001). El orden *Peronosporales*, el cual contiene a la Familia *Pythiaceae*, está integrado por hongos con micelio bien desarrollado, con esporangios libres formados en las puntas de las hifas y con capacidad de producir oosporas (Agrios, 1996). Este orden pertenece a la Clase *Oomycetes* cuyo carácter morfológico sistemático son las hifas mayormente no septadas y zoosporas biflageladas formadas en zoosporangios (Agrios, 1996).

Los *Oomycetes* son organismos miceliares que tradicionalmente han estado ubicados dentro del Reino *Myceteae* o *Fungi* debido a su hábito de crecimiento filamentoso (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kamoun, 2003). Posteriormente algunos autores los han ubicado en el reino Chromista, conformado por organismos con mitocondrias de crestas tubulares y/o con células cuyos flagelos presentan pequeños pelos adosados llamados mastigonemas (Erwin y Ribeiro, 1996; Dick, 2001). Nuevas investigaciones sugieren que los *Oomycetes* están filogenéticamente más relacionados con los organismos superiores como las algas marrones y diatomeas que con los hongos verdaderos (Bush, 2002; Agustí Alcals, 2007). Por este motivo han pasado a formar parte del Reino *Straminipila* representando una línea evolutiva alejada de los hongos verdaderos del Reino *Myceteae*. Los *Oomyetes* pertenecientes a este nuevo Reino se caracterizan por producir esporas asexuales móviles con dos flagelos morfológicamente diferentes, siempre con uno de ellos recubierto de dos hileras laterales de mastigonemas (Dick, 2001).

### 2.3. Hospedantes

Diferentes especies de *Phytophthora* causan importantes enfermedades en cultivos agrícolas y ecosistemas naturales (Cooke *et al.*, 2000; Bush, 2002; Kamoun, 2003). Su grado de especialización es variable; mientras que algunas especies están asociadas a un solo hospedante, la mayoría ejerce su parasitismo sobre un amplio abanico de plantas (Tello, 1985; Erwin y Ribeiro, 1996).

*P. cactorum* parasita a un número considerable de plantas, por ello es que De Bary la designó originalmente con el nombre *P. omnivora* (Frezzi, 1950). Es patógena en más de 200 especies (entre ellas malezas) de 150 géneros distribuidos en 60 familias botánicas (Erwin y Ribeiro, 1996; Agustí Alcals, 2007), pero los mayores daños los provoca en la familia *Rosaceae*, más precisamente en los géneros *Malus* y *Pyrus* (Fernández Valiela, 1979; Smith *et al.*, 1992).

### 2.4. Características morfológicas y morfométricas

**2.4.1. Características de la colonia:** Las colonias en Agar Harina de Maíz (AHM) a 20°C y en Agar Papa Glucosado (APG) al 1% a 20-22°C y pH de 6,7 a 7 son difusas y finamente radiadas (Frezzi, 1950; Harris y Bielenin, 1986; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset *et al.*, 2002). Las mismas poseen bordes no definidos, con hifas aéreas cortas y poco densas. Si bien Waterhouse (1970) sugiere que el comportamiento de la

colonia y la ramificación de las hifas deben ser examinados, estos parámetros no han sido útiles para la identificación a nivel de especie por su elevada variabilidad (Erwin y Ribeiro, 1996).

La temperatura mínima de crecimiento de *P. cactorum* es 2°C, el óptimo 25°C y el máximo 31°C (Erwin y Ribeiro, 1996). No desarrolla a 35°C en APG al 1% ni en AHM (Frezzi, 1950).

**2.4.2. Características miceliales:** El micelio de todas las especies de *Phytophthora* es continuo (cenocítico) aunque pueden aparecer tabiques en hifas viejas o poco activas producidos por cambios en la concentración del citoplasma (Tello, 1985; Erwin y Ribeiro, 1996). El micelio de *P. cactorum* está constituido por hifas poco ramificadas (Harris y Bielenin, 1986), con ramificaciones en ángulos entre 65° y 70° (Erwin y Ribeiro, 1996). Algunos autores lo describen como micelio verrucoso o toruloso debido a la forma irregular que presentan las hifas (Tuset *et al.*, 2002) aunque Frezzi (1950) lo cita como micelio no toruloso. El ancho de las hifas es inferior a 6 µm con protuberancias hifales (swellings) ausentes o esporádicas (Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Harris, 1991).

**2.4.3. Estructuras asexuales:** Los esporangios o zoosporangios de *P. cactorum* son caducos y con disposición terminal u ocasionalmente lateral (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1970; Erwin y Ribeiro, 1996). Poseen un ápice papilado con engrosamiento hemiesférico de 3,5 µm y un pedicelo corto menor a 5 µm de largo (Ho, 1981; Stamps *et al.*, 1990), si bien Frezzi (1950) reporta un largo de 2 a 8,5 µm. La forma de los esporangios es frecuentemente elipsoide a ovoide, obpiriforme a esférica o limoniforme (Frezzi, 1950; Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Tuset *et al.*, 2002). Los esporangióforos son delgados (0,5-1 µm) con un suave engrosamiento en la base de algunas ramificaciones (Waterhouse y Waterstone, 1966; Waterhouse, 1970). Éstos son simpodiales, generalmente simples o con escasas ramificaciones (Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996). Los esporangios son producidos en abundancia y a los pocos días tanto en medios sólidos como en agua (Frezzi, 1950; Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Stamps *et al.*, 1990). Cada esporangio forma más de 50 zoosporas de 8 a 12 µm de ancho por 10,5 a 17 µm de largo (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1970). La longitud de los esporangios según Waterhouse y Waterstone (1966) es de 36 a 50 µm (55 µm máx.) y el ancho de 28 a 35 µm (40 µm máx.). En Argentina, Frezzi (1950) informa rangos más amplios, siendo el largo de 21 a 54 µm y el ancho de 17 a 46 µm. La

relación entre el largo y el ancho de cada esporangio es menor a 1,6 (Frezzi, 1950; Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Stamps *et al.*, 1990).

**2.4.4. Estructuras sexuales:** Los oogonios poseen un diámetro menor a 40  $\mu\text{m}$  (Ho, 1981), generalmente entre 19 y 38  $\mu\text{m}$ , son esféricos o angostados en la base en forma de embudo con una pared delgada hialina o levemente amarilla (Frezzi, 1950; Waterhouse y Waterstone, 1966; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los anteridios son casi siempre paráginos, es decir, ubicados lateralmente al oogonio cercanos a la inserción del pie, y ocasionalmente anfíginos, rodeando la base del oogonio (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1963; Ho, 1981; Tello, 1985; Stamps *et al.*, 1990). Su forma es casi esférica de menos de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981). Según Frezzi (1950) son predominantemente alargados de 8,5 a 21  $\mu\text{m}$  de ancho y 12 a 21  $\mu\text{m}$  de largo.

La reproducción sexual ocurre cuando un oogonio es fertilizado por un anteridio, formando una oospora de pared engrosada. La reproducción es homotática (autofértil), produciéndose sin la interacción de dos talos diferentes (Erwin y Ribeiro, 1996). Las oosporas son apleróticas según Waterhouse y Waterstone (1966), Stamps *et al.* (1990) y Erwin y Ribeiro (1996), es decir que no llenan toda la cavidad oogonial, aunque hay reportes que las definen como pleróticas (Lindquist, 1938; Frezzi, 1950). Su forma es esférica, color amarillo paja y poseen una pared gruesa de 2  $\mu\text{m}$  de espesor, aunque éste es relativo al diámetro (Frezzi, 1950; Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996). Su diámetro medio oscila entre 20 y 26  $\mu\text{m}$  según Waterhouse y Waterstone (1966); Frezzi (1950) hace mención a un rango de 20 a 29,5  $\mu\text{m}$ , similar al registrado por Stamps *et al.* (1990) (20 a 30  $\mu\text{m}$ ).

Los órganos sexuales son formados fácilmente en medios sólidos y en agua (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1963; Ho, 1981; Stamps *et al.*, 1990) propiedad que comparte con las demás especies homotáticas (Zentmyer y Erwin, 1970).

**2.4.5. Estructuras de resistencia:** Las clamidosporas son otro tipo de propágulo asexual. Su producción es variable pudiendo no estar presentes en algunos aislados (Harris, 1991; Tuset *et al.*, 2002), si bien Frezzi (1950) las observó con frecuencia y en abundancia. Son predominantemente intercalares (Ho, 1981; Tuset *et al.*, 2002) aunque Frezzi (1950) las describe como principalmente terminales. Son globosas, hialinas o amarillentas, con tonos más o menos oscuros y no se separan

naturalmente de la hifa (Frezzi, 1950). Su diámetro va de 25 a 45  $\mu\text{m}$ , con un mínimo de 19  $\mu\text{m}$ , un máximo de 55  $\mu\text{m}$  y una pared de 1-1,5  $\mu\text{m}$  de grosor (Frezzi, 1950; Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981).

## **2.5. Sintomatología de la podredumbre de cuello en frutales de pepita causada por *P. cactorum***

### **2.5.1. Síntomas en la canopia**

Las plantas afectadas poseen escaso desarrollo, el follaje es poco denso y con una clorosis que comienza a evidenciarse en primavera produciendo coloración rojiza a violácea en otoño prematuramente. A medida que avanza la enfermedad se van secando las ramas principales, pudiendo quedar adherido el follaje. Las plantas sintomáticas decaen progresivamente a lo largo de las temporadas y eventualmente mueren (Fernández Valiela, 1979; Bergna, 1983; Harris, 1991; Agrios, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996; Rossini *et al.*, 1997; Guzmán Lyon, 2003). Con menor frecuencia colapsan y mueren repentinamente, lo cual estaría relacionado con otoños o primaveras excesivamente húmedos (McIntosh, 1960; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996).

### **2.5.2. Síntomas en el tronco**

Los síntomas en la canopia son consecuencia de la podredumbre en tronco y/o raíces, característica de esta enfermedad (Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Rossini y Di Masi, 1996). La misma es descrita como una podredumbre húmeda -a excepción de Bergna (1983) que hace mención a una consistencia seca-, levemente hundida, que se extiende por el tronco en sentido ascendente y hacia las ramas principales. La zona de avance de la podredumbre suele ser acuosa, esponjosa y desarrolla olor alcohólico, si bien Fernández Valiela (1979) afirma que en peral es más difícil que en manzano percibir el olor a fermentado en los tejidos necrosados. Realizando un corte longitudinal sobre la peridermis del tronco puede observarse la formación de líneas concéntricas castaño-rojizas sobre el tejido floemático y el cámbium, ubicadas en el límite entre el tejido enfermo y el sano (Lindquist, 1938; Fernández Valiela, 1979; Bergna, 1983; Harris, 1991; Rossini y Di Masi, 1996).

Algunos autores mencionan la presencia de manchas húmedas y oleosas en la superficie de la madera afectada (Rossini *et al.*, 1992; 1997), aunque Lindquist (1938)

en su primer registro de *P. cactorum* en manzanos para Argentina comenta que no las observó y McIntosh (1959) tampoco observó en perales de British Columbia síntomas en superficie que indicaran que el tejido por debajo estaba enfermo. En zonas de tejido enfermo donde el patógeno está activo pueden aparecer exudados acuosos marrones que se observan sobre la corteza (Feldman y Gracia, 1981; Bergna, 1983; Harris, 1991; Smith *et al.*, 1992).

La mayoría de los autores coinciden en que *P. cactorum* produce sólo podredumbre de cuello en peral, la cual se desarrolla en la parte baja del tronco a nivel de la zona de injertación y se extiende hacia arriba pero no lo hace por debajo del punto de injerto (Frezzi, 1950; Ten Houten, 1958; Feldman y Gracia, 1981; Bolay, 1992; Rossini *et al.*, 1997; Elena y Paplomatas, 1999; Thomidis *et al.*, 2002). Sin embargo, Jeffers y Wilcox (1990) y Bergna (1982) mencionan que también podría producir podredumbre en raíces.

Es importante mencionar que la sintomatología producida por *P. cactorum* en la parte aérea puede ser confundida con alteraciones causadas por factores abióticos - tales como daño por frío y asfixia radical-, con deficiencias nutricionales y con otras enfermedades, (McIntosh, 1959; Utkhede, 1986; Bielenin y Jones, 1988; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Rossini y Di Masi, 1996; Rossini *et al.*, 1997; Guzmán Lyon, 2003; Sánchez *et al.*, 2005; Tomlinson *et al.*, 2005). A pesar de ello, las manchas oleosas en el tronco y las líneas concéntricas que avanzan por el floema son síntomas característicos de *P. cactorum* (Lindquist, 1938; Rossini y Di Masi, 1996).

### **2.5.3. Síntomas en los frutos**

Las plantas afectadas por *P. cactorum* presentan menor cantidad de frutos y de menor tamaño (McIntosh, 1960; Rossini y Di Masi, 1996). Lockhart y Newbery (1988) estimaron pérdidas en los rendimientos de manzanos enfermos de al menos el 0,5%.

En zonas con precipitaciones abundantes existen antecedentes de podredumbres en fruto por *P. cactorum* producidas por salpicaduras de las gotas de lluvia (Grove y Boal, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset *et al.*, 2002; Yamak *et al.*, 2002). Este tipo de sintomatología es la única asociada con la presencia de *P. cactorum* en frutos de manzanos y perales.

La presencia de *P. cactorum* afecta indirectamente a los frutos de plantas sintomáticas ya que quedan más expuestos a la radiación solar a causa de la menor cantidad de hojas y pueden sufrir quemaduras por sol con la consecuente pérdida de calidad (Erwin y Ribeiro, 1996). Asimismo, estas plantas presentan frutos más coloreados que a veces maduran anticipadamente (Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Agrios, 1996). Existen reportes que afirman que frutos de cv. Williams con mayor exposición a la radiación registran mayor tonalidad amarilla y mayor acidez (Kingston, 1992; Raffo *et al.*, 2008) y estas alteraciones en el estado fisiológico de los frutos a cosecha condicionan la vida poscosecha de los mismos (Gomila *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen trabajos que cuantifiquen la existencia de dichas alteraciones en frutos provenientes de plantas afectadas por *P. cactorum*. Una forma de cuantificar el estado fisiológico y detectar posibles modificaciones en la calidad y/o en el proceso de maduración de frutos es a través de la utilización de índices físicos y químicos tales como firmeza, color de la epidermis, sólidos solubles y acidez titulable (Calvo, 2008).

Los frutos de plantas sometidas a condiciones de estrés biótico o abiótico incrementan la producción de 'etileno por estrés' o 'etileno endógeno' (Adato y Gazit, 1974; Yu y Yang, 1980; Apelbaum y Yang, 1981; Lund *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1999). Existen registros del incremento en la producción de esta hormona en tejidos de coliflor (*Brassica oleracea var. acephala*) afectada por *Erwinia carotovora* (Lund y Mapson, 1970), en raíces de papa (*Solanum tuberosum*) afectadas por *Ceratocystis fimbriata* (Stahman *et al.*, 1966), en soja (*Glycine max* L. Merr.) afectada por *Phytophthora sojae* (Hoffman *et al.*, 1999), entre otros. Si bien no existen antecedentes del aumento en la producción de etileno en frutales de pepita afectados por *P. cactorum*, Yu y Yang (1980) afirman que el 'etileno por estrés' aceleraría la maduración y causaría pérdida de calidad del fruto durante el transporte y la conservación.

## **2.6. Epidemiología de *P. cactorum* en perales**

*P. cactorum* se considera un patógeno policíclico ya que, una vez producida la infección primaria, la cantidad de inóculo secundario (zoosporangios y zoosporas) puede aumentar en pocos días o semanas, de niveles bajos o incluso no detectables a niveles elevados. Este aumento tiene mayor impacto en la tasa de desarrollo de la enfermedad cuando las condiciones ambientales, principalmente la presencia de agua libre, son favorables (Duniway, 1983; Erwin y Ribeiro, 1996).

Muchas especies de *Phytophthora* son consideradas competidores saprofitos pobres (Jeffers y Wilcox, 1990), es por ello que los niveles de inóculo en suelo dependen principalmente de su producción en plantas enfermas (Mitchell y Kannwischer-Mitchell, 1983). Sin embargo *P. cactorum* puede colonizar frutos, pétalos y hojas caídos al suelo (Harris, 1991). Las pasturas y malezas ubicadas en el interfilas también son importantes fuentes de inóculo ya que pueden ser colonizadas por el hongo, el cual ataca posteriormente a los frutales (Harris 1991), lo que le confiere ventaja competitiva respecto a otras especies del género (Weste, 1983; Rossini y Di Masi, 1996).

Siguiendo el criterio de MacKenzie *et al.* (1983) en cuanto a la duración de las epidemias, y en comparación con aquellas producidas por otras especies del mismo género, *P. cactorum* produce una epidemia de larga duración. Si bien podría relacionarse la naturaleza perenne del cultivo hospedero con la duración de la epidemia, existen cultivos de dichas características atacados por especies de *Phytophthora* que producen epidemias de corta duración (semanas o meses) como la vaina negra en cacao producido por *P. palmivora* (MacKenzie *et al.*, 1983). La duración de la epidemia tiene implicancias en el manejo de la enfermedad ya que resulta más complejo con las de larga duración debido a la implicancia que tiene en los costos de control y en las pérdidas económicas (MacKenzie *et al.*, 1983).

### **2.7. Ciclo de vida de *P. cactorum***

*P. cactorum* posee un ciclo de vida que consta de dos fases reproductivas favorecidas por condiciones ambientales diferentes. La fase asexual se caracteriza por la producción de esporangios en presencia de agua la cual es óptima a 20°C de temperatura (Harris, 1991). La germinación de los esporangios puede ser directa, formando un tubo germinativo, o indirecta, a través de la producción de zoosporas (Ribeiro, 1983). La germinación indirecta se produce en ausencia de nutrientes, temperatura moderada (15 a 27°C) y elevado potencial agua. Si estas condiciones no se presentan, los esporangios germinan de forma directa formando un esporangio secundario capaz de producir zoosporas ante condiciones favorables (Duniway, 1983; Utkhede, 1986; Harris, 1991). La papila del esporangio se disuelve y las zoosporas son expulsadas por presión de turgor generada por altas concentraciones de prolina en el citoplasma del esporangio (Utkhede, 1986, Agustí Alcals, 2007). Las zoosporas nadan en busca de tejido hospedante por un tiempo variable que depende de la temperatura, la composición iónica del agua edáfica y la proximidad de los tejidos de la

planta (Harris, 1991). Una vez cerca del hospedante, las zoosporas enquistan sobre él y posteriormente germinan formando micelio que penetra los tejidos. El micelio formado produce nuevos esporangios a través de los cuales se repite varias veces la fase asexual durante la infección de la planta, y así el inóculo del patógeno aumenta, junto con las posibilidades de dispersión e infección (Erwin y Ribeiro, 1996; Agustí Alcals, 2007).

La formación de esporangios se inhibe ante condiciones ambientales de estrés, en particular de humedad y temperatura; en su lugar se produce la formación de propágulos de supervivencia denominados clamidosporas que pueden sobrevivir en suelo y en tejido vegetal por un largo período de tiempo. La temperatura óptima de formación de estas estructuras para *P. cactorum* es de 4°C (Erwin y Ribeiro, 1996; Horner y Wilcox, 1996). La germinación de las clamidosporas se ve favorecida con condiciones de temperatura superiores a 20°C. En presencia de nutrientes, éstas germinan a través de un tubo germinativo que continúa creciendo y forma micelio. En ausencia de nutrientes, las clamidosporas germinan formando en su extremo un esporangio (Ribeiro, 1983).

En la fase sexual, el anteridio (gametangio masculino) entra en contacto con el oogonio (gametangio femenino). Luego comienza una fase de expansión en la que el oogonio se dilata considerablemente más que el anteridio resultando la configuración parágina, es decir, un oogonio con un anteridio mucho más chico cementado lateralmente al primero (Hemmes, 1983). Posteriormente, el anteridio transfiere su núcleo al oogonio y se produce la cariogamia o fusión de ambos núcleos. El oogonio fecundado desarrolla una pared gruesa dando origen a la oospora. Esta estructura germina produciendo micelio o zoosporangios, previo a un período de 'hibernación' de seis a ocho semanas a 10-15°C y a condiciones de humedad, intensidad lumínica y contenido de nutrientes adecuados para su maduración (Ribeiro, 1983; Utkhede, 1986; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996). Los esporangios formados producen zoosporas garantizando la repetición del ciclo asexual (Erwin y Ribeiro, 1996; Agustí Alcals, 2007).

## **2.8. Ciclo de la enfermedad: Interacción *Phytophthora cactorum* - *Pyrus communis***

El proceso infeccioso se produce a través de una serie de eventos que favorecen el ingreso, establecimiento y propagación del agente causal (Agrios, 1996):

### **2.8.1. Inoculación**

Las zoosporas son los principales órganos de dispersión e infección. Pueden nadar o trasladarse pasivamente en el agua de riego, de drenaje superficial o a través de aquellos poros del suelo que contienen agua (Weste, 1983). El período de actividad de las zoosporas dura al menos 10 horas y disminuye a medida que aumentan la temperatura y la concentración de iones en solución (Carlile, 1983). Pueden nadar unos 121  $\mu\text{m}/\text{seg}$  aunque la distancia real de avance es de aproximadamente 6 cm ya que cambian de dirección permanentemente. A través de diferentes movimientos directos o taxismos las zoosporas se acercan (taxis positiva) o se alejan (taxis negativa) en función a estímulos ambientales que les permiten dispersarse direccionalmente, reduciendo la pérdida de inóculo y optimizando la llegada al hospedero (Carlile, 1983; Duniway, 1983; Weste, 1983; Dick, 2001; Agustí Alcals, 2007).

El enquistamiento de las zoosporas se produce por una serie de factores ambientales, incluyendo la presencia de exudados radicales, temperaturas extremas, cambios en el potencial osmótico o en el pH; o a causa de circunstancias tales como agitación del medio en el que se encuentran o la cercanía a una superficie (Carlile, 1983).

### **2.8.2. Prepenetración y penetración**

Las zoosporas enquistadas pueden germinar desarrollando tubos germinativos o liberando una zoospora secundaria. Los exudados de raíces y los nutrientes favorecen la germinación, proceso en el cual se forma un tubo germinativo de hasta 200  $\mu\text{m}$  de largo (Harris, 1991). La formación de zoosporas secundarias se produce cuando la zoospora enquistada no se encuentra lo suficientemente cerca de los tejidos del hospedero (Carlile, 1983).

*P. cactorum* penetra el tejido del hospedante de forma directa (Agrios, 1996; Kamoun, 2003) mediante micelio intercelular que forma haustorios pequeños y subesféricos, o bien formando apresorios y un micelio intracelular absorbiendo, en ambos casos, los nutrientes de las células del hospedero (Utkhede, 1986; Harris, 1991; Smith *et al.*, 1992; Kamoun, 2003). Cabe mencionar que también utiliza como vía de ingreso las aberturas naturales y las heridas causadas por frío, herramientas,

insectos o roedores por ser puntos de fácil acceso (Harris, 1991; Smith *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996).

El ingreso de *Phytophthora* en la zona del cuello de las plantas puede producirse a través de la corteza externa o ritidoma, sin la presencia de heridas. Hay autores que han demostrado su ingreso a través de la corteza que ha sido ablandada previamente debido a la alta humedad generada por la proximidad de malezas o pasturas altas (Utkhede, 1986; Harris, 1991). Asimismo, la corteza hinchada en la zona de injertación y las lenticelas son vías importantes para la penetración del patógeno en este tipo de podredumbre (Harris, 1991).

### **2.8.3. Infección**

*P. cactorum* es un microorganismo parenquimático que destruye todos los tejidos vivos de la corteza, el cambium y el xilema joven (Utkhede, 1986; Harris, 1991; Smith *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996), mientras que el xilema secundario es inmune (Harris, 1991).

Una infección efectiva da como resultado la aparición de síntomas (Agrios, 1996). Los tejidos infectados se necrosan mientras el patógeno crece y coloniza otros tejidos sanos de la planta, entre ellos el sistema vascular, obstruyéndose el transporte de agua y nutrientes de las raíces al resto de la planta (Agustí Alcals, 2007).

La tasa de infección y severidad de la enfermedad depende de una serie de factores que se mencionan a continuación (Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Guzmán Lyon, 2003):

\* Época del año: En los frutales de pepita, la infección por *P. cactorum* ocurre en otoño previo a la entrada en dormancia o durante la fase de desarrollo de hojas y flores en primavera temprana (Jeffers y Aldwinckle, 1986; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Browne y Mircetich, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996); mientras que la susceptibilidad es baja durante el invierno (Browne y Mircetich, 1996). Esto se correlaciona con las temperaturas registradas durante estas épocas del año ya que la actividad del patógeno es muy lenta con temperaturas inferiores a 8°C y su actividad es proporcional al aumento de la temperatura hasta los 20°C (Smith *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996; Horner y Wilcox, 1996; Ampuero Vega, 2005).

\* Predisposición del tejido hospedero: Algunos autores citan al peral como cultivo más susceptible al ataque de *P. cactorum* que el manzano (Scheer van der, 1969). Asimismo, hay antecedentes de cultivares de peral con mayor susceptibilidad como Williams, Beurré D'Anjou, Winter Nellis, Blanca de Aranjuez y Kondoula (McIntosh, 1959; Cameron, 1962; Grove y Boal, 1991; Rossini y Di Masi, 1996; Elena y Paplomatas, 1999; Tuset *et al.*, 2002). La mayor o menor susceptibilidad del tejido hospedero está en función de factores endógenos y de factores externos de estrés, muchos de los cuales no han sido aún dilucidados (Jeffers y Wilcox, 1990; Smith *et al.*, 1992).

Existen reportes que relacionan el aumento de la susceptibilidad de frutales de pepita a la podredumbre de cuello con la edad del árbol. McIntosh (1959) observó que perales de menos de cuatro años eran resistentes a *P. cactorum* y árboles de más de seis años eran susceptibles. Un comportamiento similar reportaron Ten Houten (1958), Harris (1991) y Smith *et al.* (1992), quienes observaron que árboles de peral y manzano de diez años o más fueron más susceptibles al ataque del patógeno en infecciones naturales respecto de árboles de menos de diez años. Sin embargo, Khan (1999) menciona que árboles de todas las edades son sensibles, pero que la susceptibilidad aumenta cuando estos entran en producción. Según Harris (1991), la formación de grietas en la zona de injertación podría explicar la asociación de la podredumbre de cuello por *P. cactorum* con plantaciones de más de diez años de edad.

\* Presencia de agua libre: La humedad del suelo es uno de los factores –junto con la temperatura- más importantes que influyen en el crecimiento y esporulación de *P. cactorum* (Duniway, 1983; Grove y Boal, 1991; Thomidis, 2000).

El efecto del exceso de agua en el suelo sobre el desarrollo de *Phytophthora* spp. en frutales de pepita ha sido estudiado ampliamente (Browne y Mircetich, 1988; Lockhart y Newbery, 1988; Harris, 1991; Merwin *et al.*, 1992; Utkhede y Smith, 1996; Latorre y Wilcox, 1996; Browne y Viveros, 1999; Guzmán Lyon, 2003; Besoain *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2007). El anegamiento favorece la producción de esporangios y la liberación de zoosporas, (Duniway, 1983; Erwin y Ribeiro, 1996; Utkhede y Smith, 1996; Ampuero Vega, 2005). Gisi (1983) y Jeffers y Wilcox (1990) mencionan que la liberación de zoosporas fuera del esporangio se produce cuando el suelo está completamente saturado (Potencial mátrico  $\psi_m = 0$ ) aunque *P. cactorum* es capaz de formar esporangios en todos los rangos de  $\psi_m$  que predominan en suelos agrícolas

durante el crecimiento del cultivo (Duniway, 1983). Además la presencia de agua libre promueve el movimiento pasivo de las zoosporas por flotación o salpicadura y favorece la motilidad de estos propágulos a través de los poros. Browne y Mircetich (1988) determinaron que cuatro horas de inundación son suficientes para alcanzar la máxima actividad infectiva de zoosporas de *P. cactorum*, y que prolongando el período de inundación la severidad de la enfermedad no aumenta. El anegamiento además estimula la germinación de oosporas y clamidosporas (Browne y Mircetich, 1988).

Es posible que la anoxia asociada a la saturación del suelo predisponga a los tejidos al ataque debido a la alteración del funcionamiento radical y al aumento de los exudados que estimulan a la quimiotaxis de zoosporas (Mitchell y Kannwischer-Mitchell, 1983; Browne y Mircetich, 1988; Ampuero Vega 2005).

#### **2.8.4. Diseminación**

Las especies de *Phytophthora* son patógenos que viven en el suelo y están adaptados a dispersarse de árboles enfermos a sanos a través del agua de riego y de drenaje superficial (Ristaino y Gumpertz, 2000; Themann *et al.*, 2002<sup>b</sup>). También pueden diseminarse a través de fuentes de agua contaminadas e implementos y maquinaria agrícolas (Erwin y Ribeiro, 1996; Gevens *et al.*, 2007).

*P. cactorum* produce esporangios caducos que pueden dispersarse rápidamente por salpicaduras o corriente de agua (Duniway, 1983). Este inóculo primario es tan importante como las zoosporas en la dispersión de la enfermedad.

#### **2.8.5. Supervivencia**

Una vez introducida en los tejidos del hospedante, *P. cactorum* sobrevive como micelio u oosporas. El hospedante puede ser tanto el cultivo principal como sus malezas o pasturas presentes (Harris, 1991). La habilidad de este 'hongo' de subsistir en un rango tan amplio de especies vegetales podría explicar la presencia de inóculo quince años después de haber erradicado una plantación de manzanos (Harris, 1991).

Las oosporas son los propágulos de mayor persistencia de *P. cactorum* y pueden sobrevivir más de un año en el suelo o en restos vegetales en estado de dormancia (Zentmyer y Erwin, 1970; Malajczuk, 1983; Utkhede, 1986; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996); esta condición estaría asociada a la

naturaleza de la pared (Zentmyer y Erwin, 1970). Existen antecedentes que mencionan la presencia de oosporas viables a una profundidad de suelo entre 25-45 cm, si bien hay estudios *in vitro* que muestran una reducción significativa en la supervivencia a 0,6 y 0,9 cm de profundidad en suelo (Utkhede, 1986).

El tiempo de supervivencia del micelio de *P. cactorum* varía con la temperatura. Puede sobrevivir en suelo húmedo más de 35 días a 4°C, aunque se produce lisis en 3 días a 29°C (Malajczuk, 1983; Weste, 1983; Utkhede, 1986) y no resiste el congelamiento (Utkhede, 1986).

La tasa de supervivencia de zoosporas en suelo es mayor a 10°C que a 27°C (Utkhede, 1986) y con un potencial mátrico ( $\psi_m$ ) de -2 a -5 bares, si bien perduran unas pocas semanas a  $\psi_m$  de -0,1 a -0,2 bares (Weste, 1983).

