

Pyricularia de trigo en Paraguay

COMPENDIO DE INVESTIGACIÓN



EDITORES

Alice Rocío Chávez

Man Mohan Kohli

ISBN 978-99967-0-531-1



Pyricularia de trigo en Paraguay

COMPENDIO DE INVESTIGACIÓN

EDITORES

Alice Rocío Chávez

Man Mohan Kohli

CÁMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE CEREALES Y OLEAGINOSAS “CAPECO”

La Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas “CAPECO”, es una entidad de carácter gremial, sin fines de lucro, fundada el 20 de Febrero de 1980 y su personería jurídica fue reconocida por decreto N° 25.339 del 18 de mayo de 1981. Su misión fundamental es aunar a las empresas para cooperar integralmente en el desarrollo de sus intereses, ejerciendo la representación legal en gestiones de beneficio colectivo.

CAPECO representa a los productores, exportadores y comercializadores de cereales y oleaginosas del país, teniendo como miembros a las principales cooperativas agrícolas, empresas exportadoras nacionales y multinacionales, así como a la industria procesadora de granos.

Sus actividades principales consisten en apoyar proyectos agrícolas para la mejora de la calidad del grano y semillas, la investigación de cultivos, la fertilización del suelo, la prevención de las enfermedades de los cultivos y el cuidado del medio ambiente.

También tiene una participación activa en la mejora de la logística de exportación, búsqueda, apertura y acceso a los mercados principalmente para el maíz, trigo, soja, girasol, canola y subproductos, así como para defender los intereses de los socios a nivel nacional e internacional.

CAPECO es miembro de organizaciones internacionales como: La Alianza Internacional de Productores de Soja (ISGA), el Diálogo Internacional de Productores de Oleaginosas (IOPD) y de la Coalición Internacional del Comercio de Granos (IGTC)

Los agronegocios del sector cereales y oleaginosas (Sistema Soja - Trigo - Maíz - Girasol), representan 81% del PIB agrícola y el 47% del ingreso de divisas por exportaciones, más de US\$ 3.000 millones en inversiones y más de 250.000 puestos de trabajo. Actualmente, el sector es el motor de la “Economía Real del País”. En la última zafra, el sector movilizó alrededor de 4.500 millones de dólares.

Citación correcta:

Chávez, AR y Kohli, MM. (eds). 2018. Pyricularia de trigo en Paraguay: Compendio de Investigación. CAPECO, Asunción, Paraguay.

p 80

Palabras Claves: Trigo, *Triticum aestivum*, Pyricularia, Piricularia, Brusone, investigación, Wheat Blast

ISBN 978-99967-0-531-1

Dewey 633.11

AGRIS F01

Agradecimientos

A los funcionarios del Centro de Investigación Hernando Bertoni que apoyaron voluntariamente al Proyecto *Pyricularia* 2013-2017, especialmente a las siguientes personas:

Graciela Cabrera
Vilma Giménez
Alfredo Guillen
Anita Paredes
Rosalino Rodríguez
Sindulfo Giménez
Lourdes Cardozo
Nathalia Bobadilla
Ángel Núñez
Alfredo Rojas
Aníbal Fariña
Edgar Giménez
Emilio Guillen
Juan Carlos Cousiño
Gregorio Bozzano

A Cinthia Cazal y Magaliz Reyes, del Proyecto *Pyricularia* en Trigo
A los funcionarios del IPTA del Programa de Investigación de Trigo
A Andrea Arrúa y Juliana Moura del CEMIT, UNA.
A los funcionarios de CAPECO.

Chávez, Alice Rocío; Kohli, Man Mohan, editores.
Pyricularia de trigo en Paraguay: Compendio de Investigación
Asunción: CAPECO, 2018.
80 p; 16 x 21 cm.

ISBN 978-99967-0-531-1

1- Trigo. 2- *Triticum aestivum*. 3- Pyricularia. 4- Piricularia. 5- Brusone. 6- investigación. 7- Wheat Blast. 8- Paraguay. I. Chávez, Alice Rocío; Kohli, Man Mohan editores. II. CAPECO. III. Título.

AGRIS F01

Dewey 633.11

Prólogo

El cultivo de trigo tiene un papel importante en la economía nacional y en el sistema de rotación de cultivos en la agricultura mecanizada. Hemos logrado grandes avances en la producción de este cereal durante la última década, en la cual el país ha sido capaz de exportar una moderada cantidad de toneladas todos los años. Estos avances fueron posibles gracias a los resultados logrados en el proyecto “Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay” apoyado por el IPTA/CAPECO/ INBIO y a los esfuerzos de miles de productores y asesores de campo.

Se estima que uno de los impactos del cambio climático, que afecta al cultivo de trigo en el país está relacionado con su susceptibilidad a las enfermedades, como manchas foliares y enfermedades de la espiga (fusariosis de la espiga y *Pyricularia*). Con el objetivo de avanzar las investigaciones en *Pyricularia*, que resultó ser catastrófica durante los años 2014 y 2015, CAPECO inició un proyecto especial para conocer los alcances de la peligrosidad de la enfermedad en el país, y buscar soluciones para limitar sus daños en el futuro. El presente compendio contiene una serie de trabajos realizados durante los últimos tres años, que fueron publicados en revistas científicas y/o presentados en congresos nacionales e internacionales del ámbito agrícola.

Los trabajos publicados en este compendio fueron realizados en el marco del Proyecto Nacional de Trigo, y también contaron con el apoyo financiero del CONACYT, en el marco del proyecto “Caracterización de la variabilidad patogénica de *Pyricularia grisea* en materiales de trigo”. Cabe destacar la colaboración de este proyecto con el Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA-ARS, en especial con el Dr. Gary Peterson del Fort Dietrich, Maryland, quien también apoyo al proyecto con fondos colaborativos, y el Consorcio Internacional de *Pyricularia* de Trigo, liderado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con sede en México. Consideramos a este compendio, una contribución importante a la ciencia nacional, que puede ser muy útil tanto para los técnicos involucrados en la investigación de trigo, como para los estudiantes interesados en avanzar su carrera en investigación agrícola.

JOSÉ BEREÁ
Presidente, CAPECO

Marzo de 2018

Índice

Pyricularia: Una amenaza para el cultivo del trigo M. M. Kohli, Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma y L.E. Cubilla	11
Identificación de hospedantes alternativos de <i>Magnaporthe</i> sp. en campos de trigo de Paraguay Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli	18
Primer reporte de <i>Magnaporthe</i> sp. en avena negra (<i>Avena strigosa</i> L.) en Paraguay Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli	26
Esporulación de <i>Magnaporthe oryzae</i> en diferentes medios de cultivo Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli	30
Evaluación de la esporulación, crecimiento radial y peso micelial de cuatro cepas de <i>Pyricularia</i> aisladas de distintos hospederos Yessica Magaliz Reyes Caballero; Alice Rocío Chávez; Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga; Juliana Moura Mendes Arrúa; Man Mohan Kohli; Cinthia Carolina Cazal Martínez	33
Conservación de cepas de <i>Pyricularia</i> sp por tres métodos; largo plazo, alternativo y un método desarrollado por combinación de métodos alternativos y de largo plazo Magaliz Reyes, Juliana Moura, Cinthia Rojas, Alice Chávez, Man Mohan Kohli, Cinthia Cazal	38
Evaluación de la concentración de conidios para la inoculación de materiales de trigo con <i>Magnaporthe oryzae</i> Alice Rocío Chávez, Cinthia Carolina Cazal Martinez, Alfredo Jesús Rojas Ozuna, Alfredo Ramón Guillén, Ángel Núñez y Man Mohan Kohli.....	44
Diferencia en la reacción a <i>Pyricularia oryzae</i> de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo Alice Chávez, Cinthia Cazal, Man Mohan Kohli	48
Inoculación a campo de <i>Pyricularia oryzae</i> en genotipos de trigo Alice Rocío Chávez, Cinthia Carolina Cazal Martinez, Nathalia Sarahi Bobadilla, Man Mohan Kohli	61
Eficiencia de fungicidas en el control de <i>Pyricularia oryzae</i> en semillas de trigo in vitro Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli	66
Comparación de eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de <i>Magnaporthe</i> sp. y su uso con marcadores moleculares Cinthia Carolina Cazal Martínez, Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga, Juliana Moura Mendes, Yessica Magaliz Reyes Caballero, Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli	70

Pyricularia: Una amenaza para el cultivo del trigo*

Pyricularia blast – a threat to wheat cultivation

M. M. Kohli, Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma y L.E. Cubilla

RESUMEN

La enfermedad Pyricularia del trigo o brusone (en portugués), causada por *Pyricularia oryzae* (telemorfo *Magnaporthe oryzae*), se ha convertido en una seria restricción para aumentar el área y la producción del cultivo, especialmente en las regiones tropicales del Cono Sur de América del Sur. Identificada por primera vez en 1985, en el estado de Paraná en Brasil, se ha convertido en una enfermedad endémica en la región de Santa Cruz, Bolivia; el sur y nordeste de Paraguay y el centro y sur de Brasil. También se han observado infecciones severas en las parcelas de trigo sembradas en verano en el nordeste de Argentina. Las infecciones de *Pyricularia* son especialmente severas durante los años húmedos y cálidos. La infección de espigas (a menudo confundida con la infección por Fusariosis de la Espiga), es el síntoma más notable de la enfermedad y es capaz de causar más del 40% de pérdida de producción. Sin embargo, bajo infección severa la pérdida de producción puede ser casi completa en las variedades susceptibles. La *Pyricularia* de trigo es principalmente una enfermedad de espiga. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, puede producir lesiones en todas las partes de la planta. Dependiendo del punto de la infección en el raquis, la enfermedad puede matar la espiga parcial o totalmente. La porción infectada de la espiga se seca, sin producir ningún grano, que puede distinguirse visiblemente de la porción sana. Si bien la diversidad de la virulencia en el hongo ha sido reportada en la literatura y está bajo exploración adicional, la resistencia genética en la especie huésped ha sido más difícil de identificar. Los primeros cultivares brasileños como BH 1146, CNT 8, varias selecciones de IAC y OCEPAR acreditadas con poseer diferentes niveles de resistencia en campo, no fueron confirmadas en estudios de inoculación artificial. Sin embargo, otros cultivares como BR18, IPR 85, CD 113, han demostrado un nivel moderado de resistencia a campo a través de los años. Recientemente se ha observado que varios cultivares y líneas avanzadas derivadas de la línea CIMMYT, Milán, tie-

* Adaptado de Kohli, M.M., Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma and L. Cubilla. 2011. *Pyricularia Blast - A threat to Wheat Cultivation*. Czech. J. Genet. Plant Breed., 47: S130-S134. 2011(Special Issue).

nen un alto nivel de resistencia a la enfermedad en toda la región endémica. Sin embargo, la base genética de esta resistencia no es muy clara debido a la extrema variación en el patógeno. Los cultivares que muestran resistencia completa frente a algunos aislados en condiciones controladas, pueden o no mostrar resistencia en el campo y en el cultivo comercial. Debido al aumento de la superficie bajo cultivares resistentes (todos basados en Milan) en Bolivia, Brasil y Paraguay, esta resistencia necesita combinarse con otras fuentes de con urgencia para evitar la selección de un patotipo virulento. Además de la resistencia genética, evitar fechas tempranas de siembra y control químico pueden reducir la gravedad de la enfermedad. Los fungicidas que combinan triazoles con estrobilurinas pueden, en algunas situaciones, ser eficaces en el control de la enfermedad en la etapa temprana. Aun cuando todos los componentes del manejo integrado de enfermedades no están conocidos, se considera una estrategia esencial para reducir las pérdidas de producción en esta región. Dada la amenaza que la *Pyricularia* puede representar para otras regiones mundiales productoras de trigo en el futuro, se considera urgente y necesario realizar más esfuerzos de investigación para lograr una solución.

Palabras clave: Trigo, *Triticum*, brusone, enfermedad, *Pyricularia*, regiones no tradicionales

ABSTRACT

Wheat blast disease caused by *Pyricularia oryzae* (telemorph *Magnaporthe oryzae*) has become a serious restriction on increasing area and production of the crop especially in the tropical parts of the Southern Cone Region of South America. First identified in 1985 in the State of Paraná in Brazil, it has become an endemic disease in the low lying Santa Cruz region of Bolivia, south and north eastern Paraguay and central and southern Brazil in the recent years. Severe infections have also been observed in the summer planted wheat crop in the northeastern Argentina. *Pyricularia* infections are especially severe during the wet and warm years. Spike infection (often confused with *Fusarium* Head Blight infection) is most notable symptom of the disease and capable of causing over 40% loss of production. However, under severe infection conditions the loss of production can be almost complete in the susceptible varieties. Wheat blast is mainly a spike disease but can also produce lesions on all above ground parts of the plant under certain conditions. Depending upon the point of the infection on the rachis, the disease can kill the spike partially or fully. The infected portion of the spike dries out without producing any grain which can be visibly distinguished from the healthy portion. While virulence diversity in the fungus has been reported in the literature and is under further exploration, the genetic resistance in the host species has been more difficult to identify. Earlier Brazilian cultivars such as BH 1146, CNT 8, several IAC and OCEPAR selections credited to demonstrate different levels of field resistance did not confirm it under artificial inoculation studies. However, other

cultivars such as BR18, IPR 85, CD 113, have shown moderate level of resistance over the years in many locations. Recently several cultivars and advanced lines derived from CIMMYT line, Milan, have been observed to carry a high level of resistance to blast disease throughout the endemic region. Yet the genetic basis of this resistance is not very clear due to extreme variation in the pathogen. Cultivars showing complete resistance against a few isolates under controlled conditions of the glasshouse may or may not show field resistance in commercial cultivation. Due to an increase of area under Milan based resistant wheat cultivars in Bolivia, Brazil and Paraguay, it needs to be combined with other sources of resistance urgently to prevent the selection of a virulent pathotype in the fungus. Besides genetic resistance, avoidance of early dates of seeding and chemical control can reduce the disease severity. Fungicides combining triazols with strobilurins can, under some situations, be effective in disease control at the heading stage. Even when all components of integrated disease management of wheat blast are not in place yet, it is seen as an essential strategy to reduce production losses in this region. Given the threat that the blast disease may pose to world wheat growing areas in the future, more research efforts are deemed urgent and necessary.

Key words: Wheat, *Triticum*, blast, disease, *Pyricularia*, non-traditional regions

INTRODUCCIÓN

La *Pyricularia*, una nueva enfermedad del trigo identificada por primera vez en el estado de Paraná en Brasil (Igarashi *et al*, 1986) se ha convertido en una amenaza a la expansión de los campos de trigo en las regiones tropicales y subtropicales. La infección a la espiga causada por la *Pyricularia* se confunde fácilmente con la infección causada por la Fusariosis de la espiga. Sin embargo, en vez de atacar las espiguillas individualmente, la *Pyricularia* ataca al raquí. La porción de la espiga encima del punto de infección se blanquea y no forma granos cuando la porción inferior se mantiene sana y produce granos normales (Fig. 1).

Figura 1. Síntoma característico del ataque de *Pyricularia*. Capitán Miranda, Paraguay, 2015.



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Hasta hace poco, las epidemias de Pyricularia de trigo estaban restringidas a las regiones tropicales de Sudamérica (noroeste argentino, llanos bolivianos, sur y centro sur de Brasil y Paraguay). Sin embargo, en el 2016, la enfermedad fue reportada por primera vez fuera de Sudamérica, en Bangladesh, Asia (Malaker et al. 2016). Los cambios climáticos asociados con el calentamiento global pueden disparar su expansión a otras partes del mundo especialmente en aquellas donde el trigo y el arroz se siembran extensivamente.

EXPANSIÓN DE LA ENFERMEDAD Y PÉRDIDAS PRODUCTIVAS

Las pérdidas causadas por la Pyricularia de trigo pueden variar desde daños menores hasta pérdidas del 100%. La enfermedad puede atacar todas las partes aéreas de la planta, pero la infección severa se observa en las espigas. Las pérdidas máximas son causadas cuando el hongo ataca al raquis en la base de la espiga limitando así el desarrollo de los granos y matando la espiga por completo.

Es posible que Cunfer *et al.*, 1993, hayan observado la enfermedad en 1987 en la frontera de Paraguay y Brasil. Sin embargo, la primera epidemia reportada a nivel nacional fue en 2002 causando pérdidas de más del 70% en campos sembrados tempranamente (Viedma y Morel, 2002). La mayoría del grano cosechado no tenía el estándar del peso específico para ser comercializado y fue utilizado para consumo animal.

Daños similares se han reportado en los llanos de Bolivia y en los principales estados productivos de trigo en Brasil (Paraná, Matto Grosso do Sul, Sao Paulo y Río Grande do Sul).

ORGANISMO CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD

Pyricularia oryzae *Triticum* pathotype (MoT) [telemorph *Magnaporthe oryzae*]

CONDICIONES CLIMÁTICAS FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Las condiciones exactas que favorecen el desarrollo de una epidemia a nivel de campo no son muy claras. Sin embargo, los años con ataques severos de Pyricularia han coincidido con años húmedos con la prevalencia del fenómeno El Niño. Éstas se caracterizan por varios días de lluvias continuadas y temperaturas promedio de 18 y 25° C durante la floración.

SEMILLA Y HUÉSPEDES SECUNDARIOS COMO FUENTES PRIMARIAS DE INÓCULO

La transmisión del hongo en la semilla de trigo fue confirmada por Goulart y Paiva, 1990, pero ésta parece tener un papel menor en la epidemiología de la enfermedad ya que la infección de la espiga es causada por conidios presentes en el aire

provenientes de fuentes secundarias. Varias gramíneas (*Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica*, *Digitaria sanguinalis*, *Brachiaria plantaginea*, *Echinochloa crusgalli*, *Pennisetum setosum*, *Hypparrhenia rufa* and *Rhynchelytrum roseum*) presentes en los campos de trigo como malezas pueden actuar como fuentes secundarias (Prabhu *et al.*, 1992 y Urashima *et al.*, 1993). Mehta *et al.*, 2006, han agregado avena negra (*Avena strigosa*) y mijo (*Setaria itálica*) a la lista de fuentes probables de infección primaria.

INTERACCIÓN HUÉSPED PATÓGENO Y FUENTES DE RESISTENCIA

La variabilidad entre los aislados de *P. oryzae* originaria del arroz, trigo, triticale y malezas gramíneas ha sido reportada por Prabhu *et al.*, 1992 y Mehta y Baier, 1998. Ha sido difícil identificar la resistencia genética en trigo a esta enfermedad debido a la amplia diversidad en la virulencia del hongo. Algunas variedades brasileñas (BR 18 y IPR 85 y CD 113) y bolivianas (Paragua CIAT, Parapetí CIAT) presentan una resistencia de moderada a alta a esta enfermedad. Cuadro 1. Recientemente, varios cultivares (Sausal CIAT, CD 116 y Caniné 1) derivados de Milan, una línea del CIMMYT han sido identificados con un alto nivel de resistencia a esta enfermedad. Es urgente combinar su resistencia con otras fuentes para prevenir una selección de un patotipo virulento en el futuro.

