



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Variabilidad patogénica, diversidad genética y estructura poblacional de *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada

María Paula Silva Villella

Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Biotecnología

Orientador: Ing. Agr. (PhD) Clara Pritsch
Co-orientador: Ing. Agr. Msc. Fernanda Gamba
Laboratorio de Biotecnología
Departamento de Biología Vegetal
Facultad de Agronomía
Universidad de la Republica

Montevideo
Uruguay
2011



Agradecimientos

Al Dr. Andrej Tekauz (Agriculture-Agri-Food Canada, Winnipeg Research Station, Manitoba, Canadá) por proveer el aislamiento WRS 1903.

A mi orientadora Ing. Agr. (PhD) Clara Ptitsch, por haberme guiado durante este tiempo.

A la Ing. Agr. Fernanda Gamba y a la Ing. Agr. Mónica Ziminov, por sus valiosos aportes y su demostración de cariño.

A todos los chicos y chicas que pasaron por el Laboratorio de Biotecnología y Genética de la Facultad de Agronomía, por haber compartido tan buenos momentos.

A todas mis amigas y amigos que estuvieron a lo largo de este ciclo dando palabras de aliento.

A mi familia, mi madre Ana, mi hermana Sabrina y mis hermanos Rodrigo y Matero, por ser la mejor familia que me haya podido tocar en el mundo.

Por último y en especial, a mi padre Carlos Silva, quien día a día me ilumina desde el cielo.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. La biotecnología y la genética de poblaciones de fitopatógenos: una asociación clave para el desarrollo de resistencias durables.....	1
1.2. La mancha borrosa de la cebada en Uruguay y esfuerzos locales para el desarrollo de resistencia genética	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. General	5
2.2. Específicos.....	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Importancia a nivel internacional.....	7
3.2. Importancia a nivel nacional	8
3.3. Condiciones predisponentes	8
3.4. Etiología de la enfermedad.....	9
3.5. Ciclo biológico de <i>C. sativus</i>	11
3.6. Rango de hospederos	12
3.7. Sintomatología	13
3.8. Biología del proceso de infección	15
4. CAPÍTULO I	17
4.1. Especialización fisiológica del patógeno.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Aislamientos de <i>C. sativus</i> y condiciones de cultivo.....	21
5.2. Genotipos diferenciales de cebada	22
5.3. Preparación de las plantas.....	23
5.4. Preparación del inóculo	23
5.5. Inoculación y evaluación de la enfermedad.....	24
5.6. Designación del grupo de virulencia.....	24
5.7. Ordenamiento de las relaciones genéticas	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Designación del grupo de virulencia.....	26
6.2. Análisis de agrupamiento basado en distancias.....	30
7. DISCUSIÓN	31
8. CAPÍTULO II	36
8.1. Estructura de la población y diversidad genética utilizando marcadores moleculares.....	36
9. MATERIALES Y MÉTODOS	38

9.1. Colección de aislamientos de <i>C. sativus</i>	38
9.2. Condiciones de cultivo	38
9.3. Extracción de ADN geonómico	40
9.4. Amplificación de marcadores RAPD	41
9.5. Selección de iniciadores	41
9.6. Caracterización de los patrones de bandas	42
9.7. Descripción de la informatividad de cada iniciador	42
9.8. Descripción de la diversidad genética	43
9.9. Análisis de agrupamiento basado en distancias	47
9.10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	48
10. RESULTADOS	52
10.1. Nivel de polimorfismo molecular e informatividad de los iniciadores RAPD	52
10.2. Diversidad genética	54
10.3. Análisis de agrupamiento basado en distancias	55
10.5. Estructura poblacional	65
11. DISCUSIÓN	66
12. CONCLUSIONES	79
13. BIBLIOGRAFÍA	80
14. ANEXOS	90

Lista de Tablas

Tabla.1. Especies monocotiledóneas hospederas de *C. sativus*

Tabla I.1. Aislamientos monospóricos de *C. sativus* utilizados para la identificación de grupos de virulencia indicando nombre, variedad de cebada muestreada, localidad, región y fecha de colecta

Tabla I.2. Nombre, tipo de espiga, origen y *pedigree* de doce genotipos de cebadas utilizados como diferenciales en la caracterización de variabilidad patogénica de *C. sativus*.

Tabla I.3. Promedios de respuesta a la infección (RI) y desvíos estándar de 12 líneas de cebada diferenciales inoculadas con 12 aislamientos de *C. sativus*, y sus correspondientes grupos de virulencia (GV), designados mediante el uso del código de triple nomenclatura (cuatro cifras)

Tabla I.4. Número y porcentaje de aislamientos de *C. sativus* colectados de diferentes Departamentos del Uruguay, asignados a 10 grupos de virulencia.

Tabla II.1. Nombre, variedad de cebada, región (Departamento) y año de colecta de 45 aislamientos monospóricos de *C. sativus* de Uruguay. Se incluye además un aislamiento monospórico de *C. sativus* de origen canadiense (WRS 1903) y un aislamiento local de *Pyrenophora teres* f.sp. *teres* (0601).

Tabla II.2. Esquemas de Análisis de Varianza Molecular AMOVA.

Tabla II.3. Secuencia del iniciador, bandas amplificadas, número de bandas polimórficas, % de polimorfismo (número de bandas polimórficas/bandas totales), rango de tamaño de bandas, contenido de información polimórfica por iniciador ($PIC_{\text{iniciador}}$) y rango de los valores PIC_{marcador} por iniciador obtenido para cada uno de los veinte iniciadores selectos para el análisis genético de 45 genotipos de *C. sativus*.

Tabla II.4. Parámetros de diversidad de 45 aislamientos de *C. sativus* en base a la región de colecta.

Tabla II.5. Comparación de a pares de Identidad genética imparcial de Nei's (Id) (Nei, 1978) (por encima de la diagonal) y Distancia genética imparcial de Nei's (D) (por debajo de la diagonal) entre las cuatro Regiones.

Tabla II.6. Aislamientos de *C.sativus* (45) agrupados según región o periodo de colecta. Se indican los genotipos y el total de aislamientos que conforman cada grupo.

Tabla II.7. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) calculado para 44 aislamientos de *C. sativus* clasificados en cuatro grupos establecidos a partir de la localidad en la cual fueron colectados. (Para el aislamiento 04.15.2 no se cuenta con información de localidad de colecta).

Tabla II.8. Estimación de diferenciación entre grupos según F_{ST} entre pares de grupos de *C. sativus* (por debajo de la diagonal) y nivel de flujo genético entre grupos según Nm (por encima de la diagonal). Los aislamientos bajo estudio fueron clasificados de acuerdo a la región de colecta descrita en la Tabla II.6. Todos los valores fueron significativos a $p < 0.05$. Se indica la media de F_{ST} para cada grupo, así como el índice F_{ST} específico.

Tabla II.9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) calculado para 45 aislamientos de *C. sativus* clasificados en tres grupos establecidos a partir del año o periodo de años en el cual fueron muestreados.

Tabla II.10. Estimación de diferenciación F_{ST} entre pares de grupos de *C. sativus* (por debajo de la diagonal) y valor de Nm (por encima de la diagonal). Los aislamientos bajo estudio fueron clasificados en tres grupos establecidos a partir del año o período en el cual fueron colectados. Grupo 1: anterior al 2002 (1991-2001), Grupo 2: 2002 y Grupo 3: posterior al 2002 (2003-2007). Todos los valores fueron significativos a $p < 0.05$. Se indica la media de F_{ST} para cada grupo, así como el índice F_{ST} específico.

Lista de Figuras

Figura 1. Enfermedades causadas por *C. sativus*. El patógeno causa mancha borrosa en hojas de trigo y cebada, punta negra en granos, podredumbre de raíz y podredumbre de corona. Tomado de Kumar *et al*, 2002.

Figura 2. Distribución de *C. sativus* en el mundo. Tomado de Kumar *et al*, 2002.

Figura 3 Ciclo Biológico de *C. sativus* en cebada, Fuente: Pereyra, 1996.

Figura 4. Escala de respuesta a la infección por *C. sativus* en hojas de plántulas de cebada. Las RI se definieron en base al tipo (presencia de necrosis y clorosis) y tamaño relativo de las lesiones observadas en la segunda hoja. Las nueve RI fueron clasificadas en tres categorías generales: baja, intermedia y alta compatibilidad hospedero-patógeno. Tomado de Fetch y Steffenson (1999).

Figura 5. Escala de respuesta a la infección por *C. sativus* en planta adulta para la interacción *Hordeum vulgare*-*C. sativus* (R: resistente, MR: moderadamente resistente, MS: moderadamente susceptible y S: susceptible). Tomado de Fetch y Steffenson, (1999).

Figura. 6. Proceso de infección de *C. sativus* en hojas de cebada desde 8-72 hdi (horas después de la inoculación). Tinción de estructuras fúngicas con azul de lactofenol.

Figura I.1. Distribución y región de colecta de los 45 aislamientos de *C. sativus* colectados en cuatro Departamentos del Uruguay: Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú, durante los años 1991-2007.

Figura I.2. Promedio de Respuestas de infección inducidas por 12 aislamientos de *C. sativus* sobre 12 líneas diferenciales de cebada. Las barras representan el desvío estándar.

Figura I.3. Dendrograma de las similitudes en el promedio de respuestas a la infección de mancha borrosa de 12 aislamientos de *C. sativus*, colectados de cebada, sobre 12 líneas diferenciales de cebada, utilizando distancias Euclidianas y método de agrupamiento Ward. El código de triple nomenclatura se muestra sobre la derecha.

Figura II.1. Perfiles de migración de productos de amplificación RAPDs en 46 aislamientos de *C. sativus* (1 al 46), obtenidos con el iniciador OPP1. El carril 47 corresponde al aislamiento 0601 de *P. teres* f.sp. *teres*. MPM: marcador de peso molecular (1kb ladder, Fermentas).

Figura. II.2. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de 45 aislamientos de *C. sativus* colectados en Uruguay en base a 205 productos de amplificación RAPDs. Los dos primeros ejes explican 26.52% de la variación observada.

Figura II.3. Patrón de asociación de los aislamientos colectados en el departamento de Paysandú en el año 2002: EEMAC, San Nicanor, Paysandú (no se tiene más detalle).

Figura II.4. Análisis de conglomerado realizado utilizando distancia Dice y método de agrupamiento *Neighbor Joining* de 45 aislamientos de *C. sativus*. En la imagen izquierda se observan los aislamientos diferenciados según el periodo de tiempo en el cual fueron colectados: anterior al 2002 (1991-2001), 2002 y posterior al 2002 (2003-2007); en la imagen sobre la derecha se observan los aislamientos diferenciados según la región en la cual fueron colectados: Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú.

Figura II.5. Análisis de estructura. El número más probable de agrupaciones o clusters (K) para la colección local de aislamientos de *C. sativus* según a) valores promedio de Ln para cada K de 1 a 10 y b) valores de ΔK estimados para cada valor de K.

RESUMEN

En Uruguay, la cebada (*Hordeum vulgare*. L) es el segundo cultivo de invierno más importante en cuanto a área de siembra. Una de las enfermedades foliares más comunes de la cebada en Uruguay es la mancha borrosa, causada por *Cochliobolus sativus*, la cual provoca importantes pérdidas en producción y calidad maltera del grano. La resistencia a la enfermedad basada en cultivares resistentes es la opción ambientalmente más amigable y económica para manejar enfermedades de plantas causadas por agentes bióticos. El éxito en la obtención de cultivares resistentes se basa principalmente en el conocimiento de los aspectos etiológicos y epidemiológicos así como en la composición poblacional de virulencias.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variabilidad patogénica y caracterizar la diversidad genética y la estructura poblacional de una muestra de aislamientos nacionales de *C. sativus*, representativos de la región más importante de cultivo de cebada en Uruguay mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs.

Para describir el espectro de virulencia de *C. sativus* se analizó un conjunto de 12 aislamientos del patógeno frente a un set de 12 líneas diferenciales de cebada. Las respuestas de infección en plántula se caracterizaron utilizando la escala de respuesta de 1 a 9 basada en el tipo y tamaño de las lesiones. En total se identificaron 10 grupos de virulencia de acuerdo al código de triple nomenclatura. Ocho de los 12 grupos de virulencia se integraban por un único aislamiento. Utilizando las respuestas de infección en tres de los 12 genotipos de cebada (diferencial de Dakota del Norte: ND 5883, cv. Bowman y NDB112), los 12 aislamientos se agruparon en tres clases de patotipos: 0, 1 y 3. A su vez el análisis de conglomerados también reveló tres grupos mayores de patogenicidad. Estos resultados indican una gran diversidad patogénica entre los aislamientos analizados. Resultados similares fueron obtenidos en otros trabajos para *C. sativus*, tanto nacionales como internacionales. De esta manera, se pone en

evidencia en primer lugar que existiría en Uruguay un variado número de grupos de virulencia y en segundo lugar que el juego de genotipos de cebada empleados como diferenciales sería altamente eficaz para su identificación.

Por otro lado, la estructura genética de una muestra de 45 aislamientos de *C. sativus*, colectados en hojas infectadas de cebadas cultivadas, entre 1991-2007, en los departamentos de Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú, fue analizada utilizando 20 iniciadores RAPD. En total se identificaron 134 loci polimórficos (65.8%) de un total de 205. Cada uno de los individuos analizados presentó un haplotipo multilocus único. Globalmente, la diversidad genética encontrada fue moderada (diversidad genética de Nei $H = 0.153$; Índice de *Shannon's I* = 0.265). De acuerdo a su origen (Departamento), el coeficiente H varió entre 0.082 (Río Negro) y 0.127 (Paysandú). Al considerar el factor región o el factor periodo de colecta (1991-2001, 2002 y 2003-2007) el análisis AMOVA mostró que ambos factores son altamente significativos. Sin embargo en ambos casos, explicaron un porcentaje muy bajo de la diversidad total, ca. 5% para el factor origen y ca. 10% para periodo de colecta. En consecuencia la variación dentro de cada grupo explicó ca. 90-95% del total. La baja diferenciación poblacional observada por región ($F_{ST} = 0.046$) o por periodo de colecta ($F_{ST} = 0.097$), sugiere un importante flujo génico tanto entre regiones ($Nm = 10.20$) como entre periodos de colecta ($Nm = 4.63$). Se propone que el flujo genético observado en *C. sativus* podría ser mediado a través de la movilización de semilla infectada entre las regiones de cultivo. El desequilibrio de ligamiento multilocus estimado para el conjunto de 45 aislamientos resulto moderado ($LD = 0.107$); si bien el significativo desequilibrio de ligamiento, así como la escasa diversidad a nivel génico observada, son consistentes con la prevalencia de un sistema reproductivo asexual para esta especie, el valor de desequilibrio de ligamiento fue inferior al esperado; en efecto, si se tiene en cuenta que el ciclo sexual del patógeno no se produce en la naturaleza se esperaban niveles mucho más altos de desequilibrio de ligamiento característicos de poblaciones clonales. Resultados similares fueron reportados por otros autores para poblaciones de *C. sativus* originarias de Estados Unidos y Australia. Posiblemente la

presencia significativa de genotipos recombinantes, que sin duda enriquecen la diversidad genética de la población de *C. sativus* sea explicada por eventos de recombinación no sexual frecuentes en hongos tales como reordenamientos cromosómicos mediados por transposones o recombinación parasexual, tal como ha sido sugerido por otros autores.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. La biotecnología y la genética de poblaciones de fitopatógenos: una asociación clave para el desarrollo de resistencias durables

Diferentes abordajes biotecnológicos desarrollados mediante Genética Molecular están realizando aportes sustantivos a la Fitopatología, ciencia abocada al diagnóstico, a la epidemiología, al manejo y al control de las enfermedades en las plantas. Dichos aportes no solamente se limitan al desarrollo de métodos de identificación de patógenos y diagnóstico sino que también incluyen un mejor conocimiento de la estructura genética de la población del patógeno al igual que el diseño de herramientas moleculares en el hospedero que faciliten el mejoramiento genético por resistencia y la optimización del despliegue de resistencias en un ambiente dado. En particular, los marcadores moleculares aplicados al ADN genómico del patógeno han contribuido a la identificación de especies patógenas, complementado el análisis de razas, facilitado el análisis de las dinámicas poblacionales del patógeno incluyendo mecanismos del flujo genético imperante y permitiendo integrar los datos genéticos de las poblaciones locales del patógeno a las colecciones disponibles a nivel internacional.

La genética de poblaciones describe y cuantifica la variación genética de las poblaciones (a nivel sub-especie) y a partir de la información generada realiza inferencias sobre los procesos evolutivos que afectan la población. Las fuerzas evolutivas como la mutación, migración, deriva genética selección y recombinación, cambian las frecuencias génicas de la población y determinan su estructura genética. En particular, el estudio de la estructura poblacional y distribución diversidad genética de los fitopatógenos son útiles para comprender la epidemiología, la importancia relativa de los diferentes mecanismos de generación de diversidad genética y para estimar el potencial de evolución del hongo en el ambiente productivo lo cual permite anticipar el potencial de evolución con el hospedero.

Los marcadores moleculares, tales como RAPDs utilizados en este trabajo, han demostrado ser altamente polimórficos, robustos y útiles para el estudio de genética de poblaciones de patógenos a nivel molecular; además, debido a que son presumiblemente neutros, son útiles para el estudio de todos los procesos evolutivos y no únicamente para la selección. Por ejemplo, estas herramientas hacen posible probar diversas hipótesis epidemiológicas y ecológicas con datos de campo. La dilucidación de los factores que puedan estar alterando a la población del patógeno son datos importantes a la hora del diseño de esquemas de mejoramiento por resistencia genética de carácter efectivo y durable.

Las siguientes preguntas/problemas de la genética de poblaciones del patógeno deben ser abordadas o resueltas para asegurar el éxito de un programa de mejoramiento por resistencia durable a enfermedades:

- ¿Cómo se distribuye la variación genética en el espacio? ¿Está la población del patógeno geográficamente sub estructurada en el área de cultivo?
- ¿Cuán representativo es el sitio de evaluación y/o la muestra de patógenos utilizada en las instancias de selección en generaciones tempranas del programa con respecto al rango de variación presente en la población general?
- ¿Cómo se distribuye la variación del patógeno en el tiempo? ¿Existen cambios en la frecuencia de los genotipos? ¿Se han producido nuevas introducciones en la población?
- ¿Qué tipo de interacción se desarrolla entre el patógeno y el hospedero? ¿Las resistencias son de tipo raza específica o raza no específica? ¿Estas alternativas impactan de manera diferencial sobre la tasa de evolución de virulencia en la población del patógeno?

1.2. La mancha borrosa de la cebada en Uruguay y esfuerzos locales para el desarrollo de resistencia genética

La cebada en Uruguay es el segundo cultivo en importancia entre las opciones de invierno y el tercer cultivo de secano en cuanto a área (DIEA, 2007). El destino principal del grano es la producción de malta para la exportación. En consecuencia, la calidad del grano remitido por los productores a la industria maltera es un elemento clave en esta cadena agroindustrial.

Uno de los factores más determinantes de la disminución de la calidad del grano es la ocurrencia de enfermedades foliares. Dentro de éstas se destaca la mancha borrosa causada por *Cochliobolus sativus*. Las severas y frecuentes ocurrencias de esta enfermedad en nuestro país podrían explicarse por los siguientes tres factores: i) no se dispone de materiales comerciales con comportamiento aceptable a la enfermedad, ii) el inóculo está siempre presente en el sistema debido a los grandes volúmenes de residuos del cultivo remanentes en la superficie asociados a la amplia adopción de técnicas conservacionistas de suelo y iii) el cultivo de trigo, principal cereal de invierno, también es hospedero de esta enfermedad. En consecuencia, la identificación e incorporación de resistencia efectiva a la población local del patógeno son objetivos de los programas de mejoramiento del cultivo en el país desarrollados por INIA, Facultad de Agronomía-UdelaR y empresas privadas.

Complementando los esfuerzos realizados mediante abordajes convencionales basados en el análisis de datos fenotípicos, diferentes abordajes biotecnológicos que explotan información genética y genómica están siendo implementados en el desarrollo de resistencia genética a la mancha borrosa en cebada, por parte de la Facultad de Agronomía (UdelaR) e INIA. En primer lugar, la identificación de regiones genómicas asociadas a resistencia a mancha borrosa en cebada utilizando marcadores moleculares ha sido y es objetivo de trabajo de proyectos de investigación con financiación nacional e internacional mediante el uso de poblaciones de

mapeo biparentales y/o colecciones de germoplasma analizadas a través de mapeo asociativo (Castro *et al*, 2008, Gutiérrez *et al*, 2011). Por otra parte, la caracterización genética de fuentes de resistencia efectivas en Uruguay mediada por análisis de haplotipos cromosómicos ha identificado fuentes diversas no redundantes (Rodríguez *et al*, 2010). Dado que el comportamiento de las resistencias es afectado por las variantes patotípicas del patógeno, la dilucidación del rango de patotipos presentes en la población de *C. sativus* de Uruguay y la estructura poblacional del patógeno son relevantes para el desarrollo de resistencias durables. Los primeros estudios en variabilidad patogénica de *C. sativus* en Uruguay fueron realizados por Gamba *et al* (2000), Gamba y Estramil (2002), Gamba *et al* (2011) y estudios preliminares de la estructura poblacional de *C. sativus* de Uruguay utilizando marcadores RAPDs fue reportado por (Pritsch *et al*, 2006). Sin embargo, dichos trabajos presentaban algunas limitaciones. El trabajo de estructura poblacional no contaba con una colección de aislamientos representativa de las regiones de cultivo de cebada en el país. Los trabajos de variabilidad patogénica no incluían en el juego de cebadas diferenciales las fuentes de resistencias genéticamente diversas, que recientemente hemos identificado. De esta manera, se consideró necesario mejorar el conocimiento de la estructura poblacional de *C. sativus* abordando las siguientes preguntas:

- ¿Qué magnitud de diversidad genética tiene el conjunto de aislamientos colectados? ¿Cómo se distribuye la variación genética en el espacio y en el tiempo? ¿Está la población del patógeno geográficamente sub-estructurada en el área de cultivo? ¿Existen cambios en la frecuencia de los genotipos?
- ¿Cuán representativo es el sitio de evaluación y/o la muestra de patógenos utilizada en las instancias de selección en generaciones tempranas del programa de mejoramiento de cebada con respecto al rango de variación presente en la población general?
- ¿Tiene la población de *C. sativus* en Uruguay una estructura clonal o se distingue diversidad a nivel genotípico? ¿Existe el mismo nivel de amplitud de diversidad genética en cada región?
- ¿Qué nivel de especialización fisiológica presenta el patógeno? ¿Cuántos grupos de virulencia componen la población local?

2. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar la variabilidad patogénica y caracterizar la diversidad genética y la estructura poblacional de una colección de aislamientos nacionales de *Cochliobolus sativus*, representativos de la región más importante del cultivo de cebada en Uruguay, mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs

2.2. Específicos

- Caracterizar la diversidad genética de una muestra de 45 aislamientos de *C. sativus* colectada en los departamentos de Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú mediante parámetros poblacionales utilizando marcadores RAPDs.
- Evaluar si la región de colecta es un factor determinante del patrón de distribución de diversidad genética observado.
- Evaluar si existe efecto año o periodo de colecta en la población del patógeno.
- Caracterizar la presencia de estructura poblacional en la colección de aislamientos de *C. sativus* mediante métodos basados en modelos.
- Cuantificar los patotipos e identificar grupos de virulencia utilizando un juego de genotipos diferenciales de cebadas mediante variables binarias y multiestado, respectivamente.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Bipolaris sorokiniana (teleomorfo: *Cochliobolus sativus*) es el agente causal de la mancha borrosa en hojas de trigo y cebada, punta negra en granos y podredumbre de raíz y corona (Fig.1), en América del Norte y del Sur, Europa, Australia y varios países de Asia. *Cochliobolus* pertenece al Phylum *Dothideomycetes*, Clase *Ascomycota* y Familia *Pleosporaceae* (Alcorn, 1983). Históricamente se lo clasificó en *Helminthosporium* hasta que en 1959 se reclasificó su fase asexual en *Bipolaris* (Shoemaker, 1959). Los parientes más cercanos son *Setosphaeria* (anamorfo *Exserohilum*) y *Pyrenophora* (anamorfo *Drechslera*). Se ha convertido en el mayor estrés biótico obstaculizando la producción comercial de trigo y cebada. Alta humedad y 22-30 °C de temperatura favorecen el desarrollo in situ de la mancha. Estas condiciones ambientales predisponen cultivares susceptibles para el desarrollo de enfermedades, causando daños en rendimiento de grano. El inóculo de *C. sativus* puede vehiculizarse a través de las semillas o puede surgir del micelio desarrollado sobre residuos de la cosecha. Por lo tanto los conidios transportados por el aire a partir de micelio presente en residuos del suelo o sobre el cultivo sirven como fuente de inóculo a principios de primavera. Los síntomas de la enfermedad suelen ser evidentes en las hojas de cebada como lesiones ovaladas necróticas, pudiendo estar rodeadas de halos cloróticos amarillos (Fetch y Steffenson, 1994). Como resultado de la infección se reduce el área fotosintética y en casos severos las hojas enteras están deterioradas llegando a la senescencia prematura de las hojas, así como a la muerte de la planta. Aunque se han desarrollado métodos químicos para el control de la enfermedad, se considera que la introducción de materiales con buenos niveles de resistencia genética a la enfermedad y la implementación de sistemas de rotación de cultivos que eviten la siembra reiterada de trigo y cebada serían las medidas más eficaces desde el punto de vista ambiental.