También es posible que *P. cactorum* sobreviva en forma de clamidosporas; éstas pueden permanecer viables en suelo por más de 106 días (Malajczuk, 1983).

### **2.9. Antecedentes sobre la diseminación de *P. cactorum* y detección de propágulos en el agua de riego**

La diseminación o dispersión es un proceso por el cual individuos o sus propágulos se mueven dentro o fuera de una población o de un área poblacional (Ristaino y Gumpertz, 2000).

Como ya se describió, *P. cactorum* es un patógeno adaptado a dispersarse en el agua a través de la producción de zoosporas móviles, principales propágulos en la generación de infecciones secundarias (Ristaino y Gumpertz, 2000; Themann *et al.*, 2002<sup>b</sup>). Diversas especies del género han sido aisladas de fuentes de agua en plantaciones de frutales de pepita (McIntosh, 1966<sup>a y b</sup>; Harris, 1989; Ali-Shtayeh *et al.*, 1991; Grove y Boal, 1991; MacDonald *et al.*, 1994; Bush, 2002; Pettitt *et al.*, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>a y b</sup>; Yamak *et al.*, 2002; Hong y Moorman, 2005), registrándose un nivel de detección superior durante primavera y otoño (Grove y Boal, 1991; Steciow, 1998; Bush, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>b</sup>). Este momento coincide con la época de infección por *P. cactorum* en frutales de pepita (Jeffers y Aldwinckle, 1988; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Browne y Mircetich, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996).

Existen diferentes métodos que permiten detectar la presencia de especies de *Phytophthora* y otros *Oomycetes* en el agua de riego (Hallet y Dick, 1981). Entre ellos se encuentran los siguientes:

**2.9.1. Técnica de ‘trampa’:** Esta técnica se basa en la exposición de tejidos vegetales susceptibles, a fuentes de agua o suelo contaminados. El material vegetal usado para el aislamiento de este patógeno incluye frutos, cotiledones, hojas, semillas, entre otros (Erwin y Ribeiro, 1996). Si bien esta técnica se basa en la capacidad patogénica de *Phytophthora* spp. sobre un tejido hospedero determinado, la misma adquiere una ventaja comparativa si se favorece la producción de esporangios y zoosporas ya que el inóculo presente es amplificado gracias a estos propágulos (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los frutos de manzano y peral son comúnmente utilizados como “frutos trampa” en plantaciones de frutales de pepita para el aislamiento de estos microorganismos en muestras de suelo y de agua de riego (Bolay, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996; Rossini *et al.*, 1997; Villegas, 1998; Latorre *et al.*, 2001; Themann *et al.*, 2002<sup>a y b</sup>; Yamak *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2005).

Entre las desventajas de esta técnica se puede mencionar su elevada variabilidad (Horner y Wilcox, 1995) y su reducida sensibilidad, ya que no permite discriminar entre diferentes tipos de propágulos infectivos y requiere de tiempo y preparación (Horner y Wilcox, 1995).

**2.9.2. Técnica de filtrado, agitación y siembra:** Otra técnica utilizada para el aislamiento de *Phytophthora* spp. de muestras de agua es el filtrado, agitación y siembra en medio de cultivo (Bush, 2002). La concentración de propágulos de este hongo en muestras de agua a través del filtrado es citada en varios trabajos (MacDonald *et al.*, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996; Wakeham *et al.*, 1997; Bush, 2002; Hong *et al.*, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>a</sup>; Davidson *et al.*, 2005).

Los filtros usados cuentan con poros lo suficientemente pequeños como para retener el inóculo (Erwin y Ribeiro, 1996) con diámetros que van de 20 a 0,45  $\mu\text{m}$ . La obstrucción de los poros por partículas coloidales contenidas en el agua de riego es una limitante ya que reduce el volumen que puede procesarse eficientemente (Erwin y Ribeiro, 1996; Flores, 2007). Se conoce que tiempos de filtrado por vacío excesivamente prolongados podrían forzar el pasaje –y por ende la pérdida- de parte

de los propágulos retenidos en los poros del filtro (Hong *et al.*, 2002). De hecho, Ali-Shtayeh *et al.* (1991) recomiendan filtrar hasta 200 ml de agua de riego por filtro para evitar la obstrucción de los poros. El material de los filtros también influye en la cantidad de propágulos recuperados (Hong *et al.*, 2002).

Realizado el filtrado, los filtros se colocan directamente en una caja de Petri con Agar Harina de Maíz (Bush, 2002; Hong *et al.*, 2002; Pettitt *et al.*, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>a</sup>) o pueden ser suspendidos en una solución de composición variable y agitados para liberar los propágulos retenidos; luego se aplica la solución recuperada en cajas de Petri conteniendo Agar Harina de Maíz (Hallett y Dick, 1981; Ali-Shtayeh *et al.*, 1991; MacDonald *et al.*, 1994; Wakeham *et al.*, 1997; Bush, 2002; Hong *et al.*, 2002).

La desventaja de esta técnica reside en la pérdida de hasta el 40% del inóculo durante la recuperación (Bush, 2002). Además es laboriosa y requiere de un gran número de cajas de Petri. Cabe mencionar que la extrapolación de la cantidad de propágulos recogidos de volúmenes relativamente pequeños a volúmenes considerables contenidos en canales, ríos o lagos presenta sus limitaciones (Bush, 2002).

**2.9.3. Técnica de ELISA:** La prueba inmunoenzimática ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se basa en la detección del microorganismo a través de la interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) por parte de una enzima conjugada a uno de los reactivos, generalmente el anticuerpo.

ELISA presenta varias ventajas respecto a otras técnicas: permite realizar un diagnóstico rápido (pocas horas) pudiendo aplicar las medidas necesarias para el control de la enfermedad en tiempos razonables (Wakeham *et al.*, 1997; Benson, 1991; Bush, 2002); posee una elevada sensibilidad, detectando bajos niveles de inóculo (Erwin y Ribeiro, 1996; Conci, 1999; Bush, 2002) incluso antes de que se manifiesten los síntomas (Erwin y Ribeiro, 1996); está disponible en kits comerciales de fácil uso, en los cuales un pequeño contenedor posee todos los materiales necesarios para el test (Pscheidt *et al.*, 1992); y pueden procesarse muchas muestras en simultáneo (Conci, 1999).

Entre las desventajas se puede mencionar el incremento de la probabilidad de obtener resultados erróneos debido a la elevada sensibilidad, por lo que el técnico

debe conocer en profundidad cada etapa del proceso (Sosa-Moss *et al.*, 1997). Algunos kits de ELISA han presentado reacciones cruzadas con algunas especies de *Pythium* y *Peronospora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Existen variaciones del método de ELISA (Voller *et al.*, 1976). Entre estos se encuentra DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) que se basa en el uso de Anticuerpos específicos (inmunoglobulinas) que están adsorbidos a una superficie sólida. Los Anticuerpos atrapan el Antígeno presente en la muestra el cual es inmovilizado selectivamente. Este complejo es detectado por otros Anticuerpos a los que se les ha unido una enzima (generalmente fosfatasa alcalina), denominados conjugados enzimáticos. Al adicionar a la enzima un sustrato adecuado, éste se hidroliza y se induce un cambio de color en la solución lo que permite detectar la reacción visualmente o con espectrofotómetro (Sosa-Moss *et al.*, 1997; Voller *et al.*, 1976). Esta técnica requiere menos antisuero lo que reduce los costos (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

ELISA es una técnica valiosa en la detección de virus de plantas (Clark y Adams, 1977) y su uso se ha extendido a la detección de hongos fitopatógenos (Casper y Mendgen, 1979; Johnson *et al.*, 1982).

Si bien existen varios trabajos donde utilizan DAS-ELISA para la detección de especies de *Phytophthora* a partir de muestras de tejido vegetal o de suelo, los reportes de su aplicación en muestras de agua de riego son escasos (Ali-Shtayeh *et al.*, 1991; Latorre *et al.*, 2001; Themann *et al.*, 2002<sup>a</sup>).

**Hipótesis de trabajo:**

1. *P. cactorum* tiene incidencia en el decaimiento que se presenta en cultivos comerciales de peral cv. Williams en el Alto Valle Este de Río Negro.

2. La presencia de *P. cactorum* afecta negativamente el crecimiento y la productividad de perales cv. Williams y la calidad de los frutos a cosecha.

3. Los propágulos de *P. cactorum* pueden dispersarse a través del agua de riego desde plantas afectadas hacia plantas sanas en las parcelas seleccionadas.

### **Objetivo general**

Estimar la incidencia de *Phytophthora* spp. en plantaciones comerciales de peral cv. Williams con síntomas de decaimiento, evaluar su influencia sobre el crecimiento, los rendimientos y la calidad de los frutos y determinar la posibilidad de su difusión a través del agua de riego.

### **Objetivos específicos:**

1. Estimar la incidencia de *Phytophthora* spp. en plantas de peral cv. Williams con síntomas de decaimiento en el Alto Valle Este.

2. Determinar la relación existente entre el desarrollo de síntomas de decaimiento y la presencia de *Phytophthora* spp. en plantas de peral cv. Williams.

3. Identificar las especies de *Phytophthora* aisladas de perales cv. Williams con síntomas de decaimiento en el Alto Valle Este, a través de sus características morfológicas y morfométricas.

4. Determinar la influencia de la podredumbre de cuello causada por *Phytophthora* spp. sobre el crecimiento y la productividad de perales cv. Williams.

5. Determinar la influencia de la podredumbre de cuello causada por *Phytophthora* spp. sobre la calidad de frutos de perales cv. Williams.

6. Evaluar la presencia de propágulos de *Phytophthora* spp. en el agua de riego en zonas aledañas a plantas afectadas por esa enfermedad.

## **1. INCIDENCIA DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN EL ALTO VALLE ESTE**

### **1.1. Área de estudio**

La zona considerada para realizar el presente estudio fue el área del Alto Valle Este, provincia de Río Negro, conformada por las localidades de Chichinales (39° 06' Sur, 66° 56' Oeste), General Enrique Godoy (39° 09' Sur, 67° 09' Oeste) y Villa Regina como epicentro (39°06' Sur, 67°05' Oeste).

### **1.2. Selección de plantas con síntomas**

Durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009 se relevaron 29 plantaciones comerciales de peral cv. Williams con plantas que presentaban síntomas compatibles con los producidos por la podredumbre de cuello y/o raíz provocada por *Phytophthora* spp. (Fig. 1). Las parcelas de peral relevadas presentaron un número de plantas variable en función de la superficie de las mismas y del marco de plantación. El número mínimo registrado fue de 430 plantas/ha y el número máximo fue de 2.500 plantas/ha.

### **1.3. Modalidad de muestreo y procesamiento de las muestras**

Para su estudio en laboratorio, se efectuaron extracciones de tejido cortical de la podredumbre ubicada en el tronco de todos los árboles sintomáticos identificados en cada plantación comercial. Se extrajeron con navaja 5 muestras de tejido por árbol de 3 cm de largo de la zona de intersección entre el tejido necrosado y el sano y las mismas se colocaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas para evitar su deshidratación. Se dispusieron en conservadora con gel refrigerante a fin de mantenerlas a temperaturas no mayores a 20°C. Las mismas fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle para realizar el aislamiento e identificación del/de los agente/s causal/es. La extracción de tejido cortical de los troncos de plantas con podredumbre se realizó durante los meses de septiembre y octubre de 2007 y en marzo, abril, septiembre y octubre de 2008, coincidente con el período de mayor actividad de *Phytophthora* spp.

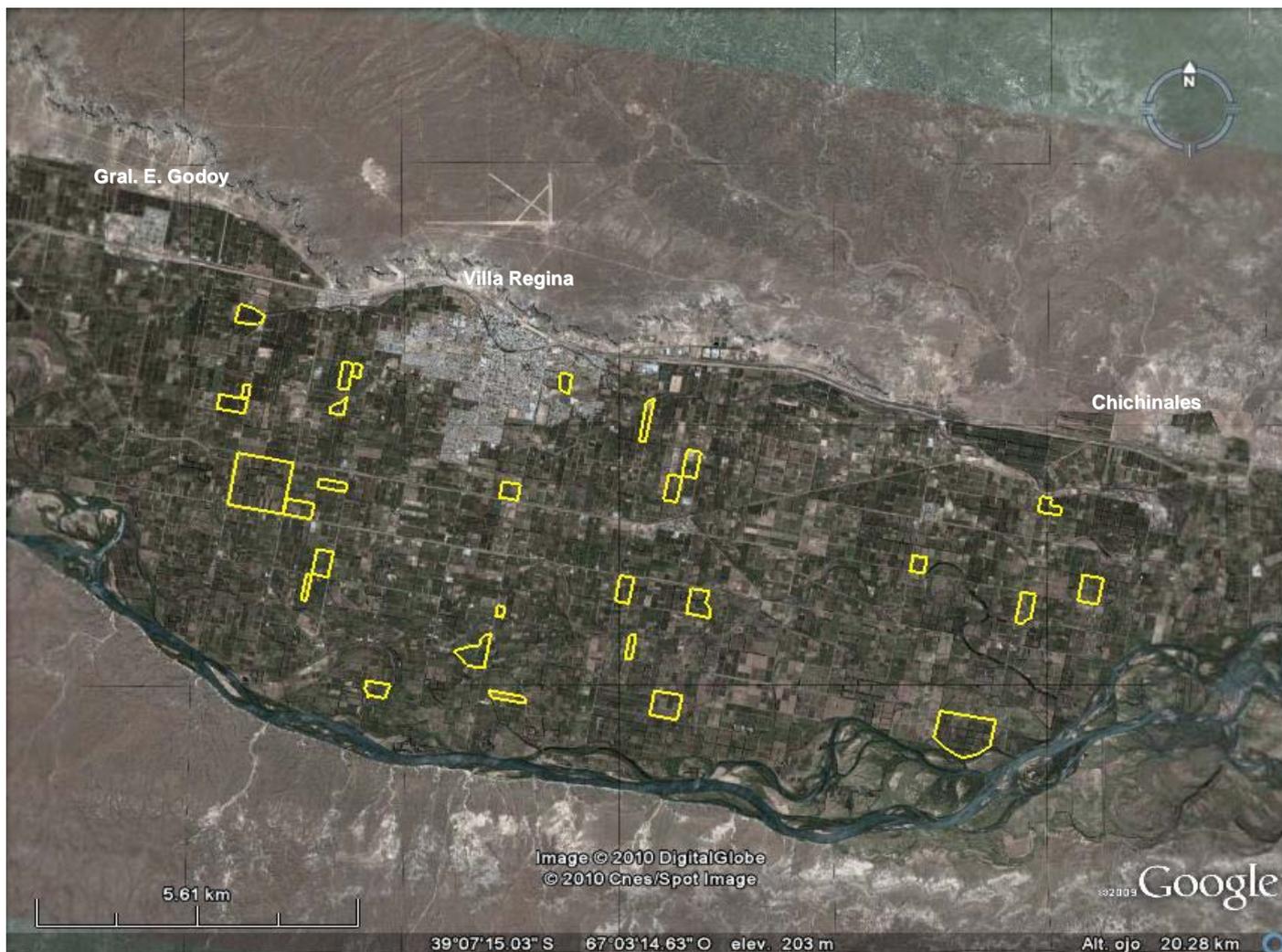


Fig. 1: Imagen satelital (Google Earth) de la zona del Alto Valle Este de Río Negro, donde se encuentran indicadas las plantaciones comerciales de peral cv. Williams con síntomas compatibles con los causados por *Phytophthora* spp., relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.

#### 1.4. Aislamiento del agente causal

En el laboratorio las muestras fueron cortadas en trozos de aproximadamente 3 cm de longitud y desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 2% en cámara de flujo laminar vertical (VLAFF 48, Gelaire Pty Ltd, Australia). Se utilizó el medio Agar Harina de Maíz (AHM) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Inglaterra) para aislar los posibles agentes causales. Cada muestra se sembró por duplicado en cajas de Petri con 10 ml de AHM en cada caja y se colocó en oscuridad en incubadora a 20°C. Las observaciones se realizaron a los 5, 7 y 14 días después de la siembra. Se identificaron las colonias fúngicas obtenidas y aquellas con características morfológicas y morfométricas similares a *Phytophthora* spp. se repicaron nuevamente en medio AHM.

Se calculó para cada parcela la cantidad de plantas sintomáticas de las cuales se obtuvieron aislados de *Phytophthora* spp. respecto al total de plantas con síntomas. El resultado fue expresado en porcentaje. Asimismo, se calculó la incidencia de la enfermedad dentro de cada una de las parcelas consideradas en este estudio. La misma fue calculada a partir de la relación entre el número de plantas sintomáticas en las que se confirmó la presencia de *Phytophthora* spp., denominadas 'plantas enfermas' o 'PE', y el total de plantas de la parcela.

## **2. RELACIÓN ENTRE PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO Y EL AISLAMIENTO DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL ALTO VALLE ESTE**

Con el objetivo de establecer la relación entre plantas con síntomas de decaimiento y la presencia de *Phytophthora* spp., se realizó una inspección visual en las plantaciones bajo estudio. En la observación de la sintomatología se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: coloración y densidad del follaje, vigor de los árboles, presencia de ramas primarias y/o árboles muertos, presencia y aspecto de podredumbre de cuello y/o raíces, detección de 'olor a fermentado' en la podredumbre, presencia de exudados en las lesiones. Cada uno de los síntomas considerados para la realización de la inspección visual en las plantas sintomáticas fue relacionado con la presencia de *Phytophthora* spp.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS DE *PHYTOPHTHORA*

#### 3.1. Identificación por morfología y morfometría

Cada planta sintomática que dio positivo a la presencia de *Phytophthora* spp. fue considerada un aislado. Estos fueron identificados siguiendo descripciones y claves específicas basándose en morfología de la colonia, características miceliales, producción, morfología y tamaño de esporangios, oogonios, anteridios y clamidosporas (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1963; Ho, 1981; Tello, 1985; Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset *et al.*, 2002). Debido a su relevancia como carácter distintivo a nivel de especie, en este trabajo se hizo especial referencia a la morfología y morfometría de los esporangios (Erwin y Ribeiro, 1996).

**3.1.1. Características de la colonia:** Sobre los cultivos en los que se desarrolló *Phytophthora* spp. se observaron las colonias formadas y se clasificaron según el patrón de crecimiento en AHM evaluando la forma, el grado de compactación y el crecimiento aéreo (Erwin y Ribeiro, 1996).

**3.1.2. Características miceliales:** En los cultivos en los que desarrolló *Phytophthora* spp. se observó bajo microscopio óptico forma de las hifas, presencia de tabiques, presencia de protuberancias o 'swellings' y se midió ancho de las hifas (Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Erwin y Ribeiro, 1996).

**3.1.3. Estructuras asexuales:** Se indujo la formación de esporangios en cada uno de los aislados incubando micelio de *Phytophthora* spp. en cajas de Petri plásticas con 20 ml de solución de extracto de suelo sin esterilizar durante 24 horas a temperatura ambiente bajo luz continua (Bush, 2002; Guzmán Lyon, 2003). Se observaron bajo microscopio óptico 30 esporangios por aislado obtenido. Se midió largo y ancho de cada uno, largo del pedicelo y se determinó forma, persistencia, tamaño y relación largo:ancho de los esporangios (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1963; Ho, 1981; Tello, 1985; Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset *et al.*, 2002).

**3.1.4. Estructuras sexuales:** Se midió bajo microscopio óptico el diámetro de 10 oogonios y 10 oosporas por cada aislado obtenido. Ambas estructuras se clasificaron según tamaño. Se midió el largo y el ancho de 10 anteridios por cada aislado obtenido y se determinó su posición respecto al oogonio y tamaño (Frezzi, 1950; Waterhouse, 1963; Waterhouse y Waterstone, 1966; Ho, 1981; Tello, 1985; Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996). Las observaciones se realizaron a los 5, 7 y 14 días después de permanecer en oscuridad en incubadora a 20°C en AHM.

**3.1.5. Estructuras de resistencia:** Se observó la presencia de estructuras de resistencia (clamidosporas) en cada aislado (Frezzi, 1950; Ho, 1981, Stamps *et al.*, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset *et al.*, 2002). Las observaciones se realizaron a los 5, 7 y 14 días después de permanecer en oscuridad en incubadora a 20°C en AHM.

### **3.2. Análisis estadístico**

Los datos fueron comparados a partir de análisis descriptivo mediante el cálculo de medias y Rangos.

#### 4. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PERAL cv. WILLIAMS

##### 4.1. Área de estudio y material experimental

El estudio se llevó a cabo en dos de las plantaciones comerciales de peral cv. Williams relevadas en la temporada 2007/2008 en las cuales se constató la presencia de *Phytophthora* spp. mediante las técnicas descritas anteriormente (ver **3.1. Identificación por morfología y morfometría**). Las parcelas seleccionadas debieron presentar, como condición para su selección, al menos 5 plantas en las que se hubiera aislado *P. cactorum* (denominadas 'plantas enfermas' o 'PE') y las PE debieron presentar un grado de desarrollo de la podredumbre de cuello superior a 10 cm.

Dentro de cada parcela se escogieron al azar 5 PE. Asimismo se eligieron 5 plantas asintomáticas (PA), teniendo en cuenta para su selección la ausencia de síntomas visibles de la enfermedad. Cada planta fue considerada como unidad experimental.

Se adaptó la escala utilizada por Utkhede y Smith (1996) en manzanos afectados por *P. cactorum*, con el objetivo de definir el grado de severidad de la enfermedad en las dos poblaciones de PE utilizadas en este estudio. Las variables escogidas para efectuar la caracterización fueron:

- La relación entre el grado de desarrollo de la podredumbre de cuello (cm) y la altura del árbol (altura media del árbol: 400 cm).
- La cantidad de ramas primarias con podredumbre y/o muertas.

En la escala adaptada se describen los siguientes grados de severidad:

**Grado 1** = Sano (sin infección)

**Grado 2** = Inicial (menos de  $\frac{1}{4}$  del tronco con podredumbre y ausencia de ramas primarias con podredumbre o muertas).

**Grado 3** = Intermedio ( $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  del tronco con podredumbre y al menos una rama primaria con podredumbre o muerta)

**Grado 4** = Terminal (más de  $\frac{1}{2}$  del tronco con podredumbre y más de una rama primaria con podredumbre o muerta)

**Grado 5** = Muerto

## 4.2. Análisis de las alteraciones inducidas en el crecimiento vegetativo y en la productividad

Se estudiaron las alteraciones que *P. cactorum* induciría en el crecimiento vegetativo de las plantas y en la productividad, basándose en las siguientes variables:

**4.2.1. Área seccional del tronco (AST):** Se consideró el AST ( $\text{cm}^2$ ) como medida del crecimiento vegetativo de los árboles. Para ello en el invierno de 2007 y de 2008 se midió el diámetro del tronco de las 5 PE y 5 PA identificadas en cada parcela a treinta centímetros por encima de la zona de injertación (Westwood, 1982; Lepsis y Blanke, 2006). El incremento registrado en este parámetro al final de las dos temporadas de observación en las PE fue comparado con el logrado por las PA.

**4.2.2. Producción de frutos:** En la primera temporada se contabilizó el total de frutos producidos por árbol luego de la purga natural, el 13 de diciembre de 2007 (Sozzi, 2006<sup>a</sup>). En la segunda temporada el total de frutos por árbol fue cosechado en dos pasadas y colocado en cajones, donde se contabilizaron. De la sumatoria de ambas pasadas se obtuvo la cantidad de frutos producida por árbol.

**4.2.3. Carga frutal:** La carga frutal se calculó mediante la relación entre producción total de frutos de cada planta sobre el área seccional del tronco. La misma se expresó en cantidad de frutos / $\text{cm}^2$  AST.

**4.2.4. Rendimiento:** En la segunda temporada se extrajeron todos los frutos producidos por árbol en dos pasadas de cosecha y se pesaron. De la sumatoria de ambas pasadas se obtuvo el rendimiento expresado en kg/planta.

## 4.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con el procedimiento MLG del paquete estadístico InfoStat versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)). Los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad se verificaron mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilks, respectivamente. Cuando el valor F resultó significativo, las medias de los tratamientos se compararon *a posteriori* utilizando las pruebas de Tukey o Kruskal-Wallis (KW).

## 5. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PERAL cv. WILLIAMS

### 5.1. Modalidad de muestreo

En el momento oportuno de cosecha de la cultivar, establecido por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) según datos aportados por el Programa Regional de Madurez del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se realizó la colecta al azar de 20 frutos por árbol por pasada de cosecha en los 10 árboles identificados en cada parcela, en dos pasadas de cosecha. La primera pasada se realizó el 15 de enero de 2008 y el 13 de enero de 2009 en ambas parcelas. La segunda pasada se efectuó el 30 de enero de 2008 para ambas parcelas y el 22 y 26 de enero de 2009 en las parcelas N°1 y N°2 respectivamente. Los frutos se tomaron al azar de la parte media de la planta entre 0,5 m y 1 m de distancia del tronco a los efectos de estandarizar el procedimiento (Calvo y Sozzi, 2004) y las determinaciones se efectuaron el día de cada cosecha. Para la medición de las variables 'presencia de defectos en los frutos' y 'frutos con diámetro superior a 67 mm' se contabilizó el total de frutos por árbol.

### 5.2. Evaluación de los índices de calidad y de madurez

**5.2.1. Tamaño de frutos:** En la primera temporada se calculó la masa media de los frutos (g) a partir de la extracción al azar de 20 frutos por árbol y por pasada de 2 pasadas de cosecha. Los frutos se extrajeron de la parte media del árbol y fueron pesados el mismo día de la cosecha en el laboratorio de poscosecha de la EEA.

En la segunda temporada se utilizó como indicador del tamaño de los frutos, la masa media de fruto (g) obtenida a partir de la relación entre el rendimiento por planta (g) y el número total de frutos por planta. Asimismo, durante la cosecha se clasificó el total de frutos por árbol en dos categorías: frutos con diámetro superior a 67 mm y frutos con diámetro inferior a 67 mm. Se contabilizó el número de frutos en cada categoría y la variable de clasificación se expresó en % de frutos con diámetro superior a 67 mm, siguiendo el criterio utilizado en la realización del pronóstico de producción de peras y manzanas para las provincias de Río Negro y Neuquén (Tassile y Reeb, 2008)

**5.2.2. Presencia de defectos en los frutos:** En la segunda temporada el total de frutos obtenido por árbol fue cosechado en dos pasadas y colocado en cajones, donde se contabilizaron los frutos que presentaban defectos utilizando el siguiente criterio:

- Frutos 'asoleados': Frutos con manchas de borde irregular, que pueden variar desde color amarillo hasta pardo, presente en la cara expuesta del fruto (Raffo, 2004).

- Frutos con daños de heladas: Frutos con manchas de *russetting* sobre la epidermis generalmente en forma de anillo (Benítez *et al.*, 2005).

Ambas categorías son definidas como defectos en la Reglamentación del IASCAV (1993). De la sumatoria de ambas pasadas se obtuvo el número total de FA y FH por árbol. Luego fue calculado el porcentaje de frutos con presencia de defectos (FA y FH) respecto del total de frutos por árbol.

**5.2.3. Color de la epidermis de frutos:** Se determinó el color de la epidermis con colorímetro Minolta CR300 (Osaka, Japón) que proporciona las coordenadas cromáticas CIELAB, obteniendo las coordenadas espaciales de color L, a y b de Hunter (1942). A partir de estas coordenadas se determinó la tonalidad o matiz medida como ángulo HUE (del inglés 'hue angle') (Raffo *et al.*, 2008), utilizando como criterio de clasificación las siguientes categorías: ángulo HUE de 90° a 115° = Epidermis del fruto con tonalidad amarilla; ángulo HUE > 115° = Epidermis del fruto con tonalidad verde pálido (Calvo y Sozzi, 2009). Cada muestra consistió en 20 frutos por árbol recolectados en cada pasada de cosecha de un total de 2 pasadas. Este procedimiento se realizó de igual manera en las dos parcelas del estudio. La medición en cada fruto se realizó sobre la zona de la epidermis que no presentaba alteraciones en la coloración debido al efecto de la exposición solar (quemado o presencia de 'blush' o color rojo).

**5.2.4. Firmeza de la pulpa:** Se determinó midiendo la fuerza requerida para penetrar la pulpa de cada pera mediante penetrómetro electrónico (Lake City Technical Products, Kelowna, British Columbia, Canadá) (Calvo, 2008) con émbolo de 7,9 mm de diámetro. Se quitó la piel en dos puntos opuestos del plano ecuatorial, haciendo un corte tangencial poco profundo. La penetración se efectuó hasta una profundidad de 10 mm. Se tomó el promedio de las dos mediciones por fruto y se expresó en Newton (Calvo y Sozzi, 2009). Se evaluaron 20 frutos por árbol y por pasada, de 2 pasadas de cosecha, de cada parcela.

**5.2.5. Contenido de sólidos solubles (CSS):** Cada muestra de 20 frutos fue dividida al azar en 3 submuestras, 2 de ellas conformadas por 7 frutos y la tercer submuestra por 6 frutos. Se cortó una sección longitudinal de los frutos de cada submuestra y se extrajo el jugo utilizando una juguera, obteniendo 1 muestra de jugo por submuestra de frutos. En las 3 muestras de jugo obtenidas se midió el CSS con un refractómetro manual auto compensado (Atago Co., Tokio, Japón). Se tomaron 2 mediciones de cada jugo y el promedio de ambas se consideró una repetición. El valor obtenido se expresó en porcentaje de materia seca. Se utilizaron 20 frutos por árbol y por pasada, de 2 pasadas de cosecha, de cada parcela.

**5.2.6. Acidez Total Titulable (ATT):** Se determinó por titulación potenciométrica, utilizando un pH metro digital calibrado B.E. 105 (Bicasa S.A., Italia). Se tomaron 10 ml del jugo utilizado para sólidos solubles, se enrasó con agua destilada a 50 ml y se tituló con NaOH 0,1 N, hasta pH 8,2. El valor obtenido se expresó en gramos de ácido málico por litro de jugo (Calvo y Sozzi, 2009).

