

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
PYRICULARIA ORYZAE, AGENTE CAUSAL DE LA
ENFERMEDAD BRUZZONE DEL ARROZ

Tesina de fin de carrera de la
Licenciatura en Bioquímica

Leticia Chao Rinaldis

Tutor: Fernando Pérez de Vida
Co-Tutor: Victoria Bonnacarrère

Unidad de Biotecnología
INIA Las Brujas

Montevideo
Uruguay
2014

Tabla de contenido

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
Importancia del cultivo del arroz.....	4
La enfermedad de Bruzzone.....	6
Etiología.....	7
Ciclo de infección.....	8
Hospederos, estructura y diversidad genética de <i>P. oryzae</i>	10
Metodologías para el estudio de la diversidad genética del <i>P. oryzae</i>	11
MGR586-RFLP.....	12
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	13
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	14
Pot2-repPCR.....	15
Resistencia a Bruzzone.....	16
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Aislamientos de <i>Pyricularia oryzae</i>	19
Extracción de ADN.....	19
Pot-2 repPCR y visualización de fragmentos.....	22
Análisis de datos de Pot2-repPCR y estudios de diversidad.....	23
AFLP y análisis de datos de AFLP.....	24
Establecimiento de los ensayo de patogenicidad.....	27
Lectura de severidad de infección en los ensayos de patogenicidad.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
Análisis de diversidad genética con marcadores Pot2-repPCR.....	30
AFLP.....	39
Ensayo de patogenicidad.....	42
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

RESUMEN

El Bruzzone es provocado por el hongo patógeno *Pyricularia oryzae* y es considerado una de las principales enfermedades del arroz (*Oryza sativa* L.) en el mundo, a causa de su alta incidencia bajo condiciones favorables y las pérdidas en el rendimiento que provoca. *P.oryzae* es un hongo que puede presentar una alta variabilidad genética debido a los mecanismos de reproducción que presenta. El objetivo de esta tesis es la caracterización genética de la población del patógeno en Uruguay y la validación de genes de resistencia al patógeno en el germoplasma del Programa de Mejoramiento de Arroz de INIA. El conocimiento de la estructura genética de *P. oryzae* es fundamental para el seguimiento de la enfermedad y la determinación de mecanismos de control. En esta tesis se utilizaron dos metodologías moleculares, AFLP que permite evaluar un gran número de *loci* en el genoma simultáneamente; y Pot2-repPCR, el cual amplifica regiones mayores del ADN y detecta diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificadas. Se analizaron aislamientos monospóricos de *P.oryzae* obtenidos en cultivos o viveros trampa, desde el año 1993 hasta 2010. Mediante la técnica de AFLP usando la metodología de análisis de discriminantes se identificaron 3 grupos genéticos significativamente diferentes, mientras que con la técnica de Pot2-repPCR se determinaron 4 grupos genéticos (A, B, C y D) con variaciones intra-linajes o haplotipos, usando métodos jerárquicos y no jerárquicos de agrupamiento. En el período analizado se observó poca variabilidad del patógeno, con sólo dos de linajes mayoritarios (B y C). El linaje B afecta mayoritariamente a los cultivares *indica*, mientras que el linaje C fue colectados de ambos linajes. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras partes del mundo, en regiones templadas donde el hongo se multiplica por mecanismos asexuales de reproducción y la población se caracteriza por tener una baja diversidad, en contraposición a regiones en Colombia y El Himalaya donde la alta diversidad genética y patogénica muestra otros mecanismos de generación de diversidad. Debido a que la técnica de Pot2-repPCR es más simple de implementar y muy robusta, se considera la más adecuada para la evaluación rutinaria de aislamientos del patógeno. El estudio de

patogenicidad logró identificar a los genes de resistencia Pi-2 y Pi-33 como los más efectivos en el control de los grupos genéticos del patógeno identificados en este estudio.

INTRODUCCIÓN

Importancia del cultivo del arroz

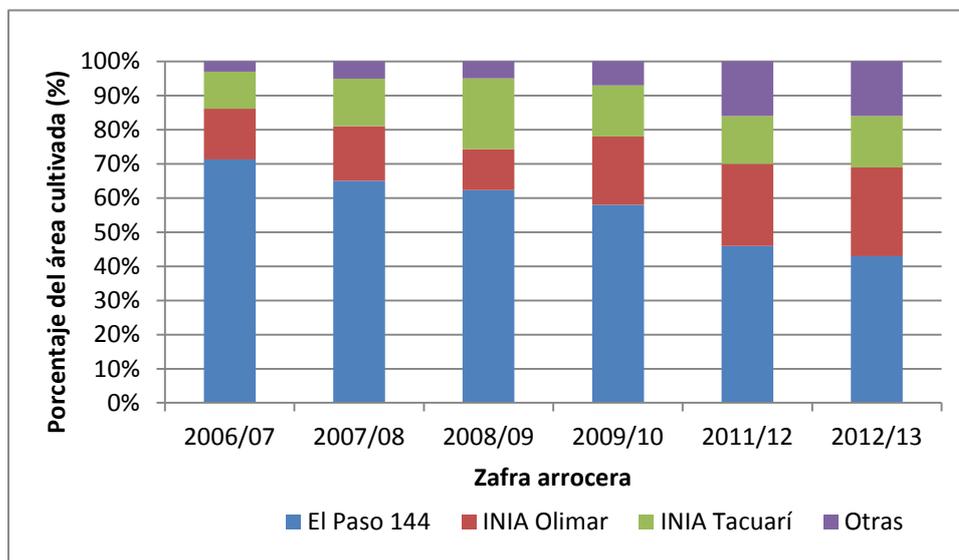
El arroz (*Oryza sativa* L.) es el segundo cultivo producido a nivel mundial, después del maíz, y es el principal alimento en Asia, donde se concentra el 60% de la población mundial (FAO, Statistics Division, FAOSTAT). El 85% del arroz cultivado se produce en este continente y el 15% restante en África, América y Europa meridional. En este contexto, Uruguay se encuentra en el puesto 33 de productores mundiales y el sexto exportador mundial de arroz en el año 2012 (Foreign Agriculture Service, USDA), exportando aproximadamente el 90 % de su producción.

En Uruguay se cultiva el arroz bajo riego, con siembra en seco, y en rotación con forrajeras, con destino a la producción de carne y lana. El área cultivada ha ido aumentando progresivamente desde 1930, alcanzando aproximadamente 180.000 ha anuales en los últimos años. En la zafra 2012/2013 ocupó el tercer lugar en superficie agrícola cultivada y en toneladas exportadas detrás de la soja y el trigo, y el segundo lugar en cuanto su ganancia de exportación luego de la soja (Anuario Estadístico Agropecuario, MGAP-DIEA 2013).

Los altos porcentajes de exportación se deben a la alta productividad alcanzada, así como a la calidad y homogeneidad de su producción. La productividad ha ido en aumento alcanzando 8000 kg/ha de promedio nacional debido a la existencia de un manejo tecnológico producto de la investigación nacional, y un proceso de adopción exitoso, que se expresa claramente por la reducida brecha tecnológica (promedio nacional vs. rendimiento experimental) (Pérez de Vida y Macedo, 2013)

La mayoría del arroz cultivado puede ser incluido dentro de dos subespecies (ssp.): *indica* y *japonica* basado en características fisiológicas y morfológicas como la tolerancia a frío, altura de la planta, color de las hojas y forma del grano, aunque el espectro de variación de cualquiera de éstos se superponen en ambas subespecies (Oka, 1991). La ssp. *japonica* se diferencia en dos ecotipos, *japonica tropical (javánica)* y *japonica templado* (Mackill, 1995).

A comienzos de la década del 1990, Uruguay pasó de producir la casi totalidad de su área con la variedad Bluebelle introducida de Estados Unidos en la década de 1970 a hacerlo con variedades desarrolladas localmente (Courdin y Hernández, 2013). En la actualidad, se cultivan fundamentalmente las variedades *Indica* El Paso 144 e INIA Olimar, en un 70% del área, y la variedad *japonica tropical* INIA Tacuarí en un 15%, (Anuario Estadístico Agropecuario, MGAP-DIEA 2013) liberadas por los programas de mejoramiento del CIAAB (Centro de Investigaciones Agrícolas A. Boerger), entre 1970 y 1991, y de INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) de 1991 a la fecha (Figura 1).



La producción de arroz puede verse limitada por diversos factores, tanto ambientales (baja temperatura) como bióticos en particular por enfermedades producidas por patógenos fúngicos. El Bruzzone es la principal enfermedad fúngica del arroz en Uruguay, debido a su amplia distribución y poder destructivo bajo condiciones favorables. En la zafra 2009/10 afectó a más del 50% del área cultivada (Anuario Estadístico Agropecuario, MGAP-DIEA 2011) a pesar de que los primeros síntomas del patógeno se observaron en 1995 (com. pers. Stella Avila, Fitopatóloga de INIA). Debido a que el 70% del área es cultivada con variedades *indica* muy susceptibles a dicha enfermedad.

Figura 1: Evolución del porcentaje del área sembrada según variedades.

capacidad de variación del patógeno. Por lo tanto, se considera prioritario el desarrollo de cultivares resistentes al mismo, especialmente incorporando resistencia en las variedades adaptadas de tipo *indica*.

En este sentido, la estrategia del programa de mejoramiento de arroz de INIA apunta a complementar cruzamientos locales con la introducción de materiales del Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR) y a la utilización de herramientas moleculares para asistir al proceso de introgresión de genes de resistencia a Bruzzone mediante ensayos de retrocruzamiento (Rosas *et al*, 2012; Pérez de Vida, 2012)

La enfermedad de Bruzzone

El Bruzzone no solo es de las enfermedades vegetales más tempranamente conocidas, sino una de las más ampliamente distribuidas en el mundo, afectando las principales regiones cultivadas de arroz. Los primeros registros sobre esta enfermedad fueron hechos en China y datan de 1637 (Ou, 1980). Más adelante, se la describe en Japón e Italia donde se la nombró Bruzzone por varios autores. Cavara (1891) es el primero que describe en Italia al género como *Pyricularia*, y la especie *Pyricularia oryzae*.

La enfermedad se puede presentar en todas las partes aéreas de la planta y es observada desde etapas tempranas de crecimiento hasta la producción de grano. Los síntomas típicos se presentan en las hojas donde las lesiones tienen una forma alargada con bordes irregulares, de 10-15 x 3-5 mm aproximadamente y de color marrón pálido. En el centro de la lesión se presenta un color grisáceo, donde aparecen los cuerpos fructíferos del hongo. En los tallos, las lesiones se localizan en la región de los nudos, con la tinción similar a la observada en las hojas (Ou, 1980). Luego de la etapa de florecimiento, el hongo ataca a todas las partes de la panícula, produciendo lesiones amarronadas. La infección de la base de la panícula es particularmente devastadora; y cuanto más temprano sea la infección en esta etapa, mayor será el daño (Figura 2)



Figura 2 : A: Lesiones causadas en hojas, B en el cuello de la panícula por *Pyricularia oryzae* en una hoja de arroz. Tomadas de (Scheuermann et al. 2012)

Etiología

El Bruzzone es causado por el hongo filamentoso ascomiceto *Pyricularia oryzae* Sacc. Cav. (teleomorfo: *Magnaporthe oryzae*) clasificado dentro de la familia *Magnaporthaceae*. Anteriormente no existía consenso sobre el nombre específico del hongo, pudiéndole nombrar también como *Pyricularia grisea* (Rossman, Howard, and Valent 1990) debido a que no hay diferencias morfológicas detectables que puedan ser utilizadas para describir el patógeno que infecta a arroz al del que infecta otras especies de gramíneas. Sin embargo, Couch y Kohn (2002) basado en análisis filogenéticos apoyados en genealogía por multilocus y experimentos de cruzamientos, divide a *Magnaporthe* en dos clados distintos, uno asociado con la infección de *Digitaria* nombrado *M. grisea* y el otro a aquellos capaces de infectar arroz, mijo y otras gramíneas, el cual es nombrado *M. oryzae*.

El anamorfo *P.oryzae* produce conidias piriformes con uno o dos septos transversales, ligeramente oscuras o hialino, vinculado al conidióforo por su parte inferior más grande (Figura 3). Los conidióforos poseen septos simples, raramente ramificados, con un crecimiento simpodial y ligeramente amarronadas. El teleomorfo *M. oryzae* no se

ha encontrado en la naturaleza, pero se ha producido después de cruzar aislamientos compatibles adecuados en laboratorio (Herbert, 1971). La etapa teleomórfica produce ascosporas hialinas, fusiformes, generalmente con tres septos y envueltas por ascos unitunicados (Subramian, C.V 1968).

