

Defensa en plantas contra fitopatógenos

Alberto Martín Gochez
(*Compilador*)



INTA Ediciones

Colección
**INVESTIGACIÓN, DESARROLLO
E INNOVACIÓN**

Defensa en plantas contra fitopatógenos

Avances PNPV 1135024

Compilación: Alberto Martín Gochez

Programa Nacional de Protección Vegetal

Bella Vista, Corrientes - Marzo 2018



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista

Gochez, Alberto Martín

Defensa en plantas contra fitopatógenos : avances PNPV 1135024 / Alberto Martín Gochez ; Beatriz Pérez ; Daniel A. Ducasse ; compilado por Alberto Martín Gochez ; editado por Andrés Alberto Zárate . - 1a ed . -Bella Vista, Corrientes : Ediciones INTA, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-521-908-3

1. Virosis. 2. Bacterias. 3. Plantas. I. Pérez, Beatriz II. Ducasse, Daniel A. III. Gochez, Alberto Martín, comp. IV. Zárate , Andrés Alberto, ed. V. Título.
CDD 580.28

Fecha de catalogación: 04/2018

1ra. Edición

Versión Digital (PDF)

Compilación: Alberto Martín Gochez.

Editores: Alberto Martín Gochez, Beatriz Alida Pérez, Daniel Adrián Ducasse.

Correcciones y Compaginación: Alberto Martín Gochez, Beatriz A. Pérez.

FOTO DE TAPA: Izquierda: olivo (*Olea europaea* L.) cv Arauco infectado con *Xylella fastidiosa* en la localidad de Aimogasta (La Rioja). (Guzman, F., IPAVE). Centro: estructuras de *Schizophyllum commune* aislado desde olivo en La Rioja (Argentina), hongo asociado a pudrición blanca de ramas y troncos en frutales (Perez, B. A., IMYZA). Derecha: plantas de tomates inoculados utilizando un acelerador de micropartículas (Bornancini, V. A., IPAVE)

Ediciones INTA

Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista

© INTA

Todos los derechos reservados

Edición Abril 2018

Impreso en Argentina

Se permite la reproducción total o parcial. Agradecemos citar la fuente.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Centro Regional Corrientes

EEA Bella Vista

Dirección: Ruta N° 27 – Km 38,3 - Municipio Tres de Abril

(3432) Dep. Bella Vista – Corrientes

www.inta.gob.ar/bellavista

El presente libro de avances del Proyecto Especifico (PE) 1135024 ha sido publicado gracias al apoyo del

Integrador PNPV 1135021. Generación de conocimientos para el manejo de enfermedades para una producción agroecológica.

Se destaca además la activa y prolífica participación de la Dra. Beatriz A. Perez (IMYZA, Castelar), la cual ha ayudado denodadamente en la compaginación y corrección de este Avance.

Programa Nacional Protección Vegetal

Coordinador de Programa: Dr. Daniel A. Ducasse.

Integrador 1135021:

Generación de conocimientos para el manejo de enfermedades para una producción agroecológica.

Coordinadora: Dras. Graciela Truol y Amelia Laura Gasoni

Proyecto Específico 1135024:

Defensa en plantas contra fitopatógenos.

Coordinador: Dr. Alberto M. Gochez

Prólogo

Las interacciones planta/patógeno/vector son complejas y por consiguiente también lo es la manera de abordar su estudio.

En el Programa Nacional de Protección Vegetal del INTA sabemos que, de una comprensión cabal y profunda de dicha complejidad, surgen en muchos casos, estrategias de manejo integrado de enfermedades. No es posible manejar un patosistema si no se lo conoce y este conocimiento no es completo si se mira a cada componente de forma individual. Es por ello que el estudio de las interacciones entre los actores es tan importante. El Proyecto Específico PNPV1135024 del PNPV trabaja en ese tipo de enfoque. Este proyecto, atraviesa las interacciones planta/patógeno/vector en diversos patosistemas poniendo el acento en los mecanismos mediante los cuales las plantas se defienden de sus patógenos. Se presenta aquí, el avance de diversas líneas de trabajo que, podrían ser evaluadas como modestas pero que sin dudas han implicado un gran esfuerzo de los profesionales actuantes y de la institución financiadora.

Va todo mi reconocimiento y felicitaciones a los investigadores responsables.

