



Foto: Irvin Rodríguez

SURGEN NUEVOS CAMINOS PARA APORTAR SOLUCIONES A PROBLEMAS EN EL “PASTO MIEL”

Ing. Agr. PhD Marco Dalla Rizza¹, MSc Héctor Oberti¹, Asist. Lab. Sara Murchio¹, Ing. Agr. PhD Javier Do Canto², Ing. Agr. PhD Eduardo Abreo³, Ing. Agr. MSc Carlos Rossi⁴, Ing. Agr. PhD Walter Ayala⁵, Ing. Agr. PhD Rafael Reyno²

¹Unidad de Biotecnología

²Programa de Investigación en Pasturas y Forrajes

³Plataforma de Bioinsumos, Programa de Investigación en Producción y Sustentabilidad Ambiental

⁴Unidad de Semillas y Recursos Fitogenéticos

⁵Director Regional INIA Treinta y Tres

El género *Paspalum* comprende un alto número de especies que aportan buena producción y calidad como forrajeras durante la época estival. En un contexto de cambio climático y ante la oportunidad de aumentar el uso de especies C4 como forrajeras, INIA se encuentra trabajando sobre estrategias para generar resistencia a la ‘enfermedad azucarada’ y así favorecer la formación y desarrollo de semilla en especies de este género.

¿CUÁL ES LA RELEVANCIA DEL ‘PASTO MIEL’ PARA LA PRODUCCIÓN FORRAJERA?

El género *Paspalum* comprende un alto número de especies, principalmente de regiones tropicales y subtropicales del continente americano. Uruguay es parte del centro de origen de este género de plantas por ende adaptadas a nuestras condiciones y donde es posible encontrar variabilidad dentro del bioma Campos. La importancia del género radica en su buena producción y calidad como forrajeras durante la época

estival. Se prevé que el uso de pastos C4 como forrajeros aumente –más adaptados a temperaturas cálidas y condiciones de estrés hídrico– debido a que el cinturón tropical se está ensanchando a causa del cambio climático mundial. Estas especies resultan ser un recurso forrajero de alta significación para zonas de producción pecuaria como el bioma Campos donde *C. paspali* –causante de la enfermedad denominada ‘ergot’, ‘cornezuelo’ o ‘enfermedad azucarada’– tiene alta incidencia y diseminación. Esta enfermedad es producida en plantas del género *Paspalum* por el hongo *Claviceps paspali*

Stevens & Hall. *C. paspali* representa un problema mayor en Uruguay haciendo inviable la producción comercial de semillas de gramíneas altamente productivas y persistentes como *P. dilatatum* (pasto miel). Dos aspectos son muy importantes en esta enfermedad: por un lado, la especialización del patógeno que solo afecta flores del género *Paspalum* con ovarios jóvenes no fertilizados y por otro, la producción de inóculo secundario (gotas azucaradas) de fácil dispersión por el viento, lluvias e insectos. La ‘enfermedad azucarada’ es una infección de la flor y ocurre generalmente si no hubo polinización, y en condiciones de alta humedad y temperatura. La producción de polen viable y su liberación pueden verse afectados por eventos climáticos puntuales durante la antesis dejando una ventana de oportunidad para la infección por el hongo si las condiciones son adecuadas.

En cuanto a la importancia desde el punto de vista productivo, la enfermedad no permite la formación y desarrollo de las semillas, que son reemplazadas por estructuras de resistencia invernales del hongo –llamados esclerotos–, disminuyendo la producción de semillas muchas veces a niveles no comerciales. Otro punto importante es que los esclerotos del hongo contienen alcaloides tóxicos como la paspalina, paspalina y paspalitrem A y B. Desde 1960, distintos países con una alta producción ganadera como Australia, Argentina, Brasil y Uruguay comunican casos de intoxicación por toxinas de *C. paspali* en ganado equino, bovino y ovino. Estos esclerotos al ser ingeridos por el ganado producen un síndrome tremorgénico típico con una morbilidad entre el 15 y 30% que llevan a una pérdida de peso significativa y con esto una pérdida de desempeño animal no deseado.

Las estrategias que se están llevando a cabo en INIA con el fin de buscar resistencia a esta enfermedad son:

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Estudio del patógeno *C. paspali*, principal agente causal de la ‘enfermedad azucarada’ en Uruguay, desarrollo de una colección de aislamientos nacionales caracterizados molecularmente.
- Desarrollo de herramientas y metodologías de evaluación de infección con *C. paspali* en condiciones controladas.
- Ensayos comparativos de campo entre especies de *Paspalum* para evaluación agronómica y comportamiento frente a *C. paspali*.
- Obtención de datos de secuenciación genómicos y de expresión de genes (transcriptómicos) y búsqueda de genes asociados a resistencia a *C. paspali* evaluados en *Paspalum* spp.



Foto: Héctor Oberti

Figura 1 - Cepas de *C. paspali* almacenadas en la Colección de Microorganismos de INIA Las Brujas.

