

# 7- PATOTIPOS DE *PYRICULARIA ORYZAE* EN GRAMÍNEAS Y SU RELACIÓN CON EL BRUSONE DEL ARROZ EN URUGUAY

S. Martínez<sup>1</sup>, M. Farman<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVE:** Capín, Filogenómica, Genoma, Pasto indio, Raigrás.

## INTRODUCCIÓN

*Pyricularia oryzae* (= *Magnaporthe oryzae*) es uno de los patógenos más importantes en cultivos de Uruguay y el mundo afectando a más de 50 especies de gramíneas. Este hongo es el agente causal del Brusone de arroz, la enfermedad más importante del cultivo en el mundo y responsable de alrededor de 30% de pérdidas anuales de cosecha.

Además, *P. oryzae* es reconocida como un serio patógeno de trigo, primero en Sudamérica donde surgió en 1985 y de importancia creciente en Asia desde su reciente introducción (Islam *et al.*, 2016). Otra de las enfermedades causadas por este patógeno es la mancha gris o Brusone del raigrás, una patología de reciente importancia en semilleros de *Lolium multiflorum* en Uruguay, pero conocida desde hace décadas en varias partes del mundo, tanto en raigrás anual como perenne (Martínez y Escalante, 2016).

Como enfermedad de importancia del arroz en Uruguay, el Brusone depende de las condiciones ambientales que predisponen al desarrollo de epidemias. Este fenómeno se ha visto agravado en los últimos años debido a que la producción de arroz se ha basado en cultivares tipo *indica*, susceptibles en hoja y cuello, y tipo *japónica* susceptibles en cuello.

La población mundial de *P. oryzae* se subdivide en múltiples linajes que se encuentran preferentemente asociados con un solo gé-

nero de planta hospedera (Gladieux *et al.*, 2018). Uno de estos linajes es conocido como patotipo *Oryzae* (*PoO*) que afecta al arroz a nivel mundial, y que solo se encuentra ocasionalmente afectando a otros huéspedes. Asimismo, el arroz es solo ocasionalmente afectado por poblaciones pertenecientes a otros linajes u hospederos (Gladieux *et al.*, 2018). La aparición de síntomas de Brusone en hojas y/o cuellos de espigas en gramíneas usadas en la rotación arroz-pastura (como el raigrás), malezas del cultivo (como pasto blanco, pasto indio, capín, etc.) y otras especies cultivadas, apuntan a la posibilidad de que una o más de estas especies puedan servir como huéspedes alternativos del Brusone del arroz.

Para obtener más información sobre esta posibilidad, se iniciaron estudios filogenómicos para investigar sobre la estructura de la población de *P. oryzae* asociada a diferentes especies de plantas hospederos en Uruguay. Más en particular, el objetivo fue evaluar la relación de los aislamientos obtenidos de gramíneas con las poblaciones especializadas en determinados hospederos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de cultivos.** Los aislamientos utilizados fueron obtenidos durante salidas de colecta en su mayoría a chacras de arroz. Plantas con síntomas de Brusone en hoja o cuello de espigas de diferentes gramíneas fueron colectadas en diferentes partes del país y en diferentes hospederos. En laboratorio se obtuvieron aislamientos puros a partir de conidias individuales sobre medio agar – afrechillo de arroz 2% y mantenidos

<sup>1</sup> Ing. Agr., Dr., INIA. Programa Nacional de Investigación en Producción de Arroz, smartinez@inia.org.uy

<sup>2</sup> Dr., Professor, University of Kentucky, mark.farman@uky.edu

en colección de papel estéril a -20oC. Los aislamientos así obtenidos, se encuentran depositados en las colecciones del Laboratorio de Patología Vegetal de INIA Treinta y Tres y el Department of Plant Pathology de la Universidad de Kentucky.

**Secuenciado del genoma.** Las bibliotecas fueron preparadas mediante el kit Illumina Nextera. Los datos de secuenciación se obtuvieron usando Illumina MiSeq y HiSeq2500. Las lecturas sin procesar se recortaron antes de ensamblar usando los programas Newbler 2.9 o Velvet 1.2.10.

**Identificación de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).** Las secuencias repetidas se seleccionaron usando un algoritmo personalizado (Li *et al.*, 2005), y los genomas enmascarados repetidamente se alinearon en pares usando Blast. Los SNP se llama-

ron utilizando un script personalizado diseñado específicamente para evitar regiones con paralogía oculta (M. Farman, inédito). Se construyó un árbol de unión (Neighbor-Joining) usando datos de distancia por pares y se evaluaron los valores de confianza de los nodos usando un nuevo algoritmo de distancia (<https://github.com/bradfordcondon/WGPAN>).

