

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE GRUPOS DE AISLAMIENTOS DE *Pyricularia grisea*, OBTENIDOS POR AFLP

Stella Avila^{1/}, Luis Casales^{1/}, Fernando Escalante^{1/}

INTRODUCCIÓN

El Quemado del Arroz o Brusone es considerado una de las principales enfermedades de este cereal en el mundo, a causa de su alta incidencia bajo condiciones favorables y las pérdidas en el rendimiento que provoca. Por esa razón, la no utilización de cultivares resistentes, implica adoptar medidas de manejo tendientes a evitar la enfermedad, pero sobre todo, la aplicación de fungicidas, con lo cual se incrementan los costos de producción y los riesgos de contaminación. A su vez, la población de *Pyricularia grisea*, en algunas regiones del mundo, presenta amplia variabilidad y gran habilidad para vencer la resistencia generada, por lo cual se estudiaron estrategias para encontrar un mecanismo que permita lograr resistencia durable y como consecuencia generar un sistema más sustentable.

La caracterización de las poblaciones del patógeno es el primer paso para identificar su estructura genética y patogénica e identificar los genes en el arroz, que otorguen incompatibilidad (resistencia) a los mismos. Con esa información disponible, los genes de resistencia pueden ser introducidos en los cultivares de interés, confiriendo una resistencia de mayor espectro y consecuentemente más durable.

En la estación de crecimiento de 1997, se aisló por primera vez, *Pyricularia grisea* del cultivar El Paso 144, en Uruguay. A partir de 1995, ya se tenía conocimiento de su quiebra de resistencia en Argentina (Corrientes) y Río Grande del Sur (Brasil). En ese período, la expansión a nivel regional, del cultivar significó un riesgo de expansión también del patógeno.

En Uruguay, por el clima templado, las condiciones para el establecimiento de esta enfermedad se daban en forma esporádica. En 1998, El Paso 144, mostró, en el vivero de evaluación de resistencia, síntomas de manchas 3 y 4, que si bien fue un grado muy bajo de infección, demostró la pérdida de su resistencia. A nivel de chacras, comenzaron a encontrarse síntomas durante la zafra 2000-2001 y se obtuvieron aislamientos en Treinta y Tres, Río Branco, Arrozal "33" y Tacuarembó. La mencionada, fue la zafra en la cual se presentaron condiciones muy favorables para el desarrollo de la enfermedad y el cultivar INIA Zapata, lanzado como resistente, se mostró susceptible a Brusone. Hasta el 2003 se detectó lo que pareció ser un nuevo cambio de la población del patógeno, pasando a ser INIA Tacuarí el cultivar más afectado en Uruguay y la región. Estudios posteriores (Livore et al, 2005) mostraron que en ese período, se presentaron los dos grupos del patógeno (linajes) prevalentes (A y C), con los cuales INIA Tacuarí era compatible. Se sucedieron tres zafras sin aparición importante de Quemado del arroz y a partir de 2007-2008, se presentó con mayor frecuencia en El Paso 144, el cual sigue siendo el cultivar más sembrado, por su alta productividad, y sobre INIA Olimar.

OBJETIVOS

Luego de caracterizados los aislamientos obtenidos por la Unidad de Biotecnología e identificados los grupos existentes, se realizaron los ensayos de patogenicidad, para identificar las reacciones patogénicas de aislamientos pertenecientes a cada grupo sobre los cultivares comerciales, líneas con genes de resistencia conocidos y posibles dadores de resistencia.

^{1/} INIA Treinta y Tres

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas de se realizaron según la metodología propuesta por CIAT (Taller, 1994) en invernáculo con ambiente controlado.

Aislamientos y líneas que participaron

De acuerdo con los resultados de la caracterización de los aislamientos por el método AFLP se identificaron 3 grupos diferentes: 1, 2 y 3. Se seleccionaron dos aislamientos de cada grupo, para realizar las pruebas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos que participaron en las evaluaciones

Grupo	No de aislamiento	Localización	Año	Cultivar	Parte de la planta
1	81	UEPL, T y Tres	2007	INIA Olimar	hoja
	107	Charqueada	2009	INIA Olimar	
2	20	Séptima, T. y Tres	1998	INIA Tacuarí	Cuello de panoja
	78	UEPL, T. y Tres	2005	INIA Olimar	hoja
3	24	UEPL, T. y Tres	1999	L 2871	hojas
	27	UEPL	1999	L 2908	hojas

Se incluyeron 14 líneas y/o cultivares, (Cuadro 2).

inoculaciones con los aislamientos 24 y 27, la semana siguiente, 01/07/10.