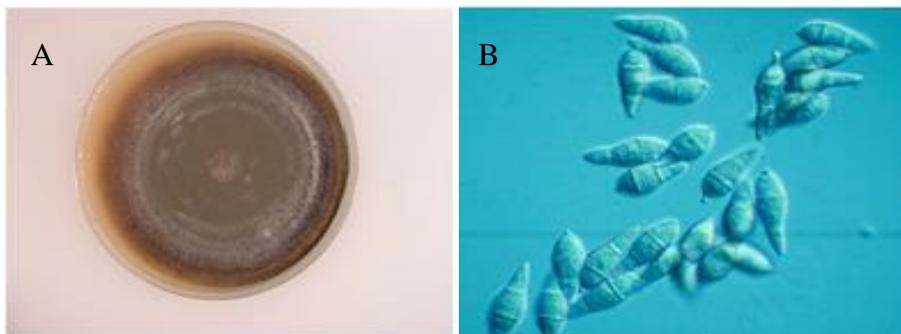


Figura 3: A: Crecimiento del hongo en medio PDA (Potato Dextrose Agar). B: Conidios vistos al microscopio óptico. (Tomado de TeBeest, 2007)

Ciclo de infección

El patógeno comienza su ciclo de infección cuando un conidio tricelular unido al conidióforo se adhiere a la superficie de la hoja del arroz mediante un mucílago rico en glicérido manosa que en presencia de agua ayuda a su fijación al huésped (Ebbole, 2007) (Figura 4). La espora apical se adhiere a la cutícula hidrófoba y germina, produciendo un tubo germinativo estrecho, el cual posteriormente se aplana y se engancha en la punta antes de diferenciarse en un apresorio. El apresorio unicelular madura y el conidio tricelular colapsa y muere en un proceso programado que requiere autofagia (Ebbole, 2007). La estructura básica del apresorio se encuentra examinada en detalle por Howard y Ferrari (1989). El apresorio es una célula con forma de domo, con una compleja pared celular, en cuyo lado interno se deposita melanina. En contacto con la cutícula de la planta, se encuentra el poro del apresorio (5-10 μm de diámetro), cuya pared celular es extremadamente delgada no melanizada. La capa de melanina funciona como barrera

semipermeable, donde el agua difunde libremente pero no así iones y osmolitos, los cuales se acumulan en el citoplasma aumentando la presión de turgencia dentro del apresorio. El glicerol es el soluto más importante acumulado llegando a una concentración de 3 M (Howard y Ferrari, 1989). El glicerol es derivado por la movilización de compuestos de reserva como lípidos, glucógeno, manitol y trehalosa (Howard y Ferrari, 1989; Ebbole, 2007). La presión de turgencia se traduce en una fuerza física produciendo una hifa de penetración que se forma en la base del apresorio. Ésta punza la cutícula a través del poro del apresorio, permitiendo la entrada en la epidermis de la hoja.

La invasión de tejido de la planta se produce por medio de hifas, adoptando la vida hemibiotrofa. Las hifas invasivas están envueltas en membrana que las separa del citoplasma de la célula huésped, una característica de los hongos biotrofos (Kankanala *et al*, 2007). El movimiento de célula a célula puede ocurrir inicialmente por plasmodesmos, sin dañar la pared celular. La invasión de células adyacentes coincide con la pérdida de viabilidad de la célula infectada previamente, iniciando la fase necrotrófica y la aparición de lesiones de la enfermedad entre 72 y 96 horas después de la deposición del conidio sobre la superficie de la planta. La esporulación se produce en condiciones de alta humedad relativa ($\geq 93\%$) en alrededor de 24 horas luego de aparición de síntomas. Conidióforos aéreos con esporas dispuestas simpodialmente son arrastradas a nuevos huéspedes por gotas de rocío (Scheuermann *et al*, 2012).

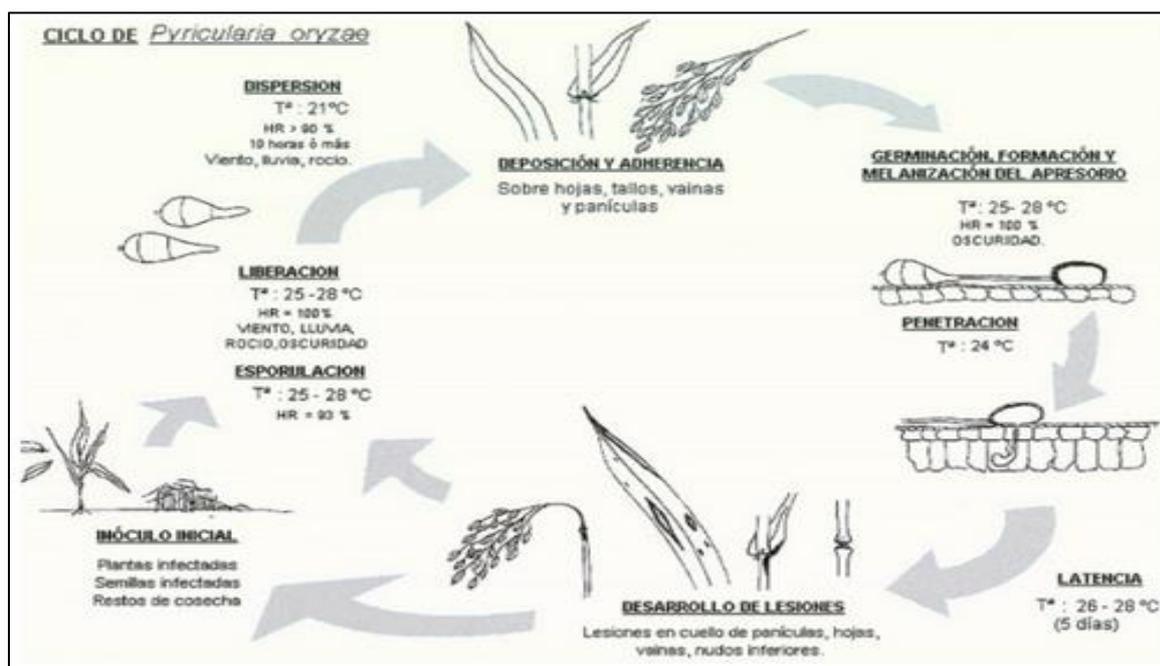


Figura 4: Ciclo de infección de *Pyricularia oryzae*. Tomada de <http://www.tecnicoagricola.es/pyricularia-oryzae-en-arroz>.

Hospederos, estructura y diversidad genética de *P. oryzae*

El género *Magnaporthe* colectivamente parasita más de 50 hospedantes de la familia de las gramíneas, aunque las especies tienen un limitado rango de huésped, siendo la infectividad cruzada un fenómeno poco frecuente. Sin embargo, las especies de *Magnaporthe* presentan un alto nivel de polimorfismo o variabilidad genética de las formas virulentas (patotipos) (Ou, 1980), que conduce a que rápidamente se quiebre la resistencia genética (específicamente la monogénica) de las variedades de arroz. El entendimiento de la estructura y dinámica poblacional del patógeno es esencial para la implementación de estrategias hacia la obtención de una resistencia más duradera en los cultivos comerciales, mediante la piramidación secuencial de genes de resistencia.

Muchos estudios se han realizado alrededor del mundo para estudiar la diversidad genética de la población de *P.oryzae*. Levy *et al.* (1991) identificaron mediante MGR586-RFLP 8 linajes genéticos en 42 aislamientos colectados durante 30 años los que representaban los linajes más comunes que infectaban a cultivares de arroz comerciales en Estados Unidos. Por otro lado, con la misma metodología Roumen *et al.* (1997)

identificó 5 linajes entre 41 aislamientos de 5 países europeos. Estos resultados reportan un número limitado de linajes del patógeno, mostrando una estructura poblacional clonal (Levy *et al*, 1993; Xia *et al*, 2000). En Uruguay un estudio utilizando marcadores AFLP en 33 aislamientos colectados entre 1995 y 1999 identificó una alta variabilidad de la población (Taheri *et al*, 2004). Más adelante utilizando la misma técnica, pero incorporando aislamientos entre 1993 y 2007 en el marco del Proyecto Fontagro se identificaron 6 grupos (Proyecto Fontagro, 2005). Sin embargo, en algunas zonas se observa una alta variabilidad de patogenicidad adjudicada a modos de reproducción sexual. Este es el caso de Colombia y Brasil donde se identificaron 39 y 35 linajes respectivamente mediante marcadores MGR586-RFLP (Levy *et al*, 1993; Anjos *et al*, 2009). En el Himalaya, donde existe una alta diversidad de cultivares de arroz bajo diferentes condiciones de cultivo aislados en diferentes valles, se encontró una alta diversidad del patógeno, aun estando lejos del centro del origen del arroz mediante la técnica MGR586-RFLP (Kumar *et al*, 1999). Asimismo análisis realizados en el norte de Vietnam encontraron también alta variabilidad patogénica mediante AFLP, donde se identificaron 12 grupos genéticos (Ninh Thuan *et al*, 2006). La baja diversidad genética con la sustancial diversidad patogénica encontrada en algunas zonas, y la alta diversidad genética y patogénica mostrada en otras áreas sugiere que diferentes mecanismos están actuando para crear variabilidad genética en *P.oryzae* (Scheuermann *et al*, 2012).

Metodologías para el estudio de la diversidad genética del *P. oryzae*

Desde que se comenzaron los estudios de diversidad genética del patógeno, se han utilizado diferentes metodologías para el estudio poblacional. Los primeros estudios utilizaron las técnicas de RAPDs (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) y RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) y posteriormente se comenzaron a implementar técnicas menos laboriosas y/o más reproducibles como AFLP y Pot2-repPCR. Todas ellas son descritas a continuación.

MGR586-RFLP

La técnica de RFLP (del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism) se entiende como el polimorfismo en el largo de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de ADN. Tal polimorfismo es evidenciado por la fragmentación del ADN a través del uso de enzimas de restricción y observado por la hibridación de éstos con secuencias homólogas de ADN (sondas) marcadas radioactivas o compuestos que desencadenan una reacción de luminiscencia (Ferreira y Grattapaglia 1996).

RFLP ha sido usado en numerosos estudios de hongos fitopatógenos en genomas nucleares y mitocondriales. Los marcadores RFLP presentan la ventaja de cubrir potencialmente todo el genoma del organismo estudiado, poseen expresión codominante, exhiben un potencial ilimitado de números de alelos por locus, y son de fácil interpretación. Una de las desventajas es que se requiere relativamente grandes cantidades de ADN de cada individuo (5 a 10 µg), son más dificultosos que los marcadores moleculares basados en PCR pero ofrecen la ventaja de ser más reproducibles (McDonald, 1997).

En el análisis poblacional de *P. oryzae* con *EcoRI* RFLP se ha utilizado como sonda de hibridación un elemento de una familia MGR (del inglés, *M.grisea* Repeat) de secuencias repetitivas dispersas llamado MGR586 (pCB586) conservados en el genoma (Hamer *et al.* 1989). Estos elementos se encuentran aproximadamente 50 copias por genoma haploide, están dispersos por todos los cromosomas y son altamente polimórficos. La sonda MGR586 hibrida entre 50 y 60 fragmentos de restricción de *EcoRI*, de longitud entre 1 a 25 kb (Romao y Hamer, 1992).

RFLP fingerprinting con MGR586 ha servido como una importante herramienta para el estudio de la estructura poblacional y cambios genéticos del hongo del Bruzzone (Levy *et al.*, 1991; Roumen *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2000). Es una técnica reproducible y son marcadores robustos. Sin embargo, la alta inversión de tiempo y recursos para el análisis de RFLP ha limitado la aplicación de esta técnica a estudios de gran escala.

La técnica fue utilizada para el análisis de aislamientos encontrados en diferentes regiones de Uruguay; logrando la clasificación de éstos en cuatro linajes A, C y D/U3 y US-IG-1A (1 aislamiento) (Proyecto FONTAGRO, 2005).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La técnica de RAPD (del inglés: Random Amplified Polymorphic DNA) se basa en la amplificación al azar del ADN polimórfico utilizando cebadores más cortos que la PCR clásica y de secuencia arbitraria para dirigir la reacción de amplificación, eliminando así la necesidad del conocimiento previo de la secuencia. Esta técnica fue desarrollada por dos grupos de EEUU independientemente (Williams *et al*, 1990; Welsh y McClelland, 1990).

RAPD es básicamente una variación del protocolo de PCR con dos características distintivas: utiliza un cebador único en vez de un par de cebadores; y ese cebador único tiene una secuencia arbitraria. Para que haya amplificación de un fragmento RAPD en el genoma analizado, dos secuencias de ADN complementarias al cebador arbitrario deben estar suficientemente adyacentes y en orientación opuesta. El polimorfismo puede ser visualizado con electroforesis utilizando tanto gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, o en geles de poliacrilamida revelados con autoradiografía (Ferreira y Grattapaglia, 1996). Por su largo número de amplicones que pueden ser escaneados en un período relativamente corto. Los RAPDs son especialmente útiles en diferenciar linajes clonales de hongos que se reproducen asexualmente. Los datos obtenidos del RAPD son fáciles de interpretar porque son basados en la amplificación de secuencias específicas de ADN produciendo datos binarios de presencia o ausencia (McDonald, 1997). Sin embargo, existen muchas limitantes técnicas asociadas con los RAPDs que las hacen difíciles de reproducir entre laboratorios (McDonald, 1997) por eso se han dejado de utilizar para estos tipos de estudios.

Algunos trabajos donde utilizaron la técnica RAPD-PCR para estudiar la variabilidad genética del Bruzzone como (Séré *et al*, 2007) en Burkina Faso, como también el mapeo de genes de avirulencia (Dioh *et al*, 2000).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La técnica del polimorfismo del largo de los fragmentos amplificados (AFLP, del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism), desarrollada por Vos *et al* (1995), es una poderosa herramienta para estudiar el fingerprinting de genomas completos. A través de esta técnica, se identifican variaciones en la secuencias de sitios de restricción, combinando el poder y reproducibilidad del RFLP con la flexibilidad de una técnica basada en PCR (Innan *et al*, 1999).