Figura 1. Enfermedades causadas por *C. sativus*. El patógeno causa mancha borrosa en hojas de trigo y cebada, punta negra en granos, podredumbre de raíz y podredumbre de corona. Tomado de Kumar et al, 2002.

3.1. Importancia a nivel internacional

En los últimos años, las epidemias de mancha borrosa se han intensificado en numerosas zonas agrícolas de clima templado y subtropical a nivel mundial (Kumar *et al*, 2002). Para el caso de trigo, los esfuerzos puestos en el mejoramiento para la resistencia a la roya de la hoja han producido grandes epidemias de mancha borrosa en los sistemas agrícolas intensivos en el sur de África (alrededor de 12.000.000 ha. afectadas). Por otra parte en China, el reemplazo de variedades de trigo por otros genotipos con mayor potencial de rendimiento y con resistencia a roya de la hoja, ha provocado un aumento en las epidemias de mancha borrosa. El hongo está presente en zonas donde las condiciones climáticas son cálidas y húmedas (este de India, sur-este de China, sur-este de Australia y sur-este de Brasil). En los últimos años, se ha extendido a áreas no tradicionales debido al aumento del consumo y la producción de trigo en estas áreas (nor-oeste de India y Pakistán). La presencia del patógeno en las áreas más frías del mundo (este de Europa, nor-oeste de China, nor-oeste de África y norte de América) se debe a la capacidad que posee para adaptarse al frío, lo cual permite una mayor supervivencia del inóculo (Fig.2.).

Las pérdidas de rendimiento en grano causadas por esta enfermedad fluctuaron entre 16 y 33% en variedades susceptibles de cebada (Fetch y Steffenson, 1994). Por otro lado, Dubin y Van Ginkel (1991) y Saari, (1998)

reportan para el cultivo de trigo en el sur de Asia, pérdidas de rendimiento entre el 16 al 23%.



Figura 2. Distribución de *C. sativus* en el mundo.
Tomado de Kumar *et al*; 2002.

3.2. Importancia a nivel nacional

La mancha borrosa junto con la mancha en red y la fusariosis de espiga representan las limitantes principales para obtener rendimientos y calidad de grano adecuados en los cultivos de cebada en Uruguay. La magnitud de las pérdidas es función de la enfermedad presente, del momento en el ciclo del cultivo en que la misma se establece, de la susceptibilidad del cultivar y de las condiciones ambientales imperantes (Pereyra *et al*, 2007). Pereyra (1996) menciona que se han registrado mermas en el rendimiento entre 10 y 15%, pudiendo llegar a 40% en aquellos casos donde la epidemia de mancha borrosa se produce antes de la espigazón.

3.3. Condiciones predisponentes

La mancha borrosa es considerada una enfermedad importante, sobre todo en lugares sub-tropicales, donde se encuentran las condiciones

óptimas para su desarrollo: altas temperaturas acompañadas de alta humedad.

Kumar *et al* (2002) citan que en condiciones conducentes, tales como cinco o seis días de lluvia seguidos de temperaturas cálidas (20-30 °C), la enfermedad puede desarrollarse muy rápido, agravándose si el cultivo infectado se encuentra en la etapa de tres cuarta espiga emergida (Zadoks *et al*, 1974) donde el cultivo se hace más susceptible al patógeno. También mencionan que bajo condiciones de baja intensidad de luz el patógeno puede colonizar intercelularmente los tejidos sin causar daños visibles. Por otro lado, Pereyra *et al* (2005) citan que las condiciones óptimas para la infección se encuentran entre 24-28 °C y entre 9 y 24 horas de agua libre sobre la hoja; desarrollándose luego favorablemente con la ocurrencia de lluvias.

3.4. Etiología de la enfermedad

Cochliobolus sativus (Ito & Kuribayashi) Drechs. ex Dastur (anamorph: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.), forma parte de la clase Ascomycetes, dentro de la división Eumycota del reino Fungi. Los eumycotas son hongos verdaderos, habitualmente filamentosos y que se alimentan por absorción (Tinline, 1988). Los ascomycetes comprenden varios miles de especies que pueden ser desde estrictamente saprófitas, hasta parásitos obligados de las plantas superiores. En estos últimos, existen algunos que pueden atacar y dañar severamente los cereales de invierno como trigo y cebada.

El ciclo de los Ascomycetes comprende dos fases: la asexual y la sexual (Fig.3). Durante la primera el hongo produce conidióforos, es decir, estructuras que soportan esporas asexuales o conidios. Los conidióforos pueden nacer individualmente o en grupos, y libres, o en cuerpos fructíferos denominados picnidios o acérvulos. Desde el punto de vista fitopatológico, esta fase es muy importante porque se repite durante todo el ciclo del cultivo, y los conidios pueden infectar hojas, tallos, espigas, e incluso granos. La fusión de dos núcleos haploides compatibles se produce en la

segunda fase o ciclo sexual y, como consecuencia, se desarrollan cuerpos fructíferos (peritecios, cleistotecios o apotecios) capaces de resistir condiciones desfavorables de humedad y temperatura durante la ausencia del cultivo. En estos cuerpos fructíferos, dentro de las ascas se producen ascosporas haploides mediante meiosis. Esta es la etapa invernante, aunque en la mayoría de los casos, las ascas o ascosporas no se forman ni maduran sino hasta el final del invierno o comienzo de la primavera. Las ascosporas se liberan al inicio de un nuevo ciclo del cultivo. Por lo tanto el hongo puede invernar también en forma de micelio y, en ocasiones, como conidio, o sobreviviendo saprofiticamente en los rastrojos. El micelio de los Ascomycetes está compuesto de hifas bien desarrolladas, delgadas o gruesas, profusamente ramificadas e interrumpidas por septas simples.

B. sorokiniana representa la fase asexual o anamórfica. Se caracteriza por conidios elípticos tabicados (60-120 μm x 12-20 μm) con 5 a 9 células. Durante el proceso de infección, la producción de conidióforos con conidios ocurre en el tejido foliar y otras partes de la planta, así como en los restos del cultivo. La fase sexual o teleomórfica (*C. sativus*), raramente se encuentra en la naturaleza. Únicamente ha sido descrita su ocurrencia bajo las condiciones agroecológicas de Zambia (Gilchrist-Saavedra *et al*, 2005). Sin embargo, es posible favorecer su desarrollo y mantenimiento en condiciones de laboratorio (Zhong y Steffenson, 2002). *C. sativus* es un hongo heterotálico, para el cual se han descrito dos tipos de apareamiento (*mating types*) denominados A y a. Por lo tanto, para el inicio de la fase sexual exitosa, núcleos haploides de hifas de tipo de apareamiento A y a se fusionan y desarrollan pseudotecios, ascas y por meiosis ascosporas (Tinline, 1988). En *C. sativus* se han identificado los de tipo de apareamiento MAT-1 y MAT-2 (Zhong y Steffenson, 2001). Sin embargo, estos autores encontraron muy bajas frecuencias de pseudotecios fértiles en los cruzamientos MAT-1 x MAT-2 ante lo cual sugirieron que otros genes adicionales son también requeridos para el desarrollo exitoso de la fase sexual.

3.5. Ciclo biológico de *C. sativus*

Las principales fuentes de inóculo primarias a partir de las cuales se desarrolla la enfermedad son: la semilla infectada, el suelo donde los conidios durmientes pueden permanecer con capacidad germinativa por 36 meses, plantas guachas o voluntarias y residuos de hospederos (Pereyra, 1996). En los últimos años con el desarrollo de prácticas conservacionistas de suelo como la siembra directa, la fuente de inóculo más importante para esta enfermedad han sido los residuos de los cultivos en la superficie (Stewart *et al*, 2005). Por otro lado, Reis (1985) citado por Pereyra (1996) menciona que la semilla es una importante fuente de inóculo para la fase de podredumbre de raíces seminales, secundarias o coroneales, lesiones en las primeras hojas y muerte de plantas luego de la emergencia.

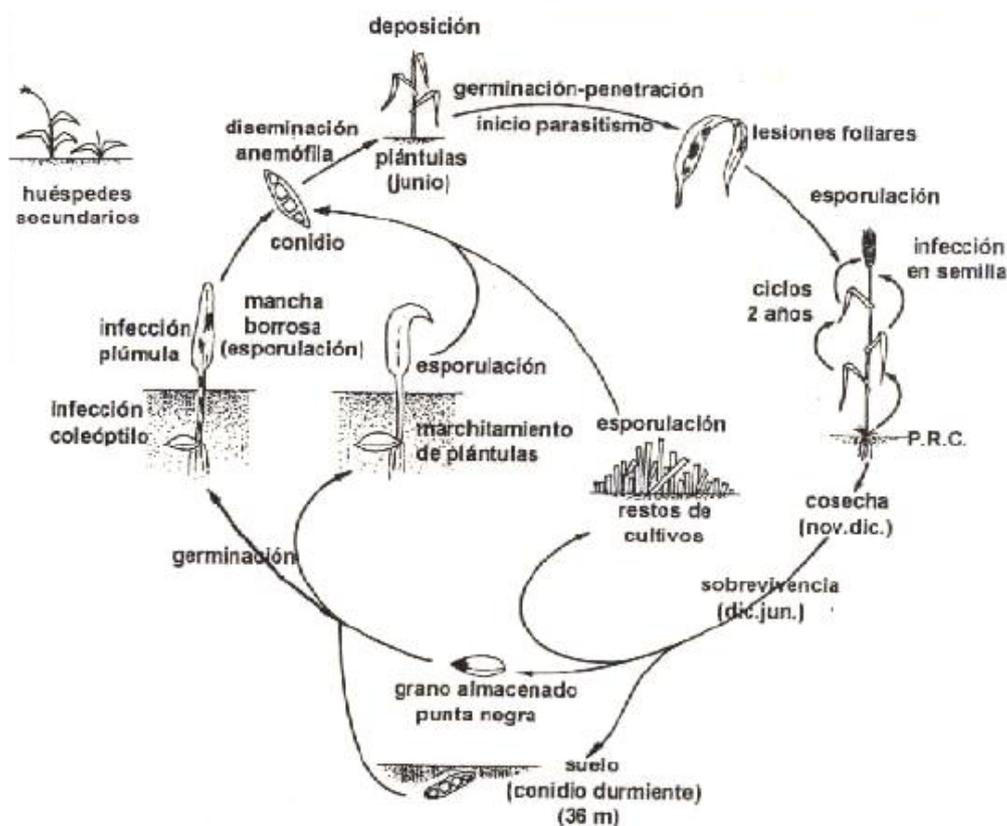


Figura 3. Ciclo Biológico de *C. sativus* en cebada, Fuente: Pereyra 1996

A partir de conidios procedentes de las fuentes de inóculo primarias antes mencionadas, y con condiciones de temperaturas cálidas y alta humedad, se producen las primeras infecciones en el cultivo. Luego, con la ocurrencia de lluvias en la primavera se suceden los ciclos secundarios cada 10-14 días (Pereyra, 1996; Pereyra *et al*, 2005) (Fig3).

3.6. Rango de hospederos

El rango de hospederos de *C. sativus* es muy amplio. En la Tabla 1 se muestra, como ejemplo, el rango de especies hospederas monocotiledóneas evaluadas en el oeste de Hungría (Kumar *et al*, 2002). Pero por su importancia económica este patógeno se destaca por las manchas foliares que desarrolla en los cultivos de trigo y cebada.

Tabla.1. Especies monocotiledóneas huéspedes de *C. sativus*

Monocotiledóneas Huéspedes *
Cereales
<i>Triticum aestivum</i>
<i>Secale cereale</i>
<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Hordeum murinum</i>
<i>Avena sativa</i>
Forrajeras
<i>Agropyron pectinatum</i>
<i>Agropyron repens</i>
<i>Alopecurus pratensis</i>
<i>Beckmannia eruciformis</i>
<i>Bromus erectus</i>
<i>Bromus inermes</i>
<i>Dactylis glomerata</i>
<i>Festuca heterophylla</i>
<i>Festuca ovina</i>
<i>Lolium perenne</i>
<i>Pennisetum villosum</i>
<i>Poa pratensis</i>
<i>Setaria viridis</i>

De acuerdo a Bakonyi *et al*. (1997)

3.7. Sintomatología

Los síntomas característicos de la mancha borrosa en cebada se presentan como lesiones redondas a elípticas, de color marrón oscuro y a veces con presencia de halo clorótico. En ambientes de producción agrícola, los síntomas de mancha borrosa causada por *C. sativus* pueden comenzar a observarse en el cultivo hospedero a partir del comienzo del desarrollo foliar, inclusive en estadio de plántula y pueden incrementarse principalmente en las hojas después de la espigazón. Este hongo también puede presentarse en corona, raíces, nudo, vaina, espiga y grano (Pereyra *et al.* 2005).

La mancha borrosa es una enfermedad que se controla principalmente a través del uso de cultivares resistentes. Las resistencias son a menudo evaluadas tanto en plántula como en planta adulta. Fetch y Steffenson (1999) crearon una escala visual que describe todo el espectro de respuestas posibles a la infección (RI), a partir de la evaluación de una colección diversa de germoplasma de cebada y aislamientos de *C. sativus*. Para el estadio de plántula generaron una escala de 1 a 9 en función del tipo (presencia de necrosis y clorosis) y tamaño relativo de las lesiones observadas (Fig.4). Las nueve RIs fueron clasificadas en tres categorías generales: baja (RI 1 a 3), intermedia (RI 4 y 5) y alta (RI 6 a 9) compatibilidad. Una baja RI consistió en pequeñas lesiones necróticas con ninguna o muy leve clorosis marginal, una RI intermedia consistió en lesiones necróticas de tamaño mediano con margen clorótico restringido, mientras que una RI alta consistió en grandes lesiones necróticas con márgenes cloróticos bien marcados y grados variables de expansión de clorosis. Por otro lado, los mismos autores propusieron para planta adulta las siguientes cuatro clases de RI: R=resistente, MR=moderadamente resistente, MS=moderadamente susceptible, y S=susceptible (Fig.5).

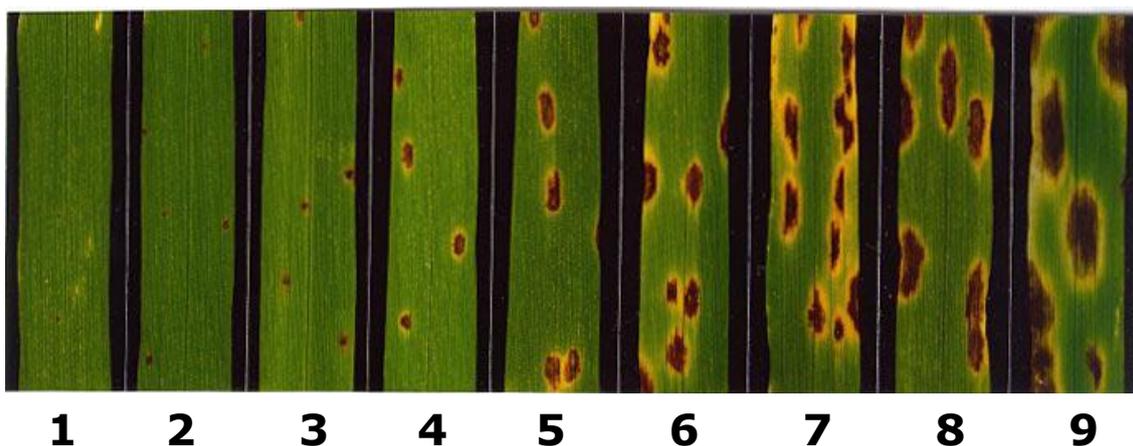


Figura. 4. Escala de respuesta a la infección por *C. sativus* en hojas de plántulas de cebada. Las RI se definieron en base al tipo (presencia de necrosis y clorosis) y tamaño relativo de las lesiones observadas en la segunda hoja. Los nueve RI fueron clasificados en tres categorías generales: baja, intermedia y alta compatibilidad hospdero-patógeno. Tomado de Fetch y Steffenson (1999).

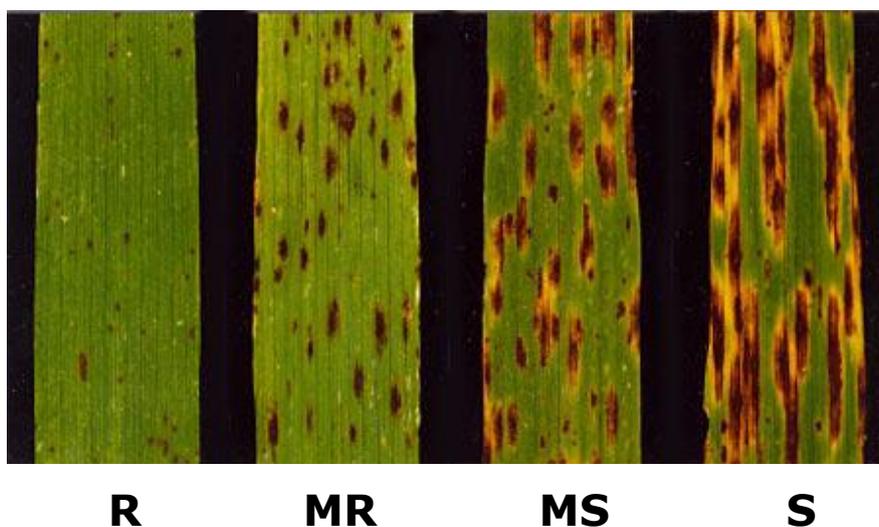


Figura. 5. Escala de respuesta a la infección por *C. sativus* en planta adulta para la interacción *H.vulgare*-*C. sativus* (R: resistente, MR: moderadamente resistente, MS: moderadamente susceptible y S: susceptible). Tomado de Fetch y Steffenson (1999).

3.8. Biología del proceso de infección

Durante la infección, *C. sativus* cuenta con una fase biotrófica seguida de una necrotrófica. Un análisis microscópico del desarrollo de este hongo durante la infección muestra claramente las siguientes etapas: i) formación de apresorio a partir del tubo germinativo y posterior penetración de la cutícula y pared celular de la célula epidérmica del hospedero, seguido por invaginación de la membrana citoplasmática y desarrollo de las hifas dentro de las células (fase biotrófica); ii) invasión del espacio intercelular del mesófilo por parte de la hifa, acompañada de desestabilización del sistema membranario y muerte de las células de la epidermis y del mesófilo (fase necrotrófica) (Fig.6). Raramente el patógeno penetra por aperturas estomáticas (Kumar *et al*, 2002).

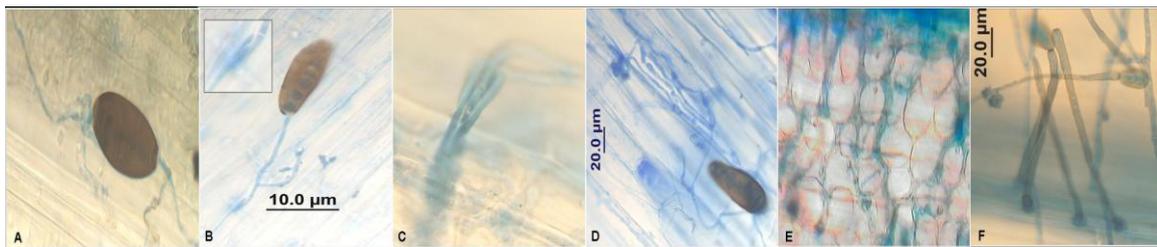


Figura. 6. Proceso de infección de *C. sativus* en hojas de cebada desde 8-72 hdi (horas después de la inoculación). La fase biotrófica (pre-penetración) se describe de A-B y la necrotrófica (post-penetración) de C-F. A) Germinación de conidio y crecimiento de hifas primarias (8-18 hdi). B) Hifa con apresorio claviforme (24 hdi). C) Varias hifas procedentes de diferentes conidios confluyen formando un nudo antes de penetrar la epidermis (36 hdi). D) Hifas intracelulares engrosadas, desarrolladas dentro de la célula epidérmica (48 hdi). E) Hifas intercelulares en el mesófilo (60 hdi). F) Emergencia de conidióforos melanizados con conidios (72 hdi). Tinción de estructuras fúngicas con azul de lactofenol.

El colapso de las células del hospedero en la fase necrotrófica es siempre indicada por un incremento en la fuga de electrones coincidiendo con el desarrollo de la enfermedad. Este proceso es paralelo a la generación

de síntomas necróticos. Este colapso estaría asociado a la secreción de toxinas por el hongo, ya que las células mueren sin tener contacto directo con las hifas. Además, la introducción de toxinas dentro de las hojas provoca una respuesta necrótica en la hoja similar a la desarrollada durante la infección (Kumar *et al*, 2002).

Se han identificado varios tipos de toxinas siendo las más estudiadas las pertenecientes a la familia heliminthosporal. Estas toxinas actuarían como desacopladores, inhibiendo la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, la foto-fosforilación en los cloroplastos y el bombeo de protones a través de la membrana plasmática. Por lo tanto no estarían interactuando de forma específica con un único receptor de la membrana del huésped (Kumar *et al*, 2002).

Los sistemas de compatibilidad toxina-dependientes, generalmente se asocian a la manifestación de una respuesta oxidativa. En el caso de la mancha borrosa, la respuesta oxidativa se pone en evidencia en células epidérmicas y del mesófilo con la acumulación de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno, intermediario reactivo del oxígeno). Existiría una correlación positiva entre el nivel de susceptibilidad a mancha borrosa y la cantidad de H₂O₂ acumulado en las lesiones de las hojas. Por lo tanto la acumulación de H₂O₂ estaría asociada a la infección exitosa (compatible) del patógeno. De acuerdo a esto se explicaría la alta susceptibilidad a *C. sativus* de la líneas de cebada portadoras del gen *mlo*, que confiere resistencia raza-no específica frente al patógeno biotrófico *Blumeria graminis* mediante una rápida muerte celular y reacción oxidativa (Kumar *et al*, 2001, 2002). Los determinantes fisiológicos o genéticos que determinan a priori el carácter durable de la resistencia no son conocidos (Michelmore, 2003).

4. CAPÍTULO I

4.1. Especialización fisiológica del patógeno

En el estudio de la especialización fisiológica de un patógeno se distinguen dos conceptos importantes: patogenicidad y virulencia. La patogenicidad se refiere a la capacidad de un microorganismo para producir enfermedad. La virulencia indica el grado de patogenicidad de un patógeno. Ambos caracteres no dependen únicamente del genotipo del patógeno sino también del genotipo del hospedero (Shaner *et al*, 1992).

La primera descripción de la especialización fisiológica entre el patógeno y el hospedero fue realizada por Christensen en 1926 quien demostró diferencias considerables en la virulencia de algunos aislamientos de *C. sativus* atacando trigo y cebada. Kumar *et al* (2002) también citan que Nelson (1960, 1961) encontró diferentes tipos de reacción en especies forrajeras al utilizar como inóculo las progenies de cruzas entre aislamientos que mostraban diferente nivel de virulencia. De acuerdo con estos resultados, el carácter virulencia tendría una herencia compleja, determinada por muchos genes.

Fetch y Steffenson (1994) detectaron marcadas diferencias en el nivel de virulencia al inocular plántulas de cebada de dos hileras con dos aislamientos de *C. sativus* (ND90Pr y ND85F) en ensayos de invernáculo. A su vez, encontraron que a nivel de campo no solo se observaban diferencias en el tipo de reacción, sino también en los niveles de severidad asociados a una interacción significativa entre aislamiento x genotipo.

La base genética de la virulencia en *C. sativus* frente al cultivar Bowman fue estudiada más recientemente por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997a). En un estudio donde se analizó la virulencia de la progenie del cruzamiento de los aislamientos de *C. sativus*: ND90Pr con ND93-1, virulento y no virulento, respectivamente, al inocular el cultivar Bowman, se encontró una tasa de segregación de 1:1 para baja/alta

virulencia, indicando que el carácter virulencia estaría controlado por un único gen. Bajo el modelo de la virulencia como un carácter monogénico, estos mismos autores analizaron la variabilidad de patotipos de *C. sativus* mediante inoculación en tres variedades diferentes de cebada (ND 5883, Bowman, ND B112) con 22 aislamientos recolectados en Dakota del Norte, Estados Unidos y 11 aislamientos adicionales provenientes de Estados Unidos (Minnesota, Dakota del Sur, Nebraska, Colorado), Japón y China (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b), identificando tres patotipos. Estos patotipos fueron designados como 0, 1 y 2; donde el 0 muestra baja virulencia en los tres genotipos, el patotipo 1 muestra alta virulencia en ND5883 y baja virulencia en Bowman y en ND B112, y por último el patotipo 2 muestra alta virulencia solo en Bowman. El patotipo 0 sería el dominante en Dakota del Norte seguido por el patotipo 1, mientras que el patotipo 2 es muy poco frecuente (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b). Sin embargo, la amplia distribución del patotipo 2 pocos años después (1990) de liberado el cultivar Bowman (1984) implicó la pérdida de efectividad de la resistencia a mancha borrosa de este cultivar en North Dakota y puso en evidencia la capacidad de adaptación de la población del patógeno frente al despliegue de resistencia en el hospedero. En un estudio más amplio, con aislamientos de varios orígenes, Zhong y Steffenson (2001) confirmaron la prevalencia de los patotipos 0 y 1. Además, al estudiar la diversidad genética de los aislamientos utilizando marcadores moleculares AFLP, estos autores encontraron que los aislamientos del patotipo 2 presentaron los valores más bajos de diversidad genética lo cual indicaría un origen más reciente de esta variante patogénica. Por otro lado, Arabi y Jawhar (2003) reportaron cuatro patotipos para una colección de *C. sativus* de Siria, donde el patotipo 1 presentó baja virulencia en todos los genotipos analizados, patotipos 2 y 3 fueron moderadamente virulentos y el patotipo 4 altamente virulento, siendo los más comunes el patotipo 3 (35%) y el patotipo 4 (42%). En otro estudio realizado con un grupo de 34 aislados australianos, se identificaron seis patotipos usando un grupo de 20 cultivares de cebada (Meldrum *et al.*, 2004).