**5.2.7. Producción de etileno:** Durante la segunda pasada de cosecha en las temporadas 2007/2008 y 2008/2009 se seleccionaron frutos sin heridas y de tamaño uniforme de cada parcela considerando plantas asintomáticas (PA) y enfermas (PE). En la primera temporada se realizaron 3 repeticiones de 1 fruto cada una por grupo (PA y PE); en la segunda temporada se efectuaron 5 repeticiones por grupo (PA y PE). Los frutos de cada repetición se colocaron en un frasco de 3 L con cierre hermético. Se determinó cada dos días promedio la producción de etileno con un cromatógrafo de gases GC14-A Shimadzu (Jenck, Bs. As., Argentina), equipado con un detector FID (Flame Ionization Detector), columna de alúmina activada e inyector, los cuales fueron operados a 240°C, 40°C y 110°C respectivamente. Se utilizó helio como gas transportador. El día de cada evaluación se taparon los frascos por treinta minutos y las lecturas se realizaron extrayendo con jeringa 1 ml de aire del espacio de cabeza de cada frasco. Se determinaron los días transcurridos hasta el pico climatérico (entendiéndose por 'pico climatérico' a la etapa producida durante el proceso de maduración de un fruto climatérico, en la cual la producción de etileno es máxima) y la magnitud de dicho pico expresada en nanolitros de etileno por gramo de fruto por hora (nl/g/h) (Candan *et al.*, 2008).

### 5.3. Análisis estadístico

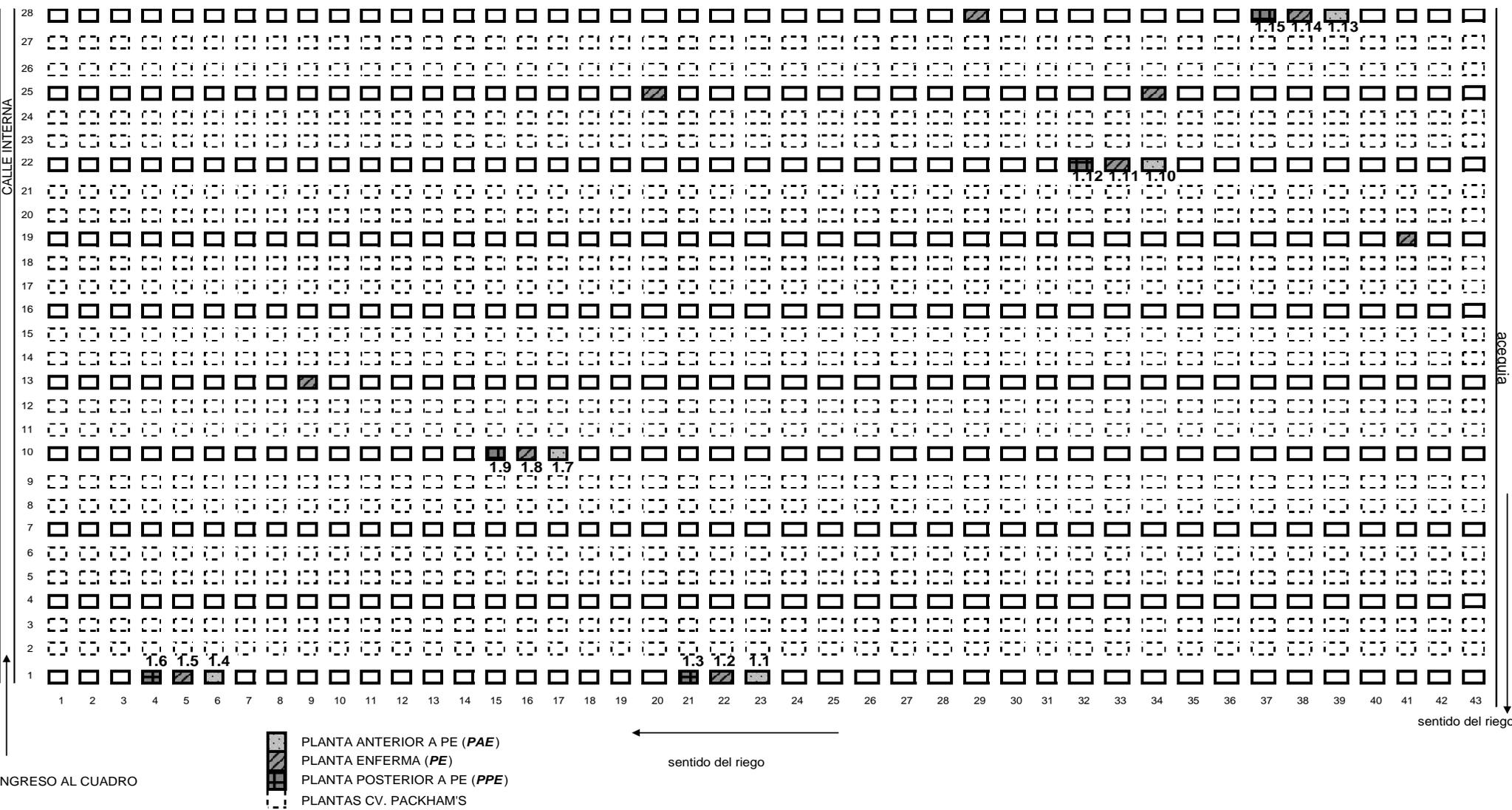
Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías con el procedimiento MLG del paquete estadístico InfoStat versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)). Los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad se verificaron mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilks, respectivamente. Cuando el valor F resultó significativo, las medias de los tratamientos se compararon a posteriori utilizando las pruebas de Tukey o Kruskal-Wallis. Los datos de presencia de defectos en los frutos fueron ordenados en tablas de contingencia, expresados en % de frutos 'asoleados' y con daños de heladas para cada grupo (plantas asintomáticas y plantas enfermas) y evaluados mediante la prueba  $\chi^2$ . El nivel de significancia fue de 0,05 para todos los casos.

## 6. DETECCIÓN DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL AGUA DE RIEGO

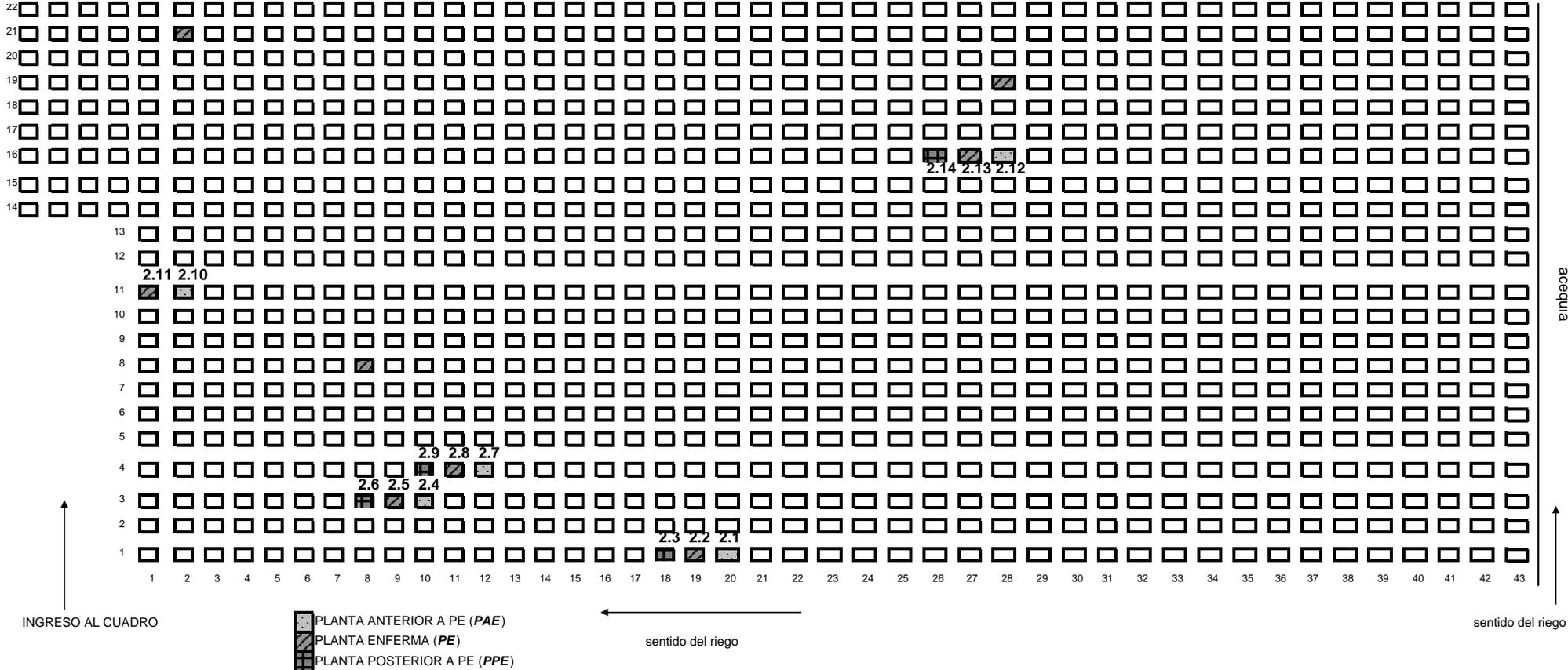
### 6.1. Recolección y caracterización de las muestras de agua de riego

Los ensayos de detección de *Phytophththora* spp. se efectuaron en las dos plantaciones comerciales donde se evaluaron incidencia y severidad de la enfermedad. Los mismos se llevaron a cabo en dos momentos del año. El primer ensayo de detección se realizó el 13 y 16 de diciembre de 2008 en las plantaciones N°1 y N°2 respectivamente. El segundo ensayo se realizó el 20 y 26 de marzo de 2009 en las plantaciones N°2 y N°1 respectivamente.

En la parcela N°1 se extrajo un total de 15 muestras de agua de riego por ensayo, mientras que en la parcela N°2 se extrajeron 11 muestras de agua de riego por ensayo (Figs. 2 y 3). Las muestras fueron tomadas durante un turno de riego, con el 100% del suelo de la parcela saturado de agua. El criterio de la toma de muestras en los 2 ensayos de detección fue el siguiente: se tomó una muestra de agua a la altura de una planta enferma o PE, una segunda muestra dos metros antes de una PE (en Figs. 2 y 3: 'Planta Anterior a Enferma' o 'PAE') y una tercer muestra dos metros después (en Figs. 2 y 3: 'Planta Posterior a Enferma' o 'PPE'), teniendo en cuenta el sentido del riego. Este procedimiento se repitió en las 5 PE seleccionadas en cada parcela. Cada muestra consistió en 2 litros de agua recolectada en bolsa de polietileno con cierre hermético debidamente identificada. En el momento de recolección de las muestras de agua también se recogió una muestra de suelo de 1 kg cercano a las raíces de cada PE. La muestra de suelo se colocó en bolsa doble de polietileno debidamente identificada. Tanto las muestras de agua como las de suelo fueron acondicionadas en conservadora con gel refrigerante para su transporte al laboratorio de Fitopatología EEA Alto Valle y conservadas en cámara de frío a 3°C hasta su procesamiento.



**Fig. 2: Esquema de la Plantación comercial N°1.** Ubicación de las plantas enfermas (PE); ubicación de las PE, PAE y PPE de las cuales se extrajeron las muestras de agua de riego y/o de suelo y la numeración utilizada; sentido de riego en la parcela; plantas correspondientes a otra cultivar, no considerada en este estudio. Estas muestras fueron tomadas en dos momentos: 13/12/2008 y 26/03/2009.



**Fig. 3: Esquema de la Plantación comercial N°2.** Ubicación de las plantas enfermas (PE); ubicación de las PE, PAE y PPE de las cuales se extrajeron las muestras de agua de riego y/o de suelo y la numeración utilizada; sentido de riego en la parcela. Estas muestras fueron tomadas en dos momentos: 16/12/2008 y 20/03/2009.

A cada muestra de agua de riego se le midió pH y CE ( $\mu\text{mhos/cm}$ ) en los dos ensayos de riego realizados (Themann *et al.*, 2002<sup>a</sup>) previo a la etapa de filtrado.

## 6.2. Prueba serológica

### 6.2.1. Tratamiento de las muestras de agua de riego

Las muestras fueron filtradas primeramente utilizando tamiz de 200  $\mu\text{m}$ , luego con filtros de papel Whatman N°4 de 20  $\mu\text{m}$  (Whatman Ltd, USA) y posteriormente con filtros de nitrocelulosa 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech GmbH 37070, Goettingem, Germany) con bomba para alto vacío a una presión de trabajo de 0,05 mm Hg (0,0008 PSI) (Bombas Pascal S.A., Buenos Aires, Argentina).

Durante la etapa de filtrado por vacío, se registró el tiempo requerido para filtrar el total de las muestras de agua de riego, la cantidad de filtros de nitrocelulosa utilizados y el volumen total de agua de riego filtrado.

Una vez finalizado el proceso de filtrado, cada filtro, correspondiente a una muestra de agua de riego, se colocó en caja de Petri debidamente identificada y se conservó en cámara de frío a 3°C hasta su procesamiento.

Es importante resaltar que el protocolo de la prueba serológica empleada en este estudio menciona que el kit detecta *Phytophthora* spp. en muestras de tejido vegetal y en cultivos fúngicos, sin embargo no especifica su uso en muestras de agua. Debido a ello, el tratamiento de las muestras indicado en el protocolo previo a la realización de la prueba serológica fue modificado para su aplicación en agua de riego. A tal fin, cada filtro (equivalente a una muestra de agua de riego) fue cortado e introducido en tubo de centrifuga graduado de polipropileno de 15 ml. Se agregaron 2 ml de buffer de extracción y se agitó con vortex durante un minuto con el objetivo de resuspender el contenido retenido por cada filtro. La resuspensión obtenida se colocó en doble bolsa de extracción de polietileno de 200  $\mu\text{m}$  de espesor y se adicionaron 5 ml más de buffer de extracción.

### 6.2.2. Ensayo de diluciones y detección de propágulos de *Phytophthora* spp.

Previo a la realización de la prueba serológica sobre las muestras de agua de riego, se efectuó un ensayo de diluciones con el objetivo de verificar la sensibilidad del kit de ELISA y por ende su utilidad en agua. En primer lugar, se utilizaron dos suspensiones madre con el objetivo de evaluar la especificidad del kit. Una de las suspensiones madre contenía

esporangios y la otra contenía micelio de *P. cactorum*. La formación de esporangios, utilizados para preparar la suspensión madre, se indujo incubando micelio en cajas de Petri por 24 horas a temperatura ambiente bajo luz continua con 20 ml de solución de extracto de suelo sin esterilizar (Bush, 2002; Guzmán Lyon, 2003). La liberación de zoosporas se produjo luego de colocar las cajas de Petri a 6°C por 1 hora y reemplazarlas a 20°C (Ali-Shtayeh *et al.*, 1991). La suspensión madre con esporangios presentó una concentración media, estimada con cámara de conteo de Thoma, de  $7 \times 10^6$  zoosporas/ml. El micelio fue extraído de cada aislado de *P. cactorum* repicado en Agar Harina de Maíz (AHM) con dos días de crecimiento en incubadora a 20°C. Se extrajo con sacabocados un disco de 1 cm (aproximadamente 0,2 g) de AHM con micelio del borde de la colonia en crecimiento y se transfirió a un tubo de ensayo de 15 ml, donde se maceró con 10 ml de agua destilada. Con cada suspensión madre se realizaron cinco diluciones seriadas al décimo, las cuales fueron filtradas utilizando el mismo procedimiento aplicado a las muestras de agua de riego (ver **6.2.1. Tratamiento de las muestras de agua de riego**). Posteriormente los filtros fueron cortados y sometidos a agitación con buffer de extracción, utilizando el mismo procedimiento empleado en las muestras de agua de riego. La suspensión obtenida se colocó en doble bolsa de extracción de polietileno de 2000 y se adicionaron 5 ml más de buffer de extracción.

Previo a la realización de la prueba DAS-ELISA, el protocolo del kit recomienda efectuar sobre el tejido del hospedero sintomático un macerado mecánico. Como se mencionó anteriormente, al no estar especificado en el protocolo del kit su uso en muestras de agua, se decidió evaluar si era necesario macerar mecánicamente dichas muestras. Para tal fin, se realizaron duplicados de cada muestra de agua. La primera muestra fue macerada mecánicamente (M) y la segunda no recibió macerado mecánico (SM).

### **6.2.3. Detección de propágulos en muestras de agua de riego**

La presencia de *Phytophthora* spp., tanto en el ensayo de diluciones como en las muestras de agua de riego, se detectó a nivel genérico a través de pruebas DAS-ELISA (Casper y Mendgen, 1979; Johnson *et al.*, 1982) con kit serológico policlonal Agdia® Inc. (Elkhart, Indiana). Las drogas empleadas se detallan en el protocolo propuesto por el fabricante del kit y el procedimiento utilizado se describe a continuación:

En primer lugar se efectuó la sensibilización de las placas de poliestireno Nunc® de 96 pocillos, colocando 100 µl del anticuerpo de captura 1:200 en cada uno de los pocillos y dejando incubar en estufa a 37°C durante 4 horas. Luego se colocaron 100 µl por pocillo de cada una de las suspensiones contenidas en doble bolsa de extracción obtenidas en etapas anteriores (ver **6.2.1. Tratamiento de las muestras de agua de riego**). La siembra de cada

muestra se realizó por duplicado. Las placas fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y luego fueron enjuagadas 7 veces con buffer de lavado. Se colocaron 100 µl del conjugado de la enzima fosfatasa alcalina en cada pocillo y se repitieron los pasos de incubación y lavado. A continuación se adicionaron 100 µl de sustrato en cada uno de los pocillos y se incubó por 1 hora en oscuridad. Posteriormente se determinaron las absorbancias a los 120 minutos con espectrofotómetro Multiskan MS (Labsystems, Finlandia) a 405 nm. En cada placa de poliestireno se incluyeron testigos negativos (muestra sin antígenos de *Phytophthora* spp.) y testigos positivos (muestra con antígenos de *Phytophthora* spp.) suministrados por el kit, un testigo (T) con agua destilada y un blanco (B) con buffer de extracción.

Se utilizaron en total 3 placas de poliestireno Nunc® de 96 pocillos. Una de las placas se utilizó para el ensayo de diluciones y las dos restantes para el primer y segundo ensayo de riego. El procedimiento detallado anteriormente se aplicó por igual en las tres ocasiones.

### **6.3. Siembra en medio AHM**

Las resuspensiones contenidas en las bolsas de extracción usadas para efectuar el DAS-ELISA también fueron sembradas en AHM. Para ello, se extrajeron 0,2 ml de cada resuspensión, se sembraron en cajas de Petri con AHM y se incubaron a 20°C en oscuridad durante 14 días. Al cabo de este período se identificaron las colonias y se constató con microscopio óptico la presencia de *Phytophthora* spp. siguiendo el criterio utilizado en el punto **3.1. Identificación por morfología y morfometría.**

### **6.4. Técnica de frutos trampa**

Cada muestra de suelo saturado con agua de riego se dividió en tres submuestras de aproximadamente 300 g las cuales fueron transferidas a un contenedor plástico con tapa; luego cada submuestra de suelo fue cubierta con agua destilada. Se enterraron parcialmente de dos a cinco frutos por submuestra (dependiendo de la edad del fruto al momento del ensayo) de manzana 'Granny Smith' y se incubaron a 20°C por catorce días. Al cabo de este período se observó el desarrollo de podredumbres en los frutos. Del margen de las lesiones observadas se extrajeron porciones de tejido y se observó el desarrollo de *Phytophthora* spp. en microscopio óptico siguiendo el criterio utilizado en el punto **3.1. Identificación por morfología y morfometría** (Erwin y Ribeiro, 1996).

## 6.5. Análisis Estadístico

La lectura en espectrofotómetro realizada en la prueba serológica (ver **6.2.3. Detección de propágulos en muestras de agua de riego**) se consideró positiva a *Phytophthora* spp. cuando la absorbancia a 405 nm fue igual o superior al umbral de detección  $X_s$  (Sutula *et al.*, 1986), donde:

$$X_s = X + 2 \delta$$

Siendo:

$X_s$  = Umbral detección. Valores de absorbancia iguales o mayores a  $X_s$  son considerados positivos a *Phytophthora* spp.

$X$  = Media de los testigos negativos o T (-).

$\delta$  = Desvío Estándar de los T(-).

T(-) = Muestra sin antígenos de *Phytophthora* spp. suministrada por el kit.

Los valores de pH y conductividad eléctrica medidos en las muestras de agua de riego fueron relacionados con los valores de absorbancia a través de una prueba F global de hipótesis acerca de la significación de la pendiente.

## 1. INCIDENCIA DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN EL ALTO VALLE ESTE

Si bien en las 29 plantaciones se registraron 301 árboles con síntomas compatibles con los producidos por *Phytophthora* spp. (Fig. 4) sólo se obtuvieron aislamientos positivos de 136 plantas (45%) distribuidas en 10 parcelas según el siguiente detalle: 2 de las 5 relevadas en la localidad de Chichinales (40%), 2 de las 5 relevadas en General E. Godoy (40%) y 6 de las 19 relevadas en Villa Regina (32%) (Tabla I).

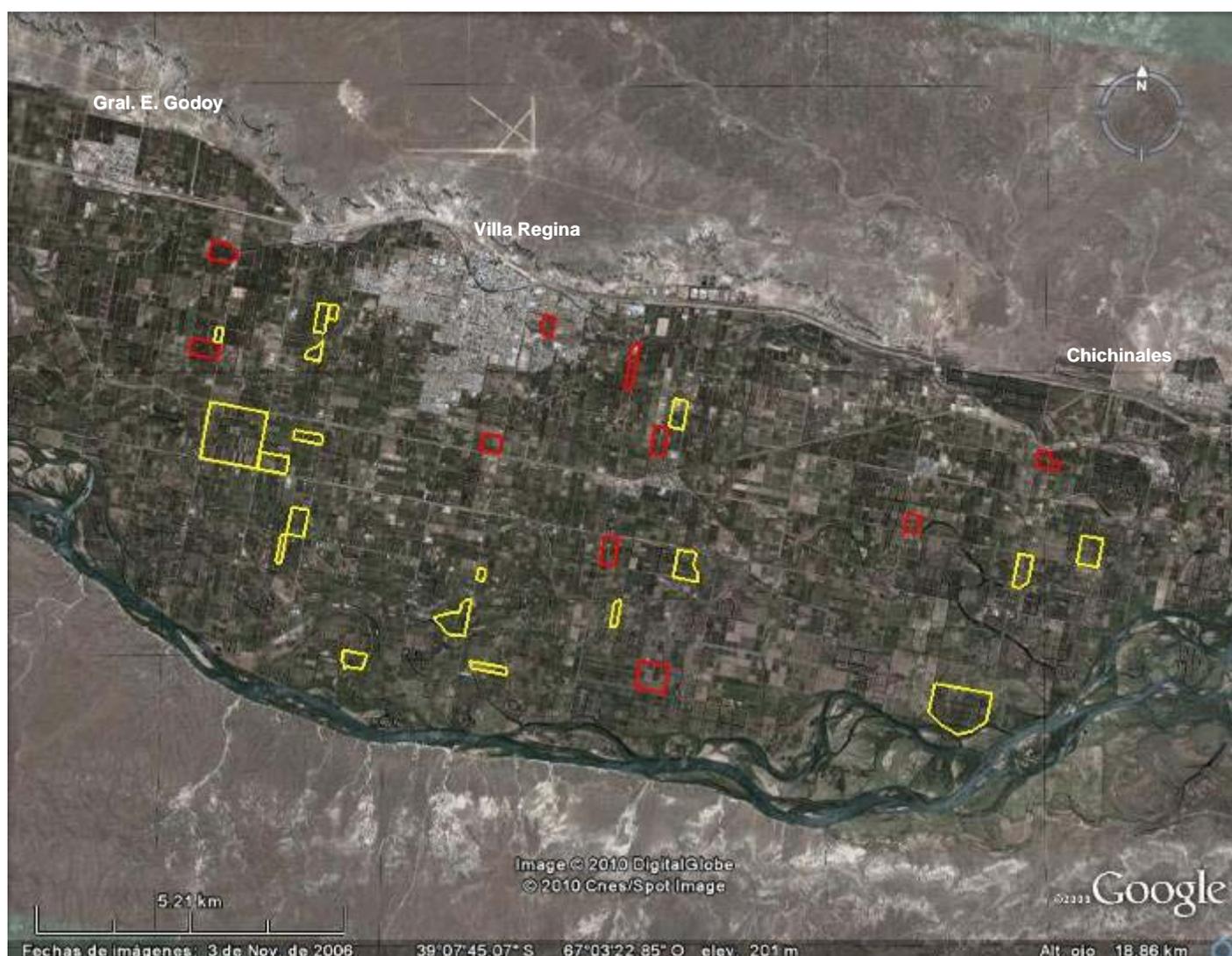


Fig. 4: Imagen satelital (Google Earth) donde se indican las plantaciones comerciales de peral cv. Williams con síntomas compatibles con los causados por *Phytophthora* spp., relevadas en la zona del Alto Valle Este de Río Negro durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009. En color rojo se señalan aquellas plantaciones que dieron positivo a la presencia de *Phytophthora* spp.

El porcentaje de aislados de *Phytophthora* spp. de las plantas con síntomas, en las 10 parcelas mencionadas, presentó variaciones. En las parcelas N°3 (10 plantas), N°12 (8 plantas) y N°24 (77 plantas) fue del 100%. En las 7 plantaciones restantes el porcentaje de aislados osciló entre 12,5% (1 planta 'positiva' de un total de 8 plantas sintomáticas) y 84% (11 plantas 'positivas' de 13 plantas sintomáticas) (Tabla I).

La incidencia mínima fue observada en la parcela N°13 con 0,3% (1 PE de un total de 300 plantas). La incidencia máxima registrada fue del orden del 10,4% (77 PE de un total de 740 plantas) en la parcela N°24. La incidencia media calculada sobre el total de parcelas fue de 2,1% (Tabla I).

Las 10 plantaciones en las que se constató la presencia de *Phytophthora* spp. presentaron árboles en plena producción, de 9 a 16 años de edad (tabla I).

**Tabla I: Plantaciones de peral cv. Williams con síntomas de decaimiento relevadas en el Alto Valle Este.** Ubicación y determinación de la presencia de *Phytophthora* spp. y de su incidencia.

Parcela	Localidad	Muestreo	Coordenadas Google Earth		N° total plantas <sup>a</sup>	Edad plantas (años)	N° PS <sup>b</sup>	N° PE <sup>c</sup>	Incidencia (%) <sup>d</sup>
1	Chichinales	Septiembre 2007	39°08'21"S	66°57'49"O	220	18	3	0	-
2	Villa Regina	Septiembre 2007	39°07'20"S	67°04'59"O	664	9	19	4	0,6
3	Villa Regina	Septiembre 2007	39°08'20"S	67°03'34"O	430	12	10	10	2,4
4	Villa Regina	Septiembre 2007	39°06'38"S	67°03'18"O	946	11	13	8	0,8
5	Villa Regina	Septiembre 2007	39°08'59"S	67°05'22"O	645	15	5	0	-
6	Villa Regina	Septiembre 2007	39°07'04"S	67°02'43"O	370	13	10	0	-
7	Villa Regina	Septiembre 2007	39°06'31"S	67°07'05"O	490	18	13	0	-
8	Villa Regina	Septiembre 2007	39°07'17"S	67°07'09"O	325	13	7	0	-
9	Villa Regina	Septiembre 2007	39°08'24"S	67°05'06"O	970	17	4	0	-
10	Villa Regina	Septiembre 2007	39°08'19"S	67°07'29"O	1200	12	3	0	-
11	Chichinales	Septiembre 2007	39°08'31"S	66°58'37"O	235	9	6	0	-
12	Chichinales	Septiembre 2007	39°07'30"S	66°58'18"O	400	8	8	8	2
13	Villa Regina	Octubre 2007	39°09'21"S	67°06'37"O	1250	7	8	0	-
14	G. Godoy	Octubre 2007	39°05'33"S	67°08'10"O	250	15	7	2	0,8
15	G. Godoy	Octubre 2007	39°06'10"S	67°06'59"O	950	14	3	0	-
16	Villa Regina	Marzo 2008	39°08'04"S	67°07'17"O	275	15	5	0	-
17	Villa Regina	Marzo 2008	39°07'19"S	67°02'58"O	300	16	8	1	0,3
18	Villa Regina	Marzo 2008	39°06'07"S	67°06'52"O	730	6	8	0	-
19	Villa Regina	Abril 2008	39°07'31"S	67°07'34"O	625	25	3	0	-
20	Villa Regina	Abril 2008	39°08'55"S	67°03'29"O	460	24	6	0	-
21	Chichinales	Abril 2008	39°09'47"S	66°59'24"O	270	15	4	0	-
22	G. Godoy	Septiembre 2008	39°07'16"S	67°08'04"O	2860	4	10	0	-
23	Villa Regina	Septiembre 2008	39°09'26"S	67°05'01"O	1250	2	15	0	-
24	G. Godoy	Septiembre 2008	39°06'27"S	67°08'24"O	740	11	77	77	10,4
25	G. Godoy	Septiembre 2008	39°06'19"S	67°08'13"O	100	10	3	0	-
26	Villa Regina	Octubre 2008	39°09'30"S	67°03'03"O	400	13	8	6	1,5
27	Chichinales	Octubre 2008	39°08'05"S	66°59'56"O	1100	14	13	11	1
28	Villa Regina	Octubre 2008	39°06'14"S	67°04'18"O	1250	13	19	9	0,7
29	Villa Regina	Octubre 2008	39°08'29"S	67°02'39"O	200	10	3	0	-
<b>Total</b>					<b>19.235</b>		<b>301</b>	<b>136</b>	<b>2,1<sup>e</sup></b>

<sup>a</sup> N° total de plantas cv. Williams por parcela.

<sup>b</sup> N° de plantas con síntomas de decaimiento compatibles con los causados por *Phytophthora* spp. por parcela.

<sup>c</sup> N° de plantas enfermas (PE) en las que se confirmó la presencia de *Phytophthora* spp.

<sup>d</sup> Incidencia por parcela calculada a partir de la relación entre el N° de plantas enfermas (PE) y el N° total de plantas dentro de cada parcela.

<sup>e</sup> Media aritmética de los valores de incidencia sobre el total de parcelas relevadas.

## 2. RELACIÓN ENTRE PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO Y EL AISLAMIENTO DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL ALTO VALLE ESTE

En 28 de las 29 plantaciones comerciales relevadas se observó que todas las plantas sintomáticas presentaron follaje ralo, clorótico, con enrojecimiento prematuro a fin de verano y debilitamiento de los árboles sintomáticos y sus ramas primarias. En la plantación N°12 no se observó esta sintomatología en la canopia (Tabla II y Fig. 5).

Es importante mencionar que en 17 de las 29 plantaciones se observaron plantas con muerte de ramas principales y/o árboles muertos pero sólo en 7 de estas 17 parcelas se aisló *Phytophthora* spp. (Tabla II: parcelas N°3, N°4, N°14, N°17, N°24, N°27 y N°28) (Tabla II y Fig. 5).

