

El efecto del nitrógeno en las enfermedades de las plantas

Estudios realizados en la Facultad indican que un aumento en la fertilización nitrogenada disminuye la susceptibilidad al ataque de *B. cinerea* en hojas y frutos de tomate. Además, los resultados proporcionan las primeras evidencias sobre los posibles mecanismos biológicos y genéticos involucrados entre la respuesta de defensa y el estado de nutricional en plantas de tomate, como metabolismo secundario y respuesta a hormonas.

El nitrógeno es un macronutriente esencial para los organismos vegetales y su disponibilidad afecta el crecimiento y el desarrollo vegetal. En ambientes naturales y agrícolas, este nutriente se encuentra en bajas cantidades. Por estos motivos, la producción de cultivos vegetales con altos rendimientos está asociada a la incorporación de grandes concentraciones de fertilizantes nitrogenados al suelo. Sin embargo, los cultivos solo

son capaces de utilizar entre el 40-50% del nitrógeno aplicado, causando efectos negativos en el medio ambiente. El nitrógeno restante no utilizado por las plantas se pierde por diferentes mecanismos contaminando suelos y fuentes de agua.

La relevancia fisiológica del nitrógeno para las plantas está claramente ejemplificada por sus efectos sobre el crecimiento de las hojas, la senescencia, la arquitectura del sistema radicular y el tiempo de floración, entre otros aspectos. Además de su efecto en el crecimiento vegetal y procesos de desarrollo de las plantas, el estado nutricional de la planta es un factor importante en la resistencia o susceptibilidad de diversos cultivos a ciertos patógenos. Diferentes estudios han demostrado que la disponibilidad de nitrógeno en la planta afecta el resultado final de la interacción planta-patógeno. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que explican esta interacción son poco conocidos y dependen de la especie vegetal y del patógeno en estudio. Por estos motivos, es difícil deducir reglas generales para el papel del nitrógeno y su efecto en la interacción de plantas y patógenos.

La respuesta de defensa de la planta involucra numerosos cambios a nivel bioquímico, fisiológico y de componentes moleculares. Para resistir a los diferentes patógenos, las

plantas han desarrollado complejos métodos de defensa para reconocer al organismo que las ataca y activar variadas estrategias de defensa, tanto en el sitio de la infección como en otros tejidos distantes mediante vías sistémicas. Con ello, la planta se prepara para futuros ataques de otros patógenos.

La respuesta de defensa en plantas es un mecanismo activo que consume energía. Por ello, se espera que el estado nutricional de la planta tenga un papel fundamental en el resultado de la interacción planta-patógeno. En consecuencia, es lógico pensar que plantas bajo una condición de estrés nutricional son más susceptibles a enfermedades. Sin embargo, varios reportes agronómicos indican que una alta disponibilidad de nitrógeno no necesariamente potencia la defensa de las plantas, sino que por el contrario, aumenta la incidencia de enfermedades en diversos cultivos. Por ejemplo, los síntomas causados por la bacteria *Pseudomonas syringae* y el hongo *Oidium lycopersicum* se incrementan en plantas de tomate con alta fertilización nitrogenada. Por el contrario, otros estudios agronómicos muestran que una reducción en la fertilización nitrogenada agrava ciertas enfermedades causadas por hongos en el cultivo de arroz y trigo.

