



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVARES Y LÍNEAS DE COLZA (*BRASSICA NAPUS*) POR SU RESISTENCIA A *LEPTOSPHAERIA MACULANS*.

de Souza, J.C.; Gieco, L.C.; Milisich, H.J.

Grupo Genética Mejoramiento y Biotecnología Vegetal. Estación Experimental Agropecuaria Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ruta 11 Km 12,5 - 3100 - Oro Verde - Entre Ríos, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La colza (*Brassica napus* L.) es el segundo cultivo oleaginoso a nivel mundial, y en Argentina la superficie cultivada se encuentra en expansión. Las enfermedades constituyen un factor limitante para el cultivo e inciden negativamente en el rendimiento. El cancro de la base del tallo o pie negro ocasionado por *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. y de Not. [Anamorfo *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm] es la enfermedad fúngica más importante del cultivo y del género *Brassica* a nivel mundial y regional (Fitt y col., 2006; Long y col., 2011; Raman y col., 2012; Wang, 2013; West y col., 2001) ocasionando considerables pérdidas de rendimiento por el uso de cultivares susceptibles y condiciones ambientales predisponentes. Para minimizar estas pérdidas, el uso de cultivares genéticamente resistentes es uno de los más económicos y sustentables desde el punto de vista ambiental. Existen dos tipos de resistencia: cualitativa y cuantitativa, y los cultivares resistentes pueden tener una de ellas o una combinación de ambas. En este sentido, la incorporación de genes de resistencia de tipo monogénica ha sido efectiva, aunque hay evidencia de frecuente quiebre de esa resistencia en respuesta a una rápida evolución de *L. maculans* (Sasek, 2012; Sprague y col., 2006). Para mejorar la durabilidad de la misma, diferentes genes específicos pueden apilarse (Fitt y col. 2006) y/o usarse en combinación con resistencia poligénica (Brum y col., 2010; Delourme y col., 2014; Leflon y col., 2007).

Un procedimiento de fenotipado eficiente y seguro es una condición indispensable para cualquier programa de mejoramiento de la resistencia en la especie (Bansal y col., 1994). Hay numerosas descripciones sobre métodos utilizados, tanto en invernáculo como en el campo, y en plántulas y plantas adultas. La presencia de genes específicos de resistencia puede detectarse perfectamente por la reacción de la plántula inoculada. Huang y colaboradores (2014) a partir de los resultados de sus experimentos sugieren que la resistencia cuantitativa también puede detectarse en plantas jóvenes, en condiciones ambientales controladas, mediante inoculaciones en la lámina o el pecíolo de la hoja, y que existe una buena correlación con el comportamiento en planta adulta.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar fenotípicamente cultivares comerciales y líneas inéditas por su resistencia a *L. maculans*, mediante inoculaciones en invernáculo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron cultivares comerciales y líneas estabilizadas del programa de mejoramiento de la EEA Paraná del INTA, en dos ensayos. Ensayo 1: se incluyeron los siguientes cultivares: Bioaureo 2386, Bioaureo 2486, Biolza, Castle, Filial, Filial Precoz, Foremost, Gladiator, Gospel, Hyola 432, Hyola 61, Jura, Katia, Latern, Legacy, Lilian, Nolza 841, Nolza 861, Pacha, QC 4508, QC 4605, Rivette, SRM 2586, SRM 2670, SRM 370, SW 2797 y SW 2836. Ensayo 2: se incluyeron 77 líneas estabilizadas inéditas del programa de mejoramiento y 12 cultivares comerciales como testigos (Artist, Hornet, Hot 6, Impact, Jura, KWS 16, KWS 19, Legacy, Rústica, SRM 2580, SRM 660 y Vectra). En los dos ensayos, los materiales se sembraron en

macetas plásticas, sobre vermiculita previamente esterilizada a 1 atmósfera de sobrepresión durante 30 minutos en autoclave. Se utilizó un aislamiento virulento de *Phoma lingam* (Teleomorfo *L. maculans*) de la colección de aislamientos pertenecientes al Grupo de Genética, Mejoramiento y Biotecnología Vegetal de la EEA Paraná del INTA, conservado en nitrógeno líquido. El aislamiento se cultivó en placas de Petri con medio YGCA durante 12 a 14 días en cámara de crecimiento, con una alternancia de 12 hs de luz NUV y 12 horas de oscuridad a 22-24 °C (± 3 °C). La suspensión de esporas se hizo en agua destilada estéril, con una concentración de $5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ conidios ml^{-1} (Bansal y col., 2002). La inoculación se realizó en plántulas con 8 días de emergidas sobre uno de los dos cotiledones, dejando el otro como testigo y se utilizaron 5 repeticiones. Se provocó una lesión con aguja histológica en ambos cotiledones, y se depositó 10 μl de la suspensión de conidios sobre la lesión. Además se utilizaron 5 repeticiones de testigos, sin lesionar ni inocular y otras 5 lesionadas con aguja donde se aplicó agua estéril. Se mantuvieron en cámara húmeda (100% de humedad relativa), temperatura entre 12 y 24°C y 16 hs de fotoperíodo.

