



## EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE GENOTIPOS DE COLZA FRENTE A *LEPTOSPHAERIA MACULANS* (*Phoma lingam*).

Prioletta<sup>1</sup>, S.M., Iriarte<sup>1</sup>, L. y Clemente<sup>2</sup>. G.

<sup>1</sup> Chacra Experimental Integrada Barrow (INTA-MAA Prov. Bs. As.); <sup>2</sup> Patología Vegetal, Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA-FCA, UNMdP); Ruta nacional N° 3 km 487. Tres Arroyos E-mail: prioletta.stella@inta.gob.ar

### RESUMEN

La enfermedad más importante para el cultivo de colza es el “Pie negro” ocasionado por *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*). La enfermedad fue detectada en Argentina en los 90 y se registraron una década luego los primeros ataques importantes en cultivos comerciales. En este trabajo se confirma la patogenicidad de un aislamiento argentino de *P. lingam* y se utiliza este aislamiento para evaluar el comportamiento de genotipos del Proyecto de mejoramiento genético de colza de INTA, en experimentos de inoculación asistida. Se adaptó a los ambientes y condiciones de trabajo disponibles una metodología de trabajo útil para la evaluación masal y rápida del comportamiento de genotipos de colza frente a *P. lingam*. La presión del patógeno lograda permitió observar en las líneas de colza F6 un rango de respuestas frente a la inoculación con *P. lingam*. Se reportan materiales evaluados como de buen comportamiento. El protocolo aplicado permitirá continuar asistiendo al plan de mejoramiento genético de colza o caracterizar el comportamiento aún no descrito de genotipos comerciales, parentales o pre-comerciales.

Palabras claves: colza, pie negro, patogenicidad, genotipos.

### INTRODUCCION

La enfermedad más importante para el cultivo es el “Pie negro” ocasionada por *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*). En el año 1994, fue detectada sobre colza de primavera en parcelas de experimentación (Gaetán *et al.*, 2001), registrándose en 2004 los primeros ataques importantes en cultivos comerciales (Iriarte & Valetti, 2008).

El inóculo primario de la enfermedad son conidios contenidos en peritecios presentes en semillas infectadas o ascosporas en peritecios que sobreviven aproximadamente 3 años en rastrojos de cultivos afectados por la enfermedad (Iriarte & Valetti, 2008). Una baja presencia de inóculo puede producir con condiciones favorables una epifita debido a la eficiente producción de ascosporas y su transmisión por medio de lluvia y viento (Delhey & Kiehr, 2008). La temperatura óptima para que se produzcan y maduren los peritecios es de 15 ° C (Petrie, 1994) y las ascosporas pueden ser transportados por el viento cientos de metros aunque algunas pueden llegar a 5 kilómetros o más (Iriarte & Valetti, 2008).

Las ascosporas del hongo infectan cotilédones y hojas en períodos vegetativos, ocasionando manchas o lesiones llamadas “máculas”, de color blanco sucio aterciopelado, redondas o con ángulos irregulares y con puntos negros, los picnidios.

Los primeros ataques pueden observarse en estado de roseta, siendo las primeras seis hojas las más susceptibles (Iriarte & Valetti, 2008).

Luego el hongo invade el tejido de las hojas y avanza hacia el tallo. En esta fase necrótrophica se producen en los tallos canchros (lesiones necróticas deprimidas, de aspecto corchoso) que pueden llegar incluso hasta la médula, la manifestación más característica de la enfermedad (Roussel, S. Nicole, M.; López, F.; Renard, M.; Chevre, A.M; Brun, H., 1999). Los canchros severos causan el vuelco y muerte de las plantas afectadas (Gaetán *et al.*, 2001). El hongo puede colonizar y necrosar también las células corticales de la base del tallo, las lesiones pueden rodear totalmente el tallo en la zona de la corona y causar la muerte de la planta (Gladders y Musa, 1979; Mcgee y Emmett, 1977; Rousell *et al.*, 1999). Cuando las silicuas son afectadas las semillas se arrugan y decoloran, o no muestran síntomas macroscópicos pero son de menor tamaño que las semillas sanas (Gaetán *et al.*, 2001).

