

Caracterización de la resistencia genética a podredumbre basal en girasol causada por *Sclerotinia sclerotiorum* en Argentina

Daniel Alvarez, Francisco Marraro

INTA - EEA Manfredi, RN 9 Km. 636, 5988 Manfredi, Argentina,

E-mail: dalvarez@manfredi.inta.gov.ar

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is an optional parasite fungi causative of stem rot in sunflower and others crops in Central and North Area of Argentina. Planting resistant materials is the most economical and efficient (Fick and Miller, 1997) management strategy. The objectives of this work were to identify differences in behaviour between materials of a wide genetic diversity compared with *S. sclerotiorum* inoculation and to obtain a reliable, simple, repeatable method for an assessment consistent with the genotypes over the years in Manfredi, INTA Experimental Station, Argentina. During 4 years, 384 entries from the INTA collection and improvement program, 21 commercial hybrids and 8 susceptible and tolerant controls were evaluated. The design of the trials was in alpha lattice with two replications. The planting was done manually in an area naturally infested with *S. sclerotiorum* and reinforced with mycelium of the pathogen grown in wheat grains. The evaluation was performed at 30 days of infection, recording the percentage of diseased plants. During the four years, there was a good manifestation of the disease allowing the evaluations. The contrasting behaviour between susceptible and resistant controls over the years was consistent. There were statistical differences between genotypes. Three groups with different levels of resistance to stalk rot between genotypes with a broad genetic variability were identified. High infection stalk rot in sunflower, and consistency in the response of genotypes through the years were achieved. The methodology used in infection and evaluation showed reliability, repeatability and simplicity by allowing the selection of superior genotypes.

Key words: breeding – genetic resistance – genetic resources – *Sclerotinia* – stalk rot – sunflower.

RESUMEN

Sclerotinia sclerotiorum es un hongo polífago agente causal de Podredumbre Basal de tallo en girasol y otros cultivos de importancia económica, principalmente en la zona Central y Norte Argentina. La siembra de materiales resistentes es la estrategia de manejo más económica y eficiente. Los objetivos de este trabajo fueron detectar diferencias de comportamiento entre materiales de amplia diversidad genética frente a inoculación con *S. sclerotiorum* y contar con un método confiable, simple y repetible para una evaluación consistente de genotipos a través de los años en INTA EEA Manfredi, Argentina. Durante 4 años, se evaluaron 384 entradas de la colección y el programa de mejoramiento del INTA, 21 híbridos comerciales y 8 testigos susceptibles y tolerantes. El diseño de los ensayos fue alpha lattice en 2 repeticiones. La siembra se realizó manualmente en infectario de *Sclerotinia sclerotiorum* reforzado con micelio del patógeno vehiculizado en granos de trigo. La evaluación se realizó a los 30 días de infectado determinando la proporción de plantas enfermas. Durante los cuatro años, existió buena manifestación de la enfermedad y el comportamiento entre los testigos susceptibles y resistentes fue contrastante y consistente durante todos los años. Existieron diferencias estadísticas entre los genotipos. Se identificaron tres grupos con diferentes niveles de resistencia a Podredumbre Basal entre genotipos de amplia variabilidad genética. La metodología utilizada en infección y evaluación demostró confiabilidad, repetibilidad y sencillez permitiendo la selección de genotipos superiores.

Palabras clave: girasol - mejoramiento - podredumbre basal - recursos genéticos - resistencia genética – *Sclerotinia*.

INTRODUCCIÓN

Sclerotinia sclerotiorum es un hongo polífago y agente causal de podredumbres en diversos cultivos de importancia económica, entre ellas la Podredumbre Basal del tallo en girasol (Cuk, 1980) y también en soja. En su infección micelial invade desde el suelo la zona radical superior y la base del tallo (Huang y Dueck, 1980).

La Podredumbre Basal puede causar severos daños en el girasol, principalmente en la zona Central y Norte de Argentina, y es una limitante para este cultivo, fundamentalmente en fechas de siembra tardías. En la campaña 2002/03, se reportaron severos daños (9,5 y 32,4% de plantas afectadas) en ensayos de evaluación de híbridos comerciales bajo condiciones de infección natural, fecha de siembra normal, y labranza convencional en la localidad de Serrano, Córdoba, (Alvarez y Guerra, 2005). La creciente expansión de la soja y su inclusión en las rotaciones, constituyen un agravante potencial ante las probabilidades de expansión de esta enfermedad.

