

Efecto la disponibilidad de nitrógeno sobre el impacto de la roya en la fisiología y crecimiento del álamo.

GORTARI F.¹; CORTIZO S.²; GUIAMET J. J.¹; GRACIANO C.¹

¹ Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) (UNLP-CONICET) fgortari@agro.unlp.edu.ar

² INTA EEA Delta del Paraná- Facultad de Agronomía UBA

Melampsora medusae es considerada una de las enfermedades principales en el cultivo de *Populus deltoides*. Los daños que provoca son la defoliación anticipada, susceptibilidad a otros factores de estrés, pérdida en la calidad de la madera y reducción del crecimiento. El grado de infección es altamente dependiente de las condiciones climáticas y de la disponibilidad de nutrientes. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar en plantas que se encuentran bajo diferentes disponibilidades de nitrógeno, el efecto de la roya sobre el crecimiento, cómo es afectado el aparato fotosintético y la abscisión foliar. Se utilizaron dos clones de *Populus deltoides* ('Onda' ex I 72/51 y 'Australiano 106-60') que poseen diferente susceptibilidad a la roya, además de diferente arquitectura. Se compararon plantas con y sin roya, y dos disponibilidades de nitrógeno (N). Se determinó el grado de infección periódicamente junto con el nivel de pérdida de hojas. Se realizaron mediciones de fotosíntesis neta (PN), respiración (R), conductancia estomática (gs) e hidráulica (Khoja), contenido de clorofilas, rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (Fv/Fm) y de la tasa de transporte de electrones (ETR). Al finalizar la temporada de crecimiento se determinó altura, diámetro a la altura del cuello (DAC) y materia seca. La disponibilidad de N sólo tuvo efecto sobre la cantidad de hojas y el grado de infección del clon 'Onda'. La roya produce caída de hojas anticipada en ambos clones, siendo más marcada en el clon 'Onda'. Las plantas del clon 'Australiano 106-60' presentaron valores más bajos de infección y de abscisión foliar. La PN, gs, Khoja y ETR de las hojas enfermas fue menor para ambos clones con respecto a hojas sanas, mientras que Fv/Fm sólo disminuyó en el clon 'Onda'. R aumentó sólo en las plantas enfermas del clon 'Onda. El contenido de clorofilas no se modificó. No hubo cambios en altura y DAC al comparar plantas sanas y enfermas, ni debido a la disponibilidad de N, excepto que las plantas sanas del clon 'Australiano 106-60' fertilizadas crecieron más en materia seca y altura que el resto de los tratamientos. La magnitud en la reducción de la capacidad fotosintética junto con la pérdida prematura de las hojas explican en parte la merma en la producción de materia seca, pero estas variables son más afectadas en el clon con menor reducción del crecimiento por la enfermedad. Por lo tanto, otros procesos relacionados con la retranslocación y reserva de nutrientes deben ser tenidos en cuenta.

Palabras claves: *Populus deltoides*, *Melampsora medusae*, fertilización, fotosíntesis, enfermedad foliar.

Introducción

Las royas se encuentran entre los organismos fitopatógenos más destructivos. Es considerada la enfermedad más importante de *Populus deltoides* Bartr. y otros álamos alrededor del mundo (Tabor *et. al.* 2000). En el Delta del Río Paraná se han reportado dos grandes epifitias en las décadas de 1920 y 1940. Posteriormente, la enfermedad comenzó a manifestarse sólo al final del período de crecimiento. Sin embargo, a partir de 1994 los ataques, causados por *Melampsora medusae* Thüm. comenzaron a anticiparse y volverse cada vez más intensos (Cortizo 2005).

La roya provoca en estaqueros y plantaciones comerciales defoliaciones durante el verano, aumento de la susceptibilidad a daños producidos por bajas temperaturas durante el invierno, retraso en la brotación del año siguiente, mayor susceptibilidad a condiciones de estrés ambiental y al ataque de otros parásitos, reducción del crecimiento y pérdida de calidad de la madera producida (Steenackers *et. al.* 1996, Tabor *et. al.* 2000, Boyle *et. al.* 2005, May-De Mio *et. al.* 2006, Benetka *et. al.* 2007).