Cuadro 1. Evaluación de la severidad de *Pyricularia* en condiciones de campo, Quirusilla, Bolivia, 2003/04

Cultivar	Promedio de infección foliar (HB + HB-1)	Infección en la espiga (%)		
		Evaluación		Área bajo de curva del progreso de la enfermedad *
		Feb-12	Feb-19	
Azubi CIAT	0.96 a	15.1	90.2	368.4 a
Surutu CIAT	0.85 a	5.1	50.5	194.7 b
BR 18	0.27 b	5.5	23.8	102.7 c
Parapetí CIAT	0.08 c	6.1	15.2	74.5 d
Paragua CIAT	0.04 c	0.9	4	17.3 e

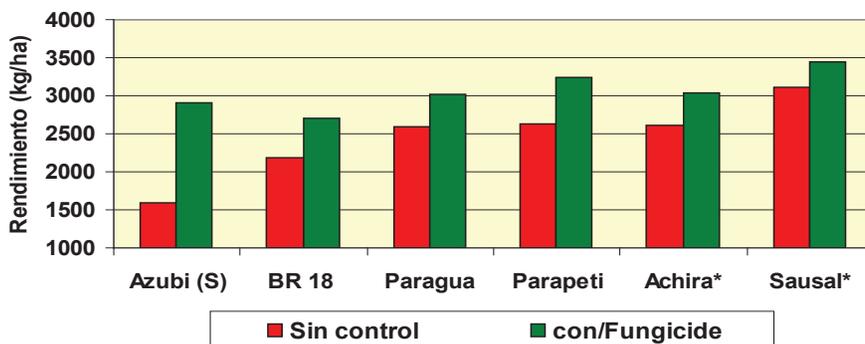
* Área bajo la curva del progreso de la enfermedad basada en dos observaciones

CONTROL INTEGRADO

Además de la resistencia genética, evitar las siembras tempranas y el control químico en la floración puede ayudar a reducir la severidad de la enfermedad. El tratamiento de la semilla puede ayudar a eliminar la infección de la semilla, pero no protege a la planta de las infecciones posteriores en la espiga.

Han sido usados con éxito fungicidas que combinan triazoles con estrobilurinas especialmente en variedades con un moderado nivel de resistencia. La aplicación de fungicidas en variedades susceptibles no resulta en un buen control de la enfermedad y no son efectivas económicamente (Fig 2).

Figura 2. Rendimiento de variedades con y sin control químico de *Pyricularia*



CONCLUSIONES

La *Pyricularia* de trigo se ha convertido en una seria amenaza a la producción de trigo en las áreas tropicales y subtropicales de Sudamérica. Bajo condiciones favorables, la enfermedad puede causar pérdidas devastadoras de hasta un 100% en la producción. Además del trigo, el hongo puede sobrevivir en triticale, cebada, avena negra, mijo y muchas malezas gramíneas. Considerando un menor número de fuentes de resistencia identificadas hasta ahora, el manejo integrado de la enfermedad que incluye la resistencia varietal, evitar siembras tempranas y el control químico son necesarios. Debido a la amenaza que esta enfermedad puede presentar para la producción mundial de trigo en el futuro, se consideran urgentes y necesarios mayores esfuerzos en la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ Cunfer BM, Yorinori T, Igarashi S. 1993. Wheat blast. In: Mathur SB, Cunfer BM (eds.). Seed borne diseases and seed health testing of wheat. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen.
- _ Igarashi S, Utimada C.M, Igarashi LC, Kazuma AE, Lopes RC. 1986. *Pyricularia* sp. em trigo. I. Occurencia de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, 11:351-352.
- _ Goulart, A; Paiva, F. 1990. Transmissão de *Pyricularia oryzae* através de sementes de trigo (*Triticum aestivum*). *Fitopatologia brasileira* 15(4): 359-362.
- _ Malaker, PK; Reza, MMA; Hakim, MA; Barma, NCD; Mannaf, MA; Khaleque, MA; Islam, R; Tiwari, TP; Duveiller, E. 2016. Occurrence of wheat blast in Bangladesh. In: Madeiros Del Ponte, E; Bergstrom, G; Pavan, W; Lazzaretti, A; Cunha Fernandes, JM. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Paso Fundo, RS. BR.
- _ Mehta, Y; Baier, A. 1998. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticale e trigo no Estado do Paraná. Grupo Paulista de Fitopatologia.
- _ Mehta, YR; Nunes, MP; Oliveira, JC. 2006. Ocorrência de brusone em aveia no Estado do Paraná. In: Resultados Experimentais. XXVI Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 4-6 de abril, FAPA, Guarapuava, Paraná, 55-57.
- _ Prabhu, AS; Filippi, MC; Castro, N. 1992. Pathogenic variation among isolates of *Magnaporthe grisea* infecting rice, wheat, and grasses in Brazil. *Tropical Pest Management*. 38: 367-371.
- _ Urashima, AS; Igarashi, S; Kato, H. 1993. Host range, mating type, and fertility of *Magnaporthe grisea* from wheat in Brazil. *Plant Disease*, 12: 11-16.
- _ Viedma LQ, Morel W. 2002. Añublo o *Pyricularia* del Trigo. Díptico. MAG/DIA/ CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.

Identificación de hospedantes alternativos de *Magnaporthe* sp. en campos de trigo de Paraguay*

Identification of alternative hosts of *Magnaporthe* sp. in wheat fields of Paraguay

Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli

RESUMEN

El género *Pyricularia* es conocido por atacar principalmente gramíneas. Este hongo presenta una amplia gama de hospederos entre los cuales se destacan el arroz y el trigo, así como otras gramíneas cultivadas, nativas y malezas. Hasta el momento poco se conoce sobre la importancia del inóculo procedente de las malezas para el cultivo del trigo. El objetivo de este estudio fue identificar los posibles hospederos alternativos de *Magnaporthe oryzae*, en las principales zonas de producción de trigo en Paraguay. Para ello, muestras de malezas, con síntomas característicos del ataque del hongo, fueron recolectadas en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú. Estas muestras fueron sembradas sobre medio de cultivo PDA, e incubadas durante 5 días a 25 °C en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé. Posteriormente se realizó la identificación del hongo mediante observación al estereoscopio y microscopio. Con los aislados obtenidos, se realizaron pruebas de patogenicidad sobre trigo. Se constató la presencia del hongo en: *Bromus catharticus*, *Brachiaria* sp., *Chloris gayana*, *Cyperus diffusus*, *Digitaria horizontalis*, *Lolium multiflorum*, *Cenchrus echinatus*, *Avena strigosa*, *Digitaria insularis*, *Rynchelyntrum roseum* y *Eleusine indica*. Se observó patogenicidad de los aislados de *B. catharticus*, *L. multiflorum*, *C. echinatus* y *E. indica*.

Palabras clave: *Magnaporthe oryzae*, trigo, hospederos alternativos

* Adaptado de Revista Investigación Agraria 17(1) 54-59, 2015.

ABSTRACT

The genus *Pyricularia* is known to attack primarily grass species. This fungus has a wide range of hosts; among which are rice and wheat, as well as other cultivated and native grasses, and weed species. So far little is known about the importance of fungal inoculum from weeds for local wheat production. The objective of this study was to identify probable alternative hosts of *Magnaporthe oryzae* (Anamorph *Pyricularia oryzae*), in the major wheat production areas of Paraguay. To this end, weed samples with characteristic blast infection symptoms of the fungus were collected in the departments of Itapúa, Alto Paraná and Canindeyú. These samples were seeded on PDA culture medium and incubated for 5 days at 25°C in the Phytopathology Laboratory of the Hernando Bertoni Research Center, Caacupé. Subsequent identification of the fungus was made by observation under the stereoscope and microscope and pathogenicity tests were carried out on wheat using the collected isolates. The *Pyricularia* fungus was identified on the following weed species: *Bromus catharticus*, *Brachiaria* sp., *Chloris gayana*, *Cyperus diffusus*, *Digitaria horizontalis*, *Lolium multiflorum*, *Cenchrus echinatus*, *Avena strigosa*, *Digitaria insularis*, *Rynchelytrum roseum* and *Eleusine indica*. Subsequent pathogenicity studies confirmed that the isolates from *B. catharticus*, *L. multiflorum*, *C. echinatus* and *E. indica* to be pathogenic on wheat.

Key words: *Magnaporthe oryzae*, wheat, alternative hosts

INTRODUCCIÓN

El género *Pyricularia* es conocido por atacar principalmente gramíneas, siendo el arroz el principal cultivo afectado por este patógeno a nivel mundial. Este hongo presenta una amplia gama de hospederos entre los cuales se destacan numerosas gramíneas cultivadas, nativas y malezas.

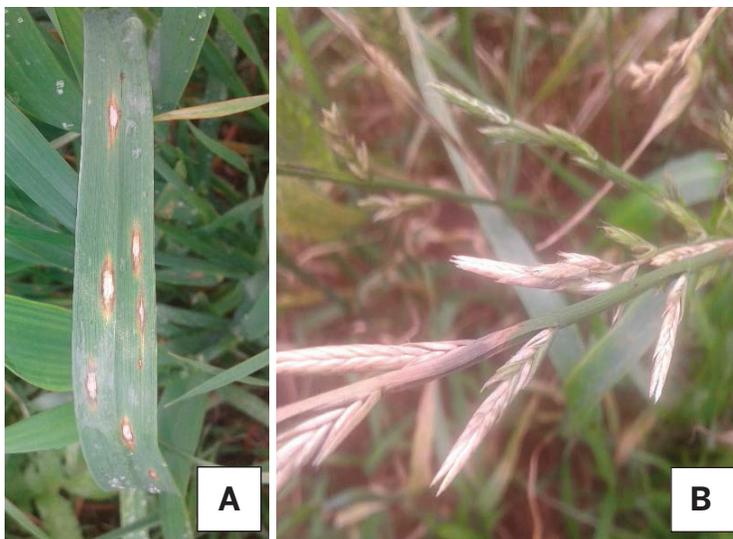
De acuerdo con Reis et al. (2005), el hongo se perpetúa de un año a otro en los residuos de cultivo, semillas y plantas espontáneas que pueden actuar como fuente de inóculo; según Lima (2004) son hospederos alternativos la cebada, millete, maíz, triticale, centeno y acevén. Existen reportes del ataque de este hongo en *Brachiaria brizantha* y *Brachiaria extensa* (Gutierrez et al. 2000; Verzignassi et al. 2012). Prabhu et al. (1992) y Urashima et al. (1993) reportan varias malezas de la familia Gramineae: *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica*, *Digitaria sanguinalis*, *Brachiaria plantaginea*, *Echinochloa crusgalli*, *Pennisetum setosum*, *Hyparrhenia ruffa* y *Rynchelytrum roseum*, como posibles fuentes de inóculo del hongo. En el 2006, Mehta et al., habían agregado a la avena negra (*Avena strigosa*) a la lista de fuentes probables de infección primaria y Marangoni et al (2013) agregaron a la avena blanca (*Avena sativa*) como especie susceptible al brusone de trigo; así también Chávez y Kohli (2015), confirmaron la patogenicidad de aislados de *Bromus catharticus*, *Digitaria horizontalis* y *Lolium multiflorum* sobre plántulas de trigo, y reportaron la presencia del hongo en *Cyperus diffusus* y *Chloris gayana*. Con el fin de aclarar el papel

que cumplen las malezas como fuente de inóculo de *Pyricularia* para el trigo, este estudio buscó identificar los posibles hospederos alternativos de *Pyricularia* sp. en las principales zonas de producción de trigo de Paraguay, y determinar si los aislados de los mismos son capaces de infectar al trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los años 2013 a 2016, muestras de hojas e inflorescencias de malezas de las familias Poaceae y Cyperaceae, que presentaban síntomas característicos del ataque de *Pyricularia*, fueron recolectadas de las zonas aledañas a parcelas de trigo, en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú.; así también se tomaron algunas muestras en el Centro de Investigación Hernando Bertoni en el departamento de Cordillera. Las hojas que presentaban manchas elípticas, con borde marrón rojizo u oscuro y centro más claro fueron tomadas para su análisis en el laboratorio, (Figura 1A) (Reis et al. 2005), así también las inflorescencias con lesiones necróticas cubiertas por crecimiento micelial grisáceo (Figura 1B).

Figura 1. Síntomas característicos del ataque de *Pyricularia* en hojas (A) e inflorescencias (B). Capitán Miranda, Paraguay, 2014.



En el cuadro 1 se detalla la lista de especies recolectadas en los diferentes departamentos.

Tabla 1. Lista de especies de malezas recolectadas en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná, Canindeyú y Cordillera durante los años 2013 a 2016.

Itapúa	Alto Paraná	Canindeyú	Cordillera
<i>Andropogon</i> sp.	<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Avena strigosa</i>	<i>Avena strigosa</i>
<i>Avena strigosa</i>	<i>Cenchrus echinatus</i>	<i>Brachiaria</i> sp.	<i>Brachiaria</i> sp.
<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Digitaria horizontalis</i>	<i>Cenchrus echinatus</i>	<i>Rynchelyntrum roseum</i>
<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Eleusine indica</i>	<i>Digitaria insularis</i>	
<i>Brachiaria mutica</i>	<i>Rynchelyntrum roseum</i>	<i>Digitaria horizontalis</i>	
<i>Brachiaria</i> sp.		<i>Setaria geniculata</i>	
<i>Bromus catharticus</i>		<i>Sorghum halepense</i>	
<i>Cenchrus ciliaris</i>			
<i>Cenchrus echinatus</i>			
<i>Chloris gayana</i>			
<i>Cynodon nlenstuensis</i>			
<i>Cyperus diffusus</i>			
<i>Digitaria insularis</i>			
<i>Digitaria horizontalis</i>			
<i>Eleusine indica</i>			
<i>Imperata brasiliensis</i>			
<i>Lolium multiflorum</i>			
<i>Panicum máximum</i>			
<i>Setaria geniculata</i>			
<i>Sorghum halepense</i>			

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni de la siguiente manera: pequeñas porciones de la parte afectada fueron desinfectadas mediante inmersión en soluciones de alcohol al 70% durante 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio (55 g Cl/I): agua (1:3), por un minuto, posteriormente lavados tres veces con agua destilada esterilizada y secados sobre papel absorbente. Una vez secos se procedió a sembrar los mismos en placas de Petri con medio de cultivo PDA (Papa, dextrosa, agar); e incubados a 25°C durante 5 días. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la identificación mediante observación al microscopio utilizando la clave de Barnett y Hunter (1998).

Las colonias identificadas como *Pyricularia*, fueron repicadas sobre trozos de papel filtro colocados en placas de Petri con medio PDA, cultivadas por 8 días a 25°C;

posteriormente los trozos de papel fueron retirados y colocados en placas de Petri estériles para el secado y posterior conservación a -18°C (Aricapa y Correa 1994).

Inoculación de materiales de trigo

Para la prueba de patogenicidad, se seleccionaron 9 aislados, cada uno de un hospedero diferente, más un aislado de trigo como testigo. En la tabla 2, se presenta la lista de aislados seleccionados. Estos aislados fueron repicados a placas de Petri con medio de cultivo Agar-Harina de avena, cultivados por 12 días a 25°C con fotoperiodo de 12 horas, posteriormente las colonias fueron aplastadas con una varilla de vidrio, y las placas colocadas bajo luz fluorescente constante por 48 horas para favorecer la esporulación (Marangoni et al. 2013). Para preparar la suspensión de conidios, se agregó 10 ml de agua destilada estéril a cada placa y las colonias fueron raspadas con ayuda de un cepillo, luego se ajustó la concentración a 5.10^4 conidios/ ml^{-1} con un hemacitómetro.

Las variedades de trigo inoculadas fueron Caniné 1 (Resistente), Caniné 11 (Susceptible) e Itapúa 70 (Moderadamente susceptible). La inoculación se realizó asperjando las espigas con las suspensiones de cada aislado.

Tabla 2. Aislados seleccionados para las pruebas de patogenicidad con su código y origen. Caacupé, Paraguay, 2016.

Código	Hospedero	Origen
P13-004	<i>Bromus catharticus</i>	Capitan Miranda, Itapúa
P13-012	<i>Digitaria horizontalis</i>	Yhovv, Canindeyú
P14-016	<i>Avena strigosa</i>	Caacupé, Cordillera
P14-039	<i>Triticum aestivum</i>	Estancia Flor, Alto Paraná
P14-050	<i>Lolium multiflorum</i>	Capitan Miranda, Itapúa
P15-054	<i>Rynchelyntrum roseum</i>	Caacupé, Cordillera
P15-055	<i>Cenchrus echinatus</i>	Yhovv, Canindeyú
P15-056	<i>Digitaria insularis</i>	Yhovv, Canindeyú
P15-062	<i>Brachiaria</i> sp.	Yhovv, Canindeyú
P15-089	<i>Eleusine indica</i>	Capitán Miranda, Itapúa

Para cada aislado se inocularon 4 macetas con tres plantas, de cada variedad. Posterior a la inoculación las plantas se mantuvieron en una cámara climatizada con 27°C de temperatura y 80% de humedad (Chávez et al. 2017). La evaluación se realizó 15 días después de la inoculación indicando la reacción de compatibilidad (+) e incompatibilidad (-).

RESULTADOS

De las muestras colectadas en el departamento de Itapúa, se constató la presencia de *Pyricularia* en hojas de *Bromus catharticus*, *Cenchrus echinatus*, *Chloris gayana*, *Digitaria horizontalis* y *Eleusine indica*, así como en hojas e inflorescencias de *Avena strigosa* y *Lolium multiflorum*; y en inflorescencias de *Cyperus diffusus*. En el departamento de Alto Paraná, son hospederos *C. echinatus* y *D. horizontalis*, y en el departamento de Canindeyú, *A. strigosa*, *Brachiaria* sp., *C. echinatus*, *D. insularis* y *D. horizontalis*. En el departamento de Cordillera, se constató la presencia del hongo en las tres especies muestreadas, *A. strigosa*, *Brachiaria* sp. y *Rynchelyntrum roseum*.

Tabla 3. Compatibilidad de la infección de los diferentes aislados en las tres variedades inoculadas. Caacupé, 2016.

Aislado	Variedad	Infección
P13-004	Itapúa 70	+
	Canindé 11	+
	Canindé 1	+
P14-016	Itapúa 70	-
	Canindé 11	-
	Canindé 1	-
P14-039	Itapúa 70	+
	Canindé 11	+
	Canindé 1	+
P14-050	Itapúa 70	+
	Canindé 11	+
	Canindé 1	-
P15-054	Itapúa 70	-
	Canindé 11	-
	Canindé 1	-
P15-055	Itapúa 70	+
	Canindé 11	+
	Canindé 1	-
P15-056	Itapúa 70	-
	Canindé 11	-
	Canindé 1	-
P15-062	Itapúa 70	-
	Canindé 11	-
	Canindé 1	-
P15-089	Itapúa 70	-
	Canindé 11	+
	Canindé 1	-

De los nueve aislados seleccionados, los aislados de *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum* y *Bromus catharticus* causaron infección en las variedades inoculadas. La compatibilidad de las infecciones de los diferentes aislados se presentan en la tabla 3.