Se debe destacar que las 136 plantas de las que se aisló este microorganismo ('PE') presentaron una podredumbre húmeda, esponjosa ubicada a nivel del cuello (Fig. 6). Sin embargo no se logró aislar el microorganismo de las 165 plantas sintomáticas que presentaron podredumbre de cuello de aspecto seco. Es necesario resaltar que no se observaron podredumbres radicales en las plantas sintomáticas relevadas en las 29 plantaciones (Tabla II).

En 115 de las 136 PE se pudo apreciar olor a fermentado en las lesiones a nivel de cuello. Cabe mencionar que estas plantas se ubicaron en 7 de las 10 parcelas en las que se aisló *Phytophthora* spp. (Tabla II).

Levantando la corteza en la zona donde se observó la podredumbre húmeda a nivel del cuello, se observó tejido necrosado, esponjoso de color marrón a marrón rojizo. En algunos casos la tonalidad de este tejido fue uniforme y en otros se observó la formación vetas o líneas de distinto color que se alternaban, constituyendo un patrón atigrado (Tabla II y Fig. 6).

Si bien en 79 de las 136 PE se observaron exudados acuosos marrón-anaranjados sobre la podredumbre, estas plantas se ubicaron sólo en 2 de las 10 plantaciones (Tabla II: parcelas N°14 y N°24) (Fig. 6).

Tabla II: Síntomas observados en las plantaciones de peral cv. Williams relevadas en el Alto Valle Este durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009.

Parcela	Clorosis y enrojecimiento prematureo follaje <sup>z</sup>	Debilitamiento de árboles <sup>z</sup>	Muerte			Podredumbre radical <sup>z</sup>	Olor a fermentado <sup>z</sup>	Exudados <sup>z</sup>
			de árboles y/o ramas <sup>z</sup>	Podredumbre de cuello húmeda <sup>z</sup>	Podredumbre de cuello seca <sup>z</sup>			
1	+	+	-	-	+	-	-	-
2	+	+	-	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	+	-	+	-
5	+	+	-	-	+	-	-	-
6	+	+	+	-	+	-	-	-
7	+	+	-	-	+	-	-	-
8	+	+	+	-	+	-	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-	-
10	+	+	+	-	+	-	-	-
11	+	+	+	-	+	-	-	-
12	-	-	-	+	-	-	-	-
13	+	+	-	-	+	-	-	-
14	+	+	+	+	+	-	+	+
15	+	+	-	-	+	-	-	-
16	+	+	-	-	+	-	-	-
17	+	+	+	+	+	-	+	-
18	+	+	-	-	+	-	-	-
19	+	+	+	-	+	-	-	-
20	+	+	+	-	+	-	-	-
21	+	+	+	-	+	-	-	-
22	+	+	+	-	+	-	-	-
23	+	+	+	-	+	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	+	+
25	+	+	+	-	+	-	-	-
26	+	+	-	+	+	-	+	-
27	+	+	+	+	+	-	+	-
28	+	+	+	+	+	-	-	-
29	+	+	-	-	+	-	-	-

<sup>z</sup> Las categorías (+) y (-) indican la presencia y ausencia, respectivamente, del síntoma observado por inspección visual en al menos 1 planta sintomática dentro de la parcela relevada.



**Fig. 5:** Síntomas en la canopia de plantas sintomáticas observados en las plantaciones comerciales relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009. **A** enrojecimiento prematuro del follaje en otoño; **B** Debilitamiento de ramas principales; **C** y **D** muerte de ramas principales y árboles.



**Fig. 6:** Síntomas en el tronco y ramas de plantas sintomáticas que dieron positivo a la presencia de *Phytophthora* spp. en las plantaciones comerciales de peral cv. Williams relevadas durante las temporadas 2007/2008 y 2008/2009. **A, B, C** podredumbre húmeda a nivel del cuello; **D** tejido en la zona de avance de la podredumbre de color uniforme (quitando la corteza); **E, F, G** tejido en la zona de avance de la podredumbre formando líneas o vetas concéntricas (patrón atigrado); **H, I** exudados marrón rojizos presentes sobre la podredumbre de cuello.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS DE *PHYTOPHTHORA*

#### 3.1. Identificación por morfología y morfometría

**3.1.1. Características de la colonia:** La forma de las colonias fue finamente radiada con bordes no definidos en todos los casos. El grado de compactación en la mayoría de los casos fue difuso, observándose algunas colonias más compactas. El crecimiento aéreo fue reducido debido a la formación de hifas cortas.

**3.1.2. Características miceliares:** Los aislados observados formaron micelio no tabicado, con presencia de estrangulaciones en la base de las ramificaciones. No se observaron protuberancias hifales o 'swellings'. El ancho medio de las hifas se detalla a continuación (Tabla III).

**3.1.3. Estructuras asexuales:** Es importante resaltar que el 100% de los esporangios obtenidos en solución de extracto de suelo no estéril al 1% resultaron caducos con pedicelos cortos. Asimismo, todos los esporangios presentaron un ápice papilado, confiriéndole la forma característica de limón. La forma predominante observada fue ovoide o limoniforme; también se observaron esporangios globosos (Tabla III y Fig. 7).

**3.1.4. Estructuras sexuales:** El 100% de los anteridios formados en medio AHM presentó una configuración parágina. Las dimensiones de los anteridios, oogonios y oosporas formados en AHM se detallan a continuación (Tabla III). Las oosporas observadas fueron apleróticas, es decir que no llenaron toda la cavidad oogonial.

**3.1.5. Estructuras de resistencia:** No se observó la formación de clamidosporas en ninguno de los aislados obtenidos en AHM.

Cabe destacar que las características morfológicas y morfométricas observadas en todos los aislados en el presente trabajo corresponden a *Phytophthora cactorum*.

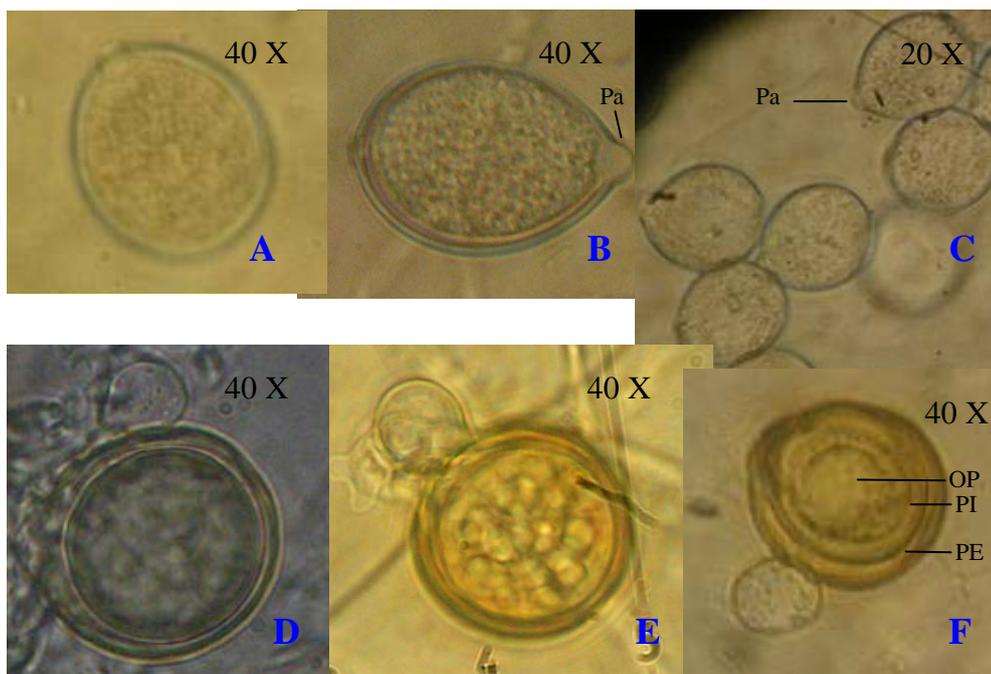
**Tabla III: Caracteres morfométricos de *Phytophthora* spp. observados en los aislados obtenidos de las diez parcelas en las que se detectó la presencia del microorganismo.** Los valores corresponden a la media  $\pm$  el Rango expresados en  $\mu\text{m}$ .

Parcela	Hifas		Esporangios <sup>xy</sup>			Oogonios	Oosporas	Anteridios <sup>xz</sup>	
	Ancho	Largo	Ancho	Relación largo:ancho	Longitud pedicelo	Diámetro <sup>xz</sup>	Diámetro <sup>xz</sup>	Largo	Ancho
2	4,7 (2,7 – 7,1)	34,2 (27,5 - 40,0)	27,4 (15,0 - 30,0)	1,2 (1,1 - 2,2)	2,6 (2,5 – 2,7)	30,0 (27,5 - 35,0)	25,0 (22,1 – 27,4)	13,7 (12,5 - 15,0)	7,8 (6,5 – 9,0)
3	3,9 (2,9 – 6,5)	34,5 (25,0 - 42,5)	22,5 (15,0 - 30,0)	1,5 (1,3 - 2,3)	3 (2,5 – 3,5)	29,2 (22,5 - 37,5)	26,1 (21,0 – 27)	14,3 (13,2 - 15,0)	8,7 (6,3 - 10,0)
4	5,3 (4,3 – 5,8)	36,6 (29,0 – 43,7)	27,5 (25,5 - 29,8)	1,3 (1,2 - 1,7)	2,7 (2,5 – 4,0)	35,0 (32,5 - 37,5)	27,3 (24,5 – 27,7)	14,6 (12,9 - 15,0)	7,4 (6,2 – 8,6)
12	4,5 (3,7 – 6,2)	38,9 (22,5 - 60,0)	32,8 (20,0 - 42,5)	1,2 (1,0 - 1,5)	3,5 (2,7 – 4,5)	32,8 (27,5 - 45,0)	24,7 (22,3 – 28,0)	13,1 (10,0 - 15,0)	7,9 (6,5 – 9,1)
14	4,1 (2,2 – 7,4)	37,8 (22,5 - 45,0)	33,1 (20,0 - 42,5)	1,1 (1,0 - 1,3)	3,0 (2,5 – 5,0)	30,5 (25,0 - 35,0)	25,3 (23,1 – 27,0)	13,3 (12,5 – 14,9)	8,5 (6,3 – 9,4)
17	3,7 (2,1 – 4,6)	36,7 (23,7 – 49,1)	26,7 (19,5 – 38,0)	1,4 (1,0 – 1,4)	2,8 (2,6 – 4,9)	35,5 (21,5 - 50,0)	28,1 (20,8 – 29,3)	12,3 (12,1 - 14,5)	7,4 (6,0 – 8,9)
24	4,6 (3,7 – 6,0)	39,2 (24,0 – 55,1)	33,9 (16,9 – 37,7)	1,2 (1,1 – 1,7)	3,4 (2,8 – 4,9)	30,8 (29,2 – 33,1)	22,4 (21,8 – 27,1)	13,4 (10,5 – 14,1)	8,1 (6,9 – 9,3)
26	4,9 (3,3 – 6,7)	37,3 (22,8 – 48,5)	31,1 (22,0 – 40,7)	1,2 (1,0 – 1,3)	3,0 (2,5 – 4,4)	32,5 (29,9 – 32,6)	23,3 (22,4 – 24,7)	12,5 (12,3 - 15,0)	9,0 (8,8 - 10,0)
27	3,9 (3,1 – 5,9)	38,7 (23,1 – 54,0)	32,9 (21,9 – 33,1)	1,2 (1,1 – 1,6)	2,9 (2,6 – 5,0)	34,4 (25,1 – 43,5)	27,7 (24,1 – 28,4)	13,1 (10,6 – 14,3)	7,5 (6,6 – 8,9)
28	4,0 (2,9 – 5,8)	37,9 (22,6 – 55,0)	32,7 (23,1 – 36,9)	1,2 (1,1 – 1,4)	3,1 (2,9 – 4,1)	32,3 (28,2 – 39,7)	29,0 (27,9 – 29,9)	12,0 (11,1 – 13,5)	7,6 (6,7 – 8,7)

<sup>x</sup> Una planta enferma (PE) fue considerada como un aislado durante la caracterización morfológica.

<sup>y</sup> Mediciones realizadas sobre 30 esporangios por aislado de 5 aislados por parcela. En aquellas parcelas con menos de 5 aislados (5 PE), se observaron 150 esporangios por parcela. Las mediciones se efectuaron a los 5, 7 y 14 días luego de permanecer en oscuridad a 20°C en AHM.

<sup>z</sup> Mediciones realizadas sobre 10 oogonios, 10 oosporas y 10 anteridios por aislado de 5 aislados por parcela. En aquellas parcelas con menos de 5 aislados (5 PE), se observaron 50 oogonios, 50 oosporas y 50 anteridios por parcela. Las mediciones se efectuaron a los 5, 7 y 14 días luego de permanecer en oscuridad a 20°C en AHM.



**Fig. 7: Características de las estructuras asexuales y sexuales observadas.**  
**A, B, C** esporangios caducos con pedicelo corto y papila prominente (**Pa**) de *P. cactorum*; **A** esporangio solitario ovoide; **B** esporangio solitario limoniforme; **C** grupo de esporangios; **D y E** oogonios con anteridios paráginos (ubicados lateralmente al oogonio); **F** oospora aplerótica conformada por un ooplasto (**OP**), una pared interna (**PI**) y una pared externa (**PE**).

#### 4. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PERAL cv. WILLIAMS

##### 4.1. Área de estudio y material experimental

Las dos plantaciones de peral cv. Williams seleccionadas para realizar este estudio fueron las parcelas N°3 y N°4 de la tabla I - de aquí en adelante denominadas 'Plantación N°1' y 'Plantación N°2' – ya que presentaron mayor grado de desarrollo medio de podredumbre y mayor tamaño poblacional de las PE. En la Plantación N°1 se logró aislar *P. cactorum* de 10 plantas sintomáticas, las cuales presentaron un grado de desarrollo medio de podredumbre de cuello de 94,1 cm. En la Plantación N°2, este microorganismo fue aislado de 8 plantas sintomáticas, las que registraron un grado de desarrollo de podredumbre de 177,6 cm (Tabla IV).

**Tabla IV: Grado de desarrollo de la podredumbre de cuello (cm) en las plantas enfermas relevadas en las plantaciones N°1 y N°2.** Grado de desarrollo medio de la podredumbre por parcela, tamaño poblacional de plantas sintomáticas, plantas enfermas y total de plantas por parcela. Temporada 2007/2008.

N° planta	Podredumbre (cm) <sup>a</sup>	
	Plantación N°1	Plantación N°2
1	68	196
2	77	300
3	45	215
4	184	61
5	178	254
6	67	70
7	134	244
8	81	81
9	56	-
10	51	-
<b>Media<sup>b</sup></b>	<b>94,1 ± 16,4</b>	<b>177,6 ± 33,1</b>
<b>N° PE<sup>c</sup></b>	<b>10</b>	<b>8</b>
<b>N° PS<sup>d</sup></b>	<b>10</b>	<b>13</b>
<b>N° total<sup>e</sup></b>	<b>430</b>	<b>946</b>

<sup>a</sup> Grado de desarrollo de la podredumbre de cuello, medida en cm, de las plantas sintomáticas en las cuales se confirmó la presencia de *P. cactorum* (PE).

<sup>b</sup> Media ± error estándar de 10 y 8 plantas para las plantaciones N°1 y N°2 respectivamente.

<sup>c</sup> N° de PE por parcela.

<sup>d</sup> N° de plantas con síntomas de decaimiento compatibles con los causados por *P. cactorum* por parcela.

<sup>e</sup> N° total de plantas cv. Williams por parcela.

El tipo de suelo de las dos plantaciones utilizadas en el estudio se caracterizó mediante análisis de pH, textura, conductividad eléctrica (c.e.) en el extracto de saturación, materia orgánica (M.O.), capacidad de intercambio catiónico (CIC), relación de adsorción de sodio (RAS) y sales solubles. Se detallan a continuación las principales características de las parcelas seleccionadas (Tabla V).

**Tabla V: Principales características de las parcelas de peral cv. Williams empleadas en el estudio.**

<b>Característica</b>	<b>Plantación N° 1</b>	<b>Plantación N° 2</b>
Portainjerto	Franco	Franco
Año de plantación	1995	1996
Marco plantación (m)	4 x 2	4 x 2
Número plantas	430	586
Superficie	0,34 ha	0,47 ha
Sistema conducción	Espaldera	Espaldera
Orientación de las filas	E-O	E-O
Tipo de riego	Manto	Surcos
Defensa heladas	Aspersión	Aspersión
Textura suelo	Franco-limoso (media)	Franco-limoso (media)
pH pasta suelo	8,04 (moderadamente alcalino)	7,5 (moderadamente alcalino)
C.E. (dS/m) suelo	0,6 (no salino)	1,4 (no salino)
RAS suelo	1,4 (no sódico)	1,8 (no sódico)
M.O. (%) suelo	2,8 (medianamente provisto)	2,8 (medianamente provisto)

Es relevante mencionar que las plantas enfermas de la plantación N°1 registraron en promedio un grado 3 (intermedio) de severidad de la enfermedad mientras que las PE de la plantación N°2 presentaron en promedio un grado más avanzado (grado 4 o terminal) (Tabla VI).

**Tabla VI: Grado de severidad de las cinco plantas enfermas seleccionadas en las plantaciones N°1 y N°2.** Grado de desarrollo de la podredumbre de cuello y cantidad de ramas con podredumbre y/o muertas.

	Plantas enfermas <sup>y</sup>									
	Plantación N°1					Plantación N°2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>Podredumbre (cm)</b>	68	77	45	184	178	196	300	215	61	254
<b>Ramas con podredumbre y/o muertas</b>	0	3	2	10	2	9	5	4	8	7
<b>Grado<sup>z</sup></b>	2	2-3	3	3-4	3	3-4	4	4	3-4	4

<sup>y</sup> Plantas enfermas seleccionadas al azar en cada parcela, correspondientes a las 5 primeras plantas descritas en la Tabla IV.

<sup>z</sup> Grado de severidad determinado a partir de la siguiente escala (adaptada de Utkhede y Smith, 1996): grado 1=sano (sin infección); grado 2=initial (menos de ¼ del tronco con podredumbre y ausencia de ramas primarias con podredumbre o muertas); grado 3=intermedio (¼ a ½ del tronco con podredumbre y al menos una rama primaria con podredumbre o muerta); grado 4=terminal (más de ½ del tronco con podredumbre y varias ramas primarias con podredumbre o muertas); grado 5=muerto.

## 4.2. Análisis de las alteraciones inducidas en el crecimiento vegetativo y en la productividad

### 4.2.1. Área seccional del tronco (AST)

No se detectaron diferencias significativas entre las medias del AST (cm<sup>2</sup>) de las plantas enfermas (PE) y de las plantas asintomáticas (PA) en la plantación N°1, durante la primera temporada de estudio. A pesar de que en la segunda temporada la media de las PE presentó una reducción del 14% respecto de la media de las PA, esta diferencia no llegó a ser significativa (Tabla VIII).

En la plantación N°2 ocurrió una situación similar, ya que la media del AST de las PE presentó una disminución respecto de la media de las PA del 17% en la primera temporada y si bien esta reducción se acentuó en la segunda temporada (llegando al 26%), en ninguno de los dos casos se obtuvieron diferencias significativas (Tabla VIII).

Es importante destacar que al comparar el incremento medio en el AST logrado entre las dos temporadas de estudio, se verificó que el aumento medio registrado por las PE fue 68%

y 74% menor al logrado por las PA en las plantaciones N°1 y N°2 respectivamente. Efectivamente, el incremento medio del AST en la plantación N°1 fue de **7,2 cm<sup>2</sup>** en las PE y de **22,9 cm<sup>2</sup>** en las PA (p-valor KW 0,0397). Mientras que en la plantación N°2 se registró un aumento medio de **5,1 cm<sup>2</sup>** en las PE y de **19,5 cm<sup>2</sup>** en las PA, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas en este último caso debido a la elevada variabilidad de los datos (p-valor KW 0,1429) (Tabla VII).

**Tabla VII: Efecto de *Phytophthora cactorum* sobre el incremento medio del AST entre las temporadas 2007/2008 y 2008/2009 de perales cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2.**

Plantación	Grupo	Incremento AST <sup>z</sup> (cm <sup>2</sup> )
N°1	PA	22,9 ± 11,4
	PE	7,2 ± 0,7
		**
	<i>p-valor</i>	0,0397
N°2	PA	19,5 ± 9,6
	PE	5,1 ± 2,8
		NS
	<i>p-valor</i>	0,1429

PA y PE: Plantas Asintomáticas y Plantas Enfermas respectivamente.

<sup>z</sup> Los valores representan la media ± e.e de 5 plantas por grupo (PA y PE) y por plantación comercial.

*p-valor*: Probabilidad asociada al estadístico F, que determina si existen o no diferencias significativas en el análisis de varianza.

NS y \*\*: No significativo y significativo con *p-valor* <0,05 respectivamente según prueba de Kruskal-Wallis.

#### 4.2.2. Producción de frutos

Las PE de la plantación N°1 presentaron una menor cantidad de frutos por planta respecto de las PA en las dos temporadas de ensayo. La reducción media en la producción de frutos (N° frutos/planta) en las PE fue de 28% y de 69% en la primera y segunda temporada respectivamente (Tabla VIII).

En la plantación N°2 no se registraron diferencias significativas entre valores de producción de frutos de PA y PE en la primera temporada. Sin embargo, en la segunda temporada las PE registraron una disminución media de 64% en la cantidad de frutos por árbol. Es importante destacar que en esta temporada la producción de frutos de las PA se redujo de 196,2 a 94,2 frutos/árbol. Esta marcada reducción en el rendimiento de todas las plantas de la

parcela N°2 podría deberse a que se registró una falla en el funcionamiento del sistema de aspersión para defensa contra heladas durante la ocurrencia de dos heladas tardías en 2009, lo cual podría haber provocado la muerte de frutos recién cuajados a causa de las bajas temperaturas (Tabla VIII).

#### **4.2.3. Carga frutal**

En general no se detectaron diferencias significativas entre valores de carga frutal (N° frutos/cm<sup>2</sup> AST) de PA y PE en la primera temporada, si bien las PE de la plantación N°1 registraron una reducción media de 21% en la carga frutal (Tabla VIII).

En la segunda temporada, las PE de las dos plantaciones registraron una menor carga frutal respecto de las PA. En la plantación N°1 la reducción media de la carga frutal en las PE fue de 64% y en la plantación N°2 de 57%. Cabe aclarar que en esta última plantación, la carga frutal de las PA disminuyó de 1,9 a 0,7 frutos/ cm<sup>2</sup>, lo cual se explica debido a la reducción en la cantidad de frutos/planta registrada en esa temporada y en esa parcela (ver **4.2.2. Producción de frutos**) (Tabla VIII).

#### **4.2.4. Rendimiento**

El rendimiento fue evaluado durante la segunda temporada de estudio. En ambas plantaciones se observó una reducción en el rendimiento medio (kg/planta) en las PE. La plantación N°1 presentó una disminución de 70% mientras que en la plantación N°2 la merma registrada fue de 60%. En esta última plantación se observó que el rendimiento medio de las PA también fue bajo (17,8 kg/planta) respecto a los valores esperados para una plantación de estas características. Este efecto fue evidenciado en la producción de frutos y en la carga frutal (ver **4.2.2. Producción de frutos**) (Tabla VIII).

Tabla VIII: Efecto de *Phytophthora cactorum* sobre el crecimiento y la productividad de perales cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.

Temporada	Plantación	Grupo	AST <sup>z</sup> (cm <sup>2</sup> )	Producción frutos <sup>z</sup> (Nº frutos/planta)	Carga frutal <sup>z</sup> (Nº frutos/ cm <sup>2</sup> )	Rendimiento <sup>z</sup> (Kg/planta)
2007/2008	N°1	PA	106,8 ± 11,6	275 ± 11,1	2,8 ± 0,4	DNE
		PE	104,3 ± 13,2	198 ± 30,4	2,2 ± 0,3	DNE
		<i>p</i> -valor	NS	**	NS	
	N°2	PA	109,1 ± 14,4	196,2 ± 19,3	1,9 ± 0,4	DNE
		PE	90,7 ± 8,6	202 ± 16,5	2,3 ± 0,2	DNE
		<i>p</i> -valor	NS	NS	NS	
2008/2009	N°1	PA	129,7 ± 11,4	341,6 ± 20,5	2,8 ± 0,4	61,0 ± 4,7
		PE	111,5 ± 13,2	104,2 ± 35,7	1,0 ± 0,3	18,2 ± 6,4
		<i>p</i> -valor	NS	**	**	**
	N°2	PA	128,6 ± 13,0	94,2 ± 19,4	0,7 ± 0,1	17,8 ± 3,5
		PE	95,8 ± 6,9	34,2 ± 12,9	0,3 ± 0,1	7,1 ± 2,4
		<i>p</i> -valor	NS	**	**	**

PA y PE: Plantas Asintomáticas y Plantas Enfermas respectivamente.

<sup>z</sup> Los valores representan la media ± e.e de 5 plantas por grupo (PA y PE) y por plantación comercial.

*p*-valor: Probabilidad asociada al estadístico F, que determina si existen o no diferencias significativas en el análisis de varianza.

DNE: Datos no evaluados

NS y \*\*: No significativo y significativo con *p*-valor <0,05 respectivamente según test de Tukey.

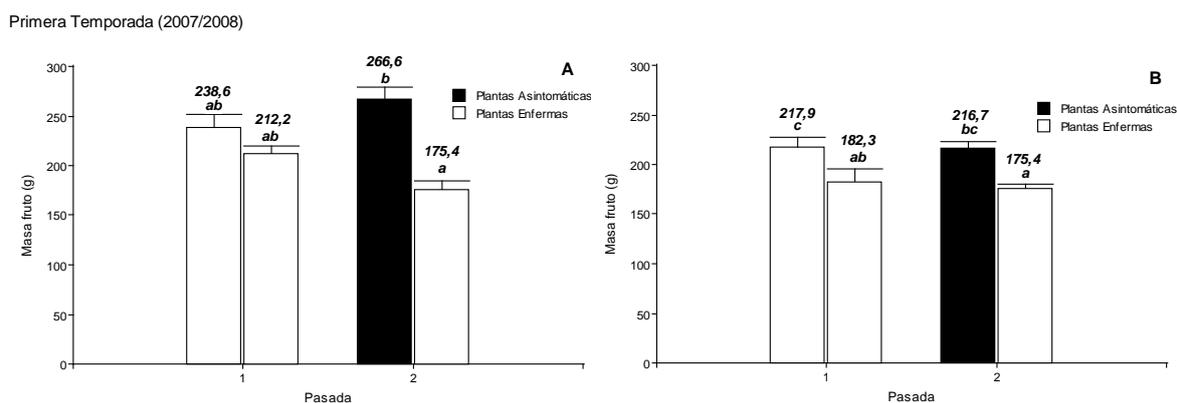
## 5. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PERAL cv. WILLIAMS

### 5.1. Evaluación de los índices de calidad y de madurez

#### 5.1.1. Tamaño de frutos

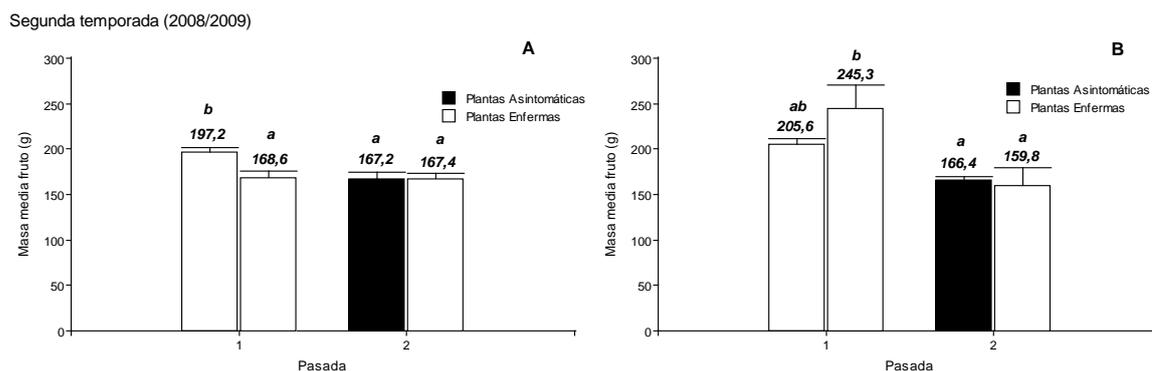
##### 5.1.1.1. Masa

En la primera temporada la masa media de los frutos de PE presentó una reducción significativa que se evidenció en las dos plantaciones. En la plantación N°1, la disminución en la masa media de los frutos de PE fue de 26,4 g y de 91,2 g en la primera y segunda pasada de cosecha respectivamente, sin embargo, esta diferencia resultó significativa sólo en la segunda pasada (p-valor 0,0078) (Fig. 8A). En la plantación N°2, los frutos de PE registraron una reducción en la masa media de 35,6 g y 41,3 g en la primera y en la segunda pasada de cosecha respectivamente (p-valor 0,0015) (Fig. 8B).



**Fig. 8: Masa de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A) y N°2 (B). Temporada 2007/2008.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas o 'PA', Plantas Enfermas o 'PE'), por pasada de cosecha y por parcela. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test de Tukey.

En la segunda temporada sólo se observaron diferencias significativas en la primera pasada respecto a los valores de masa media de frutos de PA y PE en la plantación N°1 (p-valor 0,0009). En esta pasada los frutos de las PE registraron una reducción en la masa media de 28,6 g (Fig. 9A). En la plantación N°2 no se detectaron diferencias significativas en ninguna pasada, si bien en la primera pasada los frutos de PE registraron un aumento en la masa media de 39,7 g respecto de los frutos de las PA (p-valor 0,2832) (Fig. 9B).

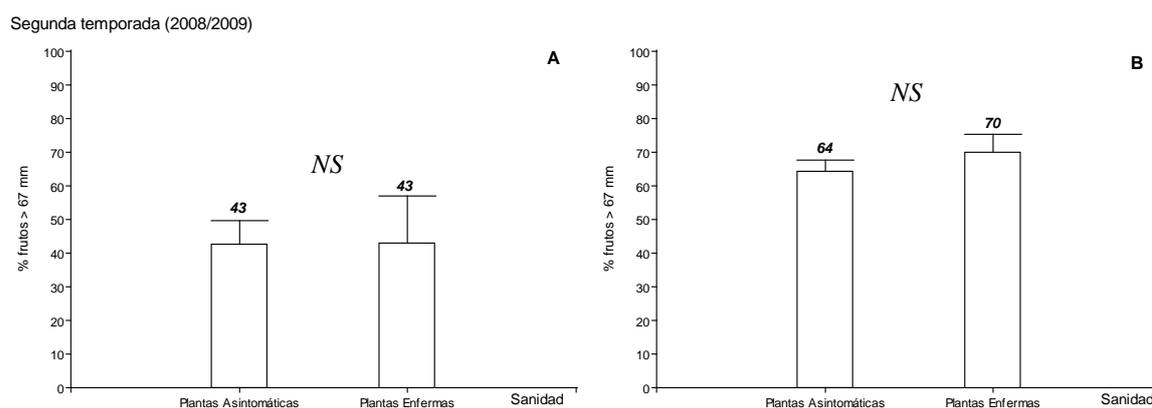


**Fig. 9: Masa media de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A) y N°2 (B). Temporada 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e del total de frutos por árbol de 5 árboles por grupo (PA, PE) y por parcela.