La reducción del crecimiento se debe a cambios fisiológicos que ocurren en las hojas, una vez que la infección comenzó. Hay una disminución en la expresión de los genes relacionados con proteínas del aparato fotosintético y un aumento de aquellos relacionados con la producción de defensas (Miranda *et. al.* 2007 y Major *et. al.* 2010). Esto se traduce en una disminución de la fotosíntesis y un aumento de la respiración. Además, el hongo se torna un fuerte destino de nutrientes (Robert *et al.* 2002).

Posteriormente a la merma en la tasa fotosintética de las hojas enfermas, y si el grado de infección es elevado, se produce la abscisión de las hojas. El nivel de defoliación varía entre clones según el grado de susceptibilidad a la roya (Cortizo 2005), con diferencias clonales en la cantidad de roya (pústulas) que prospera como así también en el nivel de roya que produce la abscisión de las hojas enfermas. La defoliación afecta por dos vías distintas el crecimiento: por un lado, la menor área foliar disminuye la interceptación de luz y por ende la capacidad fotosintética; por otro lado, la senescencia (y abscisión) de las hojas se puede producir con niveles más elevados de nutrientes que son retenidos por la biomasa fúngica, tal como se observó en trigo (van den Berg *et. al.* 2007), disminuyendo la retranslocación de nutrientes hacia tejidos en crecimiento o tejidos de reserva (Silla & Escudero 2003).

El grado de infección es fuertemente dependiente, además de las condiciones meteorológicas (Robert *et. al.* 2002, Dowkiw *et. al.* 2003, Das *et. al.* 2007), de la disponibilidad de nutrientes. La infección por roya es mayor cuando las plantas de sauces crecen con mayor disponibilidad de nutrientes (Toome *et. al.* 2009). Sin embargo, cuando plantas de abeto fueron fertilizadas con nitrógeno no fue significativo el aumento en el grado de infección por *Phaeocryptopus gaeumanni* (Mulvey *et. al.* 2013). No se sabe si la fertilización afecta el grado de infección por roya en clones de *Populus deltoides*.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar en plantas que se encuentran bajo diferentes disponibilidades de nitrógeno, el efecto de la roya sobre el crecimiento, el aparato fotosintético y la abscisión foliar.

Materiales y Métodos

Como modelo de estudio se utilizaron dos clones de *Populus deltoides* que poseen susceptibilidad diferencial al ataque de roya y, además, presentan una arquitectura diferente (tamaño de hojas y ramificación). Uno fue el clon 'Onda' ex I 72/51, de alta susceptibilidad, poco ramificado y con hojas de gran tamaño, y el otro el 'Australiano 106-60', de baja susceptibilidad, más ramificado y con hojas de menor tamaño.

El ensayo se llevó a cabo en la temporada 2012-2013 en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina). Las estacas se colocaron en macetas de 40 litros rellenas de un sustrato de tierra y arena (1:10 v/v). Se compararon plantas libres de roya y con roya en sustratos con dos disponibilidades de nitrógeno. El ensayo consistió en 8 tratamientos que derivan de la combinación de 3 factores: clon (Onda o Australiano 106-60), roya (con roya (R+) o sin roya (R-

Eliminado :

) y disponibilidad de nitrógeno (fertilizadas (N+) o no fertilizadas (-N)). Cada tratamiento tenía 5 repeticiones, distribuidas completamente al azar.

Las plantas libres de roya se fumigaron quincenalmente con tebuconazole (Folicur) (258 mg pa/litro de agua hasta punto de goteo) desde la brotación hasta la abscisión otoñal. Las plantas con roya se infectaron de forma natural a partir de los primeros días de febrero. En cuanto a la disponibilidad de N, se consideró alta disponibilidad al agregado de 10 g de urea por planta (5 g agregados el 26 de octubre y 5 g agregados el 21 de diciembre de 2012) y baja disponibilidad al no agregado de urea.

Para conocer si la disponibilidad de N afecta la incidencia de roya o modifica la defoliación anticipada, se midió el número de hojas presentes en cada planta, semanalmente a partir del mes de abril. En cada fecha de medición se estimó el grado de presencia de la enfermedad registrando la incidencia (número de hojas afectadas) y severidad (área afectada en cada hoja con una escala de 0, 5, 25, 50, 75 a 100%). Se calculó un índice (incidencia x severidad), promediando la severidad de todas las hojas de cada planta.