La infección natural suplementada con inoculación artificial es considerada un efectivo método para realizar selección entre materiales (Miller, 1996). La siembra de materiales resistentes es la estrategia de manejo más económica y eficiente.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Detectar diferencias de comportamiento entre materiales de la Colección de Germoplasma de Girasol, del Programa de Mejoramiento del INTA y de Híbridos Comerciales frente a inoculación asistida con micelio de *S. sclerotiorum*. 2) Contar con un método confiable, simple y repetible que permita una evaluación consistente del comportamiento de los genotipos posibilitando la detección de resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 4 años (2002/03, 2004/05, 2005/06 y 2006/07), se evaluaron 423 genotipos compuestos por 384 entradas de la colección de Recursos Genéticos del INTA y 21 híbridos comerciales, de los cuales se utilizaron 8 como testigos en base a su comportamiento sanitario diferencial (4 susceptibles y 4 tolerantes) frente a Podredumbre Basal y de capítulo (Trogia et al., 2002).

Los ensayos se dispusieron en diseños Alpha lattice en 2 repeticiones. Las parcelas eran de 1 hilera de 5,10 m de largo, distanciadas a 0,70 m. La siembra se realizó en un infectario natural de *S. sclerotiorum* en forma manual a 0,30 m entre sí. El análisis estadístico mediante ANOVA, consideró Genotipo como fuente de variación. LSMeans se calculó por el procedimiento GLM de SAS (SAS 2002).

Cuando las plantas alcanzaron el estado V4 se realizó el raleo, dejando 1 planta por golpe (Schneiter y Miller, 1980). En el estado de prefloración, se reforzó la presencia de patógeno introduciendo micelio vehiculizado en granos de trigo en la zona de suelo próxima al cuello de la planta a una profundidad de 2 a 3 cm y parcialmente cubierto. El inóculo se preparó cultivando esclerotos de *S. sclerotiorum* en APG (2%) e incubándolos a 25°C. Posteriormente a los 4 días se vehiculizaron en granos de trigo. Este vehículo se preparó remojando trigo durante 24 horas, posteriormente se escurrió el exceso de agua y fraccionó en frascos de 500 ml de capacidad. Se esterilizaron en autoclave secuencialmente en 3 oportunidades a 1 atm durante 30 min, dejando enfriar. En condiciones de asepsia se inoculó con colonias de *S. sclerotiorum* (aislado a partir de esclerotos recolectados en el campo) y se incubó a 25°C durante 25 a 30 días, agitando periódicamente para permitir un crecimiento homogéneo. La evaluación se realizó en dos oportunidades: a los 15 y a los 30 días de infectado, considerando planta afectada a toda aquella que presentara lesión en la base del tallo (Pereyra y Escande, 1994). Se determinó la proporción de plantas enfermas como el cociente entre plantas con síntomas y plantas totales x 100. Los genotipos se clasificaron en resistentes, intermedios y susceptibles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los cuatro años de evaluación, existió una buena manifestación de la enfermedad que permitió realizar las evaluaciones. En la Fig. 1 se observa un comportamiento contrastante entre los testigos susceptibles (S1, S3, S5 y S7) y resistentes (S2, S4, S6 y S8), el cual fue consistente durante todos los años de evaluación, siendo la proporción de plantas enfermas de los susceptibles siempre mayores a los de los resistentes. Durante los tres primeros años de evaluación (2002/03, 2004/05 y 2005/06), el nivel de enfermedad en todos los testigos fue superior a la de 2006/07, lo cual se debería a las condiciones ambientales con un período de sequía y altas temperaturas posterior a la inoculación, que podrían haber afectado el proceso de infección de las plantas. Sin embargo, esta situación natural no afectó significativamente los parámetros estadísticos ni la discriminación de los genotipos por su grado de resistencia.

De acuerdo a la Tabla 1, durante los 3 primeros años se obtuvo una alta incidencia (superior a 80%) de las plantas infectadas para el promedio de todos los genotipos, mayor a la registrada en el 4° año, (18.2% en 2006/07). Los Coeficientes de Variación (C.V), se encontraron dentro de los valores esperados para este tipo de evaluaciones. Las Diferencias Mínimas Significativas (DMS) permitieron diferenciar estadísticamente los genotipos por su comportamiento frente a la enfermedad.