La evaluación de los síntomas en cotiledones se realizó a los 11 días pos inoculación, mediante observación visual directa, con la escala de severidad adaptada de Bansal y colaboradores (1994). Se discriminaron 5 grados: 0 (sin síntomas visibles de la enfermedad), 1 (respuesta hipersensible alrededor de la herida (diámetro 0,5-1,5 a 1,5 – 3 mm), 2 (Tejido colapsado color verde grisáceo con margen distintivo y/o grandes áreas necróticas), 3 (Tejido colapsado color verde grisáceo con margen difuso en expansión y pueden formarse algunos picnidios), y 4 (La mayor parte del tejido vegetal con lesiones verde grisáceo colapsado con abundante formación de picnidios). Los datos se analizaron estadísticamente mediante *The glm procedure* de SAS (1988) y test de diferencias de medias de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de los dos ensayos de inoculación realizados.

Ensayo 1: el modelo estadístico resultó altamente significativo, con un ajuste $R=0.97$ y un coeficiente de variación $CV=8.45\%$. Dentro del modelo el efecto genotipo fue altamente significativo. En la siguiente tabla se presentan los cultivares, con el grado correspondiente y el test de comparación de medias (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayo1: cultivares fenotipados, grado asignado y test de Tukey.

Orden	Cultivar	Grado	TCM (Tukey 5 %)
22	Legacy	3,5	A
11	Filial	3	B
12	Filial Precoz	3	B
13	Foremost	3	B
14	Gladiator	3	B
23	Lilian	3	B
20	Katia	3	B
30	Pacha	3	B
31	QC 4508	3	B
32	QC 4605	3	B
39	SW 2797	3	B
40	SW 2836	3	B
16	Hyola 432	2	C
17	Hyola 61	2	C
21	Latern	2	C
25	Nolza 841	2	C
26	Nolza 861	2	C
33	Rivette	2	C
37	SRM 370	2	C

1	Bioaureo 2386	1	D
2	Bioaureo 2486	1	D
3	Biolza	1	D
4	Castle	1	D
15	Gospel	1	D
19	Jura	1	D
34	SRM 2586	1	D
36	SRM 2670	1	D
41	Testigo (agua)	0	E

De acuerdo a lo observado en el cuadro, en el grupo de cultivares ensayados encontramos variabilidad genética para la resistencia al cancro del tallo. El cultivar Legacy se diferenció del resto por su marcada susceptibilidad. Un grupo de 8 cultivares se destacan como moderadamente resistentes: Bioaureo 2386, Bioaureo 2486, Biolza, Castle, Gospel, Jura, SRM 2586 y SRM 2670. También es interesante considerar que otros 7 cultivares se determinaron moderadamente susceptibles, de acuerdo a este ensayo: Hyola 432, Hyola 61, Latern, Nolza 841, Nolza 861, Rivette, SRM 370. No se encontraron cultivares en el grupo 0, es decir resistentes.

Ensayo 2: en este segundo ensayo también el modelo estadístico resultó altamente significativo, con un ajuste $R=0.99$ y un coeficiente de variación $CV=5.5\%$. El efecto genotipo fue altamente significativo. La tabla 2 contiene los datos de los cultivares y líneas ensayadas, con su grado correspondiente y el test de Tukey. En ella podemos ver que 13 líneas del programa de mejoramiento fueron completamente resistentes, es decir no mostraron síntomas de la enfermedad, y otras 20 líneas fueron moderadamente resistentes. Los cultivares Jura y Legacy estuvieron presentes en los dos ensayos.

Tabla 2. Ensayo 2: líneas estabilizadas y cultivares fenotipados, grado asignado y test de Tukey.

Orden	Cultivar	Grado	TCM (Tukey 5 %)	Orden	Cultivar	Grado	TCM (Tukey 5 %)
85	KWS 19	4	A	69	107	2	C
13	51	4	A	74	112	2	C
15	53	4	A	80	Hornet	2	C
23	61	4	A	84	KWS 16	2	C
25	63	4	A	2	40	1	E
26	64	4	A	4	42	1	E
27	65	4	A	5	43	1	E
32	70	4	A	7	45	1	E
40	78	4	A	10	48	1	E
43	81	4	A	11	49	1	E
49	87	4	A	16	54	1	E
57	94	4	A	18	56	1	E
59	96	4	A	29	67	1	E
72	110	4	A	30	68	1	E
14	52	3	B	33	71	1	E
19	57	3	B	35	73	1	E
20	58	3	B	37	75	1	E
24	62	3	B	38	76	1	E
31	69	3	B	44	82	1	E
39	77	3	B	58	95	1	E
42	80	3	B	60	97	1	E
64	102	3	B	63	101	1	E
66	104	3	B	71	109	1	E