• Estudio del patógeno *C. paspali*, principal agente causal de la ‘enfermedad azucarada’ en Uruguay, desarrollo de una colección de aislamientos nacionales caracterizados molecularmente

En el marco de este proyecto desde INIA se generó una colección de 33 cepas locales de *C. paspali* representativas de varias especies hospedadoras y presentes en suelo uruguayo. Se colectó material infectado en Tacuarembó, Paysandú, Rivera, Durazno, Florida, Maldonado y Canelones con el fin de abarcar diferentes zonas de Uruguay. La identificación de estas cepas se realizó en el Laboratorio de Bioproducción y en el Laboratorio de Proteínas de INIA Las Brujas. Estas 33 cepas aisladas y caracterizadas provienen de tres especies diferentes de *Paspalum* (*P. dilatatum*, *P. urvillei* y *P. plicatulum*).

El hongo produce compuestos tóxicos para el ganado que ingiere los pastos infectados, y además disminuye la producción de semillas de estos pastos a niveles muchas veces no comerciales.

Cuadro 1 - Resultados de la evaluación frente a la infección con *C. paspali* en invernáculo de especies y accesiones de *Paspalum* spp.

| Especie | Accesión | Severidad (%) ^a | |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------|
| | | ILB432 | ILB342 |
| <i>P. malacophyllum</i> | 508800 | 0 | 0 |
| | 508797 | 0 | 0 |
| | 508794 | 0 | 0 |
| | 508804 | 0 | 0 |
| | 508796 | 0 | 0 |
| | 508798 | 0 | 0 |
| | 508802 | 0 | 0 |
| | 284509 | 0 | 0 |
| | 315731 | 0 | 0 |
| <i>P. dilatatum</i> | cv Estanzuela Chirú | 22,8 (±) 6,5 | 19,4 (±) 11,7 |
| | spp. flavescens Pflav01 | 10,5 (±) 7,0 | 13,8 (±) 3,01 |

^aSeveridad: porcentaje basado en número de espiguillas enfermas con relación al total de las espiguillas en la panoja. ILB432, ILB342 cepas de *C. paspali* evaluadas.

La importancia de este punto en la investigación radica en que un mayor conocimiento del patógeno presente en Uruguay permitirá interpretar comportamientos y diseñar estrategias de mejoramiento y manejo de esta enfermedad de una forma más adecuada.

Esta colección de aislados única en Uruguay fue depositada en la Colección de Microorganismos de la Estación Experimental INIA Las Brujas. Estas cepas serán de utilidad para posteriores evaluaciones de cultivos de forma estandarizada.



Foto: Héctor Oberti

Figura 2 - Ensayo de inoculación en invernáculo. Detalles de metodología de infección en condiciones controladas y signo de la enfermedad en etapas avanzadas de la infección.

Un mayor conocimiento del patógeno presente en Uruguay permitirá interpretar comportamientos y diseñar estrategias de mejoramiento y manejo de esta enfermedad.

• **Desarrollo de metodologías para evaluación de infección con *C. paspali* en *Paspalum* spp. en condiciones controladas**

La colección de *C. paspali* se caracterizó en base a crecimiento y capacidad de esporulación *in vitro*, y se identificaron tres aislamientos altamente virulentos con los cuales se logró poner a punto las condiciones de infección en invernáculo (Figura 2).

Las evaluaciones de infección en invernáculo permiten tener mayor control del ambiente y maximizar el inóculo, evitar los métodos de escape como la rápida polinización y factores externos climáticos como la baja humedad. En ese sentido, además de especies mencionadas anteriormente, se evaluó en invernáculo nueve accesiones de la especie reportada como inmune *P. malacophyllum* utilizando cepas de la colección de *C. paspali*. En este ensayo se determinó que ninguna accesión de *P. malacophyllum* mostraba infección frente a la inoculación con ninguno de los aislamientos locales. Como control de infección y comparación directa se utilizó *P. dilatatum* cv Estanzuela Chirú y *P. dilatatum* spp. flavescens (Cuadro 1).



Foto: INIA

Figura 3 - Evaluación de síntomas en invernáculo en el cv Estanzuela Chirú.

Cuadro 2 - Especies y accesiones de *Paspalum* en observación a campo. Procedencia geográfica de las accesiones y origen de la semilla.

| Especie | Accesión | Procedencia (facilitador) |
|-------------------------|-------------------------|---|
| <i>P. malacophyllum</i> | 508800 | Tucumán, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 508797 | Córdoba, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 508794 | Córdoba, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 508804 | Tarija, Bolivia (GRIN-USDA) |
| | 508796 | Córdoba, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 508798 | Córdoba, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 508802 | Salta, Argentina (GRIN-USDA) |
| | 284509 | Puerto Rico, Estados Unidos (GRIN-USDA) |
| | 315731 | Florida, Estados Unidos (GRIN-USDA) |
| | 14855 (CEN) | Brasil (Fagro-Udelar) |
| <i>P. dilatatum</i> | cv Estanzuela Chirú | Uruguay (La Estanzuela-CIAAB) |
| | spp. flavescens Pflav01 | Uruguay (Fagro-Udelar) |
| <i>P. notatum</i> | cv Pensacola | Semilla comercial |
| | cv INIA Sepé | Uruguay (INIA) |
| <i>P. urvillei</i> | Purv01 | Tacuarembó, Uruguay (INIA) |
| <i>P. plicatulum</i> | Pplic01 | Tacuarembó, Uruguay (INIA) |
| <i>P. umbrosum</i> | Pumb01 | Uruguay (Fagro-Udelar) |