Los estudios más recientes de variabilidad patogénica en *C. sativus* fueron desarrollados por Ghazvini y Tekauz (2008), Knight *et al* (2010) y

(Gyawali, 2010). Mientras que el primer trabajo únicamente estudió aislamientos colectados de hojas con síntoma de mancha borrosa, los otros dos trabajos incluyeron estudios en aislamientos asociados a dos sintomatologías: mancha borrosa y podredumbre de corona. En cuanto a la mancha borrosa, la cual es el tema central de este trabajo, estos autores describieron la variabilidad patogénica mediante dos estrategias: por un lado identifican patotipos o grupos de virulencia, utilizando la nomenclatura de triple codificación asociada a la clasificación binaria de reacción resistente y susceptible, en juegos de a tres genotipos y utilizando en total de 12 a 15 genotipos diferenciales; por otro lado, describieron la variabilidad patogénica de forma más cuantitativa mediante análisis de conglomerados utilizando los valores multiestado de la escala elaborada por Fetch y Steffenson (1999). En este caso, los agrupamientos detectados se denominaron grupos de patogenicidad. Utilizando un juego de 12 genotipos diferenciales de cebada y la nomenclatura de triple codificación, Ghazvini y Tekauz, (2008) reportaron ocho grupos de virulencia de *C. sativus* en Canadá. Estos ocho grupos a su vez se agruparon de acuerdo a su nivel de agresividad en tres grupos mayores o clusters definidos por baja virulencia o agresividad (0.0.0.0), virulencia diferencial (6.0.0.0) y virulencia con niveles variados de agresividad (6.3.5.0, 7.7.5.1, 7.7.7.5, 7.7.5.4, 5.7.4.0 y 5.7.0.0). Entre ellos, se destacó el hallazgo de los grupos de virulencia 7.7.7.5 y 7.7.5.1 los cuales fueron altamente virulentos sobre los genotipos de seis carreras de América del Norte, considerados hasta ese momento con resistencia durable, entre ellos NDB112.

Un estudio reciente con aislamientos de *C. sativus* de Dakota del Norte (Gyawali, 2010) utilizando 12 genotipos diferenciales reportó cuatro grupos de virulencia, en donde dos de ellos, los grupos 7.7.3.6 y 7.3.3.6 (similar a la virulencia reportada por Ghazvini y Tekauz, 2008), representados por los aislamientos 4008 y 1457, causaron síntomas severos de mancha borrosa en ND B112. Estos resultados pusieron en evidencia que los patotipos que vuelven vulnerable la resistencia derivada de NDB112, han logrado ampliar su área de dispersión desde Manitoba, Canadá hasta la región limítrofe de Dakota del Norte, Estados Unidos constituyendo una real

amenaza para el pool genético de cebadas de seis hileras en esta región dado su muy reducida diversidad genética.

Por su parte Knight *et al* (2010) estudiando la variabilidad patogénica de 31 aislamientos de *C. sativus* en 12 genotipos de cebada de Australia, reportaron 11 patotipos los cuales se agruparon en tres grupos mayores de patogenicidad, PC1: baja patogenicidad, PC2: alta patogenicidad y PC3: patogenicidad intermedia, representados por los patotipos 0.0.0.0, 1.7.7.7 y los patotipos no virulentos sobre ND 5883, respectivamente.

En Uruguay, el primer estudio exploratorio realizado sugirió la existencia de tres perfiles de virulencia diferencial, en un grupo de 37 aislados y 15 genotipos de cebada (Gamba, *et al.*, 2000). Trabajos posteriores distinguieron dos grupos de virulencia en 30 aislamientos de *C. sativus* de Uruguay utilizando como líneas diferenciales tres genotipos de cebada en uso en el país (Gamba y Estramil, 2002). Además, en ese estudio, también se inocularon los tres patotipos estadounidenses (patotipo 0: ND 93-1; patotipo 1: ND 90Pr, y patotipo 2: ND 85F), identificados y caracterizados por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997a), los 30 aislados uruguayos que fueron inoculados en las tres cebadas diferenciales (ND5883, Bowman y NDB112) usadas por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997a). De los dos grupos identificados, uno fue de igual comportamiento al patotipo 1 y el otro al patotipo 2. No se encontró ningún aislado con patrón de virulencia similar al patotipo 0 (Gamba y Estramil, 2002). Sin embargo, estos estudios no son comparables con otros reportados porque fueron realizados con genotipos de cebadas diferentes. Esta falta de consistencia requiere de una estandarización del grupo de cebadas diferenciales así como de los protocolos de investigación a ser usados a nivel internacional.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamientos de *C. sativus* y condiciones de cultivo

En total, 12 aislamientos monospóricos de *C. sativus* fueron evaluados en este estudio (Tabla I.1). Todos los aislamientos se colectaron a partir de tejido infectado de hojas de diferentes variedades de cebada procedentes de cuatro regiones de cultivo en Uruguay: Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú (Fig. I.1). Las secciones de tejido foliar presentando manchas típicas de mancha borrosa fueron esterilizadas superficialmente e incubadas en cámara húmeda de tres a cuatro días para inducir la esporulación del hongo. Los conidios colectados se utilizaron para establecer cultivos monospóricos (de una sola espora). El cultivo de una única espora fue transferido a medio sólido PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM0139) el cual se incubó a 23°C con un régimen de 12h /12h, luz/oscuridad ($100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 14 días.



Figura I.1. Distribución y región de colecta de los 45 aislamientos de *C. sativus* colectados en cuatro Departamentos del Uruguay: Colonia, Soriano, Río Negro y Paysandú, durante los años 1991-2007.

Tabla I.1. Aislamientos monospóricos de *C. sativus* utilizados para la identificación de grupos de virulencia indicando nombre, variedad de cebada muestreada, localidad, región y fecha de colecta

Aislamiento	Variedad	Localidad	Región	Año	Origen
96.2	E.Quebracho	Ombúes	Colonia	1996	INIA
01.1	Reg 30152	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
01.2	CLE 218	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
01.8	M 6456	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
02.1	I.Ceibo	Mercedes	Soriano	2002	INIA
03.65.2	MP 1007	C. Exp. Norteña	Paysandú	2003	FA
04.1.4	U 5293	L.A.Herrera (Planel)	Colonia	2004	FA
05.4	Danuta	Young	Río Negro	2005	INIA
05.5	I. Ceibo	Dolores	Soriano	2005	INIA
05.6	C5/4202/5	La Estanzuela	Colonia	2005	INIA
05.7	I. Ceibo	Mercedes	Soriano	2005	INIA
07.501.2	I.Ceibo	Dolores, C.Exp. R96,km37	Soriano	2007	FA

FA: Facultad de Agronomía, INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

5.2. Genotipos diferenciales de cebada

Doce genotipos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) con niveles variables de resistencia a mancha borrosa fueron utilizados como líneas diferenciales para identificar grupos de virulencia en el patógeno (Tabla I.2). Se incluyeron seis variedades sembradas en Uruguay, de las cuales cinco fueron desarrollados en Uruguay y una en Alemania. Estos expresan desde mediana a alta susceptibilidad a MB, con la excepción de INIA Guaviyú que expresa resistencia intermedia en planta adulta. El cultivar Bowman y las líneas NDB112, ND17293, ND23180 y TX7934 provenientes de Estados Unidos son líneas con resistencia efectiva para la población de *C. sativus* de Uruguay (Albin, 2008; Rodríguez *et al*, 2010). La línea ND5883 se incluyó a los efectos de completar junto a ND B112, y cv. Bowman, el juego de tres cebadas diferenciales originalmente utilizadas por Valjavec-Gratian y Steffenson, (1997b) para caracterizar la población de *C. sativus* de Dakota del Norte, Estados Unidos y, posteriormente incluidas en estudios de identificación de patotipos de *C. sativus* realizados en Australia (Meldrum *et al*, 2004; Knight *et al*, 2010), Canadá (Ghazvini y Tekauz, 2008), Estados Unidos (Zhong y Steffenson, 2001; Gyawali, 2011) y de forma preliminar en Uruguay (Gamba y Estramil, 2002).

Tabla I.2. Nombre, tipo de espiga, origen y *pedigree* de doce genotipos de cebadas utilizados como diferenciales en la caracterización de variabilidad patogénica de *C. sativus*.

Material	Tipo de Espiga	Origen	Pedigree
Bowman	2 *	ND-EEUU	Klages//Fergus/Nordic/3/ND1156/4/Hector
ND5883	2	ND-EEUU	Clipper/línea experimental Canadá702-10
NDB112	6	ND-EEUU	Reselección de Kindred CI6969/CI7117-17
Tx7934	6	Texas-EEUU	Tokak/KY79-44//TAMBAR 401
A. Madi	2	Alemania	AC4404/Katharina//Krona
INIA Ceibo	2	Uruguay	FNCI-22/Defra
ND17293	2	ND-EEUU	ND14651/ND15062
ND23180	2	ND-EEUU	ND19888/ND18380-1
CLE 253	2	Uruguay	Perún/I. Aromo
INIA Guaviyu	2	Uruguay	ND16680/ND13111(Carumbé)
INIA Arrayán	2	Uruguay	Defra/CI 5791
Dayman	2	Uruguay	ND 7085/ND 4994-15//ND 8968

* número de carreras de la espiga, ND: Dakota del Norte

5.3. Preparación de las plantas

Las líneas diferenciales se sembraron dos semanas antes de la inoculación, en macetas de 30 cm de diámetro con una mezcla de 1:1 tierra:arena. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperíodo de 18h ($100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 70 % de humedad relativa. Los 12 genotipos, divididos en tres grupos de cuatro, se plantaron a razón de cuatro genotipos por maceta. Se sembraron tres semillas por genotipo. Cada maceta se hizo por duplicado, en consecuencia un total de seis plantas fueron analizadas por genotipo.

5.4. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Fetch y Steffenson (1999). Para colectar conidios, cultivos monospóricos crecidos en PDA fueron raspados con agua destilada estéril y luego filtrados con gasa. La concentración de conidios se contó con un hematocitómetro y se ajustó a 5.000 conidios/mL. Una gota de polioxietileno-20-sorbitán (Tween 20) fue agregada por cada 50 mL de suspensión para facilitar la adhesión y la distribución uniforme del inóculo en las hojas de las plántulas.

5.5. Inoculación y evaluación de la enfermedad

Plántulas de 14 días (segunda hoja en crecimiento) fueron inoculadas por aspersión mediante un atomizador boquilla (modelo 15, DeVilbiss Co., Somerset, Pensilvania), acoplado a un compresor ajustado a 60 kPa de presión. En acuerdo con lo descrito por Fetch y Steffenson (1999), la cantidad de inóculo utilizada (aprox. 20mL/planta) fue suficiente para provocar escurrimiento. El período de incubación se realizó en oscuridad durante 18h a 22°C y 100% de humedad relativa. A continuación, se cultivaron en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 18h ($100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) a 22°C. Diez a 12 días posteriores a la inoculación, se realizaron lecturas de respuesta a la infección (RI), en la segunda hoja (totalmente expandida) utilizando la escala de RI 1-9 desarrollada por Fetch y Steffenson (1999). Para cada combinación genotipo de cebada-aislamiento se tomaron seis lecturas, tres en cada uno de los duplicados. Para cada aislamiento se calculó el RI promedio por genotipo (seis lecturas por cada genotipo de cebada). Para evaluar un modelo de gen por gen entre los aislamientos y las líneas diferenciales, valores de RI promedio $\leq 4,5$ y $> 4,5$ fueron considerados como reacciones susceptibles (1 o S) y resistentes (0 o R), respectivamente.

5.6. Designación del grupo de virulencia

Los aislamientos fueron clasificados en diferentes grupos de virulencia empleando el sistema de código de triple nomenclatura desarrollado por Limpert y Müller (1994). En este sistema, los genotipos diferenciales están ordenados en subgrupos de tres. A cada reacción de una línea diferencial con cada aislamiento del patógeno se le asigna un valor binario, donde 1 y 0 representan reacciones susceptibles (S) y de resistencia (R), respectivamente. Si el valor binario resultante es 1 (reacción susceptible) luego se convierten en valores decenarios por los factores de conversión: 2^0 (igual a 1), 2^1 (igualdad a 2), y 2^2 (igual a 4) para el primer, segundo, y tercer genotipo de cebada de cada subgrupo, respectivamente, mientras que un valor binario de 0 (reacción de resistencia) no es convertido. Se

suman todos los valores decenarios en cada subconjunto y se separan los dígitos por puntos. Para este estudio, las 12 líneas diferenciales se ordenaron en cuatro subgrupos de tres genotipos, alfabéticamente, con la excepción del primer subgrupo constituido por los tres diferenciales ND 5883, Bowman y ND B112 reportados por Valjavec-Gratian y Steffenson, (1997b), resultando en un código de cuatro dígitos para cada subgrupo (por ejemplo, R, R, R, S, R, R, R, S, R, S, S, R puede ser designado como 0.1.2.3 y R, R, S, S, R, S; R, S, S, S, S, S puede ser designado como 4.5.6.7). Los aislamientos que presentaron un código de cuatro dígitos común se agruparon en el mismo grupo de virulencia.

Un segundo método de clasificación se basó exclusivamente en las lecturas de respuesta de infección (RI) en ND 5882, Bowman y ND B112, que permiten establecer los tipos de patotipos 0 (R, R, R), 1 (S, R, R), 2 (R, S, R), 3 (S, S, R), mediante un único dígito y no grupos de virulencia.

5.7. Ordenamiento de las relaciones genéticas

Con el objetivo de identificar el agrupamiento natural de las observaciones (aislamientos) de acuerdo a sus niveles de virulencia o agresividad se utilizó el Análisis de Conglomerados (*Cluster analysis*). A partir de los valores RI promedios por genotipo, se calcularon las distancias Euclidianas entre pares de aislamientos y se aplicó el método de agrupamiento Ward, utilizando el programa estadístico DarWin 5 (Perrier, 2006).

6. RESULTADOS

6.1. Designación del grupo de virulencia

Todos los aislamientos utilizados en este estudio provocaron síntomas de mancha borrosa en las 12 líneas diferenciales de cebada, resultando en lesiones que variaron en tamaño y cobertura foliar (severidad). Los síntomas variaron desde pequeñas lesiones necróticas sin presencia o con un leve halo clorótico marginal, hasta grandes lesiones necróticas generalmente acompañadas de un halo clorótico marginal bien significativo.

Los valores de RI registrados en las líneas diferenciales a los diferentes aislamientos de *C. sativus* variaron continuamente, siendo frecuentes los valores de RI intermedios (RI de 4 a 5) (para más detalle ver Anexo I y II). En algunos casos la extensión del halo clorótico rodeando la mancha necrótica no fue tan notorio como el que se ilustra en la escala de RI propuesta por Fetch y Steffenson (1999), y por lo tanto el tamaño de la lesión necrótica fue utilizado como el principal criterio para definir el RI correspondiente a dicho genotipo. Basados en los RI inducidos por los 12 aislamientos de *C. sativus* sobre las 12 líneas diferenciales de cebada, los aislamientos se clasificaron en 10 grupos de virulencia de acuerdo al código de triple nomenclatura (Limpert y Müller, 1994) (Tabla I.3).

Dos de los 12 aislamientos analizados (16.7%) correspondieron al grupo 0.0.0.0 ya que indujeron una reacción incompatible o de resistencia (RI <4.5) en todas las líneas diferenciales de cebada. Estos aislamientos fueron también los únicos clasificados como patotipo 0 según Valjavec-Gratian y Steffenson (1997b). El grupo de virulencia 1.0.0.0 incluyó dos aislamientos (16.7%) que únicamente desarrollaron un RI >7 en el cv. ND5883 pero bajos RIs (entre 2 y 4) en los restantes genotipos (Tabla I.3). Estos aislamientos fueron igualmente los únicos clasificados como patotipo 1 de acuerdo al sistema de Valjavec-Gratian y Steffenson (1997b).

En el reducido número de aislamientos analizados, no se encontró ninguno perteneciente al patotipo 2 de acuerdo a Valjavec-Gratian y Steffenson (1997b), o sea, inductor de reacción incompatible en NDB112 y ND5883 y compatible en Bowman.

Los restantes ocho aislamientos (66.6%) fueron asignados al patotipo 3 de acuerdo a los diferenciales de Dakota del Norte (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b) al generar reacción incompatible en NDB112 pero compatible en Bowman y ND5883. Es de destacar que, cada uno de los aislamientos del patotipo 3 fue asignado a un patotipo diferente de acuerdo al código de triple nomenclatura. Este grupo abracaría a los aislamientos de más alta agresividad.

Considerando únicamente los aislamientos del patotipo 3 se constata que los genotipos susceptibles según reportes previos, Ackermann Madi, CLE 253, INIA Arrayán e INIA Ceibo, mostraron reacción de susceptibilidad para cuatro, seis, cinco y siete de los ocho aislamientos de este grupo, respectivamente. Los genotipos medianamente resistentes, INIA Guaviyú y Norteña Daymán mostraron susceptibilidad para tres y cuatro aislamientos, respectivamente, mientras que las fuentes de resistencia ND17293, ND23180 y TX7934 mostraron reacciones de susceptibilidad para uno, dos y tres aislamientos, respectivamente; de esta manera, cada una de estas fuentes mostró un patrón único de reacción frente a los doce aislamientos analizados (para más detalle ver Anexo I y II). En consecuencia, el único genotipo que expresó reacción incompatible con la totalidad de los aislamientos fue NDB112.

En cuanto al patrón de distribución geográfica de los grupos de virulencia (Tabla I.4) se destaca que los aislamientos del patotipo 0 o GV 0.0.0.0 (dos aislamientos) fueron colectados en Soriano, del patotipo 1 o GV 1.0.0.0 (dos aislamientos) en Colonia y Río Negro, y los restantes ocho aislamientos del patotipo 3 en Paysandú (cuatro), Colonia (dos) y Soriano (dos). De esta manera el patotipo 3 tendría una amplia distribución en la zona de cultivo de cebada en Uruguay.

Tabla I.3. Promedios de respuesta a la infección (RI) y desvíos estándar de 12 líneas de cebada diferenciales inoculadas con 12 aislamientos de *C. sativus*, y sus correspondientes grupos de virulencia (GV), designados mediante el uso del código de triple nomenclatura (cuatro cifras) ^a.

Aislamiento	Líneas diferenciales												Promedio ± DS	GV ^b	GV (ND)
	ND 5883	Bowman	NDB 112	A. Madi	CLE 253	I. Arrayán	I. Ceibo	I. Guaviyú	ND 17293	ND 23180	N.Daymán	Tx 7934			
02.1	4.0 ± 1.1	3.0 ± 1.4	1.3 ± 0.5	2.3 ± 2.0	4.3 ± 1.5	1.5 ± 0.8	2.3 ± 1.2	3.2 ± 1.5	1.7 ± 0.8	3.5 ± 1.6	2.0 ± 0.9	2.0 ± 0.9	2.0 ± 0.8	0.0.0.0	0
07.501.2	2.5 ± 1.0	2.5 ± 0.5	1.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.8	2.7 ± 0.8	2.2 ± 1.5	2.7 ± 0.5	1.7 ± 0.8	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.6	0.0.0.0	0
04.1.4	7.7 ± 1.2	3.7 ± 1.8	3.2 ± 1.2	3.3 ± 1.2	3.3 ± 2.1	3.2 ± 1.9	3.5 ± 2.4	3.3 ± 1.9	4.2 ± 1.5	4.3 ± 2.1	2.7 ± 2.7	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1	1.0.0.0	1
05.4	7.2 ± 0.8	3.3 ± 0.5	2.7 ± 0.8	3.3 ± 0.5	3.5 ± 1.0	3.2 ± 0.8	3.3 ± 1.0	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.7 ± 1.2	3.3 ± 1.2	3.5 ± 0.5	3.5 ± 1.3	1.0.0.0	1
01.2	9.0 ± 0.0	5.7 ± 1.6	3.5 ± 0.8	4.2 ± 1.5	4.0 ± 1.9	4.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5	4.2 ± 0.4	4.0 ± 1.5	3.7 ± 0.8	4.2 ± 0.8	4.3 ± 2.3	4.3 ± 1.6	3.0.0.0	3
96.2	7.5 ± 0.5	6.2 ± 0.8	2.7 ± 0.5	3.2 ± .04	4.3 ± 2.0	3.8 ± 0.8	5.2 ± 0.8	4.2 ± 0.8	3.8 ± 0.4	4.2 ± 1.2	4.7 ± 0.8	3.3 ± 0.8	3.3 ± 1.2	3.0.1.2	3
03.65.2	9.0 ± 0.0	5.3 ± 0.8	4.2 ± 2.1	5.2 ± 2.1	4.7 ± 0.5	3.0 ± 1.4	7.7 ± 0.8	3.8 ± 0.8	3.5 ± 1.0	5.2 ± 1.0	3.5 ± 0.5	5.5 ± 2.3	5.5 ± 2.1	3.3.1.5	3
05.5	8.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	2.7 ± 1.5	2.8 ± 1.6	7.2 ± 2.2	5.5 ± 0.5	5.0 ± 1.5	3.8 ± 1.3	2.8 ± 1.0	4.2 ± 1.2	5.0 ± 1.7	2.8 ± 1.0	2.8 ± 1.1	3.6.1.2	3
05.7	9.0 ± 0.0	6.5 ± 0.5	3.7 ± 0.6	4.0 ± 1.3	5.3 ± 0.5	5.7 ± 0.8	6.5 ± 1.2	4.0 ± 1.4	3.5 ± 1.0	5.0 ± 2.2	3.7 ± 1.4	5.8 ± 2.4	4.5 ± 2.2	3.6.1.5	3
01.1	8.5 ± 0.8	6.5 ± 0.5	2.5 ± 1.0	4.7 ± 0.5	7.0 ± 1.7	6.8 ± 0.8	5.2 ± 1.2	5.3 ± 0.5	3.3 ± 1.2	3.7 ± 1.2	4.3 ± 0.5	4.5 ± 1.0	4.5 ± 1.7	3.7.3.0	3
01.8	9.0 ± 0.0	5.2 ± 0.4	2.8 ± 0.8	5.3 ± 0.8	7.7 ± 1.5	7.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6	4.8 ± 1.7	3.8 ± 0.8	4.3 ± 1.5	4.8 ± 1.2	4.8 ± 1.7	4.8 ± 1.8	3.7.3.5	3
05.6	9.0 ± 0.0	7.0 ± 2.5	3.2 ± 2.3	5.0 ± 1.1	6.2 ± 1.5	6.6 ± 2.2	5.8 ± 0.8	5.8 ± 1.5	4.7 ± 1.0	4.5 ± 1.4	4.8 ± 1.7	4.5 ± 1.6	5.8 ± 1.7	3.7.7.2	3

^a También se listan a modo de comparación los código de un solo dígito para los aislamientos, basados en la respuesta de infección (RI) de las líneas diferenciales de Dakota del Norte: ND 5883, Bowman y ND B112 (ND)

^b Grupos de virulencia (GV) designados acorde al código de triple nomenclatura propuesto por Limpert y Müller (1994).

Las respuestas medias a la infección se calcularon promediando las respuestas de infección de las seis réplicas correspondientes a un mismo genotipo de cebada, utilizando la escala de calificación de RI 1 a 9 desarrollada por Fetch y Steffenson (1999).

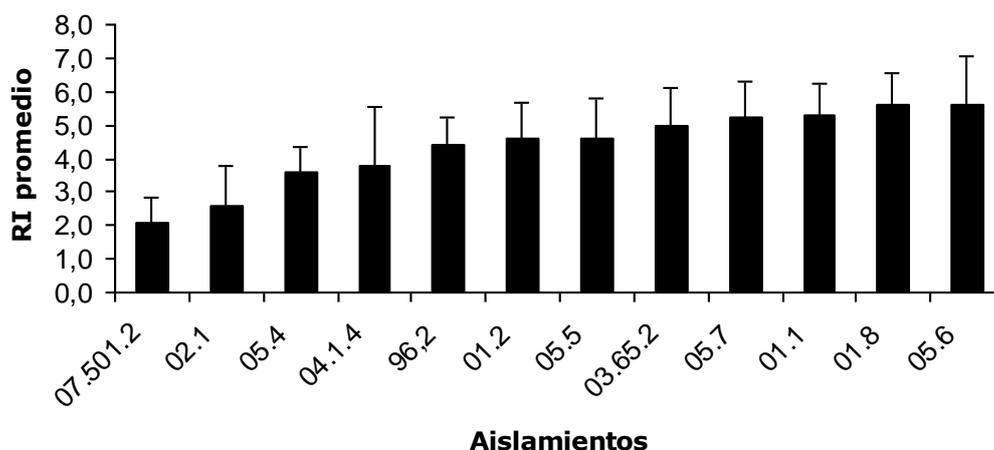
Tabla I.4. Número y porcentaje de aislamientos de *C. sativus* colectados de diferentes Departamentos del Uruguay, asignados a 10 grupos de virulencia.

Departamentos	Número por Grupo de virulencia (GV) % ^a										Total
	0.0.0.0	1.0.0.0	3.0.0.0	3.0.1.2	3.3.1.5	3.6.1.2	3.6.1.5	3.7.3.0	3.7.3.5	3.7.7.2	
Colonia		1 (33.3)		1 (33.3)						1 (33.3)	3
Soriano	2 (50)					1 (25)	1 (25)				4
Río Negro		1 (100)									1
Paysandú			1 (25)		1 (25)			1 (25)	1 (25)		4
Total	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Total %^b	16.7	16.7	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	

^a Grupos de virulencia (GV) designados de acuerdo al código de triple nomenclatura (Limpert y Müller, 1994). Entre paréntesis se presenta, en porcentajes, la proporción de cada aislamiento de cada GV y en cada Departamento

^b Porcentaje total. Representa la proporción de cada aislamiento de cada GV en el total de los 12 aislamientos de *C. sativus* evaluados.