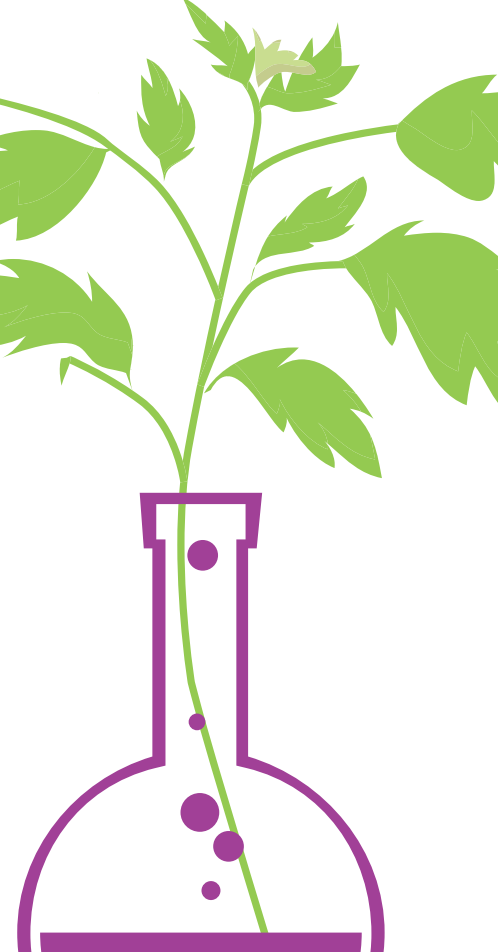


Tabla 1. Crecimiento de plantas de tomate en condiciones contrastantes de nitrógeno

	Concentración de Nitrato			
	2mM	4mM	6mM	12mM
Biomasa (g/peso fresco planta)	0,65±0,13 a	1,02±0,16 b	1,49±0,22 c	1,56±0,27 c
% Nitrógeno	1,82±0,06 a	2,29±0,06 b	3,09±0,32 c	3,21±0,11 c

* Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se cree que altos contenidos de nitrógeno generan mayor resistencia a patógenos facultativos o necrotrofos en tejidos vegetales, pero provocan más susceptibilidad a patógenos obligados o biotrofos. Esta diferencia en la respuesta se podría explicar por especificidades en requerimientos nutricionales de ambos tipos. Los patógenos biotrofos se nutren de asimilados suministrados por las células vivas mientras que los necrotrofos prefieren los tejidos senescentes o producen toxinas que dañan y matan las células vivas. Sin embargo, en la literatura científica existen varios reportes contradictorios que ejemplifican que la relación entre la nutrición mineral nitrogenada y las enfermedades de las plantas es compleja.

Frente al escenario expuesto, cabe preguntarse: ¿cómo los elementos minerales en la planta están relacionados con los mecanismos de defensa en esta? Lamentablemente, y pese al esfuerzo de un número importante de investigaciones realizadas en Chile como en el mundo, no tenemos todavía una respuesta clara. Varios estudios en especies vegetales usadas como modelo de análisis demuestran que varias proteínas involucradas en el metabolismo de nitrógeno están reguladas de manera diferencial durante el ataque de patógenos vegetales. Adicionalmente, se ha descrito que proteínas vegetales asociadas a la resistencia a patógenos se inducen (se estimula su producción) en plantas con baja fertilización nitrogenada. El panorama es aún más complejo si pensamos que el metabolismo del nitrógeno influye en el metabolismo secundario de la célula, el que permite generar otros metabolitos que las plantas utilizan para defenderse de los patógenos vegetales.

En el caso del hongo *Botrytis cinerea*, considerado a nivel mundial como el segundo en términos de su importancia económica y científica, la influencia del estado nutricional de nitrógeno puede ser favorable o desfavorable a la infección y el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, una fertilización alta en nitrógeno aumenta los síntomas de la infección por este hongo en cultivos de leguminosas, lechugas y frutillas. Por el contrario, en el cultivo de tomate, disminuye la susceptibilidad a este hongo con el aumento de las concentraciones de nitrógeno. En resumen, el crecimiento y la

respuesta de defensa de la planta presentan una interconexión muy compleja. Por estos motivos, es importante estudiar la relación entre el metabolismo de nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta: solo recientemente se ha sugerido que esta interconexión puede proporcionar nuevas estrategias para potenciar la respuesta de defensa en plantas.