Con condiciones de alta humedad relativa o lluvias junto a temperaturas frescas, las infecciones foliares tempranas aumentan las probabilidades de que se desarrollen canchros basales y severas pérdidas de rendimiento, especialmente en variedades susceptibles (Iriarte & Valetti, 2008). La humedad y temperatura del suelo son los principales factores que regulan la descomposición de los residuos infectados por el patógeno, por ejemplo veranos secos e inviernos frescos favorecen la persistencia del inóculo por la lenta descomposición de los restos (Iriarte y Valetti, 2008).

En este trabajo se confirma la patogenicidad de un aislamiento argentino de *P. lingam* y se utiliza este aislamiento para evaluar el comportamiento de genotipos pertenecientes al Proyecto de Mejoramiento Genético de Colza del INTA (Responsable: Ing. H. Milisich, EEA Paraná, Entre Ríos) en experimentos de inoculación asistida.

## MATERIALES Y METODOS

Aislamiento del patógeno y producción de inóculo para experimentos: se incubaron porciones de tallos de colza con presencia de canchros y lesiones en la base, en condiciones de alta humedad relativa (cámaras húmedas). Las secciones de tejidos con síntomas fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio comercial (56 g Cl activo/litro) al 2% por 1 minuto y lavados tres veces con agua estéril por 1 minuto. Este material fue transferido a cajas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa al 2% (enmendado con estreptomycin y tetraciclina) e incubados a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Las colonias típicas obtenidas fueron purificadas y repicadas en medio Agar V8 para favorecer la fructificación de hongo, incubando a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  y ciclos de 12 h de oscuridad y 12 h de luz artificial (2 tubos NecBiolux FL 40 Watt T10 y un tubo de luz Near UV).

### Prueba de patogenicidad

*Genotipos de colza:* se obtuvieron 15 plántulas de colza a partir de semillas desinfectadas con Hipoclorito de Sodio comercial al % 2 durante 5 minutos y lavadas con agua estéril. Las plántulas crecieron durante 20 días en macetas de plástico con sustrato de jardinería pasteurizado. Se utilizaron colzas invernales (Hornet, SRM 2586) y primaverales (Hyola 76, Larissa, Legacy, Impact, Ability). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

*Inoculación:* Los conidios utilizados como inóculo fueron obtenidos desde los picnidios presentes en colonias de *P. lingam* de 10 días. Se prepararon suspensiones de  $1 \times 10^6$

conidios/ml con las que se asperjaron las plántulas de colza, utilizando un pulverizador del tipo De Vibbiss, hasta punto de goteo. Se usaron como controles experimentales plantas de colza que fueron inoculadas con agua estéril. Todas las plántulas permanecieron cubiertas durante 72 horas con nylon transparente para favorecer la infección.

*Condiciones de crecimiento:* las plántulas crecieron 10 días en la cámara de cría del Laboratorio de Patología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA-FCA, UNMdP) a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con fotoperiodo de 12 horas de luz fluorescente tipo día ( $350 \pm 10 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ).

*Evaluación:* luego de 10 días de crecimiento se evaluó a presencia de máculas foliares y la mortalidad de plántulas.

Screening de genotipos: con la misma metodología de las prueba de patogenicidad se inocularon 37 líneas (F6) de colza pertenecientes al Proyecto de Mejoramiento de INTA y dos híbridos (Hyola 76 de buen comportamiento, Hornet de mal comportamiento). Cada genotipo fue inoculado con suspensión conídica de *P. lingam* o asperjado con agua estéril (control experimental). El experimento se condujo en las mismas condiciones que el anterior en un invernáculo vidriado de la Chacra Experimental Integrada Barrow (INTA-MAA Prov. Bs. As.). Se determinó el porcentaje de plantas muertas y se clasificaron los materiales por su comportamiento según la escala presentada en la Tabla 1.