Ensayos comparativos en campo entre especies de *Paspalum* para evaluación agronómica y comportamiento frente a *Claviceps*

En el género *Paspalum*, se ha informado que accesiones de *P. malacophyllum* y *P. urvillei* son las únicas especies que presentan inmunidad o tolerancia a *C. paspali* respectivamente. Para evaluar su comportamiento con aislamientos locales se solicitó al banco de germoplasma de Estados Unidos (National plant germplasm system-USDA-ARS, Griffin (Georgia)) 10 accesiones de *P. malacophyllum*.

Esta especie es nativa de Argentina, Paraguay y Brasil y no ha sido reportada en Uruguay. Con el fin de evaluar especies y accesiones de *Paspalum* en diferentes condiciones de suelo y ambientes se trasladaron un total de 17 accesiones entre *P. malacophyllum*, *P. plicatulum*, *P. urvillei*, *P. umbrosum*, *P. dilatatum* y *P. notatum* (Cuadro 2). Se evaluará en

campos experimentales de las cinco regionales de INIA (Salto Grande, Tacuarembó, Las Brujas, La Estanzuela y Treinta y Tres). Este es un ensayo inédito donde se evaluará si *P. malacophyllum* mantiene su inmunidad a campo en Uruguay.



Figura 4 - Ensayo a campo de 17 accesiones de *Paspalum* spp. en la Unidad Experimental Glencoe, INIA Tacuarembó.

Para un mayor conocimiento de *Paspalum* sobre diferentes suelos y ambientes se trasladaron 17 accesiones que serán evaluadas en las cinco regionales de INIA.



Foto: Héctor Oberti

Figura 5 - Inflorescencia de *P. malacophyllum*.

• Obtención de datos de secuenciación y búsqueda de genes asociados a resistencia a *C. paspali* evaluados en *Paspalum* spp.

Se realizará la secuenciación de *P. malacophyllum* para confeccionar el primer genoma de la especie. Previamente, se obtuvieron datos de secuenciación masiva en plantas del cv Estanzuela Chirú infectadas con *C. paspali* donde se determinó que activan mecanismos de defensa. Estos mecanismos han sido descritos en plantas de centeno infectadas con *Claviceps purpurea*. Nuestros resultados son la primera aproximación para identificar componentes claves en la respuesta de defensa de plantas de *Paspalum* que permitan diseñar estrategias de mejoramiento.

INIA profundizará en el conocimiento agronómico y molecular de *Paspalum malacophyllum*, motivado por su potencial forrajero y su comportamiento frente a la enfermedad.

Paspalum malacophyllum es una especie reportada como inmune en USA en el siglo pasado (Burton, Journal of Heredity 1948) y con capacidad de transmitir a la progenie esta característica en cruzamientos interespecíficos. También se comportó como inmune con aislamientos locales de *C. paspali*.

Nombre común: *Paspalum* estriado.

Nombre científico: *Paspalum malacophyllum* Trin.

Distribución: desde México hasta Argentina. Noreste y sur de Brasil, Bolivia, Paraguay y el centro y norte de Argentina. Desde el nivel del mar hasta 3000 metros.

Ciclo: pasto perenne (vive más de un año) y de primavera / verano.

Algunas características descritas en bibliografía: presenta buena palatabilidad como pasto forrajero, no persiste bien bajo pastoreo y posee una alta producción de semillas. La especie es potencialmente útil para mejoramiento porque permite la realización de cruzamientos interespecíficos y potencialmente transmitir la inmunidad a la 'enfermedad azucarada' y mejorar la producción de semilla.

REFERENCIAS

Oberti H. 2020. Análisis de expresión de genes que modifican su expresión en el biótrofo *Claviceps paspali* y su hospedero *Paspalum dilatatum* cv 'Estanzuela Chirú'. Tesis de maestría, Universidad de la República, Uruguay

Oberti H, Abreo E, Reyno R, Feijoo M, Murchio S, Dalla-Rizza M. (2020). New draft genome sequence of the Ergot disease fungus *Claviceps paspali*. Microbiol Resour Announc 9:e00498-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00498-20>.

Oberti H.L., Dalla-Rizza M., Reyno R., Murchio S., Altier N and E. Abreo (2020). Diversity of *Claviceps paspali* reveals unknown lineages and unique alkaloid genotypes Mycologia, 112:2, 230-243, <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1694827>.



Foto: Héctor Oberti

Figura 6 - Diferencias en los fenotipos entre accesiones de *P. malacophyllum*.