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test de Tukey.

#### 5.1.1.2. Diámetro superior a 67 mm

El diámetro de los frutos fue medido en la segunda temporada de estudio. Cabe mencionar que no se registraron diferencias significativas entre PA y PE en el porcentaje de frutos con diámetro mayor a 67 mm en las plantaciones N°1 ( $p$ -valor 0,9801) y N°2 ( $p$ -valor 0,3893). Sin embargo, las PE de la plantación N°2 presentaron 6% más frutos con diámetro superior a 67 mm, concordando con los valores de masa observados (ver **5.1.1.1. Masa**) (Fig. 10).



**Fig. 10: Porcentaje de frutos con diámetro mayor a 67 mm de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A) y N°2 (B). Temporada 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e del total de frutos/planta de 5 plantas por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas) por parcela.

NS: No significativo según test de Tukey.

### 5.1.2. Presencia de defectos en los frutos

En general la incidencia del 'asoleamiento' en las PE durante la segunda temporada puede considerarse baja (menor del 2% de frutos afectados).

En la plantación N°2 se registró una mayor frecuencia de frutos 'asoleados' en las PE (1,9%) en relación a las PA (0,1%). Cabe mencionar que en esta plantación el grado de afectación por *P. cactorum* fue más elevado que en la plantación N°1 (Tabla IX).

La frecuencia de aparición de frutos afectados por daños de heladas fue mayor en las PE que en las PA, en ambas plantaciones. En promedio, las PE presentaron 6,4% y 9,9% de los frutos con daños de heladas, en las plantaciones N°1 y N°2 respectivamente (Tabla IX).

**Tabla IX: Porcentaje de frutos 'asoleados' y de frutos con daños de heladas de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporada 2008/2009.**

Plantación	Grupo	Frutos 'asoleados' <sup>z</sup> (%)	Frutos con daños de heladas <sup>z</sup> (%)
N°1	PA	0,6	2,7
	PE	0,2	6,4
	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	NS	**
	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	0,2	8,2
N°2	PA	0,1	3,6
	PE	1,9	9,9
	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	**	**
	<i>Chi</i> <sup>2</sup>	5,9	8,9

<sup>z</sup> Los valores representan la media del total de frutos/planta de 5 plantas por grupo (PA, PE) por parcela. NS y \*\*: No significativo y significativo con p-valor <0,05 respectivamente según prueba  $\chi^2$ .

### 5.1.3. Color de la epidermis de frutos

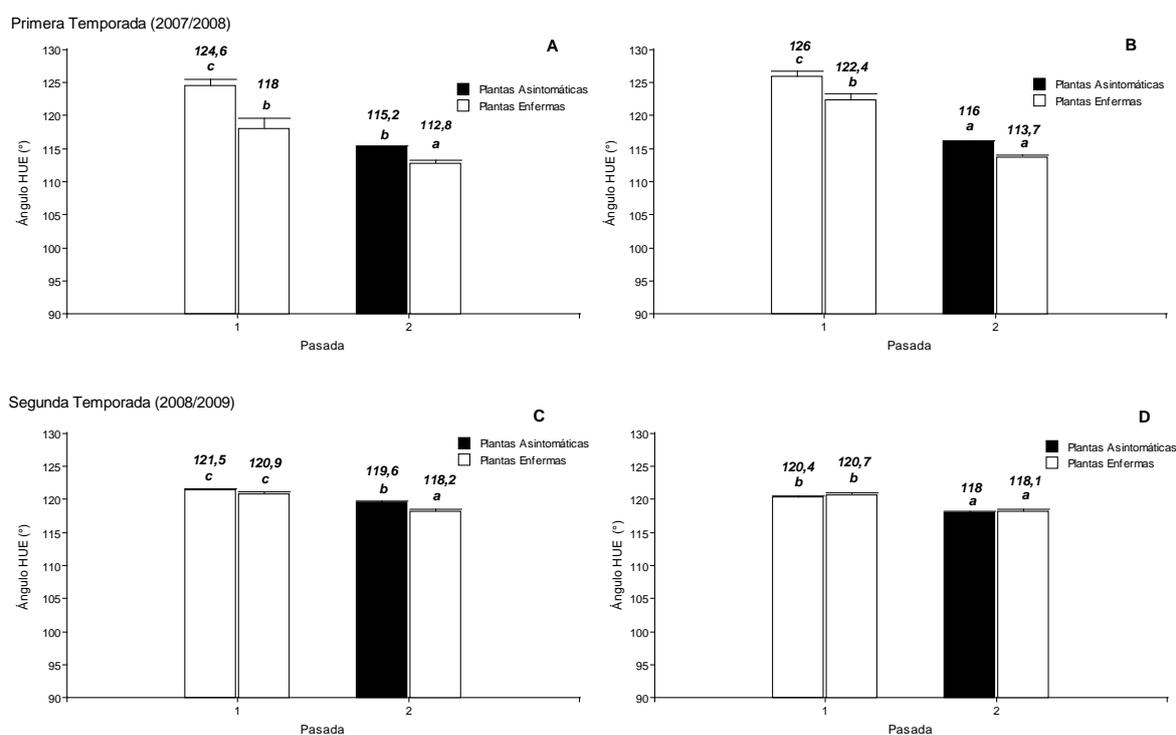
En general los frutos provenientes de las PE presentaron menores valores de HUE, y por ende mayor tonalidad amarilla, respecto de los frutos de PA.

En la plantación N°1, las diferencias en la tonalidad de la epidermis de frutos de PA y PE se manifestaron en ambas pasadas de cosecha durante la primera temporada (p-valor < 0,0001). En esa temporada los frutos de PA presentaron un HUE medio de 119,9° mientras que los frutos de PE registraron 115,4° de HUE (Fig. 11A). En la plantación N°2 también se detectaron diferencias significativas en la tonalidad de la epidermis de frutos cosechados de PA

y de PE ( $p$ -valor  $< 0,0001$ ). Si bien los frutos provenientes de PE presentaron una epidermis con mayor tonalidad amarilla (HUE medio  $118,5^\circ$ ) respecto de los frutos de PA (HUE medio  $121^\circ$ ), estas diferencias fueron significativas sólo en la primera pasada de cosecha (Fig. 11B).

Cabe mencionar que en la plantación N°1 sólo se detectaron diferencias significativas en la tonalidad en la segunda pasada de cosecha ( $p$ -valor  $< 0,0001$ ) durante la segunda temporada. En esta pasada, los frutos de PE presentaron un HUE medio de  $118,2^\circ$  mientras que los frutos provenientes de PA registraron un HUE de  $119,6^\circ$  (Fig. 11C). En la plantación N°2 no se registraron diferencias significativas en el color de la epidermis de frutos cosechados de PA y de PE en ambas pasadas de cosecha ( $p$ -valor  $0,3815$ ) (Fig. 11D).

Es importante destacar que en los casos en los que se detectaron diferencias en la tonalidad de la epidermis de los frutos, los valores de HUE se mantuvieron dentro del rango de color verde pálido en función a la escala propuesta por Calvo y Sozzi (2009).



**Fig. 11: Color de la epidermis (ángulo HUE) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A y C) y N°2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e. de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (PA, PE), por pasada de cosecha y por parcela. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba de Kruskal-Wallis.

#### **5.1.4. Firmeza de la pulpa**

En general los frutos que fueron cosechados de PE registraron mayores valores de firmeza de la pulpa (N) que aquellos frutos provenientes de PA.

En la primera temporada, los frutos de PE de la plantación N°1 presentaron un aumento en la firmeza de la pulpa de 1,5 N y 4 N en la primera y segunda pasada de cosecha respectivamente, si bien este aumento resultó significativo sólo en la segunda pasada (p-valor 0,0071) (Tabla X). Es importante resaltar que si bien estos frutos también presentaron una reducción de la masa media, esta disminución fue significativa en la segunda pasada de cosecha (Tabla X y Fig. 8). Cabe destacar que a pesar de los frutos de PE de la plantación N°2 presentaron un incremento medio de la firmeza de la pulpa de 1 N (0,22 lb), este aumento no fue significativo (p-valor 0,3204) (Tabla IX). En este caso la masa media de los frutos de PE fue significativamente menor que la de los frutos de PA en las dos pasadas (Tabla X y Fig. 8).

En la segunda temporada, la magnitud de las diferencias en la firmeza media de la pulpa de frutos de PE y de PA fue mayor que en la temporada anterior. Los frutos de PE de la plantación N°1 registraron en la segunda temporada una firmeza media de la pulpa de 84,7 N mientras que los frutos de PA presentaron una firmeza media de 74,2 N (p-valor < 0,0001) (Tabla X). Si bien en ambas pasadas los frutos de PE registraron una disminución en la masa, ésta fue significativa en la primera pasada de cosecha (Tabla X). En el caso de la plantación N°2, los frutos provenientes de PE presentaron un incremento de la firmeza de la pulpa de 2,4 N y 4,1 N en la primera y segunda pasada respectivamente, si bien este aumento fue significativo sólo en la segunda pasada (p-valor 0,0001) (Tabla X). Algo similar ocurrió con la masa media de estos frutos ya que si bien se observó una reducción en la masa de frutos de PE, estas diferencias no fueron significativas (Tabla X).

**Tabla X: Firmeza (N) y masa de los frutos (g) de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.**

Temporada	Plantación	Pasada	Grupo	Firmeza <sup>y</sup> (N)	Masa <sup>z</sup> (g)		
2007/2008	N°1	1	PA	85,1 ± 0,9	bc	238,6 ± 13,3	ab
			PE	86,6 ± 1,2	c	212,2 ± 7,3	ab
		2	PA	78,9 ± 0,7	a	266,6 ± 12,6	b
			PE	82,9 ± 1,0	b	175,4 ± 9,6	a
	N°2	1	PA	89,7 ± 0,9	a	217,9 ± 9,5	c
			PE	90,8 ± 1,0	a	182,3 ± 12,9	ab
		2	PA	87,5 ± 0,9	a	216,7 ± 6,8	bc
			PE	88,3 ± 1,0	a	175,4 ± 4,8	a
2008/2009	N°1	1	PA	76,9 ± 0,5	c	213,1 ± 3,3	c
			PE	81,6 ± 0,6	b	197,5 ± 2,9	b
		2	PA	71,6 ± 0,5	a	181,9 ± 3,2	a
			PE	73,9 ± 0,6	b	177,3 ± 2,8	a
	N°2	1	PA	82,9 ± 0,7	b	226,8 ± 3,4	b
			PE	85,3 ± 0,9	b	221,8 ± 5,1	b
		2	PA	78,2 ± 0,6	a	172,6 ± 3,6	a
			PE	82,3 ± 1,2	b	166,5 ± 4,8	a

PA y PE: Plantas Asintomáticas y Plantas Enfermas respectivamente.

<sup>y</sup> Los valores representan la media ± e.e de 2 mediciones por fruto de 20 frutos por planta de 5 plantas por grupo (PA y PE), por pasada de cosecha y por parcela.

<sup>z</sup> Los valores representan la media ± e.e de 20 frutos por planta de 5 plantas por grupo (PA y PE), por pasada de cosecha y por parcela.

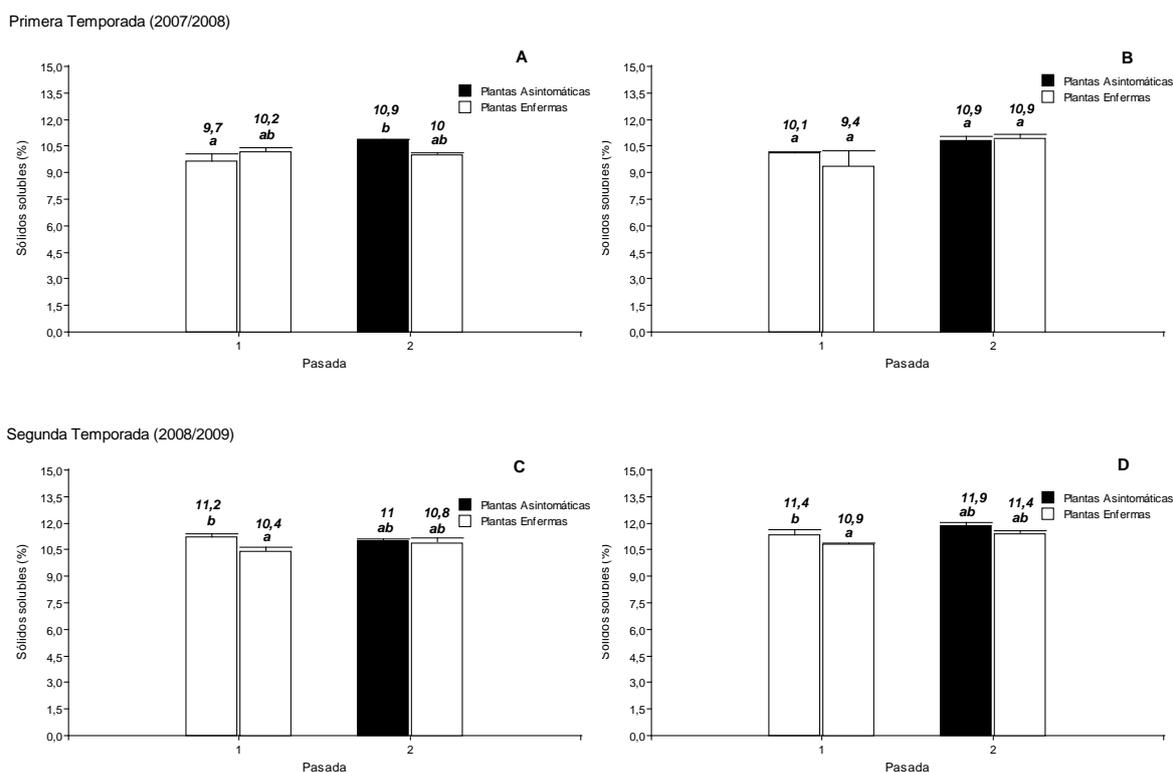
Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test de Tukey.

### 5.1.5. Contenido de sólidos solubles (CSS)

En general los frutos provenientes de las PE no se diferenciaron estadísticamente en cuanto al contenido de sólidos solubles (%) respecto de los frutos de PA.

En la primera temporada no se detectaron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles de frutos provenientes de PA y de PE ni en la plantación N°1 ( $p$ -valor 0,4644) (Fig. 12A) ni en la plantación N°2 ( $p$ -valor 0,5157) (Fig. 12B).

En la segunda temporada se observaron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles de frutos de PA y de PE sólo en la primera pasada de cosecha tanto en la plantación N°1 ( $p$ -valor 0,0381) como en la plantación N°2 ( $p$ -valor 0,0182). En dicha pasada los frutos cosechados de las PE registraron una reducción en el contenido de sólidos solubles de 0,9% en ambas plantaciones (Figs. 12C y 12D).



**Fig. 12: Contenido de sólidos solubles (%) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A y C) y N°2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (PA, PE), por pasada de cosecha y por parcela. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test de Tukey.

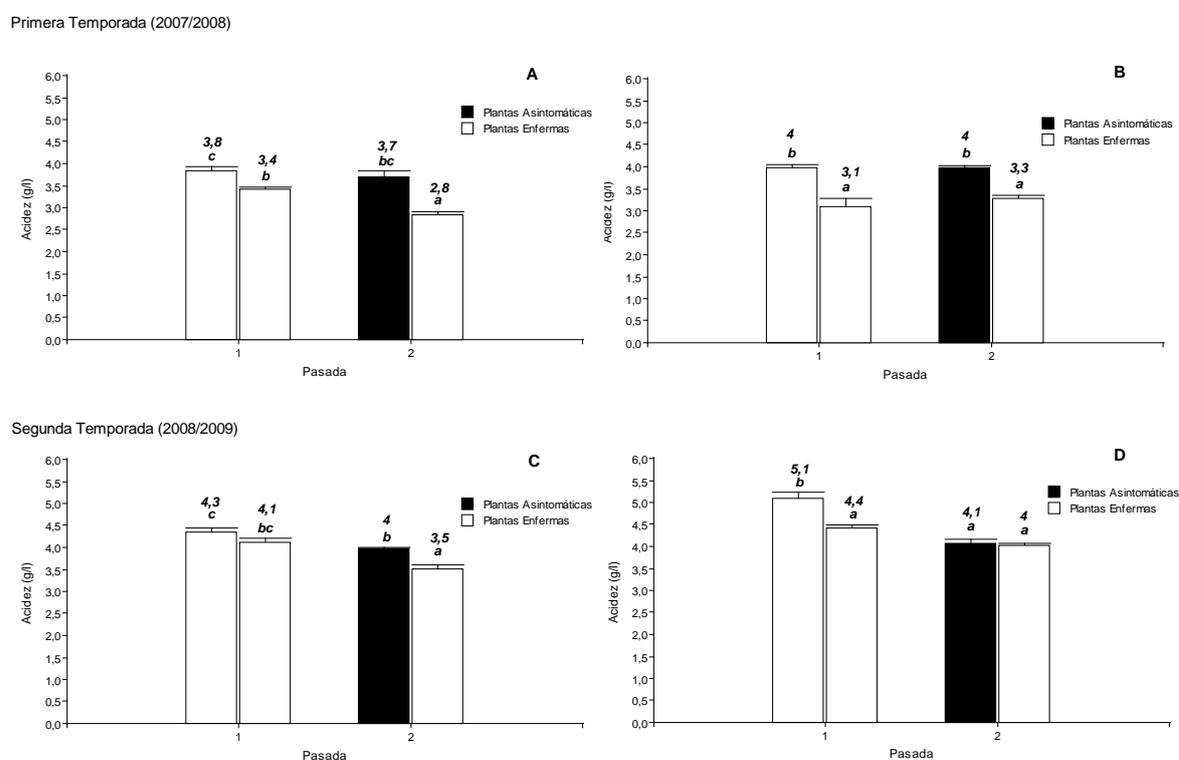
### 5.1.6. Acidez Total Titulable (ATT)

En general, los frutos que fueron cosechados de PE registraron una menor acidez total titulable (g/l) que los frutos cosechados de PA.

En la primera temporada de estudio, los frutos de PE presentaron una reducción en la acidez titulable de 0,4 g/l y 0,9 g/l en la primera y segunda pasada de cosecha respectivamente, notándose una mayor magnitud de esta reducción respecto de los frutos de PA en la segunda pasada ( $p$ -valor 0,0001) (Fig. 13A). En la plantación N°2 los frutos de PE también registraron una disminución en la acidez titulable respecto de los frutos de PA de 0,9 g/l y 0,7 g/l en la primera y segunda pasada de cosecha respectivamente ( $p$ -valor 0,0001) (Fig. 13B).

En la segunda temporada, los frutos provenientes de PE registraron una reducción en la acidez titulable respecto de los frutos de PA de 0,2 g/l en la primera pasada y de 0,5 g/l en la segunda, siendo estadísticamente significativa sólo la segunda ( $p$ -valor 0,0001) (Fig. 13C).

Asimismo, se observó una interacción significativa entre valores ATT de frutos provenientes de PA y de PE y las pasadas ( $p$ -valor 0,0057) en la plantación N°2. Los frutos de PE presentaron una reducción en la acidez de 0,7 g/l respecto de los frutos de PA en la primera pasada, sin embargo en la segunda pasada no se detectaron diferencias significativas (Fig. 13D).



**Fig. 13: Contenido de acidez total titulable (g/l) de frutos de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 (A y C) y N°2 (B y D). Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.** Los valores representan la media  $\pm$  e.e de 20 frutos/planta de 5 plantas por grupo (PA, PE), por pasada de cosecha y por parcela. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test de Tukey.

### 5.1.7. Producción de etileno

Los frutos provenientes de PE no se diferenciaron estadísticamente de los frutos provenientes de PA en cuanto a los días transcurridos hasta el pico climatérico.

Es relevante mencionar que en la primera temporada no se observaron diferencias significativas en los días al pico climatérico entre frutos de PA y PE en la plantación N°1 ( $p$ -valor 0,7542); de hecho, los frutos de PE produjeron el pico climatérico luego de 12,7 días y los frutos de PA lo produjeron a los 11,7 días. Sin embargo, el pico climatérico medio de frutos provenientes de PE (59 nl/g/h) presentó un incremento de 26% respecto al producido por los frutos de PA (43,4 nl/g/h) ( $p$ -valor 0,0075). En la plantación N°2 no se detectaron diferencias

significativas en los días al pico climatérico (p-valor 0,5185) ni en la magnitud del pico climatérico entre frutos de PA y PE (p-valor 0,4908) (Tabla XI).

En la segunda temporada de estudio no se registraron diferencias significativas en los días al pico climatérico entre frutos de PA (14,8 días) y PE (17,8 días) en la plantación N°1 (p-valor 0,1414) a diferencia de los resultados obtenidos en la primera temporada. Tampoco fueron significativas las diferencias en la magnitud del pico climatérico entre frutos de PA (87,8 nl/g/h) y PE (90,3 nl/g/h) (p-valor 0,8636). En la plantación N°2 no se observaron diferencias en los días al pico climatérico entre frutos de PA (16,8 días) y PE (16,7 días) (p-valor 0,9732). Cabe destacar que la magnitud del pico climatérico de frutos provenientes fue significativamente mayor en frutos de PE (142,6 nl/g/h) (p-valor 0,0487) respecto de frutos de PA (97,7 nl/g/h), registrando un incremento de 31% (Tabla XI).

Tabla XI: Producción máxima de etileno (pico climatérico) en nl/g/h y días transcurridos hasta el pico climatérico en frutos de peral cv. Williams en las plantaciones N°1 y N°2 cosechadas en la segunda pasada de cosecha. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.

Parcela	Grupo	Rep.	Días al pico climatérico <sup>z</sup>		Valores medios días al pico climatérico <sup>x</sup>		Pico climatérico <sup>z</sup> (nl/g/h)		Pico climatérico medio <sup>x</sup>	
			2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
N°1	PA	1	14	18			46,9	108,6		
		2	8	15			39,7	82		
		3	13	19	11,7±1,9	14,8±1,7	43,5	60	43,4±2,1	87,8±9,4
		4	-	11			-	78,5		
		5	-	11			-	109,4		
	PE	1	8	19			61,7	84,1		
		2	15	15			60,9	71		
		3	15	18	12,7±2,3	17,8±0,7	54,4	92,2	59,0±2,5	90,3±10,5
		4	-	19			-	129,4		
		5	-	18			-	74,7		
					<b>NS</b>	<b>NS</b>			<b>**</b>	<b>NS</b>
N°2	PA	1	14	25			63,4	83,4		
		2	13	17			55,1	101		
		3	14	14	13,7±0,3	16,8±2,1	51,2	99,9	56,6±3,6	97,7±4,7
		4	-	14			-	111,8		
		5	-	14			-	92,4		
	PE	1	13	17			40,3	188,5		
		2	14	11			13,9	111,9		
		3	13	22	13,3±0,3	16,7±3,2	74,7	127,4	42,9±17,6	142,6±23,4
		4	-	DNE			-	DNE		
		5	-	DNE			-	DNE		
					<b>NS</b>	<b>NS</b>			<b>NS</b>	<b>**</b>

PA y PE: Frutos provenientes de Plantas Asintomáticas y de Plantas Enfermas respectivamente.

Rep.: Repeticiones de 1 fruto cada una por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas), por parcela.

nl/g/h: Nanolitros/gramo de fruto/ hora

<sup>x</sup>: Los valores representan la media ± e.e de 3 frutos por grupo (Plantas Asintomáticas, Plantas Enfermas) y por parcela en la temporada 2007/2008 y de 5 frutos por grupo y por parcela en la temporada 2008/2009.

<sup>z</sup>: Las evaluaciones fueron realizadas con frutos de peral cosechados durante la segunda pasada de cosecha, los días 30/01/08 en las dos plantaciones y el 22/01/09 y 26/01/09 en las parcelas N°1 y N°2 respectivamente.

DNE: Datos no evaluados. Debido a la merma en la cantidad y calidad de frutos registrada en las PE de la Plantación N°2 en la segunda temporada, sólo se realizaron 3 repeticiones de frutos sin heridas y de tamaño uniforme, condiciones requeridas para realizar este ensayo.

NS y \*\*: Diferencias no significativas y significativas respectivamente (p<0,05) según test de Tukey.

## 6. DETECCIÓN DE PROPÁGULOS DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL AGUA DE RIEGO

### 6.1. Recolección y caracterización de las muestras de agua de riego

No se registró una relación lineal entre valores de absorbancia de las muestras de agua de riego y el pH ( $F = 1,48$ ;  $p\text{-valor} = 0,22$ ;  $R^2 = 0,02$ ) (Fig. 14A). Es importante destacar que si bien se detectó una relación lineal positiva entre valores de absorbancia y la conductividad eléctrica de las muestras de agua ( $F = 6,35$ ;  $p\text{-valor} = 0,014$ ), sólo el 11% de la variabilidad de los valores de absorbancia fue explicada por los valores de conductividad eléctrica ( $R^2 = 0,11$ ) (Fig. 14B).

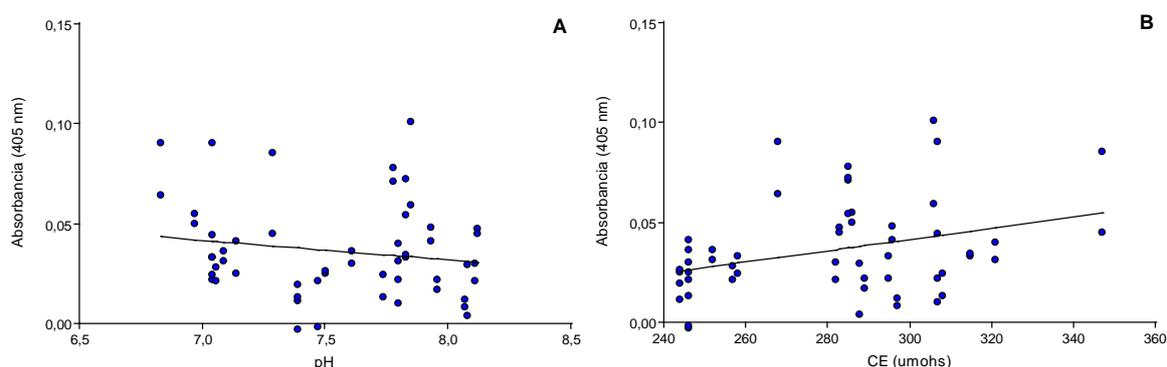


Fig. 14: Relación entre la absorbancia y el pH (A) y la absorbancia y la CE ( $\mu\text{mohs}$ ) (B) de muestras de agua recolectadas en los dos ensayos de riego. Temporadas 2007/2008 y 2008/2009.

### 6.2. Prueba serológica

#### 6.2.1. Tratamiento de las muestras de agua de riego

Los suelos de las dos plantaciones, de las cuales se extrajeron las muestras de agua de riego, presentaron una textura franco-limosa. Cabe resaltar que en las muestras de agua recolectadas se observó un elevado contenido de partículas suspendidas las cuales provendrían de la fracción limosa (diámetro de partícula de limo de 2 a 50  $\mu\text{m}$ ). Esto implicó realizar, previo al filtrado por vacío, dos filtrados 'gruesos'. El primer filtrado se realizó con tamiz de 200  $\mu\text{m}$  con el objeto de eliminar restos vegetales y residuos de mayor tamaño. El segundo filtrado grueso se efectuó con filtro de papel de 20  $\mu\text{m}$  para reducir el contenido de partículas en suspensión. Durante el filtrado por vacío de las muestras de agua de riego, fue necesario utilizar en algunos casos más de un filtro de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  cada 2 litros de muestra, principalmente durante el primer ensayo de detección de *Phytophthora* spp. realizado en diciembre de 2008. En promedio se utilizó 1 filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  para filtrar 700 ml de agua de riego.

El tiempo medio registrado en la etapa de filtrado por vacío fue de 60 segundos cada 100 ml de muestra de agua de riego. Este tiempo de filtrado medio corresponde a una presión de 0,05 mm Hg (0,0008 PSI).

### **6.2.2. Ensayo de diluciones y detección de propágulos de *Phytophthora* spp.**

De las diluciones realizadas a partir de la suspensión con micelio de *P. cactorum*, se registraron valores de absorbancia superiores al umbral de detección ( $X_s = 0,03$ ) en las diluciones 0 (suspensión madre),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Cabe mencionar que estos resultados se observaron en los tratamientos con macerado mecánico (M) y sin macerado (SM) (Tabla XII).

En cuanto a las diluciones obtenidas de la suspensión madre con esporangios de *P. cactorum*, se detectaron valores de absorbancia mayores al  $X_s$  en las diluciones 0 (suspensión madre),  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en los tratamientos M y SM, obteniéndose un umbral de detección promedio por parte del kit de  $7 \times 10^4$  zoosporas/ml (Tabla XII).

**Tabla XII: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras del ensayo de diluciones.** Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 repeticiones por dilución, por suspensión utilizada (micelio, esporangio) y por tratamiento (M, SM).