Tabla 1. Escala de clasificación de genotipos de colza por su comportamiento en experimentos de inoculación asistida con el patógeno *Phoma lingam*. La variable considerada para la clasificación es el porcentaje de mortalidad de plántulas.

Porcentaje mortalidad (%)	Comportamiento
0-9	Muy Resistente (MR)
10-19	Resistente (R)
20-29	Levemente Resistente (LR)
30-39	Susceptible (S)
40-50	Muy Susceptible (MS)
>50	Altamente Susceptible (AS)

## RESULTADOS

### Prueba de Patogenicidad

Los controles experimentales (asperjados con agua) no presentaron síntomas de enfermedad. La patogenicidad del aislamiento de *P. lingam* estudiado quedó corroborada, permitiendo observar un rango de comportamiento de los genotipos comerciales de colza analizados. Se observó la presencia de máculas aún en las plantas de los cultivares citados como de mejor comportamiento. Se registró un 45% de mortalidad de plántulas en el cultivar de colza Hornet, 43% en SRM2586, 36% en Impact, 33% en Legacy, 28% en Larissa, 26% en Ability y 16% en Hyola 76. Según la clasificación previamente mencionada, estos genotipos podrían ser caracterizados por su comportamiento frente al aislamiento de *P. lingam* utilizado, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de genotipos cultivados de colza por su comportamiento frente a *Phoma lingam*. La variable considerada es el porcentaje de mortalidad de plántulas que estos genotipos presentaron en experimentos de inoculación asistida con *P. lingam*.

Genotipos	Comportamiento
---	Muy Resistente (MR)
Hyola 76	Resistente (R)
QC 4008, Ability	Levemente Resistente (LR)
Impact, Legacy	Susceptible (S)
Hornet, SRM2586	Muy Susceptible (MS)
---	Altamente Susceptible (AR)

### Screening de genotipos

Los controles experimentales (asperjados con agua) no presentaron síntomas de enfermedad. Los híbridos Hyola 76 (buen comportamiento) y Hornet (susceptible) mostraron el resultado esperado, 28% y 44% de mortalidad respectivamente, coincidentes con los resultados de la prueba de patogenicidad, validando que la presión de inóculo del experimento fue apropiada para evaluar las líneas de colza. De las líneas evaluadas 2 resultaron muy resistentes, 4 resistentes, 3 levemente resistentes, 7 susceptibles y 21 muy susceptibles. En la Figura1 se muestra la distribución porcentual de los genotipos estudiados en las categorías de comportamiento previamente descriptas.