Para entender procesos biológicos complejos (como el descrito anteriormente), los cuales se ven afectados por más de una variable, es necesario combinar varias estrategias experimentales que nos permitan comprender el proceso desde las distintas aristas involucradas: agronómicas, genéticas, fisiológicas, estudios del genoma, entre otras. Con esta nueva información combinada podemos entender el proceso de manera global y conocer los mecanismos de interacción y regulación, algo primordial para el desarrollo de nuevas estrategias de control, en el caso de las enfermedades de las plantas.

Nuestros estudios experimentales

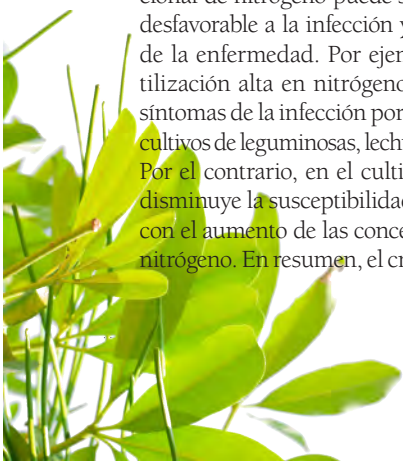
En nuestro laboratorio en la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC, estamos estudiando la conexión que existe entre la fertilización nitrogenada y la respuesta de defensa de la planta a la infección por patógenos. Para ello, nos encontramos analizando cómo el nitrógeno altera los mecanismos de defensa de la especie vegetal *Solanum lycopersicum* (tomate) frente a infecciones por *Botrytis cinerea*. Para realizar estos estudios, se crecen plantas de tomate en macetas con un sustrato de crecimiento inerte, sin fuentes de nitrógeno, las que son irrigadas con una solución de nutrientes minerales con diferentes concentraciones de nitrógeno (2, 4, 6 ó 12 mM concentración final).

Como se ha reportado en otros estudios agronómicos, la concentración de nitrógeno impacta significativamente el crecimiento de las plantas de tomate (tabla 1). El crecimiento máximo se alcanzó con 6 mM nitrato (condición suficiente) mientras que con 2 y 4 mM nitrato se obtuvieron fenotipos de limitancia graves y leves, respectivamente (condiciones limitantes). La cantidad de biomasa de la planta disminuyó en un 30% y 55% en las condiciones de

limitancia descritas, al compararlas con el crecimiento obtenido en la condición de nitrógeno en concentraciones suficiente (6 mM). Las concentraciones más altas de nitrógeno no condujeron a cambios significativos en el crecimiento (12 mM), lo que demuestra que, alcanzado el crecimiento potencial máximo de una planta, un aumento en la fertilización nitrogenada no tiene efecto en su crecimiento.

Para estudiar cómo la nutrición mineral nitrogenada afecta la susceptibilidad de las plantas de tomate a la infección por el hongo *B. cinerea*, las plantas cultivadas fueron inoculadas con este patógeno. La infección causada por el hongo se desarrolló en todas las plantas, obtenidas bajo distintas concentraciones de nitrógeno, mostrando los síntomas típicos de la infección causada por *B. cinerea* que corresponden a lesiones necróticas. Sin embargo, las plantas crecidas en condiciones de limitancia de nitrógeno (2mM y 4mM nitrato) desarrollaron los síntomas de la enfermedad de manera más rápida. Adicionalmente, estas plantas desarrollaron lesiones de mayor tamaño y se observó una maceración en los tejidos que rodean los sitios primarios de infección en las hojas (figura 1A), lo que demuestra una mayor susceptibilidad a la infección por este hongo. Por el contrario, las plantas crecidas en suficiencia de nitrógeno (6mM y 12mM nitrato) desarrollaron lesiones necróticas discretas (figura 1A). La severidad de los síntomas fue siempre mayor en las hojas de las plantas cultivadas bajo condiciones de limitación de nitrógeno (figuras 1B).