El AFLP consiste en tres pasos:

1. Digestión con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente (*MseI*) y otra de corte poco frecuente (*EcoRI*).
2. Incorporación de adaptadores oligonucleotídicos de doble hebra de secuencia conocida en los extremos de los fragmentos de restricción.
3. Amplificación preselectiva y selectiva de los fragmentos de restricción. La amplificación preselectiva utiliza cebadores complementarios a los adaptadores amplificando solamente aquellos fragmentos que presentan sitios de restricción para ambas enzimas. La amplificación selectiva, mediante el uso de nucleótidos específicos en los extremos 3', simplifica la complejidad de fragmentos de manera de que sean analizables. El número de bases selectivas depende del tamaño y la complejidad del genoma a analizar.

El tamaño de los fragmentos generados en las dos reacciones de amplificación por PCR descritas anteriormente son determinados mediante análisis en gel o electroforesis capilar. Un gran número de fragmentos pueden ser analizados simultáneamente, dependiendo del sistema de detección utilizado. Típicamente de 50 a 100 fragmentos son amplificados y detectados en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (en el protocolo original) o en electroforesis capilar (secuenciador automático).

Dentro de las características de la técnica de AFLP se pueden destacar el uso de ADN de alta calidad en poca cantidad, la alta resolución obtenida por las condiciones

exigentes del PCR, muchos subgrupos de fragmentos de restricción pueden ser amplificados cambiando la extensión del adaptador y dado que no se requiere conocimiento previo de la secuencia esta técnica se puede utilizar en una gran variedad de organismos (Vos et al. 1995, Innan et al. 1999).

AFLP es una poderosa herramienta para detectar secuencias polimórficas en el ADN. Comparte muchas características con los RAPDs, son dominantes y usualmente tienen 2 alelos por locus. Dado que más loci son escaneados en cada reacción y cebadores más largos son utilizados, la reproducibilidad de AFLP es mayor. Las desventajas de esta herramienta, es que requieren más experiencia técnica y sufren las mismas limitaciones analíticas que los RAPDs (McDonald, 1997).

Numerosos trabajos para la caracterización molecular de poblaciones de *P.oryzae* se han realizado con esta técnica (Saleh et al, 2003; Ninh Thuan et al, 2006) , incluyendo aislamientos de Uruguay (Taheri et al, 2004).

Pot2-repPCR

La técnica de PCR basado en elementos repetitivos (rep-PCR) está basada en la generación de fragmentos de ADN por amplificación de secuencias que se encuentran entre las copias dispersas aleatoriamente de elementos repetitivos en el genoma. Esta metodología combina la simplicidad del PCR con el polimorfismo detectado por RFLP. En *P.oryzae*, el elemento repetitivo disperso o Pot2 (Kachroo, 1994) mide 1857 pb y representa una de las principales secuencias compartidas de aislamientos de *P. oryzae* que infectan al arroz y las que infectan a otros huéspedes. George et al (1998) desarrolló la técnica de rep-PCR utilizando Pot2 como secuencia del cebador y así generar perfiles de fingerprinting. Estos perfiles consisten en 30 o menos fragmentos los que son analizados por análisis de cluster generando grupos discretos que corresponden cercanamente con las agrupaciones de linajes MGR-RFLP (Babujee y Gnanamanickam, 2000).

El elemento Pot2 comparte características estructurales con MGR586. Por un lado, está presente en aproximadamente 100 copias por genoma haploide mientras que el fragmento MGR586 se encuentra presente entre 45 y 50 copias por genoma en

aislamientos de *P. oryzae* patógeno al arroz y en sólo una a tres copias por genoma en patógenos de otras gramíneas (George *et al*, 1998).

Diversos trabajos han utilizado esta técnica para la caracterización de poblaciones locales de *P. oryzae* (Javan-nikkhah *et al*, 2004; Prabhu *et al*, 2007).

Resistencia a Bruzzone

La interacción *P. oryzae* x *O. sativa* está determinada por la relación gen-por-gen (Silué *et al*, 1992). Los genes de resistencia de arroz a Bruzzone fueron primeramente descritos por Sasaki en 1923 (Ballini *et al*, 2008). Existen dos tipos de resistencia básicas que pueden ser usados en el control de la enfermedad: resistencia parcial y resistencia completa; ambas definidas fenotípicamente. La resistencia completa es específica de la raza del patógeno y está gobernada por uno o pocos genes de resistencia R en la planta, dominantes y recesivos, que reconocen el producto del gen *de avirulencia* del patógeno inhibiendo completamente la reproducción del patógeno. En estos casos, cuando la resistencia es efectiva, no se observa síntomas de la enfermedad, mientras que si la resistencia no es efectiva, los síntomas se producen a gran escala afectando a toda la planta. Por otra parte, un genotipo de arroz con resistencia parcial permite la reproducción del hongo y es inespecífica a las razas de éste. Esta resistencia está determinada por un mayor número de genes o QTLs (Quantitative Trait loci) caracterizándose por tener lesiones en número y tamaño reducido (Babujee y Gnanamanickam, 2000).

El espectro de resistencia es definido de acuerdo a la interacción de la planta con las cepas del patógeno. Una resistencia específica es efectiva contra sólo algunas cepas. Por otro lado, la resistencia amplia describe la resistencia que es efectiva contra un gran número, pero no todas, las cepas de un patógeno (Ballini *et al*, 2008). Johnson (1981) define la resistencia duradera como aquella que mantiene la efectividad mientras el cultivar que la posee es ampliamente cultivado.

A la fecha, un total de 85 genes de resistencia a Bruzzone y alrededor de 350 QTL han sido identificados y mapeados en el genoma de arroz (Scheuermann *et al*, 2012). La

disponibilidad de un gran número de estos genes otorga la posibilidad de integrar dos o más de ellos en el genotipo, lo que es llamado “piramidación de genes”, lo que fue descrito primeramente por Johnson (1984). Este término refiere a la combinación de dos o más genes mayores de resistencia en un único genotipo. Mientras que el uso de un solo gen mayor limita la utilidad de cultivares resistentes en pocos años, la piramidación de genes podría retrasar la ruptura de la resistencia confiriendo una resistencia más efectiva contra todos los patotipos prevalentes del patógeno (Babujee y Gnanamanickam, 2000). Esta aproximación es considerada una poderosa herramienta para otorgar resistencia amplia duradera en una nueva variedad. El uso de marcadores moleculares es esencial en la piramidación de genes, debido a la posibilidad de rastrear loci específicos en poblaciones segregantes en sustitución a monitoreos fenotípicos más costosos y más lentos (Scheuermann *et al*, 2012).

Por todo esto, es de suma importancia conocer la diversidad genética de *Pyricularia oryzae* en el país para identificar los genes de resistencia a ser introgresados en los cultivares de arroz y así otorgar resistencia duradera a la población del patógeno presente en el Uruguay (Rosas *et al*. 2012).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la variabilidad genética de la población del patógeno *Pyricularia oryzae* en Uruguay mediante técnicas moleculares y evaluar la relación de patogenicidad entre grupos genéticos del patógeno y diferentes genotipos de arroz.

Objetivos específicos

- Caracterizar a la población de patógeno con marcadores Pot2-repPCR
- Caracterizar a la población de patógeno con marcadores AFLP.
- Evaluar la relación de fitopatogenicidad entre grupos genéticos del patógeno y el cultivar de arroz al cual infecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de Pyricularia oryzae

El estudio se realizó sobre 67 aislamientos de *P. oryzae* recolectados en cultivos de arroz en Uruguay desde 1993 al 2010 sobre diferentes cultivares y líneas. En la Tabla 1 se listan los aislamientos, el genotipo de arroz de donde fue colectado, parte de la planta donde fue aislado, el año y la localidad. Se realizaron cultivos monospóricos en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental de INIA Treinta y Tres en medio PDA con afrechillo de arroz según es descrito en el protocolo de CIAT (CIAT, 1994).

Extracción de ADN

Los aislamientos fueron crecidos en medio líquido YEG (0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 0,4% glucosa) en agitación constante por 5 a 7 días para obtener micelio. El micelio se secó con papel absorbente y se liofilizó en un liofilizador Freezone 4.5 Liter Labconco®.

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo modificado del método de CTAB (Ninh Thuan *et al*, 2006). Se molieron de 2 a 4 g de micelio liofilizado con nitrógeno líquido, colocando el material en tubos con 1 ml de tampón de extracción (0,7 M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 10 mM ácido etilendiaminotriacético [EDTA] pH 8, 1% CTAB) e incubado a 65 °C por 1 h con agitación suave y periódica. Se centrifugó a 18000 g durante 15 min y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde se agregó 1 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclado cuidadosamente y centrifugado nuevamente a 18000 g por 15 min. Al sobrenadante se le agregó 85 µl de CTAB 10% y 1 ml cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) hasta que la interfase se volviera transparente. La precipitación del ADN se realizó en varios pasos: en primer lugar se agregó 1 ml de tampón de precipitación (CTAB 50mM Tris-HCL pH 8, 10 mM EDTA pH 8) seguido por incubación a temperatura ambiente por 30 min. Luego se centrifugó a 18000 g durante 15 min y se añadieron 30 µl de NaCl 5 M y 1500 µl de etanol absoluto frío. Posteriormente se centrifugó a 9500 g por 5 min. El precipitado se enjuagó con 500 µl de etanol 70%. El ADN

se recogió por centrifugación a 9500 g, se dejó secar al aire y finalmente se disolvió suavemente en 200 μ l de tampón TE (10 mM Tris-HCL pH 8, 0,1 mM EDTA pH 8).

La cuantificación de ADN se realizó en espectrofotómetro Nanodrop™.

Análisis de la diversidad genética de *Pyricularia oryzae*, agente causal de la enfermedad Bruzzone del arroz

Leticia Chao

Nº	Lugar de recolección	Fecha de aislamiento	Cultivar donde fue recolectado	Subespecie	Parte de la planta
1 ^{1 2}	India Muerta, Rocha	1995	Bluebelle	Japonica	Hoja bandera
3 ¹	Lavalleja	1994	INIA Yermal	Japonica	Cuello de panícula
4 ²	San Fernando	1995	INIA Yermal	Japonica	Cuello de panícula
5 ^{1 2}	El Bagre	1995	Bluebelle	Japonica	Cuello de panícula
6 ¹	Río Branco	1995	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
7 ^{1 2}	Arboleya, Rocha,	1993	Bluebelle	Japonica	Cuello de panícula
8 ^{1 2}	Raduns, San Fernando	1995	Bluebelle	Japonica	Hoja bandera
9 ²	Bagué, Brasil	1995	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
11 ^{1 2}	Arboleya, Rocha	1993	Bluebelle	Japonica	Hojas
16 ^{1 2}	UEPL ³ , Treinta y Tres	1998	INIA Caraguatá	Japonica	Hojas
20 ^{1 2}	Séptima Sección, T y Tres	1998	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
21 ¹	UEPL, Treinta y Tres	1998	El Paso 144	<i>Indica</i>	Hojas
23 ¹	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2746 ⁴	s/d	Hojas
24 ²	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2871 ⁴	Japonica	Hojas
25 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2877 ⁴	Japonica	Hojas
26 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2882 ⁴	<i>Indica</i>	Hojas
27 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2908 ⁴	<i>Indica</i>	Hojas
28 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2923 ⁴	<i>Indica</i>	Hojas
29 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2995 ⁴	Japonica	Hojas
30 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 2998 ⁴	Japonica	Hojas
31 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3006 ⁴	s/d	Hojas
33 ²	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3014 ⁴	s/d	Hojas
34 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3070 ⁴	Japonica	Hojas
35 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3107 ⁴	s/d	Hojas
36 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3128 ⁴	Japonica	Hojas
37 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	L 3194 ⁴	s/d	Hojas
38 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	Bluebelle	Japonica	Hojas
39 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	El Paso 144	<i>Indica</i>	Hojas
40 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	CT13063-CA	<i>Indica</i>	Hojas
41 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	INIA Tacuarí	Japonica	Hojas
42 ^{1 2}	UEPL, Treinta y Tres	1999	INIA Cuaró	<i>Indica</i>	Hojas
44 ^{1 2}	PK Cebollatí	2001	INIA Tacuarí	Japonica	Nudos
45 ¹	PK UEPL	2001	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
46 ¹	PK Río Branco	2001	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
47 ²	Tacuarembó	2001	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
49 ¹	Costas del INIA Tacuarí	2001	INIA Zapata	Japonica	Cuello de panícula
51 ^{1 2}	PK UEPL	2001	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
52 ¹	Tacuarembó	2002	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
53 ^{1 2}	PROCIPA, 7ª Sección, T. Tres	2002	L 1855 ⁴	s/d	Cuello de panícula
54 ^{1 2}	Stirling, Rincón	2002	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello de panícula
55 ^{1 2}	Stirling, Rincón	2002	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
56 ^{1 2}	PROCIPA, 7ª Sección, Treinta y Tres	2002	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
58 ^{1 2}	UEPL, UPAG, Potr. 5, Treinta y Tres	2003	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
60 ^{1 2}	Bachino Lascano, Rocha	2003	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
63 ^{1 2}	Barquín, Lascano, Rocha	2003	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula

Continúa en la próxima página

Nº	Lugar de recolección	Fecha de aislamiento	Cultivar donde fue recolectado	Subespecie	Parte de la planta
64 ^{1,2}	Ensayo riego, UEPL, T y Tres	2003	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
65 ¹	Gigena, Arroyito, T y Tres	2003	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello de panícula
75 ¹	UEPL, Trinta y Tres (vivero trampa <i>Pyricularia</i>)	2005	Bluebelle	Japonica	Hoja
76 ^{1,2}	A. Porto, Río Branco	2005	Fanny	Japonica	Hoja
78 ^{1,2}	UEPL, Treinta y Tres (vivero trampa <i>Pyricularia</i>)	2005	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Hoja
79 ¹	Río Branco, Cerro Largo	2005	C104 PKT	s/d	Hoja
80 ¹	UEPL, Trinta y Tres (vivero trampa <i>pyricularia</i>)	2005	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Hoja
81 ²	UEPL, Trinta y Tres	2007	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Hojas
83 ^{1,2}	UEPL, estaca 209	2007	El Paso 144	<i>Indica</i>	Lígula
84 ^{1,2}	UEPL, Treinta y Tres	2007	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Nudos
87 ^{1,2}	UEPL, Trinta y Tres (vivero trampa <i>pyricularia</i>)	2007	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Hoja
107 ^{1,2}	La Charqueada,	2009	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Hojas
109 ^{1,2}	UEPL	2009	L8183 ⁴	s/d	Hojas
111 ¹	Rincón, Manini	2010	INIA Olimar	<i>Indica</i>	Cuello
115 ¹	Rivera, Hospital, Cámara	2010	El Paso 144	<i>Indica</i>	Hoja
117 ¹	Rocha, Fariña	2010	INIA Tacuarí	Japonica	Cuello
121 ¹	Rincón. Gomes Chagas	2010	El Paso 144	<i>Indica</i>	Cuello

Tabla 1: Listado de aislamientos de *P. oryzae* utilizados para el ensayo Pot 2 repPCR. ¹ Aislamientos analizados con marcador Pot2-repPCR. ² Aislamientos analizados con AFLP. ³ UEPL: Unidad Experimental Paso De La Laguna. ⁴ Líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz, INIA . s/d: sin datos.

Pot-2 repPCR y visualización de fragmentos

La amplificación de las regiones entre elementos Pot2 se realizó con los cebadores (Pot2-1:5'CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT 3' y Pot2-2: 5' CCCTCATTCGTCACGTTT 3') de acuerdo a lo descrito por (George et al. 1998) con modificaciones. La amplificación fue realizada en 25 µl de reacción conteniendo 0,5 µM de cada uno de los cebadores, 0,185 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs, Fermentas Life Science™), 1,5mM de MgCl₂ (Fermentas Life Science™), 1X *Taq* tampón PCR con KCl (Fermentas Life Science™), 4 ng/µl de ADN molde, 0,1 U/µl de *Taq* polimerasa (Fermentas Life Science™). El ciclo de PCR fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2,5 min; 4 ciclos de desnaturalización por 1 min. a 94°C por 1 min, hibridación por 1 min a 62°C, extensión a

65°C por 10 min; seguido por 26 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación por 1 min a 62°C, extensión por 10 min a 65°C, finalizando con una extensión por 15 min a 65°C. La amplificación por PCR fue realizada en el termociclador Mastercycler® ep gradient S Eppendorf®.

Los fragmentos amplificados se visualizaron utilizando el equipo de electroforesis capilar QIAxcel® de Qiagen®, utilizando QIAxcel DNA Large Fragment kit® y en geles de agarosa 1,8% corridos a 50V durante 7 horas, teñidos con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se clasificaron como presentes (1) o ausentes (0), las cuales se ingresaron en una matriz binaria de todos los aislamientos analizados.

Análisis de datos de Pot2-repPCR y estudios de diversidad

Los datos binarios fueron utilizados para calcular distancias genéticas entre todos los pares de aislamientos con el método de Jaccard. Basados en estas distancias se realizó un análisis de agrupamiento y se construyó un dendrograma usando UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) (Software InfoGen, Balzarini *et al.* 2004).

Además del análisis jerárquico, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) que permite visualizar los grupos obtenidos por UPGMA y vincularlos mediante información gráfica con otras variables, como subespecie de procedencia de los aislamientos.

Para analizar la diversidad entre los grupos genéticos obtenidos se calculó el Índice de diversidad de Shannon-Weaver. Dicho índice cumple con las siguientes características: 1) cuando hay sólo un alelo presente, el valor de éste índice es mínimo (cero) *indica* que no hay diversidad genotípica lo cual se asociaría a clonalidad máxima; 2) para un número fijo de alelos, el valor es máximo si todos se encuentran en igual frecuencia, es decir, cuando cada aislamiento de la población es una clase distinta, o sea no se detectan clones; 3) la diversidad aumenta cuando aumenta el número de alelos en la población y 4) es una función convexa de la frecuencia de alelos, es decir que una muestra de individuos tomada de dos poblaciones diferentes siempre será más diversa que la media de sus

diversidades por separado, excepto si ambas poblaciones son idénticas en su composición (Balzarini *et al.* 2004) . El índice de Shannon se calcula como:

$$H = - \sum_i^S p_i \times \log_2 p_i$$

donde S es el número total de especies o tipos de descriptores estudiados y p_i es la abundancia relativa.

Para verificar si existen diferencias significativas entre los grupos se realizó un análisis de varianza molecular AMOVA (Software InfoGen Balzarini *et al.* 2004). Se basa en un esquema de varianza jerarquizada produciendo estimaciones de los componentes de covarianza denominados estadísticos (Φ), los cuales son análogos a los estadísticos F de Wright. 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 de 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) (Balzarini *et al.* 2004).

AFLP y análisis de datos de AFLP

La técnica de AFLP se realizó a 53 aislamientos desde 1993 a 2009 (Tabla 1). Se utilizó AFLP™ Microbial Fingerprinting kit de Applied Biosystems® con modificaciones menores. Los adaptadores y cebadores de PCR fueron proporcionados como componentes del kit. La digestión de ADN genómico fue realizada con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* (Fermentas Life Science™), para la reacción se utilizó 500 ng de ADN genómico, 10 U de cada enzima, se incubó a 37°C durante 2 horas para asegurarse una digestión completa. Se controló el producto de la digestión en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN fueron ligados utilizando 100 U de T4 ADN ligasa, 1 µl de cada

adaptador *EcoRI* y *MseI* suministrados en el kit, e incubados a 16°C por 8 h. La mezcla de ligación se diluyó 1/10 antes de ser usada como para la pre-amplificación. A continuación se realizó la amplificación pre-selectiva en 20 µl de reacción conteniendo 4 µl de solución de restricción-ligación diluída 0,5 µl de cada adaptador pre-selectivo *EcoRI* (+0), *MseI* (+0) y 15 µl de tampón "AFLP™ Amplification Core Mix". El ciclo de PCR para la amplificación pre-selectiva fue: 1 ciclo inicial de desnaturalización por 2 min a 72°C, 20 ciclos de desnaturalización por 20 seg a 94°C, hibridación por 30 seg a 56°C, extensión por 2 min a 72°C mantenido finalmente a 4°C. Para verificar que la amplificación hubiera sido exitosa, se corrió los productos de PCR en gel de agarosa 2% en TBE 1X.

La amplificación selectiva se realizó bajo las mismas condiciones del protocolo de AFLP de Applied Biosystems®, la combinación de cebadores usados en las nueve amplificaciones selectivas se describen en la Tabla 2. El producto de la amplificación pre-selectiva se diluyó en 1/20, del cual se utilizaron 1,5 µl en 10 µl de reacción, 0.25 µM cebador de *MseI*, 0,05 µM del cebador marcado *EcoRI*, Y 7,5 µl de " AFLP Core Amplification Mix". Los parámetros del ciclo de amplificación selectiva fueron: 1 ciclo inicial por 2 min a 94°C, 1 ciclo de desnaturalización por 20 seg a 94°C, hibridación por 30 seg a 66°C, extensión por 2 min a 72°C; este ciclo fue seguido por 9 ciclos en cual la temperatura de hibridación fue disminuida en cada ciclo en 1°C desde 65°C a 57°C. Luego, 20 ciclos de 20 seg a 94°C, 30 seg a 56°C y 2 min a 72°C, seguido por la extensión final de un ciclo de 30 min a 60°C, mantenido finalmente a 4°C. Todas las amplificaciones por PCR fueron realizadas en el termociclador Mastercycler® ep gradient S Eppendorf®. Para verificar que la amplificación hubiera sido exitosa, se corrió los productos de PCR en gel de agarosa 2% en TBE 1X a 50 V/cm por 2 horas. Los fragmentos se visualizaron en un secuenciador ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems™.

Selectiva	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
S1	<i>EcoRI</i> (+C)	<i>MseI</i> (+A)
S2	<i>EcoRI</i> (+G)	<i>MseI</i> (+A)
S3	<i>EcoRI</i> (+T)	<i>MseI</i> (+A)
S4	<i>EcoRI</i> (+A)	<i>MseI</i> (+A)
S5	<i>EcoRI</i> (+G)	<i>MseI</i> (+C)
S6	<i>EcoRI</i> (+C)	<i>MseI</i> (+C)
S7	<i>EcoRI</i> (+AT)	<i>MseI</i> (0)
S8	<i>EcoRI</i> (0)	<i>MseI</i> (+C)
S9	<i>EcoRI</i> (0)	<i>MseI</i> (+T)

Tabla 2: Listado de bases utilizadas en cada uno de los cebadores para la amplificación selectiva.

La determinación de la posible estructura en la población con los datos de AFLP, fue estudiada utilizando el algoritmo k-means implementado en el entorno WEKA (WEKA versión 3.6.10) (Witten y Frank, 2005). El algoritmo k-means fue el elegido para determinar el número más probable de particiones (cluster) del conjunto de datos, de forma de determinar la posible estructura en la población estudiada. Es necesario tener presente al aplicar el algoritmo k-means que siempre se obtendrá una partición del conjunto de datos (según el k que haya sido pre-definido). Los clusters obtenidos no siempre tienen significado, debiendo utilizar información adicional al momento de tomar una decisión.

No existe conocimiento previo acerca de cuál sería el número de particiones que mejor explique la variabilidad de la población. Una de las formas de abordar el problema, es probar valores diferentes de k y evaluar cuál de todas es la mejor, esto es, cuál minimiza el total de las distancias al cuadrado de todos los puntos al centro de sus cluster correspondientes. Una simple estrategia es comenzar dando un número mínimo para k y

trabajar hasta un pequeño máximo fijo, utilizando validación cruzada como forma de evaluación. En este análisis se utilizó un rango de valores para k desde k=2 hasta k=10, tomando como criterio de corte (elección del número de cluster) el k donde el error intra-cluster disminuye significativamente con respecto al anterior, esto es el punto donde las distancias entre los diferentes grupos se maximizan y se minimizan las distancias entre los aislamientos asignados a un mismo cluster.

Establecimiento de los ensayo de patogenicidad

Las pruebas se realizaron según la metodología propuesta por CIAT (taller, 1994) en invernáculo con ambiente controlado, en la Estación Experimental INIA Treinta y Tres (Ávila, S., 2010). Se denomina tratamiento a la inoculación de una cepa del hongo patógeno. Se realizaron 6 tratamientos aislados en carpas de plástico independientes. En cada carpa, se incluyeron 14 genotipos de arroz, cada uno por triplicado. En cada una de las macetas de la repetición se sembraron 15 semillas. En la Tabla 3 se muestra el listado, conteniendo cultivares comerciales, variedades diferenciales con el gen de resistencia que poseen, y líneas isogénicas promisorias del Programa de Mejoramiento de Arroz del INIA.

Debido a que en el momento de realizar el test de patogenicidad todavía no se contaba con el resultados de los ensayos de los marcadores Pot2-repPCR, se seleccionaron dos aislamientos de cada uno de los 3 linajes clasificados previamente por AFLP (Tabla 6): aislamientos 81 y 107 del grupo 1; aislamientos 20 y 78 del grupo 2; aislamientos 24 y 27 del grupo 3. El inóculo fue preparado a partir de los aislamientos monospóricos conservados en papel, multiplicados en medio agar-salvado de arroz a 28°C en oscuridad durante 12 días y 3 días a temperatura ambiente con luz para inducir su esporulación. Las inoculaciones se realizaron cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo de 3 y 4 hojas, mediante aspersor manual aplicando 200 ml de una solución de esporas entre 0,5 y 3,1 x 10⁴ conidias/ml y 0,4 % de gelatina, por carpa del ensayo. Luego de la inoculación, las carpas se mantuvieron cerradas, asegurando un mínimo de temperatura de 20° C durante las noches y humedad en el entorno de 90%. Para el recuento de las conidias se usó la Cámara de Neugebauer.