## RESULTADOS

En total, se obtuvieron aislamientos de *Pyricularia oryzae* de nueve especies o géneros diferentes de gramíneas, incluyendo al arroz. Se obtuvieron secuencias del genoma completo de 12 aislamientos provenientes de siete especies hospederas diferentes de este patógeno. Las características de estos aislamientos, como sitio y año de colecta, hospedero y órgano vegetal se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Datos de los aislamientos de *Pyricularia oryzae* utilizados para secuenciación de genoma completo.

Aislamiento	Localidad	Hospedero	Año colecta	Parte vegetal
Po75	UEPL, Treinta y Tres	Arroz	2005	-
Po107	Charqueada, Treinta y Tres	Arroz	2009	Cuello
Po168	Río Branco, Cerro Largo	<i>Luziola</i> sp.	2010	Lígula
Po169	Río Branco, Cerro Largo	<i>Eleusine</i> sp.	2010	Hoja
Po171	Zapata, Treinta y Tres	<i>Luziola</i> sp.	2010	Hoja
Po217	Valle Alto, Treinta y Tres	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	2015	Hoja
Po221	Berachi, Cerro Largo	<i>Lolium multiflorum</i>	2015	Glumas
Po229	Valle Alto, Treinta y Tres	<i>Eleusine indica</i>	2017	Cuello
Po231	Valle Alto, Treinta y Tres	<i>Eleusine indica</i>	2017	Tallo
Po233	Covidef 1, Florida	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	2017	Hoja
Po234	18 de Julio, Rocha	<i>Lolium multiflorum</i>	2017	Hoja
Po237	UEPL, Treinta y Tres	<i>Lolium multiflorum</i>	2017	Espiga

La información obtenida fue usada para elaborar una línea de base de la estructura de la población de *P. oryzae* y de la distribución de patotipos a través del país.

Dos especies de *Pyricularia* fueron identificadas de las primeras muestras colectadas en el país. En diferentes especies de pasto blanco (*Digitaria* spp.), maleza común en el cultivo de arroz, la especie colectada fue identificada como *P. grisea*, no perteneciente a la población de *P. oryzae*. Los aislamientos provenientes del resto de hospederos (Cuadro 1) pertenecen a *P. oryzae*.

Los estudios filogenómicos revelaron la existencia de varios linajes de *P. oryzae*, considerados actualmente patotipos, presentes en Uruguay (Figura 1). Diez de esos aislamientos se agruparon con otros aislamientos estrictamente de acuerdo con el hospedero (linajes asociados a los géneros *Eleusine*, *Lolium*, *Luziola*, *Oryza* y *Stenotaphrum*). Los aislamientos de pasto indio de Uruguay pertenecen a uno (*Eleusine* 1) de los dos linajes reportados para este hospedero a nivel mundial.

Además, fueron secuenciados tres aislamientos obtenidos de raigrás (*L. multiflorum*), dos de los cuales pertenecen al patotipo *Lolium* emparentado con el patotipo *Triticum*, no reportado en el país, pero de importancia en la región (Figura 1).