Suspensión <sup>x</sup>	Dilución <sup>y</sup>	Tratamiento	Absorbancia	Suspensión <sup>x</sup>	Dilución <sup>y</sup>	Tratamiento	Absorbancia
Micelio	0	M	<b>0,22 <math>\pm</math> 0,02**</b>	Esporangio	0	M	<b>0,14 <math>\pm</math> 0,00**</b>
Micelio	0	SM	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,02**</b>	Esporangio	0	SM	<b>0,18 <math>\pm</math> 0,02**</b>
Micelio	10 <sup>-1</sup>	M	<b>0,13 <math>\pm</math> 0,04**</b>	Esporangio	10 <sup>-1</sup>	M	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,00**</b>
Micelio	10 <sup>-1</sup>	SM	<b>0,15 <math>\pm</math> 0,02**</b>	Esporangio	10 <sup>-1</sup>	SM	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,01**</b>
Micelio	10 <sup>-2</sup>	M	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,01**</b>	Esporangio	10 <sup>-2</sup>	M	<b>1,21 <math>\pm</math> 1,59**</b>
Micelio	10 <sup>-2</sup>	SM	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,03**</b>	Esporangio	10 <sup>-2</sup>	SM	<b>0,06 <math>\pm</math> 0,09**</b>
Micelio	10 <sup>-3</sup>	M	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,02**</b>	Esporangio	10 <sup>-3</sup>	M	0,02 $\pm$ 0,01
Micelio	10 <sup>-3</sup>	SM	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,00**</b>	Esporangio	10 <sup>-3</sup>	SM	0,02 $\pm$ 0,01
Micelio	10 <sup>-4</sup>	M	0,00 $\pm$ 0,00	Esporangio	10 <sup>-4</sup>	M	0,01 $\pm$ 0,04
Micelio	10 <sup>-4</sup>	SM	0,01 $\pm$ 0,02	Esporangio	10 <sup>-4</sup>	SM	0,01 $\pm$ 0,02
Micelio	10 <sup>-5</sup>	M	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01**</b>	Esporangio	10 <sup>-5</sup>	M	0,03 $\pm$ 0,04
Micelio	10 <sup>-5</sup>	SM	0,02 $\pm$ 0,02	Esporangio	10 <sup>-5</sup>	SM	0,01 $\pm$ 0,03
T	-	M	0,03 $\pm$ 0,01	T	-	M	0,02 $\pm$ 0,03
T	-	SM	0,03 $\pm$ 0,01	T	-	SM	0,04 $\pm$ 0,02
<i>B</i>							0,03 $\pm$ 0,04
<i>T (+)</i>							0,54 $\pm$ 0,05
<i>T (-)</i>							0,01 $\pm$ 0,01
<i>Xs</i>							0,03

M y SM: Tratamiento con macerado mecánico y sin macerado mecánico respectivamente.

T: Testigo con agua destilada

*B*: Blanco con buffer de extracción.

*T (+)* y *T (-)*: Testigo positivo y Testigo negativo respectivamente, aportados por el kit serológico

*Xs*: Umbral de detección

<sup>x</sup>: La suspensión madre con micelio se preparó con AHM con micelio (aproximadamente 0,2 g) extraído del borde de una colonia en crecimiento de *P. cactorum*. La suspensión madre con esporangios presentó una concentración de  $7 \times 10^6$  zoosporas/ml de *P. cactorum*.

<sup>y</sup>: La dilución '0' corresponde a la suspensión madre, con micelio o con esporangio según corresponda, a partir de la cual se realizó el resto de las diluciones al décimo.

\*\* : Valores de absorbancia mayores al *Xs* son consideradas 'positivas' a la presencia de *Phytophthora* spp.

### 6.2.3. Detección de propágulos en muestras de agua de riego

Se determinaron las absorbancias de las muestras de agua de riego del primer ensayo realizado el 13 y el 16 de diciembre de 2008 en las plantaciones N°1 y N°2 respectivamente utilizando la prueba DAS-ELISA. Se observó que las muestras 1.2, 1.3, 1.5, pertenecientes a la plantación N°1, y las muestras 2.2, 2.10 y 2.11 de la plantación N°2 presentaron valores de absorbancia mayores al Xs (0,04) y por tal motivo se consideraron positivas a la presencia de *Phytophthora* spp. (Tabla XIII).

**Tabla XIII: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras de agua de riego.** Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 repeticiones por muestra de agua de riego, por parcela del primer ensayo de detección.

Plantación N°1		Plantación N°2	
Muestra	Absorbancia	Muestra	Absorbancia
1.1	0,02 $\pm$ 0,01	2.1	0,02 $\pm$ 0,01
1.2	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,03**</b>	2.2	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,00**</b>
1.3	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,02**</b>	2.3	0,02 $\pm$ 0,00
1.4	0,03 $\pm$ 0,00	2.4	0,04 $\pm$ 0,00
1.5	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,03**</b>	2.5	0,03 $\pm$ 0,00
1.6	0,03 $\pm$ 0,01	2.6	0,04 $\pm$ 0,00
1.7	0,03 $\pm$ 0,00	2.7	0,02 $\pm$ 0,01
1.8	0,03 $\pm$ 0,01	2.8	0,01 $\pm$ 0,00
1.9	0,02 $\pm$ 0,00	2.9	0,03 $\pm$ 0,01
1.10	0,03 $\pm$ 0,01	2.10	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,00**</b>
1.11	0,02 $\pm$ 0,01	2.11	<b>0,06 <math>\pm</math> 0,01**</b>
1.12	0,01 $\pm$ 0,01	2.12	DNE
1.13	0,01 $\pm$ 0,02	2.13	DNE
1.14	0,03 $\pm$ 0,00	2.14	DNE
1.15	0,03 $\pm$ 0,00		
B			0,00 $\pm$ 0,01
T			0,02 $\pm$ 0,01
T (+)			0,44 $\pm$ 0,02
T (-)			0,02 $\pm$ 0,01
Xs			0,04

B: Blanco con buffer de extracción. T: Testigo con agua destilada

T (+) y T (-): Testigo positivo y Testigo negativo respectivamente, aportados por el kit serológico

Xs: Umbral de detección

DNE: Datos no evaluados. El sector donde se encontraban las plantas enfermas de donde se extrajeron las muestras 2.12, 2.13 y 2.14 había sido regado sin previo aviso.

\*\* : Valores de absorbancia mayores al Xs son consideradas 'positivas' a la presencia de *Phytophthora* spp.

Durante el segundo ensayo de detección, realizado el 20 y 26 de marzo de 2009 en las plantaciones N°2 y N°1 respectivamente, se procedió de la misma manera que en el primero. Se determinaron las absorbancias de las muestras de agua de riego y se observó que las muestras 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.9 y 1.12, provenientes de la plantación N°1, presentaron valores de absorbancia mayores al Xs (0,04) y por ende se consideraron positivas a la presencia de *Phytophthora* spp. Sin embargo, en la Plantación N°2 no se registraron muestras positivas (Tabla XIV).

**Tabla XIV: Lecturas de absorbancia obtenidas a partir de prueba DAS-ELISA realizada sobre las muestras de agua de riego.** Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 repeticiones por muestra de agua de riego, por parcela del segundo ensayo de detección.

Plantación N°1		Plantación N°2	
Muestra	Absorbancia	Muestra	Absorbancia
1.1	0,06 $\pm$ 0,00	2.1	-0,02 $\pm$ 0,01
1.2	<b>0,16 <math>\pm</math> 0,08**</b>	2.2	0,00 $\pm$ 0,02
1.3	<b>0,31 <math>\pm</math> 0,23**</b>	2.3	0,01 $\pm$ 0,02
1.4	<b>0,15 <math>\pm</math> 0,03**</b>	2.4	0,01 $\pm$ 0,01
1.5	<b>0,24 <math>\pm</math> 0,10**</b>	2.5	0,06 $\pm$ 0,05
1.6	<b>0,20 <math>\pm</math> 0,01**</b>	2.6	0,04 $\pm$ 0,00
1.7	<b>0,19 <math>\pm</math> 0,01**</b>	2.7	0,02 $\pm$ 0,01
1.8	0,09 $\pm$ 0,01	2.8	0,01 $\pm$ 0,00
1.9	<b>0,17 <math>\pm</math> 0,03**</b>	2.9	0,02 $\pm$ 0,00
1.10	0,12 $\pm$ 0,03	2.10	0,09 $\pm$ 0,03
1.11	0,09 $\pm$ 0,01	2.11	0,08 $\pm$ 0,01
1.12	<b>0,13 <math>\pm</math> 0,06**</b>	2.12	DNE
1.13	0,09 $\pm$ 0,13	2.13	DNE
1.14	0,03 $\pm$ 0,06	2.14	DNE
1.15	0,06 $\pm$ 0,07		
B			0,03 $\pm$ 0,04
T			0,02 $\pm$ 0,01
T (+)			0,54 $\pm$ 0,01
T (-)			0,00 $\pm$ 0,06
Xs			0,12

B: Blanco con buffer de extracción. T: Testigo con agua destilada

T (+) y T (-): Testigo positivo y Testigo negativo respectivamente, aportados por el kit serológico

Xs: Umbral de detección

DNE: Datos no evaluados. El sector donde se encontraban las plantas enfermas de donde se extrajeron las muestras 2.12, 2.13 y 2.14 había sido regado sin previo aviso.

\*\* : Valores de absorbancia mayores al Xs son consideradas 'positivas' a la presencia de *Phytophthora* spp.

---

### 6.3. Siembra en medio AHM

No se observó la formación de colonias de *Phytophthora* spp. en los cultivos realizados durante el primer y segundo ensayo de detección.

### 6.4. Técnica de frutos trampa

De las muestras de suelo extraídas durante el primer ensayo de detección no se aisló *Phytophthora* spp. de ninguno de los frutos. Tampoco se observó la formación de podredumbres en la epidermis.

En el segundo ensayo de detección se observó que el 47% de las bandejas contenedoras presentó al menos un fruto con una podredumbre firme, circular, de color marrón. Asimismo, todas las muestras de suelo presentaron al menos una repetición con frutos con podredumbre, compatible con las características miceliares de *Phytophthora* spp.

## 1. INCIDENCIA DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN EL ALTO VALLE ESTE

En el 35% de las plantaciones de peral cv. Williams relevadas en el Alto Valle Este se logró aislar *Phytophthora* spp. de plantas sintomáticas. Este porcentaje de detección es similar al obtenido por Rossini *et al.* (1997) en perales del Alto Valle de Río Negro, quienes detectaron la presencia de este microorganismo en el 45% de las plantaciones sintomáticas relevadas. *Phytophthora* spp. fue aislado de plantaciones ubicadas en las tres localidades donde se realizó el estudio, confirmando su presencia en perales cv. Williams del Alto Valle Este.

Es importante resaltar que la cantidad de aislados positivos respecto del total de perales cv. Williams sintomáticos registrada en este estudio para el Alto Valle Este (45%) fue similar al obtenido por Bergna (1983) en perales cv. Beurré D'Anjou en el Alto Valle (50%).

La variabilidad en la incidencia de la enfermedad observada dentro de cada parcela (incidencia mínima 0,3% y máxima 10,4%) se condice con los resultados observados por Rossini y Di Masi (1996) en frutales de pepita infectados naturalmente por *P. cactorum* en el Alto Valle. Estos autores mencionan que el porcentaje de plantas afectadas por este microorganismo dentro de una parcela es variable, alcanzando valores de hasta 15%. Esta variabilidad estaría dada por un conjunto de factores que favorecerían o no el ingreso del patógeno y la evolución de la enfermedad, destacándose entre ellos la temperatura y el contenido hídrico del suelo (Harris, 1991; Browne y Mircetich, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996). Se ha comprobado que *P. cactorum* es infeccioso cuando la temperatura media del aire es superior a 8°C y su actividad se acrecienta con el aumento de la temperatura hasta los 20°C (Smith *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996; Horner y Wilcox, 1996; Ampuero Vega, 2005). Es relevante destacar que en el Alto Valle de Río Negro se ha registrado este rango de temperatura, requerido por *P. cactorum*, en los meses de marzo, abril, septiembre y octubre en los últimos 20 años (Rodríguez y Muñoz, 2006), coincidiendo con el momento de producción de estructuras de propagación. El contenido hídrico del suelo es otro factor de gran importancia ya que tiene un efecto directo en la dispersión de esta enfermedad. Se ha comprobado que *P. cactorum* es diseminada a través del agua presente en el suelo (Duniway, 1983) y si bien las precipitaciones en la región del Alto Valle son escasas (inferiores a 200 mm), las láminas de riego aplicadas en las plantaciones comerciales superan los 2.500 mm anuales (Bestvater y Casamiquela, 1983; Nolting, 2003), lo cual garantizaría las condiciones necesarias para la liberación y diseminación de zoosporas a través del agua de riego (Duniway, 1983; Browne y Mircetich, 1988).

De lo antes expuesto se podría inferir que las condiciones de temperatura y contenido hídrico del suelo, necesarias para la diseminación de esta enfermedad, estarían garantizadas en determinados períodos del año en la región del Alto Valle. Por tal motivo, y cumplimentados los requisitos de temperatura y humedad antes mencionados, otros factores podrían haber estado involucrados en el éxito o no de la dispersión de la enfermedad en las plantaciones relevadas durante el estudio, entre estos la textura de los suelos. Existen antecedentes que afirman que la podredumbre causada por *P. cactorum* no estaría condicionada por la textura del suelo (Harris, 1991). Asimismo, Rossini *et al.* (1997) observaron este comportamiento para el Alto Valle. Sin embargo, algunos autores mencionan que plantas hospederas ubicadas en suelos arcillosos son más propensas a desarrollar esta enfermedad debido a que el agua es retenida por más tiempo en dichos suelos (Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996) y los exudados de las raíces se difunden más fácilmente estimulando la quimiotaxis de zoosporas (Duniway, 1983). Los suelos de las plantaciones de peral cv. Williams relevados en los que se detectó *P. cactorum* pertenecían a las categorías de suelo de 'barda' (textura arenosa), de 'media barda' (textura franco-limosa a franca) y de 'media costa' (textura franco-arenosa a arenoso-franca), según el mapa de distribución textural del Alto Valle de Río Negro realizado por Bestvater y Casamiquela (1983). Si bien podría inferirse a partir de lo observado que no habría una relación directa entre la textura del suelo y la presencia de *P. cactorum*, tal como lo mencionan Harris (1991) y Rossini *et al.* (1997), sería necesario cuantificar en futuros trabajos la relación entre textura de suelo de cada parcela relevada y la presencia del microorganismo.

Existen reportes que relacionan el aumento de la susceptibilidad de frutales de pepita a la podredumbre de cuello con la edad del árbol. McIntosh (1959) y Khan (1999) observaron que plantas que se encontraban en plena producción fueron más susceptibles al ataque de *P. cactorum* que aquellas que aún no comenzaban a producir. Asimismo, Ten Houten (1958), Harris (1991) y Smith *et al.* (1992) registraron que árboles de diez años o más fueron más susceptibles al ataque del patógeno en infecciones naturales. En el estudio realizado, las 10 plantaciones en las que se confirmó la presencia de *P. cactorum* registraron un rango de edades de 9 a 16 años, con plantas que se encontraban en plena producción, lo cual coincidiría con lo reportado por los autores mencionados anteriormente.

## **2. RELACIÓN ENTRE PLANTAS DE PERAL cv. WILLIAMS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO Y EL AISLAMIENTO DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL ALTO VALLE ESTE**

En el 96% de las plantaciones comerciales sintomáticas relevadas se observó follaje poco denso, clorótico, con enrojecimiento prematuro a fin de verano, debilitamiento de plantas y/o de sus ramas primarias. Esta sintomatología coincide con la citada por Fernández Valiela (1979) Bergna (1983) y Rossini *et al.* (1997) para la podredumbre de cuello en peral causada

por *P. cactorum* en Argentina. Sólo en una de las plantaciones sintomáticas no se observaron estos síntomas, tal como lo observara McIntosh (1959) en perales en British Columbia, quien cita la ausencia o la presencia casi imperceptible en el cambio de color o en el crecimiento anual de las plantas. Dicha parcela, presentó un grado de desarrollo de la podredumbre de cuello inferior al registrado en el resto de las plantaciones en las que se aisló *Phytophthora* spp., lo cual podría indicar una infección reciente que aún no se manifiesta en la canopia, si bien esto no podría aseverarse a partir de los datos de este estudio.

Sólo en el 35% de las parcelas en las que se observaron los síntomas en la canopia antes descritos se detectó la presencia de *Phytophthora* spp. Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos por Rossini *et al.* (1997) en perales y manzanos en el Alto Valle, quienes registraron que los síntomas de decaimiento en aquellas plantaciones sintomáticas en las que no aislaron *Phytophthora* spp., podrían deberse a condiciones de anoxia por riego excesivo o drenaje deficiente.

Durante el presente estudio no se observó colapso y muerte repentina de plantas en las parcelas relevadas. Este suceso ha sido registrado en otros lugares del mundo durante otoños y primaveras con condiciones de humedad excesiva (McIntosh, 1960; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996).

Todas las plantas en las que se detectó la presencia de *Phytophthora* spp. durante este trabajo presentaron una podredumbre húmeda y de consistencia esponjosa a nivel del cuello que ascendía por el tronco hacia las ramas principales, en concordancia con lo descrito por McIntosh (1959), Fernández Valiela (1979), Bergna (1983) y Feldman y Gracia (1981) para perales y por Lindquist (1938), Jeffers y Wilcox (1990), Harris (1991) y Rossini y Di Masi (1996) para manzanos. No se logró aislar el microorganismo de ninguna de las plantas sintomáticas que presentaron podredumbre de cuello con aspecto seco. Los resultados obtenidos en este estudio indicarían una relación directa entre el desarrollo de la podredumbre húmeda en el cuello de peral cv. Williams y la presencia de *Phytophthora* spp. en las plantaciones relevadas, a diferencia de lo observado por McIntosh (1959) en perales de British Columbia (Canadá) quien no detectó síntomas en la corteza externa de los troncos que indicasen que el tejido floemático estuviera enfermo.

Todas las podredumbres observadas durante el estudio se desarrollaron a nivel de cuello y se extendieron hacia la porción apical del árbol, lo que concuerda con reportes de *P. cactorum* en peral (Feldman y Gracia, 1981; Rossini *et al.*, 1997; Elena y Paplomatas, 1999; Thomidis *et al.*, 2002) y en manzano (Frezzi, 1950; Ten Houten, 1958; Bolay, 1992; Rossini *et al.*, 1997). Si bien Jeffers y Wilcox (1990) y Bergna (1982) mencionan que también podría

producir podredumbre en raíces de manzanos y de perales respectivamente, esto no fue observado. A partir de estos resultados podría asumirse que la presencia de síntomas por encima del nivel del suelo, como lo observado en la podredumbre de cuello causada por *Phytophthora* spp. en las plantaciones relevadas, agilizaría el diagnóstico de la enfermedad y facilitaría la aplicación de estrategias para su manejo (Browne y Viveros, 1999). Es importante destacar que el control de especies que producen podredumbres radicales, como *P. cinnamomi*, es más complejo ya que la aplicación de fungicidas es menos eficiente, debiendo recurrir a otras estrategias tales como variedades resistentes o control biológico (Flores, 2007).

Cabe mencionar que solamente se percibió olor a fermentado en podredumbres de cuello de consistencia húmeda, nunca en las podredumbres secas. Asimismo, no se logró percibir este olor alcohólico en todas las podredumbres húmedas registradas, si bien fue en la mayoría (85%). Esto coincidiría con lo expuesto por Fernández Valiela (1979) quien registró que en peral es más difícil que en manzano percibir este olor.

En el 58% de las plantas en las que se detectó *Phytophthora* spp. se observó la formación de exudados acuosos marrón-anaranjados sobre las podredumbres, si bien estas plantas se encontraron sólo en el 20% de las plantaciones positivas. La presencia de exudados también fue reportado por Feldman y Gracia (1981) y Bergna (1983) en Argentina para perales y Harris (1991) y Smith *et al.* (1992) en otros países para manzano. Sin embargo, no se pudo establecer a partir de este estudio qué factor o factores estarían influyendo en la aparición de estos exudados.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS DE *PHYTOPHTHORA*

Se pudo establecer que la única especie causal de podredumbres de cuello en las plantaciones de peral cv. Williams relevadas en la región del Alto Valle Este fue *P. cactorum*.

La forma de las colonias según lo descripto, fue finamente radiada con bordes no definidos. Estos resultados coinciden con lo citado para *P. cactorum* por Frezzi (1950), Waterhouse (1970), Harris y Bielenin (1986), Tuset *et al.* (2002) y Erwin y Ribeiro (1996). Debido a que algunas especies de *Phytophthora* presentan colonias con diferentes patrones de crecimiento (Erwin y Ribeiro, 1996), este carácter debería utilizarse sólo como información complementaria en la caracterización de especies del género. Cabe mencionar que en este estudio se observó una elevada homogeneidad entre los aislados de *P. cactorum* en cuanto a las características de la colonia.

Las características morfológicas del micelio coinciden con lo citado por Frezzi (1950) y Bergna (1982) para *P. cactorum* en Argentina.

Los datos morfométricos en cuanto al ancho medio de hifas –inferior a 6  $\mu\text{m}$ - y a la ausencia de protuberancias hifales se encuentran dentro del rango definido para *P. cactorum* por Waterhouse y Waterstone (1966) y Ho (1981) y se ajustan a lo expresado por Bergna (1982) en Argentina y Harris (1991) en Inglaterra.

Al igual que las descripciones realizadas para la especie por Frezzi (1950) en Argentina y por Waterhouse (1970), Ho (1981), Stamps *et al.* (1990) y Erwin y Ribeiro (1996), todos los aislados presentaron esporangios caducos con ápice papilado. La longitud media de los pedicelos se encuentra dentro de los rangos expresados para la especie por Frezzi (1950) en Argentina y por las claves de Ho (1981) y Stamps *et al.* (1990) (< 5  $\mu\text{m}$ ). La forma predominante observada de los esporangios (ovoide o limoniforme) coincide con lo descrito por Bergna (1982) y Frezzi (1950) en Argentina y por Waterhouse y Waterstone (1966) y Erwin y Ribeiro (1996). La longitud media de los esporangios y el ancho medio se encuentran dentro de los rangos citados por Frezzi (1950), Waterhouse y Waterstone (1966) y Bergna (1982). Si bien las dimensiones medias de los esporangios observadas en el presente trabajo superan el rango mencionado por Lindquist (1938) (26-30  $\mu\text{m}$  de largo y 20-25  $\mu\text{m}$  de ancho), este autor observó que estas dimensiones variaban con los diferentes medios de cultivo.

En cuanto a la relación entre el largo y el ancho de los esporangios, los valores medios se encuentran dentro del rango establecido por Ho (1981) y Stamps *et al.*, 1990 (< 1,6  $\mu\text{m}$ ), si bien es menor a los valores expresados por Frezzi (1950) (1,45  $\mu\text{m}$ ) y Waterhouse y Waterstone (1966) (1,3 a 1,4  $\mu\text{m}$ ).

El diámetro medio de los oogonios observados en cada parcela se encuentra dentro de los rangos citados por Waterhouse y Waterstone (1966) (19 a 38  $\mu\text{m}$ ), Bergna (1982) (23,5 a 34  $\mu\text{m}$ ), Ho (1981) (< 40  $\mu\text{m}$ ) y Stamps *et al.* (1990) (< 30  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ ).

La morfología de los anteridios coincide con lo descrito por Lindquist (1938), Frezzi (1950) y Waterhouse (1963). No se observaron anteridios anfíginos a diferencia de lo que mencionan Ho (1981) y Stamps *et al.* (1990) quienes comentan que ocasionalmente aquellos podrían formarse. La morfometría de los anteridios coincide con lo reportado por Waterhouse y Waterstone (1966) y Ho (1981) aunque los valores son levemente inferiores a los citados por Frezzi (1950) (8,5 a 21  $\mu\text{m}$  de ancho; 12 a 21  $\mu\text{m}$  de largo) y Bergna (1982) (10  $\mu\text{m}$  de ancho; 17  $\mu\text{m}$  de largo).

El diámetro medio de las oosporas observadas por parcela se encuentra dentro de los rangos establecidos por Stamps *et al.* (1990) (20-30  $\mu\text{m}$ ), Frezzi (1950) (20-29,5  $\mu\text{m}$ ) y Waterhouse y Waterstone (1966) (media 20-26  $\mu\text{m}$ ). Las oosporas fueron apeleróticas, en coincidencia con lo observado por Waterhouse y Waterstone (1966), Stamps *et al.* (1990), Erwin y Ribeiro (1996) y a diferencia de lo citado por Lindquist (1938) y Frezzi (1950).

No se registró la formación de clamidosporas en las condiciones dadas en el presente estudio y en los aislados analizados, coincidiendo con los resultados obtenidos por Lindquist (1938) en muestras de manzano en Argentina y a lo reportado por Ho (1981), Stamps *et al.* (1990), Harris (1991) y Tuset *et al.* (2002). Si bien Frezzi (1950) las observó con frecuencia y en abundancia en diferentes medios de cultivo, menciona que otros autores no observaron clamidosporas –lo cual le llamó la atención- sino ‘sphaero-conidia’, estructuras definidas como oogonios no fecundados. Sin embargo este autor asevera que las estructuras que él observó eran clamidosporas porque presentaron mayor diámetro medio que los oogonios.

Como se ha mencionado anteriormente, son varias las especies de *Phytophthora* citadas a nivel mundial aisladas de frutales de pepita: *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. megasperma* y *P. syringae* (Cameron, 1962; Waterhouse y Waterston, 1964<sup>a y b</sup>; Jeffers y Aldwinckle 1986; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Elena y Paplomatas, 1999; Latorre *et al.*, 2001; Thomidis *et al.*, 2002; Yamak *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2006). Es importante mencionar que, de las especies antes citadas, sólo *P. cactorum* y *P. citrophthora* presentan esporangios caducos, como los observados en este estudio. Por tal motivo este carácter morfológico fue el primero en ser utilizado para definir y caracterizar las especies de *Phytophthora* que podrían encontrarse en las muestras de tejido. Cabe aclarar que los esporangios no caducos pueden desprenderse cuando el medio acuoso en el que se encuentran es sometido a movimiento brusco o agitación, en estos casos la variabilidad en la longitud de los pedicelos sería muy elevada (Erwin y Ribeiro, 1996), a diferencia de lo observado en este trabajo. La longitud de los pedicelos fue otro carácter morfométrico que permitió diferenciar los esporangios de *P. cactorum* de los de *P. citrophthora* ya que los primeros poseen pedicelos cortos (< 5  $\mu\text{m}$ ), mientras que los esporangios de la segunda especie poseen pedicelos de largo intermedio (10-12  $\mu\text{m}$ ) (Erwin y Ribeiro, 1996). En este estudio, y como ya se mencionó, la longitud media de los pedicelos fue de 3  $\mu\text{m}$ , con un mínimo de 2,5  $\mu\text{m}$  y un máximo de 5  $\mu\text{m}$ . Coincidiendo con Erwin y Ribeiro (1996), el parámetro morfológico de mayor relevancia para caracterizar a *P. cactorum* es la presencia de esporangios predominantemente ovoides con una papila prominente que le confiere la forma típica de limón, tal como lo registrado en este trabajo. Mientras que *P. citrophthora* presenta esporangios de tamaños y formas variables y muchos de ellos con dos ápices divergentes (Waterhouse y Waterston, 1964<sup>b</sup>; Erwin y Ribeiro, 1996).

En función de los resultados obtenidos se podría decir que existe una escasa variación intraespecífica en las cepas aisladas de *P. cactorum* en el Alto Valle Este ya que Erwin (1983) afirma que si existiera tal variación debería manifestarse a través de las características morfológicas y morfométricas. Esto coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos donde se menciona la existencia de una elevada uniformidad morfológica y genética de *P. cactorum* en el mundo (Brasier y Hansen, 1992; Hantula *et al.*, 2000; Bhat *et al.*, 2006) debido probablemente a su reciente dispersión desde su centro de origen (Europa o el Cáucaso) respecto de otras especies de *Phytophthora* (Brasier y Hansen, 1992).

El reducido grado de variabilidad de los caracteres morfológicos y morfométricos observados en esta especie confirmaría la confiabilidad de dichos caracteres como elementos de diagnóstico (Erwin, 1983).

#### **4. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PERAL cv. WILLIAMS**

Se pudo observar en ambas temporadas una tendencia de las plantas enfermas a presentar un promedio menor del área seccional del tronco respecto de las plantas asintomáticas tanto en la plantación N°1 como en la N°2, si bien no se detectaron diferencias significativas. Es importante resaltar que el incremento medio del AST registrado por las plantas enfermas entre la primera y la segunda temporada de estudio fue en promedio un 70% inferior al incremento medio logrado por las plantas asintomáticas, si bien las diferencias fueron significativas sólo en la plantación N°1. Esto podría deberse a que en la plantación N°2 se registró una mayor variabilidad en los datos que no permitió que las diferencias fueran apreciables estadísticamente.

La reducción en el área seccional también fue observada por McIntosh (1960) en perales afectados por *P. cactorum* en British Columbia, y reportada por Agrios (1996). Si bien Utkhede y Smith (1991) no obtuvieron diferencias significativas, observaron una reducción en el diámetro de troncos de plantas de manzano afectadas por *P. cactorum*. Utkhede *et al.* (1997) también indicaron una disminución del área seccional del tronco en árboles de ciprés Lawson (*Chamaecyparis lawsoniana*) con podredumbre radical causada por *Phytophthora lateralis*, si bien las diferencias tampoco fueron significativas. Esta disminución podría deberse a que la interrupción del floema en el tronco causada por *P. cactorum* durante varias temporadas consecutivas reduciría el suministro de fotoasimilados hacia los diferentes destinos de la planta, similar al principio fisiológico del 'anillado' (Sozzi, 2006<sup>a</sup>). La interrupción permanente del floema en las plantas enfermas generaría durante el otoño una menor removilización de fotoasimilados hacia las raíces y por ende se reduciría su disponibilidad durante la etapa de

crecimiento de los órganos destino de la planta. La consecuente reducción del crecimiento secundario se podría ver reflejada en una menor área seccional del tronco en las plantas enfermas, si bien sería necesario continuar con la medición de esta variable para determinar si la disminución en el área seccional a causa de esta enfermedad es significativa.

Cabe resaltar que las plantas enfermas de la parcela N°2 presentaron una reducción del área seccional del tronco más acentuada lo cual podría deberse a que dicha parcela registró un grado de severidad de la enfermedad más elevado que el de la plantación N°1.

En general, las plantas enfermas registraron una reducción en la producción de frutos respecto de las plantas asintomáticas, y la magnitud de esta reducción se acentuó notablemente en ambas parcelas en la segunda temporada de estudio, registrándose una disminución media del 70%. Es menester mencionar que los resultados obtenidos en la plantación N°2 durante la segunda temporada de estudio no serían consistentes ya que estarían influenciados por el efecto de las heladas primaverales (que no fueron controladas eficientemente). No obstante esto, aparece como relevante que en ambas plantaciones se registró una disminución del orden del 70% en las plantas enfermas respecto de las plantas asintomáticas. Se hubiera esperado observar una merma en la producción de frutos de plantas enfermas proporcional al grado de severidad de la enfermedad registrado en las mismas. Sin embargo, en la plantación N°2, la cual registró un grado de avance mayor de la enfermedad, no se evidenciaron diferencias significativas en la producción de frutos de plantas enfermas en la primera temporada a pesar de que éstas presentaron una producción similar a las plantas enfermas de la plantación N°1. Esto podría deberse a que las plantas asintomáticas de la plantación N°2 exhibieron una producción media de 196,2 frutos/árbol, inferior a la esperada para una plantación de esas características según el pronóstico de producción realizado en esa temporada por la Secretaría de Fruticultura de Río Negro para el Alto Valle (valor esperado para peral cv. Williams de 10 a 19 años de edad conducido en espaldera: 278 frutos/árbol) (Tassile y Reeb, 2008). Esta reducción en la producción de frutos de las plantas asintomáticas podría haber 'enmascarado' la disminución a causa de la enfermedad en las plantas enfermas de la plantación N°2 en la primera temporada.