Figura I.2. Promedio de respuestas de infección inducidas por 12 aislamientos de *C. sativus* sobre 12 líneas diferenciales de cebada. Las barras representan el desvío estándar.



Los valores promedio de respuesta a la infección a mancha borrosa variaron entre 1.7 y 5.8, siendo el menos virulento el aislamiento 07.501.2 y el más virulento el 05.6. (Tabla I.3 y Fig. I.2). Los resultados fenotípicos presentaron un buen nivel de correlación entre las repeticiones dentro de los experimentos aislados, con diferencias en la puntuación que variaron desde 0.6 hasta 2.2.

6.2. Análisis de agrupamiento basado en distancias

Utilizando el promedio de respuesta a la infección para los 10 grupos de virulencia se realizó un análisis de conglomerados (Fig I.3). Resultó evidente que los aislamientos formaron tres grupos o clusters de patogenicidad (PC) principales. El PC1 se caracterizó por presentar muy baja patogenicidad (RI promedio 1.85), el PC2 baja patogenicidad (RI promedio 3.45) y el PC3 patogenicidad intermedia (RI promedio 4.65). El PC1 estuvo representado exclusivamente por el patotipo 0 (grupo 0.0.0.0) y el PC3 por el patotipo 3 (3.3.1.5, 3.6.1.2, 3.6.1.5, 3.7.3.0, 3.7.3.5 y 3.7.7.2), sin embargo el PC2 contiene a todos los representantes de patotipo 1 (grupo 1.0.0.0) y dos aislamientos del patotipo 3 de menor virulencia (3.0.0.0 y 3.0.1.2).

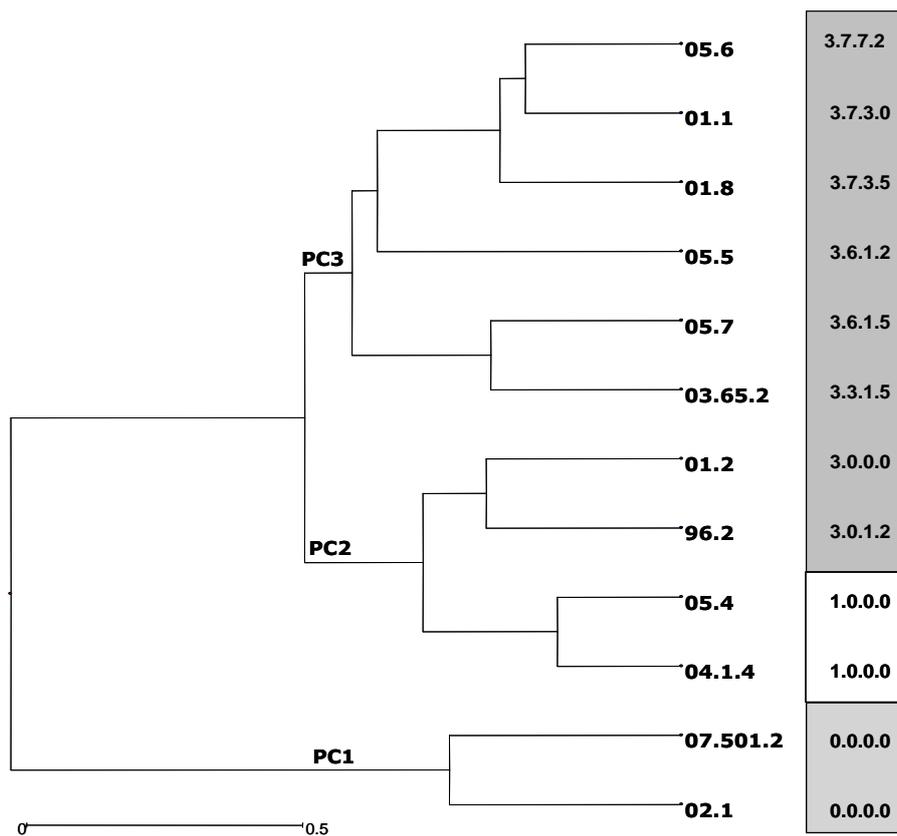


Figura I.3. Dendrograma de las similitudes en el promedio de respuestas a la infección de mancha borrosa de 12 aislamientos de *C. sativus* sobre 12 líneas diferenciales de cebada, utilizando distancias Euclidianas y método de agrupamiento Ward. El código de triple nomenclatura se muestra sobre la derecha.

7. DISCUSIÓN

Este trabajo reporta los patrones de virulencia de doce aislamientos de *C. sativus* colectados en los cuatro Departamentos más importantes en cuanto a la producción de cebada del Uruguay utilizando un juego de 12 genotipos de cebada como diferenciales. En total se identificaron 10 grupos de virulencia de acuerdo a la nomenclatura de triple código. Ocho de los 12 grupos de virulencia se integraban por un único aislamiento. Estos resultados indican una gran diversidad patogénica entre los aislamientos. Resultados similares fueron obtenidos por Gamba (2011) para la población de aislamientos de Uruguay, Ghazvini y Tekauz (2007) para aislamientos pertenecientes a Canadá y Knight *et al* (2010) para Australia. De esta manera, se pone en evidencia en primer lugar que existiría en Uruguay un variado número de grupos de virulencia y en segundo lugar que el juego de genotipos de cebada empleados como diferenciales sería altamente eficaz para identificarlos.

Considerando únicamente los genotipos diferenciales propuestos por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997b) este trabajo identificó los patotipos 0, 1 y 3, no detectándose el patotipo 2. La presencia de patotipos 0 y 1 en *C. sativus* de Uruguay está en concordancia con lo previamente reportado por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997b), Zhong y Steffenson (2001) y Ghazvini y Tekauz, (2007), trabajos en los cuales se analizó un número reducido de aislamientos de Uruguay. Además, estos trabajos reportaron que los patotipos 0 y 1 también fueron identificados en Estados Unidos, Brasil, Polonia y Canadá, así como China, Japón y Nueva Zelanda, indicando que tendrían una distribución mundial (Zhong y Steffenson, 2001; Ghazvini y Tekauz, 2007). Sin embargo un estudio nacional previo reportó la ocurrencia del patotipo 2 en una población de 30 aislamientos de *C. sativus* (Gamba y Estramil, 2002), por lo cual sería necesario ampliar el número de aislamientos a analizar para confirmar estos resultados. El patotipo 0 se caracteriza por una muy baja agresividad generando una reacción incompatible en NDB112, Bowman y ND5883 y el patotipo 1 induce reacción incompatible únicamente en ND5883. Uno de los padres de ND5883, el

cultivar Clipper, de origen australiano manifiesta de media a alta susceptibilidad a *C. sativus* en Uruguay. Otras líneas relacionadas a Clipper, como INIA Quebracho, y CLE247 son también susceptibles a la población de *C. sativus* de Uruguay. Estos datos sugieren que es posible que los mismos factores de susceptibilidad sean compartidos entre ND5883, Clipper, INIA Quebracho y CLE247. La no detección del patotipo 2 en este trabajo está en concordancia con el reporte de Ghazvini y Tekauz (2007) en el cual de ocho aislamientos de *C. sativus* de Uruguay ninguno de ellos fue asignado al patotipo 2. Es de destacar, sin embargo, que el 75% (8 de 12) de los aislamientos analizados en este trabajo fue asignado al patotipo 3. Este es el primer reporte de presencia del patotipo 3 en Uruguay. Este patotipo es virulento en Bowman y en ND5883. Teniendo en cuenta que estos dos genotipos están muy escasamente relacionados genéticamente se puede especular que no compartirían el mismo factor de susceptibilidad o de resistencia, por lo tanto los aislamientos del patotipo 3 podrían ser portadores de efectores eficaces para interaccionar con ambos factores. Varias líneas de mejoramiento y variedades comerciales de Uruguay derivan de líneas de Dakota del Norte con importante presencia de Bowman en sus *pedigrees*, en especial aquellas con destino a la zona norte de cultivo en Uruguay debido a la favorable combinación de tolerancia al calor y precocidad que aporta dicho genotipo. Las variedades INIA Guaviyú y Norteña Daymán tienen a Bowman en su *pedigree* y manifiestan una reacción de resistencia intermedia a la mancha borrosa (Pereyra S, *com pers*). En este trabajo estos dos genotipos mostraron reacciones de compatibilidad para solo 3 y 4 de los ocho aislamientos del patotipo 3, respectivamente. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que ambos cultivares derivan de líneas parentales obtenidas de cruza complejas realizadas en la Universidad de Dakota del Norte en las cuales se han acumulado en el genotipo Bowman resistencias de varios orígenes, potencialmente resistentes a mancha borrosa. En este sentido en la genealogía de INIA Guaviyú además de Bowman están las fuentes ND7556 (derivada de NDB112), Zhedar (de origen Chino), Shyri (Ecuador), mientras que en Norteña Daymán están Nordic y Manker (derivadas de NDB112), así como otras líneas que derivan de las fuentes Chevron, Jet, Olli, entre otras. Los genotipos ND17293, ND23180 y TX7934, considerados fuentes de

resistencia eficientes en Uruguay (Pereyra S, *com pers*) manifestaron reacciones compatibles para únicamente uno, dos y tres aislamientos del patotipo 3, indicando que ofrecen un interesante espectro de resistencia (para más detalle ver Anexo I y II). Dichos espectros no coinciden entre si ni con los presentes en INIA Guaviyú y Norteña Daymán.

Por último, no se detectaron aislamientos que indujeran una reacción compatible en NDB112. Este resultado es consistente con los datos de niveles estables de resistencia de NDB112 tanto en plántula como en planta adulta frente a mezclas de aislamientos de *C. sativus* de Uruguay y por varios años (Pereyra S, *com pers*). En cambio, aislamientos de *C. sativus* virulentos en NDB112 han sido recientemente identificados en Canadá (Ghazvini y Tekauz, 2008) y en Estados Unidos (Gyawali, 2010) lo cual constituye una real amenaza a la oferta varietal de cebadas del medio oeste americano y canadiense que se han basado hasta el momento en la resistencia de NDB112, la cual ha sido durable por más de 40 años.

El mayor nivel de variabilidad patogénica entre los aislamientos de *C. sativus* se observó en el Departamento de Paysandú, donde se encontraron 4 de los 10 GV identificados, siendo todos los aislamientos pertenecientes al patotipo 3. Aislamientos designados por el grupo de virulencia 0.0.0.0 solamente se encontraron en el Departamento de Soriano por lo tanto presentan una estrecha distribución. Estos resultados podrían indicar que existe una amplia variabilidad del patógeno cuanto más al norte se avanza sobre el litoral, siendo por lo tanto Paysandú el Departamento con mayor variabilidad. Sin embargo esto también podría deberse al mayor numero de aislamientos testeados para dicho Departamento (n= 4) con respecto al Departamento de Río Negro (n= 1) y Colonia (n= 3). El reducido número de aislamientos analizados en este trabajo sugiere tomar con cautela los resultados obtenidos y promover futuros trabajos con un número mayor de aislamientos. Duveiller *et al* (2000) reportaron que la probabilidad de detectar diferencias en patogenicidad entre aislamientos se incrementa con el aumento en el número de aislamientos a testear, y esto a su vez es más probable que ocurra cuando los aislamientos son colectados en diferentes localidades. Basados en la respuesta diferencial de 25 especies en 22

géneros de Gramíneas, Nelson y Kline (1962) encontraron variación intraespecífica en la patogenicidad de ocho aislamientos de *C. sativus* colectados de diferentes regiones de Canadá y Estados Unidos. En este trabajo, todos los aislamientos testeados fueron colectados de tejido de hoja de cebada por lo que no podemos inferir acerca de la especialización tejida específica del patógeno ni de la especialización por el hospedero. Varios trabajos han estudiado la especialización de *C. sativus* asociada al tejido del cual fue colectado, como semilla, corona de raíz y hoja, así también como del hospedero del cual fueron aislados, siendo en la mayoría de los casos trigo o cebada (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b, Ghazvini y Tekauz, 2007, Knight *et al*, 2010, Gyawali, 2010). No se han realizado aún estudios de este tipo en Uruguay lo cual podría contribuir a comprender la dinámica de la población del patógeno a nivel regional, y en el tiempo (rotaciones trigo cebada).

El bajo número de aislamientos evaluados en este trabajo es una limitante para lograr una buena representación del espectro de virulencia presente en la población de *C. sativus* de Uruguay. Sin embargo, el conjunto de 12 aislamientos fue seleccionado teniendo en cuenta los resultados de diversidad genética y estructura población del patógeno detectada mediante marcadores moleculares RAPDs y presentado en el capítulo II de esta tesis, a fin de lograr una buena representación de la variación observada. Estudios posteriores con un mayor número de aislamientos y mayor cobertura territorial son necesarios para confirmar o refutar los resultados que se presentan en esta tesis.

En acuerdo con Ghazvini y Tekauz (2007) y Knight *et al* (2010), este trabajo mostró que los fenotipos de infección inducidos por *C. sativus* mostraron variación continua de 1 a 9, siendo más frecuentes los valores de RI intermedios de 4 a 5. En este sentido, la aplicación en este patosistema de un modelo gen a gen, que se utilizó en este trabajo para la identificación de patotipos, debe ser utilizado con cautela ya que la definición de la línea de corte entre reacción compatible e incompatible es arbitraria. De hecho, dependiendo de cuál sea el criterio utilizado para definir el punto de corte

en la escala de RI, es decir si se corta en 4.5 o en 5, los resultados obtenidos pueden variar.

En este trabajo se identificaron 10 grupos de virulencia utilizando como punto de corte valores de respuestas de infección de 4.5 para discriminar entre reacciones resistentes (o incompatibles) y susceptibles (o compatibles), y aplicando el código de triple nomenclatura (Limpert y Müller, 1994). De haber aplicado el valor 5 como el punto de corte de la escala de RI, como ya ha sido reportado por otros autores (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997a; 1997b; Zhong y Steffenson, 2001), el número de grupos de virulencia de *C. sativus* obtenido en este estudio se hubiera reducido a ocho (datos no mostrados). Parecería entonces que el análisis cualitativo de patotipos es insuficiente para el estudio de este sistema hospedero-patógeno. Por lo tanto, la diversidad de aislamientos de *C. sativus* en cuanto a su virulencia podría ser mejor analizada mediante el uso de métodos cuantitativos.

Utilizando el análisis de conglomerados con los valores RI promedios para cada aislamiento se identificaron tres clusters de patogenicidad o también denominados grupos de virulencia (PC o GV). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ghazvini y Tekauz (2007) y Knight *et al* (2010). EL grupo más representado fue "PC3", el cual integró a seis de los ocho aislamientos del patotipo 3 indicando que este grupo podría ser considerado como el de mayor agresividad. Además, estos seis aislamientos están distribuidos en los cuatro departamentos indicando que este mismo grupo es además relevante en todas las zonas de cultivo de cebada en Uruguay. El término "agresividad", que describe la cantidad de enfermedad producida en una determinada interacción susceptible hospedero-patógeno (Andrison, 1993), podría ser preferiblemente denominada "virulencia" para determinar el nivel de patogenicidad de aislamientos de *C. sativus* de forma cuantitativa. En consecuencia, los aislamientos del "PC3" serían los más relevantes para ser utilizados en las etapas de selección en mejoramiento por resistencia a esta enfermedad.

8. CAPÍTULO II

8.1. Estructura de la población y diversidad genética utilizando marcadores moleculares

La estructura genética de la población de hongos describe la magnitud y distribución de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones (McDonald y McDermott, 1993). La disponibilidad de numerosas estrategias de análisis del patrón de distribución de polimorfismo en múltiples regiones genómicas (multilocus) entre individuos de una población mediante marcadores moleculares constituye una herramienta poderosa para el estudio de la genética de poblaciones de los hongos patógenos. Los estudios de la variabilidad genética y la evolución de los hongos patógenos de plantas han recibido más atención recientemente a los efectos de mejorar la comprensión de la interacción hospedero-patógeno, así como para lograr el control de enfermedades a través de la resistencia del hospedero. La comprensión de la estructura poblacional tiene una implicancia fundamental en el mejoramiento de cultivos y manejo de enfermedades.

Existen antecedentes en la literatura de estudios de diversidad genética de *C. sativus* utilizando marcadores moleculares AFLP (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997a; Zhong y Steffenson, 2001, 2002; Ghazvini y Tekauz, 2008; Knight *et al*, 2010; Gyawali, 2010), RAPDs (Oliveira *et al*, 2002; Iram y Ahmad, 2004; Baturó, 2005; Müller *et al*, 2005; Arabi y Jawhar, 2007) e ITS (Moura Nascimento y Van Der Sand, 2008).

Zhong y Steffenson (2007) utilizando marcadores AFLP para analizar aislamientos de *C. sativus* (aislados de hojas de cebada y granos de cebada y trigo) originarios predominantemente de América del Norte, encontraron cuatro grupos los cuales no se correlacionaban con los patotipos observados. Baturó (2005) estudió la variabilidad genética de aislamientos de *C. sativus* de Polonia mediante el uso de marcadores RAPDs. Este autor, reportó que la magnitud de la diversidad detectada entre los aislamientos

dependía del cultivar de cebada del cual se habían aislado, y en menor medida del sistema de agricultura utilizado, no encontrando relación ninguna en cuanto al año de colecta o parte de la planta de la cual se aisló el patógeno (raíz, base de tallo o semilla). Un estudio más detallado debería incluir más años de muestreo, ya que en este estudio preliminar solamente se abarcaron dos años de colecta (2002-2003). Por otro lado, Arabi y Jawhar (2007) utilizaron marcadores del tipo RAPD para comparar un grupo de aislamientos de *C. sativus* colectados de hoja y raíz de cebada, no encontrando distinción genética entre los aislamientos en relación a la fuente de tejido o la patogenicidad.

Recientemente Knight *et al* (2010) al examinar la variación genotípica de poblaciones de *C. sativus* de Australia utilizando marcadores AFLP y análisis de conglomerados, identificaron cuatro grupos, separándose claramente los aislamientos asociados a diferentes hospederos (cebada o trigo). Sin embargo, no se observó relación entre el origen geográfico de los aislamientos y los agrupamientos detectados en base a la matriz de similitud genética.

Gyawali (2010) empleó marcadores AFLP para estudiar una colección de *C. sativus* perteneciente a Dakota del Norte (ND) y Australia (A), colectados de diferentes tejidos (hoja (L) y raíz (R)) y de diferentes hospederos (trigo (W) y cebada (B)), reportando especialización en cuanto a la región geográfica y a la fuente de tejido y hospedero. De esta forma encontró que la población analizada se dividía en cuatro subpoblaciones: NDLB, ARB, NDRB y NDRW.

El reporte nacional más reciente sugiere la existencia de una alta variabilidad genética de los aislados locales detectada con marcadores moleculares RAPDs (Pritsch, *et al.*, 2006).

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Colección de aislamientos de *C. sativus*

Cuarenta y cinco aislamientos monospóricos de *C. sativus* muestreados a partir de hojas de cebada con síntomas de mancha borrosa fueron analizados en este trabajo. Las hojas infectadas fueron muestreadas en cuatro regiones de cultivo de cebada en Uruguay (Fig. I.1), durante el periodo 1991-2007. El aislamiento de *C. sativus* WRS 1903 aislado de una lesión foliar de cebada en Canadá (cedido por el Dr. A. Tekauz, Canadá) y el aislamiento 0601 de *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* colectado en Uruguay fueron incluidos en el análisis como genotipo de referencia y externo, respectivamente (Tabla II.1).

9.2. Condiciones de cultivo

Para la producción de conidios, *C. sativus* y *P. teres* f. sp. *teres* fueron cultivados en medio PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM0139) y V8-agar (20% jugo V8, 0,3% carbonato de calcio) respectivamente, a 23°C en un régimen de 12h/12h (luz/oscuridad). Los conidios se colectaron mediante raspado de micelio de 10 días de crecimiento con agregado de agua destilada estéril y posterior filtración en gasa. La concentración de conidios se evaluó mediante hematocitómetro.

Para el cultivo de micelio en medio líquido, aislamientos monospóricos de cada especie fueron crecidos en medio YPG 0.5X (glucosa 1%, peptona 0,5%, extracto de levadura 0,15%) inoculado con 10×10^8 conidios/ml de medio de acuerdo a Zhong y Steffenson (2001) y se incubó con agitación, a 23 °C y en oscuridad por 72h. Cumplido este tiempo, el micelio se recuperó mediante filtración con gasa y tres lavados con agua destilada. Previo al almacenamiento a -20°C, el exceso de agua del micelio fue eliminado mediante prensado con papel absorbente. Este

procedimiento permitió mantener por varios meses la calidad del micelio fúngico colectado.

Tabla II.1. Nombre, variedad de cebada, región (Departamento) y año de colecta de 45 aislamientos monospóricos de *C. sativus* de Uruguay. Se incluye además un aislamiento monospórico de *C. sativus* de origen canadiense (WRS 1903) y un aislamiento local de *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (0601).

Aislamiento	Variedad	Localidad	Departamento	Año	Origen
HS 3	Bloque cruz.	La Estanzuela	Colonia	1991	FA
HS 21	Stirling	Paysandú	Paysandú	1992	FA
93.1	Ana	La Estanzuela	Colonia	1993	INIA
HS 225	NE 853-15	La Estanzuela	Colonia	1993	FA
94.9	NE 853-15	Young	Río Negro	1994	INIA
96.2	E.Quebracho	Ombúes	Colonia	1996	INIA
96.10.0	Defra	Young	Río Negro	1996	FA
96.10.2	Defra	Young	Río Negro	1996	FA
98.1	Clipper	La Estanzuela	Colonia	1998	INIA
QP pay 01	Palomar	Paysandú	Paysandú	2001	FA
01.1	Reg 30152	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
01.2	CLE 218	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
01.8	M 6456	Paysandú	Paysandú	2001	INIA
02.1	I.Ceibo	Mercedes	Soriano	2002	INIA
02.1.1	Q. Ayelén	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.2.2	Q.Palomar	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.3.1	CLE 202	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.4.2	Stirling	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.5.2	NE 5593-13	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.6.1	MUSA 016	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.7.1	MUSA 936	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.7.2	MUSA 936	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.8.2	NE 1695	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.14.1	NE 0296	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.14.2	NE 0296	EEMAC	Paysandú	2002	FA
02.15.1	Dayman	Paysandú	Paysandú	2002	FA
02.17.1	Perún	San Nicanor	Paysandú	2002	FA
02.19.3	Dayman	San Nicanor	Paysandú	2002	FA
02.32.1	Dayman	Young	Río Negro	2002	FA
03.65.2	MP 1007	C. Exp. Norteña Constancia	Paysandú	2003	FA
04.1.4	U 5293	L.A.Herrera (Planel)	Colonia	2004	FA
04.2	I.Aromo	Dolores	Soriano	2004	INIA
04.11.3	N. Carumbé	Paysandú	Paysandú	2004	FA
04.15.2	MUSA 016	Paysandú	sin dato	2004	FA
04.48.3	Perún	EEMAC Var. Coop.	Paysandú	2004	FA
05.4	Danuta	Young	Río Negro	2005	INIA
05.5	I. Ceibo	Dolores	Soriano	2005	INIA
05.6	C5/4202/5	La Estanzuela	Colonia	2005	INIA
05.7	I. Ceibo	Mercedes	Soriano	2005	INIA
06.201.7	I. Ceibo	Mercedes	Soriano	2006	FA
06.202.5	Ac.98/5943/4	Young. Vivero trampa	Río Negro	2006	FA
06.228.7	Q.Ayelén	Young. Vivero trampa	Río Negro	2006	FA
07.2.1	Danuta	Mercedes	Soriano	2007	FA
07.501.1	I.Ceibo	Dolores, C.Exp. R96,km37	Soriano	2007	FA
07.501.2	I.Ceibo	Dolores, C.Exp. R96,km37	Soriano	2007	FA
1903	sin dato	Canadá	Canadá	2000	Canadá
0601	Dayman	Young	Río Negro	2006	FA

FA: Facultad de Agronomía, INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

9.3. Extracción de ADN geonómico

Para la extracción de ADN se utilizó el micelio crecido en medio líquido YPG 0.5X y almacenado en freezer a -20 °C. La extracción de ADN siguió el procedimiento descrito por Zhong y Steffenson (2001), con modificaciones. Se tomaron 200 mg de micelio, que fue pulverizado manualmente en mortero con nitrógeno líquido y transferido a microtubos de 1.5 mL seguido de adición de 400 µl de buffer de extracción (50mM de Tris pH 8.0, 50mM de EDTA, SDS 3% y 1% β-mercaptoetanol) e incubación en baño seco a 65°C por una hora. Posteriormente se adicionó 400 µl de fenol/cloroformo (24:1), agitándose 10 minutos para emulsionar las fases. Luego de centrifugar a 10.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (21°C) se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a un nuevo microtubo y se agregó 10 µl de acetato de sodio 3M y 0.54 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 minutos a 21°C, descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 1mL de etanol 70%, seguido de centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos a 21°C, descarte del etanol y secado del pellet a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 200 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) y almacenado en freezer a -20 °C.