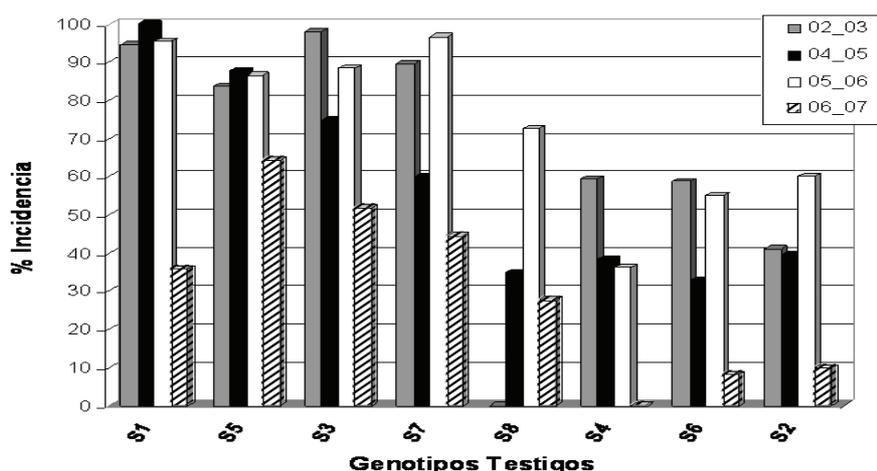


Fig. 1. Incidencia de podredumbre basal en testigos susceptibles (S1, S3, S5 y S7) y resistentes (S2, S4, S6 y S8), en cuatro años de evaluación.

Tabla 1. Número y porcentaje de genotipos con diferente grado de incidencia de Podredumbre Basal. Promedio, Coeficiente de Variación y DMS ($\alpha=0,1$), durante cuatro años de evaluación.

Incidencia	2002/03		2004/05		2005/06		2006/07	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Alta	5	4,5	21	20,2	1	1,0	74	71,2
Media	34	30,6	7	6,7	32	30,8	18	17,3
Baja	72	64,9	76	73,1	71	68,3	12	11,5
Promedio (%)	80,3		80,1		86,2		18,2	
C.V. (%)	24,2		20,2		12,6		34,7	
DMS (0,1)	22,8		37,6		18,2		25,7	

En la Fig. 2, la severidad del ataque y la reacción de los genotipos permitieron identificar tres grupos de materiales con diferente comportamiento según grado de resistencia. Resistentes: genotipos con valores menores a la suma del valor mínimo del ensayo y la DMS (Negros); Medios: con valores que difieren del valor mínimo y/o máximo del ensayo (Blancos) y Susceptibles: valores mayores a la diferencia entre el valor máximo del ensayo y la DMS (Gris).

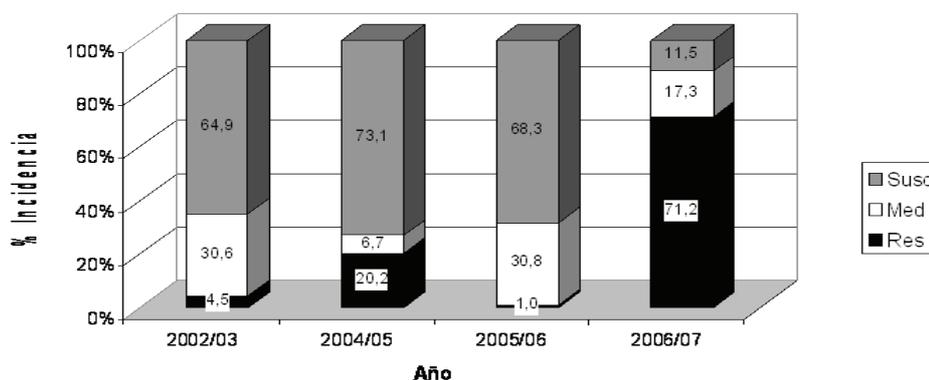


Fig. 2. Proporción de genotipos con diferente grado de resistencia frente a podredumbre basal (susceptibles, medios y resistentes) en cuatro años de evaluación.