El hongo *B. cinerea* también puede infectar los frutos de este cultivo. Por estos motivos, se evaluó la respuesta de los frutos de tomate en dos estadios de desarrollo a la infección por este hongo. La figura 2 muestra los síntomas de la enfermedad y el tamaño de la lesión en los frutos en dos etapas de desarrollo conocidos como “verde madura” (MG) y “maduro rojo” (RR) obtenidos de plantas cultivadas en las mismas condiciones de nitrógeno descritas anteriormente. Bajo todas las condiciones de fertilización nitrogenada evaluadas, los tomates en el estadio MG fueron significativamente menos susceptibles a la infección por *B. cinerea* en comparación con los frutos RR, como se había descrito anteriormente en la literatura. Sin embargo, los resultados muestran



que el tamaño de la lesión necrótica aumenta en los frutos MG obtenidos de plantas crecidas en limitancia de nitrógeno. En frutos de tomate en el estadio RR, la descomposición de tejidos y el crecimiento del hongo en el pericarpio fueron evidentes en todas las condiciones experimentales analizadas (figura 2A). Sin embargo, la gravedad de los síntomas, al igual que en el estadio MG (figura 2B), fueron mayores en los frutos de plantas cultivadas bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Nuestros resultados demuestran que la nutrición mineral nitrogenada afecta el desarrollo de la infección por *B. cinerea*, causando mayor susceptibilidad en hojas y frutos en condiciones de limitación de nitrógeno.

Para comprender de mejor manera la interacción entre el status nutricional de la planta y la susceptibilidad de estas a *B. cinerea*, estudiamos los genes que se regulan de manera diferencial (transcriptoma) en plantas sanas e infectadas con el hongo bajo condiciones de limitancia y suficiencia de nitrógeno. Utilizamos la tecnología de micro-matrices de Affymetrix, las que permiten interrogar el genoma completo, analizando los genes que se inducen y reprimen frente a un estímulo, en este caso la infección por *B. cinerea*. Con ello, podemos identificar las principales funciones biológicas de la planta afectadas en conjunto por estas dos variables y tener una noción global de los procesos fisiológicos que serían importantes en esta interacción, al menos desde un punto de vista genético. La figura 3 muestra las funciones biológicas representadas como círculos, donde su tamaño representa el número de genes que cambian asociados a esa función. El color de cada círculo refleja la significancia estadística o importancia dentro de este grupo de genes (desde azul a rojo, menor a mayor significancia estadística respectivamente). Los resultados muestran que procesos que son importantes para la defensa de las plantas, como el metabolismo secundario, el metabolismo de la pared celular y la respuesta a hormonas, se ven afectados de manera significativa por el patógeno, pero dependiendo del estado nutricional de la planta. Por ejemplo, se ha descrito que la acumulación de metabolitos secundarios es un mecanismo de defensa de la planta a varios hongos patógenos, lo que se podría relacionar con la menor susceptibilidad que desarrollan las plantas en condiciones de suficiencia de nitrógeno.

Entonces, ¿cuál es el rol del nitrógeno?


La pregunta planteada de cómo la disponibilidad de nitrógeno puede modular la respuesta de la planta todavía debe ser explorada. Muchos estudios agronómicos indican que la concentración de nitrógeno en la planta influye en su capacidad para responder a diferentes patógenos. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos y genéticos implicados en esta interacción han sido poco caracterizados. Nuestros estudios indican que un aumento en la fertilización nitrogenada disminuye la susceptibilidad al ataque de *B. cinerea* en hojas y frutos de tomate. Además, y de manera importante, nuestros resultados proporcionan las primeras evidencias sobre los posibles mecanismos biológicos y genéticos involucrados entre la respuesta de defensa y el estado de nutricional en plantas de tomate, como metabolismo secundario y respuesta a hormonas. Sin duda, se requiere combinar estudios agronómicos, fisiológicos y genético-moleculares para explorar con mayor detalle el papel del estado nutricional de la planta en las interacciones planta-patógeno, así como su impacto en la defensa de las plantas y la virulencia de patógenos. 