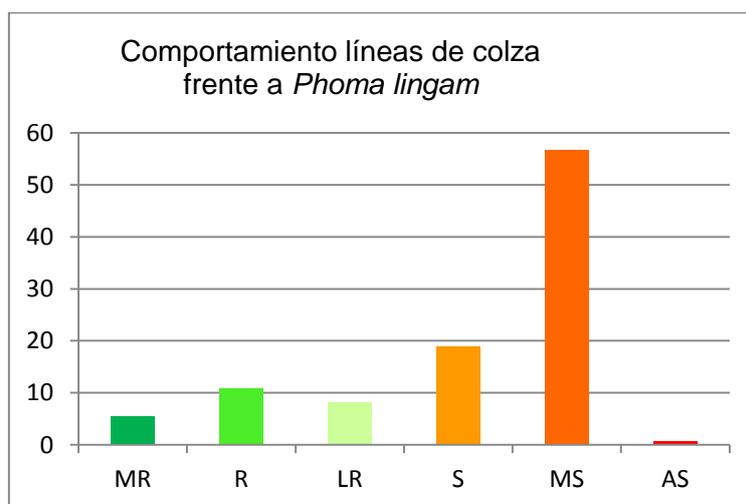


Figura 1. Distribución porcentual, por su comportamiento frente a *P. lingam*, de 37 líneas de colza del Proyecto de Mejoramiento del INTA (EEA INTA Paraná). Las categorías (MR, muy resistente; R, resistente; LR, levemente resistente; S, susceptible; MS, muy susceptible; AS, altamente susceptible) se determinan en función del porcentaje de mortalidad de plántulas en pruebas con inoculación asistida.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las plántulas criadas en condiciones controladas (cámara de cría, invernáculo) y sometidas a inoculación asistida por el método de aspersión con solución conídica de *P. lingam* presentaron máculas, debilitamiento y estrangulamiento del tallo o incluso

mortalidad, síntomas que concuerda con las observaciones realizadas por Hammond *et al.* (1985) y Gaetan *et al.* (1995) en experimentos similares. Con los experimentos desarrollados se adaptó a los ambientes y condiciones de trabajo disponibles de la Chacra Experimental Integrada Barrow y de la Unidad Integrada Balcarce una metodología de trabajo útil para la evaluación masal y rápida del comportamiento de genotipos de colza frente a *P. lingam*. Este procedimiento permitirá continuar asistiendo al plan de mejoramiento genético de colza o caracterizar el comportamiento aún no descrito de genotipos comerciales, parentales o pre-comerciales. Con el mismo procedimiento experimental es posible además estudiar la patogenicidad de colecciones de aislamientos del patógeno.

Los síntomas foliares (máculas) evolucionaron rápidamente y produjeron muerte de plántulas. No obstante la presión del patógeno lograda permitió observar en las líneas de colza F6 un rango de respuestas frente a la inoculación con *P. lingam*. Se pueden reportar que 9 de los genotipos evaluados fueron clasificados en las categorías de buen comportamiento, resultados alentadores para el mejoramiento genético del cultivo de colza en la búsqueda de materiales comerciales de buen comportamiento frente al pie negro (*P. lingam*).

Fotos gentileza de María de las Mercedes Loungás.

Inoculaciones artificiales



Máculas en hojas de colza

## BIBLIOGRAFIA

- DELHEY, R.; ANDERSON, F. & KIEHR, M. 2006. Nuevos registros de Peronosporomycetes (Stramenopila) en crucíferas argentinas. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas; Catamarca, 2006. Resúmenes, 322-323.
- GAETAN, S.; MADIA, M. & RODRÍGUEZ, A. 2001. Pie Negro o Necrosis del Cuello [*Phomalingam* (Tode: Fr.) Desmaz.] en cultivos de colza canola en la Argentina. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas. Madrid, España. Vol 27, 159-168.
- GAETÁN, S. A., GARBAGNOLI, C., IRIGOYEN, E. 1995. Microorganismos presentes en semillas de colza (*Brassic napus* L. subsp. *oleifera*(Metzg.) Sinsk.) en Argentina. Fitopatología Vol. 30 (2): 107-117. Lima, Perú.

GLADDERS, P., MUSA, T. M. 1979. The development of *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape and its implications for disease control. In Proceedings of the 1979 British Crop Protection Conference: Pests and Diseases. Brighton, England, November 1979.

HAMMOND, K. E., LEWIS, B. G., MUSA, T. M. 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathol. 34:557-565.

IRIARTE, L. B. & VALETTI, O. 2008. Cultivo de Colza. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP – INTA, Argentina, Primera edición.

ROUSSEL, S.; NICOLE, M.; LÓPEZ, F.; RENARD, M.; CHEVRE, A.M., BRUN, H. 1999. Cytological Investigation of resistance to *Leptosphaeria maculans* conferred to *Brassica napus* by introgressions originating from *B. Juncea* or *B. Nigra* genome. Phytopathology, Vol 89, 12: 1200-1213.