Las proporciones entre los tres grupos varió con el año y los materiales evaluados en cada año, de 11.5 (2006/07) a 73.1 % (2004/05) para los genotipos de susceptibles, y de 1.0 (2005/06) a 71.2 % (2006/07) para los genotipos de resistentes. Comparando los diferentes años de evaluación, la alta proporción de entradas con mayor nivel de resistencia en 2006/07, se debería a que un alto número de genotipos participantes fueron seleccionados por su buen comportamiento frente a la enfermedad por esta metodología, en años anteriores.

De acuerdo a la Fig. 3 en el año 2002/03, 4 genotipos se comportaron como resistentes (barras negras), y 1 sola entrada perteneciente a la Colección de Recursos Genéticos de INTA (CGGI 491, PROCISUR-B-C0, datos no publicados) superó al mejor testigo resistente (rayas horizontales).

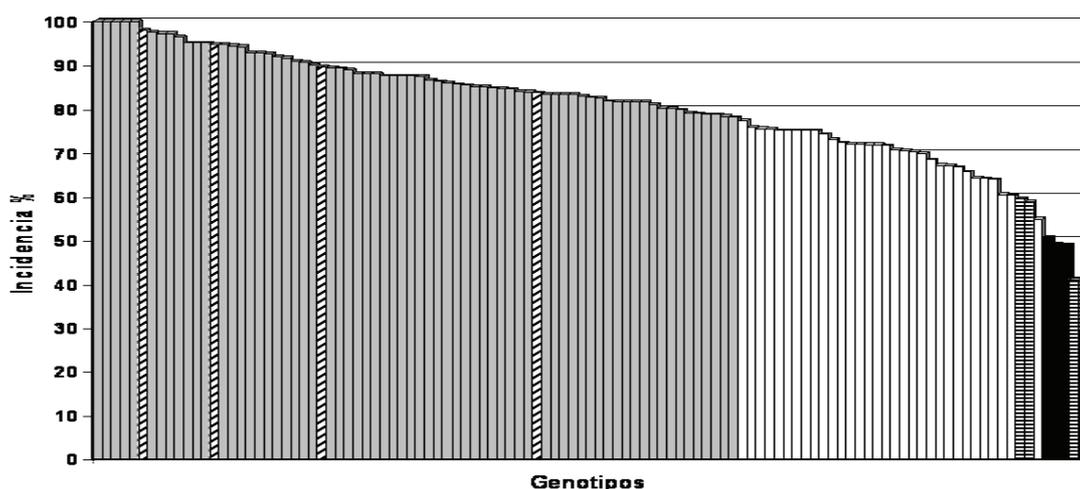


Fig. 3. Respuesta de 111 genotipos frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, año 2002/03, INTA Manfredi. Susceptibles: barra color gris, Medios: barra color blanco, Resistentes: barra negra, Testigos Resistentes: rayas horizontales, Testigos Susceptibles: rayas diagonales.

En las evaluaciones correspondientes a los años 2004/05 y 2005/06, de acuerdo a Fig. 4 y 5, ninguna entrada de Colección demostró mejor comportamiento que el mejor testigo resistente (rayas horizontales). 16 entradas (2004/05) y ninguna (2005/06), integraron el grupo resistente (barras negras).