Cuadro 2. Líneas y/o cultivares incluidos

No.	cultivar	genes
1	C 104 LAC	Pi-1
2	C 101 A51	Pi-2
3	IR 64	Pi-33
4	Fanny (testigo susceptible)	
5	El Paso 144	
6	INIA Olimar	
7	INIA Tacuarí	
8	INIA Caraguatá	
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 ²

Fecha de siembra: 19/05/2010. De cada línea se sembraron 3 macetas y 15 semillas por maceta, para cada aislamiento.

Para su inoculación, las macetas correspondientes a cada repetición se colocaron en una bandeja a la cual se le agregó agua y a su vez las tres repeticiones (3 bandejas) se colocaron en carpas de plástico separadas, usando una carpa por aislamiento. (Foto 1)

El inóculo fue preparado a partir de los aislamientos monospóricos de la colección conservada en papel, multiplicados en medio agar-salvado de arroz. El crecimiento en dicho medio requiere alrededor de 15 días, para la obtención del mayor No. de conidias. La incubación se realizó a 28°C, en oscuridad y a temperatura ambiente con luz, los últimos días de incubación.

Fertilización: Se aplicaron 10 ml por maceta de una dilución de 14 g de urea en 2 l de agua, tres veces: el 09, 16 y 23/06/10.

Las inoculaciones se realizaron mediante aspersor manual, aplicando 200 ml por carpa, de una concentración de esporas entre 0,5 y 3,1 x 10⁴ conidias por ml, con 0,4% de gelatina.

Inoculaciones

Inoculación con suspensión de esporas de cada aislamiento: Se realizó el 24/06/10, cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo de 3 y 4 hojas. Debido a la baja concentración obtenida, se repitieron las

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%.



Foto 1. Carpas en las cuales permanecieron las plantas, después de inoculadas con cada aislamiento.

Evaluaciones

De cada maceta se leyeron 10 plantas y a su vez, de cada planta se leyó la hoja más afectada. Las lecturas se realizaron entre el 15 y el 22/07/10. Se tomó el tipo de mancha, de acuerdo con el Sistema de Evaluación Estándar para Arroz de IRRI, y el % de área foliar afectado.

Para el diagnóstico final se usó la escala propuesta por F. Correa, CIAT:

- 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 sea válida, el testigo susceptible (Fanny) tiene que estar afectado con manchas 4 en más del

20% y en general se considera positivo, si están afectadas más del 30% de las plantas en cada maceta.

Descripción de tipos de lesión

- 0: Ninguna lesión
- 1: Pequeñas manchas color café, del tamaño de la cabeza de un alfiler.
- 2: Manchas color café más grandes.
- 3: Manchas necróticas grises, pequeñas, casi redondas a ligeramente alargadas, de 1-2 mm de diámetro.
- 4: Lesiones típicas de *Pyricularia*, elípticas, de 1-2 cm de largo

Análisis de datos

Se realizó un ANOVA de bloques completos al azar, tomando como bloque la bandeja y como tratamiento los cultivares. Se realizó un análisis por carpa.

RESULTADOS

Se muestran en los cuadros 3, 4 y 5, en los cuales se presentan los tipos de manchas, % de área foliar afectada y diagnóstico.

Patogenicidad de los grupos

Los grupos 1 y 3, se comportaron de manera similar, con ligera diferencias en su virulencia. Los aislamientos de los grupo 1 (81 y 107) y 3 (24 y 27), coincidieron en los diagnósticos, siendo susceptibles El Paso

144, INIA Olimar y las líneas que poseen el gen Pi-1 y Pi-ta. El gen Pi-2, aparentemente es el que confiere resistencia o parte de ella a las líneas 5502, 5287 y 5688. Se generaron dudas respecto de la línea B-83, proveniente de cruzamientos con proveedores de Pi-2, que se comportó como Intermedia Resistente (IR) y Susceptible (S). La línea IR-64 que posee el gen Pi-33 se comportó como resistente, en ambos grupos. INIA Tacuarí, también se comportó entre Intermedio resistente (IR) e Intermedio Susceptible (IS) cuadros 3 y 5.