La calidad y concentración del ADN fueron evaluados mediante electroforesis bajo las siguientes condiciones: buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.5), gel de agarosa al 0.8% (p/v) y tinción con bromuro de etidio (concentración final de 50 µg/ml). La cuantificación se realizó mediante la comparación visual del ADN obtenido con tres concentraciones de ADN conocidas (20, 50 y 100 ng/µl) de un ADN genómico comercial (fago λ DNA, Fermentas). Complementariamente, mediante espectrofotometría, se registraron los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm, utilizando un equipo Nanodrop (Thermo Fischer Scientific Inc.).

9.4. Amplificación de marcadores RAPD

La reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) se realizó en un volumen total de 10 μ L, conteniendo aproximadamente 5 ng de ADN genómico, 2 μ M de cada iniciador (Operon Technologies, Alameda, CA), 0.2 mM de cada dNTP (Fermentas), 1U de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 2 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.8 utilizando un termociclador Thermal Cycler (Corbett, modelo C61-96). El programa de amplificación incluyó una fase de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 44 ciclos compuestos por 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 2 min a 72°C. Al final de la reacción, se agregó una fase de elongación de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación generados fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v), con buffer TBE 1X (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA pH 8.0), a voltaje constante (90 V) por 2h. Seguidamente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (concentración final 50 μ g/mL) y visualizados en transiluminador con luz ultravioleta. Las fotos se obtuvieron con cámara digital (PowerShot, 8 mega píxeles, Canon). Los tamaños de los productos de amplificación en pares de bases (pb) fueron estimados por comparación con el patrón de migración del marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas). Todas las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado.

9.5. Selección de iniciadores

Para identificar aquellos iniciadores que revelaran niveles de polimorfismo útiles se compararon los patrones de amplificación generados por 60 iniciadores decámeros (Operon Technologies Alameda, CA) en cuatro genotipos de *C. sativus*, seleccionados al azar. De los iniciadores evaluados, siete correspondían a la serie OPA, tres a la serie OPB, cinco a la serie OPC, doce a la serie OPE, dos a la serie OPG, diez a la serie OPP, tres a la serie OPT, siete a la serie OPV y once a la serie OPW. Para testar la reproducibilidad de la técnica, dos reacciones independientes de amplificación fueron realizadas por cada iniciador. De estos 60 cebadores analizados se seleccionaron 20 iniciadores decámeros, de acuerdo a la

calidad, nitidez y polimorfismo de las bandas obtenidas. Los iniciadores empleados, secuencia y productos amplificados son presentados en la Tabla 2.3 de la sección resultados.

9.6. Caracterización de los patrones de bandas

Para la identificación y selección de las bandas correspondientes a los productos de amplificación, la imagen digital de los geles fue procesada con el programa CrossChecker (Buntjer, 1999). Solo las bandas RAPD de buena intensidad y presentes sin ambigüedad en ambos duplicados fueron consideradas. Con las bandas identificadas, se construyó una matriz binaria indicándose presencia (1) y ausencia (0) de cada banda. A su vez, el programa CrossChecker estimó automáticamente el tamaño de las bandas (en pares de bases) e identificó los patrones de bandas correspondientes a cada genotipo.

Para cada iniciador se evaluó el total de bandas amplificadas, el porcentaje de bandas polimórficas (número de bandas polimórficas/número de bandas totales), el rango de tamaño en pares de bases y su poder discriminatorio. Un locus fue considerado polimórfico si la frecuencia de la banda no excedía 0.95. Para los posteriores análisis estadísticos fueron eliminadas las bandas monomórficas (frecuencia relativa de banda mayor a 0.95).

9.7. Descripción de la informatividad de cada iniciador

El poder discriminatorio de los iniciadores fue evaluado mediante el parámetro Contenido de Información Polimórfica ($PIC_{\text{iniciador}}$). La fórmula utilizada para calcular el $PIC_{\text{iniciador}}$ es equivalente al índice de diversidad establecido por Nei (Nei, 1973) para loci bialélicos

$$PIC = 2\hat{p}_m(1 - \hat{p}_m)$$

siendo p_m la frecuencia estimada para el marcador m en estudio. Por su parte, el PIC_{marcador} se refiere a la habilidad de determinado marcador de detectar polimorfismo dentro de una población. Depende del número de alelos detectables y de su frecuencia. Los marcadores dominantes, como los marcadores RAPD, que presentan como máximo dos alelos (presencia y ausencia de banda) alcanzan máximos de PIC_{marcador} de 0.5 cuando la mitad de las accesiones analizadas presenta el marcador y la otra mitad no.

A partir de estos cálculos, se estableció el PIC para cada iniciador mediante:

$$PIC_{\text{iniciador}} = \sum PIC_i / N$$

que es el cociente entre el valor de PIC_{marcador} para cada i marcador RAPD y el N número de marcadores RAPD generados por un único iniciador. Los loci monomórficos fueron excluidos de estos cálculos.

9.8. Descripción de la diversidad genética

Para la estimación de la extensión de la diversidad genética se estimaron los parámetros PIC, H (Heterocigosidad esperada), I (Índice de Shannon's), Id (Identidad genética), D (Distancia genética), número de haplotipos, GD (Diversidad genotípica) y LD (Desequilibrio de ligamiento). El parámetro PIC fue descrito en la sección anterior.

La heterocigosidad esperada promedio por locus (H) o diversidad génica de Nei (Nei, 1973) es uno de los parámetros más comúnmente utilizados para medir la diversidad génica. Esta expresa la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. Para cada locus se calcula como:

$$H = 1 - \sum x_j^2$$

donde, x_j es la frecuencia del alelo j th en el locus. El valor calculado puede verse afectado por aquellos alelos presentes en frecuencias mayores. Varía

de 0 a 1 y se maximiza cuando hay prevalencia de alelos con frecuencias similares. Aunque el parámetro H no es tan informativo en general, para el caso de marcadores dominantes como RAPDs, donde se debe asumir como cierto una herencia bialélica asociada a presencia y ausencia de bandas, al ser *C. sativus* una especie haploide, y con la cual se analizaron en este trabajo aislamientos monospóricos, la presencia o ausencia del marcador representa directamente el genotipo del aislamiento. Para una población diploide en equilibrio de Hardy-Weinberg, esta medida de diversidad génica es idéntica a la frecuencia esperada de heterocigotas para un locus, y el término es comúnmente llamado heterocigosis. Sin embargo, Nei (1973, 1978, 1987) demostró que este parámetro también puede ser aplicado para organismos haploides así como para poblaciones sin apareamiento al azar.

Otro de los índices utilizados para describir la diversidad presente dentro de en una población es el Índice de Shannon's (I) (Shannon y Weaver, 1949). A diferencia del parámetro anterior de diversidad génica, que toma en cuenta loci individuales, este parámetro considera el concepto de clases que en este caso corresponde a haplotipos multilocus. Se calcula como:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde S: número de clases (haplotipos multilocus) , pi: proporción de individuos de la clase i respecto al total de individuos (es decir la

abundancia relativa de la clase i): $\frac{n_i}{N}$, ni: número de individuos de la clase i y N: número de todos los individuos de todas las clases. Los valores del Índice varían entre cero y $\ln Np$, donde cero indica que no hay diversidad genotípica lo cual se asociaría a clonalidad máxima, es decir, cuando todos los aislamientos de la población pertenecen a la misma clase, y $\ln Np$ indica el nivel más alto de la diversidad, es decir, cuando cada aislamiento de la población es una clase distinta, o sea cuando no se detectan clones. La diversidad genética de Nei's y el Índice de Shannon's se calcularon utilizando el programa POPGENE 3.2 (Yeh *et al*, 1999).

La distancia genética (D) de Nei (1978) es una medida cuantitativa de la divergencia genética entre especies, individuos o taxas. Este parámetro D asume que las diferencias surgen debido a mutación y deriva génica. Distancias genéticas pequeñas indican una relación genética estrecha, mientras que distancias genéticas grandes indican una relación genética más distante. Este parámetro suele utilizarse para comparar la similitud genética entre diferentes especies, o dentro de una especie, para medir la divergencia entre sus integrantes. Los tipos de datos más usados para estimarla son secuencias aminoacídicas, secuencias nucleotídicas, y frecuencias alélicas. Se calcula como:

$$D = -\ln_e I$$

siendo I o I_d la Identidad genética de Nei's (1978) (I_d):

$$I = \frac{I_{ab}}{\sqrt{I_a I_b}}$$

El parámetro I_d de Nei, varía entre 0 y 1, mientras que D entre 0 e ∞ . Para el cálculo del número total de haplotipos se definieron como haplotipos diferentes, dos patrones que en su estructura molecular difieran en al menos una banda. Los parámetros D e I_d de Nei y número de haplotipos diferentes fueron calculados utilizando el paquete estadístico GenAlex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006).

La diversidad genotípica (GD) (Nei, 1987) es un parámetro informativo de la estructura genética dentro de las poblaciones. Puede utilizarse para reflejar la integración de diversidad en loci individuales en genotipos multilocus, el cual es un proceso mediado básicamente por el modo de reproducción. Por lo tanto, la comparación de la diversidad genotípica poblacional (variable dependiente) con la predicha a partir de sus frecuencias génicas (variables independientes) puede utilizarse para evaluar cuan cercana esta esa población a las condiciones de panmixia. En las especies que emplean modos de reproducción sexual y asexual, este parámetro puede servir para estimar la magnitud de la contribución de la

clonalidad en una población y/o comparar las contribuciones de clonalidad que ocurren en diferentes poblaciones (Stoddart y Taylor, 1988) GD aumenta con el aumento del número de genotipos y con una mayor distribución de la frecuencia de los mismos, y se ve afectada por: el tipo de apareamiento (organismos endogámicos poseen menor GD que los de polinización cruzada), el sistema reproductivo (individuos sexuales poseen mayores niveles de GD que los asexuales) y la selección. Si uno o dos clones aumentan de frecuencia en comparación con otros clones en una población, como resultado de la selección, la diversidad genotípica total de la población seleccionada se reducirá. Por lo tanto, el sistema reproductivo probablemente tendrá un impacto significativo en la diversidad genotípica, pero no necesariamente en la diversidad genética. GD se calcula a partir de la siguiente relación:

$$\frac{n}{n-1} \cdot \left(1 - \sum_{i=1}^s p_i^2\right)$$

Para medir la magnitud de la contribución relativa de la clonalidad o recombinación potencial o sea, para buscar evidencias del modo reproductivo, se realizó una estimación del desequilibrio de ligamiento gamético mediante el índice de conexión multilocus r_d , el cual es una modificación de I_A (análisis de asociación multilocus) (Brown, 1975; Brown *et al*, 1980). El desequilibrio de ligamiento (LD) es la asociación no aleatoria entre dos alelos en dos o más loci. En otras palabras, consiste en el desvío de las frecuencias genotípicas multilocus observadas (haplotipos observados) con respecto a las esperadas a partir de la formación aleatoria de genotipos basada en las frecuencias génicas bajo la hipótesis de independencia. Generalmente se los denomina D:

$$D = x_{11} - p_1q_1$$

El nivel de LD depende de numerosos factores incluyendo: ligamiento genético entre loci, selección, tasa de recombinación, tasa de mutación, deriva genética, apareamientos no aleatorios y estructura poblacional. El

valor $LD = 0$ indica equilibrio de ligamiento o sea, que los loci examinados son independientes entre sí, mientras que un valor $LD \neq 0$ indica completa dependencia, es decir desequilibrio de ligamiento. No puede estimarse el valor LD para el caso de loci que presenten valores de frecuencias alélicas 0 o 1. Una forma de estimar LD con independencia del valor de las frecuencias génicas es mediante el coeficiente de correlación r_d entre pares de loci, expresado como:

$$r = \frac{D}{\sqrt{p_1 p_2 q_1 q_2}}$$

Para la estimación de LD multilocus se utilizó el programa Multilocus 1.3 (Agapow y Burt, 2001). Este programa calcula el grado de asociación entre los alelos mediante dos parámetros: el índice de la Asociación (I_A) (Brown, 1975; Brown *et al*, 1980) o r_d que es una modificación del I_A definido por Maynard-Smith *et al* (1993) para eliminar la dependencia del número de loci (Agapow y Burt, 2001).

9.9. Análisis de agrupamiento basado en distancias

Para poner en evidencia patrones de ordenamiento de las relaciones genéticas entre los aislamientos se siguieron dos aproximaciones estadísticas: el Análisis de Conglomerados (Cluster analysis) y el Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) a partir de una matriz de similitud computada utilizando Dice como medida de distancia.

El Análisis de Conglomerados tiene como objetivo identificar el agrupamiento natural de las observaciones estudiadas, estableciendo una clasificación de las mismas. De los diversos algoritmos utilizados para realizar esta clasificación se optó por el método no jerárquico de agrupamiento *Neighbour joining*, mediante el cual se obtiene una agrupación secuencial de los vecinos más próximos minimizando de esta manera la longitud total del árbol. Finalmente el agrupamiento resultante se representó mediante un dendrograma.

El PcoA es una forma de escalamiento multidimensional clásico, realizado con el objetivo de representar gráficamente las distancias entre muestras. Este método maximiza la correlación lineal entre distancias de una matriz en un espacio de menor dimensión (dos a tres ejes). Se obtienen nuevas variables no correlacionadas, denominadas componentes principales, que son una combinación lineal de todas las variables originales. A su vez cada componente está asociado a un valor propio (eigenvalue), que indica la magnitud de la variabilidad explicada en la dimensión dada. Para el Análisis de Conglomerados y PcoA se utilizó el programa computacional DARwin 5 (Perrier, 2006).

9.10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular AMOVA delineado por Excoffier *et al* (1992) se basa en un esquema de análisis de varianza jerarquizada produciendo estimaciones de los componentes de varianza denominados estadísticos (Φ), los cuales son análogos a los estadísticos F de Wright (1951, 1965). En este método, el haplotipo de un individuo es representado por un vector con valores de 1, si la banda homóloga está presente y 0, en el caso contrario. La métrica Euclidiana es usada para construir una matriz con los cuadrados de distancias entre todos los pares de haplotipos que, en este contexto, se refiere a la combinación de marcadores moleculares. De esta forma se obtienen los componentes de varianza, usados para calcular los estadísticos Φ (F). La Tabla II.2 ejemplifica lo niveles de jerarquía siendo P el número total de poblaciones y N el número total individuos para datos genotípicos.

Tabla II.2. Esquemas de Análisis de Varianza Molecular AMOVA.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SQ)	Cuadrado medios esperada
Entre grupos	P - 1	SQa	$n\sigma_a^2 + \sigma_b^2$
Dentro de grupos	N - P	SQb	σ_b^2
Total	N - 1	SQt	σ_T^2

Los componentes de varianza de cada nivel de jerarquía son extraídos de los cuadrados medios esperados. De esta forma tenemos

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

siendo F_{ST} la proporción de variabilidad molecular de haplotipos moleculares entre grupos en el total de la variabilidad detectada. Estos estadísticos pueden ser usados en términos de índices de endogamia, índice de fijación o como un indicador de la distancia genética entre poblaciones, reflejando la diversidad genotípica o haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica.

Este procedimiento también se utilizó para obtener los valores de F_{ST} pareados, calculados entre pares de grupos, que pueden ser usados como estimadores de las distancias genéticas entre los grupos. Para el testeo de la significancia de los estadísticos F_{ST} global y F_{ST} entre pares de grupos se realizaron 10.000 permutaciones de haplotipos entre los grupos (permutaciones no paramétricas, en las que cada permutación calcula todos los estadísticos asumiendo una distribución nula). Dentro del diseño de AMOVA fueron calculados los índices de F_{ST} específicos para cada grupo en la división jerárquica establecida. Los valores de F_{ST} específicos para cada grupo i fueron calculados siguiendo la formula:

$$F_{STi} = \frac{\frac{1}{n} \left[\frac{1}{P-1} SSD(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} SSD(WP_i) \right]}{\sigma_T^2}$$

siendo SSD (AP) la suma de cuadrados entre grupos, SSD (W P_i) la suma de cuadrados entre poblaciones y σ_T^2 la varianza total. El AMOVA fue realizado para las 45 accesiones de *C. sativus* locales bajo dos hipótesis de estructura genética de acuerdo a: i) los aislamientos colectados en cada

región de colecta de los materiales (cuatro grupos) y ii) fecha de colecta (tres grupos).

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos (en animales y en el caso de algunas plantas), así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (Slatkin, 1987; Slatkin y Batron, 1989), aunque cabe mencionar que los migrantes que no se reproducen en la población a la que migraron no contribuyen al flujo génico. El estudio del flujo génico ha sido un tema vital en biología evolutiva, ya que es un componente importante en la estructura de las poblaciones. Si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994).

Para estimar el flujo génico se calculó el número promedio de migrantes por generación mediante la expresión:

$$Nm = 1/2 (1/F_{ST} - 1)$$

en donde: m corresponde a la tasa de migración, N al tamaño poblacional y Nm al número de migrantes por generación. En función de este valor, se estimó el flujo génico entre pares de poblaciones correspondiente a M en la nomenclatura de Slatkin (1993, 1994). El análisis de AMOVA, y las estimaciones de los parámetros F_{ST} pareados entre grupos, F_{ST} específicos y el valor Nm se realizaron utilizando el programa computacional Arlequín (de acuerdo a lo descrito en el punto 9.II.10) (Excoffier *et al*, 2005).

9.11. Estructura poblacional

La estructura de la población de *C. sativus* se analizó utilizando el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) para evaluar la afiliación de los genotipos multilocus en grupos (K) o grupos genéticos mediante un modelo de agrupamiento bayesiano y testear la posibilidad de afiliación a múltiples grupos (mezcla o "admixture"). Para cada valor de K, que varía entre 1 y 10, se realizaron diez corridas independientes. Los parámetros del programa fueron establecidos como: "admixture ancestry model" y "correlated allele frequencies" (Pritchard y Wen, 2003). Para cada corrida, se fijó un periodo de "burn-in" de 50.000 iteraciones seguido de 1.000.000 iteraciones MCMC (Monte Carlo Markov Chain). Para estimar el número de grupos más probable, se calculó $\ln(K)$ para cada valor de K (Pritchard *et al.*, 2000) y se comparó con el delta K estadístico, es decir, la tasa de cambio de segundo orden de la función de verosimilitud con respecto a K (Evanno *et al.*, 2005). En resumen, la diferencia media entre sucesivos valores de verosimilitud $L'(k)$ fue calculado luego de que los valores absolutos de la diferencia entre sucesivos valores de $L'(k)$, $L''(k)$, fue promediado sobre las diez corridas y dividido por su desvío estándar.

10. RESULTADOS

10.1. Nivel de polimorfismo molecular e informatividad de los iniciadores RAPD

De los sesenta iniciadores evaluados, veinte de ellos amplificaron un total de 205 bandas útiles (reproducibles y claramente resueltas) de las cuales 134 fueron polimórficas (un 65.8% de la totalidad de las bandas) (Tabla. II.3). El número de bandas monomórficas detectadas por iniciador varió entre cero a siete. Una muestra representativa de los productos de amplificación RAPD obtenidos se describe en la Fig. II.1.

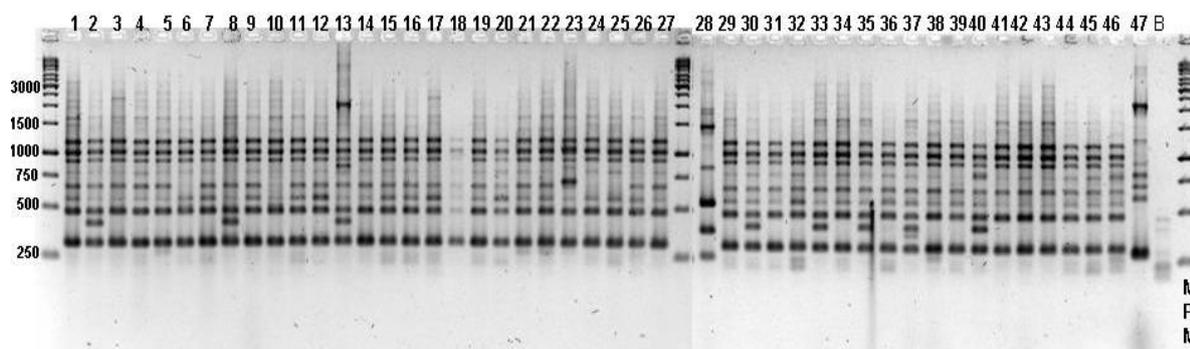


Figura II.1. Perfiles de migración de productos de amplificación RAPDs en 46 aislamientos de *C. sativus* (1 al 46), obtenidos con el iniciador OPP1. El carril 47 corresponde al aislamiento 0601 de *P. teres* f. sp. *teres*. MPM: marcador de peso molecular (1kb ladder, Fermentas). Código numérico asignado a cada aislamiento utilizado en la migración de ADN en geles de agarosa 2% (orden del 1 al 47): 93.1, 94.9, 96.2, 96.10.2, 98.1, 01.1, 01.2, 01.8, 02.1, 03.65.2, 04.1.4, 04.2, 04.11.3, 04.15.2, 04.48.3, 05.4, 05.5, 05.6, 05.7, 06.201.7, 06.202.5, 06.228.7, 07.2.1, 07.501.1, 07.501.2, 08.106, 08.107, 1903, 02.32.1, 96.10.0, HS21, QPpay01, 02.1.1, 02.2.2, 02.3.1, 02.4.2, 02.5.2, 02.6.1, 02.7.1, 02.7.2, 02.8.2, 02.14.1, 02.14.2, 02.15.1, 02.17.1, 02.19.3, 0601 (Ver Tabla II.1)

El número promedio de bandas o marcadores por iniciador fue de 10.25, extendiéndose desde siete para los iniciadores OPE16, OPE18, OPG1 y OPG3 hasta 16 para el iniciador OPW3. Teniendo en cuenta solo los

marcadores polimórficos, el número promedio de marcadores polimórficos por iniciador fue de 6,7, con un mínimo de dos marcadores polimórficos para OPG3 y OPP3 y un máximo de 12 para OPW3. El porcentaje de polimorfismo por iniciador fue moderado, variando desde un 20.0% (OPP3) a un 100 % (OPE 7 y OPE 16).

Tabla II.3. Secuencia del iniciador, bandas amplificadas, número de bandas polimórficas, % de polimorfismo (número de bandas polimórficas/bandas totales), rango de tamaño de bandas, contenido de información polimórfica por iniciador ($PIC_{iniciador}$) y rango de los valores $PIC_{marcador}$ por iniciador obtenido para cada uno de los veinte iniciadores selectos para el análisis genético de 45 genotipos de *C. sativus*.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Número total de bandas	Número de bandas polimórficas	% de polimorfismo	Rango de tamaño de bandas (pb)	Rango de $PIC_{marcador}$	$PIC_{iniciador}$
OPA11	CAATCGCCGT	10	7	70,0	366 - 1103	0,08 - 0,31	0,17
OPA17	GACCGCTTGT	8	3	37,5	660 - 3000	0,08 - 0,40	0,19
OPC4	CCGCATCTAC	9	8	88,9	375 - 2778	0,08 - 0,49	0,27
OPC13	AAGCCTCGTC	12	11	91,7	517 - 2387	0,08 - 0,46	0,21
OPE1	CCCAAGGTCC	8	5	62,5	398 - 1697	0,04 - 0,36	0,16
OPE7	AGATGCAGCC	8	8	100,0	494 - 1830	0,08 - 0,48	0,22
OPE16	GGTGACTGTG	7	7	100,0	354 - 1806	0,08 - 0,49	0,22
OPE17	CTACTGCCGT	12	7	58,3	424 - 1344	0,08 - 0,43	0,19
OPE18	GGA CTGCAGA	7	5	71,4	429 - 3000	0,08 - 0,50	0,37
OPG1	CTACGGAGGA	7	5	71,4	995 - 2936	0,08 - 0,47	0,26
OPG3	GAGCCCTCCA	7	2	28,6	435 - 944	0,08 - 0,16	0,12
OPP1	GTAGCACTCC	12	7	58,3	276 - 1959	0,08 - 0,45	0,2
OPP3	CTGATACGCC	9	2	22,2	756 - 880	0,08 - 0,08	0,08
OPP4	GTGTCTCAGG	11	10	90,9	467 - 1906	0,08 - 0,50	0,29
OPP9	GTGGTCCGCA	8	6	75,0	280 - 1465	0,08 - 0,50	0,17
OPT6	CAAGGGCAGA	13	7	53,8	250 - 1500	0,08 - 0,42	0,18
OPV16	ACACCCACACA	12	5	41,7	757 - 2500	0,12 - 0,48	0,27
OPW3	GTCCGGAGTG	16	12	75,0	384 - 2600	0,08 - 0,36	0,17
OPW5	GGCGGATAAG	15	6	40,0	464 - 1618	0,08 - 0,33	0,16
OPW7	CTGGACGTCA	14	11	78,6	368 - 2477	0,08 - 0,40	0,22
Promedio		10,25	6,7	65,8	473 - 1987	0,08 - 0,40	0,21
TOTAL		205	134		250 - 3000		

A nivel de cada marcador, una estimación de la informatividad fue obtenida con el valor de PIC de cada marcador. El $PIC_{marcador}$ presentó una distribución poco uniforme que se extendió desde 0,08 hasta 0,50 con un valor promedio de 0,21. Asimismo, el poder discriminatorio para cada uno de los veinte iniciadores se evaluó utilizando el parámetro: PIC (por iniciador). Los valores de $PIC_{iniciador}$ variaron desde 0,08 hasta 0,37, con un valor promedio de 0.211. El iniciador menos informativo fue el OPP3, mientras que el más informativo fue OPE18 (Tabla II.3).