CONCLUSIÓN

Se constató la presencia de *Pyricularia* en las siguientes especies: *Avena strigosa*, *Brachiaria* sp., *Bromus catharticus*, *Lolium multiflorum*, *Chloris gayana*, *Cyperus difusus*, *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica*, *Digitaria insularis*, *Digitaria horizontalis* y *Rynchelyntrum roseum*. Si bien en muchas de las especies colectadas, no se observó la presencia del hongo, no se las debe descartar como posibles hospederos alternativos, ya que los numerosos reportes demuestran que *Pyricularia* posee un amplio rango de hospedantes, y se debe seguir estudiando los mismos.

Los aislados de *Cenchrus echinatus*, *Lolium multiflorum*, *Bromus catharticus* y *Eleusine indica* causan infección al trigo, teniendo en cuenta que solo se estudió un aislado de cada hospedero, es necesario ampliar el número de aislados estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American Phytopathological society. Minnesota, US. 218 p.
- Chávez, A; Cazal, C; Kohli, MM. 2017. Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo. *Investigación Agraria* 19(1):56-63.
- Gutiérrez, S; Mazzanti de Castañon, M; Galmarini, M. 2000. Avances en el conocimiento de hospederos espontáneos de *Magnaporthe oryzae* en Argentina. (en línea). Comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. Consultado 06 ago. 2013. Disponible en: www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/5.../a_pdf/a_043.pdf
- Lima, MIPM. 2004. Giberela ou Brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. (en línea). Documentos on line. Embrapa Trigo. Consultado 30 abr. 2013. Disponible en: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm

- _ Marangoni, M; Nunes, M; Fonseca, N; Metha, Y. 2013. *Pyricularia* blast on White oats – a new threat to wheat cultivation. *Tropical Plant Pathology*. 38(3):198-202.
- _ Mehta, YR; Nunes, MP; Oliveira, JC. 2006. Ocorrência de brusone em aveia no Estado do Paraná. In: Resultados Experimentais. XXVI Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 4–6 de abril, FAPA, Guarapuava, Paraná, 55–57.
- _ Prabhu, AS; Filippi, MC; Castro, N. 1992. Pathogenic variation among isolates of *Magnaporthe oryzae* infecting rice, wheat, and grasses in Brazil. *Tropical Pest Management*. 38: 367-371.
- _ Reis, EM; Casa, RT; Forcelini, CA. 2005. Doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.). In Kimati, H; Amorim, L; Rezende, J; Bergamin, A; Camargo, L. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo, BR. Ceres. v. 2, 663 p.
- _ Tagle, AG; Chuma I; Tosa, Y. 2014. Rmg7, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. *Genetics and resistance*. V 105(4) 495-499.
- _ Urashima, AS; Igarashi, S; Kato, H. 1993. Host range, mating type, and fertility of *Magnaporthe oryzae* from wheat in Brazil. *Plant Disease*, 12: 11–16.
- _ Valent, B; Cruz, CD; Peterson, G; Bockus, WW; Farman, M; Pedley, K; Whitley, R; Navia-Urrutia, M; Trick, HN; Maciel, JLN; Oliveira-Garcia, E; Stack, J. 2016. Wheat blast: Biology, genetics and genomics. In: Madeiros Del Ponte, E; Bergstrom, G; Pavan, W; Lazzaretti, A; Cunha Fernandes, JM. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Paso Fundo, RS. BR.
- _ Verzignassi, JR; Poltronieri, LS; Benchimol, RL; Santos de França, SK; de Arruda, Eudes; Dornelas, C. 2012. *Magnaporthe oryzae*: novo patógeno em *Brachiaria brizantha* cv. Marandú no Pará. *Summa Phytopathologica* 38 (3): 254.
- _ Viedma, LQ; Morel, W. 2002. Añublo o Pyricularia del Trigo. Díptico. MAG/DIA/CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.

Primer reporte de *Magnaporthe* sp. en avena negra (*Avena strigosa* L.) en Paraguay*

First report of *Magnaporthe* sp. on black oats (*Avena strigosa* L.) in Paraguay

Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli

RESUMEN

La avena negra (*Avena strigosa* L.) es el abono verde de invierno más difundido en Paraguay, ocupando el 26% del área agrícola durante el invierno. Durante el ciclo 2014 en las parcelas de avena negra del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, se observaron hojas con síntomas similares a los causados por *Magnaporthe oryzae* (anamorfo *Pyricularia oryzae*) en trigo. Muestras de hojas con estos síntomas fueron procesadas en el laboratorio de Fitopatología, mediante técnicas de incubación y aislamiento rutinarias. Las muestras de avena negra analizadas, confirmaron el ataque de *Magnaporthe* sp. (anamorfo *Pyricularia* sp.), convirtiendo a la avena negra en una potencial fuente de inóculo para el cultivo de trigo.

ABSTRACT

The black oats (*Avena strigosa* L.) is the most widespread winter green manure in Paraguay, occupying approximately 26% of the cultivated area during the winter season. Black oat leaves with symptoms similar to those caused by *Magnaporthe oryzae* (anamorph *Pyricularia oryzae*) in wheat were observed during the 2014 cycle at the Hernando Bertoni Research Center, Caacupé. Once processed in the phytopathology laboratory, through routine incubation and isolation techniques, the analyzed samples of black oat leaves confirmed the presence of *Magnaporthe* sp. on them. This is the first report of *Magnaporthe* sp. infection on black oats in Paraguay, making it a potential source of additional inoculum for wheat crop.

* Presentado en el III Congreso Nacional de Ciencias Agrarias, 2014.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la avena negra (*Avena strigosa* L.) es utilizado como el abono verde de invierno más difundido en Paraguay. Es una gramínea de rápido crecimiento, considerada uno de los abonos que más carbono orgánico aporta al suelo y capaz de reciclar altas cantidades de nitrógeno y potasio. De acuerdo con Vallejos et al. (2001) la avena negra ocupa el 26% del área agrícola durante el invierno, siendo utilizado en las principales colonias productoras en rotación con la soja en el 28% del área sembrada.

Desde hace unos años la enfermedad conocida como brusone, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* (T.T. Hebert) M.E. Barr (anamorfo *Pyricularia oryzae* Sacc.), es comúnmente observada en trigo en Paraguay, la misma tuvo su primera epidemia en el año 2002, causando pérdidas de más del 70% en campos sembrados temprano (Viedma y Morel, 2002). Teniendo en cuenta que la avena negra es el abono verde de invierno más utilizado por los productores de nuestro país, el hecho de que la misma sea infectada por *M. oryzae* representa una gran amenaza para el cultivo del trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En parcelas de avena negra del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay se observó la presencia de hojas que presentaban manchas castaño rojizas de 1 a 2 mm de largo, así como también lesiones elípticas coalescentes con borde marrón y centro gris oscuro, muy similares a las lesiones observadas en materiales de trigo cuando inoculadas con *M. oryzae*, razón por la cual se procedió a recolectar muestras de las mismas, las cuales fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología para su diagnóstico.

Las muestras fueron puestas en cámara húmeda durante 3 días a 28°C, transcurrido el periodo de incubación se procedió a la identificación microscópica con ayuda de la clave de identificación de Barnett y Hunter (1998). Una vez identificado el patógeno se procedió a aislarlo sembrando pequeños fragmentos de las muestras en placas de Petri con medio de cultivo PDA, las placas fueron incubadas por 5 días a 28°C, posteriormente se procedió a la identificación y repicado de las colonias en medio de cultivo Agar-Avena.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la infección de *Magnaporthe oryzae* en avena negra, se inician como pequeñas lesiones de color castaño rojizo, las cuales evolucionan a manchas elípticas con borde marrón y centro gris oscuro (Figura 1). Estos síntomas son muy similares a los observados en hojas de trigo cuando inoculadas con *M. oryzae* (Figura 2).

Figura 1. Síntomas observados en hojas de avena negra del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay, 2014.



Figura 2. Síntomas observados en hojas de trigo inoculadas con *M. oryzae* (A), síntomas observados en hojas de avena negra del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay (B), 2014.



En el año 2006, Mehta et al., habían agregado a la avena negra a la lista de fuentes probables de infección primaria del brusone del trigo en Brasil, y recientemente, Marangoni et al. (2013) agregaron a la avena blanca como especie susceptible al brusone de trigo. En Paraguay, Viedma (2010), menciona la observación de este patógeno en parcelas de avena negra en Colonias Unidas, departamento de Itapúa en el año 2005, sin embargo, esta autora no lo reportó.

CONCLUSIÓN

Las muestras de avena negra analizadas, confirman el ataque de *Magnaporthe* sp. (anamorfo *Pyricularia* sp.), agente causal de la enfermedad conocida como brusone, siendo este el primer reporte de la presencia de la enfermedad en plantaciones de avena negra en Paraguay. Este hecho representa una gran amenaza para el cultivo del trigo ya que la infección de *M. oryzae* sobre avena negra puede resultar en el incremento sustancial del inóculo ya que ambos cultivos se desarrollan durante el mismo periodo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American Phytopathological society. Minnesota, US. 218 p.
- _ Mehta, YR; Nunes, MP; Oliveira, JC. 2006. Ocorrência de brusone em aveia no Estado do Paraná. In: Resultados Experimentais. XXVI Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 4-6 de abril, FAPA, Guarapuava, Paraná, 55-57
- _ Marangoni, M; Nunes, M; Fonseca, N; Metha, Y. 2013. *Pyricularia* blast on White oats – a new threat to wheat cultivation. Tropical Plant Pathology. 38(3):198-202.
- _ Vallejos, F; Kliewer, I; Florentín, M; Casaccia, J; Calegari, A; Derpsh, R. 2001. Abonos verdes y rotación de cultivos en siembra directa. Sistemas de producción tractorizados. San Lorenzo, PY. MAG, GTZ. 92 p.
- _ Viedma, LQ; Morel, W. 2002. Añublo o Pyricularia del Trigo. Díptico. MAG/DIA/CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.
- _ Viedma, LQ. 2010. Manejo integrado de mancha amarilla y la Pyricularia en el cultivo de trigo en Paraguay. In: Kohli, M; Cubilla, LE; Cabrera, G. Tercer seminario nacional de trigo “Del grano al Pan”. Asunción, PY. CAPECO, INBIO. 168 p.

Esporulación de *Magnaporthe oryzae* en diferentes medios de cultivo*

Sporulation capacity of *Magnaporthe oryzae* in different culture media

Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli

RESUMEN

El hongo *Magnaporthe oryzae* (anamorfo *Pyricularia oryzae*), agente causal del brusone del trigo presenta baja capacidad de esporulación y crecimiento lento en laboratorio, lo cual dificulta la producción de inóculo. Este trabajo tuvo por objetivo seleccionar un medio de cultivo adecuado para la esporulación de *M. oryzae*. Fueron evaluados los medios agar-harina de avena, agar-semillas de trigo, agar-hojas de trigo y V8 Casero. El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar, con 4 tratamientos y dos repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANAVA), y al test de Tukey al 5%. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los medios, siendo el medio agar-harina de avena el que presentó mayor esporulación.

ABSTRACT

The fungus *Magnaporthe oryzae* (anamorph *Pyricularia oryzae*), the causal organism of wheat blast disease, has low sporulation capacity and slow growth in the laboratory, which hinders the production of large quantities of inoculum. The objective of this study was to identify and select a suitable culture medium which would enhance the sporulation of *M. oryzae* fungus. The following media: agar-oatmeal, agar-wheat seed, agar-wheat leaf and V8 media were evaluated. A completely randomized experimental design was used with 4 treatments and two replications. The data were subjected to analysis of variance and comparison of means with the Tuckey test $\alpha = 0.05$ by means of the InfoStat program. Significant statistical differences were observed among the media used in the study, with the oatmeal agar medium favoring the highest fungal sporulation.

* Presentado en el Sexto Seminario Nacional de Trigo “Del grano al pan” 2015.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Magnaporthe oryzae* (anamorfo *Pyricularia oryzae*), agente causal del brusone del trigo, forma conidios piriformes, obclavados, con base circular y ápice fino, levemente oscuros o hialinos (Bedendo y Prabhu 2005). Soave et al. (1975), señalan que este patógeno presenta baja capacidad de esporulación y crecimiento lento en laboratorio, lo cual dificulta la producción de inóculo; así también Cruz et al. (2009) mencionan que la esporulación de *M. oryzae* se ve afectada entre otros factores por la composición del medio de cultivo y por el régimen de luz. Estas características hacen necesario realizar pruebas locales con diferentes medios de cultivo, a fin de encontrar aquel que permita una mayor esporulación, y pueda ser utilizado en la producción de inóculo para la realización de pruebas de selección de materiales genéticos resistentes a la enfermedad. Este trabajo tuvo por objetivo seleccionar un medio de cultivo adecuado para la esporulación de *M. oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB). El aislado utilizado fue obtenido durante el ciclo 2013, de una espiga de trigo, proveniente de una parcela comercial del distrito de Capitán Miranda, Departamento de Itapúa. El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar, con 4 tratamientos y dos repeticiones. Los tratamientos se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados y su composición. Caacupé, Paraguay, 2015.

Tratamiento	Medio de Cultivo
1	Agar-harina de avena
2	Agar-semillas de trigo
3	Agar-espigas de trigo
4	V8 casero

Un disco de 5 mm de diámetro con cultivo puro del hongo fue sembrado en cada Placa de Petri. Las placas fueron incubadas a 28 °C, con fotoperiodo de 12 horas durante 10 días, luego, conforme a la recomendación de Marangoni (2014), el micelio fue aplastado con una varilla de vidrio, y las placas puestas bajo luz continua, sin tapa, por 48 horas para favorecer la esporulación. La cuantificación de las esporas se realizó empleando la cámara de Neubauer, tomando 5 muestras por placa, y los valores obtenidos fueron promediados. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANAVA), y al test de Tukey al 5%.

RESULTADOS

El medio de cultivo que presentó la mayor concentración de conidios fue Agar-Harina de avena, mostrándose estadísticamente diferente a los demás. Los medios de cultivo compuestos por Agar-Espigas de Trigo y V8 casero, también presentaron concentraciones apreciables, pudiendo ser considerados como una opción. Los promedios de concentración de conidios de los diferentes medios de cultivo se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Promedio de concentración de conidios/ml de *Magnaporthe oryzae* en diferentes medios de cultivo. Caacupé, Paraguay, 2015.

Medio de cultivo	Concentración de conidios/ml
Agar-Harina de avena	4,1.10 ⁶ a
Agar-Espigas de Trigo	3,2.10 ⁶ ab
V8 casero	2,1.10 ⁶ ab
Agar-Semillas de Trigo	2,7.10 ⁵ b

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCLUSIÓN

Los mejores resultados para la esporulación de *Magnaporthe oryzae* fueron obtenidos con el medio Agar-Harina de avena, siendo el medio seleccionado para los futuros trabajos de multiplicación de inóculo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bedendo, IP; Prabhu, AS. 2005. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). In Kimati, H; Amorim, L; Rezende, JAM; Bergamin Filho, A; Camargo, LEA. Manual de fitopatología. Doenças das plantas cultivadas. 4 ed. Sao Paulo, BR. Ceres. v. 1, 663 p.
- Cruz, MF; Prestes, A; Maciel, JL. 2009. Esporulação e crescimento vegetativo de *Pyricularia oryzae* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. Ciencia Rural. v.39, n.5, p.1562-1564.
- Marangoni, M. 2014. Comunicación personal.
- Soave, J.; Galli, F; Kimati, H. 1975. Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação de *Pyricularia oryzae* Cavara, em diferentes meios de cultura. Summa Phytopathologica, São Paulo, v.1, n.4, p.258-266.

Evaluación de la esporulación, crecimiento radial y peso micelial de cuatro cepas de *Pyricularia* aisladas de distintos hospederos*

Evaluation of sporulation, radial growth and mycelial weight of four strains of *Pyricularia* isolated from different host species

Yessica Magaliz Reyes Caballero ⁽²⁾; Alice Rocío Chávez ⁽²⁾; Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga ⁽¹⁾; Juliana Moura Mendes Arrúa ⁽¹⁾; Man Mohan Kohli ⁽²⁾; Cinthia Carolina Cazal Martínez ⁽¹⁻²⁾

RESUMEN

Pyricularia grisea y *Pyricularia oryzae* están incluidas dentro del género *Pyricularia*, agente causal de enfermedades en arroz (*Oryza sativa* L.) Infectan también gramíneas como *Triticum aestivum* L., *Avena sativa* L etc. A pesar de la variedad de hospederos existe especificidad en cepas aisladas de arroz por presentarse infección solo en plantas muy próximas a esta (*Lolium* y Cebada). Esto puede relacionarse a la variabilidad genética que el presente trabajo evalúa mediante análisis de características morfológicas (crecimiento radial, esporulación y peso de micelio) sobre cepas de *Pyricularia* aisladas de trigo, avena y *Bromus catharticus*. Las cepas se sembraron en medio de cultivo Agar-Avena, y se incubaron a 25°C con luz por siete días, posteriormente se evaluó el crecimiento radial y se raspó la

⁽¹⁾ Centro Multidisciplinario de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Dirección General de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT- DGICT-UNA).

⁽²⁾ Cámara Paraguaya de Exportadores de Cereales y Oleaginosas.

* Presentado en el VIII Congreso Brasileiro de Micología, 2016.

placa para estimular la esporulación en cámara húmeda. Para conocer el peso del micelio, se sembraron bocados de los aislados en matraces conteniendo medio de cultivo preparado a base de caldo de papa y dextrosa. Los mismos se mantuvieron a 25°C con luz y agitación constante (130 r. p. m) por siete días, luego se filtró, secó y pesó el micelio. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y comparación de medias con el test de Tuckey $\alpha=0,05$ mediante el programa InfoStat. Se determinó que no existe diferencia significativa en la esporulación de los aislados provenientes de trigo y avena, siendo significativa para la cepa proveniente de *B. catharticus*. En el crecimiento radial no se observó diferencias significativas. Para peso de micelio la diferencia fue significativa entre todos los aislados analizados. Con estos resultados se demuestra que estas variables no pueden emplearse como criterios únicos indicativos de variabilidad genética entre aislados. Se concluye que las características morfológicas tales como crecimiento radial, esporulación y peso micelial no pueden ser criterios únicos para estimar la variabilidad biológica existente entre aislados de *Pyricularia*, por lo que se hace necesario el uso de otras herramientas como marcadores moleculares que complementen estas características morfológicas.