Nº	Cultivar	Genes de Resistencia
1	C 104 LAC	Pi-1
2	C 101 A51	Pi-2
3	IR 64	Pi-33
4	Fanny (testigo susceptible)	sd
5	El Paso 144	sd
6	INIA Olimar	sd
7	INIA Tacuarí	sd
8	INIA Caraguatá	sd
9	L5502	Pi-2
10	L5287	Pi-2
11	L5688	Pi-2
12	C25	Pi-1
13	B 83	Pi-2
14	F-128-1	Pi-ta

Tabla 3: Tabla de las líneas y cultivares incluidos en el ensayo de patogenicidad, en el caso de que corresponda se *indican* los genes de resistencia conocidos que poseen cada una de ellas. s/d sin datos

Lectura de severidad de infección en los ensayos de patogenicidad

La lectura de los síntomas se realizó de acuerdo al Sistema de Evaluación Estándar para Arroz de IRRI (IRRI, 2002). De cada maceta se leyeron 10 plantas y de cada planta se leyó la hoja más afectada tomándose el tipo de mancha o lesión y el porcentaje del área foliar afectada. Los tipos de lesión se clasifican según la escala mostrada en la Figura 5.

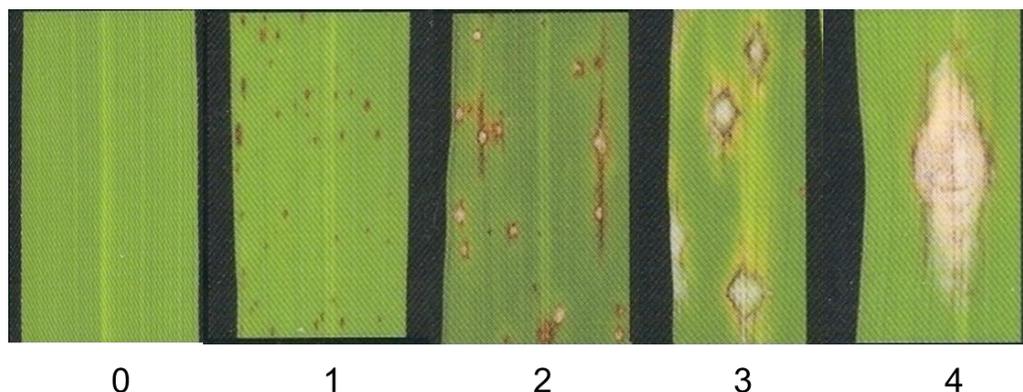


Figura 5: Escala de tipo de mancha de *P.oryzae*: 0 sin lesiones; 1, Pequeñas manchas color castaño de 1-2 mm; 2, Manchas color castaño de más de 2 mm; 3, Manchas necróticas grisáceas, circulares a romboidales y hasta 5 mm de diámetro; 4, Manchas típicas de *Pyricularia*, elípticas a romboidales de más de 5 mm largo. (Adaptado de IRRI 2002)

Cada línea o cultivar fue clasificada posteriormente según resistencia o susceptibilidad de acuerdo al tipo de mancha presente y área foliar afectada, de acuerdo al Sistema de Evaluación Estándar para Arroz de IRRI (IRRI, 2002):

- Altamente Resistente (AR), ó Resistente (R): Tipo de Lesión: 0, 1, 2;
- Intermedio Resistente (IR): Tipo de lesión: 3 en 1 a 8% del área foliar;
- Intermedio Susceptible (IS): Lesiones tipo 4 de 1 a 5% del área foliar, o lesiones tipo 3 entre 8 y 20% del área foliar;
- Altamente Susceptible (AS), ó Susceptible (S): Lesiones tipo 4 en más del 5% del área foliar, o lesiones tipo 3 por encima del 20% del área foliar.

Para que la prueba fuera válida, el testigo susceptible (Fanny) debía estar afectada con manchas tipo 4 en más del 20% y cuando estaban afectadas más del 30% de las plantas en cada maceta.

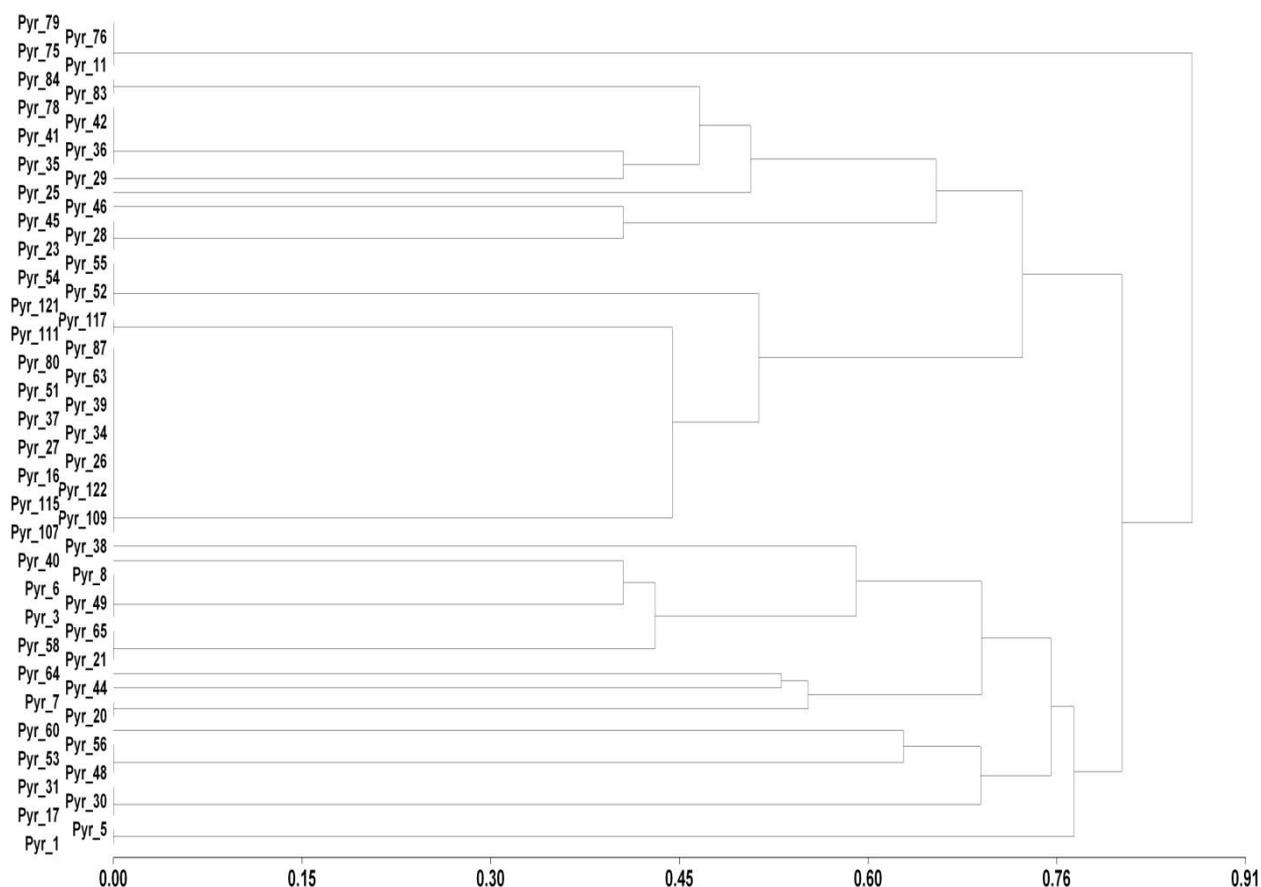
Se realizó el análisis estadístico de la varianza ANOVA (Software InfoGen, Balzarini *et al.* 2004) (nivel de significancia 5%) de bloques completos al azar, tomando como

tratamiento cada aislamiento del hongo utilizado para la inoculación y como repetición el triplicado de cada cultivar para cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de diversidad genética con marcadores Pot2-repPCR

A partir de las matrices binarias generadas en el fingerprinting Pot2-repPCR se calcularon las distancias genéticas entre todos los pares de aislamientos utilizando el método de Jaccard y se realizó el análisis de agrupamiento o cladograma (Figura 6). Para determinar correctamente el nivel de similitud utilizado para discriminar grupos, se realizó un análisis no jerárquico de los mismos utilizando un análisis de componentes principales (PCA) donde las variables son los marcadores Pot2 y el criterio de selección el número de aislamiento (Figura 7). Se observa que los aislamientos del patógeno son agrupados de la misma forma con ambos análisis.



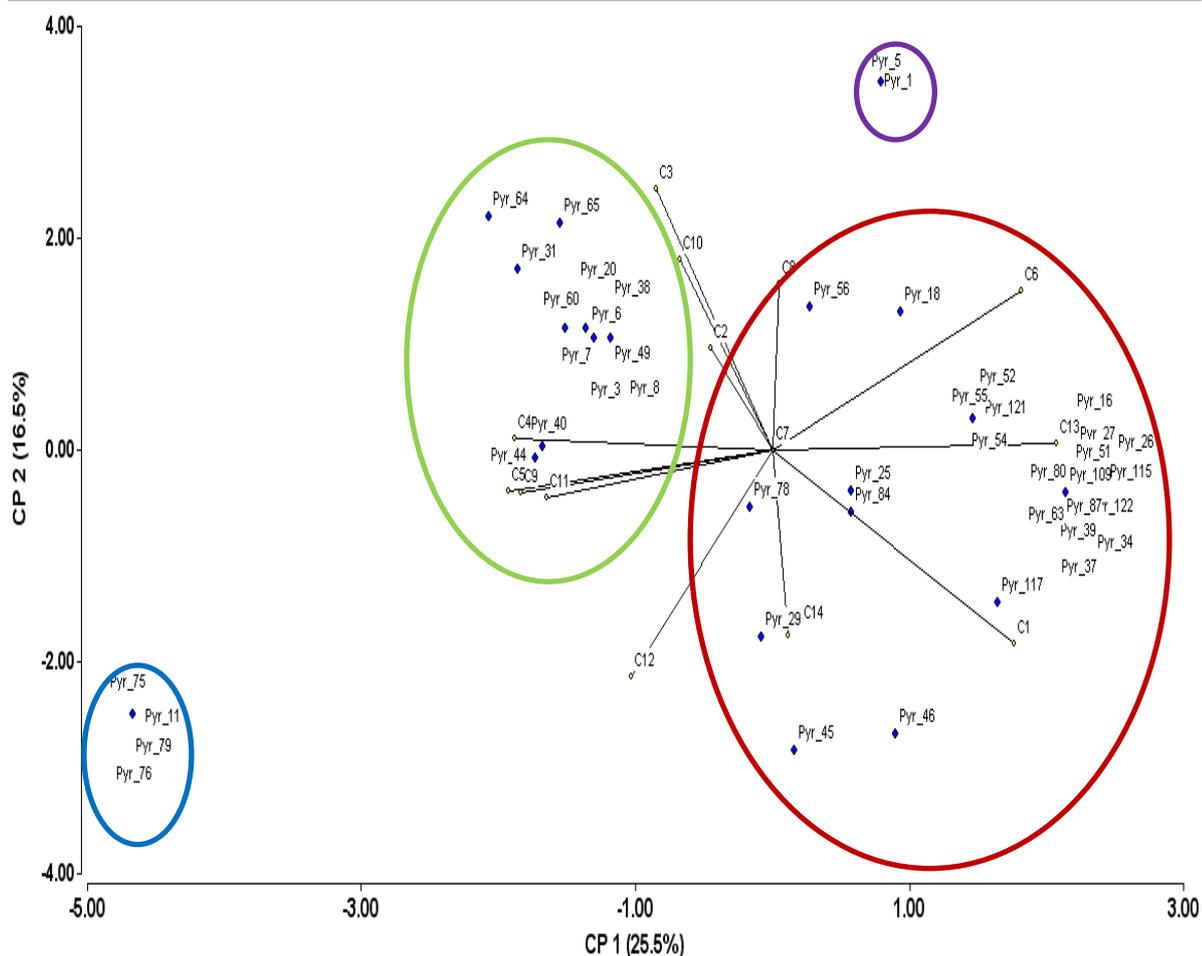


Figura 7: Análisis de Componentes Principales de los marcadores Pot2. El círculo azul rodea el grupo A, en círculo rojo el grupo B, el círculo verde el grupo C y el círculo violeta el grupo D.

El perfil de bandas correspondiente a cada linaje se muestra en la Figura 8. Se observa que la mayoría de los aislamientos pertenecen a los linajes B y C, teniendo 59% y 32% de aislamientos respectivamente. Estos linajes presentan variaciones intra-linajes o haplotipos, mientras que los linajes C y D presentan un único haplotipo.

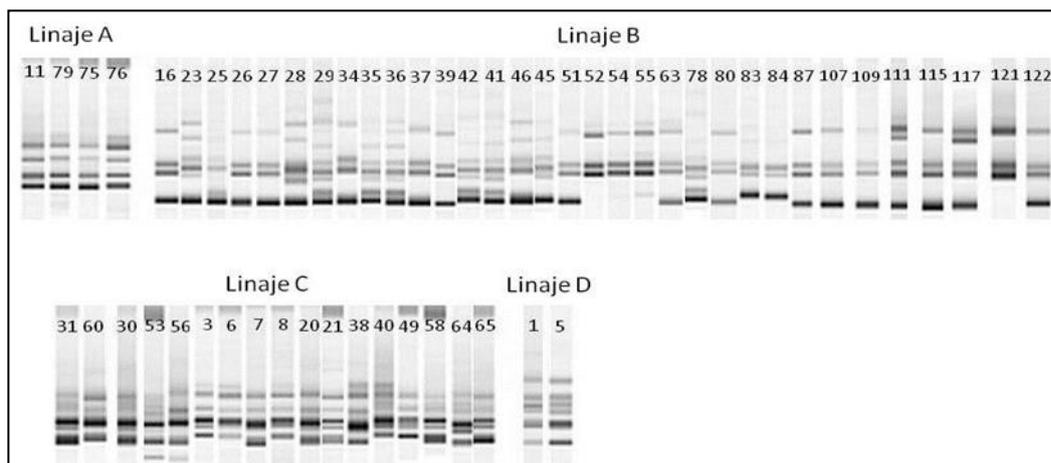


Figura 8: Perfiles de bandas de Pot2-repPCR de los cuatro linajes encontrados A, B, C, D. en cada perfil se *indica* el número de aislamiento correspondiente.