67	105	3	B	77	115	1	E
68	106	3	B	79	Artist	1	E
73	111	3	B	82	Impact	1	E
75	113	3	B	1	39	0	F
78	116	3	B	3	41	0	F
86	Legacy	3	B	12	50	0	F
88	SRM 660	3	B	17	55	0	F
8	46	2	C	22	60	0	F
9	47	2	C	34	72	0	F
21	59	2	C	47	85	0	F
28	66	2	C	48	86	0	F
36	74	2	C	51	87	0	F
41	79	2	C	53	89	0	F
45	83	2	C	56	93	0	F
46	84	2	C	70	108	0	F
50	88	2	C	76	114	0	F
52	88	2	C	81	Hot 6	0	F
54	90	2	C	83	Jura	0	F
55	91	2	C	87	Rústica	0	F
61	98	2	C	89	SRM 2580	0	F
62	100	2	C	90	Vectra	0	F
65	103	2	C	91	Testigo (agua)	0	F

A Jura le correspondió grado 1 en el primer ensayo y grado 0 en el segundo; y Legacy, que en el primer ensayo tuvo el máximo grado (3,5%), en el segundo ensayo también fue susceptible (grado 3). La diferencia en los valores encontrados podría deberse a que el ensayo 1 se llevó a cabo con temperaturas promedio mas elevadas (mes de abril) que el ensayo 2 (mes de junio).

CONCLUSIONES

A partir de estos resultados podemos concluir que:

- el método de inoculación permitió discriminar y agrupar los cultivares y las líneas testeadas en su resistencia frente a la inoculación con el patógeno.
- el programa de mejoramiento de colza de la EEA Paraná cuenta con líneas inéditas resistentes a *L. maculans*. Estas líneas están siendo evaluadas en ensayos comparativos de rendimiento y caracterizadas fenológicamente.

REFERENCIAS

- BANSAL, V.K.; BLENIS, P.; STRINGAM, G.R.; THIAGARAJAH, M.R.; TEWARI, J.P. Screening of *Brassica napus* against blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*: effects of inoculum concentration, subculturing of the pathogen, and time of disease screening. 2002. Canadian Journal of Plant Pathology, 24, 3: 323-326.
- BANSAL, V.K.; KHARBANDA, P.D.; STRINGAM, G.R.; THIAGARAJAH, M.R.; TEWARI, J.P. A Comparison of Greenhouse and Field Screening Methods for Blackleg Resistance in Doubled Haploid Lines of *Brassica napus*. 1994. Plant Disease 78: 276-281.
- BRUN, H.; CHÈVRE A-M.; FITT, B.D.L.; POWERS, S.; BESNARD, A-L.; ERMEL M.; HUTEA, U. V.; MARQUER, B.; EBER, F.; RENARD, M. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. 2010. New Phytologist 185:285–299.

DELOURME, R.; PILET-NAYEL, M.L.; ARCHIPIANO, M.; HORVAIS, R.; TANGUY, X.; ROUXEL, T.; BRUN, H.; RENARD, M.; BALESSENT, M.H. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. 2004. *Phytopathology*, 94: 578-583.

FITT, B.D.L.; BRUN, H.; BARBETTI, M.J.; RIMMER, S.R. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). 2006. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 5-15.

HUANG, Y.-J.; QI, A.; KING, G.J.; FITT, B.D.L. Assessing Quantitative Resistance against *Leptosphaeria maculans* (Phoma Stem Canker) in *Brassica napus* (Oilseed Rape) in Young Plants. 2014. *PLoS ONE* 9(1): e84924. doi:10.1371/journal.pone.0084924.

LEFLON, M.; BRUN, H.; EBER, F.; DELOURME, R.; LUCAS, M.O.; VALLEE, P. Detection, Introgression and Localization of Genes Conferring Specific Resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. 2007. *Theoretical and Applied Genetics*; 115(7):897-906.

LONG, Y.; WANG, Z.; SUN, Z.; FERNANDO, D.; MCVETTY, P. y LI, G. Identification of two blackleg resistance genes and fine mapping of one of these genes in a *Brassica napus* canola cultivar 'Surpass 400'. 2011. *Theoretical and Applied Genetics* 122:1223–1231.

RAMAN, R.; TAYLOR, B.; MARCROFT, S.; STILLER, J.; ECKERMANN, P.; COOMBES, N. Molecular Mapping of Qualitative and Quantitative Loci for Resistance to *Leptosphaeria maculans*; Causing Blackleg Disease in Canola (*Brassica napus* L.). 2012. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 2:405-18.

SASEK, V.; NOVAKOVA, M.; JINDRICOVA, B.; BOKA, K.; VALENTOVA, O.; BURKETOVA, L. Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signalling in *Brassica napus*. 2012. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 25:1238–1250.

SPRAGUE S.J.; BALESSENT M.; BRUN H.; HAYDEN H.L.; MARCROFT S.J.; PINOCHET X.; ROUXEL T.; HOWLETT B.J. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. 2006. *European Journal of Plant Pathology*, 114:33-40.

WANG, Z. Development of High-throughput Molecular Markers for Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Resistance Genes in *Brassica napus* for Gene Stacking. 2013. *Universal Journal of Plant Science*, 1(4): 118-124.

WEST, J.S.; KHARBANDA, P.D.; BARBETTI, M.J.; FITT, B.D.L. Epidemiology and Management of *Leptosphaeria maculans* (Phoma Stem Canker) on Oilseed Rape in Australia, Canada and Europe. 2008. *Plant Pathology*, 50(1):10-27.