

aplicación de 20 % de floración, fue el tratamiento 2, no hubieron diferencias con el testigo y el producto 2, Allegro, rindió 15 bolsas menos. Con la aplicación de final de doblado ningún tratamiento superó al testigo y se obtuvieron 17 bolsas menos con el producto 1, Nativo.

Componentes del rendimiento Se obtuvieron más granos llenos por panoja con Allegro, mayor No. De granos totales por panoja con Allegro y Amistar, mayor % de esterilidad en general con Amistar y con Allegro en la aplicación de 20% de floración y mayor peso de granos en el testigo sin aplicación.

Rendimiento y calidad industrial. Se encontró, menor % de yesados con Amistar

en los momentos de aplicación 1, 2 y 3 y con Nativo en el momento 4.

Con El Paso 144, si bien se han dado algunas diferencias respecto de INIA Tacuarí, también se confirma la conveniencia de las aplicaciones tempranas y con carácter preventivo. Se presentaron interacciones con diferente grado de significación, que mostraron algunas diferencias entre productos y entre momentos para los distintos parámetros estudiados, pero en general el control de las enfermedades claro, con los tres productos.

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DEL PATÓGENO *PYRICULARIA GRISEA* EN URUGUAY

Victoria Bonnacarrère^{1/}, Fabián Capdevielle^{1/}, Silvia Garaycochea^{1/}, Stella Ávila^{2/}

INTRODUCCIÓN

Pyricularia grisea es un hongo que puede presentar una alta variabilidad genética, por lo que en regiones donde ocurre la reproducción sexual del mismo es muy difícil de controlar mediante incorporación de genes de resistencia en el arroz. El estudio y caracterización genética de la población del patógeno en Uruguay y su evolución es fundamental para el seguimiento de la enfermedad y la determinación de mecanismos de control. Hasta el presente se han utilizado diversas herramientas moleculares, que incluyen técnicas muy complejas y de difícil aplicación rutinaria como los MGR (Levy et al., 1991). Los resultados obtenidos con esta técnica han sido publicados en Serie: Actividades de Difusión 418, Agosto 2005, INIA Treinta y Tres, cap 6, pp. 26 a 37. En la Unidad de Biotecnología se ajustó una técnica de fácil aplicación como lo son la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y se está aplicando otra metodología denominada Pot-2, cuyos

resultados se publicarán posteriormente. Mediante AFLP se analizan un gran número de bases del ADN del patógeno, buscando identificar mutaciones puntuales o cambios en una sola base de la información genética. La técnica de Pot-2 amplifica regiones mayores del ADN y detecta diferencias en el tamaño de las secuencias amplificadas. Con esta información genética se forman clusters o grupos con diferentes grados de similitud en su información genética. Estos grupos, mediante herramientas de minería de datos se pueden vincular a cultivares, regiones del país u año de aislamiento, evaluando la evolución del patógeno en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de AFLP se aisló ADN de 51 aislamientos monospóricos de *P. grisea* obtenidos desde 1995 hasta 2007 sobre diferentes cultivares y líneas. Actualmente se encuentran en proceso, aislamientos colectados en 2008 y 2009. Los marcadores de AFLP se realizaron usando el kit de Applied Biosystem para microorganismos, de acuerdo a los protocolos dados por el proveedor. Los fragmentos se visualizaron

^{1/} INIA Las Brujas

^{2/} INIA Treinta y Tres

fragmentos se visualizaron en un secuenciador ABI310. Los resultados se analizaron mediante “análisis de cluster” utilizándose el algoritmo k-means implementado en la plataforma WEKA (Waikato Environmental Knowledge Analysis) (Witten and Frank, 2005) estableciéndose el número mas probable de agrupamientos de aislamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de los marcadores AFLP permitió formar grupos (cluster) de aislamientos, clasificados de acuerdo a su similitud genética. El número de grupos (k) se determina como aquel donde el error intra-cluster disminuía 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. Para este caso el error es minimizado para k=7 (Figura 1), por encima de este valor no se observó disminución significativa.

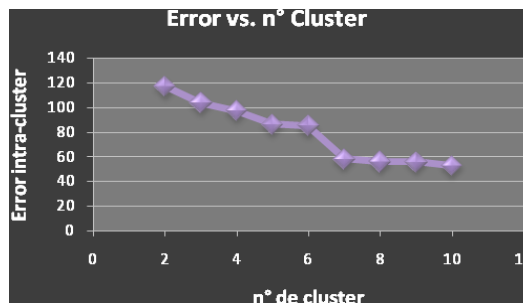


Figura 1: Grafica error intra-cluster vs. número de cluster_ Eje x: valores de error para cada corrida del algoritmo cambiando el parámetro k; Eje y: valores tomados para el parámetro k

La cantidad de aislamientos asignados a cada cluster o grupo genético, así como la visualización gráfica (figura 2) de los grupos se muestran a continuación.