Se realizaron mediciones de fotosíntesis neta (PN), respiración (R), conductancia estomática (gs), contenido de clorofilas en hojas que presentaban elevado nivel de ataque (pústulas) para cada clon. Las mediciones de PN y R se realizaron en hojas totalmente expandidas con un IRGA Ciras2 (a $1500 \mu\text{m} \text{ fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25 °C en la cámara) entre las 11 hs y las 16 hs, período en el cual las hojas se encuentran fotosintéticamente inducidas. Sobre esas mismas hojas se midió la conductancia estomática (gs) al mediodía con un porómetro (SC-1, Decagon) y la conductancia hidráulica (Khoja) con un conductímetro de resistencias conocidas. Para conocer la integridad del aparato fotosintético se midió la concentración de clorofilas y el transporte de electrones a nivel del fotosistema 2. El contenido de clorofilas total se midió con el medidor de clorofilas Spad-502 (Minolta) y también se midió clorofila a y b por extracción con dimetilformamida (Inskeep y Bloom, 1985). Se midió la tasa de transporte fotosintético de electrones (ETR) y, luego de aclimatar en oscuridad las hojas durante 30 minutos, la eficiencia cuántica potencial del fotosistema 2 (Fv/Fm) con un fluorímetro (FMS2, Hansatech Ltd.).

Una vez terminada la temporada de crecimiento se realizaron mediciones de materia seca aérea y subterránea, altura de la plata y diámetro a la altura del cuello (DAC).

Las comparaciones se hicieron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias fueron analizadas con el test de Duncan.

Resultados y discusión:

El número de hojas por planta al 15 de abril fue un 30% menor en las plantas enfermas en relación a las sanas para el clon 'Australiano 106-60', disminuyendo progresivamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, en las plantas sanas el número de hojas se mantuvo constante hasta el 20 de mayo, momento en el que se produce la defoliación otoñal natural. La disponibilidad de N no produjo diferencias significativas en el número de hojas en este clon (figura 1-b). En el clon 'Onda' la disponibilidad de N afectó la cantidad de hojas. Las plantas de este clon, sanas y fertilizadas, tienen números de hojas similares a los tratamientos del clon 'Australiano 106-60' sanas. Sin embargo, las plantas del clon 'Onda' no fertilizadas (-N) tienen un 60% menos de hojas y la defoliación natural se adelanta una semana. Las plantas con roya al 15 de abril tienen también un 60% menos de hojas que las plantas sanas, pero la caída de hojas se produce abruptamente en las siguientes dos semanas en las plantas no fertilizadas, mientras que la defoliación es más gradual en las plantas fertilizadas (figura 1-a).

El grado de infección para el clon 'Australiano 106-60', no se modificó por la disponibilidad de N, alcanzando valores cercanos al 25% de hojas infectadas (figura 1-d). En cambio, en el clon 'Onda', el grado de infección fue mayor en las plantas con baja disponibilidad de N, afectando el 75-80% de área foliar al comienzo de las mediciones, con respecto a las plantas con alto contenido de N (50%) (figura 1-c). Las plantas R(-) de ambos clones se mantuvieron libres de roya durante todo el ensayo.