Cuadro 3: Resultados del grupo 1: Aislamientos 81 y 107. Tipo de mancha, porcentaje de área foliar afectada y diagnóstico

No. cultivar	genes 81				107			
		tipo de mancha	%	diag	Tipo de mancha	%	diag	
1 C 104 LAC	Pi-1	3	58,6	S	3	60,5	S	
2 C 101 A51	Pi-2	2	3,7	R	2	6,0	R	
3 IR 64	Pi-33	0	0,0	R	0	0,0	R	
4 Fanny		4	65,8	S	4	100	S	
5 El Paso 144		4	47,4	S	4	85,6	S	
6 INIA Olimar		4	73,4	S	4	90,4	S	
7 INIA Tacuarí		3	7,7	IR	4	2,0	IS	
8 INIA Caraguatá		1	0,5	R	1	0,2	R	
9 L5502	Pi-2	2	2,4	R	1	1,1	R	
10 L5287	Pi-2	1	0,4	R	1	0,07	R	
11 L5688	Pi-2	1	0,3	R	1	0,3	R	
12 C25	Pi-1	4	61,1	S	4	65,9	S	
13 B 83	Pi-2	3	3,8	IR	3	23,1	S	
14 F-128-1	Pi-ta ²	3	18,9	IS	4	79,2	S	
Prom.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		0,000	0,000		0,000	0,000		

Grupo 2. También fue consistente el comportamiento de los cultivares, para los dos aislamientos (20 y 78). INIA Tacuarí se comportó con mayor susceptibilidad y de acuerdo con los datos obtenidos su diagnóstico es de Intermedio Resistente (IR) e Intermedio Susceptible IS, cuadro 4. Estos aislamientos no afectan a El Paso 144 ni a INIA Olimar, tampoco a las líneas que poseen los genes Pi-2 y Pi-33. Se mantiene la duda, respecto de la línea B-83. Fue afectada la línea C 104 LAC, con el gen Pi-1 pero no C-25, que se supone, posee el mismo gen.