- Cluster 0: 25 aislamientos (49% del total analizado)
- Cluster 1: 2 aislamientos (4%)
- Cluster 2: 11 aislamientos (22%)
- Cluster 3: 1 aislamiento (2%)
- Cluster 4: 9 aislamientos (18%)
- Cluster 5: 1 aislamiento (2%)
- Cluster 6: 2 aislamientos (4%)

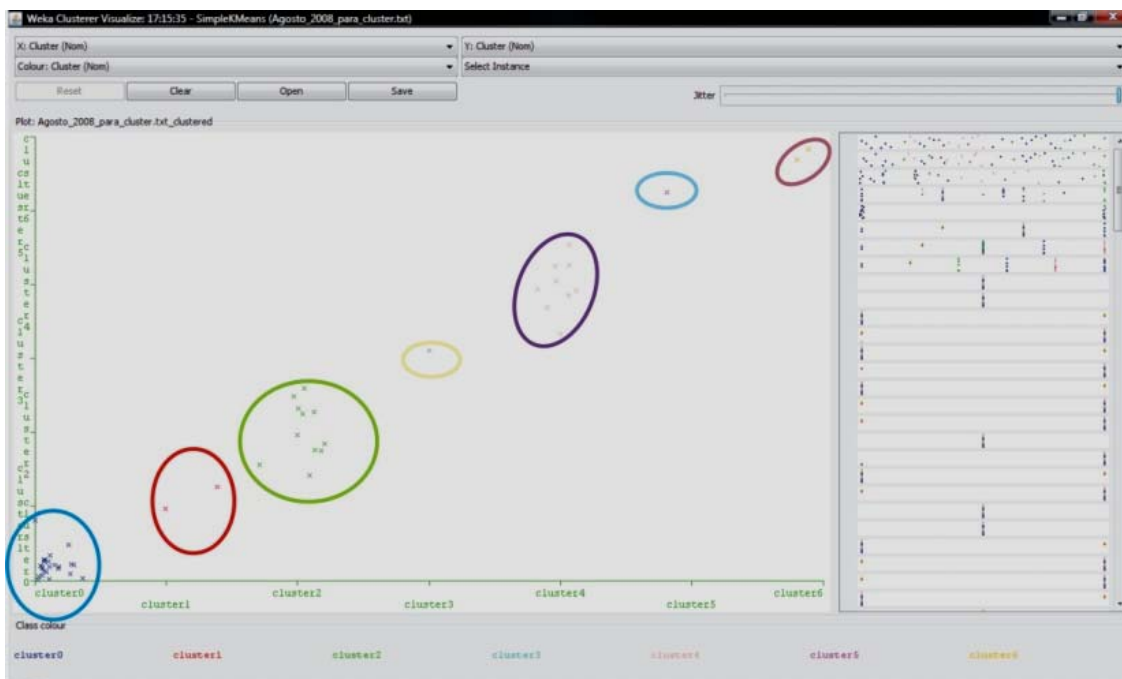


Figura 2: Visualización de los cluster WEKA versión 3.5.8

Al analizar los resultados obtenidos para $k=7$, se observa que existen 4 cluster formados por uno o dos aislamientos (cluster 1, 3, 5 y 6). Este tipo de resultado genera dudas acerca de si la partición generada de la población es representativa de la posible estructura presente o es un resultado forzado, es decir si los grupos formados tiene algún significado biológico.

Al analizar como los cluster se fueron formando para los distintos valores de k e identificando los aislamientos asignados a cada cluster en las diferentes corridas, se observó que los dos clusters formados por un único aislamiento se generaban para determinados valores de k y se mantenían incambiables. El cluster 3 formado por el aislamiento Pyr_76 aparecía para $k=4$, mientras que el cluster 5 formado por el aislamiento Pyr_30 para $k=6$. Buscando un sentido biológico al hecho de que estos aislamientos presenten suficientes diferencias del resto de los aislamientos como para ser separados de los clusters mayoritarios y formar cada uno un cluster en si mismo, los resultados se contrastaron con información adicional poseída para cada aislamiento. El punto en común encontrado para ambos cluster es que los aislamientos fueron hallados sobre tipos de plantas poco frecuentes. El aislamiento Pyr_76 (cluster 3) se halló sobre el cultivar Fanny, esta es una variedad utilizada como testigo susceptible, mientras que el aislamiento Pyr_30 (cluster 5) fue hallado sobre una línea experimental (L2998). En el primer caso, correspondió a un "vivero trampa" en chacra de un productor y en el segundo caso, el cultivo se encontró limitado al campo experimental, por lo cual pueden considerarse casos poco frecuentes en el escenario del cultivo. Según estudios previos, diferentes grupos genéticos del patógeno presentarían cierta especificidad con respecto al tipo de planta que infecta (origen genético, variedades)(Proyecto FONTAGRO, 2005), si esto se aplicara a los grupos encontrados por esta técnica, explicaría la aparición de estos dos clusters.