ABSTRACT

Pyricularia grisea and *Pyricularia oryzae* are included within the genus *Pyricularia*, the causal organism of blast disease in rice (*Oryza sativa* L.). The fungus is also known to infect other cereals, viz. wheat (*Triticum aestivum* L.) and oats (*Avena sativa* L.) etc. Despite the multiplicity of hosts, the fungal specificity has been identified in isolates from rice (*Oryza sativa* L.) which only infect it or the plants very close to it (*Lolium* and Barley). This can be related to the genetic variability which is studied in the present work by analysis of morphological characteristics (radial growth, sporulation and weight of mycelium) on four strains of *Pyricularia* (P14GTae019, P14GTae021, P14IAsh016 and P13CBch04), isolated from wheat (2), oats and *Bromus* respectively. Oatmeal Agar was sown with each strain, kept at 25°C with light for seven days. After this period the radial growth was evaluated and the plate was scraped to stimulate sporulation in a humid chamber (recounted after seven days). Bits of fungal isolates were placed in flasks containing culture medium prepared with potato broth and dextrose. It was kept at 25 ° C with light and constant agitation (130 rpm) for seven days, after which the mycelium was filtered, dried and weighed. The data were subjected to analysis of variance and comparison of means with the Tuckey test $\alpha = 0.05$ by means of the InfoStat program. While no significant difference was observed in the sporulation between isolates from wheat and oats, they differed significantly from *Bromus* isolate. No significant differences among the isolates were observed for the radial growth. However, for mycelial weight, significant differences were found among the isolates analyzed. These results coincide with those obtained in the genotyping of *Pyricularia*

grisea isolates, where sporulation and radial growth were evaluated and significant differences were seen for the same host. It is therefore concluded that morphological characteristics such as radial growth, sporulation and mycelial weight cannot be used as unique criteria to estimate the biological variability among *Pyricularia* isolates, and it is necessary to identify other tools, such as molecular markers, to complement morphological characteristics.

INTRODUCCIÓN

El género de hongos *Pyricularia* (teleomorfo *Magnaporthe*) está compuesto por varias especies tales como, *P. higginsii*, *P. zingiberi*, *P. zizaniaecola*, *P. commenicola*, *P. grisea* y *P. oryzae*, siendo este último el agente causal de varias enfermedades en arroz (*Oryza sativa* L.) tales como Pudrición del cuello de la espiga, y la más destructiva conocida como Rice Blast, esta se encuentra entre las diez enfermedades de origen fúngico que amenaza la seguridad e inocuidad alimentaria en todo el mundo. (Luo et al, 2013). Este género fúngico infecta además a otras gramíneas tales como Trigo (*Triticum aestivum* L.), avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* L.) etc. Lo cual demuestra la existencia de una amplia variedad de hospederos para este hongo. (Dias, et al. 2010). Una particularidad del género es que las especies *P. grisea* y *P. oryzae*, son prácticamente indistinguibles en cuanto a la morfología del conidio, peritecio y ascospora entre otros caracteres, lo cual podría ser un inconveniente al momento de caracterizar morfológicamente las cepas fúngicas (Klaubaul et al. 2014). A pesar del rango de hospederos amplio, se ha observado especificidad de hospederos para cepas de *Pyricularia* aisladas de arroz, ya que estas infectan solo a plantas muy próximas al arroz como Lolium y Cebada, en tanto que cepas aisladas de otras gramíneas son incapaces de infectar al arroz. (Klaubaul et al. 2014), Gutiérrez, et al. 2015). Esto podría estar relacionado con la variabilidad biológica existente entre una cepa y otra. Esta variabilidad podría ser manifestada a través de los caracteres macroscópicos (aspecto del micelio, color, forma) y microscópicos (tamaño y forma del conidio) de la cepa. Con el objetivo de evaluar la variabilidad por medio de las características morfológicas se procedió al análisis de las siguientes variables: Crecimiento radial, esporulación y peso de micelio en cuatro cepas de *Pyricularia* (P14GTae019, P14GTae021, P14IAsh016 y P13CBch04) aisladas de tres hospederos distintos; trigo, Avena y *Bromus catharticus* respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas fueron sembradas en medio Agar Avena con 1% de getamicina (por triplicado) y mantenidas para su crecimiento a una temperatura de 25°C y luz continua durante ocho días. Posteriormente fueron evaluadas las variables de crecimiento radial y esporulación, registrando el radio de crecimiento presente en la placa para cada cepa. Para evaluar la esporulación se procedió al raspado de la placa y su posterior incubación en cámara húmeda por 7 días con el fin de estimular la formación de esporas en las

cepas. El recuento de esporas se realizó con una cámara de Neubauer en microscopio óptico compuesto, el mismo fue realizado por triplicado. Para el análisis de peso micelial se sembró las cepas en un matraz Erlenmeyer conteniendo medio de cultivo líquido preparado a base de infusión de papa, dextrosa 2% y 1% de gentamicina, a una temperatura de 25°C con luz y agitación constante (130 r. p. m) durante 7 días. Se registraron los datos de peso de micelio posterior a una filtración y secado. Los datos obtenidos para las tres variables fueron sometidos a análisis de varianza y comparación de medias con el test de Tuckey $\alpha = 0,05$ mediante el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de medias determino que no existe diferencia significativa para la variable de esporulación (**Tabla 1**) en las cepas provenientes de trigo y avena, siendo significativa esta diferencia para la cepa proveniente de *Bromus catharticus*.

Tabla 1. Análisis de Medias para la variable esporulación en las cepas P14GTae019, P14GTae021, P14IAsh016 y P13CBch04 aisladas de tres hospederos distintos; trigo, Avena y *B. catharticus* respectivamente. San Lorenzo, Paraguay, 2016.

Cepa	Media
P14GTae019	179400 a
P14GTae021	263333 a
P14IAsh016	765000 a
P13CBch04	5283333 ab

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En cuanto al crecimiento radial y peso micelial, (**Tablas 2 y 3**) la prueba de Tuckey determino que tampoco existió diferencia significativa para el crecimiento radial entre las cepas provenientes de los tres hospederos, sin embargo, se observó diferencia en cuanto al peso del micelio entre las cuatro cepas analizadas.

Tabla 2. Análisis de Medias para la variable de Crecimiento Radial en las cepas P14GTae019, P14GTae021, P14IAsh016 y P13CBch04 aisladas de tres hospederos distintos; trigo, Avena y *B. catharticus* respectivamente. San Lorenzo, Paraguay, 2016.

Cepa	Media
P14IAsh016	32,92 a
P14GTae019	33,67 a
P14GTae021	34,67 a
P13CBch04	34,75 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. Análisis de Medias para la variable Peso Micelial en las cepas P14GTae019, P14GTae021, P14IAsh016 y P13CBch04 aisladas de tres hospederos distintos; trigo, Avena y Bromus respectivamente. San Lorenzo, Paraguay, 2016.

Cepa	Media
P13CBch04	16,67 a
P14GTae021	249,67 b
P14GTae019	399,40 c
P14IAsh016	845,07 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Con estos resultados se demuestra que la esporulación, el crecimiento radial en placa y el peso del micelio no pueden ser empleados como criterio indicativo de variabilidad biológica entre cepas provenientes de hospederos diferentes. En cuanto para la variable peso de micelio, se resalta la diferencia significativa existente entre las cuatro cepas de *Pyricularia*, incluyendo a las dos cepas provenientes del mismo hospedero (P14GTae019 y P14GTae021), esto sugiere la posibilidad de emplear la variable como criterio de variabilidad entre cepas aisladas de un mismo hospedero. En un estudio efectuado por Bouvet en el año 2015, se evaluó los caracteres morfológicos y la esporulación de cepas de *Pyricularia grisea* aisladas de arroz, en el mismo quedo demostrado que estas características varían dentro de una misma cepa para un mismo hospedero, lo cual concuerda también con el resultado obtenido en el presente trabajo.

CONCLUSIÓN

Se concluye que las características morfológicas tales como crecimiento radial, esporulación y peso micelial no pueden ser criterios únicos para estimar la variabilidad biológica existente entre aislados de *Pyricularia*, por lo que se hace necesario el uso de otras herramientas como marcadores moleculares que complementen éstas características morfológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bouvet. M 2015 Aislamiento y caracterización de *Pyricularia grisea* de variedades de arroz cultivadas en el Departamento San Javier1. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL) 1 – 4.
- Dias, J, Santos. G, Anjos. L, Nakano. P & Ferreira. P 2010 Alta diversidade de raças fisiológicas de *Magnaporthe oryzae* em áreas de arroz irrigado em Tocantins, Brasil Pesq. agropec. 45(3): 252-260
- Chávez. R & Kohli. M. 2015. Hospederos alternativos de *Magnaporthe grisea* del trigo en Paraguay. Investig. Agraria 17(1)54-59
- Gutiérrez. S & Cúndom. M. 2015 *Pyricularia oryzae* en cultivos de cebada en Corrientes (Argentina) Summa Phytopathol. 4 (4): 318-320
- Klaubauf. S, Tharreau. D, Fournier.E, Groenewald. J, Crous. P, Vries.R & Lebrun. M. 2014 Studies in Mycology 79: 85-120
- Luo. J & Zhang. N. 2013. Magnaporthiopsis and new genus in Magnaportheaceae (Ascomycota). Mycologia 105: 1019-1029

Conservación de cepas de *Pyricularia* sp por tres métodos; largo plazo, alternativo y un método desarrollado por combinación de métodos alternativos y de largo plazo

Evaluation of different methods to conserve *Pyricularia* sp. isolates for longer periods

Magaliz Reyes^(1*), Juliana Moura⁽²⁾, Cinthia Rojas⁽³⁾, Alice Chávez⁽¹⁾, Man Mohan Kohli⁽¹⁾, Cinthia Cazal⁽¹⁾

RESUMEN

La implementación de métodos de conservación se hace indispensable para el estudio de microorganismos como hongos fitopatógenos. El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento radial de cepas de *Pyricularia* sp. conservadas en Papel de filtro y Glicerol como crioprotector, para ello se llevó a cabo un experimento en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de investigaciones Tecnológicas (CEMIT) con dos cepas de *Pyricularia* sp (066M y 067M) aisladas de *Digitaria horizontalis* y *Brachiaria* sp. respectivamente. Las cepas fueron inoculadas en medio Agar-Avena y mantenidas a condiciones controladas de luz y temperatura (25°C) por 7 días. Posteriormente, se realizó su conservación por los siguientes métodos; Papel de filtro a -20°C y Papel de filtro a -80°C (con Glicerol). Para su Congelamiento con glicerol (80%v/v), las cepas de *Pyricularia* sp. se almacenaron a -80°C. Luego de 12 meses de almacenamiento se procedió a la reactivación bajo condiciones controladas de luz y temperatura (25°C). Se evaluó el crecimiento radial durante 15 días (las pruebas fueron realizadas por

⁽¹⁾Cámara Paraguaya de Exportadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO)

⁽²⁾Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT-UNA)

⁽³⁾Iniciación científica Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT-UNA)

^(*)Autor para correspondencia: magalizrc@gmail.com

triplicado). Las cepas conservadas por los métodos de congelamiento a -80°C no presentaron crecimiento durante las observaciones realizadas, Por el contrario, con la conservación en Papel de filtro a -20°C pudo observarse crecimiento sin diferencias significativas entre las cepas. En conclusión, la de conservación sobre Papel de filtro a -20°C puede ser implementada para la recuperación con éxito de cepas de *Pyricularia* sp.

ABSTRACT

The implementation of correct conservation methods is essential for the study of microorganisms such as phytopathogenic fungi. The objective of the present work was to evaluate the radial growth of different isolates of *Pyricularia* sp. preserved on filter paper and glycerol as cryo-protectant. Using two strains of *Pyricularia* sp. isolated from *Digitaria horizontalis* (066M) and *Brachiaria* sp. (067M), an experiment was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Multidisciplinary Technological Research Center (CEMIT). The strains were inoculated in oatmeal agar medium and kept under controlled conditions of light and temperature (25°C) for 7 days. Subsequently, their conservation was carried out by the following methods; Filter paper at -20°C and filter paper at -80°C (with glycerol). For their freezing with glycerol (80% v / v), the *Pyricularia* isolates were stored at -80°C . Twelve months after storage, reactivation was carried out under controlled conditions mentioned above. The radial growth was evaluated during 15 days, in three replications. The strains conserved by the freezing at -80°C showed no growth during the observations. On the other hand, when conserved in filter paper at -20°C , the growth was observed without significant differences between the isolates. In conclusion, the *Pyricularia* isolates can be successfully conserved on filter paper at -20°C for the successful recovery.

INTRODUCCIÓN

La implementación de métodos de conservación se hace indispensable en las investigaciones efectuadas con microorganismos como hongos o bacterias que gozan de interés económico al ser causantes de varias enfermedades en cultivos agrícolas (Ladino et.al. 2016). A la fecha se han desarrollado varias técnicas cuyo fin es la conservación de un material viable con caracteres casi inalterados y similares al cultivo inicialmente aislado. Estos métodos en base a factores como tiempo y características fisiológicas del microorganismo se agrupan en métodos de corto y largo plazo y en métodos alternativos. (Parra et al, 2006, Pinzón & Gutierrez, 2009) Entre los métodos considerados de largo plazo, así denominados por el tiempo de conservación largo (hasta 30 años dependiendo del microorganismo) se encuentran la congelación, en la cual se utiliza un crioprotector (glicerol, dimetilsulfoxido, leche descremada, glucosa, lactosa, manitol etc.), para mantener las células inal-

teradas y conservadas a baja temperatura (-20°C a -140°C) y la liofilización que es básicamente la deshidratación por sublimación del agua (Ladino et al. 2016). Los materiales liofilizados pueden ser conservados a temperaturas comprendidas entre los 18°C y 25°C. (Arencibia et al, 2014). Estos métodos requieren de equipamientos costosos para mantener las condiciones adecuadas, es por ello que la conservación a corto plazo y otros métodos alternativos podrían resultar eficaces para el propósito, pero presenta la desventaja que las células no pueden permanecer almacenadas indefinidamente. Entre las técnicas es posible citar al subcultivo de microorganismo, con la cual se mantiene la actividad metabólica conservando al organismo en medio de cultivo fresco y nutritivo a temperaturas comprendidas entre los 4°C. La suspensión del material a conservar en agua destilada y estéril bajo las mismas condiciones es otra opción de conservación a corto plazo (Martínez et al, 2009). Cuando los métodos antes mencionados no representan una opción para emplear sobre el microorganismo, es posible emplear los métodos alternativos. Se basan en la paralización de las actividades metabólicas por desecación del agua que a diferencia con la liofilización (deshidratación celular) este método solo elimina el agua disponible para las células, es posible citar a la desecación en papel de filtro y sobre sustratos inertes (arena, silica gel, algodón, gelatina, vidrio, porcelana, alginato, sales etc.) (Godínez et al, 2008). Las temperaturas de almacenamientos son variadas, comprendidas entre 4°C y -18°C, pudiéndose almacenar incluso a -80°C si se emplea alginato como sustrato inerte. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de cepas de *Pyricularia* sp. conservadas en dos métodos alternativos (papel de filtro y papel de filtro con glicerol como crioprotector) y en un método a largo plazo (congelamiento con glicerol como crioprotector).

METODOLOGÍA

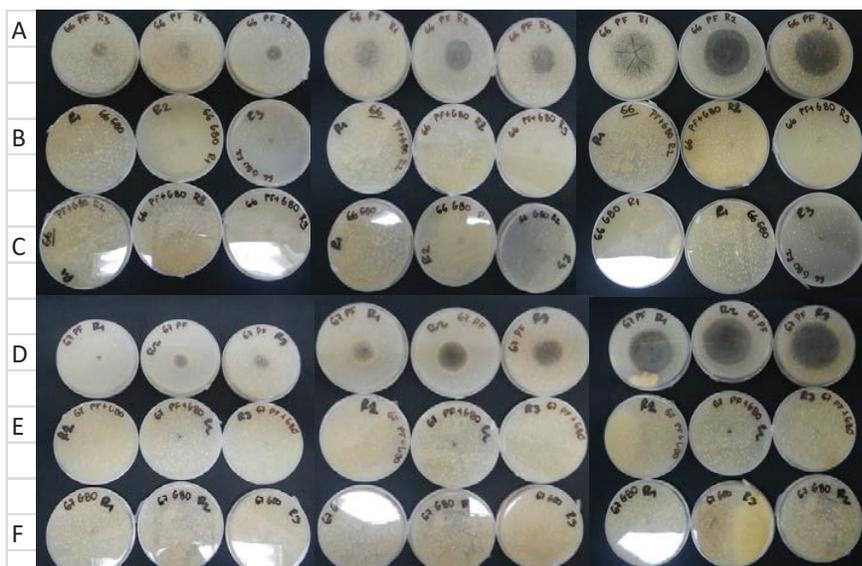
El ensayo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de investigaciones Tecnológicas de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-DGICT-UNA). Se trabajó con dos cepas de *Pyricularia* sp. (066M y 067M) aisladas de *Digitaria horizontalis* y *Brachiaria* sp. respectivamente. Las cepas del hongo fueron sembradas en medio Agar-Avena y mantenidas a condiciones de luz y temperatura adecuadas para su crecimiento durante 7 días. Posteriormente, se realizó la conservación de los materiales por los siguientes métodos; Conservación en papel de filtro (PF) a -20°C, para el cual fueron trasferidos explantes de cada cepa sobre papel de filtro estéril en medio Papa-Dextrosa-Agar en condiciones adecuadas para el crecimiento, 8 días después, el papel de filtro con las cepas crecidas, se secó a temperatura ambiente (25°C), dentro de placas vacías y estériles para su posterior almacenamiento a -20°C y a -80°C con Glicerol (80% v/v) como crioprotector (PF-G80). Para la técnica de conservación por Congelamiento con glicerol (80%v/v) (CG80) como crioprotector a -80°C, se transfirieron explantes de las cepas de *Pyricularia* sp. a tubos con glicerol (80% v/v) directamente desde el medio Agar-Avena. Las cepas fueron

mantenidas bajo las condiciones de conservación durante 12 meses, posteriormente se procedió a la reactivación de las mismas en medio Agar-Avena bajo condiciones controladas de luz y temperatura (22°C - 25°C). Se evaluó el crecimiento radial en centímetros (cm) durante 15 días a intervalos de 5 días realizándose un total de tres observaciones. Se estimuló la esporulación realizando un raspado a la placa en cámara húmeda, manteniendo esta condición por tres días. Posteriormente se evaluó la presencia de esporas al Microscopio óptico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reactivación de las cepas conservadas durante un año en tres métodos diferentes, arrojó resultados no esperados debido a que las cepas conservadas por los métodos de congelamiento a -80°C (PF-G80 y G80) en donde se empleó Glicerol como crioprotector no presentaron diámetro de crecimiento durante las observaciones realizadas a lo largo del ensayo (Figura 1), lo cual implica que el hongo ha perdido la viabilidad en el transcurso del tiempo y no pudo recuperarse. El glicerol o glicerina tiene la función de preservar la integridad celular a temperaturas muy bajas con la capacidad de atravesar la membrana celular y evitar así efectos perjudiciales del aumento en la concentración de soluto generado por el congelamiento del agua (Arencibia et al, 2008).