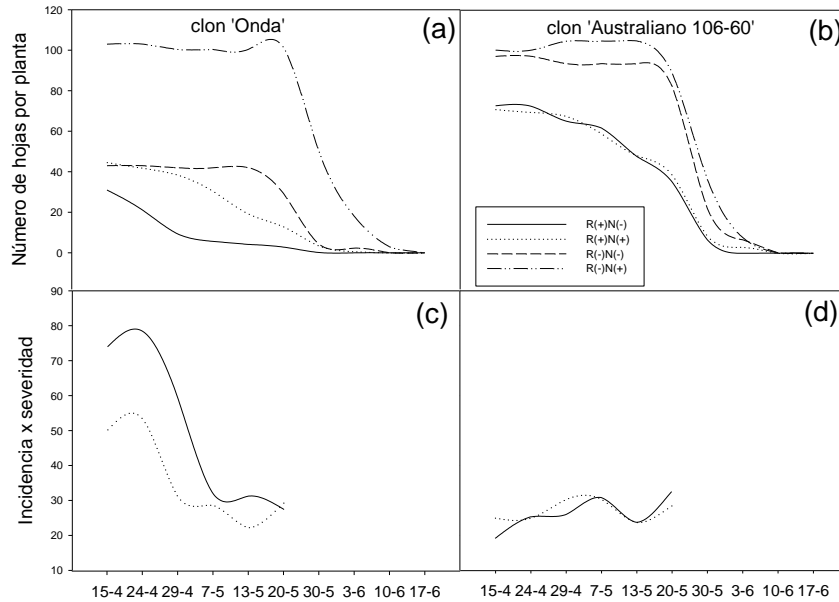


Figura 1: Evolución de la defoliación para los clones 'Onda' (a) y 'Australiano 106-60' (b). Grado de infección para los clones 'Onda' (c) y 'Australiano 106-60' (d).

La disminución en la tasa fotosintética en hojas enfermas puede deberse al daño en el aparato fotosintético que disminuye la fotosíntesis bruta (PN + R) y/o a un aumento en la liberación de CO₂ por la respiración. La fertilización con N no modificó PN ni R. La PN disminuyó significativamente al comparar las hojas sanas con las enfermas, siendo esta disminución mayor en el clon 'Onda'. La R aumentó significativamente sólo en el clon 'Onda' cuando las plantas se encontraban enfermas; en cambio, en el clon 'Australiano 106-60' no hubo diferencias entre plantas sanas y enfermas (Figura 2). En los dos clones, la disminución de la PN está reflejando una disminución de la fotosíntesis bruta, porque el aumento en R es moderado con respecto a la caída de PN. El aumento observado en la respiración en el clon 'Onda' puede deberse a la respiración de la planta y/o a la del hongo.

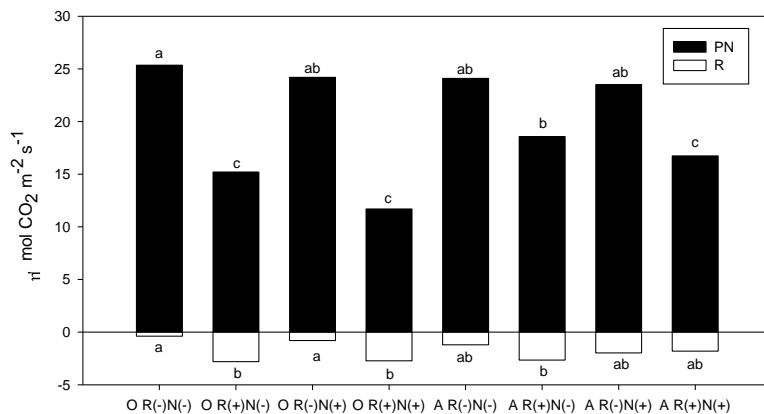


Figura 2: Fotosíntesis neta (PN) y respiración (R) para los clones 'Onda' (O) y 'Australiano 106-60' (A).

R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el test de Duncan.

No sólo el intercambio de CO₂ fue afectado por la presencia de la enfermedad. También fue significativa la disminución de la transpiración, evidenciada por la menor gs en las plantas enfermas, independientemente del clon y de la disponibilidad de N (figura 3). También fue significativa la disminución de Khoja en las plantas enfermas (figura 4). Esto refleja que se produjo cierre estomático parcial o mayor resistencia a la salida de agua desde los estomas por daños en la estructura del mesófilo (Gortari et. al. 2012).

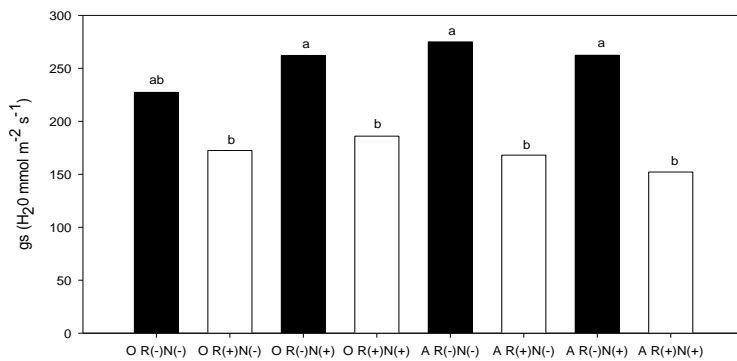


Figura 3: Conductancia estomática (gs) para los clones 'Onda' (O) y 'Australiano 106-60' (A). R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el test de Duncan.