Los clusters 1 y 6 formados ambos por 2 aislamientos representan un caso diferente

a los anteriores, debido a que el cluster 1 aparece para $k=2$ con 4 aislamientos y se mantiene hasta $k=7$, mientras que el cluster 6 es formado a partir de la división del 1. La generación de un cluster a partir de otro no mayoritario, el que además es generado en la primer partición del conjunto ($k=2$) hace pensar que el cluster 6 podría no ser una partición confiable. Al contrastar con la información adicional, se observó que los aislamientos del cluster 1 (Pyr_24 y Pyr_27) pertenecen al período de recolección 1995-1998 mientras que los del cluster 6 (Pyr_47 y Pyr_63) al período 2001-2003. Sin embargo, los 4 aislamientos fueron hallados sobre diferentes cultivares y líneas, los primeros sobre líneas experimentales, restringido su cultivo al campo experimental, mientras que los segundos fueron hallados sobre 2 de los cultivares más utilizados en la actualidad (INIA Tacuarí y El Paso 144). El hecho de que un posible nuevo grupo genético del patógeno pudiera estar infectando cultivares, perteneciente a diferentes subespecies, podría relacionarse con la extensión del área de cultivo hacia zonas más propicias para el crecimiento del hongo. Sin embargo si se observa el cambio en la estructura de la población en función a los cluster mayoritarios (cluster 0 y cluster 2), los aislamientos de ambos cluster serían casos atípicos encontrados sin una reaparición en otros períodos.

Los aislamientos asignados a los clusters mayoritarios, sin embargo, han sido hallados a lo largo de todo el período evaluado. En particular el cluster 0 aparece en los primeros años como el predominante, creciendo principalmente sobre cultivares de la subespecie Japónica, la que representaba la mayoría de los plantados en ese período; estando presente en períodos posteriores compartiendo escenario con otros grupos y habiéndose encontrado también sobre plantas de las subespecie Indica.

Para el caso de los aislamientos asignados al cluster 2, se observó que estaban presentes ya en los primeros años evaluados de forma minoritaria y es el grupo predominante en el último período. Este

Este cambio de los grupos predominantes encontrados en los diferentes períodos puede relacionarse con la consolidación en el uso de variedades con base genética diferente. (Esto ya había sido considerado con los linajes encontrados en FONTAGRO 2005. En el último periodo, hubo una mayor proporción, en el uso de variedades pertenecientes a la subespecie Indica, a diferencia de la situación inicial del período en estudio en el cual predominaban cultivares de la subespecie Japónica. Los cultivares tipo Indica presentan mayor rendimiento y se adecuan más a las temperaturas del norte del país (región hacia donde se ha extendido el cultivo del arroz). Sin embargo, según estudios de patogenicidad, las plantas tipo Indica serían más susceptibles al ataque del hongo *P. grisea* que las tipo japónica. La generalización de este tipo de cultivares, podría haber favorecido el establecimiento de un solo grupo. A pesar de ello el mismo grupo fue encontrado sobre plantas tipo japónica, haciendo de este un caso para ser estudiado más profundamente ya que sería capaz de infectar ambos tipos de plantas y crecer en diferentes ambientes (centro y sur del país).

A través del análisis de cluster se pudo determinar la existencia de estructura en la población del *P. grisea*. Los datos analizados permiten inferir la existencia de al menos 2 grupos genéticos (cluster 0 y cluster 2) los que se presentan mayoritarios en diferentes períodos. El grupo de aislamientos hallados en el último año de recolección, existía en períodos anteriores en forma minoritaria con el potencial para infectar genotipos ya presentes. La expansión del cultivo y la intensificación del uso de cultivares de la subespecie Indica puede relacionarse con la aparición mayoritaria del grupo en los últimos años. A

pesar de encontrarse grupos mayoritarios en los diferentes períodos la diversidad de la población es mantenida, comportamiento esperado de una población no recombinante de este hongo.

La relación entre los posibles grupos genéticos desprendidos del análisis de cluster, donde se vio una tendencia de los diferentes grupos a infectar plantas de determinado origen genético, sumado a los valores de clasificación obtenidos en el análisis discriminante tomando como clase el origen genético hace pensar que es probable la existencia de una estructura en la población del patógeno estudiado. Este análisis genético servirá como guía para futuros estudios acerca de la relación huésped-patógeno que permitan confirmar las tendencias halladas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Levy, M., Ramao, J., Marchetti, M., Hamner, J. (1991). 'DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus'. *The Plant Cell*, vol 3, 95-102.

PROYECTO FONTAGRO - CONVENIO IICA-BID FTG/99-02-RG (2005). Informe técnico final: Desarrollo de una Estrategia para la Obtención de Resistencia Durable a *Pyricularia grisea* en Arroz en el Cono Sur. Responsable: Dr. Alberto B. Livore-INTA

Witten, I. & Frank, E. (2005). 'Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques'. Second Edition, Elsevir.