Los índices de diversidad de Shannon, usando un índice de aproximación normal, muestran que el grupo A tiene un índice de 1.79 con un intervalo de confianza de [1.53-1.82], el grupo B un índice de 1.87 y un intervalo de [1.74-1.94], el grupo C un índice de 2.11 y un intervalo de [1.90-2.19] y por último el grupo D un índice de 1.79 y un intervalo de [1.27-1.83]. Los resultados sugieren que el grupo C es el que presenta mayor diversidad seguida por el grupo B; ambos grupos mayoritarios.

Mediante un análisis de AMOVA se evaluó la estructura jerárquica entre grupos, los cuales fueron establecidos de acuerdo a los agrupamientos por Pot2-rep-PCR según se *indica* en la Figura 4. Este resultado *indica* que el factor grupo Pot2 explica el 25,30% de la variación total, por lo que la 74,70% de la variación observada se debe a diferencias entre aislamientos de un mismo grupo. El valor del componente de varianza (Comp. Var.) es significativamente diferente a cero (p -valor <0.0001), lo cual *indicaría* que existe variabilidad genética ente grupos o que al menos una de los 4 grupos se diferencia de los otros respecto a los perfiles moleculares promedio. Por último, se infiere que dentro de cada uno del grupo también existe variabilidad genética ($p<0.0001$).

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Iter.#	Comp.Var.	Porcentaje
Entre grupos Pot 2	34.62	3	11.54	<0.0001	400	0.56	25.30
Dentro del grupo Pot 2	84.93	51	1.67	<0.0001	400	1.67	74.70
Total	119.55	59	2.03			2.23	100.00

Tabla 4: AMOVA entre grupos identificados por pot2-repPCR. FV: Fuente de variación, SC: Suma de cuadrados, gl: grados de libertad; CM: Cuadrados medios esperada. Comp.Var: Componentes de la varianza.

Según los análisis estadísticos (Índice de Shannon`s y AMOVA) se infiere que los grupos basados en marcadores Pot2 son significativamente diferentes entre sí, a pesar de su variación genética interna por lo que esta técnica es robusta para analizar la población del patógeno. Por lo tanto, este resultado muestra consistencia con los obtenidos por (George *et al*, 1998; Javan-nikkhah *et al*, 2004).

En la Tabla 5 se describe las características de cada aislamiento: número de aislamiento, cultivar o línea donde fue recolectado, año de colecta y grupo Pot2. Las diferencias en la cantidad de colectas en los diferentes años se deben a que eran obtenidas según la incidencia de la enfermedad en ese año. Se puede observar que aislamientos pertenecientes al grupo A fueron encontrados sobre el cultivar Bluebelle (*ssp. japonica*) en 1995 y luego no se halló hasta el año 2005, el cual también se encontró en Bluebelle y en plantas diferenciales (C104 PKT) en viveros trampa. Es de destacar que el cultivar Bluebelle se dejó de cultivar hacia los años 1999-2000, por lo que la aparición del haplotipo del grupo A después de 10 años, pudo deberse a que el patógeno se encontrara en campo infectando hospederos alternativos. Conforme un genotipo de arroz compatible se encuentre disponible para ser infectado (como por ejemplo en un vivero trampa, donde las condiciones son favorables para su desarrollo) el patógeno podrá producir infección. Esto mismo puede explicar el comportamiento del grupo D, el cual fue solamente encontrado en el cultivar Bluebelle en el año 1995 sin haber otro aislamiento hasta 2010.

El grupo B apareció a partir de 1998 y en todos los años sucesivos, siendo el predominante en los últimos años de colecta 2007-2010. El 45% de los haplotipos de este

linaje fueron recolectados sobre cultivares del tipo *indicas*, como El Paso 144, INIA Olimar e INIA Cuaró, mientras que el 18% fue recolectado de cultivares del tipo *japonicas* o templadas como INIA Tacuarí e INIA Caragatá. Esto puede deberse al aumento del área sembrada de los *Indica* respecto a los *japonicas*, y no a que haya una selectividad de la subespecie por parte del grupo genético del patógeno. El restante 37% de los haplotipos fueron aislados de líneas avanzadas del Programa de Arroz, INIA. Por último, el grupo C aparece entre los años 1994 y 2003, donde 70% de los aislamientos clasificados en este grupo son del tipo *japonica* (INIA Tacuarí, INIA Yerbal, INIA Zapata y Bluebelle).

Análisis de la diversidad genética de *Pyricularia oryzae*, agente causal de la enfermedad Bruzzone del arroz

Leticia Chao

Nº	Fecha de aislamiento	Cultivar donde fue recolectado	Linaje por Pot2	Nº	Fecha de aislamiento	Cultivar donde fue recolectado	Linaje por Pot2
1	1995	Bluebelle	D	46	2001	El Paso 144	B
3	1994	INIA Yermal	C	49	2001	INIA Zapata	C
5	1995	Bluebelle	D	51	2001	INIA Tacuarí	B
6	1995	INIA Tacuarí	C	52	2002	El Paso 144	B
7	1993	Bluebelle	C	53	2002	L 1855	C
8	1995	Bluebelle	C	54	2002	El Paso 144	B
11	1993	Bluebelle	A	55	2002	INIA Tacuarí	B
16	1998	INIA Caraguatá	B	56	2002	INIA Tacuarí	C
20	1998	INIA Tacuarí	C	58	2003	INIA Tacuarí	C
21	1998	El Paso 144	C	60	2003	INIA Tacuarí	C
23	1999	L 2746	B	63	2003	INIA Tacuarí	B
25	1999	L 2877	B	64	2003	INIA Tacuarí	C
26	1999	L 2882	B	65	2003	INIA Tacuarí	C
27	1999	L 2908	B	75	2005	Bluebelle	A
28	1999	L 2923	B	76	2005	Fanny	A
29	1999	L 2995	B	78	2005	INIA Olimar	B
30	1999	L 2998	C	79	2005	C104 PKT	A
31	1999	L 3006	C	80	2005	INIA Olimar	B
34	1999	L 3070	B	83	2007	El Paso 144	B
35	1999	L 3107	B	84	2007	INIA Olimar	B
36	1999	L 3128	B	87	2007	INIA Olimar	B
37	1999	L 3194	B	107	2009	INIA Olimar	B
38	1999	Bluebelle	C	109	2009	L8183	B
39	1999	El Paso 144	B	111	2010	INIA Olimar	B
40	1999	CT13063-CA	C	115	2010	El Paso 144	B
41	1999	INIA Tacuarí	B	117	2010	INIA Tacuarí	B
42	1999	INIA Cuaró	B	121	2010	El Paso 144	B
44	2001	INIA Tauarí	B	122	2010	L5502	B
45	2001	El Paso 144	B				

Tabla 5: Descripción de aislamientos utilizados para el fingerprinting pot2. Se incluye el linaje de cada uno.

Respecto a la evolución de la población de *P. oryzae* en el tiempo (Figura 9), se observa que a partir del año 1998 hubo un cambio en la población del patógeno, apareciendo aislamientos del grupo B y desapareciendo paulatinamente los del grupo C. Desde el 2005, los únicos aislamientos recolectados del patógeno son pertenecientes al grupo B, exceptuando ese mismo año cuando apareció nuevamente el grupo A. Este

grupo fue recolectado en cultivos en viveros trampa y no en cultivares sembrados en campo actualmente.

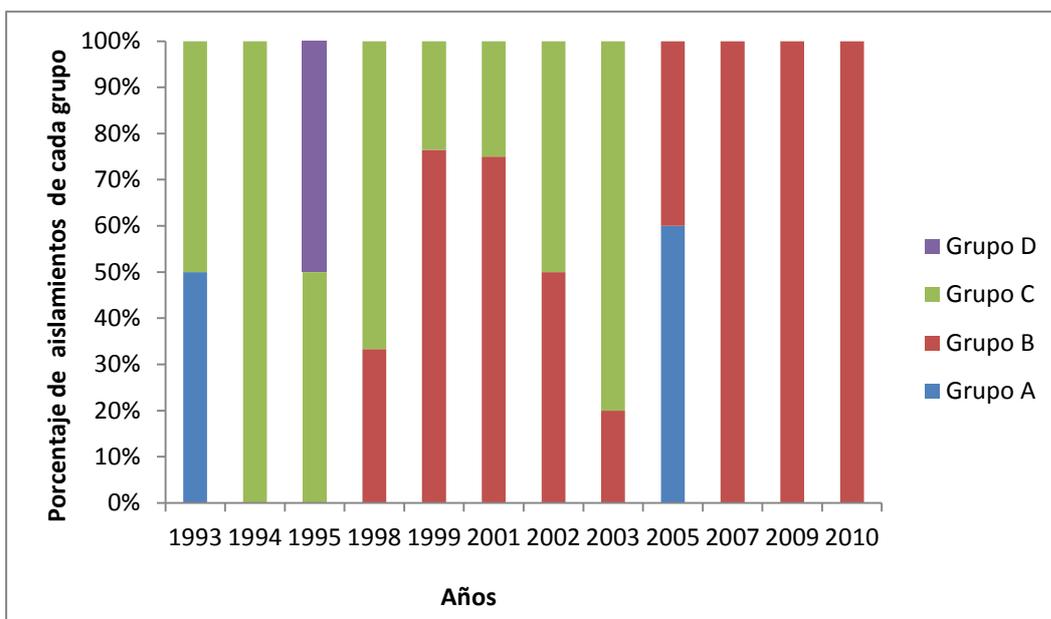


Figura 9: Evolución en años de los grupos clasificados por Pot2 repPCR.

Para considerar si existe relación entre los grupos obtenidos por Pot2-repPCR y la variedad de arroz al cual infecta, en el análisis por PCA se incluyó en el identificador del aislamiento, la subespecie del cultivar donde fue recolectado (Figura 11). Como se observa en esta figura, pareciera existir una tendencia de los cultivares *indica* a ser infectados mayoritariamente por el grupo B, mientras que los cultivares Japonica son compatibles con todos los grupos genéticos de *P.oryzae* que se encuentran en el Uruguay. Esta diferencia se ve claramente en la Figura 10 donde se grafica el porcentaje de grupos genéticos de *P.oryzae* en cuanto a su infección en cultivares *indica* y *japonica*. Igualmente no se puede concluir con estos datos que los aislamientos del grupo B tengan alguna especificidad de infección con los genotipos *indica*.

Leticia Chao

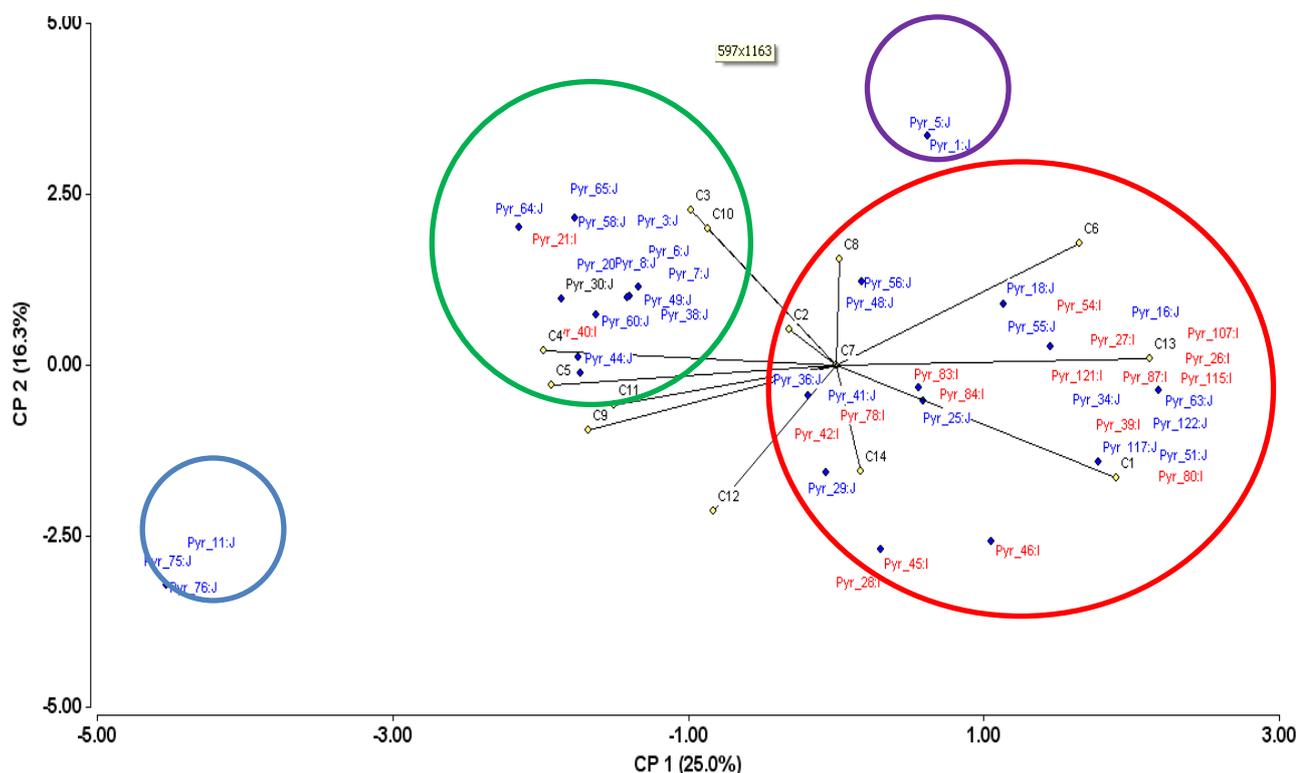


Figura 11: Análisis de Componentes Principales. En azul se destaca los aislamientos recolectados de cultivares *japonica*, y en rojo los recolectados sobre cultivares *indica*. El círculo azul rodea el grupo A, en círculo rojo el grupo B, el círculo verde el grupo C y el círculo violeta el grupo D.