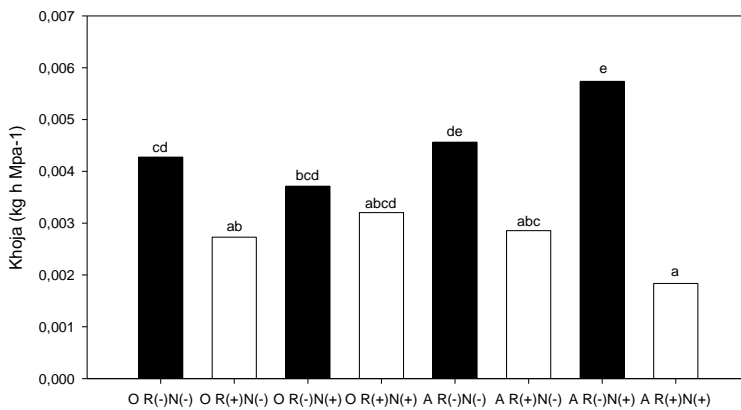


Figura 4: Conductancia hidráulica de la hoja (Khoja) para los clones 'Onda' (O) y 'Australiano 106-60' (A). R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el test de Duncan.

No hubo diferencias significativas en el contenido de clorofila total medido con Spad entre plantas sanas y enfermas. Sin embargo, al comparar los clones, el clon 'Australiano 106-60' presenta contenidos menores al clon 'Onda'. Según el método de la dimetilformamida, las únicas diferencias significativas están en el contenido de clorofilas b entre plantas con baja y alta disponibilidad de N, pero no hay diferencias, entre plantas sanas y enfermas (datos no presentados). Esto indica que la reducción en PN posiblemente no se debe a daños severos en

el aparato fotosintético, sino principalmente a menor capacidad de intercambio gaseoso y mayor respiración.

Sin embargo, se encontraron diferencias en la tasa de transporte de electrones del fotosistema 2. ETR disminuyó significativamente en plantas enfermas para ambos clones independientemente de la disponibilidad de N. En cambio, Fv/Fm sólo disminuyó en las plantas enfermas del clon 'Onda' (figura 5). Estos resultados indican que la disminución de ETR en el clon 'Australiano 106-60' posiblemente no se debe a daños estructurales, sino que es una inhibición reversible. Sin embargo, en el clon 'Onda' la enfermedad produce un daño en el aparato fotosintético, que probablemente involucra alteraciones estructurales del fotosistema II. Posiblemente en este clon la enfermedad desencadena la senescencia foliar.

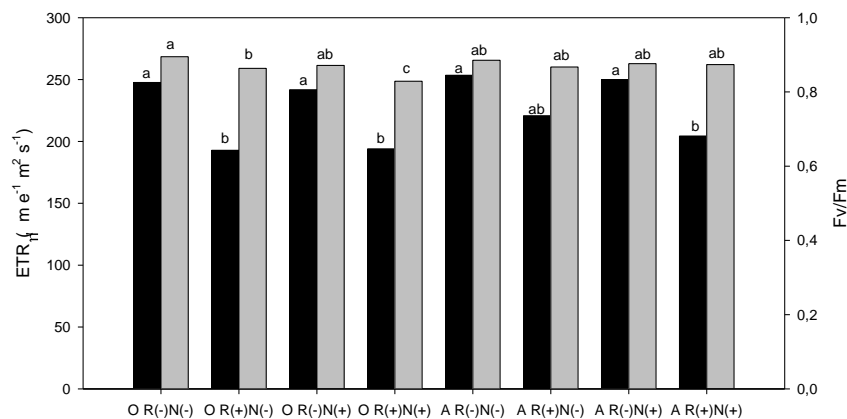


Figura 5: ETR (barras negras) y Fv/Fm (barras grises) para los clones 'Onda' (O) y 'Australiano 106-60' (A). R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el método de Duncan.