10.2. Diversidad genética

El análisis de diversidad genética multilocus reveló que cada uno de los 45 aislamientos posee un genotipo multilocus único. Al considerar el conjunto de los 45 aislamientos de *C. sativus* como una población, la diversidad genética calculada en base a la diversidad de Nei tuvo un valor de $H = 0.153$. Al considerar la diversidad genética de los aislamientos en cada una de las cuatro regiones muestreadas, los valores de diversidad genética de Nei mostraron variaciones. Paysandú mostró la mayor diversidad genética ($H = 0.127$), mientras que Río Negro presentó el menor valor ($H = 0.082$). La diversidad genética fue 0.097 y 0.099 para Soriano y Colonia, respectivamente. El valor promedio de los valores por región fue de 0.101 (Tabla II.4). El índice de diversidad de Shannon's (I) reveló un patrón similar de valores al obtenido por el índice de Nei. El valor I para la población total fue $I = 0.265$, mientras que el promedio para las cuatro regiones fue de $I = 0.156$, oscilando entre 0.126 para la región Río Negro y 0.203 para Paysandú.

Tabla II.4. Parámetros de diversidad de 45 aislamientos de *C. sativus* en base a la región de colecta.

Región	n ^a	n° loci polimórficos	% loci polimórficos	H	I	LD	GD
Colonia	7	58	28,3	0,099	0,15	0,0312	1
Soriano	8	58	28,3	0,097	0,147	0,0407	1
Río Negro	7	50	24,4	0,082	0,126	0,0009	1
Paysandú	23	105	51,2	0,127	0,203	0,0187	0,95
Total	45	134	64,4	0,153	0,265	0,1072	0,87

^aTamaño de la muestra para cada región de colecta. H: Diversidad de Nei (1973), I: Índice de Shannon's, LD: Desequilibrio de ligamiento multilocus, GD: Diversidad genotípica.

Considerando el conjunto de aislamientos, el desequilibrio de ligamiento (LD) medido por el parámetro *rd* fue moderado ($LD = 0.10721$). Por su parte, los valores LD por región fueron: extremadamente bajos en Río Negro ($LD = 0.00093$), muy bajos en Paysandú ($LD = 0.0187$) y bajos en Colonia y Soriano ($LD = 0.0312$ y $LD = 0.0407$, respectivamente) con un valor promedio de 0.0229. La diversidad genotípica total fue alta ($GD =$

0.87). Cada región presentó un $GD = 1.00$ con la excepción de Paysandú ($GD = 0.95$).

A los efectos de analizar la diferenciación genética de los aislamientos por su región de origen se calcularon los valores de identidad genética imparcial (I_d) y distancia genética imparcial (D) (Tabla II.5). Los valores D fueron muy bajos, mostrando pequeñas variaciones entre los pares de regiones consideradas. Las regiones menos diferenciadas genéticamente entre sí fueron Colonia y Soriano ($D = 0.003$) y las más diferenciadas fueron Río Negro y Paysandú ($D = 0.015$). Acorde con estos resultados, los valores de I_d obtenidos fueron muy similares para todas las comparaciones pareadas, oscilando entre 0.985 para Río Negro-Paysandú, y 0.997 para Colonia-Soriano. Es de destacar que el valor I_d sigue siendo alto aún en parejas de poblaciones localizadas a más de 300 km entre sí como es el caso de Colonia y Paysandú.

Tabla II.5. Comparación de a pares de Identidad genética imparcial de Nei's (I_d) (Nei, 1978) (por encima de la diagonal) y Distancia genética imparcial de Nei (D) (por debajo de la diagonal) entre las cuatro regiones.

	Colonia	Soriano	Río Negro	Paysandú
Colonia		0.997	0.993	0.991
Soriano	0.003		0.991	0.995
Río Negro	0.007	0.009		0.985
Paysandú	0.009	0.005	0.015	

10.3. Análisis de agrupamiento basado en distancias

No se detectó un claro patrón de agrupamientos como puede observarse en el diagrama de Análisis de Coordenadas Principales (Fig.II.2), y en el Análisis de Conglomerados (Fig.II.4). Para ambos análisis la distribución de los aislamientos parecería indicar la presencia de una estructura principal de tres grupos, dos de ellos que incluyen a la mayoría de los aislamientos y el tercero que incluye un remanente de aislamientos más dispersos. En cambio, cuando se incluyeron en el análisis el aislamiento

C. sativus WRS 1903 de origen canadiense y el aislamiento 0601 de *P. teres* f. sp. *teres* de Uruguay, éstos divergieron notoriamente de la colección local de *C. sativus*, (ver Anexo III y IV).

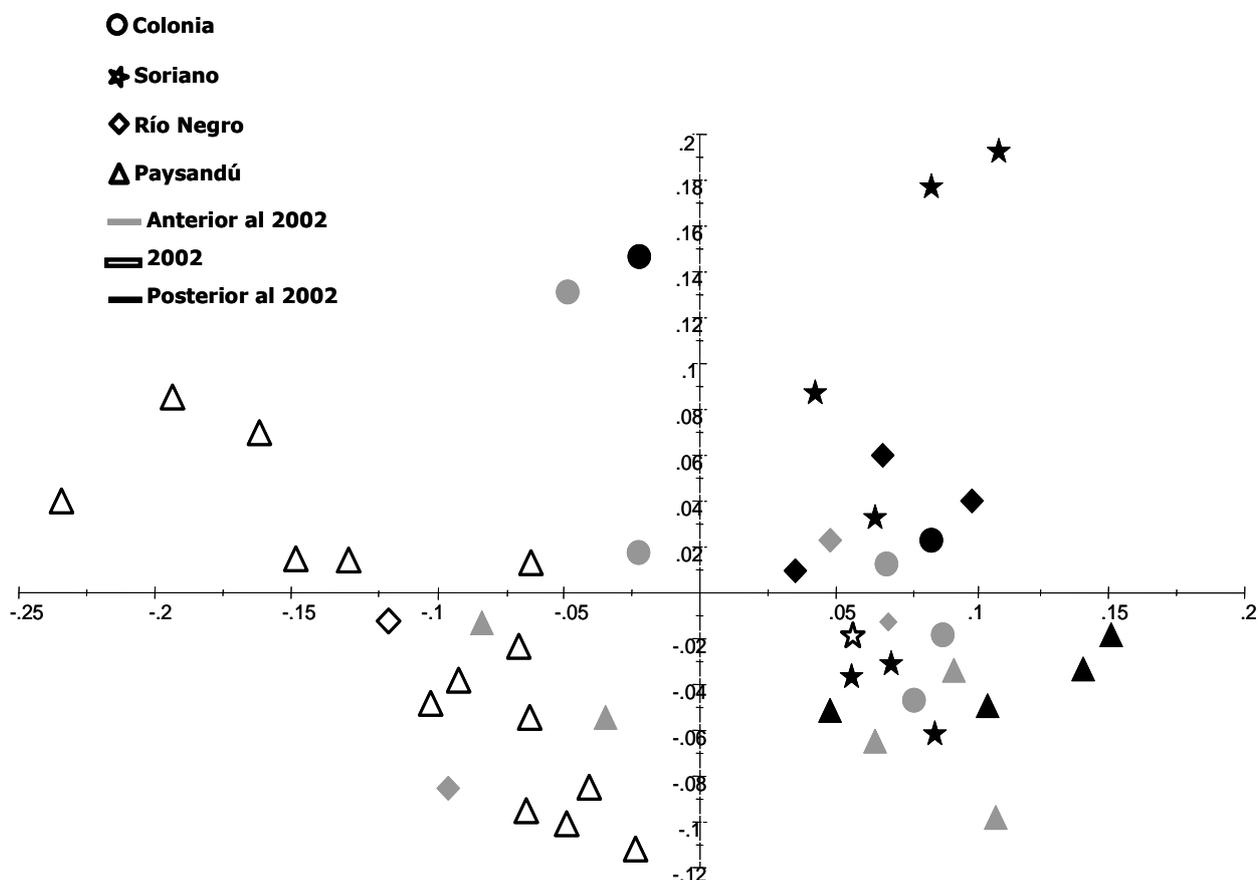


Figura. II.2. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de 45 aislamientos de *C. sativus* colectados en Uruguay en base a 205 productos de amplificación RAPDs. Los dos primeros ejes explican 26.52% de la variación observada.

El análisis de PCoA muestra que los aislamientos no se agruparon claramente de acuerdo a la región de colecta. Los aislamientos de cada región se distribuyeron prevalentemente en tres cuadrantes para el caso de Paysandú y Colonia y en dos cuadrantes para el caso de Soriano y Río Negro; en cada caso no existieron coincidencias en el patrón de distribución por cuadrantes. Comparativamente, la dispersión de los aislamientos de origen Paysandú es mucho mayor a la de los aislamientos de Colonia. La distribución de aislamientos de cada región por cuadrante no fue

homogénea. Un número importante (22) de aislamientos de todas las regiones se nuclearon en el entorno del eje horizontal a la derecha de la figura. En cambio, 14 de los 22 aislamientos colectados en Paysandú se localizaron específicamente en los dos cuadrantes situados a la izquierda.

Análogamente, tampoco se observó agrupamientos de acuerdo al año de colecta (Fig.II.2). De esta manera, para el período de colecta 1991-2001 (anterior al 2002) los aislamientos se encontraron dispersos en los cuatro cuadrantes; los aislamientos colectados en el año 2002 se distribuyeron en dos grupos, uno más disperso en el cuadrante superior izquierdo y otro más compacto localizado mayoritariamente sobre el cuadrante inferior izquierdo, quedando un solo aislamiento por fuera; mientras que, los aislamientos colectados con posterioridad al 2002 formaron un único grupo, disperso en todo el lado derecho y co-localizando con cerca de la mitad de los aislamientos muestreados con anterioridad al año 2002. Estos datos indicarían que la colecta realizada en el año 2002, con prevalencia de aislamientos colectados en Paysandú estaría afectando la estructura de la población. Sería interesante analizar en mayor profundidad si este resultado se asocia a condiciones climáticas severas que pueden haber contribuido a generar importantes niveles de la enfermedad. Resulta sugestivo que en el periodo (2001-2002) las primaveras fueron lluviosas y los cultivos de trigo y cebada se caracterizaron por severos ataques de fusariosis o como parece más probable a la combinación año-localidad de colecta (2002-Paysandú).

Lamentablemente, la mayoría de los aislamientos colectados en el 2002 provienen de Paysandú, por lo que no se pudo analizar el efecto combinación año-departamento en este caso. Para el intervalo de años más reciente (2003-2007) se observan patrones similares en los cuatro departamentos con prevalencia de un grupo único en los cuadrantes superior e inferior derecho. De esta manera, dejando aparte el caso particular de la combinación Paysandú-2002, podría decirse que la población de *C. sativus* mostró evidencias de haber estado conformada en dos grupos de acuerdo a los datos previos a 2002 y a un único grupo de acuerdo a las colectas en años más recientes.

Para comprender un poco más la particular divergencia que mostró Paysandú-2002 en relación al resto, en la Figura.II.3 se aportan detalles de las localidades de muestreo en dicho Departamento. Como puede apreciarse, la gran mayoría de los aislamientos colectados en la Estación Experimental Mario Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía-UdelaR se localizaron en el cuadrante inferior, mientras que mas alejados de este grupo y en el cuadrante superior se localizaron los aislamientos colectados en la localidad de San Nicanor. Este nivel de divergencia no es visualizado en las colectas más recientes (2003-2007). Como se explicó antes, esto podría deberse al pequeño tamaño de las muestras de colectas por departamento o a un cambio en la estructura de la población: en consecuencia, sería necesario a partir de estos resultados, diseñar un sistema de colecta más sistematizado teniendo en cuenta la representatividad de cada uno de los factores que puedan estar implicados en le evolución poblacional del patógeno.

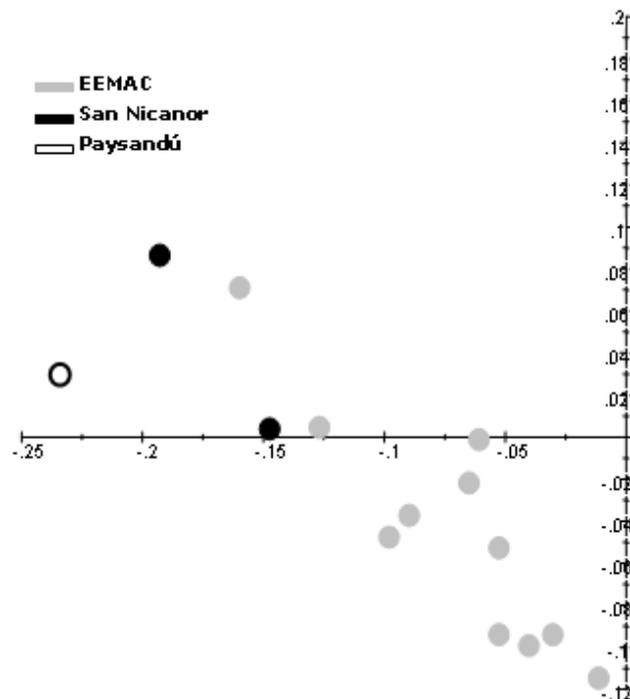


Figura II.3. Patrón de asociación de los aislamientos colectados en el departamento de Paysandú en el año 2002: EEMAC, San Nicanor, Paysandú (no se tiene más detalle).

Otro abordaje para visualizar el grado de asociación genética entre aislamientos es el Análisis de Conglomerados cuyo dendrograma resultante se presenta en la Figura II.4. Pueden distinguirse un total de tres grupo con subgrupos. Los mismos pueden caracterizarse por las combinaciones observadas entre origen y año de colecta. El grupo 1 corresponde mayoritariamente a los grupos observados en el cuadrante superior e inferior derecho del PcoA. En este sentido, están representados todos los departamentos y años de colecta, casi la totalidad de los aislamientos pertenecientes a los periodos de colecta anterior y posterior al 2002, y un solo representante del año 2002, que a su vez no pertenece a la localidad de Paysandú, siendo el 1A representado en su mayoría por colectas previas al 2002 (1991-2001) y el 1B por colectas posteriores a 2002 (2003-2007) y representantes del Soriano. El grupo 2, se integra por aislamientos mayoritariamente del 2002 y en menor medida años previos, estando el subgrupo 2A integrado por aislamientos de Río Negro y Paysandú y el 2B exclusivamente por origen Paysandú. En cuanto al grupo 3, se compone de origen Colonia de colectas previas al 2002 y recientes, no encontrando ningún aislamiento perteneciente al 2002. Sin embargo aislamientos de diferentes orígenes se distribuyeron en todos los grupos. Es de destacar que sería altamente valioso contar con un mayor número de colectas recientes de forma más sistematizada por departamento para corroborar estas conclusiones.

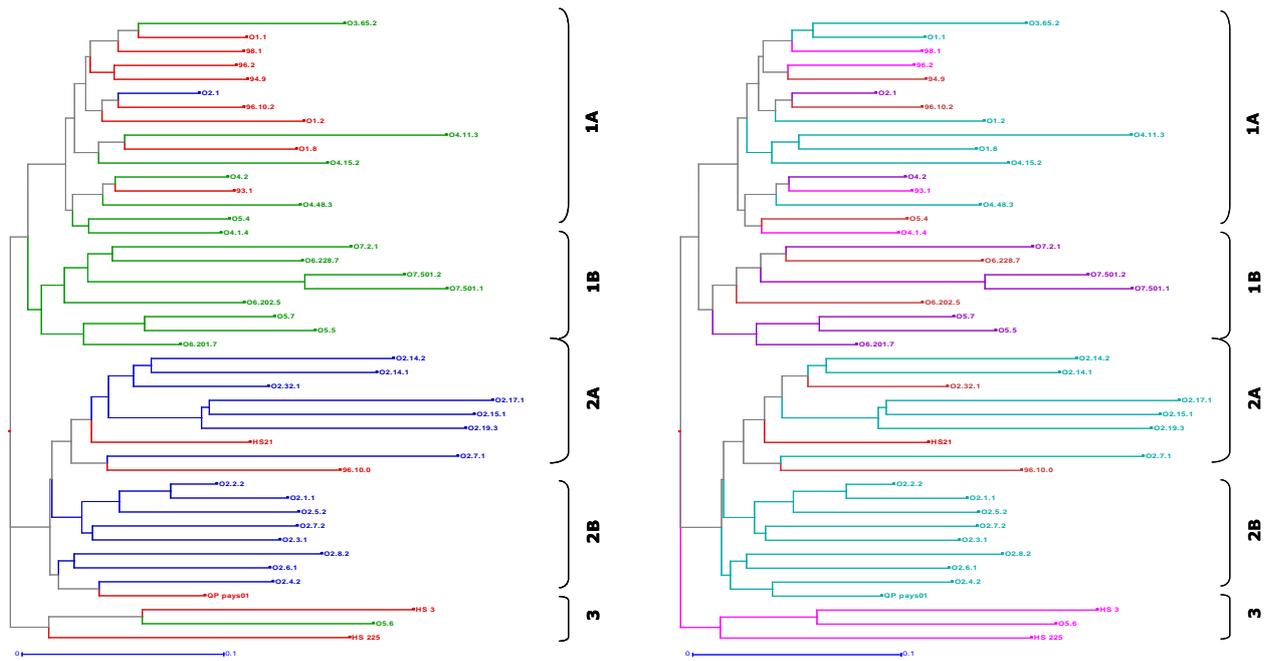


Figura II.4. Análisis de conglomerado realizado utilizando distancia Dice y método de agrupamiento *Neighbor Joining* de 45 aislamientos de *C. sativus*. En la imagen izquierda se observan los aislamientos diferenciándolos según el periodo de tiempo en el cual fueron colectados: **—** anterior al 2002 (1991-2001), **—** 2002 y **—** posterior al 2002 (2003-2007); en la imagen sobre la derecha se observan los aislamientos diferenciándolos según la región en la cual fueron colectados: **—** Colonia, **—** Soriano, **—** Río Negro y **—** Paysandú.

10.4. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Mediante un análisis de AMOVA se evaluó la estructura jerárquica entre grupos, los cuales fueron establecidos de acuerdo a: i) región de origen de los aislamientos (cuatro) y ii) fecha de colecta expresada en serie de años (tres) según se indica en la Tabla II.6.

Tabla II.6. Aislamientos de *C.sativus* (45) agrupados según región o periodo de colecta. Se indican los genotipos y el total de aislamientos que conforman cada grupo. Se excluyeron los aislamientos WRS 1903 de *C. sativus* y 0601 de *P. teres* f. sp. *teres*.

Colonia	REGION			PERIODO DE TIEMPO		
	Río Negro	Paysandú	Soriano	Anterior al 2002	2002	Posterior al 2002
HS3	94,9	HS21	02.1	93,1	02.32.1	04.1.4
93,1	96.10.0	QPpays01	04.2	96,2	02.1.1	05.7
HS225	96.10.2	01.1	05.5	98,1	02.2.2	05.5
96,2	02.32.1	01.2	5,7	94,9	02.3.1	06.202.5
98,1	05.4	01.8	06.201.7	96.10.2	02.4.2	06.228.7
04.1.4	06.202.5	02.1.1	07.2.1	96.10.0	02.5.2	07.2.1
05.6	06.228.7	02.2.2	07.501.1	01.1	02.6.1	03.65.2
		02.3.1	07.501.2	01.2	02.7.1	04.48.3
		02.4.2		01.8	02.7.2	05.4
		02.5.2		HS21	02.8.2	04.2
		02.6.1		QPpays01	02.14.1	05.6
		02.7.1		HS3	02.14.2	06.201.7
		02.7.2		HS225	02.15.1	07.501.1
		02.8.2			02.17.1	07.501.2
		02.14.1			02.19.3	04.11.3
		02.14.2			02.1	04.15.2
		02.15.1				
		02.17.1				
		02.19.3				
		03.65.2				
		04.11.3				
		04.15.2				
		04.48.3				
<hr/>						
Total=7	Total = 7	Total = 23	Total = 8	Total = 13	Total = 16	Total = 16

El análisis de AMOVA representado en la Tabla II.7, indica que el factor región de colecta explica únicamente el 4.67% de la variación total ($F_{ST} = 0.04672$) por lo que 95.33% de la variación observada se debe a diferencias entre aislamientos dentro de cada región. De todas maneras, el valor del componente de varianza V_a fue significativamente diferente de cero ($P \text{ value} < 0.001$) lo cual indicaría cierta diferenciación genética entre las regiones. De acuerdo a los valores obtenidos de los índices de F_{ST} pareados, las parejas de regiones menos diferenciadas serían Río Negro-Colonia y Río Negro-Paysandú con F_{ST} menores a 0.02; seguidas de Soriano-Colonia, Paysandú-Colonia y Río Negro-Soriano con F_{ST} menor a 0.06, finalmente las más diferenciadas resultaron ser Soriano-Paysandú (F_{ST} menor a 0.08). El grupo Soriano fue en promedio el más diferenciado del

resto de los grupos (F_{ST} media = 0.05243). Los valores obtenidos de F_{ST} específicos, que describen la diferenciación de los grupos a partir de una población ancestral común, sugerirían que los aislamientos de la región Paysandú serían los más ancestrales, seguidos de la región Soriano y Colonia y finalmente como grupo más diferenciado serían los aislamientos de la región Río Negro (Tabla II.8).

El valor de flujo génico promedio para todas las regiones fue elevado ($Nm = 10.2$) (Tabla II.7). Aislamientos colectados en regiones contiguas presentaron valores altos de flujo (Colonia-Soriano = 13.5, Soriano-Río Negro = 10.5 y Río Negro-Paysandú = 26.4). Sin embargo, el flujo genético más importante ($Nm = 46.3$) se encontró entre Colonia y Río Negro, en acuerdo con el mínimo de diferenciación encontrado entre ellas como se mencionó más arriba. Estas regiones no son contiguas, sino que entre ellas se localiza la región Soriano.

Tabla II.7. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) calculado para 44 aislamientos de *C. sativus* clasificados en cuatro grupos establecidos a partir de la localidad en la cual fueron colectados. (Para el aislamiento 04.15.2 no se cuenta con información de localidad de colecta).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	P-value
Entre regiones	3	49.869	0.55084 Va	4,67	<0.001
Dentro de la región	40	449.486	11.79049 Vb	95,33	<0.001
Total	43	499.455	11.79049		
Índice de fijación	F_{ST} : 0.04672	Nm : 10.2			

Tabla II.8. Estimación de diferenciación entre grupos según F_{ST} entre pares de grupos de *C. sativus* (por debajo de la diagonal) y nivel de flujo genético entre grupos según Nm (por encima de la diagonal). Los aislamientos bajo estudio fueron clasificados de acuerdo a la región de colecta descrita en la Tabla II.6. Todos los valores fueron significativos a $p < 0.05$. Se indica la

Grupo	Colonia	Río Negro	Paysandú	Soriano
Colonia		46.29032	9.35076	13.54436
Río Negro	0.01069		26.36837	10.48491
Paysandú	0.05076	0.01861		6.06546
Soriano	0.03560	0.04552	0.07616	
Media	0.03235	0.02494	0.04851	0.05243
F_{ST} Específicos	0.05971	0.06906	0.03195	0.05641

media de F_{ST} para cada grupo, así como el índice F_{ST} específico.

El análisis de la partición de la variabilidad detectada con los marcadores RAPDs también se realizó considerando el factor fecha de colecta de los aislamientos de acuerdo a tres períodos: antes del 2002 (1991-2001), 2002 y posterior a 2002 (2003-2007). En este caso, la fecha de colecta explica únicamente 9.76% de la variación total ($F_{ST} = 0.09747$), siendo de todas maneras significativamente diferente de cero, mientras que el 90.25% restante es explicado por la variabilidad dentro de cada fecha (Tabla II.9). Los grupos menos diferenciados entre sí son el grupo integrado por aislamientos colectados antes del 2002 y el grupo con aislamientos de años posteriores al 2002, con un valor de $F_{ST} = 0.04916$, mientras que los grupos más diferenciados entre sí corresponden a colectas realizadas en el año 2002 y el grupo posterior al 2002 ($F_{ST} = 0.14310$). El grupo 2002 fue en promedio el más diferenciado del resto de los grupos dado el valor promedio de F_{ST} media = 0.11233 (Tabla II.10).

Tabla II.9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) calculado para 45 aislamientos de *C. sativus* clasificados en tres grupos establecidos a partir del año o periodo de años en el cual fueron muestreados.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	P-value
Entre grupos	2	56.720	1.17226 Va	9,76	<0.001
Dentro de grupos	42	455.880	10.85428 Vb	90,25	<0.001
Total	44	512.600	12.02655		
Índice de fijación	F_{ST} : 0.09747	Nm : 4.6			

Tabla II.10. Estimación de diferenciación F_{ST} entre pares de grupos de *C. sativus* (por debajo de la diagonal) y valor de Nm (por encima de la diagonal). Los aislamientos bajo estudio fueron clasificados en tres grupos establecidos a partir del año o período en el cual fueron colectados. Grupo 1: anterior al 2002 (1991-2001), Grupo 2: 2002 y Grupo 3: posterior al 2002 (2003-2007). Todos los valores fueron significativos a $p < 0.05$. Se indica la media de F_{ST} para cada grupo, así como el índice F_{ST} específico.

Grupo	Anterior al 2002	2002	Posterior al 2002
Anterior al 2002		5.63108	9.67060
2002	0.08155		2.99410
Posterior al 2002	0.04916	0.1431	
Media	0.06536	0.11233	0.09613
F_{ST} Específicos	0.10161	0.09595	0.09564

10.5. Estructura poblacional

El análisis de la presencia de grupos diferenciados en la población global mediante un abordaje basado en modelos utilizando el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard y Wen, 2003) indicó ausencia de estructura. Utilizando el valor de ΔK (Evanno *et al*, 2005) en lugar del máximo valor de $\ln(K)$, se identificó el valor de K grupos. El máximo valor se asoció a $K=1$, indicando que todos los individuos formaron una única población (Fig.II.5).