Compatibilidad de: grupo – gen de resistencia

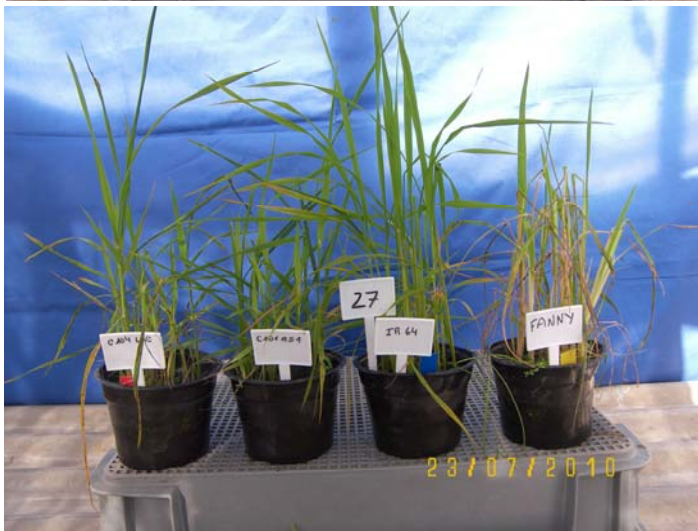
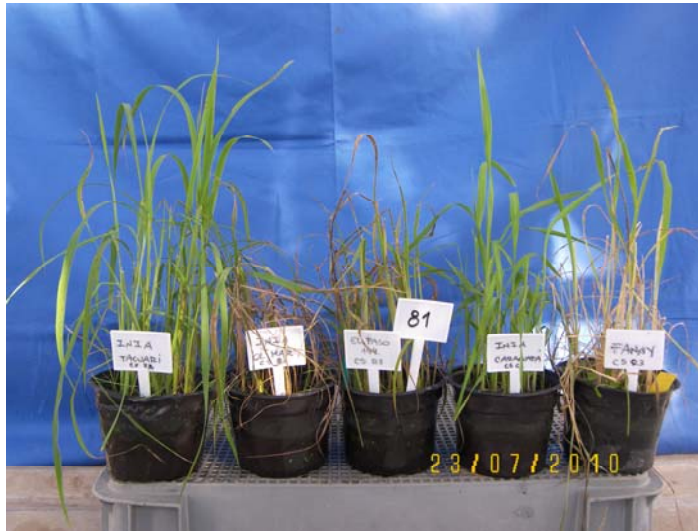
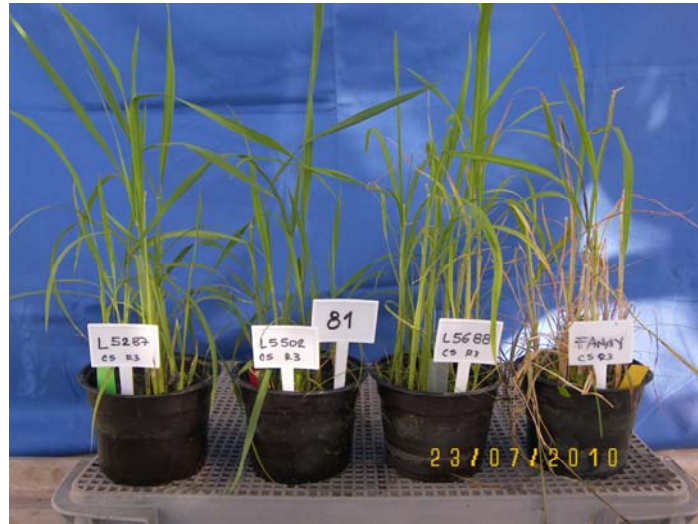
Se enfrentaron aislamientos representativos de los grupos identificados, con líneas portadoras los genes de resistencia Pi-ta², Pi-1, Pi-2 y Pi-33, solos. Mostraron mayor incompatibilidad, con los aislamientos, los genes Pi-2 y Pi-33. Los genes Pi-1 y Pi-ta. se comportaron en forma diferente en el grupo 2, con el cual a pesar de ser R, presentaron algunas manchas 4.

Cuadro 4. Resultados del grupo 2: Aislamientos 20 y 78. Tipo de mancha, porcentaje de área foliar afectada y diagnóstico

No.	cultivar	genes	20			78		
			Tipo de mancha	%	diag	Tipo de mancha	%	diag
1	C 104 LAC	Pi-1	3	85,8	S	4	36,4	S
2	C 101 A51	Pi-2	1	11,1	R	2	4,2	R
3	IR 64	Pi-33	0	0,0	R	0	0,0	R
4	Fanny		4	100	S	4	71,7	S
5	El Paso 144		1	0,6	R	1	3,5	R
6	INIA Olimar		1	0,2	R	1	0,1	R
7	INIA Tacuarí		3	5,6	IR	4	1,5	IS
8	INIA Caraguatá		1	1,7	R	1	0,03	R
9	L5502	Pi-2	2	3,2	R	2	0,2	R
10	L5287	Pi-2	1	0,07	R	1	0,0	R
11	L5688	Pi-2	3	4,1	R	3	1,8	IR
12	C25	Pi-1	2	2,2	R	2	1,0	R
13	B 83	Pi-2	1	6,7	R	4	33,3	S
14	F-128-1	Pi-ta ²	2	7,6	R	4	0,2	R
Prom.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 trat			0,000	0,000		0,000	0,000	

Cuadro 5. Resultados del grupo 3: Aislamientos 24 y 27. Tipo de mancha, porcentaje de área foliar y diagnóstico