Daniel Ducasse

Coordinador Programa Nacional
de Protección Vegetal

Introducción

En Argentina se pierden anualmente entre 4 a 7 millones de ha de producción debido a enfermedades, lo cual pone de relieve la importancia de identificar y generar fuentes de resistencia a enfermedades. Atento a prioridades y demandas de las regiones que necesitan mantener un status competitivo de sus cultivos sin poner en riesgo la sostenibilidad ambiental, surgió el Proyecto Específico (PE) 1135024 “Defensa en planta contra fitopatógenos”. Este proyecto, incluido en el Programa Nacional de Protección Vegetal (PNPV), Cartera de Proyectos 2013 de INTA y parte del Proyecto Integrador (I) 1135021 Generación de conocimientos para el manejo de enfermedades para una producción agroecológica. El PE 1135024 focaliza conceptualmente el estudio de la interacción patógenos-cultivos de importancia económica para cada región. Tanto las experiencias de campo como ensayos de laboratorio, este proyecto se ha caracterizado por su alto componente molecular en casi todas sus líneas de trabajo, lo cual refleja la calidad y capacitación de sus RRHH, en base a articulaciones logradas con y desde los Institutos de INTA y Universidades.

Luego de la publicación del primer Avance en el año 2015 (ISBN 978-987-521-671-6) el proyecto ha sido evaluado en medio término (año 2016) y luego auditado (año 2017) para el correcto control y fiscalización de los recursos empleados. En ambas oportunidades se ha logrado cumplir enteramente con las metas de los evaluadores y auditores, avalándose así la continuidad del mismo hasta el momento.

Aunque estamos lejos de agotar las temáticas de estudio propuestas en cada uno de los tres productos que integran este PE, se espera que las actividades llevadas a cabo dentro de cada línea de trabajo abra nuevas puertas y marque horizontes promisorios para las investigaciones en Fitopatología que se decidan continuar y profundizar desde INTA.

Objetivo General

Caracterizar genética y molecularmente la interacción planta-patógeno, los mecanismos de resistencia en cultivos de importancia regional y seleccionar genotipos resistentes a fitopatógenos.

Objetivos Específicos

Estudiar la interacción planta-patógeno y agentes vectores de virosis en cultivos de hortalizas, frutales, trigo

Evaluar e identificar genotipos con resistencia a fitopatógenos y a productos fitosanitarios en cultivos de hortalizas, frutales y trigo.

Estructura del PE

Las propuestas fueron consensuadas con los Centros Regionales y de Investigación. En base a ello se estructuraron las líneas de acción que a su vez tuvieron un correlato con las demandas de Programas Nacionales y PReTs como se detalla más adelante.

El PE se estructura fundamentalmente sobre tres metas:

- a-** Obtener información sobre genes y proteínas relacionadas con la interacción planta-patógeno-ambiente y determinar los mecanismos de resistencia de microorganismos frente a fitosanitarios
- b-** Caracterizar molecularmente las poblaciones de microorganismos patógenos y vectores
- c-** Identificar/obtener genotipos para resistencia/tolerancia a patógenos y generación de fuentes de resistencia no convencionales.

Los cuales engloban a los tres productos que posee este PE.

Productos PNPV 1135024

P1. Información sobre genes y proteínas relacionadas con la interacción planta-patógeno obtenida. Mecanismos de resistencia de fitopatógenos a productos fitosanitarios determinados.

P2. Poblaciones de fitopatógenos e interacciones con sus vectores caracterizadas molecularmente.

P3. Evaluación de genotipos resistentes a fitopatógenos y generación de fuentes de resistencia no convencionales.

ÍNDICE

Prólogo	I
Introducción	II
Objetivos	III

Resistencia genética a Fitoplasmas

Detección y caracterización de proteínas potencialmente involucradas en la interacción de patógenos con su hospedante. Modelo de estudio: Fitoplasmas. <i>F. D. Fernández; A. B. Saavedra Pons; F. A. Guzmán; T. Pérez Grosso; A. Luque; L. R. Conci. Apoyo técnico: W. Arce; S. Brandimarte</i>	1
---	----------

Resistencia genética a Virus

Caracterización biológica y genética de aislamientos de Grapevine Leafroll associated Virus 2 provenientes de Mendoza, Argentina. <i>M. Lanza Volpe; S. Moyano; S. Gómez Talquenca</i>	4
---	----------

Estudios de los mecanismos genéticos involucrados en la resistencia de las plantas a Plum pox virus (Sharka). <i>H. Debat; A. Dal Zotto; D. Marini; R. Farrando; L. Porcel</i>	7
---	----------

Secuencias completas de virus interactuando en infecciones mixtas. <i>M. G. Celli; M. C. Perotto; C. E. Luciani; E. A. Pozzi; V. C. Conci</i>	10
--	-----------

Triple interacción Glycine max- B. japonicum- Soybean Mosaic Virus: Defensa y crecimiento. <i>S. Andreola; M. Rodríguez; R. H. Lascano</i>	12
---	-----------