Figura 3. Funciones biológicas identificadas en tomate afectadas en respuesta a la infección por *B. cinerea* dependiente del estado nutricional de la planta. La figura muestra las funciones biológicas sobrerrepresentadas en color rojo, visualizadas mediante la herramienta computacional Revigo. El tamaño de los círculos en la figura es proporcional al número de genes involucrados en cada función biológica.

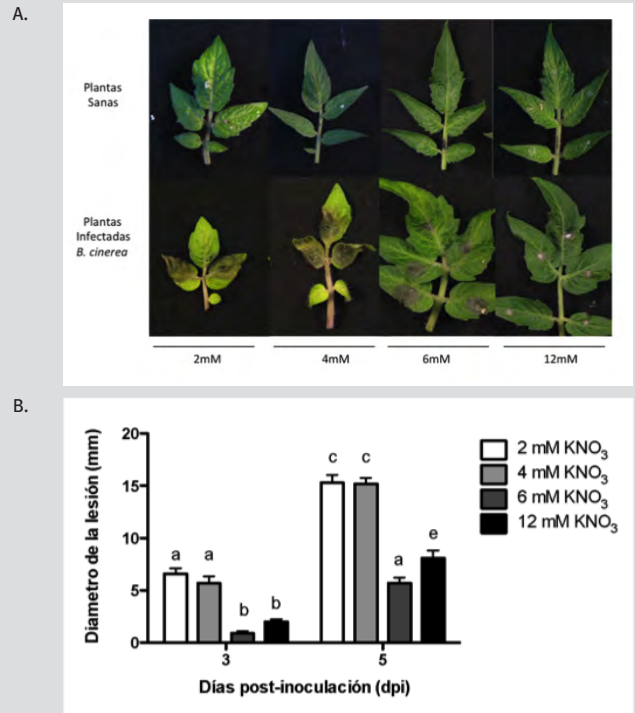
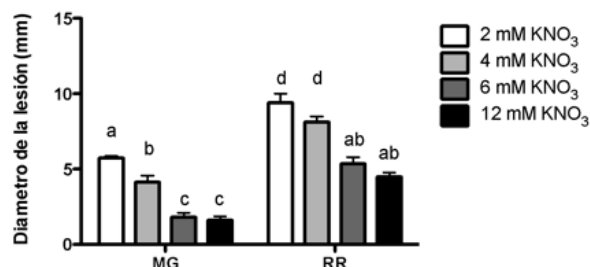


Figura 2. Susceptibilidad a *Botrytis cinerea* en plantas de tomate cultivadas bajo diferentes concentraciones de nitrato. A, Fotos representativas de hojas infectadas por el hongo en cada concentración de nitrato utilizada (3 dpi). B, Tamaño de la lesión. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

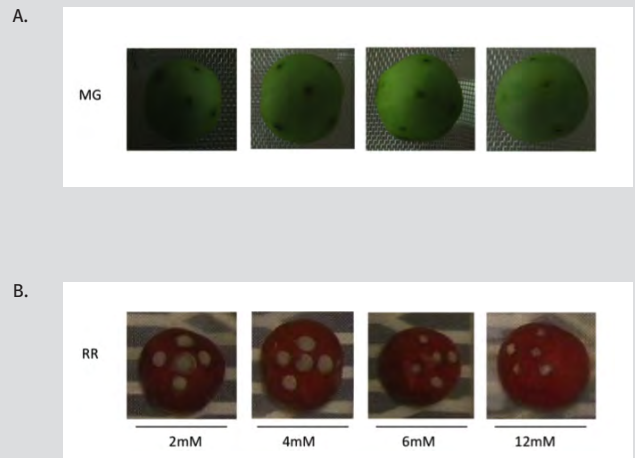


Figura 2. Susceptibilidad a frutos de tomate a *Botrytis cinerea* obtenidos a partir de plantas cultivadas bajo diferentes concentraciones de nitrato. A, Fotos representativas de la infección de frutos de tomate en dos estados de desarrollo (MG y RR) para cada concentración de nitrato. B, Tamaño de la lesión (diámetro) para frutos inoculados con *B. cinerea*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