Figura 1. Evaluación de la reactivación de las cepas 066M y 067M de *Pyricularia sp.* en Agar-Avena por los métodos de conservación PF (A-D), PF-G80 (B-E) y G80(C-F), por triplicado cada 5 días por un intervalo de 15 días. San Lorenzo, Paraguay, 2017.



Se han realizado varios estudios y se lo ha catalogado como un compuesto no tóxico para las células, sin embargo, es posible que la concentración empleada (80%v/v) en este trabajo en comparación con otros haya resultado tóxica para el microorganismo (Malik, 1996, Ladino et al, 2016, Cárdenas, 2010). En base a esto no se puede descartar por completo la técnica empleando este crioprotector, más bien es indispensable realizar estudios para encontrar la concentración adecuada de glicerol para su implementación dentro de la técnica de congelamiento.

Por el contrario, con la conservación en papel de filtro a -20°C se pudo observar crecimiento en las dos cepas con características macromorfológicas de aspecto y textura de la colonia correspondiente al género del hongo fitopatógeno, tal como se observa en la figura 1 y tabla 1. Este método alternativo de conservación puede ser empleado con éxito para la recuperación de las cepas de *Pyricularia* sp.

Tabla 1. Crecimiento de las cepas de *Pyricularia* sp. Conservadas durante 12 meses en tres métodos diferentes; Papel de Filtro (PF), Glicerol 80% (G80) y una combinación de Papel de Filtro con Glicerol (PF-G80). Las cepas fueron reactivadas en Agar-Avena y evaluadas durante 15 días. San Lorenzo, Paraguay, 2017.

Cepa	Observación	Diámetro de Crecimiento		
		PF (cm)	PF - G80 (cm)	G80 (cm)
66M	1	2.67	0	0
	2	3.1	0	0
	3	5.2	0	0
67M	1	1.67	0	0
	2	3.33	0	0
	3	5.5	0	0

En cuanto a la esporulación, esta fue escasa en las condiciones provistas dentro de la cámara húmeda para ambas cepas, es posible que sea necesario ajustar algunos factores importantes como humedad elevada y la temperatura para estimular con éxito la esporulación.

CONCLUSIÓN

Los métodos de conservación (Congelamiento con crioprotector a -80°C y el método alternativo generado por la combinación de papel de filtro y crioprotector a -80°C) resultaron inadecuados para la conservación de cepas de *Pyri-*

cularia sp. Se hace necesario evaluar la concentración ideal del crioprotector para implementarlo dentro de las técnicas. La técnica alternativa de conservación sobre papel de filtro a -20°C puede ser implementada para la recuperación con éxito de cepas de *Pyricularia sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ Arencibia, D. Fernández, L & Menéndez, R. 2008. Métodos generales de conservación de microorganismos. Finlay Ediciones. Colombia, p1 -14
- _ Cárdenas, Y.; D. Rodríguez; O. Elósegui. 2010. *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34. Métodos de conservación y evaluación de sus formulados, tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- _ Godínez, S. Calderón, M. 2008. Métodos Alternativos para la conservación de Hongos Filamentosos. Ciencia y Tecnología de Alimentos, Cuba, v 18 n2 p 31-37
- _ Malik K.A. 1996 Freezedrying of microorganisms using a simple apparatus. Technical Information for Culture Collections Curators in Developing Countries. Education Committee. U/W, 29-32. K. A. Malik (ed), p 256-260
- _ Martínez, A. León, M & González, G. 2009. Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar, Cuba, v XLIII n2 p 47-50
- _ Ladino, E. Rubio, J & Chacín, C. 2016. Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. Centro Agrícola, Colombia, v 43 n p 36-41
- _ Parra, S. M. Pérez, M. Bernal. Z, Soares & D. Montoya. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Colombia, v4 n5 p 1-116
- _ Pinzón, A. Gutiérrez, Y. Bustamante, S. & Buitrago, S. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea sp.*). Revista Colombiana de Biotecnología, Colombia, v XI n 2 p 8-18

Evaluación de la concentración de conidios para la inoculación de materiales de trigo con *Magnaporthe oryzae**

Evaluation of conidia concentration for artificial inoculation with *Magnaporthe oryzae* on wheat

Alice Rocío Chávez⁽¹⁾, Cinthia Carolina Cazal Martinez⁽¹⁾, Alfredo Jesús Rojas Ozuna⁽²⁾, Alfredo Ramón Guillén⁽²⁾, Ángel Núñez⁽²⁾ y Man Mohan Kohli⁽³⁾

RESUMEN

Debido a la importancia del brusone del trigo causado por *Maganaporthe oryzae*, la búsqueda de fuentes de resistencia, mediante la inoculación y evaluación de materiales es de fundamental importancia, sin embargo, no se ha establecido una concentración de conidios estándar para la inoculación y evaluación de materiales. Este trabajo busco determinar una concentración de inóculo de *M. oryzae* que permita distinguir materiales resistentes y susceptibles al hongo. Para ello, fueron inoculadas mediante aspersión, plantas de las variedades Canindé 11 y Milán, con tres concentraciones de conidios: $2,5 \cdot 10^4$, $7,5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ conidios/ml⁻¹. Se evaluó la severidad a nivel foliar y de planta. Los datos obtenidos fueron sometidos al ANOVA y al test de Tukey 5%. Se observó que independientemente de la concentración empleada, las variedades inoculadas se mostraron estadísticamente diferentes tanto a nivel foliar como de planta.

ABSTRACT

Given the importance of the wheat blast disease in Paraguay, caused by *Maganaporthe oryzae*, the artificial inoculation and evaluation of genetic materials is of fundamental importance to identify new sources of resistance. In order to do so

⁽¹⁾CAPECO, Proyecto Pyricularia en trigo, USDA

⁽²⁾Centro de Investigación Hernando Bertoni, IPTA

⁽³⁾CAPECO, Consultor Internacional

^(*)Presentado en el I Congreso Agrario del IPTA, 2015.

correctly, a standard concentration of conidia needs to be established. The present study sought to determine an inoculum concentration of *M. oryzae* that would allow to distinguish resistant and susceptible germplasm under artificially inoculated conditions. Under greenhouse conditions, plants of susceptible cultivar Canindé 11 and resistant cultivar Milan were inoculated by spraying with three concentrations of conidia: $2,5 \cdot 10^4$, $7,5 \cdot 10^4$ and $1 \cdot 10^5$ conidia/ml⁻¹. The leaf and plant severity level were evaluated. The data were subjected to analysis of variance and comparison of means with the Tuckey test $\alpha = 0.05$, by means of the InfoStat program. The results showed that regardless of the concentration used, the inoculated varieties were statistically different both at leaf and plant level.

INTRODUCCIÓN

El brusone del trigo es una enfermedad causada por *Magnaporthe oryzae* (T.T. Hebert) M.E. Barr (anamorfo *Pyricularia oryzae* Sacc.). Actualmente esta enfermedad es considerada de importancia económica en la región pues las epidemias de brusone del trigo están restringidas principalmente al noroeste argentino, llanos bolivianos, sur y centro sur de Brasil y Paraguay (Kohli et al. 2011). Debido a su importancia, las investigaciones están enfocadas a la búsqueda de fuentes de resistencia, mediante la inoculación y evaluación de materiales; muchos de estos trabajos mencionan concentraciones de inóculo de entre $2,5 \cdot 10^4$ conidios/ml⁻¹ y $1 \cdot 10^6$ conidios/ml⁻¹, no habiendo una concentración estándar para la evaluación. El trabajo busco determinar la concentración de inóculo de *Magnaporthe oryzae* que permita distinguir materiales resistentes y susceptibles al hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni durante los meses de octubre de 2014 a enero de 2015. El diseño experimental empleado fue el completamente al azar, con 6 tratamientos, consistentes en 3 concentraciones de inóculo y 2 variedades, con 3 repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por 2 macetas, con 4 plantas en cada una de las variedades Canindé 11 y Milan. La inoculación se llevó a cabo 2 meses después de la emergencia, pulverizando las hojas con suspensiones de $2,5 \cdot 10^4$, $7,5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ conidios/ml⁻¹. Una vez inoculadas las plantas fueron mantenidas en oscuridad por 24 horas a 26°C con humedad del 90%. Posteriormente fueron mantenidas con fotoperiodo de 12 horas.

La evaluación se llevó a cabo 8 días después de la inoculación, clasificando las lesiones de acuerdo a la escala propuesta por Valent et al. (1991) en la cual las lesiones son clasificadas en 6 categorías:

0 = Sin infección

1 = Lesiones puntuales del tamaño de una cabeza da alfiler de color marrón

2= Lesiones elípticas o estriadas de 2 mm o más sin centro distinguible

3 = Lesiones redondeadas con borde oscuro y centro ceniza, en algunos casos con halo amarillo

Evaluación de la concentración de conidios para la inoculación de materiales de trigo con *Magnaporthe oryzae*

4 = Lesiones típicas del brusone, elípticas con borde oscuro y centro ceniza

5 = Lesiones coalescentes, semejantes a quemaduras redondeadas con centro gris oscuro

Las lesiones de tipo 0, 1 y 2; son consideradas de tipo resistente, puesto que no esporulan cuando se someten a las condiciones favorables. Y las lesiones de tipo 3, 4 y 5 son de tipo susceptible.

También se estimó el grado de infección en cada tratamiento, utilizando la escala propuesta por el IRRI (1996) (Tabla 1) para evaluar el ataque de *Pyricularia oryzae* en arroz.

Tabla 1. Escala de grados de infección de la planta causado por *Pyricularia oryzae*

Grados	Síntomas
0	Ninguna lesión
1	Lesiones pardas pequeñas del tamaño de un alfiler o grandes sin centro esporulativo
2	Pequeñas lesiones redondeadas a ligeramente elongadas, manchas necróticas grises, cerca de 1-2 mm de diámetro con margen parduzco
3	Lesiones similares al grado 2, pero un número significativo de ellas están sobre las hojas superiores.
4	Lesiones típicamente susceptibles de 3 mm o más. Área foliar afectada 4%
5	Lesiones típicas. Área foliar afectada 5-10%
6	Lesiones típicas. Área foliar afectada 11-25%
7	Lesiones típicas. Área foliar afectada 26-50%
8	Lesiones típicas. Área foliar afectada 51-71%. Muchas hojas muertas
9	Más del 75% del área foliar afectada

Fuente: IRRI (1996)

Los datos obtenidos fueron promediados, luego sometidos al ANAVA y al test de Tukey al 5% utilizando el programa INFOSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en cuanto al tipo de lesión causado por el hongo con las diferentes concentraciones de conidios se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Promedio del tipo de lesión causado por *Magnaporthe oryzae* en hojas de las variedades Milan y Canindé 11 con las diferentes concentraciones de inóculo. Caacupé, Paraguay, 2015.

Concentración conidios/ml ⁻¹	Milan	Canindé 11
2,5.10 ⁴	1 a*	3,3 b
7,5.10 ⁴	1 a	3,3 b
1.10 ⁵	1 a	3,6 b

* Test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Independientemente de la concentración empleada, las variedades inoculadas se mostraron estadísticamente diferentes; siendo la concentración de 1.10⁵ conidios/ml⁻¹ en la variedad Canindé 11, la que presentó tipos de lesión de mayor grado. En cuanto al grado de infección por planta de acuerdo con la escala del IRRI (1996) los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Promedio de los grados de infección en la planta causados por *M. oryzae* con las diferentes dosis empleadas. Caacupé, Paraguay, 2015.

Concentración conidios/ml ⁻¹	Milan	Canindé 11
2,5.10 ⁴	1,33 a*	5,33 b
7,5.10 ⁴	1,67 a	7 b
1.10 ⁵	1,33 a	5,33 b

* Test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Al igual que con los tipos de lesión, las variedades se mostraron estadísticamente diferentes en cuanto al grado de infección de las plantas. Para ambas variedades, la concentración de 7,5.10⁴ conidios/ml⁻¹ presentó mayor grado de infección, sin embargo, no se encontró diferencia estadística significativa entre las concentraciones.

CONCLUSIÓN

Las variedades Milan y Canindé 11 se comportaron diferente (Resistente y susceptible), independientemente de la dosis empleada tanto para el tipo de lesión observado como para el grado de infección de las plantas, por lo tanto, se puede utilizar la dosis más baja (2,5.10⁴ conidios/ml⁻¹) para futuros ensayos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ IRRI. 1996. Standard evaluation system for rice. 4 ed. International Rice Research Institute. 17-19.
- _ Kohli, M.M., Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma and L. Cubilla. 2011. *Pyricularia* Blast- A threat to Wheat Cultivation. Czech. J. Genet. Plant Breed., 47: S130-S134. 2011(Special Issue).
- _ Valent, B; Farral, L; Chumley, F. 1991. *Magnaporthe oryzae* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127. P 87-101

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo*

Difference in the reaction to *Pyricularia oryzae* of wheat materials in the vegetative and reproductive stages

Alice Chávez, Cinthia Casal, Man Mohan Kohli

RESUMEN

La *Pyricularia* o brusone causada por *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch and L. M. Kohn (sin. *Pyricularia oryzae*), es actualmente considerada una de las más importantes enfermedades del trigo en Sudamérica, considerando las pocas fuentes de resistencia reportadas en el mundo. El objetivo del trabajo fue relacionar la resistencia a *Pyricularia oryzae* en hojas con la resistencia en espigas, en base a la inoculación de 61 materiales de trigo, pertenecientes al Programa Nacional de Trigo, del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria. Estos fueron seleccionados en base a su amplia variabilidad genética de progenitores para resistencia al patógeno. Las inoculaciones se realizaron en invernadero, cuando las plantas presentaban 4 hojas para el estadio vegetativo y en espigazón para el estadio reproductivo, utilizando una suspensión de 2.10^5 conidios/ml de un aislado del hongo seleccionado por su alta virulencia en ensayos previos. De los 61 materiales evaluados, solo cuatro presentaron resistencia tanto en hoja como en espiga, y tres fueron resistentes a nivel foliar y moderadamente resistentes en espigas, demostrando la estrechez en la base de germoplasma resistente para las infecciones de brusone en las espigas. En base al bajo número de líneas consideradas resistentes a *Pyricularia* en este estudio, se enfatiza la necesidad de ampliar resistencia genética en el germoplasma de trigo de manera urgente.

Palabras clave: *Pyricularia oryzae*, trigo

* Publicado en Revista Investigación Agraria 19(1) 56-63, 2017.

ABSTRACT

The wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch and L. M. Kohn (sin. *Pyricularia oryzae*), is considered one of the most important wheat diseases in South America. Considering the few sources of resistance reported in the world, the objective of this study was to relate the foliar resistance with spike resistance by inoculating 61 wheat materials belonging to the National Wheat Program of the Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, IPTA. These were artificially inoculated with a highly virulent fugal isolate in a greenhouse at four leaf and at heading stage using a suspension of 2.10^5 conidia/ ml. Of the materials evaluated only four were identified as resistant in leaf and in spike stages. Another three lines were resistant in the leaf stage but moderately resistant in spike stage. This demonstrates a narrow base of resistance in the germplasm for wheat blast infections in the spikes. On the basis of this study, several wheat lines considered resistant on the foliar basis are in fact susceptible for *Pyricularia* infection in the spike. This information emphasizes the need to expand the base of genetic resistance urgently.

Key words: *Pyricularia oryzae*, wheat blast

INTRODUCCIÓN

El cultivo de trigo en Paraguay ha logrado grandes avances en su producción durante la última década. Sin embargo, dicho logro está amenazado anualmente por diversas limitaciones incluyendo las epidemias de enfermedades. Una de estas, es conocida como pyricularia o brusone causado por *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch and L. M. Kohn (sin. *Pyricularia oryzae*). Este hongo presenta una amplia variabilidad patogénica (Zeigler et al. 1995), existen varias cepas, las cuales tienden a variar en grado de especificidad hospedera, y pueden ser divididas en patotipos en base a la preferencia de hospederos. Las cepas que comúnmente atacan al trigo en Sudamérica, han sido denominadas como *Magnaporthe oryzae Triticum* pathotype (MoT) (Valent et al. 2016; Cruz et al. 2016). Desde su primer reporte a nivel mundial en Brasil en 1985 (Iragashi et al. 1986), esta enfermedad ha causado varias epidemias en Brasil, Bolivia y Paraguay, siendo considerada la mayor amenaza a la producción de trigo en Sudamérica (Kohli et al. 2011). Recientemente la enfermedad ha sido reportada en Bangladesh causando epidemias devastadoras (Malaker et al. 2016) y es considerada como una amenaza potencial a la producción de trigo en los Estados Unidos (Cruz et al. 2016). Todo esto la convierte en una de las más importantes enfermedades del trigo en la actualidad.

En Paraguay, la primera epidemia de brusone fue observada en el año 2002, causando severas pérdidas a la producción nacional (Viedma y Morel 2002). Según Viedma (2010), las siembras tempranas (primera quincena de abril), tienen mayor posibilidad de ataque si se producen condiciones de alta temperatura y humedad en los meses de junio y julio. Mientras que, en años muy húmedos, con prevalencia del fenómeno El Niño, los ataques de *Pyricularia* pueden ocurrir independien-

temente de la fecha de siembra (Kohli et al., 2011). Actualmente son pocos los materiales que han sido reportados con altos niveles de resistencia: BR 18, Sausal CIAT, Paragua CIAT, Milan, CD 116 (Kohli et al. 2011; Fronza et al. 2016). Dichos materiales fuentes forman parte del programa nacional de mejoramiento. Sin embargo, poco se conoce acerca del comportamiento de los trigos nacionales y de las líneas derivadas del cruzamiento de las fuentes de resistencia mencionadas. Numerosas investigaciones, han sido realizadas, para identificar fuentes de resistencia y desarrollar estrategias de control que permitan reducir las pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Urashima et al. 2004; Arruda et al. 2005; Prestes et al. 2007). La mayoría de estas investigaciones fueron basadas en la infección foliar (Urashima y Kato 1994; Mehta et al. 2001; Urashima et al. 2004; Marangoni et al. 2013). Considerando que la enfermedad es más severa en el estadio reproductivo afectando a la espiga y los granos, este trabajo buscó relacionar la resistencia a la infección foliar con la resistencia en las espigas ya que se observan varias diferencias en la expresión de la resistencia a nivel de campo. Dependiendo de la validez de la infección foliar, se podría evaluar mayor cantidad de materiales en menor tiempo y ante una mayor cantidad de aislados del hongo. Esto permitiría ampliar la base de resistencia a *Pyricularia* en corto a mediano plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Hernando Bertoni del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), durante el año 2014. Sesenta y un líneas avanzadas y variedades de trigo, representando una gran diversidad genética del Programa de Investigación de Trigo del IPTA, fueron evaluadas bajo condiciones semi controladas (Tabla 1). El ensayo utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, tanto en la infección foliar como en las espigas, tomando una maceta con cuatro plantas como unidad experimental. La inoculación foliar se llevó a cabo en el estado de 4 hojas, y la de espigas, cuando las mismas se encontraban completamente fuera de la hoja bandera.