Es importante resaltar que la reducción en la acumulación de materia seca siguió el mismo patrón que la altura de la planta. La fertilización con N aumentó el crecimiento de las plantas sanas del clon 'Australiano 106-60', tanto en materia seca (figura 6) como en altura (figura 7), mientras que aumentó el DAC de plantas sanas del clon 'Onda' (figura 7). Las plantas enfermas de ambos clones tuvieron crecimiento similar, con o sin fertilización, en materia seca, altura y DAC. Se observó una disminución en la producción de materia seca en plantas fertilizadas del clon 'Australiano 106-60' debido a la presencia de la roya. Sin embargo, en el caso del clon 'Onda' y del clon 'Australiano 106-60' cuando las plantas se encontraban con baja disponibilidad de N, no hubo diferencias en el crecimiento entre las plantas sanas y enfermas (figura 6). La defoliación y la reducción de la capacidad fotosintética fueron siempre menos marcadas en el clon 'Australiano 106-60' que en el clon 'Onda', lo que sugiere que otros procesos son modificados por la presencia de la enfermedad, y que impactan negativamente en el crecimiento de las plantas, como por ejemplo la retranslocación de nutrientes desde las hojas o la acumulación de nutrientes en los tejidos de reserva.

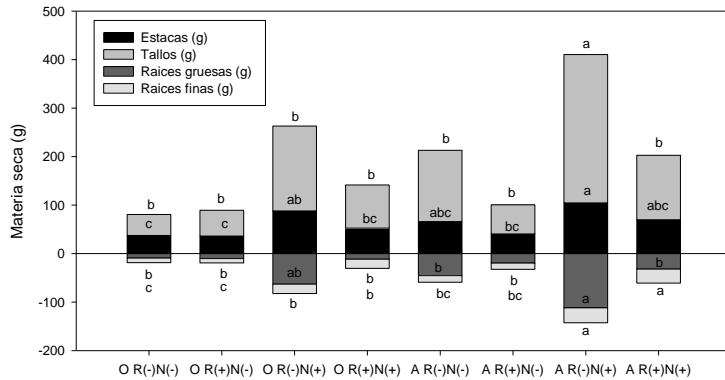


Figura 6: Materia seca acumulada en cada compartimento en plantas de los clones 'Onda' (O) y 'Australiano 106-60' (A). R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el método de Duncan.

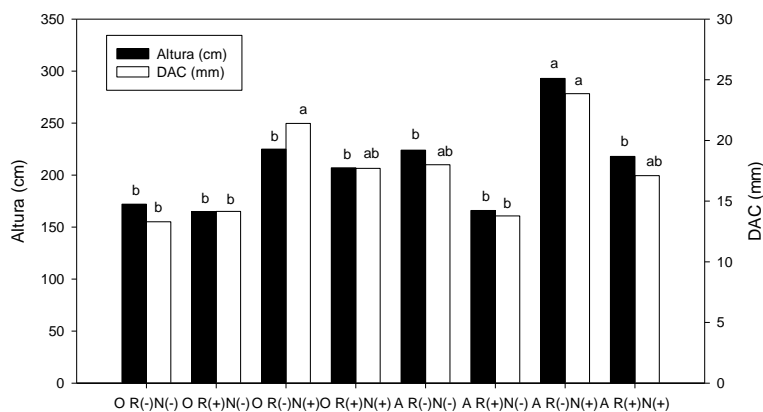


Figura 7: Altura y diámetro a la altura del cuello (DAC) para los clones Onda (O) y Australiano 106-60 (A). R(-): sin roya; R(+): con roya; N(-): baja disponibilidad de N; N(+): alta disponibilidad de N. Letras diferentes denotan diferencias significativas por el método de Duncan.

Conclusiones:

La disponibilidad de nitrógeno afectó la cantidad de hojas y el grado de infección para el clon 'Onda'. Este último en sentido contrario al esperado, es decir, disminuyó con el aumento de la disponibilidad de N. Sin embargo, no modificó la capacidad fotosintética (fotosíntesis neta, respiración ETR, Fv/Fm, concentración de clorofila), la transpiración o la conductancia de la hoja.

La presencia de roya produjo una defoliación anticipada como así también redujo la tasa fotosintética y la integridad del aparato fotosintético en general. Esta reducción fue mayor en el clon 'Onda' que en el 'Australiano 106-60'.