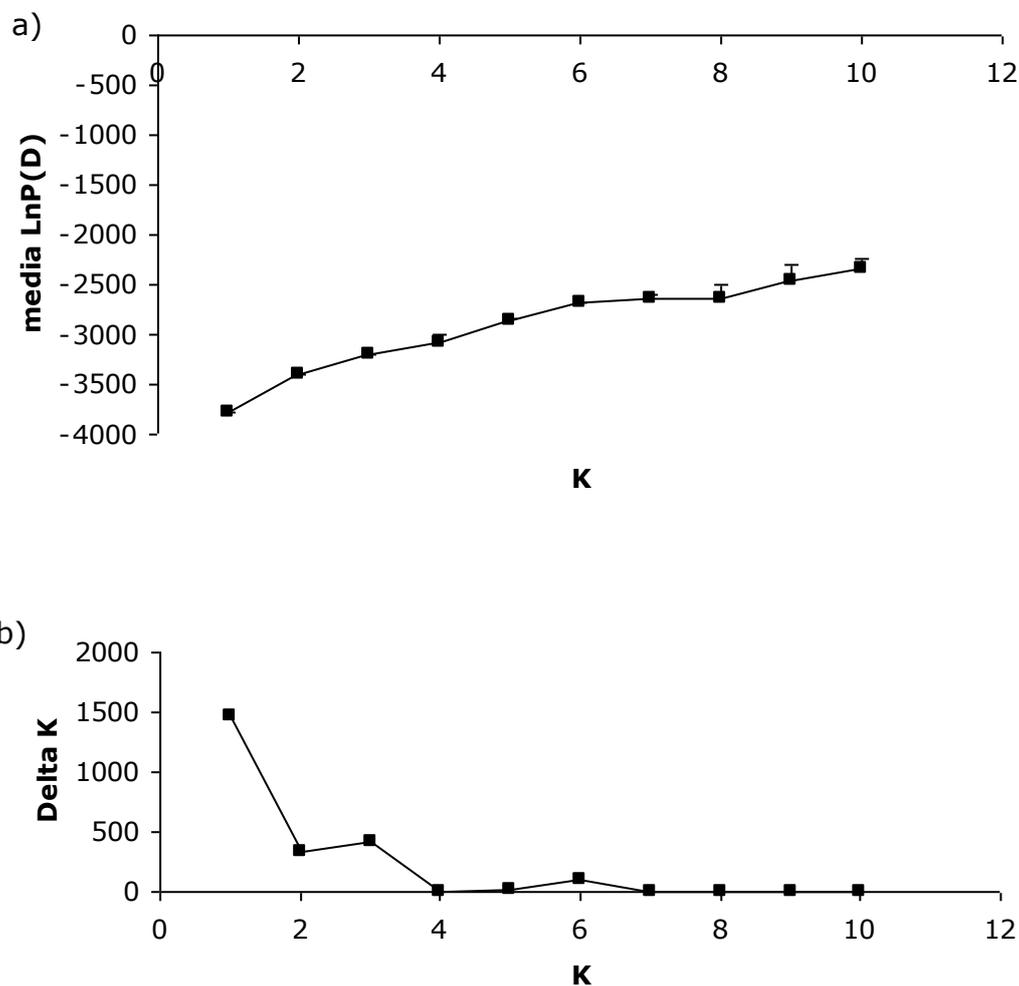


Figura II.5. Análisis de estructura. El número mas probable de agrupaciones o clusters (K) para la colección local de aislamientos de *C. sativus* según a) valores promedio de $\ln P(D)$ para cada K de 1 a 10 y b) valores de ΔK estimados para cada valor de K .

11. DISCUSIÓN

En este estudio, la diversidad genética de una población de 45 aislamientos de *C. sativus* colectados de cuatro diferentes regiones de cultivo de cebada en Uruguay, fue analizada utilizando 205 loci RAPDs generados mediante 20 pares de iniciadores.

Esta colección de 45 aislamientos locales de *C. sativus*, mostró un alto nivel de diversidad genética a nivel del ADN. Se destaca el alto número de bandas polimórficas obtenidas (134 bandas), que aumentaría la probabilidad de cubrir la extensión del genoma de la especie y un alto porcentaje de polimorfismo (65.8%). Estos valores explicarían en primer término por la alta variabilidad genética entre los materiales, característica intrínseca de cada conjunto de genotipos. Además, este alto nivel concuerda con el esperado para especies con un sistema de reproducción asexual y que presentan mecanismos como la hibridación somática, que favorecen la generación y el mantenimiento de la variabilidad. Esta alta diversidad entre los aislamientos se apoya en la obtención de haplotipos multilocus únicos diferenciales para cada una de las 45 accesiones evaluadas. Por último, el alto nivel de polimorfismo encontrado indicaría una alta eficiencia del sistema de marcadores RAPD empleado. De hecho, los 20 iniciadores RAPD empleados en este trabajo resultaron de una doble selección. En el primer paso, se evaluó la mayoría de los iniciadores reportados en la bibliografía en cuatro aislamientos seleccionados al azar. En un segundo paso, estos 20 iniciadores fueron probados y evaluados en nuestra colección, no descartándose ningún iniciador ya que todos produjeron perfiles de bandas nítidas y reproducibles.

En comparación con datos reportados para esta especie el nivel de diversidad genética detectado en esta colección fue bajo. En este sentido, el total de bandas obtenidas (205 bandas), fue menor al reportado por Muller *et al* (2005), que evaluando 20 aislamientos de *C. sativus* aislados de trigo, generaron un total de 282 bandas RAPD. Por otra parte el polimorfismo detectado (65.8%) en nuestro trabajo fue menor al reportado por Muller *et*

al (2005) (80.9%). Sin embargo estos autores reportaron una baja variabilidad genética, en donde 19 de los 20 aislamientos presentaron un 78% de similitud. Nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis de estos autores, que establece que la escasa diversidad genética presente entre los aislamientos de *C. sativus* se explica por provenir de un número reducido de regiones geográficas de Brasil. Zhong y Steffenson (2001) evaluaron la diversidad genética de *C. sativus* basada en la virulencia y marcadores AFLP. Noventa y cinco marcadores AFLP polimórficos fueron encontrados con ocho pares de cebadores, en donde cada aislamiento exhibió un patrón AFLP único. El análisis de conglomerados no reveló una estrecha correlación entre patotipos y grupos de AFLP. En el mismo estudio, tampoco se encontró una correlación estrecha entre la similitud genética medida por marcadores AFLP y el origen geográfico, lo que sugiere que estas cepas se obtuvieron a partir de la misma población de origen fundadora y que se diseminaron de un área a otra, en asociación con sus hospederos. Por otro lado, Gyawali (2010) y Knight *et al*, (2010), obtuvieron 127 y 134 fragmentos, analizados con 3 y 22 AFLP, en una colección de 289 y 48 aislamientos respectivamente.

El análisis RAPD reveló una baja diversidad génica global al considerar el conjunto de 45 aislamientos de *C. sativus*, con un valor de $H=0.153$ (el máximo sería 0.5 si la frecuencia de ausencia y la de presencia de cada banda fueran equilibradas), este valor fue mas bajo que el reportado para la población de *C. sativus* de Dakota del Norte $H=0.292$, para 86 aislamientos, de dimensiones similares a las de Uruguay, en un área de muestreo razonablemente equivalente a la desarrollada en este trabajo (Gyawali, 2010). Aunque los marcadores utilizados en ambos trabajos fueron diferentes: RAPDs en nuestro trabajo y AFLP en Gyawali (2010) en ambos casos se trata de marcadores dominantes, bialélicos. Por lo tanto, las diferencias observadas en ambos trabajos se deberían a una distribución más sesgada de los alelos en la población de *C. sativus* en Uruguay. Podría postularse también que ambos marcadores podrían estar explorando zonas diferentes del genoma. Los valores de H para cada región estimados en este trabajo aportan información preliminar dado el pequeño número de aislamientos colectados en cada región (menor a 30 aislamientos por

región), por lo que el muestreo realizado pudo no haber sido suficiente para capturar toda la diversidad genética presente. Valores similares de H ($H=0.16$) fueron reportados por Lee y Neate (2007) quienes estudiaron la estructura genética poblacional del patógeno *Septoria passerinii*. Por otro lado, valores de H entre 0.07 y 0.21 fueron reportados para *P. teres* (Serenius, 2006) utilizando AFLP. Por lo tanto este parámetro de medición de la diversidad genética indica una mayor diversidad en ND que en Uruguay (siendo baja de todas maneras).

Otro parámetro indicador de la diversidad genética de la colección son los resultados obtenidos sobre la informatividad de los marcadores. La capacidad informativa de los marcadores empleados evaluados a través del parámetro PIC (Contenido de información Polimórfica) fue alta. El valor promedio de $PIC_{\text{iniciador}}$ 0.21, refleja la utilidad de los marcadores en la caracterización genética de esta especie, para la cual se cuenta con escasos datos moleculares en nuestro país. Del estudio detallado del informatividad de cada iniciador, se destacó el iniciador OPE18 con alta capacidad de procesamiento de la información, obteniendo un valor $PIC_{\text{iniciador}}$, de 0.37, sugiriendo un alto rendimiento específico y poder discriminatorio. Este iniciador se presenta como potencialmente útil en investigaciones futuras que involucren la obtención de perfiles específicos del patógeno, el desarrollo de *fingerprinting* y de marcadores moleculares específicos para la especie.

Una forma de medir la complejidad de una población es la estimación del número y frecuencia de los genotipos multilocus presentes mediante el Índice de Shannon`s. Nuestros resultados indican que globalmente, *C. sativus* de Uruguay tendría un valor de $I=0.265$, mientras que Gyawali (2010) obtuvo un valor cercano al doble para la población de Dakota del Norte, $I=0.447$, indicando una estructura poblacional más compleja en Dakota del Norte. Alternativamente, el mayor valor obtenido por Gyawali podría explicarse por el hecho que el tamaño de la muestra en ND (85 aislamientos) fue cerca de dos veces mayor que la utilizada en Uruguay (45 aislamientos). Resulta interesante señalar, que en ambos trabajos no se detectaron haplotipos replicados (clones) por lo que el parámetro de

diversidad genotípica GD fue muy alto para Gyawali (GD=1) y para Uruguay (GD=1). Este resultado implica que la contribución de la clonalidad a la diversidad genética total es escasa, lo cual no es esperado en una especie de reproducción asexual.

A los efectos de estimar de la contribución de la clonalidad o recombinación de forma independiente del tamaño de la muestra se estimó el parámetro de desequilibrio de ligamiento a nivel multilocus rd . Se espera que en una población con máxima clonalidad el valor de rd debería ser cercano a 1, mientras que en una población panmítica debería ser cero (equilibrio gamético). El desequilibrio de ligamiento (LD) proporciona información importante acerca de la biología poblacional del hongo, como la reproducción sexual o eventos de recombinación en las poblaciones. En este estudio se encontraron valores de LD muy bajos (0.0009-0.0407). Sin embargo, el valor calculado para la población total, representada por los 45 aislamientos fue moderado (LD= 0.1072), indicando que eventos de recombinación están operativos en la población. Valores similares de LD (LD= 0.111) fueron obtenidos por Gyawali (2010). Los valores de LD por región son únicamente preliminares debido al pequeño tamaño de la muestra. Brown (1975) y Brown *et al* (1980) hacen referencia a que el tamaño de la muestra debe ser mayor a 100 para que la estimación del valor de LD sea más precisa. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el número de individuos de nuestras regiones son muy pequeños, los valores de LD estarían siendo sobrestimados. Las mezclas (*admixture*) por migración del patógeno por semillas también condicionan el valor de LD, lo cual indicaría que valores aún menores de desequilibrio de ligamiento y por ende sistemas de recombinación realizarían contribuciones aún mayores a la diversidad presente en cada región. Zhong y Steffenson (2001) reportaron que inesperadamente algunas cepas de *C. sativus* de diferentes regiones del mundo se agrupaban en el mismo grupo mediante análisis con AFLP. Ellos sugieren que la migración de hongos patógenos puede haber ocurrido por transmisión mediante semilla, ya que *C. sativus* es un patógeno que se dispersa por semilla infectada (Mathre, 1982). Por lo tanto una población mezcla y el pequeño tamaño de la misma podrían estar

explicando el valor moderado de LD reportado para la población total (LD= 0.1072).

En acuerdo con lo anterior, la alta diversidad genotípica encontrada en este estudio (DG=1) en oposición a la presencia esperada de importantes niveles de clonalidad de acuerdo al sistema reproductivo asexual del patógeno en condiciones de campo, sugiere que la recombinación juega un rol importante en el desarrollo de la estructura poblacional del patógeno. Cabe señalar que la diversidad genotípica es independiente de la diversidad genética, es decir, el hecho de tener muchos genotipos diferentes no garantiza un número alto de alelos diferentes para cada locus y tener un número bajo de genotipos en una población no implica necesariamente que la variación genética también sea baja (Eguiarte *et al*, 2007). Por lo tanto, valores bajos a moderados de desequilibrio de ligamiento, así como altos valores de diversidad genotípica para un hongo de reproducción asexual sugiere la presencia de mecanismos no sexuales de recombinación. El estado sexual de *C. sativus* no ha sido reportado que ocurra en la naturaleza, sin embargo, la ocurrencia de recombinación parasexual en la especie ha sido demostrada que ocurre *in vitro* (Tinline, 1988). Es por esto que se considera a la reproducción asexual como el mecanismo principal del ciclo de vida de *C. sativus*. Sin embargo se han reportado valores elevados en cuanto a diversidad genética para poblaciones naturales de *C. sativus* (Gyawali, 2010; Zhong y Steffenson, 2001). La elevada diversidad genética encontrada para este patógeno puede ser debida a varias razones. En primer lugar, rearrreglos mediados por transposones pueden introducir variabilidad en poblaciones de hongos ascomycetes que se reproducen asexualmente (Kistler y Miao, 1992; Fierro y Martín, 1999; Daboussi y Capy, 2003). La alta variación cariotípica y el polimorfismo en el largo cromosómico están asociados a la falta de la etapa sexual en los hongos ascomycetes. Con respecto a esto, Zhong y Steffenson (2007) reportaron un alto grado de polimorfismo cromosómico y aberraciones cromosómicas como translocaciones, duplicaciones y deleciones, en aislamientos de *C. sativus*. Altos niveles de variación cariotípica se han encontrado en otros hongos patógenos modelo, como por ejemplo *Fusarium oxysporum* y *Magnaporthe grisea* (Boehm *et al*, 1994; Alves-Santos *et al*, 1999; Nitta *et al*, 1997). Se ha reportado que existe

variación mediada por transposones en el locus de Tox1 en *Cochliobolus heterostrophus* (Kodama *et al*, 1999) y en el locus de Tox2 de *Cochliobolus carbonum* (Ahn y Walton, 1996). Kistler y Miao (1992) sugirieron que altos niveles de variación cariotípica pueden ser encontrados en hongos con reproducción asexual, mientras que los hongos que se reproducen sexualmente tienden a tener menores niveles en cuanto a esta variación. Por lo tanto la evidencia de altos niveles de variación cariotípica (Zhong y Steffenson, 2007) y la ausencia de reproducción sexual en la naturaleza, soportan la hipótesis de que la variación genética mediada por transposones puede ser uno de los factores en generar la diversidad genética en poblaciones de *C. sativus*. Segundo, niveles elevados de variación genética pueden ser debidos a recombinación parasexual entre individuos dentro de las poblaciones. Esto último está de acuerdo con Zhong y Steffenson (2001), quienes especularon que la alta variabilidad encontrada para la población de *C. sativus* podía deberse a intercambio genético entre aislamientos debido a eventos de recombinación parasexual. La recombinación parasexual junto con la mutación son la fuente última de generación de la variación en hongos patógenos (Burdon y Silk, 1997). La recombinación parasexual se inicia por la fusión de hifas pertenecientes al mismo grupo de compatibilidad vegetativa, seguido por la formación de un heterocarionte (Pontecorvo, 1956). Durante la recombinación parasexual, los dos núcleos haploides se fusionan para formar un núcleo diploide, donde los cromosomas homólogos se someten a recombinación genética. Finalmente, el núcleo diploide comienza a perder cromosomas a través de divisiones mitóticas, formando estados intermedios de diploides parciales en algunos individuos antes de retornar al estado haploide. Este tipo de recombinación ha sido demostrada que ocurre en *C. sativus* en el laboratorio (Tinline, 1988), sin embargo no se ha confirmado aún si existe en la naturaleza. Si la recombinación parasexual tuviera un rol importante en la generación de diversidad en las poblaciones de *C. sativus*, entonces más estudios deberían hacerse, mediante el uso de marcadores codominantes, tales como RFLP, SSR o SNP, para demostrar que individuos con diploides parciales ocurren en la naturaleza. Ejemplos de ocurrencias de recombinación somática han sido demostrados para *Puccinia graminis*

(Watson y Luig, 1958), *Rhynchosporium secalis* (Salamati et al, 2000) y *C. sativus* (Gyawali, 2010).

Resulta interesante señalar que en una pequeña muestra de aislamientos de *C. sativus* de Uruguay analizada por Zhong y Steffenson (2001), se verificó la existencia de los dos tipos de apareamientos MAT-1 y MAT-2, lo cual indicaría el potencial de reproducción sexual en nuestro país, un número más amplio de muestras deberían ser analizadas, así como relevar la distribución de los dos loci en nuestro país.

La metodología elegida para la efectiva clasificación de las accesiones fue el análisis jerárquico de conglomerados, método estadístico que revela las relaciones a niveles crecientes de similitud al producir un dendrograma que claramente enfatiza las similitudes y diferencias entre accesiones. El dendrograma seleccionado fue el generado con el coeficiente de distancia genética de Dice y el método de agrupamiento *Neighbour Joining*. Los grupos definidos *a priori* reflejan la estrategia de colecta empleada para establecer la colección de aislamientos, muestreando las cuatro regiones del país más importantes en cuanto al cultivo cebada, tratando así de lograr cubrir la variabilidad genética a nivel local. De acuerdo a nuestros resultados, estos cuatro grupos no mostraron un alto grado de diferenciación genética entre sí, ya que las accesiones integrantes de cada grupo se distribuyeron en forma general entre los tres grupos principales detectados en el dendrograma. Estos resultados también están de acuerdo con los elevados valores de identidad genética y bajos valores de distancia genética, encontrados para todos los grupos.

El análisis de Coordenada Principales (PcoA), método de ordenamiento que centra a los genotipos preservando las distancias entre puntos con la mayor resolución posible, al utilizar los dos ejes más explicativos permitió obtener un gráfico en un plano que reflejó un agrupamiento similar al que mostró el dendrograma. A diferencia del Análisis de Conglomerados, el análisis de PcoA otorga más libertad en la expresión gráfica de las relaciones genéticas establecidas en la matriz de distancia. Las relaciones entre los genotipos están determinadas por la

posición en que se disponen en un espacio reducido. Debido a que el número de aislamientos muestreados en cada región es bajo, las diferencias observadas podrían simplemente deberse a errores de muestreo; alternativamente podría estar explicando una cierta tendencia a mayor diversidad genética de *C. sativus* progresando desde el sur al norte en el litoral agrícola. La coincidencia observada en los resultados logrados con ambas metodologías de análisis multivariado valida el agrupamiento obtenido para las 45 accesiones estudiadas, reforzando la similitudes genéticas entre los grupos. Ambas metodologías revelaron moderada diversidad genética en cuanto a la caracterización de los 45 materiales pertenecientes a la colección de *C. sativus* del país. Los diferentes aislamientos se distribuyeron en los cuatro cuadrantes del plano PcoA. Sin embargo, al incluir en el análisis a un aislamiento de *C. sativus* perteneciente a Canadá y a un aislamiento de *P. teres* f. sp. *teres*, el agrupamiento de los materiales locales en el PcoA fue mucho más marcado, agrupándose los 45 individuos en solo dos cuadrantes, permitiendo observar más claramente las relaciones entre ellos, reflejando entonces un nivel reducido de diversidad genética en la colección local (ver Anexo IV).

La metodología de AMOVA fue originalmente diseñada para su aplicación en sistemas haploides utilizando en el análisis ADN de origen mitocondrial (ADNmt) el cual constituye un único grupo de ligamiento (Excoffier *et al*, 1992; 2005). A partir de ese momento este método se tornó en una de las metodologías más empleadas para estudiar la partición de la variabilidad genética, en trabajos que involucran poblaciones naturales examinadas con marcadores moleculares de herencia dominante. Actualmente, el uso del AMOVA se ha adoptado ampliamente, siendo una metodología útil en la caracterización de la estructura genética. El propósito principal del AMOVA es perfilar la extensión de la diferenciación genética entre y dentro de los grupos examinados, a través de la estimación de los componentes de varianza.

Los resultados obtenidos del AMOVA muestran una extremadamente baja diferenciación entre los grupos, tanto al ser probada la hipótesis de clasificación de los materiales en grupos que reflejan las cuatro regiones de

colecta ($F_{ST} = 0.04672$), así como bajo la hipótesis de clasificación considerando el periodo de tiempo en el cual fueron colectados ($F_{ST} = 0.09747$). Es importante notar que a pesar de la significativa diferencia ($p < 0.001$) entre los grupos revelado por los valores de F_{ST} , este parámetro puede verse ser sobre-estimado dado el pequeño tamaño de los grupos evaluados (menor a 30 aislamientos por grupo). Estos valores se pueden considerar bajos en comparación con los que se reportan comúnmente para hongos ascomycetes. Gyawali (2010) reportó un valor de F_{ST} moderado ($F_{ST}=0.196$) para cuatro poblaciones de *C. sativus*, tres de Dakota del Norte y una de Australia, al analizar aislamientos obtenidos de dos hospederos, trigo y cebada y dos tejidos. Lee y Neate (2007) informaron un G_{ST} general de 0.238 para *Septoria passerinii* en los Estados Unidos. Adhikari *et al* (2008) encontraron un F_{ST} significativo de 0,288 en una población de *Phaeosphaeria nodorum* de los EE.UU. Milgroom y Lipari (1995) reportaron un nivel similar de diferenciación de la población ($G_{ST}= 0,20$ a $0,31$) para el patógeno *Cryphonectria parasitica* en América del Norte.

De acuerdo a Burdon y Silk (1997), la fuente principal de generación de variabilidad en los hongos fitopatógenos se debe a mecanismos de mutación y recombinación. Estos mecanismos de generación de variabilidad, pueden ser suplementados con el flujo génico entre las poblaciones de la misma especie, a través de los propágulos que se dispersan de un área epidemiológica a otra. El flujo génico como único proceso de evolución puede resultar en la dispersión de genes o secuencias de ADN, genotipos y hasta en el establecimiento de una población entera en una región diferente (Mc Donald y Mc Dermott, 1993).

Los bajos valores de F_{ST} encontrados tanto al agrupar por región o por periodo de colecta, están apoyados por los altos valores de flujo génico en ambos casos. El flujo génico también puede tener un impacto significativo en la estructura genética de una población, ya que en su ausencia, poblaciones aisladas pueden diferenciarse en término de alelos presentes y frecuencias alélicas debidas a deriva genética mediante acumulación de alelos exclusivos. La identidad genética de las

subpoblaciones indicó que estas son muy cercanas, de hecho la distancia geográfica entre ellas es pequeña.

Los bajos valores de F_{ST} también indican que la subdivisión geográfica entre las cuatro subpoblaciones es mínima. Si el alto grado de similitud es debido exclusivamente al flujo de genes y las poblaciones están en equilibrio estable, entonces el F_{ST} se puede utilizar para estimar el Nm , el número promedio de migrantes intercambiados por generación, lo cual determina la falta de subdivisión poblacional. El Nm promedio fue de 10.2 y 4.6 para región o periodo de colecta respectivamente, lo que sugiere que el nivel de flujo génico es de 4-10 veces mayor al necesario para prevenir que las poblaciones diverjan por deriva génica. Los elevados valores de flujo encontrados siempre que se analizó la región Río Negro, aunque no eran los esperados, podrían explicarse por el mayor tráfico de semilla que existe desde Río Negro hacia las demás regiones, por lo que es de esperar valores altos de flujo génico siempre que esté presente el grupo Río Negro. Bajos valores de F_{ST} también han sido reportados para poblaciones de otros patógenos de plantas, como por ejemplo, *Rynchosporium secalis* (Salamati et al, 2000) y *Mycosphaerella graminicola* (Linde et al, 2002), concluyendo los autores en estos casos que estos hongos existen como una población bien mezclada.

El análisis AMOVA adicionalmente permitió obtener un conjunto de estadísticos F_{ST} pareados entre grupos, comparables por ejemplo con la distancia genética de Nei calculada a partir de la frecuencia de cada marcador entre los distintos grupos. De esta manera los valores de F_{ST} entre dos poblaciones cualquiera pueden ser interpretados como la distancia inter-poblacional promedio entre estas dos poblaciones (Huff, 1997). Los valores de diferenciación genética entre grupos detectada con los marcadores RAPD representarían el rol de la deriva genética en la diferenciación de los grupos, porque estos marcadores son selectivamente neutros y no son blanco de los procesos de selección natural. Los valores de F_{ST} pareados entre regiones o periodos de colecta aunque significativos fueron muy bajos (rango 0.01 a 0.07) indicando una muy pobre diferenciación entre los grupos de aislamientos analizados. Valores

superiores de F_{ST} pareados fueron obtenidos por Gyawali (2010) cuando analizó al grupo de aislamientos de Dakota del Norte ya sea colectados en hojas infectadas, versus raíces y coronas con podredumbre (F_{ST} pareado 0.18 a 0.26), indicando que en la especie *C. sativus*, la especie hospedera, el tejido infectado y las regiones geográficas de mayor distancia (Dakota del Norte y Australia) pueden generar procesos de diferenciación poblacional. Serenius (2006) estimó F_{ST} pareados entre campos de Finlandia para *Pyrenophora teres* de 0.31 a 0.39, sin embargo en algunos estados de Australia fue de 0.22. Nuestro trabajo es el primero en estudiar la diferenciación genética en hojas infectadas de cebada. Los valores de la media de F_{ST} resultaron bajos para todos los grupos, ya sea mediante la agrupación por región o por periodo de colecta. Bajo esta hipótesis la media de los valores de F_{ST} refleja en promedio el grado de diferenciación de un grupo con respecto a los restantes. Esta baja diferenciación entre grupos concuerda con el resultado observado del análisis PcoA, en el cual no se observa una diferenciación clara entre los grupos, aunque existe un cierto patrón de agrupamiento.

