

“Estudio epidemiológico de la Pyricularia del trigo (*Magnaporthe oryzae* patotipo *Triticum* (MoT)) en condiciones de campo en Paraguay”

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal, orientación en Protección Vegetal*

Alice Rocío Chávez

Ingeniera agrónoma, Universidad Nacional de Asunción – 2011

Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay

Fecha de defensa:

7 de abril de 2021



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marcelo Aníbal Carmona

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires) Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires) Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de La Plata)

Co-director

Man Mohan Kohli

Ingeniero Agrónomo (Rajasthan Agricultural University) Magister Scientiae en Agricultura botánica (Indian Agricultural Research Institute) Doctor en Genética (Indian Agricultural Research Institute)

Consejero

Cinthia Carolina Cazal Martinez

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Asunción) Magister Scientiae en Ciencias en Biotecnología (Universidad Nacional de Asunción)

JURADO EVALUADOR

Daniel Ploper

Norma Formento

Sebastián Steinglein

DEDICATORIA

A mi mamá

A Luna y Sol

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología Agrícola INBIO, por la beca para continuar mis estudios de posgrado

A la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas, CAPECO, y al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, IPTA, por el apoyo brindado en cuanto a insumos, instalaciones y logística para la realización de la tesis.

Al director de tesis Marcelo Carmona y consejera Cinthia Cazal por el apoyo constante y los consejos recibidos

Al co director Mohan Kohli por el apoyo constante y por siempre animarme a tratar de llegar más lejos

A Lourdes Cardozo, por brindarme su conocimiento y apoyo desinteresada y amablemente

A mis compañeros del Centro de Investigación Hernando Bertoni: Vilma Giménez, Magaliz Reyes, Alfredo Guillen, Anita Paredes, Rosalino Rodríguez y Graciela Cabrera por el apoyo brindado

A los funcionarios del IPTA: Alcides Villalba, Nathalia Bobadilla, Ruth Scholz y Pedro Chávez por la ayuda para la realización de ensayos en los diferentes centros de investigación.

A Pastor E. Pérez por la ayuda para el análisis estadístico de los datos.

A las hermanas que me dio Buenos Aires: Johana González, Rocío Montiel, Mónica Bogado y Claudia Caballero por estar siempre para todo.

A mi familia por el apoyo que me brindaron durante los años que duró la maestría.

A la señora Cristina Amoroso y familia, por recibirme y hacerme sentir parte de su familia

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución”.

Ing. Agr. Alice Rocío Chávez

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
ÍNDICE DE TABLAS	viii
	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS UTILIZADAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1	
Introducción general	
1.1 Introducción	16
1.1.1 El cultivo de trigo en Paraguay	16
1.1.2 Enfermedades importantes del trigo en Paraguay	19
1.1.3 Pyricularia o brusone del trigo	21
1.1.3.1 Sintomatología y condiciones ambientales ideales para el desarrollo de la enfermedad	22
1.1.3.2 Características y biología de <i>Magnaporthe oryzae</i>	23
1.1.3.3 Epidemiología	28
1.1.3.4 Manejo de la enfermedad	32
1.1.3.5 Antecedentes filogenéticos de <i>Magnaporthe oryzae</i>	37
1.2 Objetivos	39
1.3 Hipótesis	39
	40
CAPITULO 2	
Cuantificación de conidios de <i>Magnaporthe oryzae</i> en hojas de trigo en condiciones de campo en Paraguay y monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo	
2.1 Introducción	41
2.2 Materiales y métodos	42
2.2.1 Recolección de muestras de hojas	42
2.2.2 Procesamiento de las muestras de hojas en laboratorio	48
2.2.3 Monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo	49
2.3 Resultados	51
2.3.1 Cuantificación de conidios de <i>Magnaporthe oryzae</i> en hojas de trigo colectadas en los campos de producción en Paraguay	51
2.3.2 Cuantificación del número de espigas enfermas y correlación con el número de conidios/g observados en hojas	54
2.3.3 Monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo	56
2.4 Discusión	58
2.5 Conclusiones	64

CAPÍTULO 3	65
Identificación de malezas hospedantes de <i>Magnaporthe oryzae</i> en las principales zonas productoras de trigo de Paraguay y diagnóstico molecular del patotipo <i>Triticum</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i> a partir de aislados de malezas.	
3.1 Introducción	66
3.2 Materiales y métodos	68
3.2.1 Identificación de malezas hospedantes de <i>Magnaporthe</i> sp. en los campos de producción de trigo en Paraguay	68
3.2.1.1 Recolección de muestras de malezas	68
3.2.1.2 Procesamiento de muestras recolectadas en laboratorio	70
3.2.2 Pruebas de infección cruzada	72
3.2.3 Diagnóstico molecular del patotipo <i>Triticum</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i> a partir de aislados de malezas	75
3.2.3.1 Protocolo de extracción de ADN	76
3.2.3.2 PCR convencional	76
3.3 Resultados	77
3.3.1 Identificación de malezas hospedantes de <i>Magnaporthe</i> spp. en los campos de producción de trigo en Paraguay	77
3.3.2 Pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular del patotipo <i>Triticum</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i> a partir de aislados de malezas	85
3.3.2.3 Inoculación de malezas	91
3.4 Discusión	92
3.5 Conclusiones	99
	101
CAPÍTULO 4	
Conclusiones finales	
4.1 Introducción	102
4.2 Síntesis de los principales resultados y contraste de hipótesis	103
4.3 Avances logrados en el conocimiento	106
4.4 Aplicaciones e implicancias para investigaciones futuras	107
BIBLIOGRAFÍA	109
APÉNDICE	126

INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG.
Tabla 2.1: Coordenadas geográficas de los campos comerciales de trigo muestreados para la recolección de muestras de hojas en los departamentos de Alto Paraná, Itapúa y Canindeyú, Paraguay.	43
Tabla 2.2: Valores mínimos y máximos, medias, coeficiente de variación (CV) y desvío estándar (DE) del número de conidios/g de hojas basales secas observados en muestras colectadas en los campos comerciales de trigo en Paraguay.	51
Tabla 2.3: Valores mínimos y máximos, medias, coeficiente de variación (CV) y desvío estándar (DE) del número de conidios/g de hojas basales secas observados en muestras colectadas en la parcela instalada en el Campo Experimental Yhovy, Paraguay, durante las tres épocas de siembra.	53
Tabla 2.4: Cantidad total de espigas, cantidad de espigas con síntomas y porcentaje de incidencia en las tres épocas de siembra en el CEY, Paraguay.	54
Tabla 2.5: Campos incluidos en el análisis de correlación con sus promedios de conidios/gramo de hojas basales secas durante el ciclo de cultivo y porcentaje de espigas enfermas.	55
Tabla 2.6: Cantidad de conidios de <i>Magnaporthe oryzae</i> atrapados semanalmente con trampas cazaesporas instaladas en los centros de investigación utilizados para el estudio.	57
Tabla 3.1: Coordenadas geográficas de los campos de producción de trigo muestreados para la identificación de malezas hospedantes en los departamentos de Alto Paraná, Itapúa y Canindeyú, Paraguay.	69
Tabla 3.2: Lista de aislados utilizados en las pruebas de infección cruzada con sus datos de origen, año de recolección y hospedero original.	74
Tabla 3.3: Lista de aislados inoculados sobre la variedad Canindé 11 con su diagnóstico molecular en ADN micelial y ADN en hojas inoculadas, y nota máxima (N+) observada en hojas.	87
Tabla 3.4: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de trigo y su N+ de infección.	88
Tabla 3.5: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de <i>Avena strigosa</i> y su N+ de infección.	89
Tabla 3.6: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de <i>Bromus catharticus</i> (P-004), <i>Brachiaria</i> sp. (P-109), <i>Cenchrus</i>	90

echinatus (P-055, P-071), *Digitaria insularis* (P-057), *Eleusine indica* (P-114) y *Lolium multiflorum* (P-048, P-050), y su N+ de infección.

Tabla 3.7: Lesiones causadas por el aislado de trigo P-009 sobre las malezas *Bromus catharticus*, *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica* y *Lolium multiflorum*. 91

Tabla 3.8: Síntesis de los principales resultados de la identificación de hospedantes, pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular, realizados con los aislados de *Magnaporthe* spp. 92

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
Figura 1.1: (a) Mapa político de la República de Paraguay. Fuente: Vázquez 2006; (b) Distribución geoespacial del cultivo de trigo en Paraguay, año 2014. Fuente: CAPECO 2020.	18
Figura 1.2: Síntoma típico de la Pyricularia en las espigas de trigo.	22
Figura 1.3: Conidios de <i>Magnaporthe oryzae</i> observados al microscopio óptico simple.	24
Figura 1.4: Esquema de la reproducción sexual de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Fuente: Moreira et al., 2015.	25
Figura 1.5: (a) Imagen en microscopio de luz de peritecios encontrados en medio de cultivo, presentando cuellos largos, removidos por escarificación; (b) Imagen en microscopio electrónico de barrido de varios protoperitecios desarrollándose en forma agrupada; (c) Imagen en microscopio electrónico de luz de peritecios desarrollados en forma agrupada parcialmente inmersos en el tejido vegetal; (d) imagen de microscopio electrónico de barrido, corte transversal de un tallo con colonización micelial interna y peritecio con cuello largo. Fuente: Moreira et al., 2015.	26
Figura 1.6: Proceso de germinación, formación de apresorio y penetración de conidios de <i>Magnaporthe oryzae</i> . Fuente: Boddy, 2016.	28
Figura 1.7: Modelo del ciclo biológico-agronómico del brusone del trigo propuesto por el CIMMYT. Fuente: CIMMYT 2019a.	31
Figura 1.8: Componentes de una estrategia de manejo integrado de la Pyricularia del trigo en Sudamérica y su importancia. Fuente: Kohli et al., 2020.	33
Figura 2.1: Ubicación de los puntos para la recolección de muestras de hojas de trigo en los departamentos de Canindeyú, Alto Paraná e Itapúa durante el ciclo 2018.	42
Figura 2.2: Parcela instalada en el CEY, con sistema de riego por aspersión.	44
Figura 2.3: Croquis de la parcela instalada en el CEY.	45
Figura 2.4: Temperatura y precipitaciones semanales durante los meses de marzo a setiembre de 2018 en Paraguay. Fuente: Dirección de Meteorología e Hidrología, Dirección Nacional de Aeronáutica Civil, DINAC.	46
Figura 2.5: Relación entre la precipitación y la humedad relativa durante los meses de marzo a setiembre de 2018 en Paraguay.	47
Figura 2.6: Hojas de trigo cortadas y puestas en cámara húmeda.	49
Figura 2.7: Trampas cazaesporas construidas de acuerdo con Reis y Santos, (1985). Fuente: Alice Chávez, 2018.	50
Figura 2.8: Promedio del número de conidios/g de hojas basales secas observados durante las tres épocas de siembra en el CEY a lo largo del ciclo de cultivo.	55
Figura 2.9: Relación entre el promedio de la cantidad de conidios/gramo de hojas basales secas y el porcentaje de espigas enfermas.	56

Figura 3.1: Ubicación de los puntos de muestreo para la recolección de muestras de malezas en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú, Paraguay.	69
Figura 3.2: Síntomas característicos del ataque de <i>Magnaporthe oryzae</i> en hojas (izquierda) e inflorescencias (derecha).	70
Figura 3.3: Escala utilizada para la evaluación de las infecciones causadas por <i>Magnaporthe oryzae</i> en hojas de trigo adaptada de Valent et al., (1991).	73
Figura 3.4: Prevalencia estacional de las especies de malezas recolectadas durante el 2018, en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú.	78
Figura 3.5: Síntomas observados en hojas de <i>Brachiaria</i> sp. Fuente: Alice Chávez, 2018.	80
Figura 3.6: Síntomas observados en las hojas de <i>Bromus catharticus</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	80
Figura 3.7: Síntomas observados en las hojas de <i>Cenchrus echinatus</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	81
Figura 3.8: Síntomas observados en las hojas de <i>Cynodon dactylon</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	81
Figura 3.9: Síntomas observados en las hojas de <i>Digitaria horizontalis</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	81
Figura 3.10: Síntomas observados en las hojas de <i>Digitaria insularis</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	82
Figura 3.11: Síntomas observados en las hojas de <i>Echinochloa crus-galli</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	82
Figura 3.12: Síntomas observados en hojas de <i>Eleusine indica</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	83
Figura 3.13: Síntomas observados en las hojas e inflorescencias de <i>Lolium multiflorum</i> . Fuente: Alice Chávez, 2018.	84
Figura 3.14: Porcentaje de muestras de las especies de malezas en las que se observaron conidios de <i>Magnaporthe</i> sp. durante el año 2018.	84

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Abreviatura	Significado
CAPECO	Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
IPTA	Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria
RH	Roya de la hoja
MM	Mancha marrón
FE	Fusariosis de la espiga
MA	Mancha amarilla
DFI	Día favorable de infección
CEY	Campo Experimental Yhovy
CETAPAR	Centro Tecnológico Agropecuario del Paraguay
CICM	Centro de Investigación Capitán Miranda
g	Gramo
Cl/l	Cloro por litro
CV	Coefficiente de variación
EE	Error estándar
DE	Desvío estándar
HR	Humedad relativa
N+	Nota máxima
Ene	Enero
Feb	Febrero
Mar	Marzo
Abr	Abril
May	Mayo
Jun	Junio
Jul	Julio
Ago	Agosto
Set	Setiembre
Oct	Octubre
Nov	Noviembre
Dic	Diciembre

RESUMEN

Estudio epidemiológico de la Pyricularia del trigo (*Magnaporthe oryzae* patotipo *Triticum* (MoT)) en condiciones de campo en Paraguay

La Pyricularia o brusone del trigo causado por *Magnaporthe oryzae*, es considerada una amenaza para la producción de trigo a nivel global. Sin embargo, muchos aspectos epidemiológicos de la enfermedad son poco conocidos hasta ahora. El presente trabajo fue realizado con los siguientes objetivos: (i) cuantificar la densidad de conidios de *M. oryzae* presentes en las hojas de trigo en condiciones de campo en Paraguay, (ii) identificar malezas hospedantes de *M. oryzae* en las principales zonas productoras de trigo en Paraguay, (iii) diagnosticar por métodos moleculares el patotipo *Triticum* de *M. oryzae* en los aislados de las malezas que pueden infectar al trigo en pruebas de infección cruzada, y (iv) monitorear el movimiento de conidios de *M. oryzae* en el aire durante el ciclo del cultivo. Se observó la presencia de conidios en las hojas colectadas en los campos de producción durante el ciclo del cultivo, con diferencias en la cantidad observada dependiendo del departamento, de la época de siembra y de la presencia de humedad continua mediante sistema de riego. Se registró una fuerte correlación entre la cantidad de conidios/g de hojas y la cantidad de espigas enfermas ($r = 0,98$). Se pudo constatar la presencia de un flujo de conidios en el aire durante el ciclo de cultivo; y se identificó por primera vez el patotipo *Triticum* de *M. oryzae* en las malezas *Brachiaria* sp., *Bromus catharticus* y *Lolium multiflorum*. Se concluye que los conidios de *M. oryzae* están presentes en las hojas del cultivo de trigo y son fuente de inóculo durante el ciclo del cultivo, dependiendo de los factores ambientales. El aire actúa como un mecanismo de dispersión de *M. oryzae* durante el ciclo del cultivo. Las malezas de la familia Poaceae son hospedantes alternativos del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

Palabras clave: trigo, brusone, fuentes de inóculo, hospedantes alternativos, diagnóstico molecular

ABSTRACT**Epidemiological study of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* (MoT)) under field conditions in Paraguay**

Wheat blast or Pyricularia, is considered a threat to wheat production globally. However, till date several epidemiological aspects of the disease are not known clearly. The present study was conducted with the objectives of: (i) quantifying the *Magnaporthe oryzae* spore load present on the wheat leaves under field conditions in Paraguay, (ii) identify weed species acting as hosts for *M. oryzae*, (iii) diagnose by molecular methods the *Triticum* pathotype of *M. oryzae* from weed isolates that can infect wheat in cross infection tests, and (iv) monitoring the presence and movement of conidia of *M. oryzae* in the air during the crop cycle. The presence of conidia on the leaves collected from the commercial fields during the crop cycle was observed with differences according to the department, the sowing date and the presence of continuous humidity through irrigation system. A strong correlation was found between the amount of conidia/g on the leaves and the number of diseased spikes ($r = 0,98$). The presence of a flow of conidia in the air was verified during the crop cycle; and weeds *Brachiaria* sp., *Bromus catharticus* and *Lolium multiflorum* were identified as hosts of the *Triticum* pathotype of *M. oryzae*. It is concluded that the conidia of *M. oryzae* are present in the leaves of the wheat crop and are a potential source of inoculum during the crop cycle, depending on environmental factors. Air acts as a dispersal mechanism for *M. oryzae* during the crop cycle. Weeds of the Poaceae family are alternative hosts for the *Triticum* pathotype of *M. oryzae*.

Key words: wheat blast, inoculum sources, alternative hosts, molecular diagnosis

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1. Introducción

1.1.1 El cultivo de trigo en Paraguay

Según referencias históricas, el trigo fue introducido al Paraguay, durante el segundo gobierno de Domingo Martínez de Irala, 1542-1557. Aunque Paraguay llegó a producir una cantidad apreciable del cereal durante esa época, los primeros trabajos de investigación se iniciaron con la llegada al país del Dr. Moisés Bertoni en 1887. El Dr. Bertoni fue el primero en señalar que el calor sería un problema para la producción de trigo en Paraguay considerando la falta de variedades adecuadas para clima subtropical (Alarcón, 2010; Kohli et al., 2010).

El cultivo de trigo fue fomentado por el gobierno, aunque de forma discontinua, hasta que se inició la ejecución del Programa Nacional de Trigo en el año 1966. La ejecución del programa y el apoyo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México, a partir de la década de 1970, ayudó a incrementar paulatinamente tanto el área de siembra como la producción nacional. Como resultado, Paraguay pudo autoabastecerse en 1986 y convertirse en país exportador en 1989. A partir de ese año, las exportaciones a los países vecinos han sido constantes, pero con fuertes fluctuaciones entre zafras (Ruiz Díaz, 2007; Servin y Rojas, 2014).

En la década de 1990, el sector trigo sufrió una caída en la producción en coincidencia con un menor apoyo del estado en la investigación de este rubro agrícola (Kohli, 2010). Ante esta situación en el año 2003, la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO) tomó la iniciativa de impulsar el “Proyecto de Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo del Trigo en Paraguay” en colaboración con el Ministerio de Agricultura y Ganadería y el CIMMYT. Este proyecto permitió generar una red de conocimientos en la que interactúan las

empresas privadas, cooperativas de productores, agricultores, profesionales especializados e instituciones públicas relacionadas (Servin y Rojas, 2014). La ejecución del proyecto permitió incrementar la producción y las exportaciones de trigo en forma constante, es así que en la zafra 2019, el área de siembra fue de 430000 ha, la producción comercial alcanzó las 1100000 toneladas y el rendimiento por ha fue de 2558 kg, ese mismo año se logró exportar 534526 toneladas. El 99% de lo exportado fue a Brasil, y el 1% a Vietnam, Bolivia y otros (Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO), 2021).

Considerando que el cultivo de trigo se adapta mejor a las zonas templadas del mundo, su cultivo en Paraguay puede considerarse como no tradicional (Pedretti et al., 2004). Por este motivo, al principio su cultivo estuvo restringido a la zona sur del país (Departamentos de Misiones e Itapúa) (Figura 1.1), donde la temperatura media durante el invierno es 18°C o menos. Con la expansión de la frontera agrícola hacia la zona norte (departamentos de Alto Paraná, Caaguazú y San Pedro), el germoplasma del cultivo tuvo que adaptarse a temperaturas medias entre 18 y 20°C, además de precipitaciones irregulares expresadas en frecuentes sequías (Kohli et al., 2007).

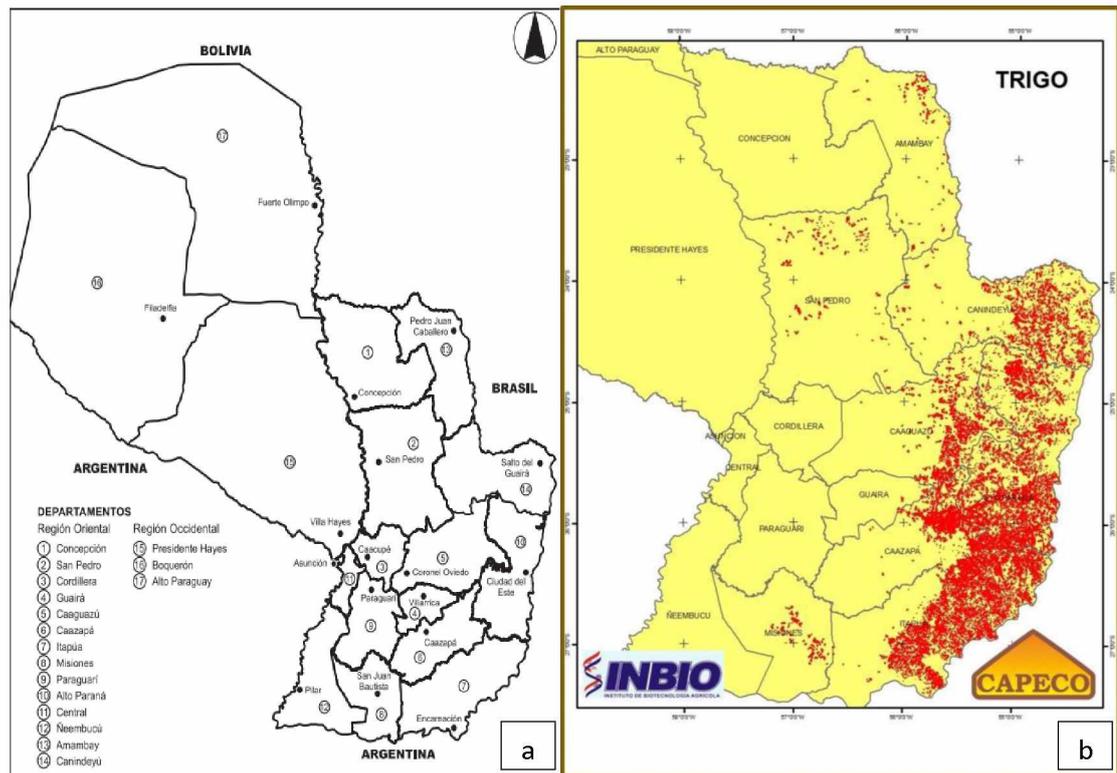


Figura 1.1: (a) Mapa político de la República de Paraguay. Fuente: Vázquez 2006; (b) Distribución geoespacial del cultivo de trigo en Paraguay, año 2014. Fuente: CAPECO, 2020.

Actualmente, el cultivo de trigo está concentrado en la Región Oriental del país y cubre los departamentos de Itapúa, Alto Paraná, Misiones, Canindeyú, San Pedro, Caazapá y Caaguazú (Kohli, 2012). En base a la fecha de siembra, pueden definirse dos regiones de producción; la primera, al norte y este de la Región Oriental, para los departamentos de San Pedro, Caaguazú, Amambay, Canindeyú y Alto Paraná norte, donde se recomienda iniciar la siembra desde el 25 de abril hasta los primeros 20 días del mes de mayo. La segunda zona bien definida, abarca el área de mayor superficie de cultivo, y comprende la región sur del país, departamentos de Misiones, Alto Paraná sur e Itapúa en donde se recomienda la siembra durante todo el mes de mayo y excepcionalmente, hasta los primeros días del mes de junio (Kohli et al., 2012).