Diversidad molecular y estructura genética de poblaciones de Potyvirus y su asociación con la patogenicidad y severidad de los síntomas. <i>M. C. Perotto, E. Pozzi, C. E. Luciani, M. G. Celli, C. C. Conci</i>	18
---	-----------

Diversidad genética del Wheat streak mosaic virus (WSMV) y de su vector <i>Aceria tosichella</i> Keifer en Argentina. <i>Alemandri, V.; López Lambertini, P.M.; G. Truol</i>	20
---	-----------

Avances en la detección de bacterias endosimbiontes de bemsia tabaci (<i>Gennadius</i>), para el análisis de su interacción con virus (geminivirus y carlavirus), especie de mosca blanca y cultivar de poroto. <i>M. F. Mattio, S. Tapia, V. Alemandri, G. Truol</i>	23
--	-----------

Caracterización del tipo de interacción en infecciones mixtas de Begomovirus en tomate. <i>V. A. Bornancini, C. G. Vaghi, V. V. Ranieri, P. M. López Lambertini</i>	26
--	-----------

Evaluación y caracterización de genes involucrados en la interacción de cultivares tolerantes y/o susceptibles de ajo (*Allium sativum* L.) al *Allexivirus garv-A*.
S. García Lampasona, V. Conci, M. C. Merino, M. Gimenez, M. Celli, G. Strumia. 28

Resistencia genética a Bacterias

Estudios comparativos del nivel de expresión de genes relacionados con resistencia en olivo (*Olea europaea* L.) 'Arauco' infectado y no infectado con *Xylella fastidiosa*.
F.A. Guzmán, R.M. Haelterman, P.A. Tolocka, M.L. Otero, M.A. Paccioretti, W.F. Arce, S. Brandimarte. 30

Evaluación de la resistencia del germoplasma cítrico a cancrrosis, black spot, CVC y HLB. Reacción de los agentes causales de estas enfermedades a nuevos compuestos potenciales para su prevención.
A. M. Gochez, B. I. Canteros, C. Lezcano. Col.: M. I. Chelotti, F. Hermosis, J. Solís, R. Benítez, A. Vallejos, Monzón. 34

Resistencia genética a Hongos

Interacción soja-*Fusarium virguliforme*. Análisis temprano de los cambios ocurridos a nivel radicular.
M.L. Giachero, L. Ortega, N. Márquez, D.A. Ducasse. 38

Cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*: estudio histopatológico de las vías de infección dentro de plantas de soja.
Montoya M., Ridao A., Colabelli M. 40

Virulencia de cepas de *Pyricularia oryzae* en arroz.
M.V. Pedraza, M.N. Asselborn, M. Bouvet, I. Burdyn, R. Maumary. 42

Evaluación de genotipos de arroz frente a cepas nativas de *Pyricularia oryzae*.
M.N. Asselborn, M. Bouvet, R. Maumary, I. Bonell I, F. Galván, I. Burdyn, M.V. Pedraza. 43

Comportamiento de frutas de mercado frente a *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de olivo.
B. A. Pérez, J. Niz, R. Salvador, M. Roca, M. V. Pesce. 45

Respuesta de olivo 'Manzanilla' frente a *Lasiodiplodia theobromae*.
B. A. Pérez, J. Niz, R. Salvador, M. Roca, M. V. Pesce. 46

Comportamiento de olivo frente a *Schizophyllum commune*.
B. A. Pérez, J. Niz, R. Salvador, M. Roca, M. V. Pesce. 47

El hongo *Xylaria* sobre olivo.
B. A. Pérez, J. NIZ, R. Salvador, A. C. Matias. 48

Galería de Fotos 49

RESISTENCIA GENÉTICA A HONGOS

INTERACCIÓN SOJA-Fusarium virguliforme. ANÁLISIS TEMPRANO DE LOS CAMBIOS OCURRIDOS A NIVEL RADICULAR.