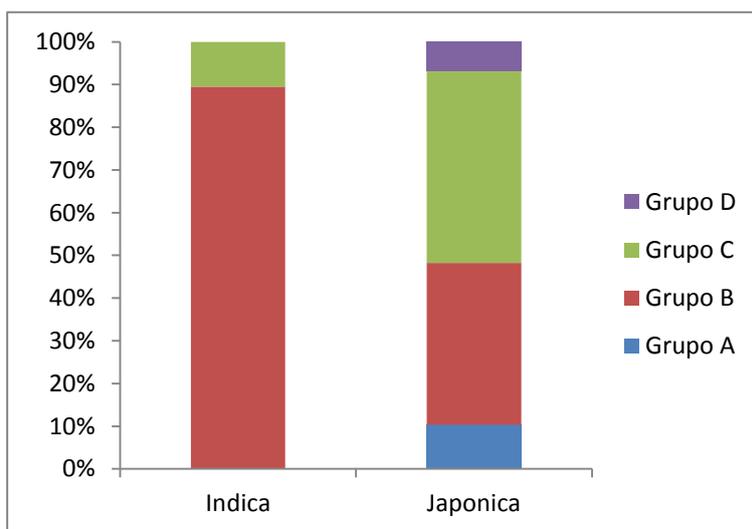


Figura 10: Gráfica del porcentaje de grupos genéticos de *P.oryzae* en cuanto a su infección en cultivares *Indica* y Japonica

Con respecto a los tejidos de las plantas a los que infecta (Figura 12), los dos grupos mayoritarios (B y C) infectan tanto a las hojas como a la panícula, mientras que el grupo A fue colectado solamente de las hojas y el D en la panícula.

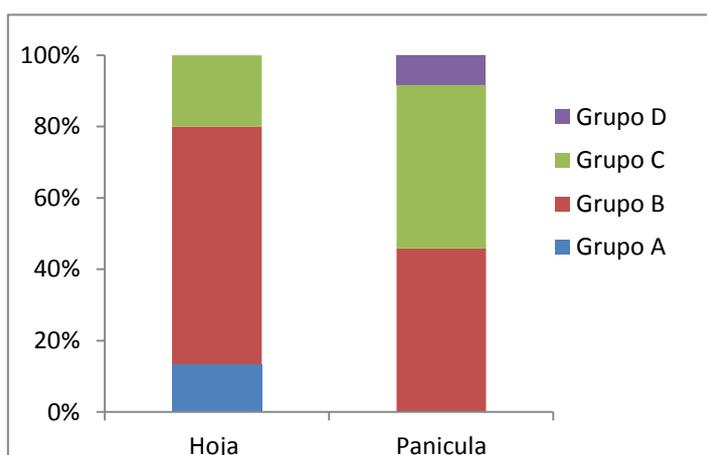


Figura 12: Comparación entre el lugar de infección en la planta respecto a los grupos aislados

Respecto a la reproducibilidad de esta técnica, George *et al* (1998) demuestra mediante análisis de segregación, que los productos de PCR (amplicones de la secuencia entre elementos Pot2) son marcadores genéticos reproducibles. Además, los autores muestran que hay una cercana correspondencia entre los linajes obtenidos con MGR586 RFLP y Pot2-repPCR, por lo que la robustez de la MGR586-RFLP para estudiar la variación genética del patosistema (Levy *et al*, 1991) podría ser similar en Pot2 pero con menos esfuerzo técnico. Las condiciones de “long PCR” (alto pH y alto tiempo de extensión) y las características de los propios elementos Pot2 (100 copias dispersas por genoma haploide) generan suficiente polimorfismo para detectar diversidad genética, el cual junto a su reproducibilidad, hacen que Pot2-rep PCR sea una herramienta de fingerprinting útil para construir mapas de *P.oryzae*. Por todo esto, además de su bajo esfuerzo y costo, se suma

a que es una tecnología simple, Pot2-repPCR es una excelente metodología en el empleo rutinario en el laboratorio para el monitoreo de la enfermedad.

AFLP

Para el análisis de variabilidad de *P. oryzae* mediante la técnica AFLP, se ensayaron las nueve combinaciones de cebadores selectivos que se describieron en Materiales y Métodos, de los cuales solamente 3 amplificaron exitosamente para todos los aislamientos: *EcoRI* (+T), *MseI* (+A) (S3), S5 (*EcoRI* (+G), *MseI* (+C)) y S7 (*EcoRI* (+AT), *MseI* (0)). Un total de 151 marcadores polimórficos AFLP fueron obtenidos como resultado de los 53 genotipos de *P. oryzae* bajo estudio utilizando las tres combinaciones de selectivas, a partir de los cuales se construyó una matriz binaria para todos los marcadores, siendo 1 la presencia y 0 a ausencia del marcador. En el caso de los aislamientos 107 y 109, los cuales no amplificaron en la S5, se los designó como “missing data” y así no perder información del año 2009. En la Figura 13 donde se grafica error intra-cluster vs. Número de cluster, el error es minimizado para $k=3$, por encima de este valor no se observó disminución significativa.

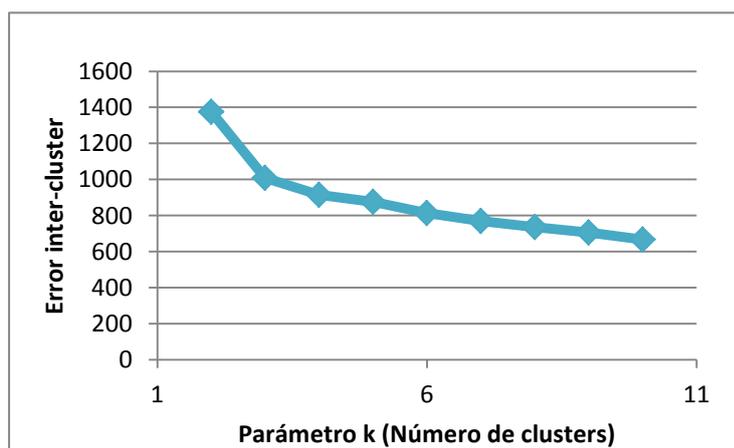


Figura 13: Gráfica Error intra-cluster vs. Número de cluster. El punto donde cambia la pendiente es $k=3$.

A través del análisis de clusters se pudo determinar la existencia de estructura en la población de *Pyricularia oryzae*. Los datos obtenidos permiten inferir la existencia de 3 grupos genéticos, los cuales se muestran en la Tabla 6. El 62 % son agrupados en el cluster 1, 30 % en el cluster 2, y 8% en el cluster 3. Los aislamientos pertenecientes a los cluster 1 y 2 fueron recolectados en todos los años.

Con esta técnica el *screening* es más profundo que el obtenido por los marcadores Pot2 (155 vs 14 *loci* polimórficos). Igualmente se observó que la estructura poblacional es simple como la obtenida con Pot2. Esto demuestra que la variabilidad genética de la población de *P. oryzae* en Uruguay como la esperada en esta región respecto a los *hot spots* de Colombia, Vietnam e Irán (Correa-Victoria y Zeigler, 1993; Javan-nikkhah *et al.* 2004; Ninh Thuan *et al*, 2006).

Análisis de la diversidad genética de *Pyricularia oryzae*, agente causal de la enfermedad Bruzzone del arroz

Leticia Chao

Nº	Fecha de recolección	Cultivar donde fue recolectado	Cluster AFLP	Nº	Fecha de recolección	Cultivar donde fue recolectado	Cluster AFLP
1	1995	BLUEBELLE	2	40	1999	CT13063-CA	1
4	1995	INIA Yerbal	1	41	1999	INIA Tacuarí	1
5	1995	BLUEBELLE	2	42	1999	INIA Cuaró	1
7	1993	BLUEBELLE	2	47	2001	El Paso 144	3
8	1995	BLUEBELLE	2	48	2001	INIA Tacuarí	2
9	1995	El Paso 144	2	51	2001	INIA Tacuarí	1
10	1993	CT10885-CA	1	53	2002	L1855	2
11	1993	BLUEBELLE	1	54	2002	El Paso 144	2
16	1998	INIA Caraguatá	1	55	2002	INIA Tacuarí	1
17	1998	INIA Tacuarí	1	56	2002	INIA Tacuarí	2
18	1998	INIA Tacuarí	1	58	2003	INIA Tacuarí	2
20	1998	INIA Tacuarí	2	60	2003	INIA Tacuarí	2
24	1999	L2871	3	63	2003	INIA Tacuarí	3
25	1999	L2877	1	64	2003	INIA Tacuarí	2
26	1999	L2882	1	76	2005	Fanny	2
27	1999	L2908	3	78	2005	INIA Olimar	2
28	1999	L2923	1	81	2007	INIA Olimar	1
29	1999	L2995	1	82	2007	INIA Tacuarí	1
30	1999	L2998	1	83	2007	El Paso 144	1
31	1999	L3006	1	84	2007	INIA Olimar	1
32	1999	L3014	1	85	2007	El Paso 144	1
34	1999	L3070	1	86	2007	INIA Olimar	1
35	1999	L3107	1	87	2007	INIA Olimar	1
36	1999	L3128	1	88	2004	El Paso 144	2
37	1999	L3194	1	107	2009	INIA Olimar	1
38	1999	BLUEBELLE	1	109	2009	L8183 ²	1
39	1999	El Paso 144	1				

Tabla 6: Listado de aislamientos clasificados por *cluster* por la técnica de AFLP.

Ensayo de patogenicidad

Con motivo de detectar diferencias en el comportamiento de las diferentes variedades de arroz en respuesta a la inoculación con diferentes aislamientos del hongo *P. oryzae* se realizó un ensayo de patogenicidad en invernáculo en la Estación Experimental INIA Treinta y Tres.

Considerando el tipo de reacción, se observó que el testigo Fanny mostró susceptibilidad a todos los aislamientos evaluados, teniendo en todos los casos tipo de mancha 4 y entre 65% y 100% del área foliar afectada, por lo que demuestra la validez del ensayo.

Las líneas diferenciales con el gen Pi-1, los cultivares del tipo *indica* El Paso 144 e INIA Olimar tuvieron diagnóstico S para ambos aislamientos del grupo 1 (Tabla 7), excepto la línea F-128-1 portadora del gen Pi-ta fue diagnosticada como IS para el aislamiento 81 y S para el aislamiento 107. Los cultivares con R fueron las portadoras del gen Pi-2, Pi-33 e INIA Caraguatá, con excepción de B 83 que por una diferencia en el área foliar afectada fueron diagnosticados resistente para el aislamiento 107, mientras que para el 81 la reacción fue IR. El cultivar del tipo *japonica* INIA Tacuarí fue diagnosticado IR para el aislamiento 81 e IS para el aislamiento 107.

En el grupo 2 (Tabla 8), la única línea que mostró susceptibilidad fue C 104 LAC, mientras que todos los demás cultivares mostraron resistencia a ambos haplotipos del patógeno, con la excepción de INIA Tacuarí y B 83 que fueron diagnosticadas como IS y S respectivamente para el 78.

El grupo 3 (Tabla 9) mostró consistencia en el comportamiento de los cultivares para los dos aislamientos 24 y 27. Las líneas portadoras del gen de resistencia Pi-1, Pi-ta2, INIA Olimar, INIA Tacuarí y El Paso 144 mostraron susceptibilidad para ambos aislamientos. Por otro lado, los cultivares que mostraron resistencia fueron los portadores del gen Pi-2 y Pi-33, excepto B 83 con diagnóstico S para el 20 e IR para 78.

Grupo 1		Aislamiento 81			Aislamiento 107		
Cultivar	Genes Pi	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico
C 104 LAC	Pi-1	3	58.6	S	3	65.5	S
C 101 A51	Pi-2	2	3.7	R	2	6.0	R
IR 64	Pi-33	0	0.0	R	0	0.0	R
Fanny	sd	4	65.8	S	4	100	S
El Paso 144	sd	4	47.4	S	4	85.6	S
INIA Olimar	sd	4	73.4	S	4	90.4	S
INIA Tacuarí	sd	3	7.7	IR	4	2.0	IS
INIA Caraguatá	sd	1	0.5	R	1	0.2	R
L5502	Pi-2	2	2.4	R	1	1.1	R
L5287	Pi-2	1	0.4	R	1	0.07	R
L5688	Pi-2	1	0.3	R	1	0.3	R
C25	Pi-1	4	61.1	S	4	65.9	S
B83	Pi-2	3	3.8	IR	3	23.1	S
F-128-1	Pi-ta ²	3	18.9	IS	4	79.2	S
Promedio general		2.2	24.5		2.3	36.7	
CV		17.96	67.35		15.49	18.54	
Sign rep		0.1	0.1		0.047	NS	
Sign trat		0.00	0.00		0.00	0.00	

Tabla 7: Evaluación de patogenicidad para el grupo 1, aislamientos 81 y 107. El diagnóstico se clasifica como: S Susceptible, IS Intermedio Susceptible, IR Intermedio Resistente, R Resistente. El porcentaje del área foliar afectada es el promedio de las tres repeticiones, con su diagnóstico. Sign rep: Significancia de la repetición. Sign trat: Significancia del tratamiento. NS: no significativo. Sd: sin datos.