1.1.2 Enfermedades del trigo importantes en Paraguay

Desde los inicios del cultivo comercial a escala en la década de 1970, las enfermedades como la roya de la hoja (RH), causada por *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* Erikss; el oídio, causado por *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* (Em. Marchal), la mancha marrón (MM), causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (Sivanesan, 1990) (teleomorfo *Cochliobolus sativus*) y la fusariosis de la espiga (FE), causada por el complejo *Fusarium graminearum* Schwabe 1839 (anamorfo); [teleomorfo = *Giberella zeae* (Schwein.: Fr.) Petch], fueron responsables de la irregularidad de la superficie como también de su producción. Posteriormente, aparecieron otras enfermedades como el rayado bacteriano causado por *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* ((Smith, Jones & Reddy) Dye), y la mancha amarilla (MA), causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. [anamorfo: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem], que fueron importantes en las décadas de 1980 y 1990, respectivamente. A fines de la década de 1990 y durante los años 2000 apareció la Pyricularia o brusone, causada por *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch and L.M. Kohn (sinónimo *Pyricularia oryzae*) patotipo *Triticum* (MoT), con sus efectos negativos para el cultivo, principalmente en años húmedos (Kohli, 2013).

La MA es una de las enfermedades más difundidas, sobre todo en el sistema de siembra directa y monocultivo, que se utiliza en alrededor del 90% de la producción de Paraguay (Viedma, 2010). Esta enfermedad es observada con mucha severidad en los años con verano seco, en los cuales se mantiene una gran cantidad de rastrojos de trigo sobre la superficie del suelo; las infecciones severas generan disminuciones significativas en el rendimiento y el peso hectolítrico, afectando además la calidad de los granos (Kohli, 2013).

La RH, es la enfermedad más común presente en el trigo (Kohli, 2013). Es una enfermedad endémica en el país, y su ocurrencia es independiente del sistema de labranza o las rotaciones utilizadas (Viedma, 2009), pues depende principalmente de la susceptibilidad de las variedades sembradas y la disponibilidad de inóculo regional. Las infecciones tempranas y graves pueden provocar una reducción significativa en el rendimiento de más de 50%, reduciendo el número de granos por espiga, el peso hectolítrico y la calidad de los granos (Kohli, 2013).

La MM es una enfermedad históricamente importante en el país, fue la responsable de los fracasos del cultivo en los primeros años, ya que infecciones tempranas pueden causar defoliación completa de las plantas, resultando en la reducción del rendimiento y la calidad de la producción (Kohli, 2013).

En Paraguay, la mayoría de las enfermedades de trigo aparecen en el estado de embuche a floración (estados Z4.3 a Z6.5 de la escala de Zadoks). A partir de esos estados fenológicos y si las condiciones son favorables las enfermedades se incrementan rápidamente. Las condiciones climáticas del país, que consiste en inviernos con moderadas a altas temperaturas y frecuentes lluvias, son ambientes muy favorables para la aparición de manchas foliares y la FE (Viedma, 2009).

En cuanto al manejo de las enfermedades, Kohli et al. (2012) recomiendan un manejo integrado que involucra el uso de variedades resistentes a un mayor número de enfermedades, adecuada rotación de cultivos, tratamiento de semillas y el control químico. Para la implementación de un sistema de manejo integrado se debe conocer, cuáles son las medidas de control preferenciales para cada enfermedad, estas medidas preferenciales, son aquellas que no tienen un costo adicional significativo para el productor y pueden ser implementadas antes de la siembra, por ejemplo, para la RH, la medida preferencial es la resistencia genética, y en segundo orden de preferencia el

control químico; para la MM la medida preferencial es el uso de semilla sana y rotación de cultivos y en último orden, el control químico (Carmona y Sautua, 2014).

1.1.3 Pyricularia o brusone del trigo

La Pyricularia o brusone del trigo, es una enfermedad causada por una sub población del hongo *Magnaporthe oryzae* (Sin. *Pyricularia oryzae*), la cual es distinta de otras poblaciones del patógeno, en cuanto a su rango de hospedantes, como la del arroz y otras gramíneas y fue denominada como *M. oryzae* patotipo *Triticum* (MoT) (Cruz y Valent, 2017). Desde su identificación por primera vez en el estado de Paraná en Brasil en 1985 (Igarashi et al., 1986), año tras año, se ha convertido en un problema sanitario endémico para la región sub tropical de Sudamérica, afectando principalmente a Brasil, Bolivia y Paraguay (Goulart y Paiva, 1992; Kohli et al., 2011).

Kohli et al. (2011) mencionan que es posible, que Cunfer et al. (1993), hayan observado la enfermedad en 1987, en la frontera de Brasil y Paraguay, sin embargo, la primera epifitía reportada en Paraguay fue en el año 2002 causando pérdidas de más del 70% en campos sembrados tempranamente (Viedma y Morel, 2002). En el año 2005 se presentó una fuerte epifitía de *Pyricularia* afectando unas 30000 hectáreas y las pérdidas de rendimiento oscilaron entre 50-80% en las parcelas afectadas (Viedma, 2009).

En Argentina, la Pyricularia del trigo fue reportada por primera vez en la provincia de Formosa en 2007 y en la provincia de Buenos Aires en 2012 (Cabrera y Gutierrez, 2007; Perelló et al., 2015). Fuera de Sudamérica, la Pyricularia del trigo fue informada en Bangladesh en 2016 (Malaker et al., 2016) y en Zambia, África en 2020 (Tembo et al. 2020).

Los fitopatólogos del Centro de Investigación de Trigo de Bangladesh, afirman que existe el peligro de que la enfermedad emerja en los países vecinos como China, India

y Pakistan, los cuales tienen condiciones climáticas similares y favorables para el patógeno, y ocupan el segundo, tercero y séptimo lugar en la producción mundial de trigo (Sadat y Choi, 2017).

1.1.3.1 Sintomatología y condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad

Síntomas y daños

La enfermedad puede atacar toda la parte aérea de la planta. En las hojas, las lesiones varían en forma y tamaño. Sin embargo, la infección típica de *M. oryzae* se caracteriza por atacar el raquis de la espiga; la porción superior al punto de infección se blanquea y no forma granos mientras que la porción inferior se mantiene sana y produce granos normales (Figura 1.2). Las pérdidas causadas por la enfermedad pueden variar desde daños menores hasta valores del 100%, en condiciones ambientales favorables (Goulart et al., 2007; Kohli et al., 2011; Cruz y Valent, 2017).



Figura 1.2: Síntoma típico de la Pyricularia en las espigas de trigo. Fuente: Alice Chávez, 2018.

Ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad

Días cálidos y húmedos durante los 60 días precedentes a la espigazón, favorecen la epifitía a nivel de campo (Fernandes et al., 2017), ya que la liberación de conidios ocurre con temperaturas entre 25 y 28°C y humedad relativa $\geq 93\%$ (Fernandes y Pavan, 2010). Los años con ataques severos de *Pyricularia*, han coincidido con años húmedos con la prevalencia del fenómeno El Niño, que se caracteriza por varios días de lluvias continuas y temperaturas promedio de 18 a 25°C durante la espigazón y floración (Kohli et al., 2011).

1.1.3.2 Características y biología de *Magnaporthe oryzae*

Reis et al. (2005), mencionan que *M. oryzae* presenta conidios piriformes, redondeados en la base y estrechos hacia el ápice, normalmente con dos septos, hialinos, los cuales se forman aisladamente en el ápice del conidióforo y miden entre 14-40 x 6-13 μm (Figura 1.3). Los conidióforos son septados y cada uno de ellos puede llevar hasta 20 conidios. Los conidios presentan un hilo basal en el punto de unión al conidióforo. Generalmente, los conidios germinan de las células apicales o de la célula basal, pero también pueden germinar de la célula central.

Entre los factores del ambiente que pueden influenciar el desarrollo del hongo se pueden mencionar los siguientes: la temperatura, que para la esporulación es óptima cercana a los 28°C, pudiendo ocurrir entre 10°C y 35°C y la liberación de esporas ocurre entre 15°C y 35°C; para la germinación se requieren entre 25°C a 28°C, y presencia de agua libre sobre la superficie que favorecen el proceso; la producción de conidios sobre las lesiones inicia cuando la humedad relativa alcanza un mínimo de 93% (Bedendo y Prabhu, 2005).

Moreira et al. (2015) mencionan que *M. oryzae* es heterotálica, es decir auto-incompatible, por lo tanto, la reproducción sexual solo es posible cuando se cruzan dos individuos de tipos sexualmente compatibles y que sean fértiles; esto ocurre cuando la estructura receptora femenina (ascogonio) está apta para recibir los núcleos del individuo compatible donador por medio de conidios o hifas (Figura 1.4).

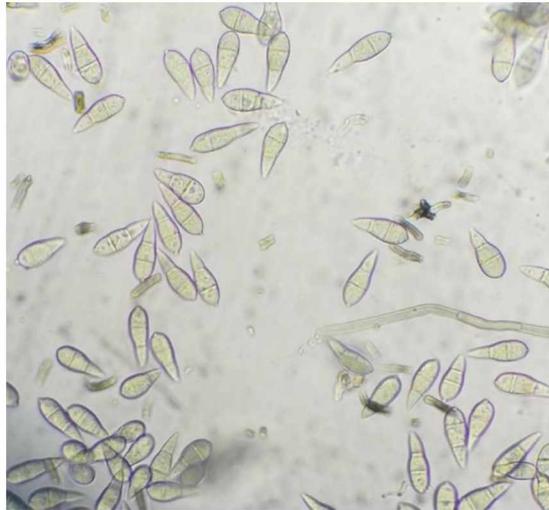


Figura 1.3: Conidios de *Magnaporthe oryzae* observados al microscopio óptico simple. Fuente: Alice Chávez, 2016.

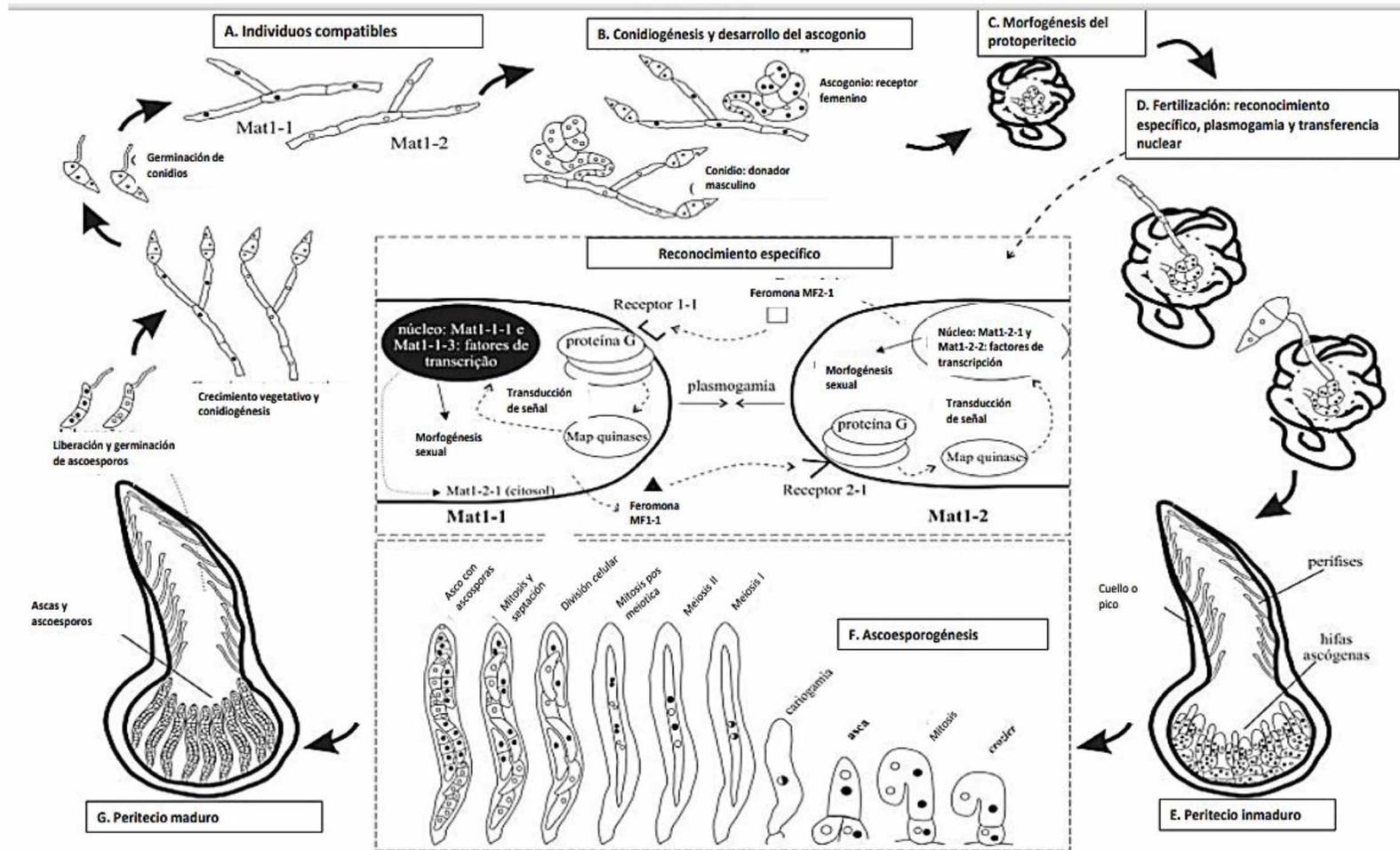


Figura 1.4: Esquema de la reproducción sexual de *Magnaporthe oryzae*. Fuente: Moreira et al., 2015.

El estado perfecto del hongo no se ha observado en la naturaleza (Perelló, 2014), sin embargo, se ha logrado inducir en condiciones *in vitro* o en tejidos senescentes de plantas la formación de peritecios negros, de cuello largo, con ascas unitunicadas, las cuales presentan ocho ascosporas, cada ascospora con tres septos (Moreira et al., 2015) (Figura 1.5).

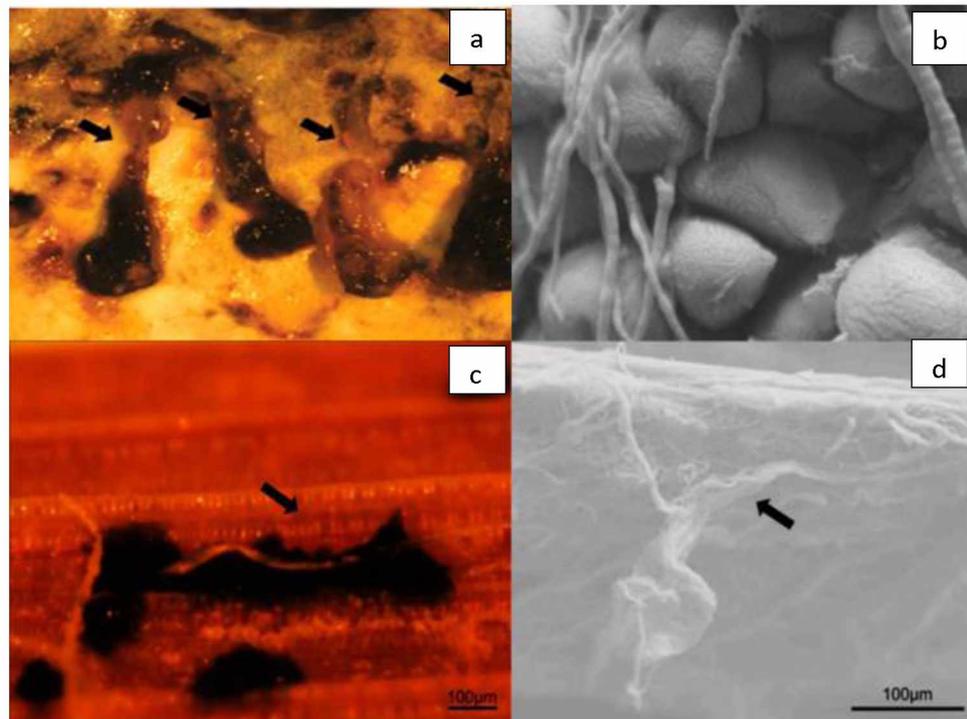


Figura 1.5: (a) Imagen en microscopio de luz de peritecios encontrados en medio de cultivo, presentando cuellos largos, removidos por escarificación; (b) Imagen en microscopio electrónico de barrido de varios protoperitecios desarrollándose en forma agrupada; (c) Imagen en microscopio electrónico de luz de peritecios desarrollados en forma agrupada parcialmente inmersos en el tejido vegetal; (d) Imagen de microscopio electrónico de barrido, corte transversal de un tallo con colonización micelial interna y peritecio con cuello largo. Fuente: Moreira et al., 2015.

Castroagudín et al. (2017) observaron la formación de estructuras reproductivas en tallos senescentes de trigo y otras malezas, y sugieren que la reproducción sexual ocurre durante la fase saprofítica del ciclo de la enfermedad en tejidos muertos; además postulan que *Phalaris camariensis* L., es una especie candidata para encontrar la fase sexual en el campo.

M. oryzae es parte de un complejo de especies compuesta por poblaciones de hongos que presentan especialización en el rango de hospedantes (Couch et al., 2005; Valent y Chumley, 1991). Debido a esta característica, la especie ha sido dividida en patotipos. Los patotipos de *M. oryzae* presentan un alto grado de especificidad hospedera. Se conoce que los aislados del patotipo *Triticum* son capaces de infectar otras especies cultivadas que incluyen avena negra, centeno y cebada, como también especies no cultivadas de gramíneas (Anjos y Charchar, 2000; Kohli et al., 2011; Mehta y Baier, 1998; Mehta et al., 2006; Sharma y Singh, 2020).

El hongo puede sobrevivir en restos de cultivo, hospedantes secundarios y semillas infectadas (Cruz y Valent, 2017; Pizolotto et al., 2018). Urashima et al. (2007) sugiere que el viento es el principal medio de dispersión y los conidios de un determinado foco pueden diseminarse a distancias de por lo menos 1000 metros. Una vez que el conidio alcanza la superficie de la planta germina, el tubo germinativo se diferencia en un apresorio y el apresorio penetra el tejido del hospedante (Figura 1.6). Las lesiones macroscópicas son observables a los 4-5 días luego de la penetración (Ribot et al., 2008).

Araujo et al. (2015) mencionan que en interacciones compatibles entre aislados de *M. oryzae* y trigo, la hifa penetra, coloniza las células epidérmicas y luego invade las células vecinas. En interacciones incompatibles, la hifa del patógeno no es capaz de penetrar y colonizar las células epidérmicas, y cuando ocurre penetración la hifa queda restringida a la primera célula epidérmica invadida.

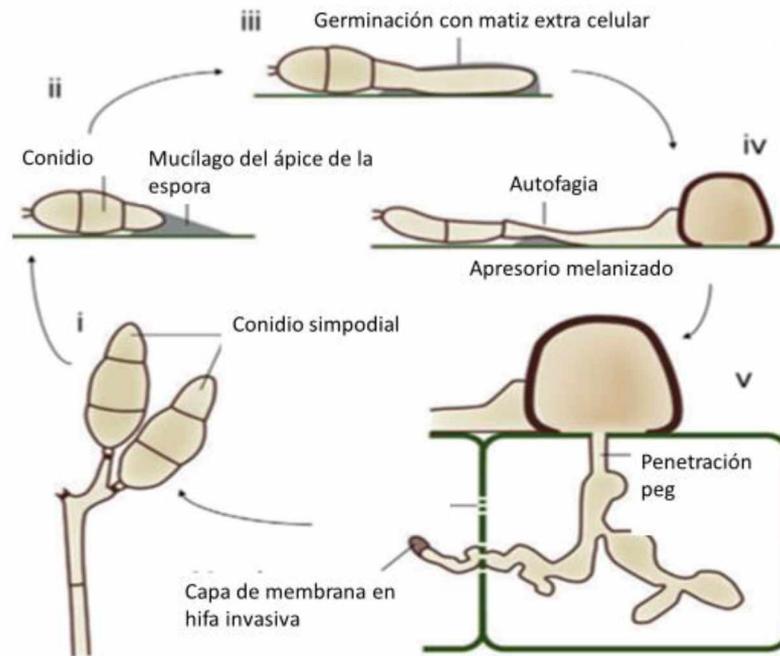


Figura 1.6: Proceso de germinación, formación de apresorio y penetración de conidios de *Magnaporthe oryzae*. Fuente: Boddy, 2016.

1.1.3.3 Epidemiología

Numerosas investigaciones se han realizado para estudiar los aspectos epidemiológicos de la enfermedad, sin embargo, todavía es necesario identificar fuentes de inóculo y esclarecer el rol de cada una de estas fuentes (Cruz y Valent, 2017).

Componentes relevantes de la epidemiología necesitan ser determinados incluyendo la dinámica y subsistemas asociados con la producción del inóculo que inicia y da soporte a una epifitía (Alves y Fernandes, 2006). Aun no se conocen los factores ecológicos y epidemiológicos que resultan en un extenso y casi sincronizado “blanqueamiento” de las espigas en los grandes campos comerciales (Cruz et al., 2015).

Goulart y Paiva (1990) mencionan que la transmisión del patógeno a través de semillas varía conforme a su incidencia en las mismas, para un lote de semillas con 21% de infección natural, la tasa de transmisión fue 2,1:1, lo cual implica que con una densidad de siembra 400 semillas/m², se tendrían 400000 focos de infección primaria por hectárea.

Los mismos autores mencionan que si las semillas infectadas logran germinar, el patógeno puede colonizar los nuevos tejidos como el coleóptilo, tallo y hojas primarias. Las semillas infectadas no muestran síntomas de la enfermedad y actúan como fuente de inóculo para nuevas áreas donde se cultiva trigo (Toledo y Escobar, 2002; Goulart y Paiva, 2000; Maciel et al., 2014).

Goulart et al. (2007) observaron que los daños e incidencia de la *Pyricularia* varían de acuerdo con la variedad utilizada y la región donde se cultivan, y que la pérdida de peso por espiga en promedio fue de 63,4% cuando la infección fue temprana, y de 46%, en infecciones tardías.

Gomes et al. (2017) mencionan que hay una reducción de la productividad y calidad fisiológica de las semillas de trigo en función de la concentración inicial de inóculo en el campo (5, 10, 20 y 30% de plantas inoculadas), y recomiendan estudiar con más detalles niveles de inóculo inicial menores al 20% de plantas inoculadas, para determinar con exactitud el valor estándar de tolerancia en condiciones de campo.

El inóculo proveniente de las hojas se considera importante en el ciclo de la enfermedad en otros patosistemas (Halmos, 1970). Si bien el hongo puede atacar toda la planta de trigo bajo condiciones favorables (Igarashi et al., 1986), poco se conoce acerca del potencial de las hojas como fuente de inóculo en condiciones de campo.

Por otro lado, Pizolotto et al. (2016) observaron que el hongo puede sobrevivir por 140 días en restos de plantas de trigo infectadas. Esto implicaría que los rastrojos no servirían como fuente de inóculo para el siguiente año, por lo que sugieren estudiar la presencia del hongo en otros hospedantes. En un estudio más reciente, los mismos autores afirman que la posibilidad de que el hongo sobreviva en los restos de cultivo de un ciclo a otro es muy baja, ya que no se observó esporulación del patógeno en los rastrojos luego de 154 días de exposición a las condiciones de campo (Pizolotto et al., 2018).

Estudiando los mecanismos de sobrevivencia de *M. oryzae* del arroz, Akase y Kusaba (2017) informaron que el hongo sobrevive en lesiones y semillas de malezas durante el invierno, sugiriendo que los hospedantes secundarios son el mecanismo por el cual el patógeno sobrevive de una estación a otra.