Giachero M. L., Ortega L., Márquez N., Ducasse D. A. INTA-CIAP. Instituto de Patología Vegetal (IPAVE). giachero.lorena@inta.gob.ar

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es uno de los cultivos más importantes en todo el mundo. Cada año, diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos causan importantes pérdidas económicas siendo el 'síndrome de la muerte Súbita o SMS' una de las más importantes por el impacto en la producción. El SMS puede ser causado principalmente por *F. virguliforme* y *F. tucumaniae* en América del Norte y del Sur, respectivamente. *F. virguliforme* es una de las especies predominantes en Argentina. *Fusarium* infecta la raíz causando pudrición radicular. El hongo es capaz de producir toxinas que son trasladadas a las hojas ocasionando un manchado clorótico internerval que evoluciona a necrosis. El SMS es de difícil manejo, fundamentalmente por ausencia de cultivares resistentes. En la actualidad, cultivares de soja, parcialmente resistentes, es la principal alternativa de manejo. Toda estrategia para limitar el avance del patógeno, debe basarse en un conocimiento profundo de la interacción entre hospedante y patógeno desde etapas muy tempranas (reconocimiento, pre-penetración y penetración). Conocer el proceso de infección a través del tiempo y la respuesta de la planta son fundamentales para comprender a la enfermedad. La pared celular es un importante medio de defensa común a muchas plantas, con funciones estructurales y de desarrollo actuando como barrera física. La raíz es el sitio de infección de *F. virguliforme* y poco se conoce sobre la deposición de lignina en los tejidos radiculares de la soja durante la interacción con microorganismos patógenos.

Los tratamientos evaluados fueron 1) Deposición de lignina en las células de la corteza, a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección (hpi) con *F. virguliforme*, 2) Cantidad de lignina total en raíz a las 24, 48, 72 y 96 hpi y 3) Cambios 24 hpi, en transcripción de genes codificantes de las enzimas phenylalanine ammonia lyase (PAL) y cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), ambas involucradas en la biosíntesis de lignina. El ensayo experimental, in vitro, incluyó plántulas de soja 'SPS 4x4' mantenidas 15 días a 24°C y 16 horas de luz. Las plantas fueron divididas al azar en dos grupos, controles sin inocular y tratamientos con *F. virguliforme* totalizando cuatro repeticiones. Para la inoculación se utilizó un taco de agar con micelio de *F. virguliforme* de 25 mm². Se registró el crecimiento de *F. virguliforme* y se tomaron muestras de raíz a las 24, 48, 72 y 96 hpi. Se tomaron muestras en la zona adyacente (FvA) y en otra zona lejos del punto de infección (FvL). El mismo procedimiento se utilizó para los controles inoculados con tacos de agar sin el hongo.

Para evaluar la **deposición de lignina**, fragmentos de raíces de ambas zonas de muestreo fueron fijadas en FAA (10:5:85, formol: ácido acético glacial: etanol 70%), y visualizadas con un microscopio confocal Nikon Eclipse CS1. Las imágenes se adquirieron con un tiempo de residencia de 10 μs y resolución final de 1024 dpi. Se midió el valor de gris promedio en el canal "azul" dentro de un área delimitada usando herramientas de la aplicación ImageJ. Para determinar la **cantidad de lignina total** de raíz, las muestras fueron secadas a 60°C hasta peso constante. Según Moreira-

Vilar y col. 2014, se obtuvo la fracción de pared celular libre de proteínas y se determinó la concentración de lignina por el método de bromuro de acetilo.

Los niveles de transcripción de PAL y CAD se midieron con la extracción, a las 24 hpi, de ARN total de raíz (Trizol®, Invitrogen, Carsbad, USA), incluyendo purificación con cloroformo y DNasa I, libre de RNAasa-Invitrogen, para eliminar ADN presente. La qPCR en tiempo real se realizó con un kit EXPRESS One-Step SYBR Green de Invitrogen y oligos específicos, utilizando Rotor Gene 6000. En cada reacción se usaron 0,01 µg de ARN total y 2 µM de cebadores específicos en un volumen total de 20 µl. El ensayo consistió en tres repeticiones. La expresión de los genes codificantes PAL y CAD se calculó con $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores se normalizaron con el gen constitutivo Skip16. El análisis estadístico de los datos fue realizado con INFOSTAT y prueba LSD Fisher, ($p < 0.05$). Las observaciones bajo microscopio estereoscópico Nikon SMZ800 permitió corroborar que las hifas de *F. virguliforme* entraron en contacto con la raíz de soja 48 hpi.