Hay antecedentes que mencionan un descenso en la producción de frutos en frutales de pepita afectados por *Phytophthora* spp. (Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Utkhede y Smith, 1991; Agrios, 1996) tal como se observó en este estudio. Cabe destacar que este es el primer registro en el que se cuantifica esta disminución en plantaciones de peral con podredumbre de cuello causada por *P. cactorum* en el país.

Si bien la carga frutal no fue significativamente menor en las plantas enfermas durante la temporada 2007/2008, sí lo fue en la temporada 2008/2009. En esta última, las plantas enfermas de ambas parcelas presentaron una reducción media superior al 50% de la carga frutal respecto de las plantas asintomáticas, en concordancia con los resultados obtenidos en la producción de frutos por planta. En este parámetro los valores consistentes corresponderían solo a la parcela N°1 ya que los de la parcela N°2 fueron afectados por las heladas primaverales. Pese a esto, es importante destacar la magnitud de la reducción registrada en las plantas enfermas en ambas temporadas. Asimismo, McIntosh (1960) hace mención a una reducción en la carga frutal de perales afectados por *P. cactorum*.

El rendimiento medio de las plantas enfermas fue menor en ambas plantaciones durante la segunda temporada, registrándose una reducción media de 65%. Lockhart y Newbery (1988) observaron una reducción en los rendimientos de 0,5% en frutales de pepita de Lunenburg County (Canadá) afectados por *P. cactorum*, si bien estos resultados no son comparables con los obtenidos en el presente estudio ya que se desconoce cómo fue calculada esta variable por los autores antes citados. A pesar de que los valores obtenidos en la plantación N°2 en la segunda temporada estarían influenciados por la acción de las heladas primaverales, se debe resaltar la magnitud en la reducción de este parámetro registrada en las plantas enfermas respecto de las plantas asintomáticas.

## **5. EFECTO DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO CAUSADA POR *P. CACTORUM* SOBRE LA CALIDAD DE FRUTOS DE PERAL cv. WILLIAMS**

Los frutos provenientes de plantas enfermas presentaron una reducción en la masa media en las dos parcelas durante la primera temporada de trabajo, si bien en la segunda temporada no se observaron en general diferencias significativas. Esto podría deberse a que la producción media de frutos en las plantas asintomáticas de la parcela N°1 fue mayor en la segunda temporada, lo cual se vería reflejado en la reducción de la masa media de los frutos de dichas plantas respecto de la primera temporada. Esta disminución en la masa de los frutos de árboles asintomáticos podría haber diluido las diferencias entre plantas enfermas y asintomáticas durante la segunda temporada. Asimismo, en la plantación N°2 este parámetro se vio afectado por las heladas primaverales que redujeron sensiblemente el número de frutos por planta y los remanentes podrían haber crecido mejor enmascarando las posibles diferencias entre plantas enfermas y plantas asintomáticas. Cabe mencionar que, debido a que la metodología utilizada en este estudio para la medición de la masa en las dos temporadas fue diferente, sería recomendable realizar mediciones durante varias temporadas para poder corroborar los resultados antes mencionados. Si bien el efecto negativo sobre el tamaño de

frutos de manzanos y perales afectados por *P. cactorum* es mencionado por varios autores (Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Agrios, 1996; Rossini y Di Masi, 1996), este es el primer reporte que pondera una reducción de la masa de los frutos en perales cv. Williams afectados por este microorganismo.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de frutos con diámetro superior a 67 mm entre plantas asintomáticas y enfermas en la segunda temporada de estudio. Como se explicó anteriormente, esto podría deberse al incremento en la producción de frutos registrado en las plantas asintomáticas en la segunda temporada, lo que habría causado una reducción en el tamaño medio de los frutos. En la plantación N°2 esta variable se vio influenciada por el efecto de las heladas primaverales que redujeron el número de frutos por planta, lo cual podría haber generado un mayor crecimiento de los frutos restantes, atenuando las probables diferencias entre plantas enfermas y asintomáticas. Sería necesario continuar con las mediciones de esta variable durante varias temporadas ya que en este estudio se la relevó en una temporada.

Es importante mencionar que 'Williams' es una cultivar de ciclo corto, con un período de crecimiento del fruto que apenas supera los cien días (Benítez, 2001). Asimismo, las temperaturas en algunas temporadas no son suficientemente elevadas en el Alto Valle, lo cual conlleva a iniciar la cosecha con frutos que alcanzaron la madurez fisiológica -etapa en la cual se ha producido el máximo crecimiento y maduración- pero con tamaño insuficiente para comercializar, lo cual es muy frecuente en 'Williams' (Benítez *et al.*, 1998; Gomila *et al.*, 2005; Calvo, 2008). Por lo antes expuesto, el tamaño en las peras de esta cultivar es considerado un atributo de calidad relevante durante su comercialización (Campana, 2006). Si a estas características varietales y meteorológicas se adicionara la reducción de la masa de los frutos causada por la enfermedad, la repercusión negativa en los retornos obtenidos en el proceso de venta sería notable y la misma aumentaría temporada tras temporada.

La incidencia del 'asoleamiento' en frutos de plantas enfermas durante la segunda temporada fue inferior a la registrada habitualmente en frutos de peral cv. Williams a cosecha, la cual se estima en un 5% promedio. Cabe mencionar que se registró un mayor porcentaje de frutos 'asoleados' en las plantas enfermas de la plantación N°2 en comparación con la N°1. Esto podría estar relacionado con el grado de severidad de la enfermedad ya que las plantas de la parcela N°2 registraron un grado de severidad de la enfermedad más elevado. Estas plantas, al estar más debilitadas que las plantas enfermas de la parcela N°1, desarrollarían una menor área foliar y por ende los frutos estarían más expuestos a la radiación. Sin embargo sería conveniente realizar estas mediciones en próximos trabajos ya que en el presente se efectuó una inspección visual del tipo cualitativo de la densidad del área foliar. Erwin y Ribeiro

(1996) también mencionan que plantas afectadas por *P. cactorum* presentan mayor probabilidad de sufrir quemaduras por sol debido a la menor cantidad de hojas.

Las plantas enfermas de ambas parcelas presentaron mayor porcentaje de frutos con daños provocados por las heladas primaverales respecto de las plantas asintomáticas en la segunda temporada. La mayor incidencia de las heladas en frutos de plantas enfermas podría estar relacionada con una menor tolerancia al frío desencadenada por la situación de estrés producida por *P. cactorum*, ya que hay antecedentes que mencionan que la exposición de plantas a situaciones de estrés disminuye su capacidad de aclimatación y la tolerancia al frío (Gariglio *et al.*, 2006). Asimismo, la plantación N°2 registró un mayor porcentaje de frutos helados respecto de la plantación N°1, similar a los resultados obtenidos con el porcentaje de frutos 'asoleados'. El hecho de que las plantas enfermas de la parcela N°2 registren una mayor frecuencia de frutos 'asoleados' y con daño por heladas podría deberse a que éstas poseen un grado de severidad más avanzado respecto de las plantas enfermas de la plantación N°1, lo cual les generaría mayor vulnerabilidad ante determinados eventos climáticos como los medidos en este estudio. De todas formas sería necesario repetir estas evaluaciones para poder llegar a conclusiones más consistentes ya que el mismo se realizó durante una sola temporada de estudio. Si este comportamiento se repitiera, podría afirmarse que *P. cactorum* no sólo estaría causando una reducción en los rendimientos sino que también produciría pérdidas en la calidad de los frutos, repercutiendo negativamente en su clasificación durante la etapa de procesamiento y por ende afectando el precio obtenido en su venta.

En general, los frutos provenientes de plantas enfermas presentaron mayor tonalidad amarilla en la primera temporada de estudio. En la segunda temporada sólo se registraron diferencias en el color de la epidermis de frutos en la plantación N°1, a diferencia de los resultados obtenidos en el porcentaje de frutos 'asoleados', en los que se registró un mayor porcentaje en la plantación N°2. Sin embargo, estos resultados no serían comparables ya que la medición del color de la epidermis se realizó sobre la región de la epidermis del fruto que no presentaba cambios en la pigmentación provocados por la exposición del fruto a la radiación solar (tales como 'blush' o pigmentación roja, quemado de la piel, etc.). Por tal motivo sería interesante realizar a futuro, en aquellos frutos que presenten daño por 'asoleamiento', mediciones del color de la epidermis en la cara expuesta a la radiación solar y en la cara no expuesta. Hay antecedentes que mencionan una mayor formación de pigmentos antocianicos en frutos de manzano a causa de esta enfermedad (Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Agrios, 1996). Sin embargo, los pigmentos que dan origen al color amarillo en las peras son pigmentos carotenoides, y por ende no debería realizarse una traspolación de los resultados obtenidos en manzanas a los de este estudio. Es importante mencionar que éste es el primer trabajo en el que se cuantifica el color de la epidermis de peras provenientes de plantas

afectadas por *P. cactorum*. Un factor que podría estar influyendo en los frutos de plantas enfermas que presentaron mayor tonalidad amarilla podría ser el contenido de etileno de dichos frutos, ya que la condición de estrés de las plantas enfermas a causa de la presencia de *P. cactorum*, podría provocar un aumento de la producción de etileno y por ende desencadenar una serie de procesos metabólicos regulados por esta hormona durante la maduración de frutos climatéricos, entre ellos la síntesis del color amarillo de la epidermis. El efecto en el color también podría relacionarse con una mayor exposición de los frutos de las plantas enfermas debido a una menor cantidad de follaje producto del estado de debilitamiento del árbol. Esto coincide con lo expuesto por Raffo *et al.* (2008), quienes registraron que frutos de cv. Williams expuestos a la radiación solar mostraron valores más bajos de HUE (mayor tonalidad amarilla) respecto de frutos parcialmente sombreados en el Alto Valle de Río Negro. Sin embargo, esta variable no fue cuantificada durante este estudio.

En la generalidad de los casos, los frutos provenientes de plantas enfermas presentaron mayor firmeza que los frutos de plantas asintomáticas en las dos plantaciones, si bien estas diferencias fueron mayores en la plantación N°1. Es importante destacar que las diferencias registradas en la firmeza de la pulpa de frutos de plantas asintomáticas y enfermas entre pasadas de cosecha y temporadas, siguió una tendencia similar a la registrada en la masa de esos frutos. Es decir que cuando se detectó un aumento significativo en la firmeza de la pulpa de frutos de PE, la masa de dichos frutos fue menor. Esto podría deberse a que la enfermedad influiría indirectamente sobre la firmeza de la pulpa, causando la reducción de la masa media de los frutos de plantas enfermas, pero no podría decirse con estos datos que la presencia de *P. cactorum* estaría afectando de manera directa este proceso metabólico. La relación entre la masa de frutos y la firmeza de la pulpa también fue registrada por Benítez *et al.* (2005) y Sozzi, (2006<sup>b</sup>) quienes observaron que frutos pequeños eran más firmes.

El contenido de sólidos solubles de los frutos provenientes de plantas enfermas y plantas asintomáticas no registró diferencias significativas. Sería interesante continuar con la medición de esta variable durante las siguientes temporadas para determinar si efectivamente existe alguna relación entre el contenido de sólidos solubles en los frutos de plantas enfermas y la presencia de *P. cactorum*.

La acidez titulable de frutos provenientes de plantas enfermas fue menor en ambas plantaciones en las dos temporadas. La reducción en la acidez podría estar relacionada con una mayor exposición de los frutos de plantas enfermas a la radiación solar, tal como registró Kingston (1992) en manzanos cv. Red Delicious. Si bien se observó la reducción del área foliar en plantas enfermas, ésta no fue cuantificada en el presente trabajo, por ende no podría aseverarse la existencia de dicha relación. Se conoce que los frutos que presentan valores

reducidos de acidez a cosecha tienen una elevada probabilidad de que su calidad se vea afectada. Este comportamiento se debe a que la acidez disminuye notablemente durante la conservación debido a que los ácidos orgánicos son los primeros sustratos utilizados en la respiración tal como lo mencionan Kingston (1992) y Barnes (2003). Este es el primer registro que cuantifica esta variable en peras afectadas por *P. cactorum* a cosecha.

Si bien la acidez de los frutos de plantas enfermas se ubicó por encima del mínimo establecido para el inicio de cosecha comercial de peral cv. Williams (3-4 g/L), la reducción de dicho parámetro iría en detrimento de la calidad gustativa al provocar una disminución en el sabor del fruto (Benítez *et al.*, 2005; Campana, 2006). Calvo y Candan (2004) registraron que un grupo de consumidores fueron capaces de detectar diferencias de 0,8 g/L de acidez, 4,9 N (1,1 lb/pulg<sup>2</sup>) de firmeza y 1% de sólidos solubles entre manzanas de una misma cultivar. Aquellas manzanas que registraron los contenidos de acidez, sólidos solubles y firmeza más bajos fueron catalogadas como 'no aptas' para el consumo. Si bien los valores obtenidos en este estudio no son comparables con el trabajo antes mencionado por tratarse de especies diferentes, sería interesante evaluar a futuro estos parámetros para estimar los potenciales umbrales de aptitud de consumo por parte de los consumidores y determinar si efectivamente las diferencias registradas entre frutos de plantas enfermas y asintomáticas pueden ser detectadas por el consumidor.

Se hubiera esperado observar un incremento en la producción de etileno en frutos provenientes de plantas enfermas ya que como se mencionara anteriormente la condición de estrés causada por la presencia de un patógeno en diferentes tejidos vegetales provocaría un aumento en la producción del "etileno por estrés" o etileno endógeno (Adato y Gazit, 1974; Yu y Yang, 1980; Apelbaum y Yang, 1981; Lund *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1999). Este 'etileno por estrés' aceleraría la maduración y causaría pérdida de calidad del fruto durante el transporte y la conservación (Yu y Yang, 1980). Si bien los frutos de plantas enfermas produjeron mayor cantidad de etileno durante el pico climatérico en la plantación N°1 en la primera temporada y en la plantación N°2 en la segunda, los resultados obtenidos en este estudio fueron erráticos entre temporadas y entre plantaciones. Por lo antes mencionado, también se hubiera esperado registrar en los frutos de plantas enfermas la producción del pico climatérico antes que en los frutos de plantas asintomáticas por acción del 'etileno por estrés', sin embargo no se registraron diferencias en el tiempo transcurrido desde el inicio de la medición de producción de etileno hasta el pico climatérico.

Asimismo, se hubiera esperado detectar una aceleración en la madurez - reflejada en la pérdida de firmeza de la pulpa, mayor coloración amarilla en la epidermis, etc. - en los frutos de

plantas enfermas que presentaron una mayor producción de etileno sin embargo esto no fue observado.

Debido a que el método para la determinación de la producción de etileno es complejo y los datos obtenidos presentan gran variabilidad, sería necesario continuar con las mediciones durante varias temporadas (Benítez *et al.*, 2005).

Sería interesante a futuro relacionar la dinámica de la producción de etileno con los índices de madurez en frutos de plantas enfermas y plantas asintomáticas durante su conservación para determinar si efectivamente los frutos de las primeras ven afectada su calidad a causa de la enfermedad.

## 6. DETECCIÓN DE *PHYTOPHTHORA* SPP. EN EL AGUA DE RIEGO

A partir de la realización del ensayo de diluciones haciendo uso del kit serológico por medio de la técnica DAS-ELISA, se pudo detectar la presencia tanto de zoosporas como de micelio de *Phytophthora* spp. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mac Donald *et al.* (1990), Ali Shtayeh *et al.* (1991), Benson (1991), Psdheidt *et al.* (1992), Mac Donald *et al.* (1994), Latorre y Wilcox (1996) y Latorre *et al.* (2001), indicando la utilidad de este tipo de kits en la detección de distintas formas de dispersión de la especie en agua de riego.

Como se comentó anteriormente, si bien las zoosporas son los principales agentes de dispersión (Weste, 1983), los esporangios caducos de *P. cactorum* juegan un rol tan importante como aquellas en la diseminación (Duniway, 1983). Asimismo, existen registros de germinación de oosporas y presencia de micelio de esta especie en suelos con agua libre (Zentmyer y Erwin, 1970; Malajczuk, 1983; Weste, 1983; Utkhede, 1986; Browne y Mircetich, 1988; Jeffers y Wilcox, 1990; Harris, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996). De allí la importancia de contar con una técnica serológica policlonal como la utilizada en este trabajo, con anticuerpos que puedan unirse a los epitopes de antígenos presentes no sólo en las diferentes estructuras del microorganismo sino también a diferentes 'porciones' de una misma estructura, favoreciendo la sensibilidad en la detección (Erwin y Ribeiro, 1996). Esto teniendo en cuenta que previamente se constató la presencia de *P. cactorum* por morfología y morfometría en las plantas enfermas.

El trabajo realizado por Ali-Shtayeh *et al.* (1991) y el presente estudio son los únicos antecedentes de filtrado de muestras de agua y posterior detección serológica de propágulos de *Phytophthora* spp. El umbral detectado en este trabajo con el kit serológico ( $7 \times 10^4$  zoosporas/ml) fue más elevado que el obtenido por Ali-Shtayeh *et al.* (1991) en muestras de agua con DAS-ELISA con anticuerpos monoclonales (700 zoosporas). La menor sensibilidad

registrada en este trabajo podría deberse a varios factores relacionados con características propias de las muestras de agua y/o al método de filtrado utilizado previo a la prueba serológica.

Entre los factores que podrían influir se encuentra el tiempo de filtrado que, en caso de ser excesivamente prolongado, podría forzar el pasaje de parte del inóculo –incluso zoosporas- a través de los poros del filtro tal como lo mencionan Hong *et al.* (2002). Estos autores registraron en su trabajo un tiempo medio de filtrado de 34 segundos para filtrar 100 ml de agua de riego con filtros de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ . El tiempo medio requerido durante este trabajo para filtrar el mismo volumen de agua y utilizando filtros de iguales características fue de 60 segundos, es decir el doble de tiempo. Esto podría estar relacionado con la presión de trabajo de la bomba de vacío, ya que en el presente estudio se contó con una bomba de vacío de menor presión de trabajo a la utilizada por Hong *et al.* (2002).

Otro factor que podría estar influyendo en el nivel de detección registrado en la prueba DAS-ELISA es el material de los filtros ya que el tipo de material, junto con otros factores, puede modificar la cantidad de propágulos retenidos por el filtro (Hong *et al.*, 2002). En este estudio se utilizaron filtros de nitrocelulosa debido a que hay estudios que registran una menor lisis de zoosporas retenidas en este tipo de filtros respecto de otros materiales (Erwin y Ribeiro, 1996; Wakeham *et al.*, 1997). Sin embargo, Ali-Shtayeh *et al.* (1991) no hacen mención al material de los filtros utilizados en su trabajo y por ende no podrían sacarse conclusiones al respecto.

Como ya es sabido, las muestras de agua de riego no requirieron de macerado mecánico previo a la realización de la prueba serológica debido a que las diferentes formas de dispersión – principalmente zoosporas - se encontrarían libres en el medio acuoso y no existirían ‘barreras’ por parte del tejido hospedero, que dificulten la detección de los antígenos presentes en los propágulos del microorganismo.

Es importante mencionar que, si bien los kits serológicos DAS-ELISA han sido utilizados a nivel mundial en muestras de agua de riego, éste es el primer registro en el cual se utilizó el kit serológico policlonal Agdia® Inc. (Elkhart, Indiana) en este tipo de muestras, confirmando su aplicación para la detección de *Phytophthora* spp.

Como se ha comentado con anterioridad, son diversas las especies del género que han sido aisladas de fuentes de agua en plantaciones de frutales de pepita (McIntosh, 1966<sup>b</sup>; Harris, 1989; Ali-Shtayeh *et al.*, 1991; Grove y Boal, 1991; MacDonald *et al.*, 1994; Bush, 2002; Pettitt *et al.*, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>a y b</sup>; Yamak *et al.*, 2002; Hong y Moorman, 2005). En

los dos ensayos de detección realizados se registró la presencia de *Phytophthora* spp. en el agua utilizada para irrigar las plantaciones de peral cv. Williams, coincidiendo con los antecedentes registrados en distintos lugares del mundo.

Los trabajos de investigación realizados indican una mayor frecuencia de detección de *Phytophthora* spp. en agua durante primavera y otoño (Grove y Boal, 1991; Steciow, 1998; Bush, 2002; Themann *et al.*, 2002<sup>b</sup>). La detección de este microorganismo en el agua de riego en primavera tardía de 2008 y en otoño temprano de 2009 en las plantaciones seleccionadas coincide con los antecedentes citados. Las temperaturas medias registradas en ambos meses (22,4°C en diciembre de 2008 y 19,5°C en marzo de 2009) ([www.inta.gov.ar/altovalle/met](http://www.inta.gov.ar/altovalle/met)) se ubicaron dentro del rango necesario para la germinación de esporangios de *P. cactorum* y la liberación de zoosporas (15 a 27°C) (Carlile, 1983; Duniway, 1983; Utkhede, 1986; Harris, 1991).

El 16% de las muestras de agua que reaccionaron positivamente con la prueba serológica en el primer ensayo de detección se ubicó – respetando el sentido del riego - en plantas anteriores a una planta enferma; el 50% en plantas enfermas, y el 34% restante en plantas posteriores a una planta enferma. El porcentaje de detección en muestras de agua tomadas en plantas anteriores a plantas enfermas puede deberse a la presencia de otros ejemplares enfermos –probables fuentes de inóculo- en la misma u otra fila que no fueron incluidas en el presente estudio. A partir de estos resultados podría asumirse que el inóculo de *Phytophthora* spp. se trasladaría por medio del agua desde una planta afectada hacia otras plantas sobre una misma fila, coincidiendo con lo registrado por Ristaino *et al.* (1994) para *P. capsici* en pimiento. Esto concuerda con lo expresado por Carlile (1983) y Duniway (1983) quienes afirman que, si bien las zoosporas presentan mecanismos activos para trasladarse (taxismos), la distancia real de avance es de unos pocos centímetros (6 cm aproximadamente). El movimiento pasivo por flotación o salpicadura sería el responsable de la dispersión a larga distancia de éstos y otros propágulos de *Phytophthora* spp., trasladándose a través del agua de riego o de drenaje o a través de poros con agua en suelos regados tal como lo mencionado por Duniway (1983) y Weste (1983) y lo reportado por Ristaino *et al.* (1994).

En el segundo ensayo de detección, no sólo se observó en la plantación N°1 el mismo comportamiento sino que además se registró un incremento en el nivel de detección con la prueba serológica del 270%. Este aumento en la sensibilidad podría estar relacionado con el momento de muestreo del agua de riego. Mohan (1988) comenta en su trabajo que el nivel de detección del ELISA se redujo en aquellos meses con temperaturas más elevadas, debido a una reducción en la actividad fúngica. Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio ya que, si bien en ambos meses la temperatura media mensual se ubicó dentro del

rango óptimo para la dispersión de este microorganismo, en diciembre de 2008 la temperatura media mensual fue 3°C superior a la registrada en marzo de 2009 cuando se efectuó el segundo ensayo de detección según datos del Área de Agrometeorología EEA Alto Valle ([www.inta.gov.ar/altovalle/met](http://www.inta.gov.ar/altovalle/met)). Este aumento en la temperatura media podría haber reducido el período de actividad de las zoosporas, ya que según Carlile (1983), el mismo dura al menos 10 horas y disminuye a medida que aumenta la temperatura.

El aumento en la sensibilidad de la prueba de ELISA durante el segundo ensayo de detección podría deberse también a una menor cantidad de sedimentos en dispersión observada en las muestras de agua de riego respecto del primer ensayo. Existen trabajos que mencionan que la presencia de sedimentos, en particular la materia orgánica, retenidos en los filtros interfieren en la reacción serológica reduciendo el nivel de detección (MacDonald *et al.*, 1994; Themann *et al.*, 2002<sup>a</sup>). Debido a que en este estudio se realizó una inspección cualitativa del contenido de sedimentos, sería conveniente en futuros trabajos cuantificar el contenido de los mismos y determinar si efectivamente existe relación entre la cantidad de sedimentos en el agua de riego y los niveles de detección registrados en la prueba serológica.

En la plantación N°2 durante el segundo ensayo de detección no se registró la presencia de *Phytophthora* spp. en las muestras de agua con el método DAS-ELISA. Esto podría deberse a que en esa chacra se aplicó Fosetyl Aluminio (Aliette®, Bayer CropScience) luego de la cosecha de la temporada 2008/2009, lo cual podría haber reducido la cantidad de inóculo presente en el suelo, agua y/o restos vegetales.

El pH no indicó una correlación con la absorbancia de las muestras de agua de riego, coincidiendo con los resultados publicados por Steciow (1998) para *Oomycetes* y Themann *et al.* (2002<sup>a</sup>) para *Phytophthora* spp. Tampoco se detectó una relación consistente entre la absorbancia y la conductividad eléctrica, a diferencia de lo observado por Themann *et al.* (2002<sup>a</sup>), quienes registraron que a mayor contenido de sales la absorbancia fue menor debido a que los iones presentes influirían negativamente en los epitopes de los antígenos de *Phytophthora* spp. Es importante mencionar que los valores máximos y mínimos registrados en aquel trabajo (máx. 403 µmohs; mín. 125 µmohs) y en el presente (máx. 347 µmohs; mín. 244 µmohs) fueron similares.

En cuanto a la siembra -previo filtrado- de alícuotas de agua de riego conteniendo propágulos de *Phytophthora* spp. en Agar Harina de Maíz, existen antecedentes que mencionan una baja detección respecto de la técnica serológica. Wilcox (1993) registró en su trabajo una frecuencia de detección de *Phytophthora* spp. provenientes de tejidos de manzano del 3%. Villegas (1998) obtuvo una frecuencia de aislamiento de *Phytophthora* en muestras de

manzano menor al 6%. Sin embargo, la no detección a través de esta metodología podría deberse a otros factores tales como la relación del volumen de agua de riego filtrado y la alícuota sembrada en el medio, que habría que evaluar en futuros estudios. La ausencia de muestras positivas durante el trabajo con esta metodología también podría estar relacionada con la lenta tasa de crecimiento que presenta el género *Phytophthora* en medio de cultivo en comparación con bacterias y hongos saprofitos, incluyendo el género *Pythium* con el que está estrechamente relacionado, los que compiten por nutrientes y espacio y dificultan su detección (Erwin y Ribeiro, 1996). En este sentido se observó el desarrollo de hongos y bacterias antes del tiempo de desarrollo de *P. cactorum*.

La podredumbre desarrollada en los frutos colocados en bandejas con suelo proveniente de las plantaciones evaluadas en este estudio se caracterizó por ser firme, circular y de color marrón, lo cual coincide con lo descrito por Erwin y Ribeiro (1996) y por Harris y Bielenin (1986) quienes también utilizaron manzanas como trampa. Todas las muestras de suelo presentaron al menos un fruto con podredumbre y, si bien se observó al microscopio un micelio con características similares al desarrollado por *Phytophthora* spp., el grado de contaminación fue elevado. Esto podría deberse a que el contacto del tejido con el suelo favorecería el desarrollo de otros hongos, tal como lo menciona Villegas (1998).

Como se comentó con anterioridad, el sistema de riego del tipo gravitacional es ampliamente utilizado en la región del Alto Valle. Cada vez que se efectúa un riego, se producen condiciones de saturación de suelo por un período de tiempo variable, favoreciendo la producción de esporangios, la liberación de zoosporas y la germinación de oosporas y clamidosporas de *Phytophthora* spp. (Duniway, 1983; Browne y Mircetich, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996; Utkhede y Smith, 1996; Ampuero Vega, 2005). Dadas estas condiciones locales es menester contar con una técnica que permita realizar un diagnóstico rápido y, consecuentemente, aplicar las medidas necesarias para el control de la enfermedad en tiempos razonables (Wakeham *et al.*, 1997; Benson, 1991; Bush, 2002). Si bien la técnica de siembra en medios de cultivo como la de frutos trampa son utilizadas ampliamente, requieren de tiempo y preparación (Horner y Wilcox, 1995) y no serían las más adecuadas para la detección de *Phytophthora* spp. en muestras de agua de riego de la región. Es por ello que la técnica ELISA sería la recomendada ya que su aplicación requiere menos tiempo respecto a las técnicas citadas previamente. Además, la prueba DAS-ELISA posee una elevada sensibilidad respecto a las otras dos, detectando bajos niveles de inóculo (Erwin y Ribeiro, 1996; Conci, 1999; Bush, 2002) incluso antes de que se manifiesten los síntomas (Erwin y Ribeiro, 1996). Asimismo está disponible en kits comerciales de fácil uso como el utilizado en este estudio (Agdia® Inc., Elkhart, Indiana), en los cuales un pequeño contenedor posee todos

los materiales necesarios para el test y pueden evaluarse una gran cantidad de muestras en simultáneo (Conci, 1999).

La podredumbre de cuello de peral cv. Williams causada por *Phytophthora* spp. está presente en las tres localidades del Alto Valle Este de Río Negro, donde se realizaron las evaluaciones de este trabajo.

Los síntomas de decaimiento observados en las plantas sintomáticas analizadas del Alto Valle Este no estuvieron estrictamente relacionados con la presencia de *Phytophthora* spp.

Las características morfológicas y morfométricas de los aislados analizados, indicaron que la única especie causal de la podredumbre de cuello en peral cv. Williams del Alto Valle Este es *Phytophthora cactorum*.

Las plantas de las cuales se aisló *P. cactorum* presentaron podredumbres que se desarrollaron desde el cuello y hacia la porción apical de las mismas, de aspecto húmedo y consistencia esponjosa. Esta sintomatología acotaría el diagnóstico, ante la detección de síntomas de decaimiento, a la presencia de *P. cactorum* como agente causal para las condiciones agroecológicas de la región bajo estudio. En ninguno de los casos se observaron podredumbres radicales.

Los árboles afectados por la enfermedad tuvieron menor rendimiento que los árboles asintomáticos. La disminución en el rendimiento correspondió a la conjunción de una menor cantidad de frutos por planta e inferior tamaño de los mismos en la cosecha.

Se observó una influencia negativa de la presencia de *P. cactorum* sobre la calidad de los frutos, determinada por distintos índices de madurez y parámetros de calidad. Los frutos provenientes de plantas afectadas en general manifestaron una mayor incidencia de problemas de 'asoleamiento', de daños por heladas primaverales y menor acidez total titulable.