Entre las malezas y especies cultivadas estudiadas como posibles hospedantes secundarios, se ha reportado infección cruzada exitosa sobre trigo, con aislados de *Setaria geniculata* y *Brachiaria plantaginea* (Urashima y Kato, 1998); triticale (*X. Triticosecale*) (Mehta y Baier, 1998); cebada (*Hordeum vulgare*) (Urashima et al., 2004 b); Avena negra (*Avena strigosa*) y avena blanca (*Avena sativa*) (Marangoni et al., 2013); *Bromus catharticus* y *Lolium multiflorum* (Chávez y Kohli, 2015), y arroz (*Oryza sativa*) (Perelló et al., 2016).

En base a la literatura existente hasta el momento, el CIMMYT propone un modelo del ciclo de la enfermedad (Figura 1.7) en el cual la infección podría darse de las siguientes formas:

- 1- Semillas infectadas que dan origen a plantas con lesiones esporulantes: los conidios formados en esas lesiones pueden luego dispersarse en el aire e infectar otras plantas, permaneciendo en las hojas durante el ciclo del cultivo para luego pasar a las espigas.
- 2- Hospedantes secundarios: los conidios del patógeno pueden dispersarse en el aire a partir de lesiones esporulantes presentes en malezas, e infectar las plántulas de trigo, permaneciendo en las hojas para luego infectar las espigas.

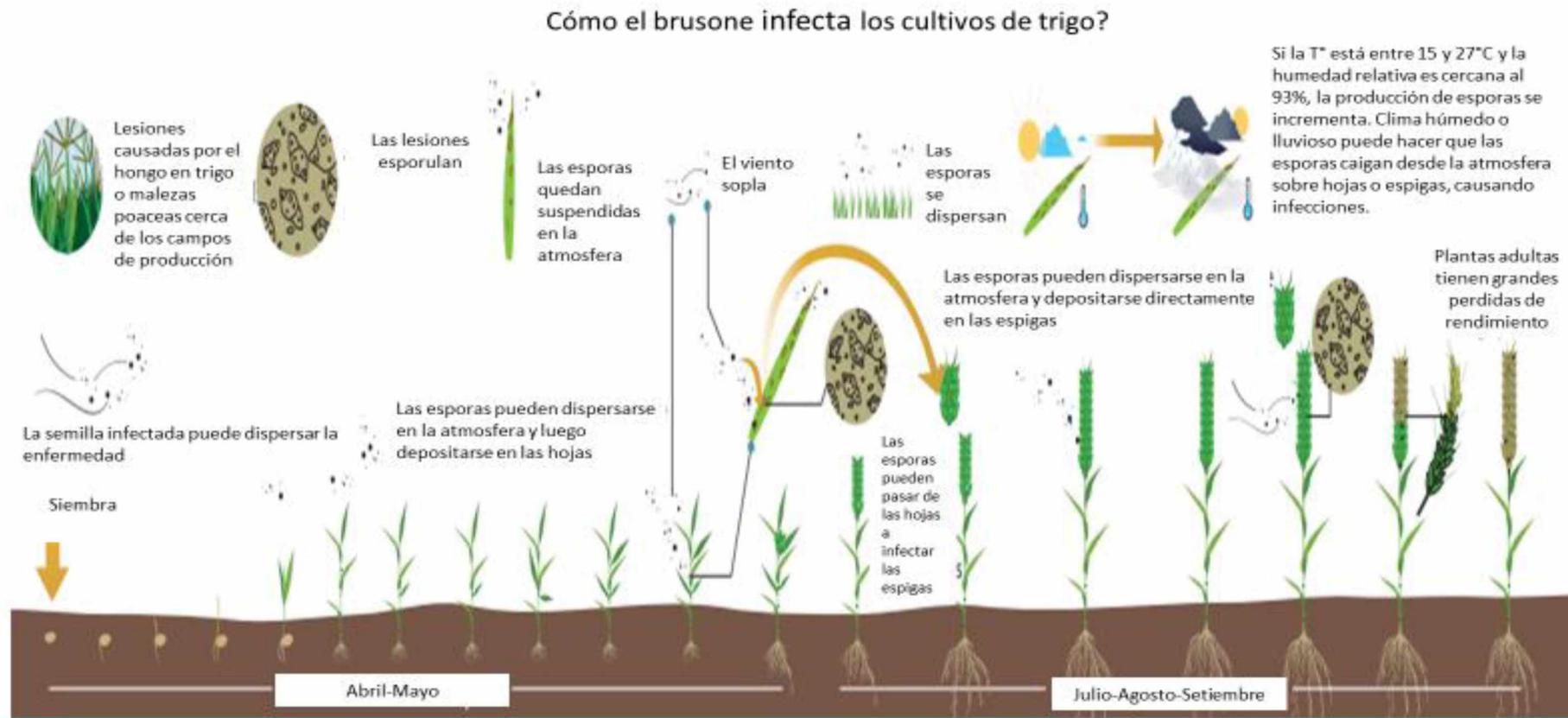


Figura 1.7. Modelo del ciclo biológico-agronómico de la Pycularia del trigo propuesto por el CIMMYT. Fuente: CIMMYT 2019a.

- 3- Los conidios presentes en el aire (provenientes de las hojas de trigo, hospedantes secundarios u otras fuentes) pueden infectar las espigas directamente.

Todo esto sucedería si se dan las condiciones ambientales favorables, es decir temperaturas entre 15 y 27°C y humedad relativa igual o superior al 93%.

1.1.3.4 Manejo integrado de la enfermedad

El control de la Pyricularia depende de un conjunto de medidas que deben ser adoptadas adecuadamente en el momento oportuno. Las medidas de control más recomendadas son la utilización de variedades con mayor nivel de resistencia y la siembra en épocas adecuadas (no tempranas) para las diferentes zonas de producción (Viedma, 2010). Además de estas medidas, pueden mencionarse la eliminación de hospedantes secundarios, tratamiento de semilla, control químico, etc.

Kohli et al. (2020) proponen una representación gráfica de los componentes del manejo integrado de la Pyricularia, cuya estrategia está compuesta en orden de importancia, por el uso de variedades resistentes, la siembra en época recomendada para la región, el uso de semillas sanas, el control químico y la rotación de cultivos (Figura 1.8).

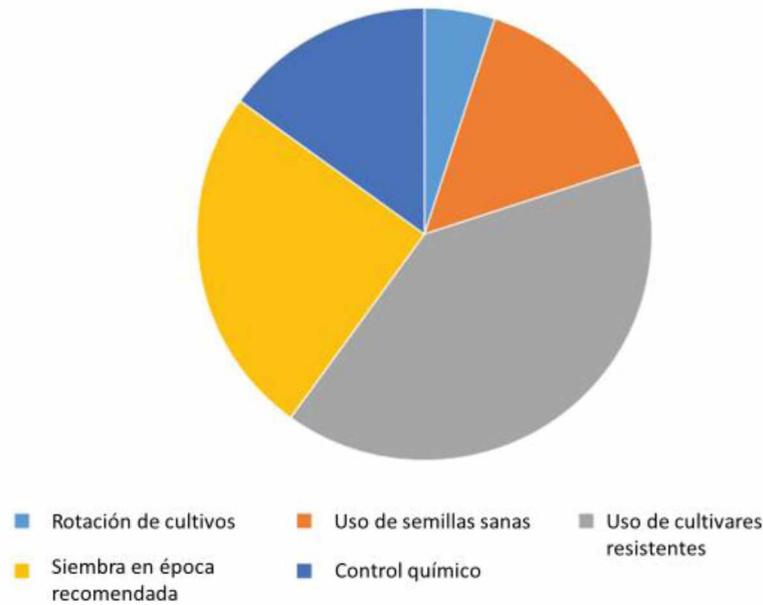


Figura 1.8: Componentes de una estrategia de manejo integrado de la Pyricularia del trigo en Sudamérica y su importancia. Fuente: Kohli et al., 2020.

Manejo de hospedantes secundarios

La eliminación de plantas voluntarias de trigo, así como malezas poáceas se considera esencial para reducir el inóculo inicial (Toledo y Escobar, 2002). Al respecto, el CIMMYT (2019b) menciona que aradas profundas buscando la eliminación de hospedantes secundarios, han sido recomendadas para reducir el riesgo de una epifitía en el siguiente periodo de cultivo, mediante la reducción de la cantidad de inóculo presente en la superficie del suelo, sin embargo, esta práctica resulta poco efectiva en regiones donde se utiliza el sistema siembra directa.

Épocas de siembra

En Paraguay se recomienda evitar las siembras en el mes de abril (siembras tempranas), ya que dichas siembras presentan una mayor posibilidad de ataque, coincidentes con el “veranillo de San Juan”, época caracterizada por frecuentes lluvias y temperatura elevada cuando el trigo se encuentra en plena floración (Viedma, 2009).

En un estudio realizado por Coelho et al. (2016), se observó que la época de siembra afecta significativamente el índice de la enfermedad, el peso de mil granos y el rendimiento de granos, independientemente de la resistencia de los materiales utilizados. En Brasil, Bolivia y Paraguay, los índices de la enfermedad pueden reducirse significativamente al retrasar la fecha de siembra. Sin embargo, en años húmedos coincidentes con el fenómeno El Niño, las epifitias ocurren independientemente de la fecha de siembra (Kohli et al., 2011; Perelló, 2014).

Resistencia genética

El desarrollo de variedades resistentes ha sido difícil debido al reducido número de fuentes de resistencia. Algunas variedades derivadas de Milan (VS73.600/MIRLO/3/BOBWHITE//YECORA 70/TRIFON), una línea del CIMMYT, presentan altos niveles de resistencia a la enfermedad, debido a la presencia de una translocación 2NS/2AS proveniente de *Triticum ventricosum* (Kohli et al., 2011). Esta translocación ha sido reportada como responsable de la resistencia de algunas variedades a múltiples patógenos como los causantes de la roya del tallo y de la hoja, nemátodos, y recientemente a la *Pyricularia* (Helguera et al., 2003; Cruz et al., 2016).

Si bien la translocación 2NS/2AS otorga resistencia a la *Pyricularia*, la resistencia varía en función del “background” genético, encontrándose genotipos desde susceptibles a resistentes (Cardozo et al., 2018).

La mayoría de las variedades sembradas actualmente en Paraguay son susceptibles a moderadamente susceptibles, y las pocas variedades resistentes, ya sean nacionales o brasileñas son todas derivadas de Milan, entre ellas Canindé 1 y CD 116 (Chávez y Kohli, 2018 a).

Además de la translocación 2NS/2AS, se han reportado otros genes de resistencia: *Rmg2* y *Rmg3* provenientes de la variedad de trigo hexaploide Thatcher; *Rmg7* proveniente de trigo tetraploide *Triticum diccocom* y *Rmg8* proveniente de un trigo hexaploide (Zhang et al., 2008; Tagle et al., 2015; Anh et al., 2015). Sin embargo, *Rmg2*, *Rmg3* y *Rmg7* solo confieren resistencia a los aislados más antiguos del hongo (1990-1992), y no a los aislados más recientes. Y el *Rmg8*, aún no ha sido probado con aislados recientes y bajo condiciones de infección natural (Cruz y Valent, 2017).

Recientemente, Cazal et al. (2018 a) evaluaron una colección de trigos sintéticos hexaploides perteneciente al CIMMYT, en condiciones de invernadero e identificaron dos genotipos resistentes a la Pyricularia, el TS29 (DOY1/AE. SQUARROSA (511)) y el TS49 (LCK59.61/Ae. SQUARROSA (313)). Los autores mencionan que estos materiales pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento y pueden ser combinados entre sí.

Control químico

En general, el control químico presenta una baja eficiencia (30-67%) por lo cual debe ser acompañado por otras medidas de control (Viedma, 2010).

Kohli et al. (2011) mencionan que la aplicación de fungicidas no es efectiva cuando se utilizan variedades susceptibles, el tratamiento de semillas ayuda a eliminar la infección de la semilla, pero no protege a la planta de las infecciones posteriores en la espiga.

Cruz et al. (2015) mencionan que la aplicación foliar de fungicidas, reduce entre 62 a 77% la cantidad de conidios del patógeno presentes en el canopeo del cultivo, y por lo tanto es una alternativa válida para reducir la incidencia de la enfermedad.

En general, se recomienda la aplicación de fungicidas del grupo de los triazoles en mezcla con estrobilurinas en floración (Kohli et al., 2011). Sin embargo, Castroagudin et al. (2015) y Oliveira et al. (2015) informaron que existe resistencia cruzada a las estrobilurinas (azoxistrobina y piraclostrobina) en la población de *M. oryzae* del trigo en Brasil. Dicha resistencia se debe a la presencia de la mutación G143A asociada con la resistencia a fungicidas del grupo inhibidores de la quinona externa (QoI). De acuerdo con los autores, la frecuencia de la mutación en la población del patógeno, se incrementó de 36% en el 2005 a 90% en el 2012. En Argentina, se ha informado sobre la pérdida de sensibilidad *in vivo* de *P. grisea* del arroz a mezclas de fungicidas (Dirchwolf et al., 2015).

También se ha reportado que aislados de *Pyricularia* spp. provenientes de malezas presentes en campos de trigo han mostrado resistencia a fungicidas triazoles, por lo que se considera que las malezas son una importante fuente de inóculo resistente a los triazoles (Dorigan et al., 2019).

Recientemente, Cruz et al. (2019) analizaron la eficiencia del uso de fungicidas para el control de la *Pyricularia* en 23 ambientes de Brasil y Bolivia, y determinaron que las medidas de control químico pueden tener resultados diferentes dependiendo del país y de la presión ejercida por la enfermedad, pudiendo los productos ser efectivos en una región, pero no en otra. Así en Brasil, fueron más efectivos los fungicidas a base de mancozeb, mientras que en Bolivia los menores índices de la enfermedad se obtuvieron con mezclas de QoI e inhibidores de la biosíntesis de esteroides (DMI).

Modelos de predicción

Cardoso et al. (2008) estudiaron el efecto de la temperatura y la duración del periodo de humedad sobre la intensidad de la *Pyricularia*, y observaron que las variaciones en la intensidad de la enfermedad en función de la temperatura, eran

explicadas por un modelo Beta generalizado, mientras que las variaciones en función del periodo de humedad eran explicadas por el modelo Gompertz; de acuerdo con esto, crearon un modelo en el cual la intensidad de la Pyricularia es función de la temperatura y duración del periodo de humedad. En base a esa ecuación construyeron tablas de predicción de la intensidad de la Pyricularia.

En un trabajo más reciente, Fernandes et al. (2017) crearon un modelo de predicción de epifitias de Pyricularia, utilizando un set de datos históricos de las condiciones ambientales y epifitias de Pyricularia (2001-2012) del estado de Paraná, Brasil. Estos autores, observaron que condiciones de alta humedad y calor durante los 60 días precedentes a la floración del trigo, fueron los factores clave para la construcción y dispersión del inoculo en el campo, así como en otras fuentes de inóculo adyacentes. Basándose en variables climáticas diarias (temperatura y humedad relativa) y variables epidémicas, identificaron un parámetro llamado día favorable de infección (DFI); un exitoso DFI está condicionado por los parámetros inóculo potencial ($IP > 30$) y la nube de esporas ($SPOR > 4$), utilizando estos parámetros el modelo predijo correctamente los años epidémicos y no epidémicos en el estado de Paraná.

1.1.3.5 Antecedentes filogenéticos de *Magnaporthe oryzae*

Desde el primer reporte de la Pyricularia del trigo, a lo largo de los años existió una confusión en la literatura acerca de la denominación del agente causal, siendo inicialmente denominado *M. oryzae*, y luego *M. grisea* (Cruz y Valent, 2017). Con los estudios de relación genética, infección de hospedantes y especificidad de cruas, se determinó que los aislados de trigo pertenecían a la especie *M. oryzae* (Couch et al., 2002; Couch et al., 2005). Sin embargo, Castroagudín et al. (2016) sugieren que existen dos especies que atacan trigo, una que es *M. oryzae* y la otra, que pertenece a una nueva

especie que denominaron *Pyricularia graminis-tritici*. La aceptación de esta nueva especie está en debate, y actualmente existen dos grupos de investigadores, uno que sostiene la ocurrencia de la nueva especie *P. graminis-tritici* (Castroagudín et al., 2016; Ceresini et al., 2019) y el otro, que sostiene la ocurrencia de patotipos de *M. oryzae* (Cruz y Valent, 2017; Valent et al., 2019).

Basándose en el análisis molecular, Kato et al. (2000) sugieren que los aislados de *M. oryzae* de cereales forman un grupo genéticamente cercano con un origen filogenético común, pero difieren en su patogenicidad en la especie hospedante. En base a esta patogenicidad, los aislados de *M. oryzae* han sido clasificados en patotipos teniendo así los patotipos Oryza (*Oryza sativa* L.), Setaria (*Setaria itálica* (L.) Beauv.), Panicum (*Panicum millaceum* L.), Eleusine (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), Triticum (*Triticum aestivum* L.), Avena (*Avena sativa* L.) y Lolium (*Lolium perenne* L.) (Kato et al., 2000; Urashima et al., 2004; Tosa et al., 2004).

Debido a que los patotipos son morfológicamente indistinguibles, Pieck et al. (2017), desarrollaron un marcador molecular único para el patotipo *Triticum*, el MoT3 que fue probado con 284 aislados del hongo, incluidos dos aislados de *Bromus tectorum* provenientes de Paraguay, de los cuales, uno amplificó el marcador. Sin embargo, Gupta et al. (2018) reportaron que este marcador no les permitió diferenciar entre los patotipos de trigo y arroz aislados en Bangladesh. En respuesta a estas observaciones, Yashuara-Bell et al. (2019), realizaron comparaciones con los mismos aislados reportados por Gupta et al. (2018) y determinaron que el marcador sí distingue entre ambos patotipos, y que los demás datos provistos por Gupta et al. (2018), dan soporte a la especificidad del MoT3.

1.2 Objetivos

- 1- Cuantificar la densidad de conidios de *M. oryzae* presentes en las hojas de trigo en condiciones de campo en Paraguay.
- 2- Identificar malezas hospedantes de *M. oryzae* en las principales zonas productoras de trigo en Paraguay.
- 3- Diagnosticar por métodos moleculares el patotipo *Triticum* de *M. oryzae* a partir de los aislados de las malezas que hayan sido capaces de infectar al trigo en pruebas de infección cruzada.
- 4- Monitorear la presencia y el movimiento de conidios de *M. oryzae* en el aire durante el ciclo del cultivo.

1.3 Hipótesis

- 1- Los conidios de *M. oryzae* se desarrollan en las hojas de trigo durante el ciclo del cultivo y constituyen una potencial fuente de inóculo para las espigas.
- 2- Las malezas principalmente de la familia Poaceae (*Bromus catharticus* Val., *Avena strigosa* Schreb., *Eleusine indica* (L.) Gaertn, *Lolium multiflorum* Lam., *Cenchrus echinatus* L. entre otras), presentes en los campos de trigo, son hospedantes del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*, actuando como fuente de inóculo para el cultivo y como medio de supervivencia de una estación a otra.
- 3- Los aislados de *Magnaporthe* obtenidos de las malezas que sean capaces de infectar al trigo, pertenecen al patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.
- 4- El aire actúa como un mecanismo de dispersión de los conidios de *M. oryzae*, llevándolos desde las hojas de trigo y de malezas hasta las espigas durante el ciclo del cultivo.

CAPÍTULO 2

Cuantificación de conidios de *Magnaporthe oryzae* en hojas de trigo en condiciones de campo en Paraguay y monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo

2.1 Introducción

El hongo *M. oryzae* puede atacar toda la planta de trigo bajo condiciones favorables (Igarashi et al., 1986). Sin embargo, los síntomas en hojas no son tan evidentes en el campo, sólo son observados en variedades altamente susceptibles y en algunos ambientes específicos (Kohli et al., 2011; Cruz y Valent, 2017).

Los síntomas en hojas inician como lesiones acuosas de color gris verdoso, que posteriormente se convierten en manchas elípticas con bordes oscuros y centros cenicientos. En Bolivia, lesiones esporulantes de *M. oryzae* en hojas verdes y senescentes de trigo fueron observadas durante la espigazón (Cruz et al., 2015).

Bajo condiciones de invernadero, los primeros síntomas en plántulas de trigo aparecen 48 horas después de ser inoculadas (Cruz et al., 2016). La formación de nuevos conidióforos y conidios ocurre a partir de las 120 horas después de la inoculación, es decir el tiempo necesario para que una nueva generación aparezca es de 5 días. Por otro lado, en condiciones controladas, Cruz et al. (2015) observaron un promedio de 1.669.000 conidios/g de hojas basales secas, en plantas provenientes de semillas infectadas, por lo que consideran a las hojas basales como una potencial fuente de inóculo.

En cuanto a la dinámica de dispersión del patógeno, se considera que el aire es el principal mecanismo de dispersión, pudiendo los conidios de un foco dispersarse a distancias de por lo menos 1000 metros (Urashima et al., 2007). Los factores climáticos que mejor predicen el comportamiento del flujo de conidios en el aire son la humedad relativa del aire, la temperatura media y las precipitaciones diarias menores a 5 mm (Danelli, 2015).

Considerando la escasez de información acerca del potencial de las hojas como fuente de inóculo en condiciones de campo y de la dinámica de dispersión de los conidios

a través del aire, se hace necesario realizar trabajos que analicen el comportamiento del patógeno, en cuanto a estos dos componentes epidemiológicos.

Para dar cumplimiento a los objetivos 1 y 4, en este capítulo se cuantifican los conidios de *M. oryzae* presentes en las hojas de trigo y monitorea la presencia de conidios en el aire en condiciones de campo en Paraguay.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Recolección de muestras de hojas

Para evaluar la presencia de conidios de *M. oryzae* en las hojas de trigo, se realizaron muestreos de hojas en 3 campos comerciales, de los tres principales departamentos de producción de trigo de Paraguay: Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú, totalizando 9 campos (Figura 2.1). Las coordenadas geográficas de los campos comerciales muestreados se presentan en la Tabla 2.1, y los datos de cada campo en el apéndice 6.3.

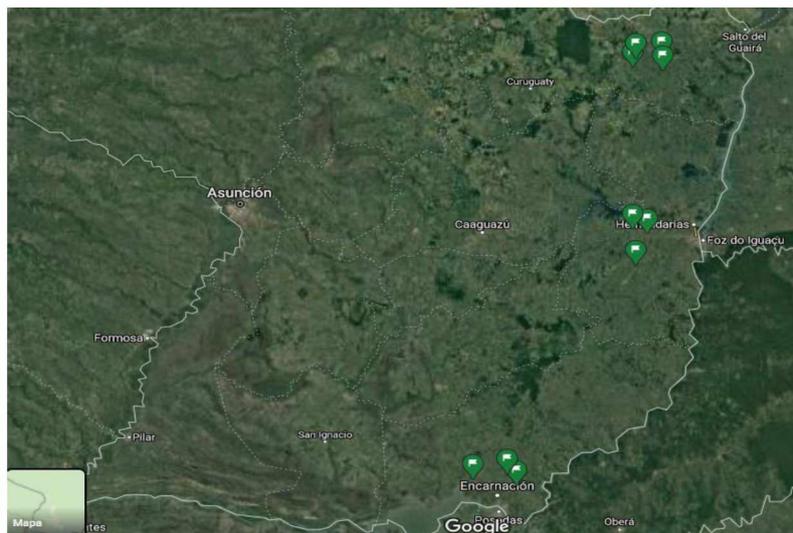


Figura 2.1: Ubicación de los puntos de muestreo para la recolección de muestras de hojas de trigo, en los departamentos de Canindeyú, Alto Paraná e Itapúa durante el ciclo 2018.

Con el fin de asegurar la obtención de datos que provengan de un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad ($T^{\circ} = 25$ a 28°C y humedad relativa $\geq 93\%$ (Fernandes y Pavan, 2010), se instaló una parcela con riego por aspersión dentro del Campo Experimental Yhovy (CEY) del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), departamento de Canindeyú (coordenadas latitud sur $24^{\circ} 16' 25''$ longitud oeste $55^{\circ} 1' 4''$) (Figura 2.2).