El aislado de *Pyricularia oryzae* empleado para las inoculaciones fue P13-009, proveniente de las colecciones de origen Capitán Miranda, Itapúa, durante el ciclo 2013. Este aislado fue conservado sobre papel de filtro estéril a -18°C (Aricapa y Correa 1994), repicado a placas de Petri con medio de cultivo de avena e incubado durante 12 días a 25°C con fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente el micelio fue aplastado con un triángulo de vidrio y las placas incubadas con luz constante por 72 horas para favorecer la esporulación (Marangoni et al. 2013). El conteo de conidios se realizó empleando un hematocitometro, y la concentración fue ajustada a 2.10^5 conidios ml^{-1} .

Tabla 1. Variedades y líneas de trigo utilizadas en el ensayo y su número de referencia. Caacupé, Paraguay, 2014.

N° de Referencia	Genotipos
1	ITAPUA 40
2	ITAPÚA 70
3	ITAPUA 80
4	CANINDE 3
5	CANINDE 11(Testigo susceptible)
6	CANINDE 12
7	CD 104
8	CD 150
9	CD 154
10	MILVUS1/ITAPUA 60
11	ITAPUA 45//TUI/RL 4137
12	E 97034/ITAPUA 45
13	IAN 8/CANINDE 3
14	ITAPUA 40/KURUKU
15	ALSEN/CANINDE 12
16	LE2331-I.D.ALBERTO
17	RDWG/MILAN//MURGA
18	ASTREB*2/NING MAI 9558
19	ASTREB*2/CBRD
20	ITAPUA 75/WEEBILL 2
21	PRL/2*PASTOR/4/CHOIX/STAR/3/HE1/3*CNO79//2*SERI
22	NOBEOKA BOZU PRECOZ/ITAPUA 50
23	ITAPUA 40/IAN 10
24	PARULA/CD 104
25	ITAPUA 70/4/BBX/LR42//BBX*2/3/TUKURU
26	SUZ6/OPATA
27	SAAR/3/PFAU/SERI.1B//AMAD/4/CD104
28	ITAPUA 75/PEWIT1
29	NING MAI 96035/FINSI//HEILO

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo

30	WUH1/VEE#5//CBRD/3/PASTOR/MUNIA/ALTAR 84/4/HEILO
31	PARAPETI CIAT
32	PSN/BOW//SERI/3/MILAN/4/ATTILA
33	PF 953048/IAPAR 18
34	GEN/PRL//CBRD
35	ORL 99192//E CARDENAL/CATBIRD'S'
36	E 97034/ORL 99220
37	E 97034/ORL 99220
38	E 97034/ORL 99220
39	NG8675/CBRD//SHA5/WEAVER
40	80456/YANGMAI 5//SHA5/WEAVER
41	BAU/MILAN//CBRD
42	80456/YANGMAI 5//SHA5/WEAVER/3/PRINIA
43	EMB16/CBRD//CBRD
44	NG8675/CBRD//MILAN/3/NG8675/CBRD
45	CHIBIA//PRLII/CM65531/3/SKAUZ/BAV92
46	BR 18
47	EMBRAPA 120
48	SAUSAL CIAT
49	PARAGUA CIAT//MILAN/MUNIA
50	PARAGUA CIAT//MILAN/MUNIA
51	PARAGUA CIAT//MILAN/MUNIA
52	MIRANTE
53	FRONTANA
54	CD 0983
55	CD 1077
56	CD 1078
57	CD 1152
58	CD 1180
59	MILAN (Testigo resistente)
60	ATTILA*2/PBW65*2//MURGA
61	BERKUT/EXCALIBUR

Las inoculaciones fueron realizadas asperjando las hojas y espigas con un aspersor común. Posterior a la aspersión las plantas fueron mantenidas en oscuridad por 24 horas en una sala climatizada con 80% de humedad y 28°C de temperatura. Posterior a esta incubación, las plantas fueron trasladadas a un invernadero con temperatura de $26 \pm 3^\circ\text{C}$.

Infección foliar. La evaluación foliar se realizó en la cuarta hoja de cada planta ocho días después de la inoculación. Para la evaluación de las lesiones foliares, fue adaptada la escala propuesta por Valent et al. (1991) (Fig. 1), de la siguiente manera para la toma de notas:

Figura 1. Escala utilizada para la evaluación de las infecciones causadas por *P. oryzae* en hojas de trigo adaptada de Valent et al. (1991) Caacupé, Paraguay, 2014.



0 = Sin infección

1 = Lesiones puntuales del tamaño de una cabeza da alfiler de color marrón

2= Lesiones elípticas o estriadas de 2 mm o más sin centro distinguible

3 = Lesiones redondeadas con borde oscuro y centro ceniza, en algunos casos con halo amarillo

4 = Lesiones típicas del brusone, elípticas con borde oscuro y centro ceniza

5= Grandes lesiones elípticas con centro gris oscuro

Las lesiones de tipo 0, 1 y 2; son consideradas de tipo resistente, debido a la ausencia de esporulación en las condiciones favorables y las lesiones de tipo 3, 4 y 5 son consideradas de tipo susceptible (Valent et al. 1991; Urashima et al. 2004). En base a la frecuencia del tipo de lesiones observadas en cada material, los mismos fueron clasificados de la siguiente manera:

Resistente (R): 100 % de las lesiones de tipo 0, 1 y 2

Moderadamente resistente (MR): Más del 50% de las lesiones de tipo 0, 1 y 2

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo

Moderadamente susceptible (MS): Más del 50% de las lesiones de tipo 3, 4 y 5

Susceptible (S): 100 % de las lesiones de tipo 3, 4 y 5

Infección en espigas: La evaluación se realizó 15 días después de la inoculación, para ello fue elaborada una escala considerando el porcentaje de la espiga necrosada, la misma se presenta en la figura 2.

Figura 2. Escala de severidad utilizada para la evaluación de la infección causada por *Pyricularia* en materiales de trigo. Caacupé, Paraguay, 2014.



0 = Sin infección

1 = Hasta el 10% de la espiga necrosada

2 = Hasta el 40% de la espiga necrosada

3 = Hasta el 60% de la espiga necrosada

4 = 100% de la espiga necrosada

Teniendo en cuenta la nota máxima alcanzada por cada material, los mismos se clasificaron en: resistentes, nota máxima 1; moderadamente resistentes, nota máxima 2; moderadamente susceptibles, nota máxima 3 y susceptibles, nota máxima 4. Los datos de ambas evaluaciones fueron sometidos al análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba de LSD de Fisher $\alpha = 0,05$ utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2015). El análisis de correlación de Pearson fue utilizado para establecer si existe una relación entre el comportamiento de los materiales en los dos estadios evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las inoculaciones controladas en el invernadero mostraron diferencias estadísticas significativas entre los materiales genéticos, sometidos a la inoculación foliar y en espigas. Para la infección foliar, 35 de los materiales evaluados fue-

ron clasificados como resistentes, 8 moderadamente resistentes, 10 moderadamente susceptibles y 8 susceptibles. Sin embargo, la evaluación de la infección en estado de espigazon resultó ser muy diferentes a aquella observada en la hoja. En este caso, solo cinco de los materiales genéticos fueron clasificados como resistentes, cuatro moderadamente resistentes, 13 moderadamente susceptibles y 39 susceptibles. Los datos presentados en las tablas 2, 3, 4 y 5 muestran la clasificación de los materiales basadas en ambas inoculaciones y su reacción a la inoculación foliar y en espiga.

Tabla 2. Variedades y líneas de trigo clasificados como resistentes a la infección foliar y su reacción a la infección en espigas. Caacupé, Paraguay, 2014.

N° de Referencia	Reacción en hoja			Reacción en espiga		
	χ_1^{**}	Media tipo de lesión		χ_2^{**}	Media severidad	
14	r	0,38	abc*	r	0	a*
9	r	0,5	abcd	r	0	a
45	r	1	cdef	r	0,25	a
30	r	0,25	abc	r	0,5	ab
59	r	0,31	abc	r	0,5	ab
26	r	0,25	abc	mr	1,75	cd
50	r	0,06	ab	mr	2	cde
31	r	0,31	abc	ms	2,5	def
29	r	0,75	abcde	ms	2,5	def
8	r	0	a	ms	3	fgh
36	r	0	a	ms	3	fgh
52	r	0	a	ms	3	fgh
58	r	0,06	ab	s	3,25	fghi
2	r	0,13	ab	s	3,25	fghi
37	r	0,19	abc	s	3,25	fghi
10	r	0	a	s	3,25	fghi
16	r	0	a	s	3,25	fghi
17	r	0	a	s	3,25	fghi
51	r	0	a	s	3,25	fghi
21	r	0,19	abc	s	3,5	ghi
32	r	0,25	abc	s	3,5	ghi
57	r	0,5	abcd	s	3,5	ghi
46	r	0	a	s	3,5	ghi
19	r	0,19	abc	s	3,75	hi
24	r	0,31	abc	s	3,75	hi

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo

15	r	0,38	abc	s	3,75	hi
58	r	0,56	abcd	s	3,75	hi
1	r	0	a	s	3,75	hi
39	r	0	a	s	3,75	hi
54	r	0	a	s	3,75	hi
7	r	0	a	s	4	i
12	r	0	a	s	4	i
22	r	0	a	s	4	i
11	r	0,13	ab	s	4	i
18	r	0,19	abc	s	4	i

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test: LSD Fisher Alfa=0,05

X₁: Clasificación según Tipo de lesión en hoja

X₂: Clasificación según severidad en espiga

** r = resistente; mr = moderadamente resistente; s = susceptible; ms = moderadamente susceptible

De los 35 materiales clasificados como resistentes a la infección foliar, solo 5 resultaron ser resistentes y uno moderadamente resistente en el estadio de espiga (Tabla 2). Ninguno de los materiales tipificados como moderadamente resistentes en la infección foliar mantuvo su resistencia en la espiga (Tabla 3). De todos los materiales clasificados como moderadamente susceptibles o susceptibles, a la infección foliar, solo dos, uno en cada categoría, fueron clasificados como moderadamente resistentes a la infección en espiga (Tablas 4 y 5).

Tabla 3. Variedades y líneas de trigo clasificados como moderadamente resistentes a la infección foliar y su reacción a la infección en espigas. Caacupé, Paraguay, 2014.

N° de Referencia	Reacción en hoja			Reacción en espiga		
	X ₁ **	Media tipo de lesión		X ₂ **	Media severidad	
25	mr	0,63	abcd	ms	2,75	efg
27	mr	0,94	bcde	ms	2,75	efg
55	mr	0,63	abcd	ms	3	fgh
53	mr	1,88	fgh	ms	3	fgh
28	mr	0,88	abcde	s	3,25	fghi
34	mr	1,63	efg	s	3,5	ghi
13	mr	0,69	abcd	s	3,5	ghi
56	mr	0,81	abcde	s	3,75	hi

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test: LSD Fisher Alfa=0,05

X₁: Clasificación según Tipo de lesión en hoja

X₂: Clasificación según severidad en espiga

** mr = moderadamente resistente; s = susceptible; ms = moderadamente susceptible

Tabla 4. Variedades y líneas de trigo clasificados como moderadamente susceptibles a la infección foliar y su reacción a la infección en espigas. Caacupé, Paraguay, 2014.

N° de Referencia	Reacción en hoja			Reacción en espiga		
	X_1^{**}	Media tipo de lesión		X_2^{**}	Media severidad	
48	ms	2,75	hij	mr	2	cde
23	ms	2,38	ghi	ms	3	fgh
47	ms	2,88	ij	ms	3	fgh
41	ms	3,5	jk	ms	3	fgh
40	ms	2,88	ij	s	3,25	fghi
42	ms	3,56	jk	s	3,25	fghi
35	ms	2,94	ij	s	3,5	ghi
61	ms	2,94	ij	s	4	i
20	ms	1,31	def	s	4	i
3	ms	3,44	jk	s	4	i

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test:LSD Fisher Alfa=0,05

X_1 : Clasificación según Tipo de lesión en hoja

X_2 : Clasificación según severidad en espiga

** mr = moderadamente resistente; s = susceptible; ms = moderadamente susceptible

Tabla 5. Variedades y líneas de trigo clasificados como susceptibles a la infección foliar y su reacción a la infección en espigas. Caacupé, Paraguay, 2014.

N° de Referencia	Reacción en hoja			Reacción en espiga		
	X_1^{**}	Media tipo de lesión		X_2^{**}	Media severidad	
60	s	4,19	klm	mr	1,25	bc
43	s	4	kl	ms	2,5	def
6	s	5	m	s	3,5	ghi
4	s	4,14	klm	s	3,75	hi
5	s	4,69	lm	s	3,75	hi
49	s	3,88	kl	s	3,75	hi
38	s	3,5	jk	s	4	i
44	s	4,13	klm	s	4	i

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test:LSD Fisher Alfa=0,05

X_1 : Clasificación según Tipo de lesión en hoja

X_2 : Clasificación según severidad en espiga

** mr = moderadamente resistente; s = susceptible; ms = moderadamente susceptible

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo

Considerando ambas infecciones, los materiales que presentaron resistencia tanto a nivel foliar como en la espiga fueron los genotipos de referencia N° 9, 14, 30, 45 y 59. De entre estos materiales, sólo la línea N° 59 (Milan) es mencionada como fuente de resistencia por Kohli et al. (2011). Estos autores también señalan a Paragua CIAT y Parapeti CIAT como resistentes, y BR 18, IAPAR 85 y CD 113 como moderadamente resistentes. Sin embargo, en el presente estudio BR 18 y Parapeti CIAT fueron clasificados como resistentes a nivel foliar, pero susceptible y moderadamente susceptibles en las espigas. Arruda et al. (2005) observaron resultados similares en BR 18, la cual, a pesar de su susceptibilidad en Paraguay, sigue siendo considerada como línea de moderada a alta resistencia por los investigadores en Brasil (Prestes et al. 2007; Storani 2013; Fronza et al. 2016). Entre las líneas avanzadas descendientes de Paragua CIAT y Milan, desarrolladas por el Programa Nacional de Trigo en Paraguay (Ref. 49, 50 y 51), solo la N° 50 (PARAGUA CIAT//MILAN/MUNIA), presentó resistencia a la inoculación foliar y moderada resistencia en espigas. Este hecho puede indicar la complejidad en el manejo de las fuentes de resistencia genética solo en base a las observaciones del campo y la dificultad para combinarlas con el objetivo de mejorar los niveles de resistencia. La frecuencia de reacción a la infección foliar y en espiga de los genotipos evaluados en este estudio, es presentada en la Tabla 6. Los resultados demuestran que, de los 35 materiales resistentes a la infección foliar, 28 mostraron susceptibilidad en las espigas, y solo 7 de los 61 materiales estudiados se comportaron entre moderadamente resistentes y resistentes a ambas infecciones.

Tabla 6. Frecuencia de reacción de los 61 genotipos de trigo a la infección foliar y en espiga. Caacupé, Paraguay, 2014.

		Reacción en hoja				Total
		R	MR	MS	S	
Reacción en espiga	R	5	0	0	0	5
	MR	2	0	1	1	4
	MS	5	4	3	1	13
	S	23	4	6	6	39
Total		35	8	10	8	61

R = Resistente; MR = Moderadamente resistente; S = Susceptible; MS = Moderadamente susceptible

Estos resultados confirman la falta de relación entre las infecciones foliares y en espiga (Pearson Coef.: 0,10618/ $p=0,61346$). Las observaciones de Arruda et al. (2005) que clasifican solo 3 de los 15 materiales resistentes en estadio foliar a susceptible en espiga es un bajo indicativo del problema en evaluación del germoplasma en hojas. En este estudio, de los 35 materiales considerados resistentes en la hoja, la mayoría (28) fue encontrada susceptible o moderadamente susceptible en estado de la espiga. Esta contundencia de resultados confirma, en general, la falta de relación entre las reacciones de *Pyricularia* en la hoja con aquellos en la espiga. Estos resultados realzan las observaciones empíricas de campo, donde identificar materiales resistentes a *Pyricularia* en estado de espiga ha sido una tarea difícil hasta ahora. Considerando la alta coincidencia de la susceptibilidad en la hoja con susceptibilidad en la espiga, la reacción en la hoja puede servir para descartar los materiales susceptibles y así, limitar los estudios de la espiga solo sobre aquellos materiales con reacciones MS, MR y R en la hoja. Esto permitiría evaluar materiales con mayor probabilidad de presentar resistencia en espigas e introducir nuevas fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento.

En base al bajo número de líneas consideradas resistentes a *Pyricularia* en este estudio, se enfatiza la necesidad de ampliar resistencia genética en el germoplasma de trigo de manera urgente.

Finalmente cabe señalar que los datos reportados aquí provienen de las inoculaciones con un solo aislado del hongo, considerado virulento en condiciones controladas y en campo. Es posible que los materiales identificados resistentes en este estudio, tengan una reacción diferenciada con otros aislados del patógeno y en el campo, dependiendo del complejo patogénico y las condiciones ambientales de la localidad.

CONCLUSIÓN

Este estudio encuentra que la resistencia foliar al brusone no es representativo de la resistencia en las espigas. Sin embargo, la susceptibilidad foliar, en general, es indicador de la susceptibilidad en la espiga. Los resultados logrados en base a un gran número de materiales genéticos utilizados por el Programa Nacional de Mejoramiento de Trigo en Paraguay demuestran la estrechez del germoplasma resistente a las infecciones de brusone en la espiga, que representa una limitación seria. Se sugiere ampliar la búsqueda de germoplasma resistente y su incorporación en el programa de manera urgente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ Aricapa, MG; Correa, F. 1994. Integración de Fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia estable al añublo del arroz (*Pyricularia grisea*). Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.
- _ Arruda, MA; Bueno, CRN; Zamprogno, KC; Lavorenti, NA; Urashima, AS. 2005. Reação do trigo a *Magnaporthe oryzae* nos diferentes estádios de desenvolvimento. Fitopatologia Brasileira 30(2). 121-126.