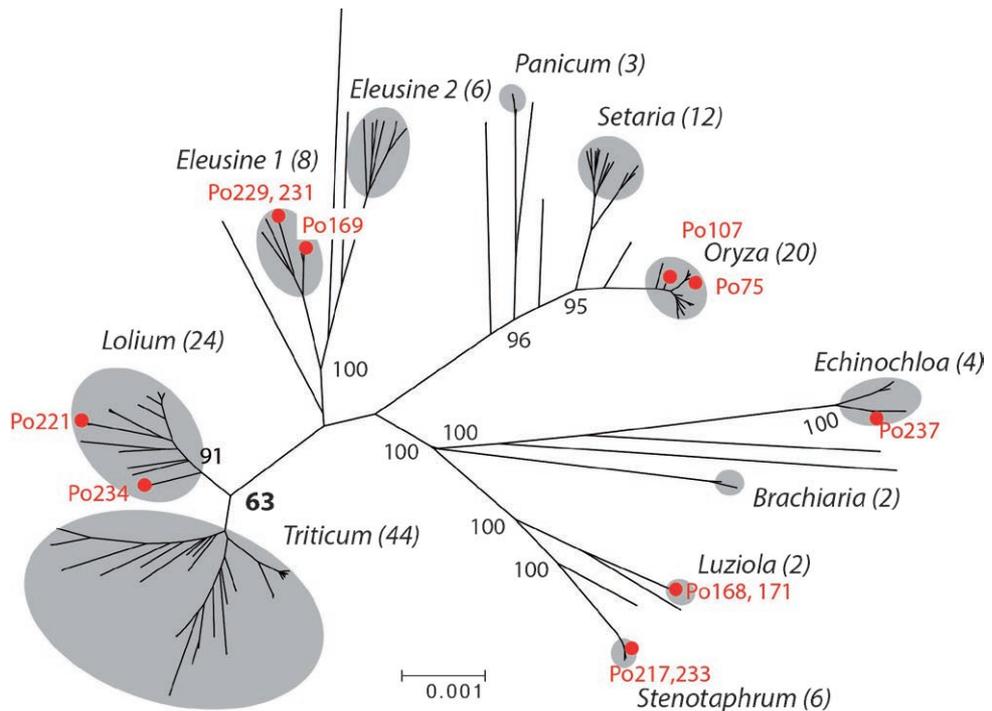
Dos aislamientos aparecen como probables casos de infección cruzada: un aislamiento del linaje *Echinochloa/Leptochloa* aislado de espiguillas de *Lolium* (Figura 1), y un aislamiento de *P. grisea*, patógeno de *Digitaria* spp., colectado en hojas de capín (*Echinochloa* sp.) (no mostrado).

## CONCLUSIONES

Fueron obtenidos aislamientos de *Pyricularia* de 9 géneros/especies de gramíneas malezas o cultivadas en Uruguay, además de arroz. En el estudio se encontraron dos especies causantes de síntomas de Brusone, *P. oryzae* y *P. grisea*, esta última patógena de *Digitaria* spp., pero también encontrada en hojas de capín.

Los estudios filogenómicos de 12 genomas analizados de *P. oryzae* revelaron la existencia de seis linajes presentes en Uruguay, coincidentes con patotipos previamente reportados en otras regiones (Gladieux *et al.*, 2018).

El patotipo *Oryzae* (*PoO*) no fue encontrado asociado a estructuras vegetales de otras especies de gramíneas fuera del arroz, su hospedero. En base a estos estudios preliminares, las malezas y otros cultivos cereales no parecen actuar como huéspedes alternativos comunes del patotipo *PoO* en Uruguay.



**Figura 1.** Árbol de distancia de genomas de aislamientos de *Pyricularia oryzae* de Uruguay con los distintos agrupamientos en base a hospederos. Números después del nombre de las poblaciones de acuerdo al hospedero indican el número de genomas comparados para ese grupo. La escala muestra el número de nucleótidos de diferencia por sitio. Los valores de confianza se muestran en los nodos.

## BIBLIOGRAFÍA

Islam, M.T.; Croll, D.; Gladieux, P.; Soanes, D.M.; Persoons, A.; Hattacharjee, P.; Hossain, M.S.; Gupta, D.R.; Rahman, M.M.; Mahboob, M.G.; Cook, N.; Salam, M.U.; Surovy, M.Z.; Sancho, V.B.; Maciel, J.L.N.; Nhani, A.; Castroagudin, V.L.; Reges, J.T.D.; Ceresini, P.C.; Ravel, S.; Kellner, R.; Fournier, E.; Tharreau, D.; Lebrun, M.H.; McDonald, B.A.; Stitt, T.; Swan, D.; Talbot, N.J.; Saunders, D.G.O.; Win, J.; Kamoun, S. 2016. Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biology* vol. 14, no.84.

Gladieux, P.; Condon, B.; Ravel, S.; Soanes, D.; Maciel, J.L.N.; Nhani, A.; Chen, L.; Terauchi, R.; Lebrun, M.-H.; Tharreau, D.; Mitchell, T.; Pedley, K.F.; Valent, B.; Talbot, N.J.; Farman, M.; Fournier, E. 2018. Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *mBIO*, 9(1): e01219-17.

Li, W.; Rehmeier, C.J.; Staben, C.; Farman, M.L. 2005. TruMatch—a BLAST post-processor that identifies bona fide sequence matches to genome assemblies. *Bioinformatics*, 21(9): 2097-2098.

Martínez, S.; Escalante, F. 2016. La *Pyricularia* o Brusone en semilleros de raigrás. *Revista INIA*, 46: 16-19.