Tabla 2.1: Coordenadas geográficas de los campos comerciales de trigo muestreados para la recolección de muestras de hojas en los departamentos de Alto Paraná, Itapúa y Canindeyú, Paraguay.

Campo N°	Departamento	Latitud (° Sur)	Longitud (° Oeste)	Localidad
1	Alto Paraná	25° 27' 17''	55° 2' 36''	Colonia Yguazú, Centro Tecnológico Agropecuario del Paraguay (CETAPAR)
2	Alto Paraná	25° 28' 58''	54° 56' 37''	Colonia Yguazú
3	Alto Paraná	25° 42' 1''	55° 1' 20''	Tavapy
4	Itapúa	27° 7' 17''	55° 51' 8''	La Paz
5	Itapúa	26° 21' 20''	55° 14' 19''	Carmen del Paraná
6	Itapúa	27° 12' 2''	55° 47' 27''	Capitán Miranda, Centro de Investigación Capitán Miranda (CICM), IPTA
7	Canindeyú	24° 15' 37''	54° 51' 9''	Corpus Christi
8	Canindeyú	24° 21' 34''	54° 50' 40''	Katuete
9	Canindeyú	24° 20' 18''	55° 2' 17''	Yvyrarovana

Teniendo en cuenta que la temperatura media durante el invierno en Paraguay, es de 20°C , pudiendo darse máximas de 38°C (Naumann y Coronel, 2008), la parcela bajo riego tuvo la finalidad de garantizar las condiciones de humedad necesarias para la aparición del patógeno, teniendo así una referencia con la cual comparar los datos obtenidos de los campos muestreados.



Figura 2.2: Parcela instalada en el CEY, con sistema de riego por aspersión. Fuente: Alice Chávez, 2018.

Semillas de la variedad susceptible Canindé 11 (Chávez y Kohli, 2018 a) fueron tratadas con fungicida (Carbendazim 15% + Tiram 35%), considerando que dichos principios activos son eficientes para el control de *M. oryzae* en semillas de trigo (Goulart y Paiva, 1993). Con el fin de abarcar un espectro diverso de condiciones ambientales, las semillas fueron sembradas en tres fechas de siembra en el CEY. La primera época fue sembrada el 8 de abril (siembra temprana), la segunda, el 10 de mayo (época normal) y la tercera el 6 de junio (siembra tardía). Para cada época se sembraron dos bloques de 1 metro de ancho por 10 metros de largo, con una separación de 0,5 metros entre bloques y 1 metro entre los bloques de cada época, los surcos estuvieron distanciados a 20 cm entre sí. El ensayo fue instalado en medio de la parcela destinada a evaluar materiales resistentes a la Pyricularia, con picos aspersión de 8 metros de diámetro de cobertura y caudal de 200 litros de agua/hora, generando una lámina de 3,98 mm por hora (Figura 2.3). El riego se realizó dos veces al día, una hora por la mañana y una hora por la tarde.

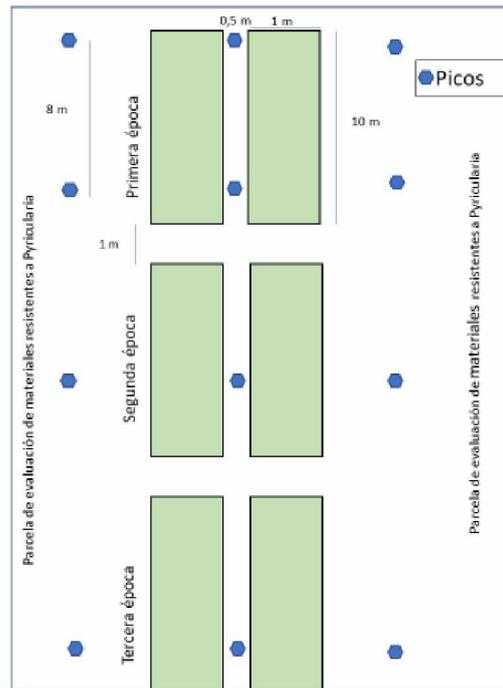


Figura 2.3: Croquis de la parcela instalada en el CEY.

Los muestreos se realizaron a partir de los 30 días de la emergencia. Se colectó la hoja más vieja, es decir la hoja más cercana al suelo, una vez al mes. Se tomaron 10 hojas en 10 puntos al azar dentro de cada campo, totalizando 100 hojas por campo (March et al., 2013). En total se realizaron tres muestreos por campo durante el ciclo de cultivo.

Al final del ciclo de cultivo, se realizó un muestreo de las espigas en 10 puntos al azar dentro de cada campo muestreado. Se cuantificó el número de espigas infectadas en una superficie de 1 m², es decir un total de 10 m². El porcentaje de infección fue correlacionado con la presencia de conidios en las hojas durante el ciclo. También se cuantificó el número total de espigas, y el número de espigas con síntomas en cada uno de los bloques sembrados en el CEY. Se determinó la incidencia con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{N^{\circ} \text{ de espigas con síntomas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de espigas}}$$

Para un mejor análisis y comprensión de los resultados obtenidos, los datos diarios a nivel país, de temperatura media, precipitación y humedad relativa del año 2018 fueron obtenidos de la Dirección de Meteorología e Hidrología, de la Dirección Nacional de Aeronáutica Civil (DINAC). Con estos datos se elaboraron dos gráficos; uno con la temperatura media, precipitación y porcentaje de humedad relativa semanal desde marzo a setiembre de 2018 (Figura 2.4), y otro en el cual se relaciona la precipitación y el porcentaje de humedad relativa (Figura 2.5).

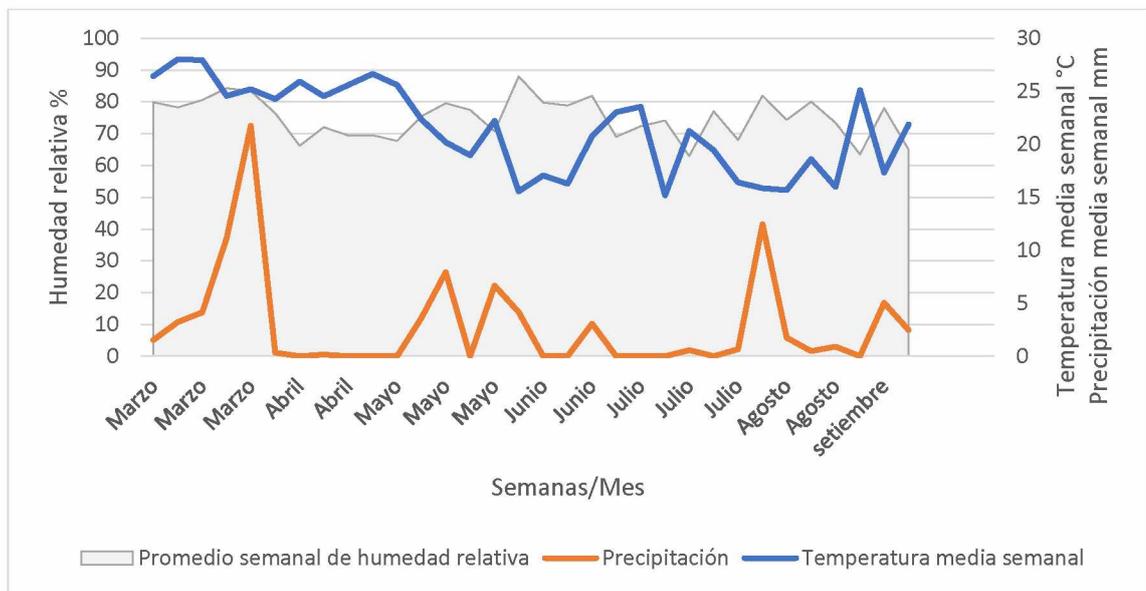


Figura 2.4: Temperatura media, precipitación y humedad relativa semanales durante los meses de marzo a setiembre de 2018 en Paraguay. Fuente: Dirección de Meteorología e Hidrología, Dirección Nacional de Aeronáutica Civil, DINAC.

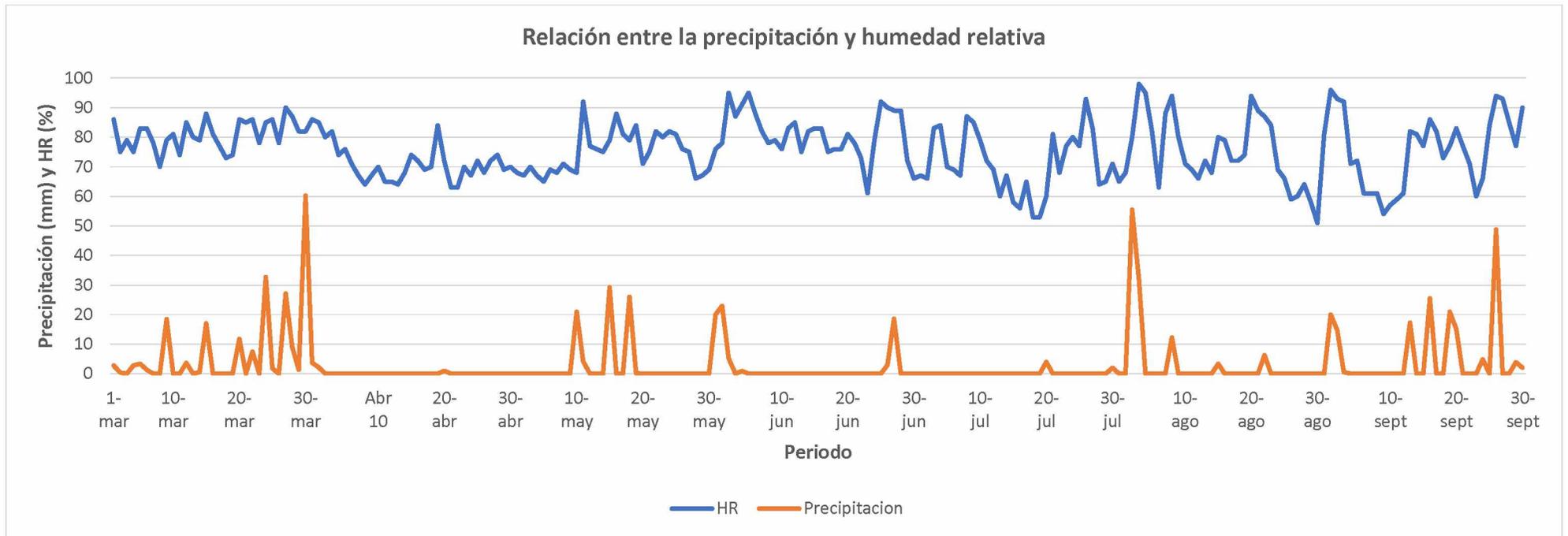


Figura 2.5: Relación entre la precipitación diaria (mm) y porcentaje de la humedad relativa diaria durante los meses de marzo a setiembre de 2018 en Paraguay.

Los datos fueron analizados mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney utilizando el software estadístico PAST v 4.03 (Hammer et al., 2001). Se realizaron comparaciones del número de conidios/g de hojas basales secas por departamento para los 9 campos muestreados; por época de siembra para las tres épocas sembradas en el CEY, y una comparación general entre los 9 campos comerciales muestreados y la parcela instalada en el CEY teniendo en cuenta la presencia o no, del sistema de riego.

2.2.2 Procesamiento de las muestras de hojas en laboratorio

El procesamiento de las hojas recolectadas se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB), perteneciente al IPTA, Caacupé, departamento de Cordillera.

Para cuantificar la presencia de conidios de *M. oryzae* en las hojas de trigo, las 10 hojas de cada punto fueron secadas a temperatura ambiente y separadas en grupos de 5 hojas, fueron pesadas, cortadas en trozos de 1,5 cm, y puestas en cámara húmeda en placas de Petri por tres días a 25°C y fotoperíodo de 12 horas (Figura 2.6). Después de este tiempo, las hojas fueron colocadas en tubos de ensayo con 5 ml de una solución de Tween 20 al 0,01%, los cuales fueron agitados utilizando un vortex para favorecer la dispersión de conidios.

El conteo de conidios fue realizado con un hematocitómetro de Neubauer, tomando una muestra de 100µL de la suspensión, y realizando cinco conteos por cada tubo (Cruz et al., 2015). Los datos obtenidos fueron expresados en conidios/g de hojas secas.

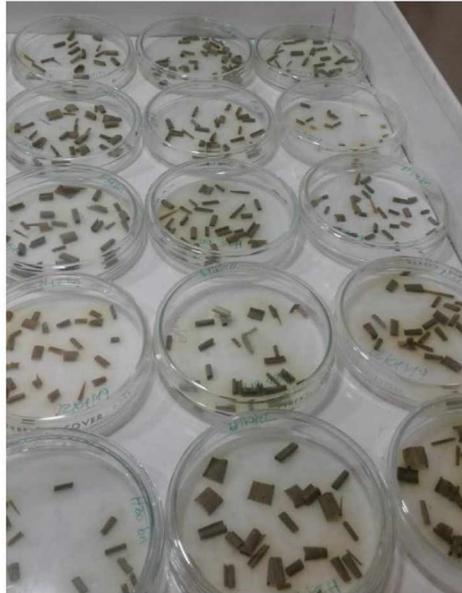


Figura 2.6: Hojas de trigo cortadas y puestas en cámara húmeda. Fuente: Alice Chávez, 2018.

Para determinar que los conidios observados pertenecían a *M. oryzae*, una parte de las muestras fue colocada en cámara húmeda por 72 horas y analizada bajo microscopio para su identificación mediante la clave de Barnett y Hunter (1998). Posteriormente, se realizó una extracción de ADN total de las muestras para una PCR convencional, utilizando los marcadores moleculares Pot-2a y MoT3 (procedimiento explicado en el capítulo 3).

2.2.3 Monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo

Para entender la dinámica de dispersión del hongo, se colocaron trampas caza esporas giratorias en función del viento. Estas fueron construidas de acuerdo con Reis y Santos (1985) y colocadas a una altura de 10 cm por encima de la altura del cultivo (Figura 2.7). En cada trampa se colocó un portaobjeto impregnado con vaselina semisólida, el cual permaneció en la trampa por 48 horas, y fue retirado para realizar el conteo de conidios colectados, al microscopio. Para ello se colocó una gota de agua en dos

posiciones del portaobjeto, teniendo así dos campos de observación de superficie conocida (cubreobjeto de 24 mm x 32 mm). La identificación de los conidios se realizó mediante la clave de identificación de Barnett y Hunter (1998).

Se realizó una lectura semanal y los resultados fueron expresados como número de conidios en función del tiempo. Carmona et al. (1999) utilizaron esta metodología para cuantificar conidios de *Drechslera teres*.



Figura 2.7: Trampas caza-esporas construidas de acuerdo con Reis y Santos (1985). Fuente: Alice Chávez, 2018.

Estas trampas fueron colocadas en el centro de cada parcela, una trampa por parcela, en los siguientes centros de investigación: CEY, en el departamento de Canindeyú, Centro de Investigación Capitán Miranda (CICM) en el departamento de Itapúa, y en el Centro Tecnológico Agropecuario del Paraguay (CETAPAR) en el departamento de Alto Paraná. La elección de estos tres puntos se basó por su localización geográfica en el área comercial de trigo en Paraguay y también en la disponibilidad de colaboradores que se encargaron del cuidado y colocación de los portaobjetos de forma semanal.

Los resultados obtenidos, fueron relacionados con los datos de conidios en hojas e incidencia en espigas de cada punto.

2.3 Resultados

2.3.1 Cuantificación de conidios de *Magnaporthe oryzae* en hojas de trigo colectadas en los campos comerciales en Paraguay

Se registró la presencia de conidios del hongo en las hojas colectadas en los campos N° 2, 3, 4, 7 y 9 correspondientes a las localidades de Colonia Yguazú, Tavapy (Alto Paraná), La Paz (Itapúa), Corpus Christi e Yvyrarovaná (Canindeyú), respectivamente (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Valores mínimos y máximos, medias, coeficiente de variación (CV) y desvío estándar (DE) del número de conidios/g de hojas basales secas observados en muestras colectadas en los campos comerciales de trigo en Paraguay.

Campo N°	Fecha de recolección	Valor mínimo	Valor máximo	Media	CV	DE
1	11/07/18	0	0	0	0	0
	16/08/18	0	0	0	0	0
	18/09/18	0	0	0	0	0
2	7/06/18	0	0	0	0	0
	12/07/18	0	3636,36	637,38	191,18	1218,58
	17/08/18	0	6666,67	1091,75	172,94	1888,12
3	7/06/18	0	5000	1500	153,96	2309,4
	12/07/18	0	0	0	0	0
	17/08/18	0	0	0	0	0
4	7/06/18	0	10000	3940,48	99,74	3930,2
	12/07/18	0	58181,82	6518,02	226,44	14759,56
	17/08/18	0	0	0	0	0
5	12/07/18	0	0	0	0	0
	17/08/18	0	0	0	0	0
	19/09/18	0	0	0	0	0
6	12/07/18	0	0	0	0	0
	17/08/18	0	0	0	0	0
	19/09/18	0	0	0	0	0
7	6/06/18	0	4444,44	277,78	400	1111,11
	11/07/18	0	0	0	0	0
	16/08/18	0	0	0	0	0
8	6/06/18	0	0	0	0	0
	11/07/18	0	0	0	0	0
	16/08/18	0	0	0	0	0
9	6/06/18	3077	15000	8731,5	42,01	3667,96
	11/07/18	0	0	0	0	0
	16/08/18	6250	28000	11431,69	57,04	6520,15

Las medias variaron entre 277 y 11431 conidios/g de hojas basales secas, observándose valores mínimos de 0 a 6250, y valores máximos entre 0 y 58181 conidios/g. En los cuatro campos restantes, no se observó la presencia de conidios durante los tres meses de muestreo. Los coeficientes de variación (CV) fueron muy altos en todos los campos variando entre 57 y 400, debido a la presencia de varias muestras con valores de cero.

En la comparación del número de conidios/g de hojas basales secas por departamento, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencia significativa entre los mismos (valor H: 4,369; p- valor: 0,0008011); se aplicó una prueba de Mann-Whitney para la comparación de a pares, la cual mostró que existe diferencia estadística significativa entre el departamento de Canindeyú y los departamentos de Itapúa (valor U: 14470,5; valor p:0,002777) y Alto Paraná (valor U: 14357,5; valor p: 0,001588), mientras que no existió diferencia significativa entre los departamentos de Itapúa y Alto Paraná (valor U: 16198; valor p: 0,9974).

En la parcela bajo riego instalada en el CEY, se observó la presencia de conidios en las muestras colectadas durante las tres épocas de siembra (Tabla 2.3).

La primera época de siembra en abril presentó la mayor cantidad de conidios/g de hojas basales secas con valores mínimos entre 1538 y 12500 conidios/g y valores máximos entre 46000 y 207059 conidios/g. La media varió entre 28748 y 82393 conidios/g.

En la segunda época de siembra en mayo, los valores mínimos oscilaron entre 0 y 3636 conidios/g, mientras que los valores máximos entre 5000 y 49412 conidios/g; la media fue de 1812 a 14367 conidios/g. En la tercera época de siembra en junio, los valores mínimos observados fueron cero y los valores máximos, entre 16000 y 57143 conidios/g; y la media fue 5114 a 11978 conidios/g.

Tabla 2.3: Valores mínimos y máximos, medias, coeficiente de variación (CV) y desvío estándar (DE) del número de conidios/g de hojas basales secas observados en muestras colectadas en la parcela instalada en el Campo Experimental Yhovy, Paraguay, durante las tres épocas de siembra.

Época	Fecha de recolección	Valor mínimo	Valor máximo	Media	CV	DE
Primera Siembra 8 de abril de 2018	11/05/18	12500	46000	28381,88	33,75	9579,4
	6/06/18	8421	207059	82393,31	86,96	71651,66
	11/07/18	1538	129600	28748	118,17	33970,41
Segunda Siembra 10 de mayo de 2018	6/06/18	3636	32000	14367,5	52	7471,29
	11/07/18	0	49412	11641,88	97,03	11296,02
	16/08/18	0	5000	1812,25	103,4	1873,91
Tercera Siembra 6 de junio de 2018	11/07/18	0	16000	5114	111,36	5694,96
	16/08/18	0	57143	11978,69	113,04	13541,05

El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis, mostró diferencias significativas en el número de conidios/g de hojas basales secas según la época de siembra (valor H: 54,53; valor p: $9,93 \cdot 10^{-13}$). La prueba de Mann-Whitney, mostró diferencias significativas entre la primera y la segunda época de siembra (valor U: 579; valor p: $1,35 \cdot 10^{-10}$); así también entre la primera y la tercera época de siembra (valor U: 334; valor p: $9,70 \cdot 10^{-10}$); no existió diferencia significativa entre la segunda y la tercera época de siembra (valor U: 1083,5; valor p: 0,4031).

En la comparación general realizada entre la parcela instalada en el CEY y los campos de producción comercial teniendo en cuenta como factor de diferencia la presencia del sistema de riego (humedad continua), la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas del número de conidios/g de hojas basales secas cuantificados en ambos ambientes (valor H: 174,1; valor p: $3,91 \cdot 10^{-65}$).

2.3.2 Cuantificación del número de espigas enfermas y correlación con el número de conidios/g observados en hojas

Debido a las condiciones climáticas adversas para el desarrollo de la enfermedad, no se observó la presencia de espigas con síntomas en los 9 campos muestreados. Sin embargo, hubo espigas infectadas en las parcelas bajo riego en el CEY, y que fueran sembradas en tres épocas. El mayor porcentaje de espigas enfermas se observó en la primera época, de siembra en abril. Los porcentajes de espigas enfermas en las tres épocas de siembra se presentan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Cantidad total de espigas, cantidad de espigas con síntomas y porcentaje de espigas enfermas en las tres épocas de siembra en el CEY, Paraguay.

Época	Cantidad total de espigas (en 20 m²)	Cantidad de espigas con síntomas	Incidencia% DE: 5,2
Primera	7954	896	11,26
Segunda	8358	193	2,31
Tercera	4426	98	2,21

En la Figura 2.8 se presenta un gráfico de la dinámica del número de conidios/g de hojas basales secas observados en la parcela instalada en el CEY durante las tres épocas de siembra. Esto permite observar la variación en el número de conidios en cada época de siembra, y apreciar los picos de aumento en el número de conidios coincidentes con el mes de espigazón de cada época; junio para la primera época, julio para la segunda y agosto para la tercera evidenciando la relación entre la cantidad de conidios observados en las hojas y la cantidad de espigas enfermas.

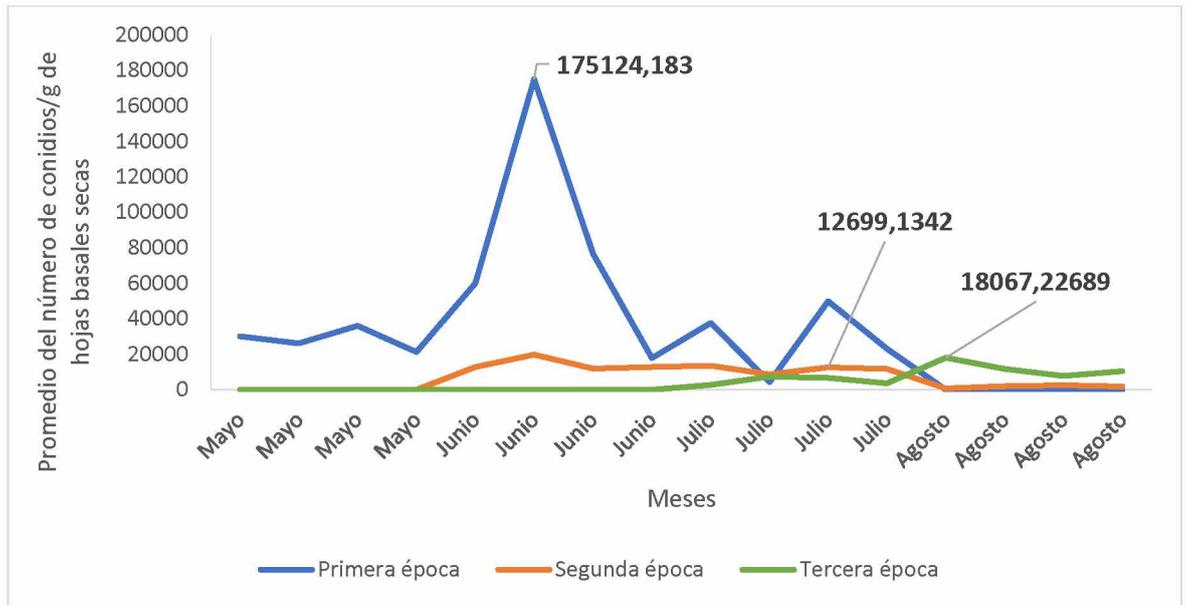


Figura 2.8: Promedio del número de conidios/g de hojas basales secas observados durante las tres épocas de siembra en el CEY a lo largo del ciclo de cultivo.