Finalmente, del análisis AMOVA se obtuvieron los valores de F_{ST} específicos, los cuales reflejan el grado de evolución de cada grupo a partir de una población hipotética ancestral, la cual habría sido dividida en los diferentes grupos considerados en la estructura genética. El F_{ST} específico permitiría entonces detectar si algún grupo contribuyó diferencialmente al valor promedio de F_{ST} , indicando que alguna fuerza evolutiva (selección, cuello de botella, etc.) estaría actuando especialmente sobre ese grupo (Excoffier *et al*, 2005). Aunque no fueron comparados estadísticamente, los valores de F_{ST} específicos no presentaron valores diferenciales entre grupos bajo la estructura de ordenamiento de los aislamientos según localidad o periodo de colecta.

Por último, el análisis de estructura poblacional realizado mediante el programa STRUCTURE (Pritchard *et al*, 2000; Pritchard y Wen, 2003), arrojó un valor de $K=1$, lo cual significa que los 45 aislamientos utilizados en este estudio estarían estructurados en un solo grupo y que todos pertenecen a una población grande, independientemente de su origen

geográfico. Este valor está de acuerdo con el hecho de que la diversidad encontrada en la población fue baja, así como también con los elevados valores obtenidos para la estimación del flujo génico entre las subpoblaciones definidas a priori.

En resumen, la moderada diversidad genética (expresada como diversidad genética de Nei e Índice de Shannon), los bajos valores de desequilibrio de ligamiento, y la alta diversidad genotípica, soportan la hipótesis de ocurrencia de un posible evento de recombinación sexual, parasexual o mediado por transposones, ya que si la población fuera completamente de reproducción asexual se esperaría alta frecuencia de individuos clonales y pocos genotipos en alta frecuencia.

En conclusión, nuestros datos son consistentes con la hipótesis de que un flujo génico homogenizador de genes se produce en la población de *C. sativus*, posiblemente a través de la dispersión de la semilla de cebada infectada entre diferentes regiones agrícolas de Uruguay. De esta manera, las poblaciones evaluadas en el presente estudio serían parte de una población del patógeno mucho más grande, que incluye todas las regiones de cultivo de cebada del país. En consecuencia, pensamos que para que la resistencia del hospedero a este patógeno sea efectiva debe ser desarrollada en contra de la especie en su conjunto y no en contra de un solo genotipo.

La información generada sobre la estructura poblacional y extensión de la diversidad genética de la población de *C. sativus* aislados de cebada en Uruguay puso en evidencia el alto potencial evolutivo de la especie pese a que la reproducción sexual no sea haya determinado en la naturaleza. En efecto, en oposición a la presencia de un nivel de clonalidad máximo, se detectó una importante diversidad genotípica. Es más, no se detectaron haplotipos multilocus repetidos (clones). Por el contrario, se detectaron niveles bajos y moderados de desequilibrio de ligamiento gamético, indicativos de contribución no despreciable de mecanismos que faciliten la recombinación genética. Los recombinantes no serían derivados de la reproducción sexual sino de otros mecanismos no sexuales de

recombinación, ya citados para el género *Cochliobolus* tales como: rearrreglos cromosómicos mediados por transposones, ciclos parasexuales que implican al fusión de núcleos haploides diferentes, eventos de recombinación mitótica y posterior eliminación de cromosomas en posteriores mitosis generando la posibilidad de diploides parciales. El bajo valor de diversidad génica a nivel global, como en cada región (indicativo de frecuencias alélicas similares y por lo tanto escasa presencia de alelos exclusivos), el alto valor de flujo genético detectado (número de migrantes por generación) en correspondencia con la baja diferenciación genética observada entre regiones y la ausencia de estructura de acuerdo con un análisis bayesiano, estaría indicando que los aislamientos originalmente muestreados en diferentes regiones y periodos de colecta formarían una única población. Considerando que la reproducción sexual no se desarrollaría en la naturaleza además de ser relativamente poco exitosa en condiciones de laboratorio, que las características morfológicas de las esporas asexuales (de gran tamaño) las hacen no aptas a la migración por viento a grandes distancias, el mecanismo más plausible que aseguraría el flujo genético a distancias (entre regiones y entre periodos de colecta) sería la movilización del patógeno a través de semillas contaminadas entre las diferentes regiones o algún otro mecanismo (maquinaria o la mano del hombre). Esto significa que si un nuevo recombinante surge en alguna región, podría fácilmente dispersarse en todas las regiones en poco tiempo. La prevalencia de dicho recombinante estaría sujeto a la capacidad adaptativa del dicho genotipo bajo diferentes presiones de selección (ambientales, hospederos). De esta manera, un quiebre de resistencia de un genotipo en una región de forma exclusiva alerta sobre la posibilidad de que en poco tiempo, las variantes alélicas de dicho aislamiento se diseminen en las demás regiones.

El seguimiento del comportamiento sanitario en cuanto a mancha borrosa en un mismo juego de genotipos de cebada debería entonces realizarse en las diferentes regiones de cultivo dado el alto potencial evolutivo del patógeno y los altos flujos genéticos entre las poblaciones.

12. CONCLUSIONES

- La moderada diversidad genética observada, el significativo desequilibrio de ligamiento y la alta diversidad genotípica detectados en la colección de *C. sativus* de Uruguay utilizando marcadores moleculares RAPD, indican la ocurrencia de eventos de recombinación genética
- Los altos valores de flujo genético entre regiones (Departamentos) detectados en la población evaluada indican que los aislamientos de *C. sativus* serían parte de una población del patógeno mucho más grande, que incluye todas las regiones de cultivo del Uruguay. En consecuencia, pensamos que para el desarrollo de resistencia efectiva sería necesario que en el proceso de selección por resistencia se incluyan aislamientos representativos de toda la zona agrícola y no un solo genotipo.
- Los factores región y periodo de colecta serían responsables de una débil estructura en la colección de *C. sativus*. Es conveniente analizar un mayor número de aislamientos representativos de todas las regiones de cultivo de cebada del Uruguay.
- En el estudio de variabilidad patogénica de 12 aislamientos de *C. sativus*, frente a un juego diferencial de 12 genotipos de cebada se detectaron 10 grupos de virulencia, pertenecientes a tres clases de patotipos, lo cual indica que existe una compleja interacción hospedero-patógeno entre los aislamientos de *C. sativus* y los genotipos de cebada. La alta variabilidad patogénica es consistente con la alta diversidad genotípica observada a nivel de marcadores moleculares. Estudios adicionales incluyendo colectas sistematizadas y un mayor número de aislamientos son necesarios para confirmar nuestros resultados.

13. BIBLIOGRAFÍA

Adhikari, T.B., Ali, S., Burlakoti, R.R., Singh, P.K., Mergoum, M., and Goodwin, S.B. 2008. Genetic structure of *Phaeosphaeria nodorum* populations in the northcentral and midwestern United States. *Phytopathology* 98:101-107.

Agapow, P.M. and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium, *Molecular Ecology Notes*, 1, pp101-102.

Ahn, J. H., and Walton, J.D. 1996. Chromosomal organization of TOX2, the complex locus controlling host-selective toxin biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* 8:887-897.

Albin, J. 2008. Caracterización genética y sanitaria de una colección de germoplasma de cebada por resistencia a mancha borrosa. Tesis presentada como uno de los requisitos para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Alves-Santos. F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P., and Diaz-Mmguez, J.M., 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3335-3340.

Andrivon, D. 1993 Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology*, 83, 889–890.

Arabi M.I.E, Jawhar M. 2003. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) on barley in Syria. *Journal of Plant Pathology* 85, 193–196.

Arabi M.I.E, Jawhar M. 2007. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus*. *Australasian Plant Pathology* 36, 17–21.

Bakonyi, J., Aponyi, I. and Fischl, G. 1997 Diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici repentis* in Hungary. In: *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot* (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, pp. 80–85.

Baturo A., Mehta Y.R., Sadowski Cz.K., 2004: Identification of genetic variability in *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat in Brazil. Summa Phytopathol. 30, 4: 470–474

Baturo A; 2005. Preliminary studies on genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolatesd from spring barlet by RAPD-PCR. Phytopathol. Pol. 35: 163–171.

Boehm, E.W.A., Ploetz, and R.C, Kistler, H.C. 1994. Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. Molec. Plant-Microbe Interact. 7:196-207.

Brown, A.H.D. 1975. Sample sizes required to detect linkage disequilibrium between two or three loci. Theor. Pop. Biol. 8:184 - 201.

Brown, A.H.D., Feldman M.W, and Nevo, E. 1980. Multilocus structure in natural populations of *Hordeum spontaneum*. Genetics 96(2): 523-536.

Buntjer J.B. 1999. CrossChecker Fingerprint Analysis Software v2.9. Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands

Burdon, J.J. & Silk, J. 1997. Sources and patterns of diversity in plantpathogenic fungi. Phytopathology 87:664-669.

Castro, A .J; Gonzalez, O; Hayes, P.M; Locatelli, A; Mosqueira, J; Silveira, M; Viega, L. 2008. Additivity Of Anthesis Date QTLs Is Explained By Individual QTLs Operative At Different Periods Within The Crop Growth Cycle. In: 10th. Internacional Barley Genetics Symposium , Alejandría.

Christensen J.J. 1926: Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 15: 785–795.

Daboussi, M.J. and Capy, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. Annu. Rev. Microbiol. 57:275-99.

Dubin, H.J., Van Ginkel. M. 1991. The status of wheat diseases and disease research in warmer areas. p. 125–145. In D.A. Saunders (ed.) Wheat for the Non-traditional Warmer Areas. CIMMYT, Mexico, D.F.

Duveiller, E., and Garcia Altamirano, I. 2000. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. Plant Pathol. 49:235-242.

Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 14:2611-2620.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics.131:479–491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.

Fetch T.G, Jr, Steffenson B.J. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. Canadian Journal of Plant Pathology 16, 202–206.

Fetch T.G, Jr, Steffenson B.J. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. Plant Disease 83, 213–217.

Fierro, F., and Martín, J.F. 1999. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. Crit. Rev. Microbiol. 25:1-17.

Gamba F, Estramil E, and Ilardía L, 2000. In: Proceedings International Barley Genetics Conference, Adelaide, South Australia.

Gamba F.; Estramil E. 2002. Variation in virulence within an Uruguayan population of *Cochliobolus sativus*. En: 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights, ICARDA-ALEPPO, Syria.

Gamba F. 2011. La variabilidad de los patógenos causantes de manchas foliares en cebada y su implicancia en el manejo. En: anejo de enfermedades en trigo y cebada. INIA Uruguay. Serie técnica N° 189. pp: 129-137.

Ghazvini H, Tekauz A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. Plant Disease 91, 814–821.

Ghazvini H, Tekauz A. 2008. Host-pathogen interactions among barley genotypes and *Bipolaris sorokiniana* isolates. Plant Disease 92, 225–233.

Gilchrist-Saavedra, L.G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry E I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F. CIMMYT.

Gutiérrez, L.; Berberian, N.; Capettini, F; Fros, D.; German, S; Pereyra, S; Perez, C; Sandoval Islas, S.; Castro, A J. 2011. Spot blotch QTLs in barley germplasm from Latin America. In: 4th International Workshop on Barley Leaf-Blights. Dundee, Scotland.

Gyawali, S. 2010. Association mapping of resistance to common root rot and spot blotch in barley, and population genetics of *Cochliobolus sativus*. Tesis Doctor of philosophy. North Dakota State University.

Huff, D.R. 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop. Sci. 37:557–564.

Iram, S. and. Ahmad, I. 2004. Diversity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat growing areas under rice- wheat cropping system in Punjab, Pakistan. Pak.J. Bot., 36: 439-444.

Kistler, H.C., and Miao, V.P. W. 1992. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:131-152.

Knight. N., Platz, G., Lehmensiek, A., Sutherland, M.W. 2010. An investigation of genetic variation among Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* from different cereal tissues and comparison of their ability to cause spot blotch on barley. *Australasian Plant Pathology*, DOI: 10.1071/AP09082.

Kodama, M., Rose, M.S., Yang, G., Yun, S.H., Yoder, O.C, and Turgeon, B.G. 1999. The translocation-associated Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. *Genetics* 151:585-96.

Kumar, J.; Hückelhoven, R.; Beckhove, U.; Nagarajan, S. ;Kogel, K.H. 2001. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Phytopathol.* 91:127–133.

Kumar J, Schafer P, Huckelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S, Kogel K.H . 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3, 185–195.

Lee, S.H., and Neate, S. M. 2007. Population genetic structure of *Septoria passerinii* in Northern Great Plains barley. *Phytopathology* 97:938-944.

Limpert E, and Müller K. 1994. Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology* 140, 346–358. doi:10.1111/j.1439-0434.1994.

Linde C.C, Zhan, J, McDonald, B.A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology*, 92, 946 –955.

Mathre, D.E. 1982. Compendium of Barley Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Maynard-Smith, J.N.H. Smith, M. O'Rourke y B.G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 90: 4348-43488.

Mc Donald, B.A., and Mc Dermott, J.M. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. Biosciences 43:311-319.

Meldrum S.I, Platz G.J, Ogle, H.J. 2004. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia. Australasian Plant Pathology 33, 109–114.

Michelmore R.W. 2003. The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. Curr. Op. Plant. Biol. 6:397-404.

Milgroom, M.G., and Lipari, S.E. 1995. Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in eastern North America. Phytopathology 85:155-160.

Moura Nascimento E.J, Van Der Sand, S.T. 2008. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 24, 647–652. doi:10.1007/s11274-007-9517-1.

Müller, M.; Germani, J.; van Der, Sand, S.T. 2005. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. Genet. Mol. Res. 4, 642–652.

Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 70 (12) 3321-3323.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals. Genetics 89:583-590.

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press cap 9.

Nelson R.R. and Klyne, D.M. 1962. Intraspecific variation in pathogenicity in the genus *Helminthosporium* to gramineous species. Phytopathology 52: 1045-1049.

Nitta N., Farman, M. L, and Leong, S. A. 1997. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetic maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theor. Appl. Genet.* 95:20-32.

Oliveira A.M, Matsumura A.T, Prestes A.M, Van Der Sand S.T. 2002. Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetics and Molecular Research* 1, 350–358.

Peakall R. and Smouse P.E. 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* 6, 288-295.

Pereyra S. 1996. Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas Serie Técnica 74:110-111. INIA, Uruguay.

Pereyra S, Diaz M, Stewart S. 2005. Manual de identificación de enfermedades en cereales de invierno. *Boletín de Divulgación* 61(2):50. INIA, Uruguay.

Pereyra S, Germán S, Stewart S, Castro M, Díaz J. 2007 Aportes de la investigación para el manejo de manchas foliares y fusariosis de la espiga en cebada. In Reunión de investigación en cebada cervecera. (2007, Paysandú.

Perrier X.and Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. DARwin software.

<http://darwin.cirad.fr/darwin>

Pontecorvo, G. 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 10:393-400.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155:945-959.

Pritchard, J.K.; Wen, W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>

Pritsch, C.; Albín, J.; Rodríguez, S.; Pravia, V.; Pereyra, S.; Gamba, F. 2006. Genetic diversity of a local collection of *Cochliobolus sativus* revealed by RAPD analysis. En: Proceedings of the 3rd international Workshop on Barley Leaf Blights. Edmonton, Alberta, Canada p. 158.

Rodríguez, S.; Torres Puyo, C.; Silva, P.; Castro, A.; Pritsch, C. 2010. Genetic diversity of barley spot blotch resistance sources by chromosome haplotyping. *Phytopathology* 100:S110.

Saari, E.E. 1998. Leaf blight disease and associated soil borne fungal pathogens of wheat in South and Southeast Asia. In: *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. E. Duveiller, H. J. Dubin, J. Reeves, A. McNab, eds. CIMMYT, México D.F., México. pp. 37-51.

Salamati, S., Zhan, J., Burdon, J.J., and Mc Donald, B.A. 2000. The genetic structure of field populations of *Rhynchosporium secalis* from three continents suggests moderate gene flow and regular recombination. *Phytopathology* 90:901-908.

Serenius, M. 2006. Population structure of *Pyrenophora teres*, the causal agent of net blotch of barley. Doctoral dissertation. University of Helsinki, Helsinki.

Shaner G.; Stromberg E.L.; Barker K.R. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 47-66.

Shannon, C.E., & Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press.

Shoemaker, R. A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from "*Helminthosporium*." *Can. J. Bot.* 37:879-887.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 15 May 1987:236 (4803), 787-792. (DOI:10.1126/science.3576198).

Slatkin, M. y. Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.

Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. In: *Ecological Genetics* (L. A. Real, ed.), pp. 3-17. Princeton University Press, Princeton.

Stewart S, Pereyra S, Diaz M. 2005. Manchas foliares en trigo y cebada bajo siembra directa: conceptos y estrategias de control. Documento on line 36. INIA, Uruguay. www.inia.org.uy.

Stoddart, J.A., and Taylor J.F. 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in amples. *Genetics*. 118:705-711.

Tinline R.D. 1988. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. pp 113-122. In: *Advances in Plant Pathology*. Vol 6. Ingram D.S.; Williams P.A. eds. Academic Press, London.

Valjavec-Gratian M.; Steffenson B.J. 1997a. Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley. *Phytopathol.* 87:1140-1143.

Valjavec-Gratian M, Steffenson B.J . 1997b. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Disease* 81, 1275-1278.

Watson, I.A., and Luig, N.H. 1958. Somatic hybridization in *Puccinia graminis var. tritici*. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 83:190-195.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15: 323-354.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics special regard to systems of mating. *Evol* 19: 395-420.

Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B. J., Ye, Z.H. & Mao, J.X. 1999. POPGENE 3.2, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre. Edmonton: Univ. of Alberta.

Zadoks J.C.; Chang T.T.; Konzak C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14:415-421.

Zhong, S.B., Steffenson B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91, 469–476.

Zhong, S.B., Steffenson B.J. 2002. Identification and characterization of DNA markers associated with a locus conferring virulence on barley in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1049–1054.

Zhong, S.B., Steffenson, B.J. 2007. Molecular karyotyping and chromosomes length polymorphism in *Cochliobolus sativus*. *Mycol. Res.* 111:78-86.

14. ANEXOS

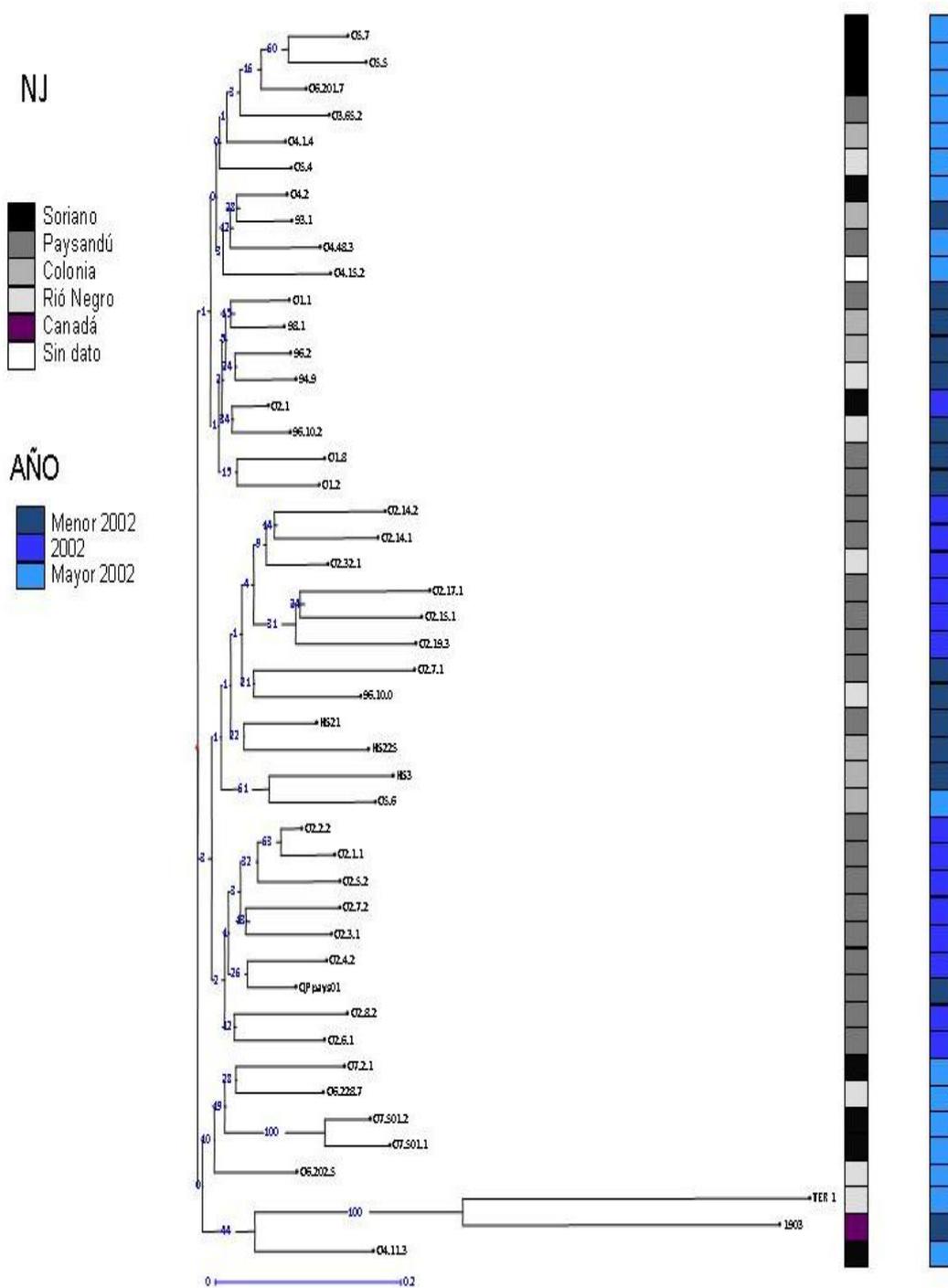
14.1. Anexo I. Reacciones de infección inducidas por 12 aislamientos de *C. sativus* en el conjunto de 12 cebadas diferenciales, A cada reacción de una línea diferencial con cada aislamiento del patógeno se le asigno un valor binario, donde S y R representan reacciones susceptibles ($RI \leq 4.5$) y de resistencia ($RI > 4.5$), respectivamente.

Lineas diferenciales													
Aislamientos	ND 5883	Bowman	NDB 112	A. Madi	CLE 253	I. Arrayán	I. Ceibo	I. Guaviyu	ND 17293	ND 23180	N.Daymán	Tx 7934	
96.2	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	
01.1	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	
01.2	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
01.8	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
02.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
03.65.2	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	
04.1.4	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
05.4	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
05.5	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	
05.6	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	
05.7	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	
07.501.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

14.2. Anexo II. Reacciones de infección inducidas por 12 aislamientos de *C. sativus* en el conjunto de 12 cebadas diferenciales, A cada reacción de una línea diferencial con cada aislamiento del patógeno se le asigno un valor, siendo A, I y B reacciones de alta, intermedia y baja compatibilidad, representadas por RI entre 1-3, 4-5 y 6-9, respectivamente.

Lineas diferenciales													
Aislamiento	ND 5883	Bowman	ND B112	A. Madi	CLE 253	I. Arrayán	I. Ceibo	I. Guaviyu	ND 17293	ND 23180	N.Daymán	Tx 7934	
96.2	A	A	B	B	I	B	I	I	B	I	I	B	
01.1	A	A	B	I	A	A	I	I	B	B	I	I	
01.2	A	A	B	I	I	I	B	I	I	B	I	I	
01.8	A	I	B	I	A	A	A	I	B	I	I	I	
02.1	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
03.65.2	A	I	I	I	I	B	A	B	B	I	B	I	
04.1.4	A	B	B	B	B	B	B	B	I	I	B	B	
05.4	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
05.5	A	I	B	B	A	I	I	B	B	I	I	B	
05.6	A	A	B	I	A	A	I	I	I	I	I	I	
05.7	A	A	B	I	I	I	A	I	B	I	B	I	
07.501.2	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	

14.3. Anexo III. Análisis de conglomerado realizado utilizando distancia Dice y método de agrupamiento *Neighbor Joining* para los 45 aislamientos de *C. sativus* locales y el aislamiento WRS 1903 Canadiense. Se incluyó en el análisis el aislamiento 0601 de *P. teres* f. sp. *teres* (TER1) como grupo externo. A la derecha se muestra región y periodo de año de colecta para cada uno de los aislamientos.



14.4. Anexo IV. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de 45 aislamientos de *C. sativus* colectados en Uruguay y el aislamiento WRS 1903 Canadiense, en base a 205 productos de amplificación RAPDs. Se incluyó en el análisis el aislamiento 0601 de *P. teres* f. sp. *teres* (TER1). Los dos primeros ejes explican 37.53% de la variación observada.