Diferencia en la reacción a *Pyricularia oryzae* de materiales de trigo en los estadios vegetativo y reproductivo

- Cruz, CD; Peterson, GL; Bockus, WW; Kankanala, P; Dubkovsky, J; Jordan, KW; Akhunov, E; Chumley, F; Baldeolmar, FD; Valent, B. 2016. The 2NS translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the Triticum pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Science* v 56. 990-1000.
- Di Rienzo, J; Balzarini, M; Gonzalez, L; Casanoves, F; Tablada, M; Robledo, CW. 2015. INFOS-TAT. Software estadístico Versión 2015. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fronza, V; Moresco, ER; Maciel, JLN; Silva, MS; Scheeren, PL; Soares Sobrinho, J. 2016. Reaction of brazilian wheat cultivar to wheat blast en the Cerrado región. In: Madeiros Del Ponte, E; Bergstrom, G; Pavan, W; Lazzaretti, A; Cunha Fernandes, JM. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Igarashi, S; Utiyama, CM; Igarashi, LC; Kazuma, AH; Lopes, RS. 1896. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 11:351- 352.
- Kohli, M.M., Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma and L. Cubilla. 2011. Pyricularia Blast- A threat to Wheat Cultivation. *Czech. J. Genet. Plant Breed.*, 47: S130-S134. 2011 (Special Issue).
- Malaker, PK; Reza, MMA; Hakim, MA; Barma, NCD; Mannaf, MA; Khaleque, MA; Islam, R; Tiwari, TP; Duveiller, E. 2016. Occurrence of wheat blast in Bangladesh. In: Madeiros Del Ponte, E; Bergstrom, G; Pavan, W; Lazzaretti, A; Cunha Fernandes, JM. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Marangoni, MS; Nunes, MP; Fonseca, N; Mehta, Y. 2013. Pyricularia blast on White oats- a new threat to wheat cultivation. *Tropical plant pathology* 38(3). 198-202.
- Mehta, YR; Arias, CA; Toledo, JF. 2001. Inheritance of resistance to *Magnaporthe grisea* in wheat. *Summa Phytopathologica* v 2. 300-304
- Prestes, AM; Arendt, PF; Fernandez, JMC; Scheeren, PL. 2007. Resistance to *Magnaporthe grisea* among Brazilian genotypes. In Buck, HT; Nisi, JE; Salomon, N. *Wheat production in stressed environments*. Springer. 119-123.
- Storani, W. 2013. Influencia do periodo de molhamento, temperatura e concentração de inoculo de *Pyricularia grisea* na ocorrência da brusone em plântulas de trigo. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal de São Carlos. 65 p.
- Urashima, A; Kato, H. 1994. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Grupo Paulista de Fitopatologia*. 20(2) 107-112.
- Urashima, A; Lavorent, N; Goulart, A; Metha, Y. 2004. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 29:511-518.
- Valent, B; Farral, L; Chumley, F. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics* 127. P 87-101
- Valent, B; Cruz, CD; Peterson, G; Bockus, WW; Farman, M; Pedley, K; Whitley, R; Navia-Urrutia, M; Trick, HN; Maciel, JLN; Oliveira-Garcia, E; Stack, J. 2016. Wheat blast: Biology, genetics and genomics. In: Madeiros Del Ponte, E; Bergstrom, G; Pavan, W; Lazzaretti, A; Cunha Fernandes, JM. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Viedma, LQ; Morel, W. 2002. Añublo o Pyricularia del Trigo. *Díptico. MAG/DIA/CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.*
- Viedma, LQ. 2010. Manejo integrado de mancha amarilla y la Pyricularia en el cultivo de trigo en Paraguay. In: Kohli, M; Cubilla, LE; Cabrera, G. *Tercer seminario nacional de trigo “Del grano al Pan”*. Asunción, PY. CAPECO, INBIO. 168 p.
- Zeigler, RS; Cuc, LX; Scott, RP; Bernardo, MA; Chen, DH; Valent, B; Nelson, R. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85:443-451.

Inoculación a campo de *Pyricularia oryzae* en genotipos de trigo*

Field inoculation of wheat genotypes with *Pyricularia oryzae*

Alice Rocío Chávez, Cinthia Carolina Cazal Martinez,
Nathalia Sarahi Bobadilla, Man Mohan Kohli

RESUMEN

El brusone del trigo causado por *Pyricularia oryzae* *Triticum* patotype, es uno de los más serios problemas para la producción de trigo en Sudamérica; se ha observado que el comportamiento de las variedades no siempre es el mismo en pruebas de invernadero y a campo, por lo cual el trabajo buscó evaluar la eficiencia de un método de inoculación a campo que permita evaluar de manera sencilla la mayor cantidad de materiales. Se sembraron 25 genotipos en dos surcos de un metro a 20 cm, cuando el 50% de las espigas se encontraban fuera de la hoja bandera, 10 espigas/surco fueron asperjadas con una suspensión de 5.10^{-4} conidios/ml⁻¹ e inmediatamente se cubrieron los surcos con unas cajas de madera forradas con plástico, para mantener la humedad por aproximadamente 16 horas, luego las mismas se retiraron. La evaluación se realizó 15 días luego de la inoculación, utilizando una escala de 0-4; se consideraron 5 espigas como una repetición, teniendo así 4 repeticiones por material. Se observó que 15 genotipos fueron susceptibles, uno moderadamente susceptible, uno moderadamente resistente y 8 resistentes. Se concluye que el método empleado favorece la infección, y puede ser utilizado como complemento de los trabajos de selección en invernadero.

ABSTRACT

The wheat blast disease caused by *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum*, is one of the most serious problems for the production in South America. Differential reaction to the disease has been observed in greenhouse and field conditions resulting in inconsistent information and the utilization of resistant progenitors in the germplasm development program. The present study was conducted to evaluate the efficiency of a field inoculation to score large number of breeding lines and varieties. 25 genotypes were planted in two rows of one meter and 20 cm apart. At heading stage (50% of

* Presentado en el XIX Congreso Internacional y XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, 2017.

spikes outside the flag leaf), 10 spikes/row were sprinkled with a suspension of 5.10^{-4} conidia/ml⁻¹. Subsequently, the rows were covered with a plastic-covered wooden box to keep the humidity for approximately 16 hours and later removed. The disease was scored 15 days after the inoculation, using a 0-4 scale. Each replication constituted of five spikes, resulting in four replications per variety. Statistical analysis of the resulting data showed 15 genotypes as susceptible, one genotype as moderately susceptible, one genotype as moderately resistant and 8 genotypes as resistant. In conclusion, we believe that the procedure followed to create wheat blast infection under field conditions was successful to screen large number of breeding lines and can complement controlled greenhouse infections to identify resistant germplasm.

ANTECEDENTES

El brusone del trigo causado por *Pyricularia oryzae* *Triticum* patotype, cuyo principal síntoma son espigas con la porción superior al punto de infección blanca y la inferior verde, es uno de los más serios problemas para la producción de trigo en Sudamérica, con pérdidas que varían del 5-60%; se ha observado que el comportamiento de las variedades no siempre es el mismo en pruebas de invernadero y a campo, por lo cual el trabajo buscó evaluar la eficiencia de un método de inoculación a campo que permita evaluar de manera sencilla la mayor cantidad de materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el Centro de Investigación Hernando Bertoni, IPTA, Caacupé; se sembraron 25 genotipos de trigo en dos surcos de un metro a 20 cm, cuando el 50% de las espigas se encontraban fuera de la hoja bandera, 10 espigas/surco fueron asperjadas con una suspensión de 5.10^{-4} conidios/ml⁻¹ e inmediatamente se cubrieron los surcos con unas cajas de madera forradas con plástico (Fig. 1), para mantener la humedad por aproximadamente 16 horas, luego las mismas se retiraron. Se consideraron 5 espigas como una repetición, teniendo así 4 repeticiones por material.

Figura 1. Cajas utilizadas para cubrir las plantas en el campo y mantener la humedad para favorecer la infección. Caacupé, Paraguay, 2017.



La evaluación se realizó 15 días luego de la inoculación, adaptando la escala propuesta por Tagle et al. (2014) como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Tipos de lesión causados por *Pyricularia oryzae* en espigas de trigo.



0 = Sin infección; 1 = Lesiones pequeñas, < 1,5 mm; 2 = Lesiones de tamaño intermedio, < 3 mm; 3 = Mezcla de glumas verdes y blancas, sin necrosis aparente, causado por una reacción de hipersensibilidad; 4 = Espiga completamente necrosada.

Los materiales fueron clasificados de acuerdo al tipo de lesión de la siguiente manera: (0-1) Resistente, (2) Moderadamente resistente, (3) Moderadamente susceptible y (4) Susceptible.

RESULTADOS

Los resultados de las inoculaciones se presentan en la tabla 1. Se observó que 15 genotipos fueron susceptibles, uno moderadamente susceptible, uno moderadamente resistente y 8 resistentes.

Tabla 1. Media de infección y clasificación de los genotipos inoculados. Caacupé, Paraguay, 2017.

Genotipo	Infección	Clasificación
Itapúa 75	4	S
REG-16-3	1	R
REG-16-4	4	S
REG-16-5	4	S
REG-16-7	0	R
REG-16-8	0	R

Inoculación a campo de *Pyricularia oryzae* en genotipos de trigo

REG-16-9	1	R
REG-16-10	4	S
REG-16-11	3	MS
REG-16-12	4	S
REG-16-13	4	S
REG-16-14	4	S
Itapúa 80	4	S
REG-16-16	4	S
REG-16-17	1	R
REG-16-19	4	S
REG-16-20	4	S
REG-16-21	2	MR
REG-16-22	4	S
REG-16-23	4	S
REG-16-24	4	S
REG-16-25	1	R
REG-16-26	0	R
REG-16-27	4	S
REG-16-28	0	R

La identidad de las líneas resistentes y moderadamente resistentes se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Identidad de las líneas resistentes y moderadamente resistentes a *Pyricularia oryzae* en inoculación a campo. Caacupé, Paraguay, 2017.

Ent	Codigo	Cruza	Historia de selección	Reacción
3	E-10303	MURGA/KRONSTAD F2004	CMSS06Y00124S-0B-099Y-099ZTM-099Y-099M-9RGY-0B	1
7	E14979	KACHU*2/3/ ND643//2*PRL/2*PASTOR	CMSS08B00712T-099TOPY-099M-099NJ-099NJ-14RGY-0B	0
8	E-09250	Caninde 21	CP6045-0E-3E-14E-0E	0
9	E-10132	E- 2044/Cord 3	CP6880-3E-0E	1
17	E12341	ONIX/KBIRD	CMSS07Y00419S-0B-099Y-099M-099Y-1RGY-0B	1
21	E14977	MUTUS//ND643/2*WBLL1	CMSS08Y00224S-099Y-099M-099NJ-099NJ-4RGY-0B	2
25	E13334	WEEBILL2//MILAN/AMSEL	CP6806-1E-1E--0E-12E--0E	1
26	Y10339	ITAPUA 70// ND643/2*WBILL1	CP08108-4Yj-2Yj-0Yj	0
28	Y14042	CANINDE 3/Prointa Granar	CP08058-2Yj-1Yj-8Yj-0Yj	0

CONCLUSIÓN

Se concluye que el método empleado favorece la infección, y puede ser utilizado como complemento de los trabajos de selección en invernadero, permitiendo descartar los genotipos susceptibles a campo, llevando a pruebas de invernadero solo aquellos con comportamiento resistente para confirmar su resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kohli, M.M., Y.R. Mehta, E. Guzman, L. de Viedma and L. Cubilla. 2011. Pyricularia Blast- A threat to Wheat Cultivation. Czech. J. Genet. Plant Breed., 47: S130-S134. 2011 (Special Issue).
- Viedma, LQ; Morel, W. 2002. Añublo o Pyricularia del Trigo. Díptico. MAG/DIA/ CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.
- Tagle, AG; Chuma I; Tosa, Y. 2014. Rmg7, a new gene for resistance to Triticum isolates of Pyricularia oryzae identified in tetraploid wheat. Genetics and resistance. V 105(4) 495-499.

Eficiencia de fungicidas en el control de *Pyricularia oryzae* en semillas de trigo in vitro*

Efficiency of fungicides in vitro to control *Pyricularia oryzae* in wheat seed

Alice Rocío Chávez y Man Mohan Kohli

RESUMEN

El tratamiento de semillas con fungicidas se realiza para reducir al mínimo posible los niveles de transmisión de patógenos. Este trabajo buscó evaluar la eficiencia de los fungicidas actualmente utilizados a nivel de campo para el control de *P. oryzae*, en semillas de trigo. Fueron evaluados los fungicidas Azoxystrobin + Ciproconazole, Tebuconazole, Trifloxystrobin + Ciproconazole y Piraclostrobin + Epoxiconazole. Se sembraron en placas de Petri semillas inoculadas con una suspensión del hongo, y posteriormente tratadas con los fungicidas. Se evaluó el número de semillas infectadas, expresando el número total de semillas infectadas por repetición en porcentaje. Los datos obtenidos fueron sometidos al test de Tukey al 5%. Se observó que los fungicidas Tebuconazole y Piraclostrobin + Epoxiconazole en la dosis de 750 cc/ha y 1000 cc/ha respectivamente fueron capaces de eliminar la infección de *Pyricularia oryzae* en las semillas de trigo.

ABSTRACT

Treatment of seeds with fungicides is a common practice to reduce seed infection as well as levels of pathogen transmission to a minimum. The present study was conducted to evaluate the efficiency of the currently available fungicides to control of *P. oryzae* in wheat seeds. The following fungicides: Azoxystrobin + Ciproconazole, Tebuconazole, Trifloxystrobin + Ciproconazole and Piraclostrobin + Epoxiconazole, were evaluated. Wheat seeds were inoculated with a suspension of the fungus *P. oryzae* in petri dish, and subsequently treated with fungicides. The number of infected seeds was evaluated and expressed as percent over the total number of seeds infected per replication. The data were subjected to analysis of variance

* Presentado en el Sexto Seminario Nacional de Trigo “Del grano al pan”, 2015.

and comparison of means with the Tuckey test $\alpha = 0.05$, by means of the InfoStat program. Our result show that the fungicides, Tebuconazole and Piraclostrobin + Epoxiconazole, in the doses of 750 cc/ ha and 1000 cc/ha respectively, were able to eliminate *Pyricularia oryzae* seed infection significantly.

INTRODUCCIÓN

El brusone del trigo, causado por *Pyricularia oryzae* es una enfermedad cuyo principal daño es la disminución del rendimiento y pérdida de calidad del grano. Este patógeno puede sobrevivir en semillas, siendo las mismas uno de los mecanismos de transmisión e introducción del patógeno en una región. El tratamiento de semillas con fungicidas se realiza para reducir al mínimo posible los niveles de transmisión de patógenos, la eficiencia de este método para el control de *P. oryzae* ya fue observada por Goulart y Paiva (1996), sin embargo, con la aparición de nuevos productos químicos, es necesario realizar ensayos para comprobar la eficiencia de dichos productos. El objetivo del trabajo fue evaluar la eficiencia de los fungicidas actualmente utilizados a nivel de campo para el control de *P. oryzae*, en semillas de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones, la unidad experimental fueron dos placas de Petri con 50 semillas de trigo cada una, teniendo en total 100 semillas por repetición y 300 semillas por tratamiento. Los tratamientos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el experimento. Caacupé, Paraguay, 2015.

Tratamiento	Principio activo	Nombre comercial	Dosis
1	Azoxystrobin + Ciproconazole	Genesis Duo	325 cc ha ⁻¹
2	Tebuconazole	Tricur	750 cc ha ⁻¹
3	Trifloxystrobin + Ciproconazole	Sphere Max	150 cc ha ⁻¹
4	Piraclostrobin + Epoxiconazole	Opera	1000 cc ha ⁻¹
5	Testigo (Suspensión de <i>Pyricularia</i>)		

Para la preparación del inóculo se rasparon 4 placas de Petri con cultivo puro de hongo, junto con 10 ml de agua destilada estéril en cada una, posteriormente la suspensión se agitó por 10 minutos en un agitador, luego se procedió al conteo de conidios empleando la cámara de Neubauer, se ajustó la concentración de conidios a 1.10^6 ml⁻¹. La infección de las semillas se realizó adaptando la metodología propuesta por Orrego et al. (2009) para lo cual, se colocaron las semillas en vasos de

plástico, luego a cada vaso se le agregó 5 ml de la suspensión de conidios y se agitó por 10 minutos. Posteriormente las semillas se dejaron secar sobre papel absorbente por 24 horas. Los fungicidas se prepararon a razón de un litro, de acuerdo con las dosis indicadas en la Tabla 1, teniendo en cuenta un volumen de caldo 600 litros ha⁻¹. Luego a cada grupo de semillas se le añadió 5 ml de la suspensión de fungicida y se agitó por 10 minutos. Posteriormente se dejó secar por 2 horas. Una vez secas las semillas, se procedió a la siembra de las mismas en placas de Petri con medio de cultivo PDA, a razón de 50 semillas por placa. Estas placas fueron incubadas por 5 días a 25°C. Para la evaluación se tuvo en cuenta el número de semillas infectadas en cada placa, expresando el número total de semillas infectadas por repetición en porcentaje. Los datos obtenidos fueron sometidos al test de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los fungicidas Tebuconazole y Piraclostrobin + Epoxiconazole, representaron los tratamientos que controlaron la infección de *Pyricularia oryzae* en semilla por completo, no habiendo diferencias estadísticas entre los mismos (Tabla 2). De igual manera no se hallaron diferencias significativas entre las mezclas de Azoxystrobin + Ciproconazole y Trifloxystrobin + Ciproconazole y ambos tratamientos presentaron un nivel bajo de infección.

Tabla 2. Porcentaje de infección de los tratamientos. Caacupé, Paraguay, 2015.

Tratamiento	% de infección
Tebuconazole	0 a
Piraclostrobin + Epoxiconazole	0 a
Trifloxystrobin + Ciproconazole	9,6 b
Azoxystrobin + Ciproconazole	14 b
Testigo (Suspensión de <i>Pyricularia</i>)	100 c

Test de Tukey 5%. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes $p > 0,05$ CV = 13,57

Teniendo en cuenta la finalidad del tratamiento de semillas, los fungicidas Tebuconazole y Piraclostrobin + Epoxiconazole serán recomendables para eliminar la infección de *Pyricularia oryzae* ya que lograron a reducir totalmente la presencia del patógeno en semillas de trigo.

CONCLUSIÓN

Los fungicidas Tebuconazole y Piraclostrobin + Epoxiconazole en la dosis de 750 cc/ha y 1000 cc/ha respectivamente fueron capaces de eliminar la infección de *Pyricularia oryzae* en las semillas de trigo. Considerando el alto nivel de infección de la enfermedad en los campos comerciales de semilla durante 2014 y 2015, será recomendable usar estos fungicidas para lograr la limpieza de la semilla para el próximo ciclo del cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _ Goulart, A; Paiva, F. 1996. Efeito do tratamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) com fungicidas para controle de *Helminthosporium sativum* e *Pyricularia oryzae*. *Ciencia e Agrotecnologia*, 20(1) 25-30.
- _ Orrego, A; Grabowski, C; Rodriguez, H; Soilan, L. 2009. Eficiencia de fungicidas para el control de *Macrophomina phaseolina* en semillas de soja, en condiciones in vitro. In: Orrego, A. *Macrophomina phaseolina*. Hongo causante de la pudrición carbonosa del tallo. INBIO, FCA, UNA. 109 p.