Para correlacionar el porcentaje de espigas enfermas con la cantidad de conidios/gramo de hojas basales secas, se incluyeron en el análisis las tres épocas de siembra en el CEY y los campos comerciales en los que se observó la presencia de conidios. Para ello, la cantidad de conidios/g de hojas basales secas registrada durante los tres meses de muestreo fue promediada. Los promedios de cada campo y el porcentaje de espigas enfermas se presentan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Campos incluidos en el análisis de correlación con sus promedios de conidios/g de hojas basales secas durante el ciclo de cultivo y porcentaje de espigas enfermas.

Campo	Promedio de conidios/g de hojas basales secas durante el ciclo de cultivo DE: 15407,82	Porcentaje de espigas enfermas DE: 3,89
CEY 1ra época	46507,7	11,26
CEY 2da época	9273,8	2,31
CEY 3ra época	8546,3	2,21
Tavapy	500	0
La Paz	3486,1	0
Corpus Christi	92,5	0
Colonia Yguazú	576,3	0
Yvyarovaná	6720,9	0

El coeficiente de correlación fue alto, $r = 0,98$, por lo que se realizó un análisis de regresión lineal, el cual arrojó un coeficiente de determinación $R^2 = 0,97$, con la siguiente ecuación $y = 0,0002x - 0,3863$ (Figura 2.9). Según esta ecuación, para tener 1% de espigas enfermas, es necesario observar un promedio de 6931,5 conidios/gramo de hojas basales secas durante el ciclo de cultivo.

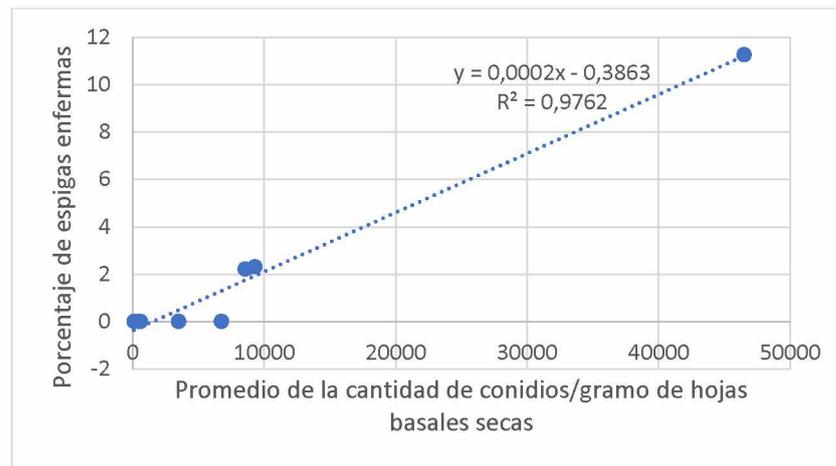


Figura 2.9: Relación entre el promedio de la cantidad de conidios/g de hojas basales secas y el porcentaje de espigas enfermas.

2.3.3 Monitoreo de la presencia y dinámica de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo

La instalación de trampas cazaesporas en el CEY, se realizó en la primera semana de mayo (por inconvenientes de fabricación) coincidió con el estadio de macollaje (2.0-2.9 escala Zadoks) en la primera época de siembra, donde se pudo observar la presencia de conidios.

El flujo de conidios varió entre semanas, observándose el máximo en la primera semana de julio, con 12 conidios atrapados. Posteriormente, se observó un número relativamente alto en la primera semana del mes de agosto (que coincide con las lluvias en ese periodo), pero a partir de la tercera semana de agosto no se produjeron más capturas de conidios (Tabla 2.6).

En los otros dos centros de investigación, la siembra se realizó a finales del mes de mayo debido a las lluvias en la primera parte del mes (momento ideal de siembra) y seguido por la sequía de casi dos meses, lo que resultó en una escasa captura de conidios. En el CICM, departamento de Itapúa, se capturó un conidio durante la tercera semana de junio, y sólo 2 conidios durante la tercera semana de agosto, no produciéndose capturas durante las demás semanas de observación. Mientras que en CETAPAR, departamento de Alto Paraná, la primera captura de conidios se produjo en la segunda semana de junio, observándose un flujo constante hasta la primera semana de julio, posteriormente se produjeron capturas durante la primera y segunda semana de agosto.

Tabla 2.6: Cantidad de conidios de *Magnaporthe oryzae* atrapados semanalmente con trampas cazaesporas instaladas en los centros de investigación utilizados para el estudio.

Mes	Fechas	Número de conidios atrapados*		
		CEY	CICM	CETAPAR
Mayo	8-10	3		
	15-17	0		
	22-24	3		
	29-31	1	Sin cultivo	Sin cultivo
Junio	5-7	0	0	0
	12-14	0	0	2
	19-21	5	1	2
	26-28	0	0	1
Julio	3-5	12	0	2
	10-12	2	0	0
	17-19	0	0	0
	24-26	0	0	0
Agosto	7-9	4	0	1
	14-16	1	0	1
	21-23	0	2	0
	28-30	0	0	0
Setiembre	4-6	0	0	0
	11-13	0	0	0
	18-20	0	0	0
	25-27	0	0	0

* Conteo del número de conidios sobre un portaobjeto de 7,68 cm²

2.4 Discusión

El muestreo realizado y la metodología empleada para la cuantificación, permitieron observar y cuantificar la presencia de conidios en las hojas basales de trigo, tanto en los campos de producción comercial como en las tres épocas de siembra instaladas bajo riego en el CEY.

De los nueve campos comerciales muestreados, se constató la presencia de conidios solo en cinco campos. A su vez, en estos cinco campos hubo meses en los que no se observó la presencia de conidios. Estas variaciones fueron causadas por las condiciones ambientales, principalmente la irregularidad de las precipitaciones y de humedad relativa del ambiente, que se dieron durante el 2018 (Figura 2.4 y 2.5). Las condiciones ambientales requeridas para la producción de conidios son temperatura de 28°C y $HR \geq 90\%$ (Alves y Fernandes, 2006), mientras que para la liberación de los mismos requiere temperaturas de 25 a 28°C y humedad relativa $\geq 93\%$ (Fernandes y Pavan, 2010). La baja humedad del ambiente (promedio semanal $HR = 70 \pm 10\%$), debida a las escasas precipitaciones (>10 mm desde mayo hasta finales de julio), durante el periodo del cultivo (mayo a agosto) (Figuras 2.4 y 2.5), fue la principal limitante, para la nula o baja producción y liberación de conidios durante todo el ciclo. A pesar de ello fue posible observar diferencias significativas en la cantidad de conidios presentes en las hojas entre los departamentos (valor H: 4,369; p- valor: 0,0008011), observándose diferencias entre el departamento de Canindeyú y los demás departamentos.

En las parcelas bajo riego, instaladas en el CEY, donde las condiciones de humedad y temperatura fueron relativamente mejores para el crecimiento del patógeno ($HR = 80 \pm 10\%$, T° media 15-25°C), el valor máximo observado fue de 207059 conidios/g de hojas basales secas. Es un valor alto en comparación al observado en los campos comerciales (58181 conidios/g), la comparación entre la cantidad de conidios observados

en ambos ambientes mostró diferencia estadística significativa (valor H: 174,1; valor p: $3,91 \cdot 10^{-65}$), reflejando el papel primordial de la humedad (riego por aspersión de aproximadamente 8 mm diarios) en la producción de conidios durante el ciclo de cultivo y a través de las épocas de siembra.

Aun así, los valores máximos de la cantidad de conidios/g de hojas basales secas observados en este estudio están muy por debajo de aquellos reportados por Cruz et al. (2015). En un ensayo de tratamiento con fungicidas realizado en campo y bajo condiciones naturales de infección, estos autores reportaron entre 390000 y 401000 conidios/g en las hojas basales de parcelas no tratadas con fungicidas. Ellos también observaron 1669000 conidios/g de hojas basales secas bajo condiciones de invernadero, en plantas provenientes de semillas infectadas. En otras palabras, bajo condiciones climáticamente adversas para el desarrollo de la enfermedad, aun el apoyo del riego por aspersión no es suficiente, ya que la baja humedad del ambiente promueve a secar las espigas en corto tiempo y consecuentemente reduce la probabilidad de infección.

El otro aspecto del menor número de conidios observados en este estudio puede ser relacionado con el tratamiento de semilla con fungicidas. Este hecho también sugiere que el número de conidios observados en este estudio pueden provenir de fuentes externas al cultivo. Para esclarecer cuales son exactamente esas fuentes externas y cuanto aporta cada una a la aparición de una epifitía, se requieren estudios más detallados.

El ensayo instalado en el CEY, también fue importante para observar el porcentaje de espigas enfermas en las tres fechas de siembra. En comparación a la primera época de siembra que tuvo 11,26% de espigas enfermas, el porcentaje en la segunda y tercera épocas fue mucho menor (2,31 y 2,21%). Este hecho corrobora lo mencionado por Coelho et al. (2016), que las fechas tardías de siembra reducen significativamente la incidencia de la *Pyricularia*, siendo las siembras tempranas las que presentan mayor incidencia.

También corrobora la observación de Kohli et al. (2011), que solo en años húmedos la ocurrencia de la enfermedad es independiente de las fechas de siembra.

En cuanto a la relación entre el porcentaje de espigas enfermas y el número de conidios observados en las hojas basales secas, Cruz et al. (2015), mencionan que 1,9% (3/160) de las espigas provenientes de plantas con infección natural en semillas, desarrolló el síntoma característico de la enfermedad en condiciones de invernadero. Sin embargo, estos autores no relacionaron el porcentaje de espigas enfermas con la cantidad de conidios observados bajo condiciones de campo.

Los datos obtenidos en esta tesis demuestran una fuerte correlación ($r=0,98$), con un coeficiente de determinación de 0,97, y una ecuación $y = 0,0002x - 0,3863$, entre ambas variables: porcentaje de espigas enfermas y la cantidad de conidios observados (Figura 2.8). Esto valida el modelo del ciclo de la enfermedad propuesto por el CIMMYT (Figura 1.5) que plantea el inicio de una epifitía mediante los conidios que se encuentran sobre las hojas durante el ciclo de cultivo, los cuales pueden originarse de semillas infectadas y/o de hospedantes secundarios.

Por todo lo expuesto, se acepta la hipótesis 1, es decir que los conidios de *M. oryzae* se desarrollan en las hojas de trigo durante el ciclo de cultivo y pueden constituir una potencial fuente de inóculo para las espigas.

Con respecto al monitoreo de conidios utilizando trampas cazaesporas, la metodología utilizada permitió observar la presencia de los mismos durante el ciclo de cultivo, con la única dificultad de no identificar a nivel de especie, los conidios observados. Solo se pudo establecer que pertenecían al género *Pyricularia* por las características morfológicas. Este inconveniente hace necesario desarrollar una metodología que permita realizar la cuantificación e identificación de los conidios a nivel

de especie, de modo a obtener datos más precisos sobre el flujo de conidios durante el ciclo de cultivo.

En este estudio, no fue posible realizar el monitoreo del flujo de conidios antes de la siembra, lo cual hubiera permitido tener un panorama más claro de la dinámica de dispersión del patógeno en diferentes regiones del país. Danelli (2015), observó el mayor flujo de conidios durante los primeros meses del año (enero a marzo), es decir cuando la temperatura y humedad en general son más altas, y favorecen la producción y dispersión de conidios. Sin embargo, este autor no realizó la identificación a nivel de especie para confirmar si todos los conidios capturados pertenecían a *M. oryzae*.

En el CICM, departamento de Itapúa el flujo de conidios fue prácticamente inexistente, mientras que en CETAPAR, departamento de Alto Paraná, el flujo fue constante desde principios de junio hasta principios de julio. Considerando que durante la última semana de mayo y primera semana de junio hubo precipitaciones (5 mm aproximadamente) en estas regiones (Figura 2.5), se infiere que los conidios que se dispersaron y fueron capturados en las trampas hayan sido producidos durante ese periodo. Posteriormente, la producción y la captura de conidios disminuyó significativamente debido a la disminución de la humedad (HR% = 50-80% desde la segunda semana de junio hasta la tercera semana de julio, Figura 2.5), motivo por el cual no se produjeron nuevas capturas hasta la ocurrencia de precipitaciones durante la última semana de julio.

Es interesante, que, a pesar de observar un flujo de conidios en el aire, no se haya observado la presencia de conidios en las hojas colectadas en este centro. Se sabe que uno de los factores en la producción de inóculo es la temperatura, dándose periodos de latencia de 13 a 18 días cuando la temperatura es de 9-11°C, y de 4 a 6 días con temperaturas de 26-28°C (Teng et al. 1991). Considerando que la temperatura media entre junio y julio,

varió entre 15 y 23°C (Figura 2.4), probablemente el factor más limitante para el establecimiento del patógeno en las hojas haya sido la humedad. Los valores de humedad requeridos por el patógeno para la producción de conidios ($HR \geq 90\%$) y liberación de conidios ($HR \geq 93\%$), señaladas por Alves y Fernandes (2006), y Fernandes y Pavan (2010), respectivamente, solo se alcanzaron en los días en que hubo precipitaciones (Figura 2.5). Teniendo en cuenta que una vez que los conidios son depositados sobre las hojas, los mismos necesitan agua libre sobre la superficie, 15-40 horas de mojado, para germinar, establecerse y continuar con el ciclo de producción de inóculo (Ebbole, 2007; Cardoso et al., 2008). Es probable que la corta duración del periodo de humedad o su ausencia haya afectado el establecimiento del patógeno en las hojas de trigo.

No se puede descartar la posibilidad que los conidios observados en las trampas hayan pertenecido a otra especie de *Pyricularia*, por ejemplo *P. grisea* y *P. pennisetigena*, procedentes de otros hospedantes como *Digitaria* spp. y *Cenchrus echinatus* razón por la cual no se establecieron en las hojas de trigo.

En cuanto a la captura de conidios en las trampas cazaesporas en el CEY, el flujo fue intermitente en las tres épocas de siembra; hubo semanas con capturas y semanas sin capturas durante el ciclo de cultivo. Considerando que se constató la presencia del patógeno en las hojas durante el ciclo de cultivo, se asume que la dispersión y la captura de conidios en las trampas, pudo verse parcialmente influenciada por la aplicación del riego. Danelli (2015), quien utilizó trampas cazaesporas similares, menciona que la dispersión de conidios de *M. oryzae* ocurre con precipitaciones de entre 0 a 80 mm, con mayor flujo cuando las precipitaciones no superan los 5 mm. Asimismo, Danelli et al. (2019) mencionan que los predictores más fuertes de la dispersión de conidios en el aire, son la humedad relativa media del aire y la temperatura media diaria. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el riego diario (dos veces por día) de 8 mm aproximadamente,

disminuyera la dispersión de conidios por el viento, impidiendo que sean capturados por las trampas, y también disminuyendo la cantidad de conidios que lleguen a las espigas. Al respecto, Kim (1994) también menciona que el agua de lluvia en gran cantidad (más de 3,5 mm/día), tiende a reducir el número de conidios presentes en lesiones en plantas, debido a que la fuerza de las precipitaciones libera los conidios de los conidióforos, reduciendo la cantidad de inóculo y afectando la diseminación. Esto explica en cierta medida el bajo porcentaje de espigas enfermas observadas en las tres épocas de siembra. Considerando las condiciones ideales de humedad y temperatura necesarias para la infección ($T^{\circ} 28^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa $\geq 90\%$), y la presencia del patógeno en las hojas durante el ciclo de cultivo, se esperaría que el porcentaje de espigas enfermas fuera mayor al observado, sobre todo en la primera época de siembra (11,26%).

Por todo lo expuesto, se acepta la hipótesis 4 que el aire actúa como mecanismo de dispersión de los conidios de *M. oryzae*, llevándolos desde las hojas de trigo y posiblemente de determinadas malezas hasta las espigas durante el ciclo de cultivo.

En este caso, sería importante estudiar la frecuencia y la cantidad de riego que permita una amplia producción y dispersión de los conidios para llegar a infectar las hojas y las espigas. También se requiere realizar estudios más detallados para precisar qué porcentaje del inóculo observado proviene de las hojas o de las malezas, y cómo afectan los factores ambientales a cada uno de estos componentes. Se considera importante monitorear el flujo de conidios durante todo el año y desarrollar una metodología que permita identificar los conidios capturados a nivel de la especie.

2.5 Conclusiones

El número de conidios presentes en las hojas basales de trigo durante el ciclo de cultivo y el flujo de conidios en dos ambientes (secano y bajo riego) mostró como principal factor favorable, la humedad relativa.

En ambos ambientes, en secano y bajo riego se constató la presencia del patógeno, tanto en las hojas de trigo como en las trampas cazaesporas, aunque con notables diferencias en la cantidad y persistencia durante el ciclo del cultivo. Las diferencias fueron causadas principalmente por la humedad, factor que afectó la producción, liberación y dispersión de conidios, así como el establecimiento del patógeno en las hojas y espigas. A pesar de ello se logró establecer que existe una fuerte correlación entre el número de conidios presentes en las hojas durante el ciclo del cultivo y el porcentaje de espigas enfermas. Esto confirma que las hojas son una fuente importante de inóculo durante el ciclo del cultivo, especialmente cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables para el patógeno.

Por otro lado, la metodología utilizada para el monitoreo de conidios fue útil para observar que existe un flujo de conidios que se mueve a través del aire. Sin embargo, no se pudo precisar si los conidios observados pertenecían a la especie *M. oryzae*, por lo que es imperioso desarrollar una metodología que permita determinar la identidad de los conidios observados en las trampas.

Los hallazgos realizados en este capítulo, son un avance importante hacia el esclarecimiento del papel de las hojas y el flujo de conidios en el aire, en el ciclo de la enfermedad; aunque es necesario precisar en qué medida contribuye cada uno de estos factores al desarrollo de una epifitía.

CAPÍTULO 3

Identificación de malezas hospedantes de *Magnaporthe oryzae* en las principales zonas productoras de trigo de Paraguay y diagnóstico molecular del patotipo *Triticum* de *Magnaporthe oryzae* a partir de aislados de malezas

3.1 Introducción

El agente causal de la Pyricularia, *M. oryzae* (*P. oryzae*) es conocido por atacar principalmente especies de la familia Poaceae (Gramineae), siendo el arroz y el trigo los cultivos más importantes afectados por este patógeno.

Este hongo presenta una amplia gama de hospedantes entre los cuales se destacan numerosas gramíneas cultivadas, nativas y malezas (Reis et al., 2005; Lima, 2004). Existen numerosos reportes del ataque de este patógeno en diversas especies entre ellas: *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf, *B. extensa* Chase, *B. plantaginea* (Link.) A.S. Hitch., *Cenchrus echinatus* L., *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Eragrostis* sp., *Lolium perenne* L., *Luziola peruviana* Juss. Ex J. F. Gmel, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scopoli., *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv., *Pennisetum setosum* (Sw.) Rich., *P. purpureum* Schumacher., *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf., *Rynchelytrum roseum* (Nees) Stapf & Hubb., *Avena strigosa* Schreb., *A. sativa* L., *Setaria italica* (L.) Beauv., *S. sphacelata* (Schumach.) Stapf & C.E. Hubb., *Eragrostis plana* Nees., *Rynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb., *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf. y *Cyperus rotundus* L. (Prabhu et al., 1992; Urashima et al., 1993; Gutierrez y Cúndom, 2015; Mehta et al., 2006; Verzignassi et al., 2012; Marangoni et al., 2013; Bastida et al., 2019; Danelli, 2015).

Además, se ha reportado infección cruzada exitosa sobre trigo con aislados de *S. geniculata* y *B. plantaginea* (Urashima y Kato, 1998); triticale (*X. Triticosecale*) (Mehta y Baier, 1998); cebada (*Hordeum vulgare*) (Urashima et al., 2004); Avena negra (*A. strigosa*) y avena blanca (*A. sativa*) (Marangoni et al., 2013); *U. plantaginea* y *S. sudanense* (Danelli, 2015) y arroz (*Oryza sativa*) (Perelló et al., 2016).

En Paraguay, Chávez y Kohli (2015) reportaron la presencia del género *Pyricularia* en las siguientes especies: *Brachiaria* sp., *B. catharticus*, *Chloris gayana*,

Cyperus diffusus, *Digitaria horizontalis*, *Lolium multiflorum*, *C. echinatus*, *A. strigosa*, *D. insularis*, *Rynchelyntrum roseum* y *Eleusine indica*.

Se observó patogenicidad de los aislados de *B. catharticus*, *L. multiflorum*, *C. echinatus* y *E. indica* sobre trigo (Chávez y Kohli, 2018 b). Estos trabajos representan los primeros estudios sobre el rol de las malezas en el ciclo de *Pyricularia* del trigo en Paraguay.

En cuanto a la genética del patógeno, Kato et al. (2000) sugieren que los aislados de *M. oryzae* de cereales forman un grupo genéticamente cercano con un origen filogenético común, sin embargo, difieren en su patogenicidad en la especie hospedante. Estas diferencias en la patogenicidad, han desatado una disputa en cuanto a la denominación del agente causal de la *Pyricularia* del trigo. Por una parte, Castroagudín et al. (2016) sugieren que un grupo de aislados de trigo son capaces de infectar trigo y algunas malezas, difiere genéticamente de otros aislados de trigo, y constituye una nueva especie *P. graminis-tritici*. Sin embargo, en un estudio realizado por Gladieux et al. (2018), donde analizaron secuencias de genoma completo de *M. oryzae*, se observó que la población del patógeno que ataca trigo, proviene de dos linajes genéticamente diferentes. Los autores afirman que existe cierto grado de especificidad para diferentes hospedantes en los aislados de *M. oryzae*, pero esta es una característica que fluye regularmente entre ellos, y no es suficiente para agruparlos como especies separadas.

Actualmente, en base a la patogenicidad, los aislados de *M. oryzae* han sido clasificados en patotipos. Los patotipos son subpoblaciones del hongo, las cuales son morfológicamente indistinguibles, que se diferencian en su especificidad hospedera. Así se tienen los patotipos *Oryza* (*O. sativa*), *Setaria* (*S. itálica*), *Panicum* (*Panicum*

millaceum), Eleusine (*E. coracana*), Triticum (*Triticum aestivum*), Avena (*A. sativa*) y Lolium (*L. perenne*) (Kato et al., 2000; Urashima et al., 2004; Tosa et al., 2004).

Recientemente, Pieck et al. (2017), desarrollaron un marcador molecular específico para el patotipo *Triticum*, el MoT3 que fue probado con 284 aislados del hongo, brindando una nueva herramienta para el análisis de la población del patógeno.