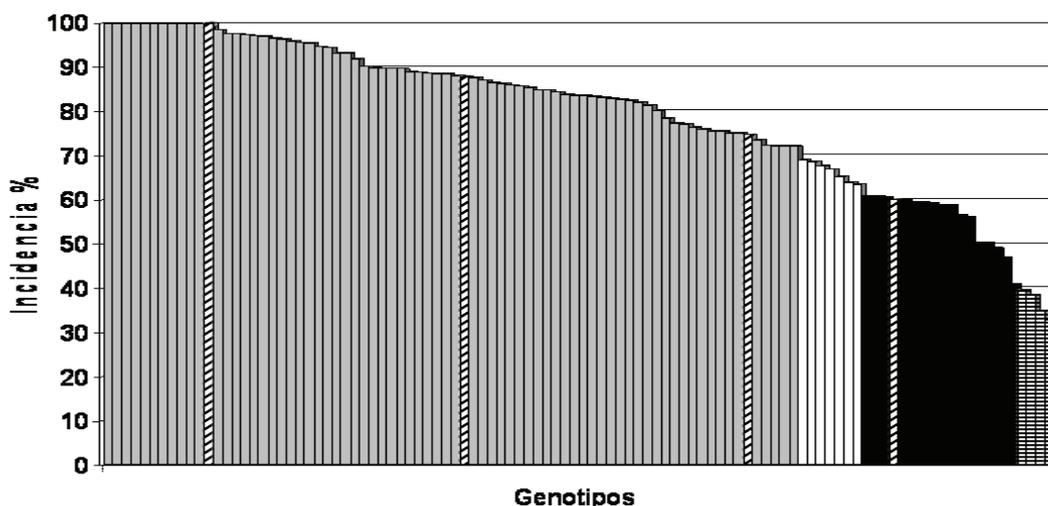


Fig. 4. Respuesta de 104 genotipos frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, año 2004/05, INTA Manfredi. Susceptibles: barras color gris, Medios: barras color blanco, Resistentes: barras color negro, Testigos Resistentes: rayas horizontales, Testigos Susceptibles: rayas diagonales.

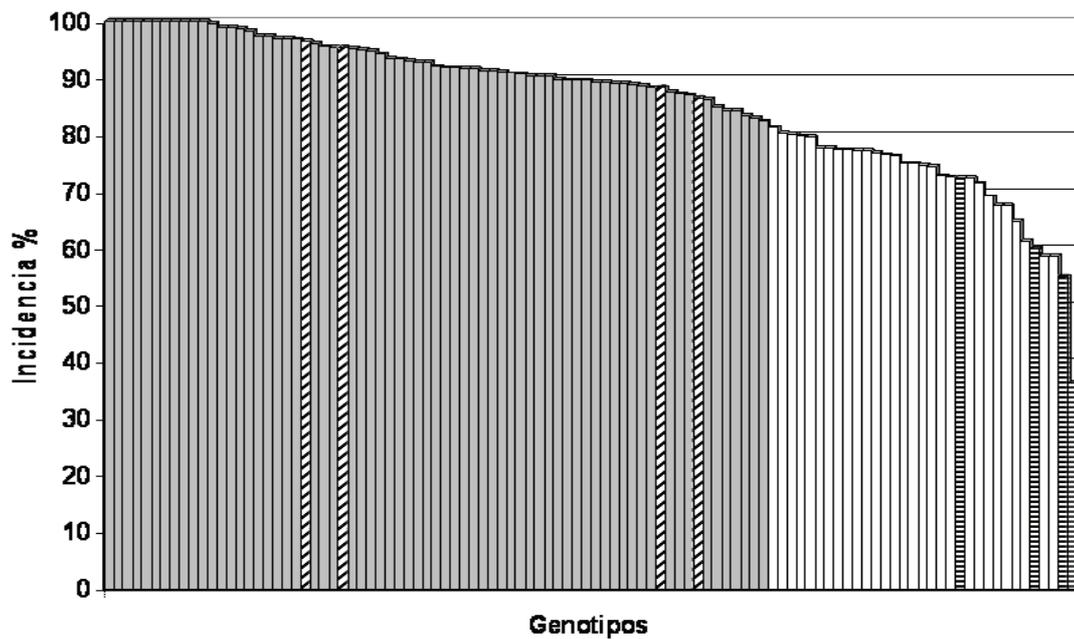


Fig. 5. Respuesta de 104 genotipos frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, año 2005/06, INTA Manfredi. Susceptibles: barras color gris, Medios: barras color blanco, Resistentes: barras color negro, Testigos Resistentes: rayas horizontales, Testigos Susceptibles: rayas diagonales.

La Fig. 6, muestra que en el año 2006/07, 61 genotipos integraron el grupo resistente (barras negras), 26 entradas superaron el valor del mejor testigo resistente (rayas horizontales), 25 de ellos corresponden al programa de mejora seleccionados años anteriores por esta metodología y sólo 1 (CGGI 13_3, IDANOV 8281-3), pertenece a la Colección de Recursos Genéticos de INTA (datos no publicados).

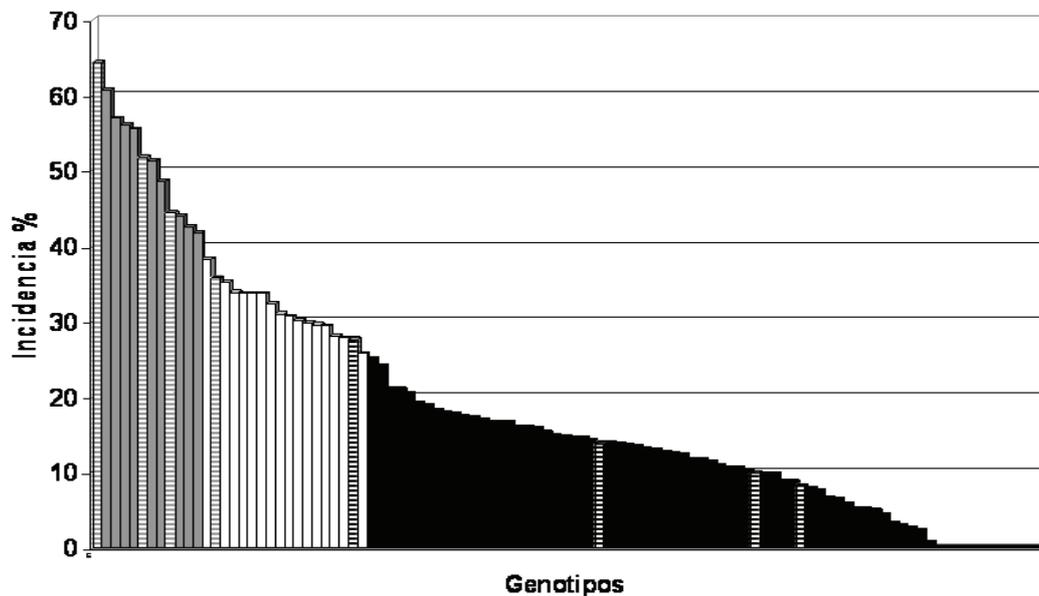


Fig. 6. Respuesta de 104 genotipos frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, año 2005/06, INTA Manfredi. Susceptibles: barras color gris, Medios: barras color blanco, Resistentes: barras color negro, Testigos Resistentes: rayas horizontales, Testigos Susceptibles: rayas diagonales.

Como resultado del presente trabajo, se puede concluir que:

1. Es posible lograr elevados niveles de infección y enfermedad de Podredumbre Basal del tallo en girasol, determinando a la vez consistencia en la respuesta de los genotipos a través de diferentes años y distintos niveles de infección general.
2. La metodología utilizada en la infección y evaluación demostró confiabilidad, repetibilidad y una aceptable sencillez permitiendo la utilización de la variabilidad en los procesos de mejora.
3. Existen diferentes niveles de resistencia a Podredumbre Basal en condiciones de infectario con inoculación micelial entre genotipos de amplia variabilidad genética como poblaciones de la Colección de Germoplasma de Girasol del INTA, líneas e híbridos comerciales.
4. La colección de Recursos Genéticos de Girasol de INTA es una fuente valiosa para selección de genotipos por caracteres de resistencia genética a la Podredumbre Basal.
5. Mediante mejoramiento genético, es posible la obtención de genotipos superiores con altos niveles de resistencia frente a *S sclerotiorum*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del personal técnico y auxiliar Agr. L. Ceballos, Agr. J. Nievas, J. Gatti y G. Rojo, en las tareas de laboratorio y campo.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, D., and G. Guerra. 2005. Evaluación de los Recursos Genéticos de Girasol por Podredumbre Basal *Sclerotinia sclerotiorum*. Segundo Congreso Nacional de Girasol, Buenos Aires, Argentina.
- Cuk, L. 1980. Resistance evaluation of sunflower genotypes naturally infected by *Sclerotinia sclerotiorum*. (Lib.) de Bary. p. 182-186. In: Proc 9th Int. Sunflower Cong., Torremolinos, Spain.
- Huang, H.C., and J. Dueck. 1980. Wilt of sunflower from infection by micelial germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Pathol. 2:47-52.
- Miller, J. F. 1996. Development of sunflower germplasm with rResistance to *Sclerotinia* stalk rot. p. 56-63. In: Proc. ISA Symp. Sunflower Disease Tolerance in Sunflower, 13 June, Beijing, P.R.China.
- Pereyra, V., and A. Escande. 1994. Enfermedades de girasol en la Argentina. Manual de reconocimiento. INTA. Unidad Integrada Balcarce, Argentina.
- SAS 2002. SAS Institute Inc 9.1.3. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Schneiter, A., and J.F. Miller. 1981. Description of sunflower growth stage. Crop Sci. 21:901:903.