No.	cultivar	genes	24			27		
			Tipo de mancha	%	diag	Tipo de mancha	%	diag
1	C 104 LAC	Pi-1	3	55,1	S	3	27,3	S
2	C 101 A51	Pi-2	2	14,8	R	2	1,2	R
3	IR 64	Pi-33	0	0,0	R	0	0,0	R
4	Fanny		4	100	S	4	66,8	S
5	El Paso 144		4	86,0	S	4	27,9	S
6	INIA Olimar		4	93,3	S	4	38,0	S
7	INIA Tacuarí		3	9,9	IS	4	0,9	IS
8	INIA Caraguatá		1	0,03	R	1	0,07	R
9	L5502	Pi-2	2	1,2	R	3	1,0	IR
10	L5287	Pi-2	1	0,1	R	1	0,13	R
11	L5688	Pi-2	1	0,3	R	1	0,2	R
12	C25	Pi-1	4	77,4	S	4	36,1	S
13	B 83	Pi-2	4	6,9	S	3	2,2	IR
14	F-128-1	Pi-ta ²	4	53,6	S	4	36,4	S
Prom.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 trat			0,000	0,000		0,000	0,000	



Fotos 2, 3 y 4. Reacción de los diferentes cultivares y/o líneas al grupo o linaje que prevalece actualmente

CONSIDERACIONES FINALES

De acuerdo con el comportamiento de los cultivares y/o líneas evaluadas, se diferenciaron sólo 2 grupos de aislamientos. Los correspondientes a los grupos 1 y 3, en realidad pertenecerían a un solo grupo o linaje.

De estos grupos, uno de ellos es compatible (virulento) con los cultivares El Paso 144, INIA Olimar, y las líneas que poseen los genes: Pi-1y Pi-ta.

A su vez este grupo es incompatible (no virulento), con las líneas que poseen el gen Pi-2 (C 101 A51, L5502, L5287, L5688) y el gen Pi-33 (IR64). La línea B-83, que aparentemente posee Pi-2, presentó reacciones IR y S (Cuadros 1 y 3; Fotos 1, 2 y 3).

Los aislamientos del 2º grupo, parecieron tener mayor compatibilidad con el cultivar INIA Tacuarí, pero éste presentó reacciones IR e IS, similares al primer grupo, al final de las evaluaciones. La diferencia de este grupo, es la incompatibilidad (resistencia) de los cultivares El Paso 144 e INIA Olimar. Las líneas poseedoras del gen Pi-2, también fueron resistentes.

Tanto L5502 como L5688, presentaron reacción IR con los aislamientos 27 y 78, respectivamente. Al final de las evaluaciones al igual que INIA Tacuarí presentaron daño de base de hojas.

El cultivar INIA Caraguatá se comportó como resistente a los dos grupos.

Se confirma la similitud con la clasificación anterior (Livore et al, 2005) en la cual sobre INIA Tacuarí se aislaron los dos grupos prevalentes, presentando este cultivar reacción intermedia IR-IS a ambos.

A su vez, sobre El Paso 144 e INIA Olimar sería más común encontrar uno de estos

dos grupos, provocando reacción de alta susceptibilidad en ambos cultivares.

Aparentemente, en las últimas zafras ha prevalecido este último grupo, lo cual explicaría por qué, la enfermedad se manifestó también en INIA Tacuarí.

Por todo lo expuesto, aparentemente, no se han producido cambios en la población del patógeno, en Uruguay. Esta confirmación coincide con información acorde de Río Grande del Sur, (J. Maciel et al, 2004 y G. Funck, IRGA, 2010)

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Sistema de Evaluación Estándar para Arroz. 1983. Programa de Pruebas Internacionales de Arroz. Cooperación IRRI-CIAT. CIAT, Cali, Colombia

Taller: Integración de Fitopatología, Mejoramiento y Biología Molecular, para desarrollar resistencia estable al Añublo del Arroz (*Pyricularia grisea*). 10 a 19 de octubre de 1994, CIAT, Cali, Colombia.

Joao L. Maciel, et al. 2004. Padrao Molecular e de Virulencia de Isolados de *Pyricularia grisea* do Estado do Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira. 29(5), set-out 2004, pag 504-510.

Livore, A. et al. 2005. PROYECTO FONTAGRO – PROCISUR 670 1392-6458/0FB82IICA-BID FTG/RF-99-02-RG “Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en arroz en el Cono Sur” Arroz, Resultados Experimentales 2004-2005. Serie de Actividades de Difusión 418, p, Cap 6, pag. 26 a 37.

Gustavo Funck. 2010. Presentación. Reunión del Comité Técnico del FLAR, Cachoeirinha, Brasil, agosto 2010.