Se verificó la presencia de propágulos de *Phytophthora* spp. en el agua de riego en la proximidad de plantas afectadas por la enfermedad tanto en primavera como en otoño. Esto da sustento a suponer que este agente puede desplazarse desde plantas enfermas hacia plantas sanas. Se comprobó asimismo que el kit serológico policlonal Agdia® Inc. permite detectar la presencia de zoosporas, micelio y esporangios de *Phytophthora* spp. en muestras de agua de riego.

- Adato I. y Gazit S. 1974. Water-deficit stress, ethylene production, and ripening in avocado fruits. *Plant Physiology* 53:45-46.
- Agrios G.N. 1996. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa S.A. México. 820pp.
- Agustí Alcals L. 2007. Characterization and efficacy of bacterial strains for biological control of soil-borne diseases caused by *Phytophthora cactorum* and *Meloidogyne javanica* on rosaceous plants. Doctoral Thesis. Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària, Institut de Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona. 152 pp.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. y Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th edition. Wiley, New York. 868 pp.
- Alcoba N. J., Bejarano N. y Catacata J. 2005. Enfermedades de los cultivos de Jujuy y Salta diagnosticadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu. 1ª Edición. Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju. San Salvador de Jujuy. 74pp.
- Ali-Shtayeh M.S., Mac Donald J.D. y Kabashima J. 1991. A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. *Plant Disease* 75:305-311.
- Ampuero Vega J. 2005. Tristeza de la petunia (*Petunia x hybrida*) en Chile. Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Dirección de Investigación y Postgrado, Programa de postgrado en Ciencias de la Agricultura. 57 pp.
- Apelbaum A. y Yang S.F. 1981. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant Physiology* 68:594-596.
- Área de Agrometeorología INTA EEA Alto Valle [en línea] <[www.inta.gov.ar/altovalle/met](http://www.inta.gov.ar/altovalle/met)> [consulta: 27 febrero 2010].
- Avellá B. y Viñuela M. 2009. Alto Valle Variedades. CAR 2005. Censo Provincial de Agricultura Bajo Riego. Secretaria de Fruticultura de Río Negro. 37 pp. [en línea] <<http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=166>> [consulta: 30 noviembre 2009].
- Barnes N. E. 2003. Generalidades sobre la composición química de los frutos. Cátedra de Tecnología de Frutas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. 26 pp.
- Benítez C. E. 2001. Cosecha y poscosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia. INTA, EEA Alto Valle. Argentina. 126 pp.
- Benítez C., Insúa E., Duprat F., Grotte M. 1998. Fruit placement on the tree and its influence on maturity and quality of pears. *Acta Horticulturae (ISHS)* 475: 527-531.
- Benítez C.E., Castro H.R., Ricca A.P. y Vaudagna S.R. 2005. Peras y manzanas: Factores que afectan la calidad de los frutos. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. 396 pp.

- Benson D.M. 1991. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in Azalea with commercial serological assay kits. *Plant Disease* 75:478-482.
- Bergna D.A. 1982. Etiología de la podredumbre del tronco de los perales en el Alto Valle de Río negro. 2º Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Ciudad de Buenos Aires. 20-26 de noviembre.
- Bergna D.A. 1983. Etiología de la podredumbre del tronco de los perales. V Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 28. Rosario. Santa Fe. 7-9 de septiembre.
- Bestvater C.R. y Casamiquela C.H. 1983. Distribución textural de los suelos del Alto Valle. Boletín de divulgación técnica N°29. INTA. 7 pp.
- Besoain X., Arenas C., Salgado E. y Latorre B.A. 2005. Efecto del período de inundación en el desarrollo de la tristeza del palto (*Persea americana*), causada por *Phytophthora cinnamomi*. *Ciencia e Investigación Agraria* 32:97-103.
- Bhat R.G., Colowit P.M., Tai T.H. y Browne G.T. 2006. Genetic and pathogenic variation in *Phytophthora cactorum* affecting fruit and nut crops in California. *Plant Disease* 90:161-169.
- Bielenin A. y Jones A.L. 1988. Prevalence and pathogenicity of *Phytophthora* spp. from sour cherry trees in Michigan. *Plant Disease* 72:473-476.
- Bolay A. 1992. Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse romande et au Tessin. 1. Nature et importance des dégâts; espèces identifiées. *Revue suisse Vitic.Arboric.Hortic.* 24:281-292.
- Brasier C.M. y Hansen E.M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part II: Phylogeny, speciation, and population structure. *Annual Review of Phytopathology* 30:173-200.
- Browne G.T. y Mircetich S.M. 1988. Effects of flood duration on the development of *Phytophthora* root and crown rots of apple. *Phytopathology* 78:846-851.
- Browne G.T. y Mircetich S.M. 1996. Effects of month of inoculation on severity of disease caused by *Phytophthora* spp. in apple root crowns and excised shoots. *Phytopathology* 86:290-294.
- Browne G.T. y Viveros M.A. 1999. Lethal cankers caused by *Phytophthora* spp. in almond scions: Specific etiology and potential inoculum sources. *Plant Disease* 83:739-745.
- Bruzzone I. 2009. Pera. Análisis de la cadena alimentaria. Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos - Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos Dirección Nacional de Alimentos - Sector frutas. [en línea] < [www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_32/cadenas/Frutas\\_Pera.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_32/cadenas/Frutas_Pera.htm)> [consulta: 17 noviembre 2009].
- Bush E.A. 2002. Characterization of *Phytophthora* species in recycled irrigation water at a container nursery in southwestern Virginia. Thesis Master of Science. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 142 pp.

- Cahill D.M. y Hardham A.R. 1994. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 84:193-200.
- Calvo G. 2008. Impacto del 1-metilciclopropeno en cultivares de peras tempranas producidas en el Alto Valle de Río Negro. Tesis de Magíster. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA) - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 132 pp.
- Calvo G. y Candan A.P. 2004. Relación entre los parámetros de madurez y el análisis sensorial de manzanas. *Rompecabezas Tecnológico* 41:33-37.
- Calvo G. y Sozzi G.O. 2004. Improvement of postharvest storage quality of 'Red Clapp's' pears by treatment with 1-methylcyclopropene at low temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 79:930-934.
- Calvo G. y Sozzi G.O. 2009. Effectiveness of 1-MCP treatments on 'Bartlett' pears as influenced by the cooling method and the bin material. *Postharvest Biology and Technology* 51:49-55.
- Cameron H.R. 1962. Susceptibility of pear roots to *Phytophthora*. *Phytopathology*. 52:1295-1297.
- Campana B.M.R. 2006. Índices de madurez, cosecha y empaque de frutas. 707-768. En: Sozzi G.O (Ed.). Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. 805 pp.
- Candan A.P., Graell J. y Larrigaudière. 2008. Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. *Postharvest Biology and Technology* 47:107-112.
- Carlile M.J. 1983. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Bartnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). St.Paul, Minnesota, USA. pp. 95-107.
- Casper R. y Mendgen K. 1979. Quantitative Serological Estimation of a Hyperparasite: Detection of *Verticillium lecanii* in Yellow Rust Infected Wheat Leaves by ELISA. *Phytopathologische Zeitschrift* 94:89-91.
- Causin R., Scopel C., Grendene A., Montecchio L. 2005. An improved method for detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using SCAR markers. *Journal of Plant Pathology* 87:25-35 (abstract).
- Cichón L. I., Di Masi S.N., Fernández D.E., Magdalena J.C., Rial E.J. y Rossini M.N. 1996. Guía ilustrada para el monitoreo de plagas y enfermedades en frutales de pepita. INTA - EEA Alto Valle. 72 pp.
- Clark M.F. y Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.

- Conci V.C. 1999. Técnicas Serológicas. 23-31. En: Docampo D.M. y Lenardón S.L. (Eds.). Métodos para detectar patógenos sistémicos. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA, Córdoba, Argentina. 178 pp
- Converse R.H. y Martin R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. 179-196. En: Hampton R., Ball E., De Boer S. (Eds). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 389 pp.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G. y Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. Fungal Genetics and Biology. 30:17-32.
- Cordon V., Forquera J., Gastiazoro J., Lassig J., Bastanki M. y Nordestrom G. 2000. Caracterización climática del Alto Valle del Río Negro y Neuquén-Limay Inferior. Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola. Fac. de Cs. Agrarias. Univ. Nac. del Comahue. Cinco Saltos, Río Negro, Argentina. 53 pp.
- Davidson J.M., Wickland A.C., Patterson H.A., Falk K.R. y Rizzo D.M. 2005. Transmission of *Phytophthora ramorum* in mixed-evergreen forest in California. Phytopathology 95:587-596.
- Dick M. W. 2001. *Straminipilous* Fungi. Systematics of the *Peronosporomycetes* including accounts of the marine *Straminipilous* protists, the *Plasmodiophorids* and similar organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 670 pp.
- Duniway J.M. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases.. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). St. Paul, Minnesota, USA. pp. 175-187.
- Elena K. y Paplomatas E.J. 1999. Collar rot caused by *Phytophthora citrophthora* on pear trees in Greece. Phytoparasitica. 27:291-298.
- Enriquez C.H. 1978. Podredumbre del tronco de manzano. Seminario Cátedra de Fitopatología. Facultad Agronomía. Universidad Nacional del Comahue. 3 pp.
- Erwin D.C. y Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, USA. 562 pp.
- Feldman J.M. y Gracia O. 1981. La podredumbre del tronco del peral causada por *Phytophthora cactorum* en Mendoza. IV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 23. Ciudad de Córdoba. 19-21 de agosto.
- Fernández Valiela M.V. 1979. Introducción a la Fitopatología. 3ra<sup>a</sup> Edición. INTA. Colección Científica. Vol. III. Hongos. Talleres de Artes Gráficas Don Bosco. Ciudad de Buenos Aires. 613pp.
- Flores C.R. 2007. Supresión de la tristeza del palto en un suelo de Jujuy. Tesis de Magíster Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 137 pp.

- Frezzi M.J. 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. Revista de investigaciones agrícolas. 4: 47-133. Eds. INTA.
- Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FunBaPa). 2008. Egresos manzanas y peras 2008. [en línea] < <http://www.funbapa.org.ar/statistique/anuario/manzana/2008.pdf>> [consulta: 27 noviembre 2009].
- Gariglio N.F., Pilatti R.A. y Agustí Fonfría M. 2006. Requerimientos ecofisiológicos de los árboles frutales. 43-82. En: Sozzi G.O (Ed.). Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. 805 pp
- Gevens A.J., Donahoo R.S., Lamour K.H. y Hausbeck M.K. 2007. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. Phytopathology 97:421-428.
- Giayetto, A.L. y Villarreal P. 2010. Introducción: Taxonomía y morfología de *Pyrus communis*. En: Pera Williams: Manual para el productor y empacador. Pro Río Negro (Ed.). 167 pp.
- Gisi U. 1983. Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). St. Paul, Minnesota, USA. pp. 109-119.
- GLOBALGAP. 2010. Aseguramiento integrado de fincas. [en línea] <[http://www.globalgap.org/cms/front\\_content.php?idart=160](http://www.globalgap.org/cms/front_content.php?idart=160)> [consulta: 11 enero 2010].
- Gomila T., Calvo G., Di Masi S., Aragón J. y Bellino J. 2005. Análisis de las variables que influyeron en la calidad de la pera Williams. Segunda parte. Fruticultura y Diversificación 46:38-43 pp.
- Grove G.G. y Boal R.J. 1991. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature apple and pear fruit by *Phytophthora cactorum*. Phytopathology. 81:1465-1471.
- Guzmán Lyon G. 2003. Identificación de especies de *Phytophthora* asociadas a *Prunus* spp., efecto de la saturación del suelo en el desarrollo de la pudrición radical y del cuello causada por *P. cryptogea* en portainjertos para duraznero y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Dirección de Investigación y Postgrado, Programa de postgrado en Ciencias de la Agricultura. 63 pp.
- Guzmán G., Latorre B.A., Torres R. y Wilcox W.F. 2007. Relative susceptibility of peach rootstocks to crown gall and *Phytophthora* root and crown rot in Chile. Ciencia e Investigación Agraria 34:31-40.
- Hallett I.C. y Dick M.W. 1981. Seasonal and diurnal fluctuations of *Oomycete* propagule numbers in the free water of a freshwater lake. Journal of Ecology 69:671-692.
- Hantula J., Lilja A., Nuorteva H., Parikka P. y Werres S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. Mycological Research 104:1062-1068 (Abstract).
- Harris D.C. 1989. The significance of apple trees tissues for regeneration of *Phytophthora cactorum* in apple orchards. Journal of Horticultural Science. 64:389-393.

- Harris D.C. 1991. The *Phytophthora* diseases of apple. Review article. Journal of Horticultural Science 66:513-544.
- Harris D.C. y Bielenin A. 1986. Evaluation of selective media and bait methods for estimating *Phytophthora cactorum* in apple orchard soils. Plant Pathology 35:565-574.
- Hemmes D.E. 1983. Cytology of Phytophthora. 9-40. En: Erwin, D. C, Bartnicki-Garcia. S. y Tsao, P. H. 1983. Phytophthora its biology, taxonomy. Ecology and pathology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 392 pp.
- Ho H.H. 1981. Synoptic keys to the species of *Phytophthora*. Mycologia 73:705-714.
- Hoffman T., Schmidt J.S., Zheng X. y Bent A.F. 1999. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. Plant Physiology 119: 935–949.
- Hong C., Richardson P.A. y Kong P. 2002. Comparison of membrane filters as a tool for isolating *pythiaceus* species from irrigation water. Phytopathology 92:610-616.
- Hong C.X. y Moorman G.W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: Challenges and opportunities. Critical Reviews in Plant Sciences 24:189-208 (abstract).
- Horner I.J. y Wilcox W.F. 1995. SADAMCAP, a technique for quantifying populations of *Phytophthora cactorum* in apple orchard soils. Phytopathology 85:1400-1408.
- Horner I.J. y Wilcox W.F. 1996. Temporal changes in activity and dormant spore populations of *Phytophthora cactorum* in New York apple orchard soils. Phytopathology 86:1133-1139
- Hunter R.S. 1942. Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. NBS Circ. C 249, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C., USA.
- INFOSTAT. Versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Programa computacional.
- INTA. 2009. La fruticultura en las provincias de Río Negro y Neuquén. [en línea] <<http://www.inta.gov.ar/altovalle/institucional/ubicacion.htm>> [consulta: 19 diciembre 2009].
- Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal (IASCAV), Dirección Nacional de Calidad Vegetal, Área de Productos no Granarios. 1993. Reglamentaciones de frutas frescas no cítricas para el mercado interno y la exportación. 143 pp.
- Jackson J.E. 2003. Biology of apples and pears. Cambridge University Press, UK. 488 pp.
- Jeffers S.N. y Aldwinckle H.S. 1986. Seasonal variation in extent of colonization of two apple rootstocks by five species of *Phytophthora*. Plant Disease 70:941-945.
- Jeffers S.N. y Aldwinckle H.S. 1987. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. Phytopathology 77:1475-1482.
- Jeffers S.N. y Aldwinckle H.S. 1988. *Phytophthora* crown rot of apple trees: Sources of *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora cambivora* as primary inoculum. Ecology and Epidemiology. 78:328-335.

- Jeffers S.N. y Wilcox W.F. 1990. *Phytophthora* crown, collar and root rots. 43-45. En: Jones, A.L. y Aldwinckle, H.S. (Eds.). Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 100 pp.
- Johnson M.C, Pirone T.P., Siegel M.R. y Varney D.R. 1982. Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 72:647-650.
- Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukariotic cell*. 2:191-199.
- Khan J. 1999. Effect of tree age and various rootstocks of apple on *Phytophthora cactorum*, the cause of crown and root rot in Malakand Division. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2:1338-1340.
- Kingston C.M. 1992. Maturity indices for apple and pear. *Horticultural Review* 13:407-432.
- Latorre B.A. y Wilcox W.F. 1996. Detección de *Phytophthora* spp. en árboles frutales por análisis inmunológicos. *Fitopatología* 31:202-206
- Latorre B.A., Rioja M.E. y Wilcox W.F. 2001. *Phytophthora* species associated with crown and root rot of apple in Chile. *Plant Disease* 85:603-606.
- Lepsis J. y Blanke M.M. 2006. The trunk cross-section area as a basis for fruit yield modelling in intensive apple orchards. *Acta Horticulturae (ISHS)* 707:231-235.
- Lindquist J.C. 1938. Muerte de manzanas ocasionada por *Phytophthora cactorum*. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata*. Ed. Coni, Bs. As. 21:195-199.
- Lockhart C.L. y Newbery R.J. 1988. Collar rot survey of apple and pear orchards in Nova Scotia. *Canadian Plant Disease Survey* 68:129-132 (Abstract).
- Lund B.M y Mapson L.W. 1970. Stimulation by *Erwinia carotovora* of the synthesis of ethylene in cauliflower tissue. *Biochemistry Journal* 119: 251-263.
- Lund T.S., Stall R.E. y Kleea H.J. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell* 10:371-382.
- Malajczuk N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 197-218.
- MacKenzie D.R., Elliott V.J., Kidney B.A., King E.D., Royer M.H. y Theberge R.L. 1983. Application of modern approaches to the study of the epidemiology of diseases caused by *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 303-313.
- MacDonald J.D., Stites J. y Kabashima J. 1990. Comparison of serological and cultural plate methods for detecting species ornamental plants. *Plant Disease* 74:655-659.
- MacDonald J.D., Ali-Shtayeh M.S., Kabashima J. y Stites J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Disease* 78:607-611.
- McIntosh D.L. 1959. Collar rot of pear trees in British Columbia. *Phytopathology*. 49:795-797.
- McIntosh D.L. 1960. The infection of pear rootlets by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease Reporter*. 44:262-264.

- McIntosh D.L. 1966<sup>a</sup>. *Phytophthora* Species and Waterlogging. American Society for Horticultural Science 87:113-116.
- McIntosh D.L. 1966<sup>b</sup>. The occurrence of *Phytophthora* spp. in irrigation systems in British Columbia. Canadian Journal of Botany 44:1591-1596 (Abstract).
- Merwin I.A., Wilcox W.F. y Stiles W.C. 1992. Influence of orchard ground cover management on the development of *Phytophthora* crown root rots of apple. Plant Disease. 76:199-205.
- Mitchell y Kannwischer-Mitchell. 1983. Relationship of inoculum density of *Phytophthora* species to disease incidence in various hosts. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 259-269.
- Mohan S.B. 1988. Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Pathology 37:206-216.
- Nolting J. 2003. El riego en el Alto Valle del Río Negro. Situación actual y algunas propuestas de manejo. Rompecabezas Tecnológico 39:5-9.
- Pettitt T.R., Wakehman A.J., Wainwright M.F. y White J.G. 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. Plant Pathology 51:720-727.
- Preiss O, Avellá B. y Viñuela M. 2007<sup>a</sup>. Análisis de los resultados del Censo Provincial de Agricultura bajo Riego 2005. Región Alto Valle. Secretaría de Fruticultura gobierno de Río Negro. 28 pp. [en línea] <<http://www.fruticultura.gov.ar/contenido/ALTO-VALLE.pdf>> [consulta: 03 enero 2010].
- Preiss O, Avellá B. y Viñuela M. 2007<sup>b</sup>. Análisis de los resultados del Censo Provincial de Agricultura bajo Riego 2005 - provincia de Río Negro. Secretaría de Fruticultura gobierno de Río Negro. 26 pp. [en línea] < <http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=14>> [consulta: 01 enero 2010].
- Preiss O, Avellá B. y Viñuela M. 2007<sup>c</sup>. Análisis de los resultados del Censo Provincial de Agricultura bajo Riego 2005. Municipio de Chichinales. 18 pp. [en línea] < <http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=14>> [consulta: 02 enero 2010].
- Preiss O, Avellá B. y Viñuela M. 2007<sup>d</sup>. Análisis de los resultados del Censo Provincial de Agricultura bajo Riego 2005. Municipio de Gral. Enrique Godoy. 18 pp. [en línea] < <http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=14>> [consulta: 02 enero 2010].
- Preiss O, Avellá B. y Viñuela M. 2007<sup>e</sup>. Análisis de los resultados del Censo Provincial de Agricultura bajo Riego 2005. Municipio de Villa Regina. 21 pp. [en línea] < <http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=14>> [consulta: 02 enero 2010].
- Preiss O. y Díaz N. 2003. Exportaciones de Peras y Manzanas de Río Negro y Neuquén. Inserción en el mercado mundial y factores que condicionan su competitividad. Documento de trabajo. Jornadas PIEA. 24 pp. [en línea] <

- <http://www.fruticulturasur.com.ar/upload/articulos/archivos/Competitividad%20regional%20y%20exportaciones.pdf>> [consulta: 04 enero 2010].
- Psdheidt J.W., Burket J.Z., Fischer S.L. y Hamm P.B. 1992. Sensitivity and clinical use of *Phytophthora*-specific immunoassay kits. *Plant Disease* 76:928-932.
- Raffo D. 2004. Efecto de las altas temperaturas sobre la calidad de los frutos. *Rompecabezas Tecnológico* 40:12-16.
- Raffo M.D., Sánchez E.E. y Sozzi G.O. 2008. Exposure to direct sunlight during the growing season delays postharvest softening of 'Williams' pears and improves their response to 1-methylcyclopropene. *Acta Horticulturae (ISHS)* 800:1035-1040.
- Red Agraria. 2009. Diferenciación de variedades de Peras y Manzanas cultivadas en la Nord Patagonia con fines comerciales. Universidad Nacional del Comahue - Facultad de Ciencias Agrarias Área PostCosecha - Tecnología de Frutas. [en línea] <[http://www.redagraria.com/investigacion/fca\\_unc/tecno\\_frutas/Peras/Williams.html](http://www.redagraria.com/investigacion/fca_unc/tecno_frutas/Peras/Williams.html)> [consulta: 15 diciembre 2009].
- Ribeiro O.K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 55-70.
- Ristaino J.B., Larkin R.P. y Campbell C.L. 1994. Spatial dynamics of disease symptom expression during *Phytophthora* epidemics in bell pepper. *Phytopathology* 84:1015-1024.
- Ristaino J.B. y Gumpertz M.L. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*. 38:541-576.
- Rodríguez A. B. 2004. Factores climáticos. Efectos sobre la calidad de la fruta. *Rompecabezas Tecnológico* 40:4-9.
- Rodríguez A. B. y Muñoz A. R. 2006. Síntesis agrometeorológica para el período 1990-2004. EEA Alto Valle. Boletín de divulgación técnica N° 53. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina. 38 pp.
- Rossini M.N. 2001. Oídios de frutales de clima templado. En: Oídios. Stadnik, M.J. y M.C. Rivera (Eds.). Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. pp. 335-360.
- Rossini M.N. 2007. Relevamiento e incidencia de virosis en frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela para Graduados. 122 pp.
- Rossini M.N., Dobra A. y Di Masi S. 1992. La podredumbre del cuello en manzanos y perales y su control. XV Congreso Argentino de Horticultura. 116. Ciudad de Neuquén. Neuquén. 28 de setiembre-3 de octubre.
- Rossini M. y Di Masi S. 1996. Las podredumbres radicales en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Boletín técnico. INTA Alto Valle. 14 pp.

- Rossini M, Dobra A. y Di Masi S. 1997. Las podredumbres radicales y del cuello en manzanos y perales en Alto Valle de Río Negro y Neuquén. RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias. 28: 73-79.
- Rossini M. y Pérez B.A. 2009. Enfermedades de *Pyrus communis* L. (peral). Atlas Fitopatológico Argentino. [en línea] <<http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=786>> [consulta: 20 septiembre 2009].
- Rossini M.N., Giayetto A.L., Vera D.L. y Frayssinet S. 2010. First Report in Argentina of Apple stem pitting virus Causing Pear Vein Yellow Disease in Pear. Plant Disease 94: 488.
- Sánchez M.E., Andicoberry S. y Trapero A. 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. Forest Pathology 35:115-125 (Abstract).
- Scheer H.A.Th. van der. 1969. The occurrence of crown caused by *Phytophthora* in the apple rootstock MM104. Netherland Journal of Plant Pathology. 65:369-370.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). 2005. Perfil de mercado de manzanas y peras. Dirección de Mercados Agroalimentarios. Área Frutas. [en línea] <[http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil\\_manzanas\\_peras.pdf](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_manzanas_peras.pdf)> [consulta: 20 diciembre 2009].
- Secretaría de Fruticultura de Río Negro (SEFRN). 2007. Breve comentario sobre perspectiva para la próxima temporada. Temporada 2008. [en línea] <<http://www.fruticultura.gov.ar/leer.php?id=55>> [consulta: 26 noviembre 2009].
- Segovia F. 2003. Potencial y Limitantes de la Producción. Argentina de Manzanas y Peras. Fundación Producir Conservando. 22 pp. [en línea] <[http://www.producirconservando.org.ar/docs/servicios/documentos/prod\\_pot\\_mz\\_ps.pdf](http://www.producirconservando.org.ar/docs/servicios/documentos/prod_pot_mz_ps.pdf)> [consulta: 17 diciembre 2009].
- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H. y Archer S.A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa Libros. 671 pp.
- Sosa-Moss C., Perdomo Roldán F., Brathwaite C.W.D. y Salazar Cruz J.J. 1997. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico fitosanitario II. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), México. 223 pp.
- Sozzi G.O. 2006<sup>a</sup>. Fisiología del crecimiento de los frutos. En: Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Sozzi G.O (Ed.). Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. pp. 309-362.
- Sozzi G.O. 2006<sup>b</sup>. Fisiología de la maduración de los frutos de especies leñosas. 669-687. En: Sozzi G.O (Ed.). Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. 805 pp.

- Stahmann M.A., Clare B.G. y Woodbury W. 1966. Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue. *Plant Physiology* 41:1505-1512.
- Stamps D.J., Waterhouse G.M., Newhook F.J. y Hall G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers*. 162:1-28.
- Steciow M.M. 1998. Variación estacional de los *Oomycetes* en un ambiente contaminado: Río Santiago y afluentes (Buenos Aires, Argentina). *Revista Iberoamericana de Micología* 15:40-43.
- Sutula C.L., Guillet J.M., Morrissey S.M. y Ramsdell D.C. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70:722-726.
- Tassile V. y Reeb P. 2008. Pronóstico de producción de peras y manzanas para las provincias de Río Negro y Neuquén. Temporada 2008/2009. Área de Estadística, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. 31 pp.
- Tello J.C. 1985. Consideraciones sobre la taxonomía del género *Phytophthora* de Bary. II curso internacional sobre la protección fitosanitaria en plantaciones frutales de clima templado. Servicio de investigación agraria. Aragón, Zaragoza, 17 de junio de 1985. 16 pp.
- Ten Houten J.G. 1958. Resistance trials against collar rot of apples caused by *Phytophthora cactorum*. *T. Pl.ziekten*. 64:422-431.
- Themann K., Werres S., Diener H.A. y Lütmann R. 2002<sup>a</sup>. Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal of Plant Pathology* 84:41-50.
- Themann K., Werres S., Lütmann R. y Diener H.A. 2002<sup>b</sup>. Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. *European Journal of Plant Pathology* 108:337-343.
- Thomidis T. 2000. Seasonal variation in crown rot of GF677 and KID I peach rootstocks by *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora* and *P. syringae*. *Phytopathologia Mediterranea* 39:396-403.
- Thomidis T., Tsiouridis C. y Cullum J. 2002. Pathogenicity and relative virulence of 11 greek *Phytophthora* species on apple and pear rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 30:261-264
- Tomlinson J.A., Boonham N., Hughes K.J.D., Griffin R.L. y Barker I. 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Applied and Environmental Microbiology* Nov:6702-6710.
- Tuset J.J., Hinarejos C. y Mira J.L. 2002. Podredumbre de los frutos del peral causada por *Phytophthora cactorum* en el área mediterránea española. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*. 28:639-645.
- Utkhede R.S. 1986. Biology and control of apple crown rot caused by *Phytophthora cactorum*: A review. *Phytoprotection*. 67:1-13.

- Utkhede R.S. y Smith E.M. 1991. Effects of fosetyl-Al, metalaxyl, and *Enterobacter aerogenes* on crown and root rot apple trees caused by *Phytophthora cactorum* in British Columbia. *Plant Disease* 75:406-409.
- Utkhede R.S. y Smith E.M. 1996. The effect of three irrigation practices on *Phytophthora* crown and root rot of apple trees under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 102:507-510.
- Utkhede R., Stephen B. y Wong S. 1997. Control of *Phytophthora lateralis* root rot of Lawson cypress with enterobacter aerogenes. *Journal of arboriculture* 23:144-146.
- Villegas B. 1998. Aislamiento, esporulación y patogenicidad de *Phytophthora* sp. en manzana Anna sobre patrón MM106 en Caldas. *Fitopatología*, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. N°20:1-4.
- Voller A., Bidwell D.E. y Bartlett A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization* 53:55-65.
- Wakeham A.J., Pettitt T.R. y White J.G. 1997. A novel method for detection of viable zoospores of *Pythium* in irrigation water. *Annals of Applied Biology* 131:427-435.
- Waterhouse G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England. 92:1-22.
- Waterhouse G.M. 1970. The genus *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England. 122:1-59.
- Waterhouse G.M. y Waterston J.M. 1964<sup>a</sup>. *Phytophthora syringae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N°32. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England. 2 pp.
- Waterhouse G.M. y Waterston J.M. 1964<sup>b</sup>. *Phytophthora citrophthora*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N°33. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England. 2 pp.
- Waterhouse G.M. y Waterston J.M. 1966. *Phytophthora cactorum*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N°111. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England. 2 pp.
- Weste G. 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. En: *Phytophthora* its biology, taxonomy. Ecology and pathology. Erwin, D. C, Bartnicki-Garcia. S. y Tsao, P. H. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 237-257.
- Westwood, M.N. 1982. Fruticultura de zonas templadas. Versión española de Romero, L. y col. Mundi-Prensa. 461pp.
- Wilcox W.F. 1993. Incidence and severity of crown and root rots on four apple rootstocks following exposure to *Phytophthora* species and waterlogging. *Hortscience* 118:63-67.
- Worcel G. 2006. Diagnóstico regional del Alto Valle de Río Negro. Proyecto FAO TCP/ARG/3002. [en línea] <[http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/fao\\_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/fao_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf)> [consulta: 28 diciembre 2009].

- Yamak F., Peever T.L., Grove G.G. y Boal R.J. 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River Valley of Washington State. *Phytopathology*. 92:1210-1217.
- Yu Y. y Yang S.F. 1980. Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiology* 66:281-285.
- Zentmyer G.A. y Erwin D.C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. The Tucker Memorial Symposium on *Phytophthora*. 60:1120-1127.
- Zubeldía H. 2007. Breve comentario sobre el sector frutícola regional. 2007/2008. Secretaría de Fruticultura de Río Negro. [en línea] <<http://www.fruticultura.gov.ar/contenido/1.1-Datos-sector-fruticola-07-08.pdf>> [consulta: 10 diciembre 2009].