El objetivo de esta parte del estudio fue identificar malezas hospedantes de *M. oryzae* en las principales zonas productoras de trigo en Paraguay, aislar el patógeno, realizar pruebas de infección cruzada e identificar el patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Identificación de malezas hospedantes de *Magnaporthe* spp. en los campos de producción comercial de trigo en Paraguay

3.2.1.1 Recolección de muestras de malezas

Para la identificación de malezas hospedantes, fueron muestreados cinco campos de producción comercial, en los tres principales departamentos de producción de trigo de Paraguay: Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú, totalizando 15 campos. Las coordenadas geográficas de dichos campos se presentan en la Tabla 3.1, y el mapa de ubicación de los mismos en la Figura 3.1.



Figura 3.1: Ubicación de los puntos de muestreo para la recolección de muestras de malezas en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú (Paraguay).

Tabla 3.1: Coordenadas geográficas de los campos de producción de trigo muestreados para la identificación de malezas hospedantes en los departamentos de Alto Paraná, Itapúa y Canindeyú (Paraguay).

Campo N°	Departamento	Latitud Sur	Longitud Oeste	Localidad
1	Alto Paraná	25° 27' 17''	55° 2' 36''	Colonia Yguazú, CETAPAR
2	Alto Paraná	25° 28' 58''	54° 56' 37''	Colonia Yguazú
3	Alto Paraná	25° 42' 1''	55° 1' 20''	Tavapy
4	Itapúa	26° 21' 20''	55° 14' 19''	Naranjito
5	Itapúa	26° 56' 11''	55° 31' 6''	Pirapó
6	Itapúa	27° 7' 17''	55° 51' 8''	La Paz
7	Itapúa	26° 21' 20''	55° 14' 19''	Carmen del Paraná
8	Itapúa	27° 12' 2''	55° 47' 27''	Capitán Miranda, Centro de Investigación Capitán Miranda, IPTA
9	Alto Paraná	25° 16' 42''	54° 44' 48''	Santa Fe del Paraná
10	Alto Paraná	24° 57' 41''	54° 56' 51''	San Alberto
11	Canindeyú	24° 21' 34''	54° 50' 40''	Katuete
12	Canindeyú	24° 15' 37''	54° 51' 9''	Corpus Christi
13	Canindeyú	24° 17' 44''	54° 58' 37''	Yhovoy
14	Canindeyú	24° 16' 25''	55° 1' 4''	Yhovoy, Campo Experimental CEY, IPTA
15	Canindeyú	24° 20' 18''	55° 2' 17''	Yvyrarovana

Se recolectaron muestras de malezas que presentaban lesiones foliares elípticas de borde oscuro y centro ceniciento (Figura 3.2) y, necrosis cubierta por micelio gris oscuro en las inflorescencias (Figura 3.2), característicos del ataque de *M. oryzae*.



Figura 3.2: Síntomas característicos de *Magnaporthe oryzae* en hojas (izquierda) e inflorescencias (derecha). Fuente: Alice Chávez, 2015.

Los muestreos se realizaron mensualmente, y se elaboró un listado de las malezas presentes tanto en los bordes como dentro del campo de cultivo, con y sin síntomas. Para un mejor análisis, se determinó la prevalencia, es decir la cantidad de campos en los que cada especie se encontraba presente en relación con el total de campos muestreados, expresado en porcentaje. Al final se elaboró un gráfico con la prevalencia estacional de las especies presentes y para ello, el año fue dividido de la siguiente manera: para el verano, se tomaron los meses de diciembre, enero y febrero; para el otoño marzo, abril y mayo; para el invierno, junio, julio y agosto; y para la primavera setiembre, octubre y noviembre.

También se elaboró un gráfico con la prevalencia de las especies en las que se observó la presencia del patógeno mensualmente.

3.2.1.2 Procesamiento de muestras recolectadas en laboratorio

Para constatar la presencia del hongo, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Fitopatología del CIHB, IPTA, de la siguiente manera: pequeñas porciones

(2-5 mm) de la parte afectada fueron desinfectadas mediante inmersión en solución de alcohol al 70% durante 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio (55g Cl/l): agua (1:3), por un minuto, posteriormente fueron lavados tres veces con agua destilada esterilizada y secados sobre papel absorbente. Una vez secos, se procedió a colocar los mismos en placas de Petri (de 9 cm de diámetro) con medio de cultivo PDA (Papa, dextrosa, agar), las cuales fueron incubados a 25°C durante cinco días. Se coloraron 3 porciones de la parte afectada por placa, y se tomaron 6 porciones de cada muestra de maleza. Transcurrido el período de incubación, se procedió a la identificación de las estructuras fúngicas mediante observación al microscopio utilizando la clave de Barnett y Hunter (1998).

Luego de identificar al patógeno, se procedió a aislar el mismo repicando las colonias a placas de Petri con medio de cultivo agar-avena. Las colonias se incubaron durante 12 días a 25°C, posteriormente se procedió a aplastar las mismas con una varilla de vidrio, para luego exponerlas a luz fluorescente constante por 72 horas. Transcurridas las 72 horas, se raspó la superficie de las placas con un pincel y 10 ml de agua destilada esterilizada por placa, para desprender los conidios formados en la superficie del medio y formar una suspensión. Esta suspensión de conidios se utilizó para obtener cultivos monospóricos mediante el método de dilución seriada.

Los aislados obtenidos fueron conservados en el cepario del Proyecto Pyricularia en trigo CAPECO en el CIHB, IPTA, Caacupé; en papel de filtro a -18 °C (Aricapa y Correa, 1994) para su posterior utilización en pruebas de infección cruzada.

3.2.2 Pruebas de infección cruzada

Las pruebas de infección cruzada consisten en inocular un aislado obtenido de una especie sobre otra especie diferente. Las inoculaciones se realizaron en el invernadero del Proyecto Pyricularia en Trigo, en el CIHB, sobre la variedad susceptible de trigo Canindé 11. La siembra se realizó en macetas de 15 x 25 cm conteniendo un sustrato compuesto por arena y estiércol vacuno en la proporción 3:1. Para cada aislado a inocular se sembraron cinco macetas con dos plantas cada una, totalizando 10 plantas por aislado.

Los aislados utilizados para las pruebas fueron los obtenidos durante el período de muestreo, además se seleccionaron otros aislados de la colección del Proyecto Pyricularia en trigo, seis aislados de trigo y 27 aislados de malezas, totalizando 33 aislados (Tabla 3.2).

También se inocularon plantas de las malezas *B. catharticus*, *L. multiflorum*, *E. indica*, *D. horizontalis* y *C. echinatus* con un aislado de trigo de la colección, para confirmar si las mismas tienen la capacidad de infectarse con el patógeno. El aislado utilizado fue el P-009, recolectado en Capitán Miranda, Itapúa durante el ciclo 2013.

Previamente, los aislados conservados en papel de filtro fueron repicados a cajas de Petri con medio de cultivo Harina de Avena-Agar, se incubaron durante 10 días a 25°C y fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente, el micelio fue aplastado con una varilla de vidrio con forma de L, y las placas fueron expuestas a luz fluorescente continua durante tres días, para favorecer la esporulación. Posteriormente las esporas se removieron con ayuda de un pincel y agua destilada esterilizada (Marangoni et al., 2013). La concentración de conidios se ajustó a 5×10^4 conidios ml⁻¹ con un hemacitómetro Neubauer utilizando para la dilución, agua destilada esterilizada (Chávez et al., 2015). La

inoculación se realizó cuando las plantas alcanzaron el estadio de cuatro hojas (Z1.4) mediante aspersión con un aspersor manual (tres aspersiones por hoja).

Las plantas inoculadas se mantuvieron en una sala climatizada dentro del invernadero por 24 horas con $80\pm 5\%$ de humedad y $27\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura para favorecer la infección. Trascurrido ese tiempo, las plantas fueron transferidas al invernadero con la misma temperatura, a humedad de $60\pm 5\%$, y con un fotoperiodo de 12 h.

La evaluación de la enfermedad se realizó ocho días después de la inoculación, tomando la cuarta hoja de cada planta. Para la evaluación de las lesiones foliares, fue adaptada la escala propuesta por Valent et al. (1991) (Figura 3.3), la cual clasifica los síntomas de la siguiente manera: 0 = Sin lesiones, 1 = Lesiones puntuales del tamaño de una cabeza de 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 de *Pyricularia*, elípticas con borde oscuro y centro ceniza, 5 = Grandes lesiones elípticas con centro gris oscuro.



Figura 3.3: Escala utilizada para la evaluación de las infecciones causadas por *Magnaporthe oryzae* en hojas de trigo adaptada de Valent et al. (1991).

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).

Tabla 3.2: Aislados utilizados en las pruebas de infección cruzada con sus datos de origen, año de recolección y hospedero original.

Código de colección	Localidad	Departamento	Hospedero	Año	Órgano de la planta
P-004	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Bromus catharticus</i>	2013	Hojas
P-005	Yhovy	Canindeyú	<i>Triticum aestivum</i>	2013	Espiga
P-009	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Triticum aestivum</i>	2013	Espiga
P-015	Caacupé	Cordillera	<i>Avena strigosa</i>	2014	Hojas
P-016	Caacupé	Cordillera	<i>Avena strigosa</i>	2014	Hojas
P-017	Caacupé	Cordillera	<i>Avena strigosa</i>	2014	Hojas
P-023	Yhovy	Canindeyú	<i>Digitaria horizontalis</i>	2014	Hojas
P-048	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Lolium multiflorum</i>	2014	Inflorescencia
P-049	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Digitaria horizontalis</i>	2014	Hojas
P-050	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Lolium multiflorum</i>	2014	Hojas
P-055	Yhovy	Canindeyú	<i>Cenchrus echinatus</i>	2015	Hojas
P-057	Yhovy	Canindeyú	<i>Digitaria insularis</i>	2015	Hojas
P-070	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Digitaria horizontalis</i>	2015	Hojas
P-071	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Cenchrus echinatus</i>	2015	Hojas
P-075	La Paz	Itapúa	<i>Avena strigosa</i>	2015	Inflorescencia
P-081	La Paz	Itapúa	<i>Avena strigosa</i>	2015	Hojas
P-084	La Paz	Itapúa	<i>Avena strigosa</i>	2015	Hojas
P-085	La Paz	Itapúa	<i>Avena strigosa</i>	2015	Hojas
P-088	La Paz	Itapúa	<i>Avena strigosa</i>	2015	Hojas
P-096	Yguazú	Alto Paraná	<i>Digitaria horizontalis</i>	2015	Hojas
P-098	Yguazú	Alto Paraná	<i>Digitaria horizontalis</i>	2015	Hojas
P-099	Yguazú	Alto Paraná	<i>Digitaria horizontalis</i>	2015	Hojas
P-102	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Triticum aestivum</i>	2017	Espigas
P-103	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Triticum aestivum</i>	2017	Espigas
P-107	Pirapó	Itapúa	<i>Digitaria horizontalis</i>	2018	Hojas
P-109	Yhovy	Canindeyú	<i>Brachiaria sp.</i>	2018	Hojas
P-110	Yhovy	Canindeyú	<i>Brachiaria sp.</i>	2018	Hojas
P-112	Yhovy	Canindeyú	<i>Cynodon dactylon</i>	2018	Hojas
P-114	Yhovy	Canindeyú	<i>Eleusine indica</i>	2018	Hojas
P-116	Tavapy	Alto Paraná	<i>Cenchrus echinatus</i>	2018	Hojas
P-118	Yhovy	Canindeyú	<i>Triticum aestivum</i>	2018	Hojas
P-119	Yhovy	Canindeyú	<i>Triticum aestivum</i>	2018	Hojas
P-120	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Digitaria insularis</i>	2018	Hojas
P-121	Capitán Miranda	Itapúa	<i>Triticum aestivum</i>	2018	Espiga

Para establecer la patogenicidad de los aislados, se tomó en cuenta el tipo de lesión con la nota más alta causado por el aislado, nota máxima (N+).

3.2.3 Diagnóstico molecular del patotipo *Triticum* de *Magnaporthe oryzae* a partir de aislados de malezas

Los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular del CIHB. El diagnóstico molecular se realizó con los aislados de malezas que fueron inoculados en las hojas, a modo de confirmar las reacciones observadas, tanto de aquellos que causaron lesiones de tipo resistente como susceptible. Para ello, se extrajo el ADN genómico de las hojas inoculadas con dichos aislados.

Se utilizaron los marcadores moleculares Pot-2a, el cual sirve para identificar al género *Pyricularia* y tiene un producto de amplificación de 389 pb y MoT3, el cual es específico para el patotipo *Triticum* de *M. oryzae*, y tiene un producto de amplificación de 361 pb (Pieck et al., 2017).

Además, se analizaron los aislados monospóricos utilizados para la infección y otros aislados de trigo como controles positivos de la especificidad y efectividad de los cebadores. Un aislado de *Fusarium* sp. fue utilizado como control negativo de ADN.

Para la extracción de ADN de las hojas, se tomaron dos hojas con síntomas inoculadas con cada aislado y cada hoja se consideró una réplica. Estas hojas fueron maceradas en un mortero con nitrógeno líquido y posteriormente se procedió a aplicar el protocolo de extracción de ADN.

Los aislados que se utilizaron para la extracción de ADN se encontraban conservados en papel filtro a -18 °C, y fueron repicados a placas de Petri con medio de cultivo Agar-Harina de avena. Estas placas fueron incubadas a 25 °C durante 12 días. Posteriormente, el micelio aéreo fue repicado a tubos Erlenmeyer conteniendo medio

líquido compuesto por caldo de papa y dextrosa, incubados a 25 °C, durante 5 días con luz fluorescente y agitación de 130 rpm constantes. El micelio resultante fue filtrado, se pesaron 100 mg y se procedió a la extracción de ADN.

3.2.3.1 Protocolo de extracción de ADN

Tanto para los aislados de cultivo puro como para los de las hojas infectadas, se utilizó el método CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2% siguiendo la metodología de Cazal et al. (2018 b), que se detalla a continuación: (1M Tris (HCl pH 8.0); 0,5M EDTA (NaOH pH 8.0); 5M NaCl; CTAB 2 %), donde inicialmente se utiliza 700 µl del buffer precalentado a 65 °C por muestra.

Se realizó la lisis mecánica con pistilo para los micelios del cultivo puro de los aislados y con nitrógeno líquido en mortero para las hojas. Posteriormente se mezcló por inmersiones suaves y se agregó 750 µl de cloroformo a -20 °C, se centrifugó a 14000 rpm por 8 minutos. Se añadió 450 µl de propanol-2 a -20 °C a cada tubo de 1,5 ml con el sobrenadante, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos. Se retiró el propanol-2 y se lavaron los pellet con 1 ml de etanol al 70 %, se dejaron secar las muestras y se retomaron con buffer TE (10 mM Tris (HCl pH 8.0); 1 mM EDTA).

3.2.3.2 PCR convencional

La PCR (reacción en cadena de polimerasa) se realizó siguiendo la metodología de Pieck et al. (2017) que se detalla a continuación: para un volumen final de reacción de 10 µl: Buffer 1X, 0.2Mm dNTP, 400 nm de cada primer, 100 ng de ADN templado, y 5 unidades/uL de Taq ADN polimerasa. Se amplificó utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 90 segundos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30

segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos; y una extensión final a 72°C por 2 minutos. Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 2 %, y tinción con bromuro de etidio.

3.3 Resultados

3.3.1 Identificación de malezas hospedantes de *Magnaporthe* spp. en los campos de producción comercial de trigo en Paraguay

A lo largo del año, se recolectaron muestras de 22 especies de malezas en los 15 campos bajo estudio. Es importante mencionar que hubo períodos en que no se recolectaron muestras en algunos campos, debido a la ausencia de malezas a causa de las medidas de control implementadas por los productores, la mayoría de las muestras recolectadas se encontraban en los bordes.

En la Figura 3.4 se presenta la prevalencia estacional de las 22 especies recolectadas. En la misma, se observa que las malezas *A. strigosa*, *Brachiaria* sp., *C. echinatus*, *C. gayana*, *Cynodon dactylon*, *D. horizontalis*, *D. insularis*, *E. crus-galli*, *E. indica*, *Eragrostis* sp., *P. máximum*, *P. purpureum*, *R. roseum*, *Setaria* sp. y *Sorghum halepense* estuvieron presentes durante las cuatro estaciones del año.

De este grupo, *D. insularis* fue la especie con mayor prevalencia durante el año, siendo la más prevalente durante el otoño (77,7%) y la primavera (64,4%), y la segunda especie más prevalente durante el verano (68,8%) y el invierno (48,8%).

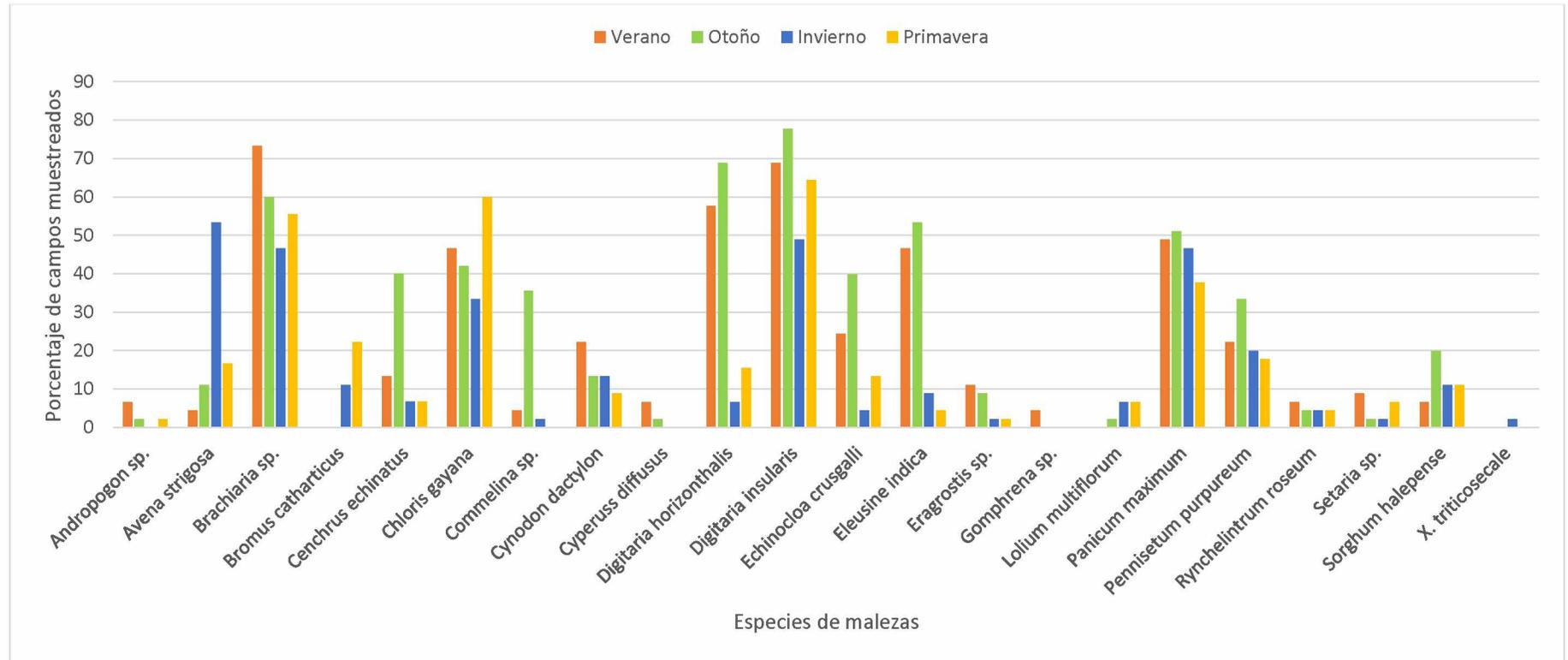


Figura 3.4: Prevalencia estacional de las especies de malezas recolectadas durante el 2018, en los departamentos de Itapúa, Alto Paraná y Canindeyú.

Durante el verano, *Brachiaria* sp. fue la especie con mayor prevalencia (73,3%), otras especies con valores altos de prevalencia durante el verano fueron *D. horizontalis* (57,7%), *Panicum maximum* (48,8%), *E. indica* (46,6%) y *C. gayana* (46,6%).

En otoño, le siguen en prevalencia a *D. insularis* las especies *D. horizontalis* (68,8%), *Brachiaria* sp. (59,9%), *E. indica* (53,3%) y *P. máximo* (51,1%).

Durante el invierno, *A. strigosa* fue la maleza más prevalente (53,3%), otras especies consideradas de invierno como *L. multiflorum* y *B. catharticus* tuvieron valores bajos de prevalencia. *L. multiflorum* apareció en otoño con 2% de prevalencia, aumentando hasta 6% durante el invierno y primavera. Mientras que *B. catharticus* apareció recién durante los meses de invierno y primavera con 11 y 22% de prevalencia, respectivamente, desapareciendo durante el verano y otoño.

En primavera, las especies más prevalentes después de *D. insularis* fueron *C. gayana* (60%), *Brachiaria* sp. (55,5%) y *P. máximo* (37,7%). Las especies como *Andropogon* sp., *Commelina* sp., *Cyperus diffusus*, *Gomphrena* sp. y *X. triticosecale* fueron ocasionales con valores de prevalencia menores al 10%.

De las 22 especies recolectadas, se constató la presencia de conidios de *Magnaporthe* sp. en nueve especies (41 %): *Brachiaria* sp., *B. catharticus*, *C. echinatus*, *C. dactylon*, *D. horizontalis*, *D. insularis*, *E. crus-galli*, *E. indica* y *L. multiflorum*.

Los síntomas observados en las hojas de *Brachiaria* sp. fueron manchas elípticas a redondeadas de tamaño variable, de borde marrón oscuro y centro marrón claro (Figura 3.5).



Figura 3.5: Síntomas observados en hojas de *Brachiaria* sp. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *B. catharticus*, los síntomas observados en las hojas fueron numerosas manchas elípticas de tamaño variable, a veces coalescentes, de color grisáceo con halo clorótico (Figura 3.6).



Figura 3.6: Síntomas observados en las hojas de *Bromus catharticus*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En las hojas de *C. echinatus*, se observaron manchas redondeadas, de borde marrón oscuro y centro marrón claro, de 3-4 mm de tamaño (Figura 3.7).

En *C. dactylon*, los síntomas observados fueron manchas pequeñas, de borde marrón oscuro a rojizo con centro marrón claro, elípticas a redondeadas (Figura 3.8), generalmente una o dos lesiones por hoja.



Figura 3.7: Síntomas observados en las hojas de *Cenchrus echinatus*. Fuente: Alice Chávez, 2018.



Figura 3.8: Síntomas observados en las hojas de *Cynodon dactylon*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *D. horizontalis*, se observaron manchas redondeadas con centro grisáceo, rodeadas de una zona de color marrón claro, borde marrón y un halo purpura; cuando las manchas eran numerosas en una hoja, el halo se extendía cubriendo la mayor parte de la hoja (Figura 3.9).



Figura 3.9: Síntomas observados en las hojas de *Digitaria horizontalis*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *D. insularis* se observaron pequeñas manchas circulares de borde marrón y centro claro, en algunos casos rodeadas de un leve halo clorótico (Figura 3.10), generalmente numerosas manchas por hoja.



Figura 3.10: Síntomas observados en las hojas de *Digitaria insularis*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *E. crus-galli*, los síntomas observados fueron manchas circulares de centro blanquecino, rodeado de una zona de color marrón claro y borde púrpura (Figura 3.11), generalmente una o dos lesiones por hoja.



Figura 3.11: Síntomas observados en las hojas de *Echinochloa crus-galli*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *E. indica*, los síntomas se caracterizaron por pequeñas manchas de borde marrón oscuro y centro claro (Figura 3.12), en algunos casos las lesiones eran aisladas y en otros, numerosas y coalescentes.