Grupo 2		Aislamiento 20			Aislamiento 78		
Cultivar	Genes Pi	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico
C 104 LAC	Pi-1	3	85.5	S	4	36.4	S
C A51	Pi-2	1	11.1	R	2	4.2	R
IR 64	Pi-33	0	0.0	R	0	0.0	R
Fanny	sd	4	100	S	4	71.7	S
El Paso 144	sd	1	0.6	R	1	3.5	R
INIA Olimar	sd	1	0.2	R	1	0.1	R
INIA Tacuarí	sd	3	5.6	IR	4	1.5	IS
INIA Caraguatá	sd	1	1.7	R	1	0.03	R
L5502	Pi-2	2	3.2	R	2	0.2	R
L5287	Pi-2	1	0.07	R	1	0.0	R
L5688	Pi-2	3	4.1	R	3	1.8	IR
C25	Pi-1	2	2.2	R	2	1.0	R
B83	Pi-2	1	6.7	R	4	33.3	S
F-128-1	Pi-ta ²	2	7.6	R	4	0.2	R
	Promedio general	1.5	16.4		1.5	11.0	
	CV	34.26	28.31		51.5	164.7	
	Sign rep	ns	ns		ns	ns	
	Sign rep	0.00	0.00		0.00	0.00	

Tabla 8: Evaluación de patogenicidad para el grupo 2, aislamientos 20 y 78. El diagnóstico se clasifica como: S Susceptible, IS Intermedio Susceptible, IR Intermedio Resistente, R Resistente. . El porcentaje del área foliar afectada es el promedio de las tres repeticiones, con su diagnóstico. Sign rep: Significancia de la repetición. Sign trat: Significancia del tratamiento. NS: no significativo.

Grupo 3		Aislamiento 24			Aislamiento 27		
Cultivar	Genes Pi	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico	Tipo de mancha	% área foliar afectada	Diagnóstico
C 104 LAC	Pi-1	3	55.1	S	3	27.3	S
C 101 A51	Pi-2	2	14.8	R	2	1.2	R
IR 64	Pi-33	0	0.0	R	0	0.0	R
Fanny	sd	4	100	S	4	66.8	S
El Paso 144	sd	4	86.0	S	4	27.9	S
INIA Olimar	sd	4	93.3	S	4	38.0	S
INIA Tacuarí	sd	3	9.9	IS	4	0.9	IS
INIA Caraguatá	sd	1	0.03	R	1	0.07	R
L5502	Pi-2	2	1.2	R	3	1.0	IR
L5287	Pi-2	1	0.1	R	1	0.12	R
L5688	Pi-2	1	0.3	R	1	0.2	R
C25	Pi-1	4	77.4	S	4	36.1	S
B83	Pi-2	4	6.9	S	3	2.2	IR
F-128-1	Pi-ta ²	4	53.6	S	4	36.4	S
	Promedio general	2.4	35.6		2.3	17.0	
	CV	14.81	33.6		22.15	60.95	
	Sign rep	0.113	0.358		Ns	Ns	
	Sign rep	0.0	0.0		0.0	0.0	

Tabla 9: Evaluación de patogenicidad para el grupo 3, aislamientos 24 y 27. El diagnóstico se clasifica como: S Susceptible, IS Intermedio Susceptible, IR Intermedio Resistente, R Resistente. . El porcentaje del área foliar afectada es el promedio de las tres repeticiones, con su diagnóstico. Sign rep: Significancia de la repetición. Sign trat: Significancia del tratamiento. NS: no significativo

CONCLUSIONES

Se encontró una baja variabilidad genética en la población de *Pyricularia oryzae* en nuestro país mediante la herramienta Pot2-repPCR. Ésta mostró ser eficiente a tales efectos, demostrado mediante análisis estadísticos. Esta característica sumada a la facilidad y bajo costo de este método, hacen que se pueda incorporar en los análisis de rutina para el Programa de Mejoramiento de Arroz que lleva a cabo INIA.

De la comparación con la metodología AFLP, surge que Pot2-repPCR es suficiente para estudiar la variabilidad genética de la población de Bruzzone existente en Uruguay, a menor costo y esfuerzo.

Como resultados de los ensayos de patogenicidad se observa una relación de los genotipos y los cultivares a los que infecta, mostrando que los genes de resistencia Pi-2 y Pi-33 otorgan resistencia a el grupo genético presente en el país, por lo que podría incorporarse mediante piramidación de genes a los cultivares desarrollados por INIA.

BIBLIOGRAFÍA

Anjos, L.M., Santos, G.R., Dias Neto, J.J., Oliveira, W.F., Castro Neto, M.D. (2009) Identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* em áreas de arroz irrigado no Estado do Tocantins. *Tropical Plant Pathology*, 34 (3): 182-185.

Ávila, S., Casales, L., Escalante, F. (2010). Pruebas de patogenicidad de grupos de aislamientos de *Pyricularia grisea*, obtenidos por AFLP. Series Actividades de Difusión 611, INIA, Cap 4: 16-21.

Balzarini, M., Di Rienzo, J., (2004). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Babujee, L., Gnanamanickam, S. S. (2000). Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance. *Current Science*, 78(3):248–257.

Ballini, E., Morel, J.B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J.L., Tharreau, D. (2008). A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7): 859–868.

Cavara, (1892). *Atti ist. bot. Università di Pavia*. 2(2): 280.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1994) Taller: Integración de Fitopatología, Mejoramiento y Biología Molecular para desarrollar resistencia estable al Añublo del Arroz (*Pyricularia grisea*). CIAT. Cali, Colombia.

Correa-Victoria, F. J., Zeigler, R. S. (1993). Pathogenic Variability in *Pyricularia grisea* at a Rice Blast “Hot Spot” Breeding Site in Eastern Colombia. *The American Phytopathological Society*, 77(10): 1029–1035.

Couch, B. C., Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*. *Mycologia*, 94: 683–693.

Courdin, V., Hernández, A. (2013). Dinámica del cultivo de arroz en Uruguay en el “nuevo” escenario agropecuario (2000-2010). *Cangüé*, 34:21–31.

Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L., Orbach, M., Lebrun, M. H. (2000). Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2):217–227.

Ebbole, D. J. (2007). Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 437–456.

FAO Statistics Division (FAOSTAT) [Base de Datos en línea], <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. [Consulta 15 noviembre de 2013]

Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. (2 ed., p. 220). Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN.

Foreign Agricultural Service, USA [Documento en línea]. Grain: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture, Marzo 2014, <http://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade> [Consulta 15 de marzo 2014]

George, M. L., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H. (1998). Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, 88(3): 223–229.

Hamer, J. E., Farrall, L., Orbach, M. J., Valent, B., Chumley, F. G. (1989). Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24): 9981–9985.

Herbert, T. T. (1971). Production of the perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, 61: 83–87.

Howard, R. J., Ferrari, M. A. (1989). Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*, 13(4), 403–418.

Innan, H., Terauchi, R., Kahl, G., Tajima, F. (1999). A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics Society of America*, (151): 1157–1164.

IRRI (2002). *Sistema devaluación Estándar del Arroz*. International Rice Research Institut.e

Javan-nikkhah, M., Mcdonald, B., Banke, S., Hedjaroude, G. (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 110(9): 909–919.

Johnson, R. (1981). Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, 71: 567–568.

Kachroo, P., Leong, SA., & Chatoo, B.B. (1994). Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular General Genetics* 245:339-348.

Kankanala, P., Czymmek, K., Valent, B. (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell*, 19(2): 706-724.

Kumar, J., Nelson, R. J., Zeigler, R. S. (1999). Population Structure and Dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, (152): 971–984.

Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A., Hamer, J. E. (1991). DNA Fingerprinting with a Dispersed Repeated Sequence Resolves Pathotype Diversity in the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell*, 3(1): 95–102.

Mackill, D.J., (1995). Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science*. (35): 889-894.

Mcdonald, B. A. (1997). Genetics of Fungi : Tools and Techniques. *Phytopathology*, 87(4): 448–453.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (Uruguay), (2011) Anuario Estadístico Agropecuario 2011. Montevideo, Uruguay, Cap II, pp. 49-75.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (Uruguay), (2013) Anuario Estadístico Agropecuario 2013. Montevideo, Uruguay, Cap II, pp. 49-75.

Ninh Thuan, N. T., Bigirimana, J., Roumen, E., Van Der Straeten, D., Höfte, M. (2006). Molecular and pathotype analysis of the rice blast fungus in North Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 381–396.

Oka, H. I. (1991). Genetic Diversity of Wild and Cultivated Rice. In G. S. Khush & G. H. Toenniessen (Eds.), *Rice Biotechnology* pp. 55–83. Oxford: CAB International.

Ou, S. H. (1980). A look at worldwide rice blast disease control. *Plant Disease*, 64(5): 439–445.

Park, S.-Y., Milgroom, M. G., Han, S.-S., Kang, S., Lee, Y.-H. (2003). Diversity of Pathotypes and DNA Fingerprint Haplotypes in Populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over Two Decades. *Phytopathology*, 93(11):1378–1385.

Pérez de Vida, F., (2012) Mejoramiento genético en cultivares del subtipo indica. *Actividades de Difusión 686, Arroz Resultados Experimentales 2011-12, INIA. Cap 6 pp.11-12.*

Pérez de Vida, F., Macedo, I., (2013) Estimación y brecha tecnológica en Arroz. *Actividades de Difusión 713, ARROZ - SOJA Resultados Experimentales 2012-13, INIA. Cap. 7, pp. 7-9.*

Prabhu, A. S., Araújo, L. G., Silva, G. B., Trindade, M. G. (2007). Virulence and rep-PCR analysis of *Pyricularia grisea* isolates from two Brazilian upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, 32(1): 13–20.

Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria, FONTAGRO (2005). Proyecto FONTAGRO Informe Técnico Final: Desarrollo de una Estrategia para la Obtención de Resistencia Durable a *Pyricularia* grisea en Arroz en el Cono Sur. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Pyricularia oryzae en arroz. [Publicación en línea]
<http://www.tecnicoagricula.es/pyricularia-oryzae-en-arroz>. [Consulta 15 de febrero 2014].

Romao, J., Hamer, J. E. (1992). Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12): 5316–5320.

Rosas, J., Bonnacarrère V., Pérez de Vida, F. (2012) Incorporación de genes de resistencia a *pyricularia* grisea Pi-2 y Pi-33 en Inia Olimar y El Paso 144. *Actividades de Difusión 686, Arroz resultados Experimentales 2011-12. Cap 6: 24-25*

Rossmann, A. Y., Howard, R. J., & Valent, B. (1990). *Pyricularia* grisea, the Correct Name for the Rice Blast Disease Fungus. *Mycologia*, 82(4): 509–512.

Roumen, E., Levy, M., & Notteghem, J. L. (1997). Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology*, (103): 363–371.

Saleh, A. a, Zeller, K. a, Ismael, A.-S. M., Fahmy, Z. M., El-Assiuty, E. M., Leslie, J. F. (2003). Amplified Fragment Length Polymorphism Diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. *Phytopathology*, 93(7): 853–859.

Scheuermann, K. K., Raimondi, J. V., Marschalek, R., Andrade, A. de, Wickert, E. (2012). The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity. In M. Caliskan (Ed.), *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. InTech

Séré, Y., Onasanya, A., Afolabi, A., Mignouna, H. D., Akator, K. (2007). Genetic diversity of the blast fungus, *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, in Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 6(22):2568–2577.

Silué, D., Notteghem, J.L., Tharreau, D. (1992). Evidence a Gene-for-Gene Relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* Pathosystem. *The American Phytopathological Society*, 82(5): 577–580.

Subramanian, C.V., (1968). *Pyricularia oryzae*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Nº 169, Set Nº17. CAB International.

Taheri, P., Bonecarrère, V., Höfte, M. (2004). Characterization of a *Pyricularia grisea* population from Uruguay by molecular analysis. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(2): 207–10.

TeBeest, D.O., C. Guerber and M. Dittmore. (2007). Rice blast. *The Plant Health Instructor*. http://www.agritech.tnau.ac.in/expert_system/paddy/cpdisblast.html [Consulta: 5 de febrero de 2014].

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.(1995).AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:319-332.

Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7213–7218.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531–6535.

Witten, I. H., Frank, E. (2005). *Data Mining: Practical machine learning tools and techniques* (2nd ed.). San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers.

Xia, J. Q., Correll, J. C., Lee, F. N., Ross, W. J., Rhoads, D. D. (2000). Regional Population Diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the Influence of Host Selection. *Plant Disease*, 84: 877–884.