



A1-273 Inducción de resistencia a la Fusariosis de la espiga en líneas recombinantes de cebada, una estrategia adecuada para un manejo sustentable de cultivos extensivos.

Tocho E^{1,2,5}, Malbrán I^{1,2}, Lori G^{1,3}, Börner A⁴, Castro AM^{1,2,5}

¹ Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales- UNLP, CC 31 1900- La Plata, Argentina. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As. (CICBA).

⁴ Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK). ⁵ Centro de Investigaciones en Sanidad Vegetal (CISaV, UNLP)

ericatocho@yahoo.com.ar; ismael.malbran@gmail.com; galori@infovia.com.ar; castro.am@gmail.com

Resumen

La cebada aumentó su superficie sembrada en Argentina en los últimos años y simultáneamente, la incidencia de la Fusariosis de la espiga (FE) en el cultivo ha pasado a ser una enfermedad de importancia económica. Un grupo de líneas recombinantes, portadoras de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) frente a poblaciones de áfidos, mostraron en el campo variación, bajo condiciones de infección natural con *Fusarium graminearum*. Por esa razón, fueron probadas por su respuesta a FE con y sin pre-tratamientos de inductores hormonales en antesis, durante 2013 y 2014. A la cosecha se evaluó el número total de granos por espiga (GE), el número de granos dañados (GD) y el Índice de fusarium (IF= GD/GE). La línea tolerante pre-tratada con ácido jasmónico (AJ), presentó, en ambos años, mayor GE, con menores GD e IF. En cebada es posible seleccionar genotipos con mecanismos inducibles de defensas, cuyo uso permitirá un manejo de la enfermedad más amigable con el medio ambiente, con reducción del uso de pesticidas y a un costo menor.

Palabras clave: Inductores hormonales; Defensas; SAR; *Fusarium graminearum*

Abstract

Barley is one of the crops that greatly increased its sown area in Argentina in the last years. With this increment, the incidence of Fusarium head blight (FHB) became of economic importance. Several lines of a set of recombinant lines were found to provide SAR type of aphid resistance. Since these lines showed variation on the field under natural infection with *Fusarium graminearum*, during the last two years several lines were tested for their responses to FHB with and without pre-treatments of hormonal inductors during anthesis. At harvest the total number of grains per spike (GS), the number of damaged kernels (DK) and the Fusarium index (FI= DK/GS) were calculated. Tolerant line showed higher GS after jasmonic acid (JA) treatment, with lower DK and FI in both years. These preliminary results may imply the possibility to select barley lines tolerant to FHB carrying induced resistance genes that allow a more sustainable management of the disease with a decrease in pesticide use and at a lower cost.

Keywords: Hormonal inductors; Defences; SAR; *Fusarium graminearum*

Introducción

La expansión del cultivo de cebada hacia zonas de alto potencial de rendimiento ha puesto de manifiesto las debilidades sanitarias de este cultivo. La presencia de infestaciones de áfidos a lo largo de todo su ciclo y la aparición de enfermedades que estaban ausentes en la zona tradicional de producción y el escaso número de cultivares, que determinan una baja biodiversidad genética incrementan las posibilidades de ocurrencia de epifitias y zoofitias. En este escenario se requiere usar más pesticidas de alta toxicidad que provocan un



impacto negativo en el ambiente incrementando los costos de producción que afectan principalmente a los agricultores familiares. La actual situación demanda la urgente necesidad de una intervención para aportar a un manejo sustentable del cultivo de cebada en Argentina.

Las plantas utilizan diversas y sofisticadas estrategias para percibir e identificar el estrés al cual están expuestas en su hábitat natural. Cuando el estrés es detectado, se activan respuestas de defensas que alteran la fisiología normal. Estas respuestas pueden otorgar tolerancia al estrés biótico o no, dependiendo de los genes que presenten las plantas (Santamaria et al., 2013). Las hormonas vegetales cumplen importantes roles en el crecimiento, desarrollo y en las respuestas de defensas a múltiples estreses bióticos y abióticos (Kumar, 2013). En los últimos años se ha logrado un significativo avance identificando los principales componentes de las respuestas de defensas de las plantas a los estreses bióticos y se ha comenzado a comprender el rol del Ácido Jasmónico (AJ), del ácido salicílico (AS), del etileno (E) y del ABA. Por otro lado, en las plantas se han desarrollado una amplia variedad de mecanismos de defensas inducibles que son 'activadas' a partir del reconocimiento del patógeno, o plaga (Fu & Dong 2013). Estas defensas inducibles incluyen múltiples cambios bioquímicos y/o morfológicos tales como la expresión de genes de defensa, de genes relacionados con la producción de compuestos antimicrobianos o con la muerte celular programada (van Loon et al., 2006).