Figura 3.12: Síntomas observados en hojas de *Eleusine indica*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En *L. multiflorum*, se observó la presencia del patógeno en hojas e inflorescencias. En las hojas, se observaron manchas elípticas de tamaño variable, de centro blanquecino, rodeado de una zona de color grisáceo y borde marrón oscuro. Mientras que, en las inflorescencias se observó necrosis del raquis, cubierta por micelio grisáceo, con el consecuente “blanqueamiento” de la zona superior al punto de infección (Figura 3.13).



Figura 3.13: Síntomas observados en las hojas e inflorescencias de *Lolium multiflorum*. Fuente: Alice Chávez, 2018.

En cuanto a la prevalencia de las especies en las que se observó la presencia del patógeno, el porcentaje de muestras de las especies y los meses de observación de los conidios se presentan en la Figura 3.14.

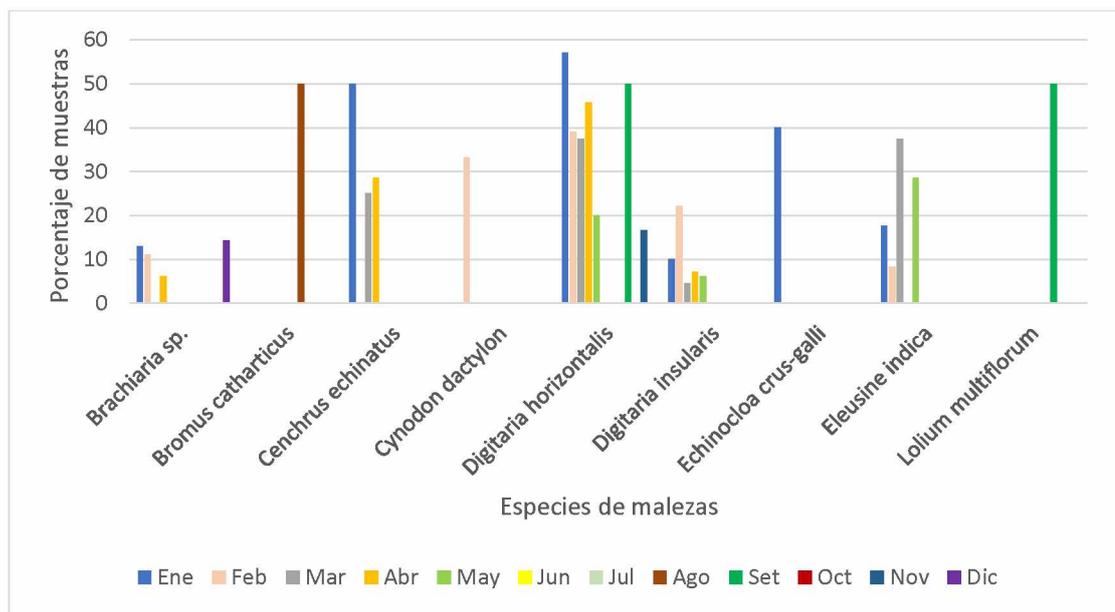


Figura 3.14: Porcentaje de muestras de las especies de malezas en las que se observaron conidios de *Magnaporthe* sp. durante el año 2018.

La especie con más meses de observación fue *D. horizontalis* (7 meses), la prevalencia del patógeno en las muestras varió entre 16 y 57%. La siguiente especie con más meses de observación fue *D. insularis* (5 meses) con porcentajes de prevalencia de entre 7 y 22%. Siguen *E. indica* (4 meses), con prevalencias de 8 a 37%; *C. echinatus* (3 meses) con prevalencias de 25 a 50% y *Brachiaria* spp. (3 meses) con prevalencias de 6 a 14%.

Las especies *E. crus-galli* y *C. dactylon*, así como las malezas de invierno *L. multiflorum* y *B. catharticus*, tuvieron un solo mes de observación, prevalencias del 33, 40 y 50%, respectivamente.

3.3.2 Pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular del patotipo *Triticum* de *M. oryzae* a partir de aislados de malezas

En las inoculaciones foliares sobre la variedad susceptible de trigo Canindé 11, se observó que de los ocho aislados de *A. strigosa* inoculados, siete causaron lesiones de tipo resistente, y uno (P-075) causó lesiones de tipo susceptible (Tabla 3.3). En cuanto al diagnóstico con los marcadores moleculares con el ADN extraído del micelio, los ocho aislados amplificaron el marcador Pot-2a y no amplificaron el MoT3. En las hojas inoculadas, las muestras correspondientes a los aislados P-015, P-016, P-017 y P-081, no amplificaron ninguno de los marcadores; mientras que las muestras de los aislados P-075, P-084, P-085 y P-088 amplificaron solo el Pot-2a.

Los aislados de *C. echinatus* (P-055, P-071 y P-116) causaron lesiones de tipo resistente. En este caso, el ADN extraído tanto de micelio como de hojas inoculadas, amplificaron solo el marcador Pot-2a.

Los dos aislados de *L. multiflorum* (P-048 y P-050) causaron lesiones de tipo susceptible en las hojas de la variedad Canindé 11. El ADN tanto micelial como de hojas inoculadas, del aislado P-050 amplificó los marcadores Pot-2a y MoT3. Sin embargo, las muestras de ADN tanto de micelio como de hojas inoculadas con aislado P 048 solo amplificaron el marcador Pot-2a.

Los aislados de *Brachiaria* sp. (P-109) y (P-110) mostraron un comportamiento diferenciado, tanto en las pruebas de infección como a nivel molecular. El aislado P-109, causó lesiones de tipo susceptible en las hojas de la variedad Canindé 11, y amplificó los marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico, mientras que el aislado P-110, no causó la infección y el ADN micelial amplificó únicamente el marcador Pot-2a.

El único aislado de *E. indica* (P-114) causó lesiones de tipo susceptible en las hojas de la variedad Canindé 11, pero a nivel molecular, el ADN tanto micelial como de las hojas inoculadas, amplificó únicamente el marcador Pot-2a.

Los aislados de *D. insularis* (P-057, P-120) causaron lesiones de tipo resistente, y el ADN de ambos aislados, tanto de micelio como de hojas infectadas amplificó solo el marcador Pot-2a.

Los aislados de *C. dactylon* (P-112) y *D. horizontalis* (P-023, P-049, P-070, P-096, P-098, P-099, P-107), no causaron infección sobre las hojas de la variedad Canindé 11. El ADN micelial de estos aislados amplificó el marcador Pot-2a, pero no el MoT3. Mientras que el ADN extraído de las hojas no amplificó ninguno de los dos marcadores.

Todos los aislados de trigo analizados causaron lesiones de tipo susceptible, y el ADN extraído tanto de micelio como de hojas inoculadas, amplificó los dos marcadores utilizados para el diagnóstico. En las Tablas 3.6 al 3.10, se muestran las lesiones observadas en las hojas de la variedad Canindé 11, causadas por los diferentes aislados

inoculados. Las fotografías de los geles con los productos de amplificación se presentan en el Apéndice 1.

Tabla 3.3: Aislados inoculados sobre la variedad Canindé 11 con su diagnóstico molecular en ADN micelial y ADN de hojas inoculadas, y nota máxima (N+) observada en hojas.

Hospedante	Aislado	ADN micelial		ADN de hojas inoculadas		N+
		Pot-2a	MoT3	Pot-2a	MoT3	
<i>Bromus catharticus</i>	P-004	P	P	P	P	3
<i>Triticum aestivum</i>	P-005	P	P	P	P	3
<i>Avena strigosa</i>	P-015	P	A	A	A	2
<i>Avena strigosa</i>	P-016	P	A	A	A	2
<i>Avena strigosa</i>	P-017	P	A	A	A	2
<i>Digitaria horizontales</i>	P-023	P	A	A	A	0
<i>Lolium multiflorum</i>	P-048	P	A	P	A	3
<i>Digitaria horizontales</i>	P-049	P	A	A	A	0
<i>Lolium multiflorum</i>	P-050	P	P	P	P	3
<i>Cenchrus echinatus</i>	P-055	P	A	P	A	2
<i>Digitaria insularis</i>	P-057	P	A	P	A	2
<i>Digitaria horizontales</i>	P-070	P	A	A	A	0
<i>Cenchrus echinatus</i>	P-071	P	A	P	A	2
<i>Avena strigosa</i>	P-075	P	A	P	A	3
<i>Avena strigosa</i>	P-081	P	A	A	A	1
<i>Avena strigosa</i>	P-084	P	A	P	A	1
<i>Avena strigosa</i>	P-085	P	A	P	A	2
<i>Avena strigosa</i>	P-088	P	A	P	A	1
<i>Digitaria horizontales</i>	P-096	P	A	A	A	0
<i>Digitaria horizontales</i>	P-098	P	A	A	A	0
<i>Digitaria horizontales</i>	P-099	P	A	A	A	0
<i>Triticum aestivum</i>	P-102	P	P	P	P	4
<i>Triticum aestivum</i>	P-103	P	P	P	P	4
<i>Digitaria horizontales</i>	P-107	P	A	A	A	0
<i>Brachiaria sp.</i>	P-109	P	P	P	P	3
<i>Brachiaria sp.</i>	P-110	P	A	A	A	0
<i>Cynodon dactylon</i>	P-112	P	A	P	A	0
<i>Eleusine indica</i>	P-114	P	A	P	A	3
<i>Cenchrus echinatus</i>	P-116	P	A	P	A	0
<i>Triticum aestivum</i>	P-118	P	P	P	P	4
<i>Triticum aestivum</i>	P-119	P	P	P	P	4
<i>Digitaria insularis</i>	P-120	P	A	P	A	0
<i>Triticum aestivum</i>	P-121	P	P	P	P	4

Referencia: P = banda presente, A = banda ausente

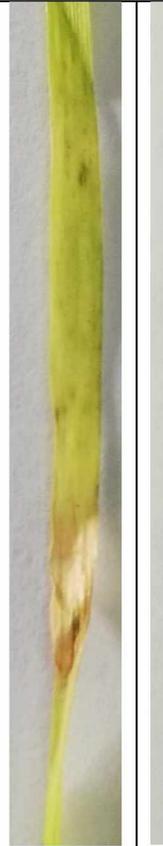
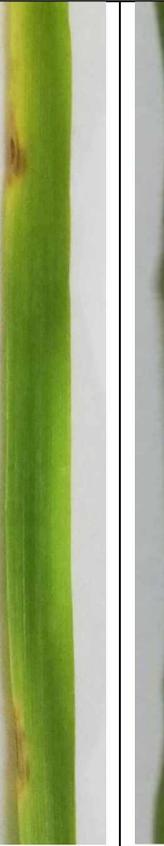
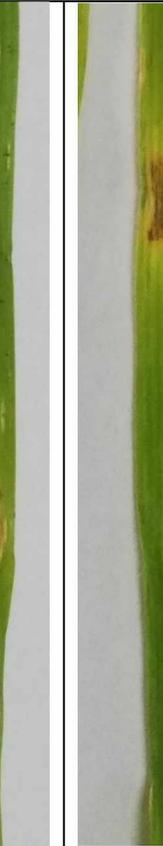
Tabla 3.4: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de trigo y su N+ de infección.

				
P-005 N+ = 3	P-102 N+ = 4	P-118 N+ = 4	P-119 N+ = 4	P-121 N+ = 4

Tabla 3.5: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de *Avena strigosa* y su N+ de infección.

							
P-015 N+ = 2	P-016 N+ = 2	P-017 N+ = 2	P-075 N+ = 3	P-081 N+ = 1	P-084 N+ = 1	P-085 N+ = 2	P-088 N+ = 1

Tabla 3.6: Hojas de la variedad Canindé 11 infectadas con los distintos aislados de *Bromus catharticus* (P-004), *Brachiaria* sp. (P-109), *Cenchrus echinatus* (P-055, P-071), *Digitaria insularis* (P-057), *Eleusine indica* (P-114) y *Lolium multiflorum* (P-048, P-050), y su N+ de infección.

							
P-004 N+ = 3	P-109 N+ = 3	P-055 N+ = 2	P-071 N+ = 2	P-057 N+ = 2	P-114 N+ = 3	P-048 N+ = 3	P-050 N+ = 3

3.3.2.3 Inoculación de malezas

En cuanto a las inoculaciones realizadas con el aislado de trigo P-009 sobre las malezas, se observó que el mismo no causó infección en *D. horizontalis*; y causó lesiones de tipo resistente en *C. echinatus*, mientras que en *B. catharticus*, *E. indica* y *L. multiflorum* causó lesiones de tipo susceptible (Tabla 3.7).

Tabla 3.7: Lesiones causadas por el aislado de trigo P-009 sobre las malezas *Bromus catharticus*, *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica* y *Lolium multiflorum*.

	
<p><i>Bromus catharticus</i> N+ = 3</p>	<p><i>Cenchrus echinatus</i> N+ = 1</p>
	
<p><i>Eleusine indica</i> N+ = 3</p>	<p><i>Lolium multiflorum</i> N+ = 4</p>

En cuanto al diagnóstico con los marcadores moleculares, se observó que únicamente el ADN de las muestras inoculadas de *L. multiflorum* amplificaron ambos marcadores. Las demás muestras no amplificaron los marcadores utilizados para el diagnóstico. En la Tabla 3.8 se presenta un resumen de los principales resultados de la identificación de hospedantes, pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

Tabla 3.8: Síntesis de los principales resultados de la identificación de hospedantes, pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular, realizados con los aislados de *Magnaporthe* spp.

Especies hospedantes de <i>Magnaporthe</i> spp. Identificadas	Patogenicidad en trigo	Amplificación de marcadores moleculares	
		Pot-2a	MoT3
<i>Avena strigosa</i> (aislados de la colección)	+	+	-
<i>Brachiaria</i> sp.	+	+	+
<i>Bromus catharticus</i>	+	+	+
<i>Cenchrus echinatus</i>	-	+	-
<i>Cynodon dactylon</i>	-	+	-
<i>Digitaria horizontales</i>	-	+	-
<i>Digitaria insularis</i>	-	+	-
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Sin datos	Sin datos	Sin datos
<i>Eleusine indica</i>	+	+	-
<i>Lolium multiflorum</i>	+	+	+ y -

Referencias: + = Patogenicidad y amplificación positivas; - = Patogenicidad y amplificación negativos

3.4 Discusión

Los datos obtenidos durante el año de muestreo mostraron la distribución estacional de las especies de malezas normalmente encontradas en los campos de trigo en Paraguay. Se observó que 15 de las 22 especies recolectadas (68%) prevalecieron durante las cuatro estaciones del año de muestreo, siendo *D. insularis* la de mayor prevalencia durante la primavera y el otoño; *A. strigosa* fue la de mayor prevalencia durante el invierno y *Brachiaria* sp., durante el verano.

De las 22 especies recolectadas, se observó la presencia del patógeno en nueve especies (*Brachiaria* sp., *B. catharticus*, *C. dactylon*, *C. echinatus*, *D. horizontalis*, *D. insularis*, *E. indica*, *E. crus-galli* y *L. multiflorum*); la presencia de *M. oryzae* en estas especies ya fue reportada por varios autores entre ellos Metha et al. (2006), Chávez y Kohli (2015), Danelli, (2015). Entre ellas, siete fueron prevalentes durante las cuatro estaciones del año, mientras que dos (*B. catharticus* y *L. multiflorum*) solo estuvieron presentes durante el invierno y parte del otoño y primavera. Esto sugiere que existen varias especies candidatas para la sobrevivencia del patógeno, tanto durante el ciclo de cultivo como fuera del mismo.

Los síntomas observados en las nueve especies mencionadas variaron en cuanto a tamaño, color y forma. En general, los síntomas observados en *Brachiaria* sp., *C. dactylon*, *C. echinatus*, *D. insularis*, *E. indica* y *E. crus-galli*, fueron los más similares entre las especies, manchas foliares más o menos circulares, con bordes oscuros y centros claros, y por lo general pocas lesiones por planta.

En *D. horizontalis* las manchas foliares observadas fueron muy características, redondeadas con centro grisáceo, halo púrpura y abundantes en las plantas. En *B. catharticus*, las lesiones observadas fueron rectangulares a elípticas rodeadas de un halo clorótico; síntomas similares fueron observados por Bastida et al. (2019), en la misma especie recolectada en campos de arroz. Mientras que en *L. multiflorum* se observaron tanto manchas foliares como lesiones en el raquis de la inflorescencia, cubiertos por micelio gris, con el consecuente blanqueamiento de la porción superior al punto de infección, muy similar al síntoma observado en las espigas de trigo.

En cuanto a las pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular, uno de los aislados de *Brachiaria* sp. (P-109), causó lesiones de tipo susceptible en las hojas de la

variedad de trigo Canindé 11. Además, este aislado amplificó los marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico, aportando así evidencias que este género actúa como hospedante alternativo del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

Al respecto, Urashima y Kato (1998) consideran a *Urochloa plantaginea* (*B. plantaginea*) como uno de los hospedantes de *M. oryzae* responsable de la alta variabilidad de este hongo. Inoue et al. (2017) también encontraron un aislado de *B. plantaginea* (BR35), que presentó 100% de coincidencia en la secuencia genómica con el aislado de trigo BR48, para el gen de virulencia PWT3 tipo B. Los análisis comparativos de la secuencia del genoma completo, sugieren que el ancestro del aislado BR48 heredó el segmento cromosómico que portaba el PWT3 tipo B, de un aislado de *Brachiaria* similar al BR35. Este hecho confirma la conclusión de Urashima et al. (1993) que existe compatibilidad sexual entre aislados de trigo y de *B. plantaginea*.

Teniendo en cuenta que *Brachiaria* sp., es una especie perenne forrajera y que fue una de las malezas con mayor prevalencia en los campos comerciales muestreados, estas características la convierten en un hospedante ideal para la sobrevivencia del patógeno de un ciclo a otro.

D. horizontalis, fue la especie en la que se observó con más prevalencia al patógeno, sin embargo, los aislados de esta especie no causaron infección en las hojas de la variedad Canindé 11 o amplificaron el marcador específico MoT3 en el ADN micelial. Cabe mencionar que los aislados de especies como *D. sanguinalis* y *D. horizontales* son clasificados como *P. grisea* que no infectan al trigo (Klaubauf et al., 2014; Chiapello et al., 2015; de Asis Reges et al., 2016). Pero el análisis histopatológico de la interacción patógeno-hospedero en plantas de trigo, *D. insularis* y *D. sanguinalis* realizado por Durante et al. (2018), concluyen que las malezas del género *Digitaria* podrían estar

actuando como fuente de inóculo en los campos de trigo. Su conclusión se basa en el estudio que las plantas de *D. sanguinalis* presentaron las menores respuestas de defensa al ser inoculadas con aislados de trigo. Estos resultados contradictorios son una afirmación más de la complejidad del patógeno y su interacción con el trigo bajo ciertas condiciones climáticas específicas.

El aislado de *C. dactylon*, no causó infección en las hojas de trigo, y el ADN micelial no amplificó el marcador MoT3; al respecto, de Asis Reges et al. (2016), mencionan que, al analizar la secuencia de los genes de la actina y la calmodulina, un aislado de *Cynodon* sp., se agrupó con aislados de especies como *Elionorus candidus*, *Rynchelytrum repens*, *P. maximum*, un aislado de trigo y un aislado de arroz. Considerando que esta especie perenne también fue una de las más prevalentes durante el año, sería importante ampliar la colección de aislados de esta especie para un estudio más representativo.

El aislado de *E. indica* (P-114), causó lesiones de tipo susceptible en la variedad Canindé 11. Sin embargo, el análisis molecular reveló que el mismo no amplificó el marcador específico MoT3. Prabhu et al. (1992), utilizando dos aislados de *E. indica* lograron infectar cinco cultivares de trigo. También Urashima et al. (1993), observaron que las especies *E. coracana* y *E. africana* fueron susceptibles a los 14 aislados de trigo estudiados. Tomando en consideración los resultados de estos trabajos y los antecedentes expuestos, se evidencia que pueden existir más patotipos de *M. oryzae* capaces de infectar al trigo, pero que no amplifican al marcador específico MoT3.

En cuanto a *A. strigosa*, no se observó la presencia del patógeno en las muestras recolectadas, aunque uno de los aislados seleccionados de la colección del Proyecto Pyricularia, el aislado P-075 causó lesiones de tipo susceptible en las hojas de trigo. Esto

concuenda con los resultados de Marangoni et al. (2013), quienes observaron susceptibilidad en 10 cultivares de trigo inoculados con una mezcla de cinco aislados de *P. grisea* (sin. *P. oryzae*) provenientes de avena negra. Así también Urashima et al. (1993) observaron que la especie *A. sativa* fue susceptible a 14 aislados de trigo, 3 aislados de *B. plantaginea* y un aislado de arroz. Considerando estos antecedentes, este género de poáceas también podría ser considerado como un posible hospedante del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*, a pesar de que los aislados estudiados en este trabajo, no hayan amplificado el marcador molecular específico utilizado para el diagnóstico.

Otra de las especies más prevalente durante el año de muestreo fue *Echinocloa crus-galli*. Si bien se observó la presencia del patógeno en la misma, no se logró aislar al mismo. Urashima et al. (1993) mencionan que algunos aislados de trigo, fueron capaces de infectar a esta especie por lo cual no se la puede descartar como posible hospedante del patógeno.

La especie *Ryncheluntrum roseum* fue prevalente durante el año de muestreo, pero sin la presencia del patógeno en las muestras recolectadas. En un trabajo sobre la infección foliar, Prabhu et al. (1992), reportan que dos aislados de esta especie causaron lesiones de tipo susceptible en los cultivares de trigo IAC 21, Anahuac, Candeias, BR-10 y BR-12. Sin embargo, Chávez y Kohli (2018) reportan que, en pruebas de infección cruzada, el aislado de esta especie no causó infección en espigas de trigo.

Los aislados de *C. echinatus* causaron lesiones de tipo resistente en las hojas de trigo, y amplificaron únicamente el marcador Pot-2a, indicando que los mismos pertenecen al género *Pyricularia* pero no al patotipo *Triticum*. Klaubauf et al. (2014) reportan que la especie asociada a *C. echinatus* es *Pyricularia pennisetigena*. Esta especie fue reportada infectando trigo bajo condiciones controladas por de Asis Reges et al.

(2016). Estos autores aclaran que *P. pennisetigena* fue más agresiva que aislados de *P. oryzae* en plántulas de trigo, lo cual no concuerda con lo observado en este trabajo. Se estima que distintas especies de *Pyricularia*, asociadas a la Pyricularia en trigo, pueden generar mayor o menor capacidad de infección dependiendo de la población de una maleza y/o condiciones climáticas que la acompañan en una región en particular.

El aislado de *B. catharticus* (P-004), además de causar lesiones de tipo susceptible en las hojas de la variedad Canindé 11, también amplificó los marcadores diagnósticos. En un trabajo anterior, Chávez y Kohli (2018) observaron que este aislado causó los síntomas típicos de la Pyricularia en espigas de las variedades Canindé 11 e Itapúa 70. Así también, Pieck et al. (2017) quienes desarrollaron el marcador MoT3, mencionan entre las dos únicas excepciones de los aislados utilizados para la validación del marcador, fue un aislado de *B. tectorum* de Paraguay, que fue el único aislado de una maleza que amplificó el marcador. Por otra parte, en un dendrograma publicado por Valent et al. (2019), dos aislados de *Bromus* de Paraguay, se agruparon en dos linajes distintos de la especie *M. oryzae*; uno en el linaje *Lolium* y otro, en el linaje *Triticum*. Estos autores avalan lo mencionado anteriormente que es posible que existan aislados de trigo que causen infecciones oportunistas en esta y otras malezas, cuando las condiciones son altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad. Lo mismo puede pasar con los aislados de malezas que atacan al trigo en condiciones muy favorables.