Cuando se evaluó la respuesta de las plantas de soja a diferentes tiempos y sitios desde el punto de inoculación con el hongo se comprobó una marcada disminución en el valor de gris promedio, indicando menor deposición de lignina. La diferencia fue estadísticamente significativa para las zonas adyacentes al ingreso del hongo durante las primeras 24 hpi. En zonas lejanas al punto de ingreso, no se detectaron diferencias significativas con el testigo para deposición de lignina. A las 48 y 72 hpi, los tratamientos con el hongo incrementaron la deposición de lignina como el control. A las 96 hpi, las plantas inoculadas superaron en nivel de lignina a los controles. La **concentración de lignina total**, método de bromuro de acetilo, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos en los tiempos analizados. La qPCR indicó que 24 hpi con *F. virguliforme*, aumento significativo ($p < 0.05$) de PAL en la zona adyacente a FvA respecto a FvL y al control. La expresión de CAD no fue afectada en ese momento del muestreo. El ingreso del hongo a la raíz ocurrió a las 48 hpi, por lo que el análisis transcriptómico indicó que las plantas de soja detectaron al hongo antes de su ingreso 24 hpi y en consecuencia activaron genes involucrados en la defensa PAL, lo que derivó en acumulación de metabolitos secundarios como lignina. Los resultados preliminares indicarían que el mejor comportamiento de 'SPS 4x4' fue por el **aumento de deposición de lignina** en presencia del hongo. Esto no solo pudo derivar en reforzamiento de la pared celular sino en la regulación de otras respuestas de defensa más generales en la planta.

Giachero M. L., Ortega L., Roca N., Márquez N., Ducasse D.A. 2017. *Fusarium virguliforme* altera la deposición de lignina en raíces de soja. 4º Congreso Argentino de Fitopatología. 19-21 abril. Mendoza.

GALERÍA DE IMÁGENES



Figura 1. Quinta de olivos infectados con *X. fastidiosa* en Aimogasta (La Rioja). El estado sanitario de los olivares es muy serio debido al rápido “declinamiento” y mortalidad de las plantas en 4 a 6 meses. Ante esta situación los agricultores proceden a erradicar las plantas afectadas. (ver resumen Guzman F.A. et al).



Fig. 2. Quinta de olivos infectados con *Xylella fastidiosa* en Aimogasta (La Rioja). La rápida declinación y muerte de las plantas condujo a la erradicación de los olivos enfermos (ver resumen Guzman F.A. et al).



Fig. 3. Acelerador de micropartículas (PDS-1000/He, Biorad®) utilizado para inocularon plantas de tomate (ver resumen Bornancini, V. A. et al)



Fig. 4. *Colletotrichum gloeosporioides*, hongo causante de antracnosis en plantas de olivo en vivero y a campo (ver resumen Pérez B.A.; Niz J.; Salvador R.; Roca M.; Pesce M.V.).



Fig. 5. *Lasiodiplodia theobromae*, hongo causante de 'cancro' en ramas y tronco de olivo en el Noroeste de Argentina (ver resumen Pérez B. A.; Niz J.; Salvador R.; Roca M.; Pesce M.V.).



Fig. 6. Cultivo de *Schizophyllum commune*, hongo causante de 'podrición blanca' en ramas y troncos de plantas añosas de olivo en el noroeste de Argentina (ver resumen Pérez B.A.; Niz J.; Salvador R.; Roca M.)



Fig. 7. Cultivo de *Xylaria*, hongo presente en olivos en decadencia en el noroeste de Argentina (ver resumen Pérez B.A.; NIZ J.; Salvador R.; Matias A.C.).

En esta versión de Avances 2018 en PNPV 113524 se incluyen investigaciones sobre resistencia genética a fitopatógenos en cereales (arroz, trigo), hortícolas (tomate), frutales (cítricos, olivo, vid) y oleaginosas (soja). Los microorganismos considerados patógenos como fitoplasmas (AY-WB, AY-ACLL), virus (Grapevine leafroll associated virus 2, Plum pox virus, Soybean mosaic virus, Wheat streak mosaic virus, Begomovirus, Potyvirus), bacterias (*Xylella fastidiosa*) y hongos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium virguliforme*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pyricularia oryzae*, *Schizophyllum commune*, *Xylaria*) o benéficos (*B. japonicum*) en plantas cultivadas. Las investigaciones comprendieron aspectos de 'detección y caracterización de proteínas, caracterización biológica y mecanismos genéticos involucrados en la resistencia de las plantas a virus, infecciones mixtas, diversidad molecular y estructura genética de poblaciones de microorganismos, vectores de virus (*Aceria tosichella*), expresión de genes relacionados a resistencia genética a microorganismos, respuesta vegetal frente a nuevos compuestos para prevención de enfermedades, virulencia de microorganismos cambios a nivel radicular en plantas enfermas y genotipos promisorios frente a enfermedades'. Los estudios fueron conducidos principalmente en Estaciones Experimentales de INTA (EEA Bella Vista, EEA Concepción del Uruguay, EEA Junín, EEA Mendoza, EEA Rama Caída, EEA Yuto) e Institutos de Investigación (CIAP IPAVE e IFRGV-Córdoba, CICVyA-IMYZA-Castelar) con colaboraciones de CONICET e Universidades Nacionales.

ISBN 978-987-521-908-3



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación