

EFFECTO DE LA FERTILIZACION NITROGENADA SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE Helianthus annuus L. A LA PODREDUMBRE BASAL (Sclerotinia sclerotiorum) (L) DE BARY.

E. Heber; M.E. Bazzalo y M. Stampacchio.

Centro de Ecofisiología Vegetal. Serrano 665, 1414 Capital Federal. Argentina.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variación de la susceptibilidad del girasol inoculado con el hongo S. sclerotiorum en función de distintos niveles de nitrógeno en el suelo. Para ello se determinó el comportamiento del híbrido de ciclo corto Cargill Super 400 en estadio vegetativo (5 pares de hojas), después de inocularlo artificialmente con micelio. Los 4 niveles de fertilidad estudiados se obtuvieron mediante la aplicación de 15, 75, 150 y 200 kN/ha, en forma de KNO<sub>3</sub> a un suelo deficiente (Chascomús, Natrocuol típico). Se realizaron observaciones al 4º día después de la inoculación para los siguientes parámetros: porcentaje de plantas enfermas, de plantas muertas, de hojas marchitas y longitud del área con podredumbre. Se determinó además, el contenido de fenoles totales solubles en metanol en las lesiones de los tallos inoculados y en tejidos similares de los tallos testigo. A medida que se incrementó el nivel de N en suelo se produjo un aumento en el crecimiento general de las plantas. Sin embargo, la mayor susceptibilidad al patógeno se observó en el mayor nivel de N. Las plantas tratadas con 75 kN/ha presentaron la mayor tolerancia.

El contenido de fenoles solubles totales aumentó postinfeccionalmente en todas las plantas, independientemente del tratamiento. Sin embargo, no parecen existir diferencias cuantitativas entre los mismos.

Introducción

La podredumbre basal del tallo del girasol (H. annuus) causada por Sclerotinia sclerotiorum es una enfermedad ampliamente distribuida en la Argentina. El síntoma predominante es una lesión en la base del tallo, que en casos más severos está asociada a una intensa desintegración de los tejidos alcanzando la médula, lo que origina el vuelco de la planta. Simultáneamente se observa la marchitez de las hojas, originada por la acumulación de la toxina fúngica, el ácido oxálico, (Noyes y Hancock 1981) y la alteración del transporte de nutrientes y agua.

Se han estudiado algunos mecanismos de resistencia de tipo bioquímico e histológico en relación con la edad de la planta. Plantas tolerantes de distintas edades reaccionan al ataque fúngico sintetizando compuestos fenólicos en la corteza, floema y parénquima interfascicular, constituyendo una barrera química a la penetración. Algunos de ellos inhiben fuertemente el crecimiento in vitro del hongo. Por otro lado no hay incremento significativo de dichos compuestos en plantas susceptibles (Bazzalo et al. 1984).

Hasta ahora no se ha encontrado resistencia absoluta al patógeno aunque existen diferencias en susceptibilidad entre cultivares y líneas de H. annuus (Dueck y Campbell 1978). Por lo tanto, se intenta controlar la enfermedad mediante rotación y prácticas agronómicas adecuadas (Steadman 1979). El nivel y la forma de N para la fertilización desempeñan un papel importante en la interacción hospedante-patógeno (Huber y Watson 1974). Pueden afectar la virulencia, crecimiento, germinación y supervivencia del patógeno (Malca et al. 1965), o alterar la resistencia del hospedante por sus efectos sobre el crecimiento y los componentes vegetales (aminoácidos, carbohidratos, cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, etc), los exudados radiculares y foliares y el pH tanto del suelo como de la rizosfera (Smiley y Cook 1973).

Como el girasol se fertiliza con N (o con N y P) (Zubriski y Zimmermann 1974, Cheng y Zubriski 1978, Vranceanu 1977) con el propósito de obtener máxima productividad y calidad, se investigó: a) el efecto de distintos niveles de N(KNO<sub>3</sub>) sobre la susceptibilidad al hongo, y b) la posibilidad de alguna relación entre el nivel de fertilidad del suelo y la concentración de fenoles en los tallos.

#### Materiales y Métodos

Se empleó el híbrido de ciclo corto Super 400 (Cargill S.A.). Las plántulas crecieron en almácigo hasta tener un par de hojas expandidas. Luego se trasplantaron a macetas de 10,6 cm de diámetro, que contenían 800 gr de suelo natrocuol típico (textura franco limosa; 142,76 ppm NO<sub>3</sub> ext. seco, pH 6.4). Previo al trasplante, se agregó a cada maceta la cantidad correspondiente de solución de KNO<sub>3</sub> en agua para obtener una fertilización de 15, 75, 150 y 200 kN/ha. Las plantas crecieron en invernáculo en un fotoperíodo de 16 hs luz y 8 h oscuridad, completando con dos lámparas de sodio ubicadas a un metro de distancia de las plantas. Se regó con una solución nutritiva de Ozanne, Key y Biddiscombe (1969) dos veces por semana.

En este ensayo se usó el aislamiento # 16, altamente virulento, de Sclerotinia sclerotiorum. La inoculación se realizó colocando un grano de arroz previamente inoculado sobre el hipocótilo lignificado de una planta en estado vegetativo (5 pares de hojas expandidas).

Las plantas se cosecharon al cuarto día siguiente a su inoculación. Tanto en las plantas testigo como inoculadas se midieron: longitud y grosor del tallo y largo y ancho de las 7<sup>o</sup> y 8<sup>a</sup> hoja. Para las plantas enfermas se calcularon los siguientes parámetros: porcentaje de plantas enfermas, de plantas muertas, de hojas con marchitez permanente, longitud de las lesiones e índice de severidad basado en el grado de marchitez (0 = sin marchitez, 4 = 100% hojas con marchitez permanente) (Bazzalo 1982). La significancia de las diferencias entre tratamientos fue evaluada con el análisis de varianza o tests no paramétricos de acuerdo con los casos.

Las lesiones se caracterizaron teniendo en cuenta color, consistencia y tipo de borde (difuso o limitado).

El día de la cosecha se recolectaron algunas plantas testigo y se determinó el peso fresco y seco, y el contenido de N total en tallos según la técnica empleada por Novozamsky et al. (1983). En las plantas enfermas se separaron los segmentos de tallos que contenían las lesiones y en el resto del tallo se determinó el contenido de N total.

Los fenoles solubles totales se extrajeron y cuantificaron en las lesiones y en tejidos similares de plantas testigo por medio de técnicas standard (Bray et al. 1954, Ribereau-Gayon 1972). Los datos se expresan en mg equivalentes de ácido clorogénico por gramo de peso fresco.

#### Resultados

Todas las plantas inoculadas fueron infectadas por el hongo, independientemente de la dosis de N aplicada. Ninguna planta de los tratamientos 15 y 75 kN/ha murió al cuarto día después de la inoculación. Sin embargo, el 14,3% y el 66,7% de las plantas tratadas con 150 y 200 kN/ha, respectivamente, mostraron una severa marchitez en todas sus hojas. La penetración del hongo hasta la médula del tallo provocó el vuelco de las plantas. A medida que aumentó la concentración

de N aplicada, se incrementaron el índice de severidad y el porcentaje de hojas con marchitez permanente. En este último caso se determinaron diferencias significativas entre los primeros tres tratamientos y el de 200 kN/ha. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre las longitudes promedio de las lesiones; aunque parecerían tender a aumentar con el nivel de N (Cuadro 1).

Cuadro 1: Evaluación de la susceptibilidad al cuarto día después de la inoculación.

Parámetros al 4º día	kN/ha			
	15	75	150	200
% plantas enfermas	100	100	100	100
% plantas muertas	0	0	14,3	66,7
$\bar{X}$ hojas con marchitez permanente (%)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	14,28 <sup>a</sup>	62,62 <sup>b</sup>
Índice de severidad	0,1	0,5	0,857	2,78
Longitud promedio de las lesiones (cm)	1,62 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup>

Valores seguidos de letras diferentes difieren significativamente al 5%. En las plantas con 100% de hojas en marchitez permanente (consideradas como muertas) las lesiones fueron característicamente claras y de bordes indefinidos, y los tallos eran huecos y húmedos ( $p = 0,01$ ). Consecuentemente al aumentar la dosis de  $\text{KNO}_3$  en suelo se incrementó el número de individuos que presentaron estos síntomas (Figura 1).

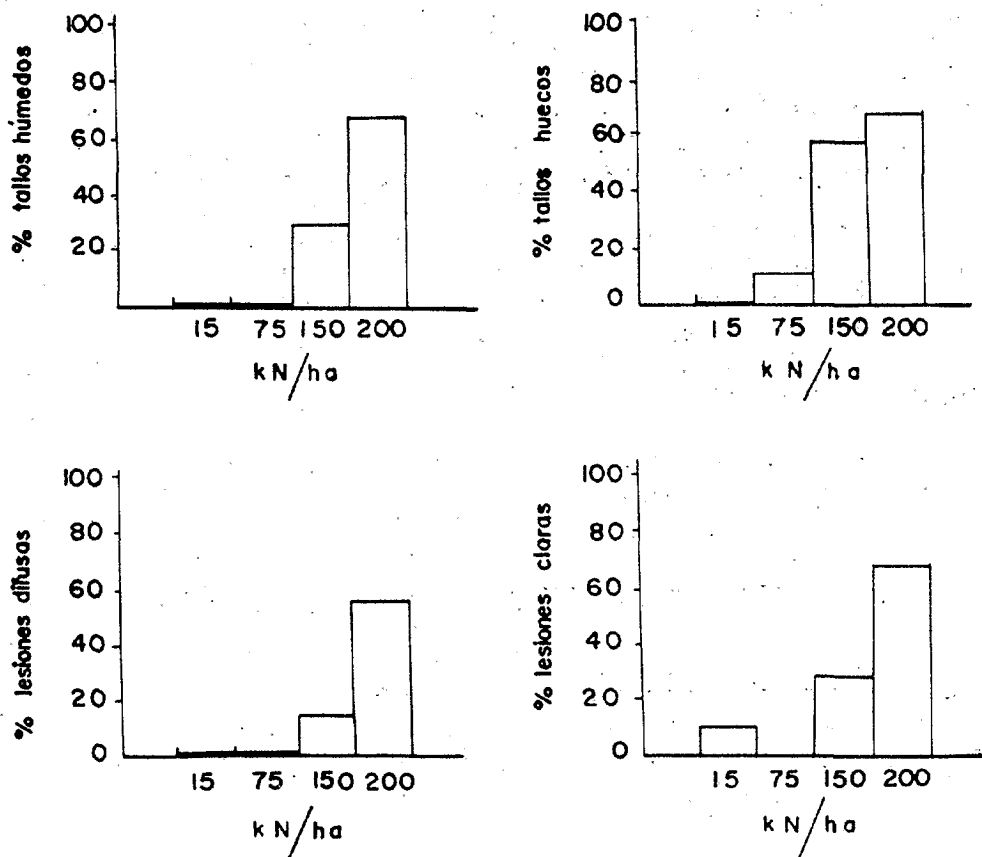


Figura 1: Efecto de distintas dosis de  $\text{KNO}_3$  en suelo sobre el porcentaje de individuos síntomas característicos de la susceptibilidad.

A medida que se incrementó el nivel de  $\text{KNO}_3$  agregado aumentó significativamente el peso seco total de la planta, el diámetro del tallo, la longitud y ancho de la 7ª y 8ª hoja y el contenido total de N en el tallo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las alturas de las plantas de los distintos tratamientos (Cuadro II). En el tratamiento de 15 kN/ha se observaron ciertos síntomas de deficiencia de N (clorosis, hojas inferiores secas, etc). Evidentemente la mayor sanidad general de la planta no estaría relacionada con una mayor tolerancia a la enfermedad.

Cuadro II: Efecto de distintas dosis de  $\text{KNO}_3$  en suelo sobre algunos parámetros de crecimiento, y el contenido interno de N.

	kN/ha			
	15	75	150	200
Peso seco total (gr)	3,85 <sup>a</sup>	7,88 <sup>b</sup>	10,93 <sup>c</sup>	10,94 <sup>c</sup>
Grosor del tallo (cm)	0,8 <sup>a</sup>	0,92 <sup>ab</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	1 <sup>b</sup>
Altura (cm)	54,1 <sup>a</sup>	52 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	52 <sup>a</sup>
Hojas longitud (cm)	10,75 <sup>a</sup>	11,55 <sup>ab</sup>	13,55 <sup>ab</sup>	14,55 <sup>b</sup>
Hojas ancho (cm)	6,90 <sup>a</sup>	7,70 <sup>ab</sup>	8,85 <sup>ab</sup>	9,80 <sup>b</sup>
N total en tallos (% peso seco)	1,15 <sup>a</sup>	1,09 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	2,143 <sup>b</sup>

Valores seguidos de letras diferentes difieren significativamente al 5%.

Se encontró una correlación positiva significativa al 5% ( $r = 0.771$ ) entre el contenido de N interno y la longitud de las lesiones.

Con respecto al contenido de fenoles solubles totales no se encontraron diferencias significativas entre las tres dosis más bajas de N. Sin embargo, las plantas que crecieron con 200 kN/ha mostraron un contenido significativamente menor.

Comparativamente con las plantas testigo, se detectó un incremento significativo en el contenido de fenoles totales solubles en las plantas inoculadas de los 4 tratamientos. En las plantas inoculadas, la concentración de fenoles en la zona de la lesión no parece depender del nivel de  $\text{KNO}_3$  suministrado. El contenido de fenoles en las plantas susceptibles (200 kN/ha) fue similar al de las plantas tolerantes (Cuadro III).

Cuadro III: Concentración promedio de los compuestos fenólicos solubles totales en plantas testigo e inoculadas.

	kN/ha			
	15	75	150	200
	mg equivalentes de ácido clorogénico/g peso fresco			
Testigo	2,75 <sup>a</sup>	2,017 <sup>a</sup>	2,51 <sup>a</sup>	1,042 <sup>b</sup>
Inoculada	8,39 <sup>c</sup>	6,075 <sup>c</sup>	7,14 <sup>c</sup>	7 <sup>c</sup>

Se observó que para los niveles bajos de fertilización, el hipocótilo lignificado dificultó la penetración del patógeno. En plantas de 200 kN/ha sin embargo, este hipocótilo no representó barrera alguna a la penetración.

#### Discusión

La susceptibilidad de un hospedante a un patógeno dado es en general influida por la fertilización nitrogenada, no solo desde el punto de vista de la dosis sino también de la forma de N aplicada (Huber y Watson 1974). Además, pueden existir interacciones con otros factores como tipo de suelo, pH, temperatura,

luz, precipitaciones, y la interacción específica del hospedante y patógeno. El aumento de la susceptibilidad del girasol a S. sclerotiorum como consecuencia de mayores concentraciones de N ( $\text{KNO}_3$ ) coincidiría con lo observado en numerosas enfermedades (Ranney 1962; Huber et al. 1968; Huber y Watson 1970; Smiley y Cook 1973 y Lam y Lewis 1982).

El mayor o menor desarrollo de la enfermedad debido a la resistencia alterada del hospedante generalmente resulta de la influencia del nivel y de la forma específica de N sobre las vías metabólicas que afectan el crecimiento; los componentes vegetales y los exudados, más que del efecto del N per se (Huber y Watson 1974).

El contenido de N total y el metabolismo alterado de aminoácidos y carbohidratos se han correlacionado con la inhibición o promoción de la enfermedad (Stretch y Cappellini 1965). Niveles elevados de N reducen la cantidad de fitoalexinas acumuladas en trébol (Bell 1981). Generalmente también se observa que una abundancia de N es inhibidora de la acumulación de fenoles. Se postula que los precursores comunes de la síntesis de proteínas y fenoles serían utilizados preferentemente en la primera de éstas vías metabólicas (Gisebach, H. 1977; Phillips y Henshaw 1977). En girasol también se ha encontrado una disminución en el contenido de fenoles solubles totales en el caso de la mayor dosis. Sin embargo, no se observó una acumulación disminuida de dichos compuestos en este tratamiento. Esto parecería indicar, que la influencia de la dosis de N se ejercería a través de modificaciones estructurales y/o del incremento de factores que promueven el crecimiento y/o la actividad de las enzimas fúngicas antes que a través de una alteración de los mecanismos de defensa. No deberían descartarse modificaciones cualitativas y de otros eventuales mecanismos de tolerancia.

#### Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Ing. Agr. H.D. Ginzo por la lectura del manuscrito, a la Sra. Ylida Torres por la valiosa colaboración técnica y al Servicio de Fotografía Científica encargado de realizar la labor gráfica.

#### Bibliografía

- BAZZALO, M.E. 1982. Relación entre la edad de inoculación de Helianthus annuus crecido bajo condiciones controladas, y su susceptibilidad frente a Sclerotinia sclerotiorum (Lib.). In: Actas del II Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Buenos Aires, Argentina. En prensa.
- BAZZALO, M.E., HEBER, E., M.A. DEL PERO de MARTINEZ y O.H. CASO 1985. Mecanismos de resistencia en Helianthus annuus L. frente a la podredumbre basal (Sclerotinia sclerotiorum (L.) De Bary). Actas de la XI Conferencia Internacional del Girasol.
- BELL, A.A. 1981. Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. Annual Review of Plant Physiology 32: 21-81.
- BRAY, H.G. y W.V. THORPE 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in Metabolism. Methods of Biochemical Analysis 1: 27-52.
- CHENG, S.F. y J.S. ZUBRISKI 1978. Effects of Nitrogen Fertilization on Production of Irrigated Sunflower, Plant Uptake of Nitrogen, and on Water Use. In: Actas de la VIII Conferencia Internacional del Girasol. Minneapolis, Minnesota, USA: 400-409.
- DUECK, J. y S.J. CAMPBELL 1978. Resistance to Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary in Sunflower. In: Actas de la VIII Conferencia Internacional del Girasol Minneapolis, Minnesota, USA: 305-310.
- GRISEBACH, H. 1977. Selected Topics in Flavanoid Biosynthesis. In Swain, T., Harborne, J., and Ch. Van Sumere (eds) Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 12: Biochemistry and London in Plants Phenolics. 557-588. Plenum Press, New York.

- HUBER, D.M. y R.D. WATSON 1970. Effect of organic amendment on soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 60: 22-26.
- HUBER, D.M. y R.D. WATSON 1974. Nitrogen Form and Plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 12: 139-165.
- HUBER, D.M., PAINTER, C.G., MCKAY, H.C., PETERSON, D.L. 1968. Effects of nitrogen fertilization on take-all of winter wheat. *Phytopathology* 58: 1470-72.
- LAM, A. y G.C. LEWIS 1982. Effects of Nitrogen and Potassium fertilizer application on Drechslera spp. and Puccinia coronata on perennial ryegrass (Lolium perenne) foliage. *Plant Pathology* 31: 123-131.
- MALCA, I., D.C. ERWIN, W. MOJE y B. JONES 1965. Effect of pH and Carbon and Nitrogen Sources on the Growth of Verticillium albo-atrum. *Phytopathology* 56: 401-406.
- NOVOZAMSKY, I., V.J.G. HOUBA, R. van ECK y W. van VARK 1983. A novel Digestion Technique for multi-element plant Analysis. *Communications in Soil Science Plant Analysis* 14 (3): 239-248.
- NOYES, R.D. y F.G. HANCOCK 1981. Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* 18: 123-132.
- OZANNE, P.G., KEAY, J. y BIDDISCOMBE, E.F. 1969. The comparative applied phosphate requirements of eight annual pasture species. *Australian Journal of Agricultural Research* 20: 809-818.
- PHILLIPS, R. y G.G. HENSHAW 1977. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of Acer pseudoplatanus L. *Journal of Experimental Botany* 28 (105): 785-794.
- RANNEY, C.D. 1962. Effects of Nitrogen Source and Rate on the Development of Verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 52: 38-41.
- RIBEREAU-GAYON, P. 1972. V.H. Heywood (ed.). *Plant phenolics*. Oliver and Boyd. Edimburgh.
- SMILEY, R.W. y R.J. COOK 1973. Relationship between Take-all of wheat and rhizosphere pH in soils fertilized with Ammonium vs. Nitrate-N. *Phytopathology* 63: 882-890.
- STEADMAN, J.R. 1979. Control of Plant Diseases caused by Sclerotinia species. *Phytopathology* 69: 904-907.
- STRETCH, A.W. y R.A. CAPPELLINI 1965. Changes in free aminoacids and reducing sugars in highbush blueberry fruit infected with Glomerella cingulata. *Phytopathology* 55: 302-3.
- VRANCEANU, A.V. 1977. *El Girasol*. Editorial Mundi Prensa. Madrid.
- ZUBRISKI, J.C. y D.C. ZIMMERMANN 1974. Effects of Nitrogen, Phosphorus and Plant Density on Sunflower. *Agronomy Journal* 66: 798-801.