Se ha determinado que las plantas responden ante estreses bióticos o abióticos activando los mismos grupos de genes. El AJ y el E se asocian con las defensas a patógenos necrótrofos y a insectos (Wang et al., 2013). Si bien los mecanismos de defensas relacionados con el AS y con el AJ/E son citados como mutuamente antagonistas hay evidencias de interacciones sinérgicas. Bajo condiciones naturales las plantas deben enfrentar múltiples desafíos bióticos y dar respuestas efectivas de defensa empleando mecanismos regulatorios complejos ante patógenos y plagas. La concentración de AJ se incrementa en forma local como respuesta a la infección, infestación o daño mecánico y por la aplicación exógena de AJ se induce la expresión de genes relacionados con las defensas (Kumar 2013). Por lo tanto, ante condiciones ambientales predisponentes, la aspersión de esta hormona permite activar las defensas naturales de las plantas y así evitar la aplicación de pesticidas.

Tanto inoculaciones con patógenos avirulentos, como tratamientos exógenos con las hormonas AS, AJ y E permiten 'aprestar' a las plantas (Santino et al., 2013), en ese estado cualquier situación de estrés biótico o abiótico es respondido en forma intensificada y en menor tiempo en comparación con el mismo cultivar no tratado con estos 'inductores'. Si bien se conoce desde hace bastante tiempo este fenómeno, es de reciente conocimiento el hecho que el nivel de respuesta frente a los factores de estrés depende de los genes que portan las plantas y de la dosis de los 'inductores'. No existen muchos genes de este tipo que otorgan un nivel de defensa incrementada y sin embargo ocasionan costos mínimos en la producción de los cultivares portadores (Goellner & Conrath, 2008). Cuando este tipo de mecanismo de defensa es incorporado a los cultivos el productor no necesitará aplicar pesticidas para controlar el avance de la enfermedad, si el cultivar lleva estas defensas inducibles sólo deberá aplicar 'inductores', que son inocuos y de bajo costo.

La fusariosis de la espiga es una enfermedad de importancia en las zonas húmedas y con primaveras lluviosas o frescas. Esta enfermedad ha comenzado a ser observada en las nuevas regiones productoras de cebada en Argentina. Es causada por varias especies de *Fusarium*, en Argentina está dada en primer lugar por *F. graminearum*, Las espigas están parcial o totalmente afectadas por la muerte de espiguillas que primero toman una coloración parda y finalmente se palidecen. Los granos que llegan a formarse son chuzos,

manchados con una coloración parda a grisácea. Sobre las glumas pueden aparecer fructificaciones negras. Disminuye el rendimiento y la calidad (disminuye el poder germinativo y hay presencia de micotoxinas que pasan a la cerveza). Las fuentes de inóculo más importantes son los restos de cultivos antecesores, como son otros cereales. Las ascosporas de *F. graminearum* constituyen el inóculo primario más importante; son diseminados por el viento y la lluvia. La ventana de infecciones en las espigas es corta, prácticamente limitada a prefloración y floración. Las ascosporas y también los conidios, por lo general infectan primero las anteras expuestas, ya muertas, pero también las glumas pueden ser infectadas, desde allí el hongo coloniza la espiguilla. La infección puede llegar al raquis e invadir a otras espiguillas (Kiehr, 2013, Steinglein, 2013).

Durante muchos años el cultivo de cebada estuvo restringido al sudoeste y centro de la provincia de Buenos Aires, donde la presión de enfermedades y plagas es moderada a baja. Si bien la provincia de Buenos Aires ha sido históricamente la mayor productora de cebada del país, con más del 90% del total, cuando se produjo el cambio de germoplasma, mediante la introducción de cultivares de mayor potencial de rendimiento, aumentó su superficie sembrada principalmente en el SE de Buenos Aires y en las provincias de Córdoba y Santa Fe. Hasta hace unos años, este cultivo se realizaba en campos de baja fertilidad, en cambio, en la actualidad, su siembra ocurre en lotes de alto potencial de rendimiento y se expande hacia las mejores zonas agrícolas de nuestro país. En las nuevas regiones existen condiciones ambientales conducentes a mayores niveles de estreses bióticos para este cultivo. Los ataques de áfidos y la manifestación de enfermedades que no eran comunes en las regiones tradicionales, como la Fusariosis de la espiga, han sido comunes en las últimas dos campañas. Es importante señalar que la mayor parte de la producción del país se basa prácticamente en un único cultivar, el que al ser sembrado en grandes superficies, también ha potenciado los reiterados ataques de pulgones y la aparición de enfermedades a los que este cultivar es susceptible. La drástica reducción de la diversidad genética en cebada pone en evidencia la necesidad de promover la biodiversidad en el cultivo como una de las formas de contrarrestar la uniformidad actual que conduce a un aumento en el uso de pesticidas, incrementando los riesgos para la salud de los trabajadores y el medioambiente.