Si bien el daño que produjo la enfermedad en parámetros como materia seca y altura sólo fue significativo para el clon 'Australiano 106-60' fertilizado con N, en todos los casos hubo una disminución en el crecimiento cuando las plantas estaban enfermas. El clon más afectado en crecimiento fue el que presentó menor daño a nivel de hoja.

Estos resultados indicarían que la disminución en la producción de materia seca no sólo depende de la capacidad fotosintética de la planta, sino que hay otros procesos que deben ser

tenidos en cuenta y que explicarían parte de esta disminución. Posiblemente procesos relacionados con la retranslocación de nutrientes durante la senescencia foliar y la concentración de nutrientes en los tejidos de reserva podrían explicar parte de la reducción en el crecimiento.

Agradecimientos:

Este proyecto se financia con el PIA 12028 del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Fermín Gortari es becario del CONICET CCT La Plata, Silvia Cortizo es investigadora del INTA EEA Delta y docente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Juan J. Guiamet es investigador de la CIC PBA, Corina Graciano es investigadora del CONICET CCT La Plata y docente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Bibliografía:

- Benetka V, Vratny F y Salkova I. 2007. Comparison of the productivity of *Populus nigra* L. with an interspecific hybrid in a short rotation coppice in marginal areas. *Biomass and Bioenergy* 31, 367-374.
- Boyle B, Hamelin R C y Séguin A. 2005. In vivo monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1546-1552.
- Cortizo S. 2005. Roya del álamo en el Delta del Paraná. *IDIA XXI Forestales V*, 139-142.
- Das M K, Griffey C A, Baldwin R E, Waldenmaier C M, Vaughn M E, Price A M y Brooks W S. 2007. Host resistance and fungicide control of leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley (*Hordeum vulgare*) and effects on grain yield and yield components. *Crop Protection* 26, 1422-1430.
- Dowkiw A, Husson C, Frey P, Pinon J y Bastien C. 2003. Partial Resistance to *Melampsora larici-populina* Leaf Rust in Hybrid Poplars: Genetic Variability in Inoculated Excised Leaf Disk Bioassay and Relationship with Complete Resistance. *Phytopathology* 93, 421-427.
- Gortari F, Graciano C y Guiamet JJ. 2012. Cambios hidráulicos en hojas de álamo debido a la infección por roya. *XXV Reunión Argentina de ecología*.
- Inskip, WP, PR Bloom. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- Major I T, Nicole M, Duplessis S y Seguin A. 2010. Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynth. Res.* 104, 41-48.
- May-De Mio L L, Amorim L y Moreira L M. 2006. Progreso de Epidemias e Avaliação de Danos da Ferrugem em Clones de Álamo. *Fitopatologia Brasileira* 31, 133-139.
- Miranda, M., et al. 2007. The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoids*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 816-831.
- Mulvey, RL, D.C. Shaw, and D.A. Maguire. 2010. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western Oregon. *Forest Ecology and Management*. 287(0), 147-158
- Robert C, Bancal M O y Lannou C. 2002. Wheat Leaf Rust Uredospore Production and Carbon and Nitrogen Export in Relation to Lesion Size and Density. *Phytopathology* 92, 762-768.
- Silla F y Escudero A. 2003. Uptake, demand and internal cycling of nitrogen in saplings of Mediterranean *Quercus* species. *Oecologia* 136, 28-36.
- Steenackers J, Steenackers M, Steenackers V y Stevens M. 1996. Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass and Bioenergy* 10, 267-274.
- Tabor G M, Kubisiak T L, Klopfenstein N B, Hall R B y McNabb H S M. 2000. Bulk Segregant Analysis Identifies Molecular Markers Linked to *Melampsora medusae* Resistance in *Populus deltoides*. *Phytopathology* 90, 1039-1042.
- Toome, M., et al. 2009. *Rust severity in bioenergy willow plantations treated with additional nutrients*. *Forest Pathology*, 2009. 39(1),28-34.
- van den Berg F, Robert C, Shaw M W y van den Bosch F. 2007. Apical leaf necrosis and leaf nitrogen dynamics in diseased leaves: a model study. *Plant Pathology* 56, 424-436.