Comparación de eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de *Magnaporthe* sp. y su uso con marcadores moleculares

Comparative efficiency of two genomic DNA extraction protocols of *Magnaporthe* sp. and their use in molecular marker studies

Cinthia Carolina Cazal Martínez^(*), Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga⁽²⁾, Juliana Moura Mendes⁽²⁾, Yessica Magalíz Reyes Caballero⁽¹⁾, Alice Rocio Chávez⁽¹⁾ y Man Mohan Kohli⁽¹⁾

RESUMEN

El experimento tuvo por objetivo comparar la eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de *Magnaporthe* sp. y su uso con marcadores moleculares. Fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción. Se utilizaron diez aislados monospóricos de hongos fitopatógenos, provenientes del Cepario de *Pyricularia* del Centro de Investigación Hernando Bertóni dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agrícola. Para ambos protocolos se realizaron extracciones por triplicado, conteniendo 100 mg de micelio cada uno. Los métodos evaluados fueron el de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) 2% con modificaciones y SDS (Sodio dodecil sulfato) 3%. Las variables evaluadas fueron: Concentración de ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por LSD Fisher Alfa=0,05. Para verificar la factibilidad del producto de ambas extracciones de ADN para sus usos con marcadores moleculares se realizó una PCR (*Polymerase chain reaction*), con el ADN de dos cepas (c01-c09) obtenidos con ambos métodos

⁽¹⁾Cámara Paraguaya de Exportadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO).

⁽²⁾Centro Multidisciplinario de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-UNA).

^(*)cccazalm86@gmail.com

de extracción, con un marcador MG_47. La concentración de ADN presentó diferencias significativas entre los protocolos evaluados, dando 2064,16 ng.µL⁻¹ por el método de CTAB y 743,07 ng.µL⁻¹ para el método de SDS. Las relaciones de pureza, no mostraron diferencias significativas. Se obtuvo productos de amplificación para ambos métodos. Se concluye diciendo que, si bien por el método de CTAB se obtuvo mayor cantidad de ADN, la pureza y la obtención de productos de amplificación, hacen eficientes a ambos métodos para el uso con marcadores moleculares.

Palabras clave: *Magnaporthe sp.* CTAB, marcadores moleculares, SDS.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the efficiency of two genomic DNA extraction protocols for *Magnaporthe sp.* and their use with molecular markers. The experiment was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Multi-disciplinary Technological Research Center of the National University of Asunción. Ten monospore fungal isolates from the *Pyricularia* Collection, maintained at Hernando Bertoni Research Center of the Paraguayan Institute of Agricultural Technology (IPTA), were used in the study. For each protocol, extractions were carried from 100 mg of mycelium per sample in three replications. The two extraction methods evaluated were: CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 2% with modifications and SDS (Sodium dodecyl sulfate) 3%. The variables evaluated were: DNA concentration (ng.µL⁻¹), absorbance ratios 260/280 and 260/230. The data were subjected to analysis of variance and comparison of means with LSD Fisher Alfa=0,05. To verify the quality of the product of each DNA extractions for its use in molecular marker study, a PCR (Polymerase chain reaction) was performed, with the DNA of two strains (c01-c09) obtained from each extraction method using a MG_47 molecular marker. The DNA concentration showed significant differences between the two protocols, giving 2064.16 ng.µL⁻¹ by the CTAB method and 743.07 ng.µL⁻¹ for the SDS method. The purity relationships did not show significant differences. Amplification products were obtained for each method. Our study shows that in spite of larger amount of DNA obtained with the CTAB method, the purity and quality of amplification products make both methods efficient for use with molecular markers.

Key words: *Magnaporthe sp.* CTAB, molecular markers, SDS.

INTRODUCCIÓN

La primera estrategia para iniciar un análisis molecular es identificar la eficiencia de los protocolos de extracción de ADN genómico según la especie con la cual se va a trabajar. La obtención de ADN genómico de buena calidad y en cantidad, es de mucha importancia para el uso de marcadores moleculares, por lo que el protocolo debe tener en cuenta ciertos criterios según el material a ser utilizado, como el tipo de membrana celular a ser degradada para liberar el ADN, prever acciones

de DNAsas que pueden degradar el ADN, acciones de compuestos fenólicos y polisacáridos (Lombardo et al. 2012).

Un método muy utilizado para la extracción del ADN genómico en especies fúngicas es el de Dellaporta et al. (1983) que utiliza al detergente aniónico SDS (Sodio dodecil sulfato) para solubilizar proteínas, tejidos y membranas. Otro protocolo utilizado para una gran gama de especies es el CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), un detergente catiónico que cumple la función de solubilizar polisacáridos Doyle y Doyle (1987), éste último es el utilizado con mayor frecuencia en especies de plantas, pero en base a ciertas modificaciones ha sido adaptado para utilizarlos para la extracción de ADN genómico de hongos (Van Burik et al. 1998).

Magnaporthe sp. es un fitopatógeno con un amplio rango de hospederos según especies. La gran mayoría de los aislados de la gramínea *Digitaria* pertenecen a la especie *M. grisea* y especies aisladas a partir de gramíneas como *Setaria*, *Panicum*, *Lolium*, *Triticum*, *Oryza* entre otras se agruparon en *M. oryza* (Couch y Kohn 2002, Bussaban et al. 2005, Choi et al. 2013). Por ello la gama de huéspedes no se puede utilizar como criterio taxonómico sin tener en cuenta los patotipos (Klaubauf et al. 2014).

Magnaporthe oryzae (*Triticum pathotype*) (MoT) es el organismo causal de la enfermedad conocida como *Bruzone* del Trigo (Portugués) o *Wheat blast* (inglés) (Cruz et al. 2016). Dicho patógeno ha causado importantes pérdidas en el rendimiento de trigo nacional desde su primera epidemia reportada en el 2002 (Quintana de Viedma 2010).

Con el fin de identificar la variabilidad genética de éste patógeno, se han realizado diferentes estudios con marcadores moleculares, utilizados en aislados provenientes de trigo y de una gama amplia de hospederos alternativos (Urashima et al. 2004, Couch et al. 2005, Cruz et al. 2009, Pereira et al. 2014, Pieck et al. 2016).

De modo a poder realizar estudios de variabilidad genética utilizando marcadores moleculares se ha fijado el objetivo de este trabajo que fue comparar la eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de *Magnaporthe* sp. y su uso con marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Dirección General del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (DGCEMIT-UNA).

Se utilizaron 10 aislados monospóricos del hongo fitopatógeno *Magnaporthe* sp., provenientes del Cepario de *Pycularia* del Centro de Investigación Hernando Bertóni (CIHB) dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agrícola (IPTA). Los micelios fueron pesados, congelados con nitrógeno líquido y conservados a -80 °C para posterior extracción de ADN. Para ambos protocolos se realizaron extracciones por triplicado y cada tubo de 1,5 µL contenía 100 mg de micelio del hongo.

Los métodos evaluados fueron el de CTAB con modificaciones (1M Tris (HCl

pH 8.0); 0,5M EDTA (NaOH pH 8.0); 5M NaCl; CTAB 2 %), (No se utilizó el polyvinylpyrrolidone (PVP) ni β -mercaptoethanol) (Doyle y Doyle 1987), donde inicialmente se utilizó 700 μ l del buffer precalentado a 65 °C por muestra, una vez mezclado el buffer con la muestra se procedió a moler los micelios con un pistilo y volver a calentar por 15 minutos a 65 °C. Posteriormente se mezclaron por inmersiones suaves y se agregó 750 μ l de cloroformo a -20 °C, se centrifugaron a 14000 rpm por 8 minutos. Se añadió 450 μ l de Propanol-2 a -20 °C a cada tubo de 1,5 ml con la sobrenadante, se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos. Se retiró el propanol-2 y se lavaron los pellet con 1 ml de Etanol al 70 %, dejamos secar las muestras y retomamos con buffer TE (10 mM Tris (HCl pH 8.0); 1 mM EDTA). Y para el método de SDS (100mM Tris-HCl pH8; 20mM de EDTA pH8; 1.4M NaCl; 3% de SDS) (Dellaporta et al. 1983). Precalentar 700 uL de buffer a 65°C, adicionar a micelio conservado a -80 °C, moler la muestra con un pistilo, calentar a 65°C por 10 minutos y pasar por el vortex para mezclar, agregar 300 μ l de acetato de potasio, incubar en hielo 30 minutos, centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos, retomar la sobrenadante en un tubo de 1,5 nuevo, agregar 300 μ l de etanol absoluto frio, incubar a -20°C por 20 minutos, centrifugar a 14.000rpm por 5 minutos, eliminar la sobrenadante, lavar 3 veces con 500 uL de etanol al 70% centrifugando entre lavados a 14.000rpm para fijar la pastilla, secar la pastilla, dejando sobre papel secante o Temoblock 35 °C, retomar la pastilla con 30 μ l de TE.

El ADN genómico producto de ambos protocolos fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro DS-11-DeNovix (DeNovix 2015). Se evaluaron las variables de Concentración de ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, que miden la presencia de proteínas y polisacáridos respectivamente (Rangos Óptimos 1,8- 2,0). Se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por LSD Fisher Alfa=0,05. Y verificar la obtención del producto de amplificación de ambas extracciones de ADN para su uso con marcadores moleculares se realizó una PCR (*Polymerase chain reaction*), con el ADN genómico de dos cepas (c01 y c09) obtenidos con ambos métodos de extracción, con un marcador del tipo microsatélite MG_47 diseñado por (Pereira et al. 2014). Se amplificó utilizando como reacción final, 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ADN total, 1X de *buffer*, 0,2 μM de cada *primers*, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM de cada dNTP, 0.02 U de Taq polimerasa y un volumen final de 10 μL , cuyo programa fue 94 °C por 4 minutos, 94 °C por 1 minutos, 56,6 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto para la extensión y 72 °C por 7 minutos de elongación final por 30 ciclos. en el termociclador Swift™ MaxPro-Esco. La amplificación fue visualizada por medio de la electroforesis con Agarosa (UltraPure™ Agarose) al 3%, tinción con GelRed.

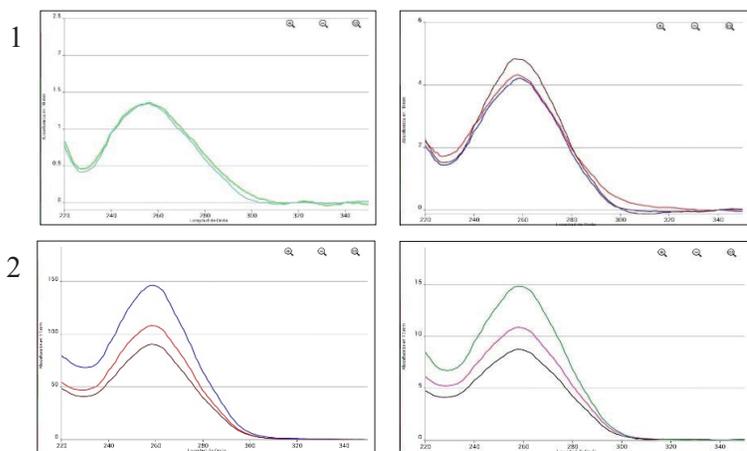
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se pueden observar las curvas de absorbancia que presentaron dos asilados al ser cuantificados en el espectrofotómetro, para ambos métodos de ex-

tracción, y se observa que los picos de las muestras por triplicado se encuentran en la longitud de onda 260 nm que es la absorbida por el ácido nucleico. Valor que fue relacionado con la longitud de onda 280 nm y 230 nm, para obtener los valores de pureza.

Teniendo en cuenta que el rango óptimo de la relación entre las absorbancias de

Figura 1. Comparación entre las curvas de Absorbancia del ADN genómico por triplicado de dos aislados de *Magnaporthe* sp, (1-c01; 2-c09) Obtenidos por el método de CTAB (a) y SDS (b). El gráfico espectral muestra datos para la muestra normalizada a una longitud de onda de 10 mm para mediciones de microvolumen. San Lorenzo, Paraguay 2017.



260 nm con 280nm y 230 nm es de 1,8 a 2 nuestros resultados se encuentran por unos decimales por encima, pero aun considerados como buenos para su evaluación de pureza, lo que coincide con Fraga Nodarse et al. (2004), que evaluaron diferentes métodos de extracción donde el método por CTAB, presentó buenos valores de concentración y pureza.

Las concentraciones de ADN obtenidas de ambos métodos presentaron diferencias significativas, dando una mayor cantidad por el método de CTAB 2%. En cuanto a las relaciones de pureza, no mostraron diferencias significativas (Tabla 1). Van Burik et al. 1998, observaron rendimientos parecidos a los nuestros al evaluar diferentes métodos mecánicos en combinación con el *buffer* con CTAB.

Como mencionan Brondani et al. (2000) y Cruz et al. (2009), la concentración de

Tabla 1. Concentración de ADN genómico ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y sus relaciones de pureza (260/280-260/230) de aislados de *Magnaporthe* sp. San Lorenzo, Paraguay 2017.

Métodos	Concentración de ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	Pureza	
		Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
CTAB	2064,16 a	2,19 a	2,19 a
SDS	743,07 b	2,21 a	2,2 a
CV	24,61	4,76	16,15

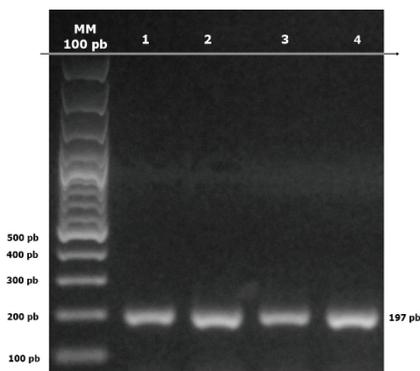
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

ADN genómico para el uso de microsatélites en *Magnaporthe* sp. esta entre 100 a 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, lo que se ve superado ampliamente por la efectividad de ambos métodos como muestran nuestros resultados.

En la figura 2 se pueden observar que ambos métodos fueron efectivos para la obtención de productos de amplificación, dando una banda única de 197 pares de bases (pb) lo que corresponde al marcador Mg_c047 según los resultados expuestos por Pereira et al. (2014) y Júnior et al. (2016).

Monroy-vaca et al. 2014, evaluaron cuatro métodos entre ellos uno que utilizaba

Figura 2. Amplificación del Microsatelite Mg_47 (197pb). Carril MM, marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder Plus). Carril 1 y 3 amplificación utilizando el ADN obtenido por el método de CTAB para las muestras c01 y c09 respectivamente. Carril 2 y 4 de amplificación utilizando el ADN obtenido por el método de SDS para las muestras c01 y c09 respectivamente. Gel de agarosa al 3%, marcador de peso molecular 100 pb. San Lorenzo, Paraguay 2017.



el SDS denominado método enzimático, y fue el que presentó mejores valores de cantidad y pureza., por lo que fue utilizado para la obtención de productos de amplificación por cebadores arbitrarios (RAPD) y específicos, logrando en ambos casos amplificaciones efectivas. De igual manera Fraga Nodarse et al. 2004, pudieron obtener productos de amplificación con el ADN genómico obtenido por el método por CTAB.

CONCLUSION

Se concluye diciendo que, si bien por el método de CTAB 2% se obtuvo mayor concentración de ADN genómico, la pureza y la obtención de productos de amplificación, hacen eficientes a ambos métodos para su uso con marcadores moleculares del tipo microsatélites.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brondani, C; Pereira, R; Brondani, V. 2000. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. 762: 753-762.
- Bussaban, B; Lumyong, S; Lumyong, P; Seelanan, T; Park, D; Hyde, K. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. 97(5): 1002-1011.
- Choi, J; Park, S-Y; Kim, B-R; Roh, J-H; Oh, I-S; Han, S-S; Lee, Y-H. 2013. Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. PloS one 8(2): e57196.
- Couch, BC; Fudal, I; Lebrun, M; Tharreau, D; Valent, B; Kohn, LM; Kim, P Van; Notte, J. 2005. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication With Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. 2005.
- Couch, BC; Kohn, LM. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94(4): 683-693.
- Cruz, CD; Peterson, W; Bockus, WW; Kankanala, P; Dubcovsky, J; Jordan, KW; Akhunov, E; Chumley, F; Baldelomar, FD; Valent, B. 2016. The 2NS Translocation from *Aegilops ventricosa* Confers Resistance to the Triticum Pathotype of *Magnaporthe oryzae*. Crop Science 56(june): 990-1000.
- Cruz, MF a.; Maciel, JLN; Prestes, AM; Bombonato, E a. S; Pereira, JF; Consoli, L. 2009. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo. Tropical Plant Pathology 34(6): 393-401.

- _ Cruz, MFA; Maciel, JLN; Prestes, AM; Bombonato, EAS; Jorge, F; Agronomia, F De; Fundo, UDP; Fundo, P. 2009. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo. 34(December): 393-401.
- _ Dellaporta, SL; Wood, J; Hicks, JB. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(4): 19-21.
- _ DeNovix. (2015) "DS-11 Spectrophotometer/Fluorometer Series. User Guide". En Págs. 89.
- _ Doyle, JJ; Doyle, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11-15.
- _ Fraga Nodarse, J; Rodríguez, J; Fuentes, O; Castex, M; Fernández-Calienes, A. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Revista Cubana de Medicina Tropical 56(3): 208-213.
- _ Júnior, AN; Pereira, JF; Ferreira, JR; Bonato, ALV; Maciel, JLN. 2016. Mapping highly informative SSR markers in the genome of *Magnaporthe oryzae* from wheat. Tropical Plant Pathology 41(5): 331-335.
- _ Klaubauf, S; Tharreau, D; Fournier, E; Groenewald, JZ; Crous, PW; de Vries, RP; Lebrun, M-H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). Studies in Mycology 79: 85-120.
- _ Lombardo, L; Nisi, M; Vanzetti, L; Helguera, M. 2012. Uso de marcadores moleculares en el programa de mejoramiento de trigo del INTA. no.2580.
- _ Monroy-vaca, EX; Fernández-andreu, CM; Díaz-rodríguez, R; Martínez-, G; Illnait-zaragozí, MT; Perurena-lancha, M. 2014. Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. 23(2): 49-56.
- _ Pereira, JF; Consoli, L; De Souza Bombonato, EA; Bonato, ALV; Maciel, JLN. 2014. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* isolates from wheat in Brazil. Biochemical Genetics 52(1-2): 52-70.
- _ Van Burik, J a; Schreckhise, RW; White, TC; Bowden, R a; Myerson, D. 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology 36(May): 299-303.
- _ Pieck, ML; Ruck, A; Farman, M; Peterson, GL; Stack, JP; Valent, B; Pedley, KF. 2016. Genomics-Based Marker Discovery and Diagnostic Assay Development for Wheat Blast. Plant Disease 2016: PDIS-04-16-0500-RE.
- _ Quintana de Viedma, L. 2010. Manejo integrado de mancha amarilla y la *Pyricularia* en el cultivo de trigo en Paraguay. Tercer seminario nacional de trigo «Del grano al Pan». Asunción-Paraguay, s.e., p.31-42.
- _ Urashima, AS; Lavorent, N a.; Goulart, ACP; Mehta, YR. 2004. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. Fitopatologia Brasileira 29(5): 511-518.



CAMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE CEREALES Y OLEAGINOSAS

Avda. Brasilia N° 840, Asunción - Paraguay
Tel.: +595 (21) 208 855 / 205 749 / 213 971
capeco@capeco.org.py
www.capeco.org.py