Con la finalidad de evaluar si líneas experimentales de cebada, doble haploides (DH), portadoras de defensas inducibles (SAR) (Tocho et al. 2014), podían tolerar el desafío de *F. graminearum*, se probaron dos DH en ensayos a campo con pre-tratamientos de elicitación con las hormonas inductoras de defensas AJ, AS y los correspondientes controles, sin inducción previa a la inoculación.

Metodología

Se emplearon dos líneas recombinantes doble haploides obtenidas del cruzamiento de *Dominante x Recombinante*, caracterizadas por ser portadoras de defensas inducibles mediante aplicación exógena de AJ y AS. Los experimentos, con un diseño factorial completo contaron con bloques al azar, con parcelas de 4 surcos (de 1.30 m) de cada una de las DH, fue establecido en el Jardín Experimental de Genética (FACAyF, UNLP), durante 2013 y 2014. Las plantas recibieron en anthesis tratamientos de elicitación con las hormonas AJ y AS, mediante aspersion hasta chorreo..

Las soluciones hormonales se prepararon en una concentración de 10^{-5} M en agua y Tween 20. Los controles solo recibieron aspersion con agua y Tween20. Los tratamientos se realizaron 72 hs antes de la inoculación (I), momento en que la mitad de las plantas de cada parcela fue inoculada con el patógeno y la otra mitad sólo fue asperjada con agua. Los tratamientos fueron: pre-tratadas con AJ (AJ); pre-tratadas con AJ y luego inoculadas (AJ +

I); pre-tratadas con AS (AS); pre-tratadas con AS e inoculadas (AS + I); asperjadas sólo con agua: controles (C); asperjadas con agua y luego inoculadas (C+I).

El inóculo fue preparado con una cepa agresiva de *F. graminearum*, en una dilución ajustada a la concentración de 1×10^4 esporas /ml. Se agregó una gota de Tween20 para facilitar la adherencia de las esporas a los tejidos del hospedante.

La inoculación se realizó 72 hs después de la inducción, mediante la aspersión de 1ml de una solución macroconidial de 10.000 esporas del patógeno/ml. Se seleccionó este tipo de inoculación ya que es la que más se asemejaría a una infección natural. Luego de la inoculación, se colocaron cámaras húmedas sobre las espigas durante 48hs.

La cosecha fue manual al igual que la trilla, se cuantificaron el número total de granos por espiga (GE), el de granos con síntomas de fusariosis (GD) y el número de granos sanos. Una vez trillado todo el material, se procedió a calcular el correspondiente Índice de Fusarium (IF= GD/GE) y a pesar los granos de cada espiga en forma individual para determinar el peso medio de grano (PPG).

Resultados y discusiones

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos, entre tratamientos y en la interacción G*T en la mayoría de los caracteres evaluados. El número de granos por espiga resultó significativamente afectado por la inoculación en el genotipo 1, en cambio presentó valores similares a los controles en el genotipo 2 (Figura 1). El tratamiento con AS pareció mejorar ese parámetro en las plantas inoculadas del genotipo 1. El tratamiento con AJ incremento significativamente el número de GS en ambos genotipos tanto en las plantas controles como inoculadas.

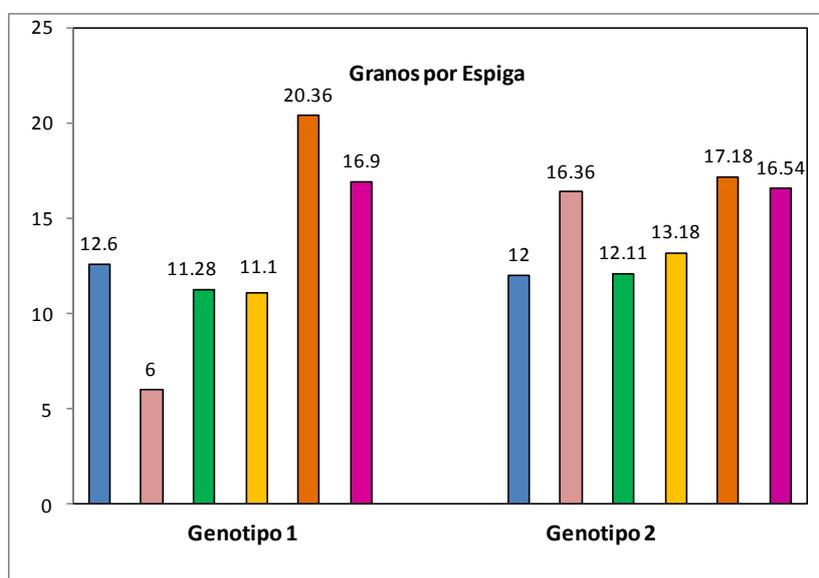


FIGURA 1. Número de granos por espiga en dos genotipos de cebada con diferentes tratamientos. De izquierda a derecha: Control, Inoculadas, SA; SA+I; AJ; AJ+I

El número de granos dañados por espiga presentó diferencias significativas entre genotipos no entre tratamientos (Figura 2). Ambos cultivares presentaron buen comportamiento frente al patógeno sin embargo fue menor el nivel de GD en la línea 1.

El índice de Fusarium resultó significativamente distinto entre genotipos y en la interacción G*T. Los diferentes tratamientos fueron similares al control sin inoculación en el genotipo 1 (Figura 3). En cambio, en el genotipo 2 ninguno de los tratamientos presentó valores similares al control.

El peso individual de granos presentó diferencias significativas entre genotipos y en la interacción G*T. Los diferentes tratamientos en el genotipo 1 no mostraron diferencias con el control (Figura 4). En el genotipo 2 sólo el tratamiento con AS incrementó significativamente el PPG, sin embargo la inoculación afectó el peso de granos también en las plantas pretratadas con AS (Figura 4). Es importante señalar que no existieron pérdidas del peso de granos por efecto de la inoculación y el tratamiento AJ+I presentó un PPG levemente superior a las plantas control.

Conclusiones

Se ha podido identificar una línea de cebada portadora de defensas inducibles que se comporta como tolerante a la FE, abriendo la posibilidad de manejar esta enfermedad en el cultivo mediante el empleo de estos genes. La inducción de defensas sin que se produzcan mermas en los componentes del rendimiento es una estrategia que permitiría reducir el uso de plaguicidas tóxicos y de elevado precio para su control. La identificación en cebada de mecanismos inducibles de defensas permitirá poner a disposición de los productores cultivares que podrán manejarse agroecológicamente, con menores costos en su producción y sin riesgo para su salud y para el medio ambiente

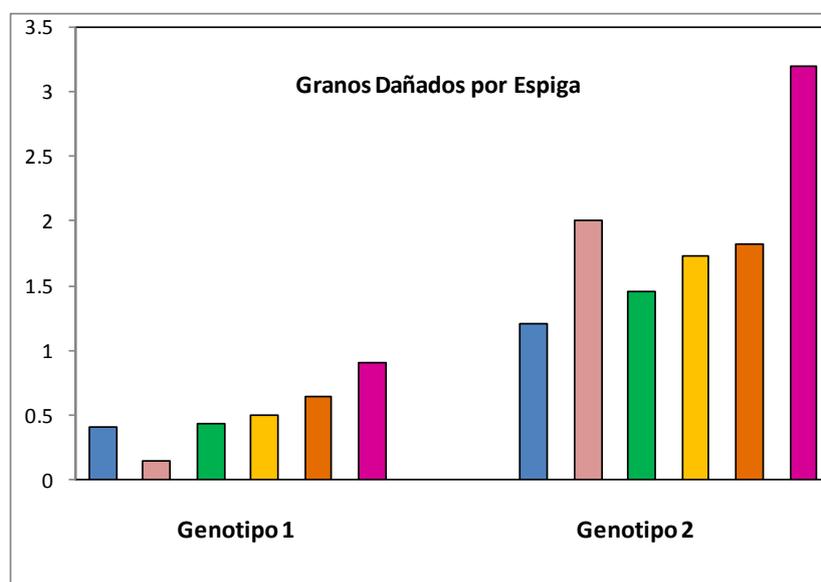


FIGURA 2. Número de granos dañados por espiga en dos genotipos de cebada con diferentes tratamientos. De izquierda a derecha: Control, Inoculadas, SA; SA+I; AJ; AJ+I

..

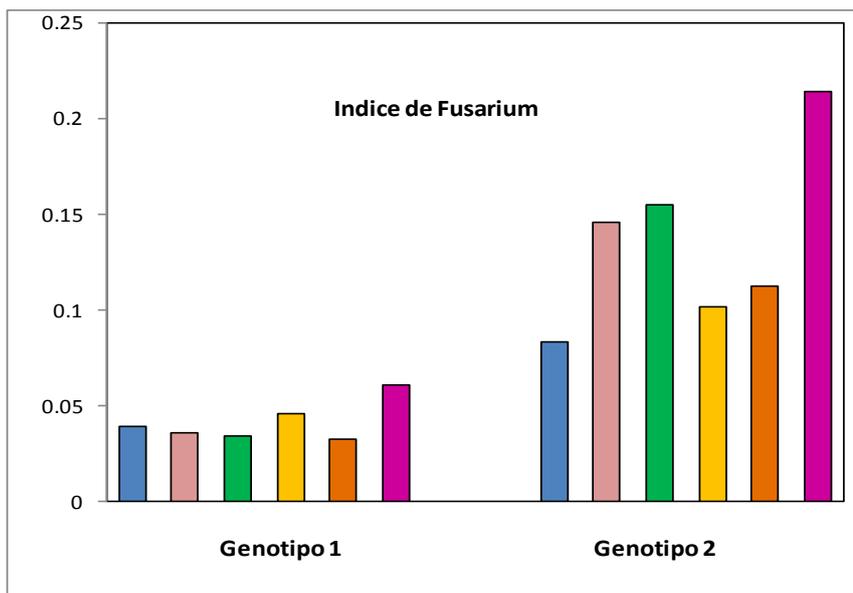


FIGURA 3. Índice de Fusarium en dos genotipos de cebada con diferentes tratamientos. De izquierda a derecha: Control, Inoculadas, SA; SA+I; AJ; AJ+I

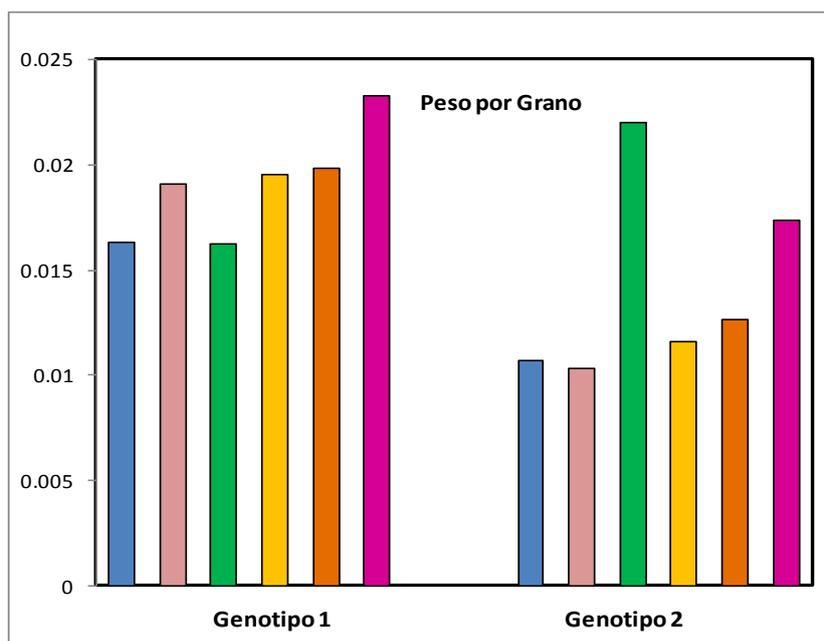


FIGURA 4. Peso individual de grano (en gr) en dos genotipos con diferentes tratamientos. De izquierda a derecha: Control, Inoculadas, SA; SA+I; AJ; AJ+I



Referencias bibliográficas

- Goellner K & U Conrath (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European J. Plant Pathology* 123: 233-242
- Kiehr M (2013). Enfermedades de Cebada en la Argentina. IV Congreso Latinoamericano de Cebada, Bahía Blanca Noviembre 2013
- Kumar P (2013) Plant hormones and their intricate signaling networks: unraveling the nexus. *Plant Cell Rep* 32:731–732
- Santamaria ME, M Martínez, I Cambra V Grbic & I Diaz (2013) Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. *Transgenic Res* 22:697–708
- Santino A *et al.* (2013) Jasmonate signalling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant Cell Rep* 32:1085–1098
- Steinglein S (2013) FUSARIUM: A QUE NOS ENFRENTAMOS IV Congreso Latinoamericano de Cebada, Bahía Blanca Noviembre 2013
- Tocho E, A Börner & AM Castro (2014) Mapping and candidate gene identification of loci induced by phytohormones in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 195: 397-402
- Wang O *et al.* 2013. *Plant Cell Rep* 32:1075–1084