Los dos aislados de *L. multiflorum* (P-048 y P-050) causaron lesiones de tipo susceptible en las hojas de la variedad Canindé 11, pero se comportaron diferente a nivel molecular. Solo el aislado P-050 amplificó el marcador MoT3, específico del patotipo *Triticum*, no así el aislado P-048. Al respecto, Tosa et al. (2004) observaron que al inocular aislados de *P. oryzae* provenientes de *L. perenne* sobre un cultivar de trigo, se produjeron lesiones de tipo 3. Así también, al inocular plantas de *L. perenne* y *L.*

multiflorum con aislados de trigo, los mismos produjeron lesiones de tipo 4 en hojas. Anteriormente, Chávez y Kohli (2018) habían observado que el aislado P-050 causaba los síntomas típicos del brusone en espigas de las variedades de trigo Canindé 11 e Itapúa 70.

En el año 2017, Farman et al., reportaron la ocurrencia de un caso de brusone del trigo en una única espiga en Estados Unidos. El análisis filogenético concluyó que el aislado de dicha espiga era resultado de la evolución de los aislados del patotipo *Lolium*, que se encuentran naturalmente en ese país, y no provenía de una introducción desde Sudamérica. Sin embargo, Gladieux et al. (2018) mencionan la existencia de aislados de trigo que se agrupan con el linaje *Lolium*. Considerando estos antecedentes, y el comportamiento diferenciado a nivel molecular de los dos aislados de *Lolium* estudiados, es posible que esté ocurriendo lo mismo en los campos de Paraguay, y existan dos patotipos capaces de causar el brusone del trigo.

En las pruebas de patogenicidad realizadas con un aislado de trigo sobre plantas de *B. catharticus* y *E. indica*, se observaron lesiones de tipo susceptible, sin embargo, al realizar el diagnóstico molecular no se observaron amplificaciones. Esto pudo deberse a que había escasa presencia del patógeno en las lesiones, y al realizar la extracción de ADN total, la cantidad de ADN del patógeno resultó imperceptible por los marcadores, a pesar de que según Pieck et al. (2017), el MoT3 es capaz de detectar incluso cantidades de 0,1ng de ADN purificado. También es posible que haya habido presencia de inhibidores de PCR que no permitieron la amplificación de los marcadores. Por otro lado, en las pruebas realizadas sobre plantas de *L. multiflorum*, el diagnóstico molecular si fue posible, confirmando la capacidad de esta maleza de hospedar al patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

Hay que considerar lo mencionado por Valent et al. (2019), de que el patotipo *Triticum* es capaz de infectar de manera oportunista las malezas de invierno como *B. catharticus*, *L. multiflorum* y *A. strigosa*. Si fuera el caso, es posible que el patógeno sobreviva en las semillas de estas malezas, las cuales permanecen como semillas durmientes en el suelo durante el verano. En el cultivo de arroz, Akase y Kusaba (2017) mencionan que *M. oryzae* sobrevive en lesiones y semillas de malezas durante el invierno, sugiriendo que los hospedantes secundarios son el mecanismo por el cual sobreviven de una estación a otra.

Por todo lo expuesto, se acepta la primera parte de la hipótesis 2, las malezas principalmente de la familia Poaceae presentes en los campos de trigo, son hospedantes del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*. Para probar la segunda parte de esta hipótesis, que estas malezas actúan como fuente de inóculo y medio de supervivencia de una estación a otra, se requieren estudios más específicos.

En cuanto a la hipótesis 3, los aislados de *Magnaporthe* obtenidos de las malezas que sean capaces de infectar al trigo, pertenecen al patotipo *Triticum* de *Magnaporthe oryzae*, los datos obtenidos revelan que existen aislados capaces de infectar al trigo que no pertenecen al patotipo *Triticum*, por lo cual se acepta parcialmente esta hipótesis.

3.5 Conclusiones

En este capítulo se identificaron las siguientes especies de malezas hospedantes de *Magnaporthe* spp. en Paraguay: *Brachiaria* sp., *B. catharticus*, *C. echinatus*, *C. dactylon*, *D. horizontalis*, *D. insularis*, *E. crus-galli*, *E. indica* y *L. multiflorum*.

Este estudio constató la patogenicidad de los aislados provenientes de lesiones observadas en *Brachiaria* sp., *B. catharticus* y *L. multiflorum*, lo que fue confirmado mediante el uso de marcadores moleculares al patotipo *Triticum* de *M. oryzae*. También

se identificaron: un aislado de *E. indica*, un aislado de *L. multiflorum* y un aislado de *A. strigosa* que fueron patogénicos al trigo, pero de acuerdo al análisis molecular actual, no corresponden al patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

Es importante mencionar que este trabajo, es el primero realizado con una colección de aislados de *M. oryzae* de Paraguay, que además combina pruebas de patogenicidad y diagnóstico molecular. Se espera realizar estudios más detallados en el futuro, tanto a nivel molecular como a nivel biológico, que permitan esclarecer aún más el rol epidemiológico de las malezas, como fuentes de inóculo del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*.

CAPÍTULO 4

Discusión general

4.1 Introducción

La Pyricularia del trigo es considerada actualmente una amenaza para la producción de trigo a nivel global (Goulart y Paiva, 1992; Kohli et al., 2011; Malaker et al., 2016), debido a su potencial de daño que puede causar pérdidas de hasta 100% en el rendimiento bajo condiciones favorables (Goulart et al., 2007; Viedma, 2010, Cruz y Valent, 2017). Por otra parte, sumado a la alta variabilidad del patógeno, ha sido difícil identificar diversidad en las fuentes de resistencia a la enfermedad.

Uno de los aspectos claves para el manejo de la enfermedad es conocer claramente los aspectos epidemiológicos de la misma. Desafortunadamente, hay muy poca información al respecto (Cruz y Valent, 2017). La mayoría de los estudios realizados buscando esclarecer los aspectos epidemiológicos de la Pyricularia fueron hechos bajo condiciones controladas. Dicha falencia hace necesario estudiar la epidemiología de la misma en condiciones de campo utilizando nuevas herramientas disponibles a nivel molecular para esclarecer las razones de las epifitias.

Este estudio fue diseñado para entender la función de los conidios de *Magnaporthe oryzae*, presentes en las hojas del tercio inferior del cultivo, mediante el muestreo y cuantificación de los mismos, abarcando las principales zonas productoras de trigo en Paraguay. Además, se monitoreó la presencia de conidios del patógeno en el aire durante el ciclo del trigo, y el rol de las malezas hospedantes del patógeno, mediante pruebas de infección cruzada y diagnóstico molecular.

En este capítulo, se presenta una síntesis de los principales resultados, analizando los objetivos e hipótesis planteadas, así como las conclusiones formuladas. Además, se presentan las implicancias futuras que puedan desprenderse de este trabajo.

4.2 Síntesis de los principales resultados y contraste de hipótesis

Con el fin de cuantificar los conidios de *M. oryzae* presentes en las hojas de trigo en condiciones de campo en Paraguay (Objetivo 1), se realizó un muestreo mensual de las hojas del estrato inferior en nueve campos de producción comercial de trigo en las principales zonas de producción: departamentos de Canindeyú, Alto Paraná e Itapúa. Considerando el comportamiento del clima que resultó ser moderado durante el ciclo 2018 (Figura 2.4), se instaló una parcela experimental en el CEY (tres épocas de siembra) que garantizó las condiciones de humedad requeridas por el patógeno, mediante un sistema de riego por aspersión.

Se constató la presencia del patógeno en las hojas en ambos ambientes, aunque con notables diferencias en la cantidad y persistencia durante el ciclo (Valor H: 174,1; valor $p:3,91 \cdot 10^{-65}$). En los campos comerciales, cuyos valores de humedad relativa dependen de las precipitaciones durante el ciclo (Figura 2.5), se observó una escasa e intermitente presencia de conidios en las hojas. Sin embargo, en la parcela bajo riego en el CEY, la presencia de conidios del patógeno en las hojas fue constante durante todo el ciclo, no solo durante la primera época de siembra sino también en la segunda y tercera época.

La presencia de conidios en las hojas colectadas en los campos comerciales (Tabla 2.2), no se tradujo en la infección de las espigas debido a la influencia de las condiciones ambientales (Figura 2.4). Contrariamente, las tres épocas de siembra instaladas bajo riego en el CEY, mostraron la presencia de conidios en hojas (Tabla 2.3) y espigas enfermas, aunque en un porcentaje moderado (11,26%; 2,31% y 2,31%, para la primera, segunda y tercera época, respectivamente). Al relacionar la cantidad de conidios cuantificados en las hojas del cultivo con el porcentaje de espigas enfermas observado, tanto en los campos comerciales como en la parcela instalada en el CEY, se encontró una fuerte correlación entre ambas variables ($r = 0,98$) (Figura 2.7). Por lo expuesto y considerando que las

semillas utilizadas en la parcela instalada en el CEY fueron tratadas con fungicidas eficientes para la erradicación del patógeno en semillas, se acepta la hipótesis 1 (Los conidios de *M. oryzae* se desarrollan en las hojas de trigo durante el ciclo de cultivo y constituyen una potencial fuente de inóculo para las espigas) agregando que esto ocurre siempre que se tengan las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del patógeno.

El monitoreo de la presencia y el movimiento de conidios de *M. oryzae* en el aire durante el ciclo del cultivo (Objetivo 4) con el uso de trampas caza-esporas, permitió observar un flujo de conidios en el aire durante el ciclo de cultivo (Tabla 2.6), aunque la metodología utilizada no permitió precisar si los conidios observados pertenecían a la especie *M. oryzae*. El flujo de conidios parece estar fuertemente influenciado por las condiciones de temperatura y humedad presentes, ya que el patógeno depende en gran medida de estos factores para la dispersión, colonización de nuevos hospedantes y producción de inóculo (Teng et al., 1991; Ebbolle, 2007; Danelli, 2015). En consecuencia, se acepta la hipótesis 4, que el aire actúa como mecanismo eficiente de dispersión de los conidios de *M. oryzae*, llevándolos desde las hojas y posiblemente desde algunas malezas hasta las espigas durante el ciclo del cultivo.

El muestreo mensual de malezas con síntomas del ataque de *M. oryzae*, permitió identificar malezas hospedantes del patógeno en las principales zonas productoras de trigo en Paraguay (Objetivo 2). Este muestreo fue realizado en 15 campos comerciales de trigo distribuidos en los departamentos de Canindeyú, Alto Paraná e Itapúa. Se constató la presencia de *Magnaporthe* spp. en nueve especies de malezas representando el 41% de las muestras, todas de la familia Poaceae colectadas durante el año de muestreo (Figura 3.12).

Con el fin de diagnosticar la presencia del patotipo *Triticum* de *M. oryzae* a partir de los aislados de las malezas que, en pruebas de infección cruzada fueran capaces de infectar al trigo, se utilizaron marcadores moleculares específicos (Objetivo 3). Así se observó, que los aislados de *Brachiaria* sp., *B. catharticus*, *L. multiflorum*, *A. strigosa* y *E. indica*, causaron infección en las hojas de trigo de la variedad susceptible Canindé 11 (Tabla 3.5). Sin embargo, sólo los aislados de *Brachiaria* sp., *B. catharticus* y uno de los aislados de *L. multiflorum* amplificaron los marcadores moleculares empleados para el diagnóstico.

De acuerdo con lo observado, hay malezas que podrían actuar como fuente de inóculo para el trigo durante el ciclo del cultivo (*B. catharticus* y *L. multiflorum*) y como medio de supervivencia de un ciclo a otro (*Brachiaria* sp.).

Por todo lo expuesto se acepta la hipótesis 2, que las malezas principalmente de la familia Poaceae (*B. catharticus*, *A. strigosa*, *E. indica*, *L. multiflorum*, *C. echinatus* entre otras), presentes en los campos de trigo son hospedantes del patotipo *Triticum* de *M. oryzae* actuando como fuente de inóculo para el cultivo y como medio de supervivencia de una estación a otra. Y se acepta parcialmente la hipótesis 3, que los aislados del género *Magnaporthe* obtenidos de las malezas que son capaces de infectar al trigo, pertenecen al patotipo *Triticum* de *Magnaporthe oryzae*, considerando que se encontraron tres aislados de malezas que infectaron al trigo, que según los marcadores diagnósticos no corresponden al patotipo *Triticum* de *M. oryzae* (P-048 de *L. multiflorum*, P-075 de *A. strigosa* y P-114 de *E. indica*).

Con estos resultados, se evidencia que aquellos patotipos filogenéticamente más cercanos al patotipo *Triticum*, como lo son el patotipo *Lolium* y el patotipo *Eleusine* (Gladieux et al., 2018), son capaces de infectar al trigo. En otras palabras, son nuevas

cepas que aumentarían la variabilidad patogénica y exponen a las escasas fuentes de resistencia identificadas hasta la fecha.

4.3 Avances logrados en el conocimiento

La cuantificación de conidios presentes en las hojas de trigo durante el ciclo del cultivo y su relación con el porcentaje de espigas enfermas, constituye un importante aporte al conocimiento en lo que se refiere a la epidemiología de la enfermedad.

Considerando que algunos autores, basados en la cantidad de conidios observados en las hojas basales de trigo, recomiendan la aplicación de fungicidas en etapas tempranas del cultivo para reducir el inóculo inicial (Cruz et al., 2016; Cruz et al., 2019), el conocimiento generado por este trabajo, de que la sola presencia de conidios en las hojas no implica la aparición de una epifitía, especialmente si no se tienen las condiciones ambientales favorables para el patógeno, permitirá plantear medidas de manejo integrado de la enfermedad más adecuadas y económicas.

El monitoreo de la presencia de conidios en el aire durante el ciclo del cultivo, es un aporte a la comprensión de la dinámica de la dispersión del patógeno. Lo cual también tiene implicancias en cuanto conocimiento de la biología del patógeno, y el manejo integrado de la enfermedad, especialmente en relación con las condiciones ambientales.

En cuanto a la identificación de malezas hospedantes y diagnóstico del patotipo *Triticum* de *M. oryzae*, mediante el uso de marcadores moleculares, este trabajo es el primero en combinar técnicas de diagnóstico molecular específico y pruebas de infección cruzada. Los resultados logrados confirman la capacidad de las malezas de hospedar al patotipo *Triticum* de *M. oryzae*, tanto a nivel biológico, mediante las pruebas de infección cruzada como molecular mediante el uso del marcador específico MoT3. Esto permite

dilucidar aspectos de la biología del agente causal de la Pyricularia del trigo y sus implicancias en el ciclo de la enfermedad.

4.4 Aplicaciones e implicancias para investigaciones futuras

De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 2, las hojas del estrato inferior del cultivo de trigo presentan naturalmente al patógeno durante el ciclo del cultivo; incluir el monitoreo de la presencia del patógeno en las hojas y en el aire durante el ciclo del cultivo, puede aportar datos que ayuden a mejorar los sistemas de alerta temprana desarrollados hasta la fecha (Fernandes et al., 2017) o a crear otros nuevos.

Los hallazgos del capítulo 3, constituyen un avance en el conocimiento de la variabilidad del patógeno, a la que están expuestas las fuentes de resistencia conocidas hasta la fecha. Este hecho convoca a los programas de mejoramiento a tener en cuenta esta variabilidad a la hora de evaluar la resistencia de las nuevas líneas desarrolladas.

Los conocimientos generados en este trabajo, son útiles para desarrollar medidas y planes de manejo integrado, que tomen en cuenta los aspectos de la dinámica y variabilidad poblacional del patógeno, logrando un manejo más adecuado y efectivo de la enfermedad.

Considerando que los datos analizados en este trabajo son producto de un solo año de muestreo, es necesario repetir el trabajo durante al menos dos años más, para así tener información más completa acerca del rol de las hojas de trigo como fuente de inóculo.

También es necesario realizar el monitoreo de conidios en el aire durante todo el año y no solo durante el ciclo de cultivo, con el fin de comprender la dinámica de producción y dispersión de inóculo del patógeno y la ocurrencia o no de las epifitias. Así

como encontrar una metodología que permita identificar a nivel de especie los conidios observados en las trampas.

Teniendo en cuenta que la colección de aislados de hospedantes, estudiados en este trabajo fue pequeña, sería importante aumentar la colección de aislados de cada hospedante, para realizar un estudio más representativo que permita caracterizar con mayores detalles la población de *M. oryzae* presente en los campos de trigo de Paraguay.

Además, sería importante realizar estudios de la dinámica poblacional de las malezas identificadas como hospedantes del patotipo *Triticum* de *M. oryzae* y otros, con el fin de estimar el potencial de las mismas para la sobrevivencia, variabilidad genética y multiplicación de inóculo. Además de profundizar estudios filogenéticos y de patogenicidad de los aislados de malezas que infectaron al trigo, pero que no pertenecen al patotipo *Triticum*.

Finalmente, realizar los trabajos de muestreo y monitoreo, tanto de hojas, conidios en el aire y malezas; complementándolos al mismo tiempo con el diagnóstico molecular, permitirá establecer con certeza el rol de cada uno de estos componentes en el ciclo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Akase, K.; Kusaba, M. 2017. Overwintering of *Pyricularia oryzae* in wild infected foxtails. *Journal of General Plant Pathology* 83(4):197-204.
- Alarcón, E. 2010. *El cultivo de trigo en el Paraguay*. Editorial El lector. 192 pág.
- Alves, K.J.P.; Fernandes, J.M.C. 2006. Influencia da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulacao de *Magnaporthe grisea* em trigo. *Fitopatologia Brasileira* 31:579-584. DOI: 10.1590/S0100-41582006000600007
- Anh, V.I.; Anh, N.T.; Tagle, A.G.; Vy, T.T.P.; Inoue, Y.; Takumi, S.; Chuma, L.; Tosa, Y. 2015. Rmg8, a new gene for resistance to Triticum isolates of *Pyricularia oryzae* in hexaploid wheat. *Phytopathology* 105:1568:1572. DOI: 10.1094/PHYTO-02-15-0034-R
- Anjos, J.R.N; Charchar, M.J.A. 2000. Natural infection by *Pyricularia grisea* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 25:205-208.
- Araujo, L.; Soares, J.; de Filippi, M.; Rodriguez, M. 2015. Cytological aspects of incompatible and compatible interactions between rice, wheat and the blast pathogen *Pyricularia oryzae*. *Scientia Agricola* 73(2):177-183. DOI: //dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0169
- Aricapa, M.G.; 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.

- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, US. 218 p.
- Bastida, L.M.; Gutiérrez, S.A.; Carmona, M.A. 2019. Aislamiento y caracterización sintomática de *Pyricularia* spp. en arroz y otros hospedantes en la provincia de Corrientes (Argentina). *Summa Phytopathologica* 45(2):200-203.
- Bedendo, J.F.; Prabhu, A.S. 2005. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). Pp. 79-90. Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.; Bergamin, A.; Camargo, L. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Volumen 2. 4 ed. São Paulo, BR. Ceres.
- Boddy, L. 2016. Pathogens of autotrophs. In: Watkinson, S.; Boddy, L.; Money, N. (eds). *The Fungi*. Elsevier Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6>
- Cabrera, M.G.; Gutiérrez, S.A. 2007. Primer registro de *Pyricularia oryzae* en cultivos de trigo del NE de Argentina. Pp. 60. En: Astiz Grasso, M.; Molina, M. (eds). Jornada de actualización en enfermedades de trigo. Lavallol, Buenos Aires. Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.
- CAPECO, página oficial. Consultado el 22 de febrero de 2021. Disponible en: <http://capeco.org.py>
- Cardoso, C.A. de A.; Reis, E.M.; Moreira, E.N. 2008. Development of a warming system for wheat blast caused by *Pyricularia grisea*. *Summa Phytopathologica* 34(3):216-221.
- Cardozo, L.; Chávez, A.; Bobadilla, N.; Perez, P.; Kohli, M. 2018. Variable resistance of bread wheat (*Triticum aestivum*) lines carrying 2NS/2AS translocation to wheat blast. *Plant Breeding*. Pp. 62-68. DOI: 10.1111/pbr.12661

- Carmona, M.; Barreto, D.; Reis, E. M. 1999. Detection, transmission and control of *Drechslera teres* in barley seed. *Seed Science & Technology* 27:761-769.
- Carmona, M.; Sautua, F. Conceptos básicos del manejo integrado de enfermedades (MIE). Pp. 345-349. En: Cordo, C.; Sisterna, M. 2014 (eds). Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Castroagudín, V.L.; Ceresini, P.C.; de Oliveira, S.C.; Reges, J.T.A.; Maciel, J.L.N.; Bonato, A.L.V.; Dorigan, A.F.; McDonald, B.A. 2015. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105:284-294.
- Castroagudín, V.L.; Moreira, S.I.; Pereira, D.A.S.; Moreira, S.S.; Brunner, P.C.; Maciel, J.L.N.; Crous, P.W.; McDonald, P.A.; Alves, E.; Ceresini, P.C. 2016. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. *Persoonia* 37:199–216. DOI: <http://dx.doi.org/10.3767/003158516X692149>
- Castroagudín, V.L.; Danelli, A. L. D.; Moreira, S.I.; Reges, J. T.A; de Carvalho, G.; Maciel, J.L.N.; Bonato, A. L. V.; Forcelini, C. A.; Alves, E.; McDonald, B.A.; Croll, D.; Ceresini, P.C. 2017. The wheat blast pathogen *Pyricularia graminis-tritici* has complex origins and a disease cycle spanning multiple grass hosts. *Biorxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/203455>
- Cazal, C.; Chávez, A.; Reyes, Y.M.; Kohli, M.M.; Perez, P. 2018 (a). Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to wheat blast disease. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1):35-49. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1807-5

- Cazal, C.; Arrúa, A.; Moura, J.; Reyes, Y.; Chávez, A.; Kohli M. 2018 (b). Comparación de eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de *Magnaporthe* sp. y su uso con marcadores moleculares. Pp. 70-76. En: Chávez, A.; Kohli, M. (ed). *Pyricularia* de trigo en Paraguay. Compendio de investigación. 2018. CAPECO. Asunción, Paraguay.
- Ceresini, C.P.; Castroagudín, V.L.; Rodrigues, F.; Rios, J.A.; Aucique-Perez, C.E.; Moreira, S.; Croll, D.; Alves, E.; de Carvalho, G.; Maciel, J.L.N.; McDonald, B.A. 2019. Wheat blast: from its origins in South America to its emergence as a global threat. *Molecular Plant Pathology* 20 (2):155-172. DOI: 10.1111/mpp.12747
- Chávez, A.; Kohli M.M. 2015. Hospederos alternativos de *Magnaporthe grisea* del trigo en Paraguay. *Investigación Agraria* 17(1):54-59.
- Chávez A.; Cazal C.; Rojas A.; Guillén A.; Núñez A.; Kohli M. 2015. Evaluación de la concentración de conidios para la inoculación de materiales de trigo con *Magnaporthe grisea*. Pp: 168-169. En: Memorias del I Congreso Agrario del IPTA. Trabajos de investigación. Encarnación, Paraguay. Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria.
- Chávez, A.; Kohli, M. 2018 (a). Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* in varieties and wheat lines grown in Paraguay. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36 (2):276-286. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-3
- Chávez, A.; Kohli M. 2018 (b). Identificación de hospedantes alternativos de *Magnaporthe* sp. en campos de trigo de Paraguay. Pp. 18-25. En: Chávez, A; Kohli, M. (eds.). *Pyricularia* de trigo en Paraguay. Compendio de investigación. 2018. CAPECO. Asunción, Paraguay.
- Chiapello, H.; Mallet, L.; Guérin, C.; Aguilera, G.; Amselem, J.; Kroj, T.; Ortega-Abboud, E.; Lebrun, M.H.; Henrissat, B.; Gendrault, A.; Rodolphe, F.; Tharreau, D.; Fournier, E. 2015. Deciphering genome content and evolutionary relationships of isolates from the

fungus *Magnaporthe oryzae* attacking different host plant. *Genome Biology and Evolution* 7(10):2896–2912. DOI:10.1093/gbe/evv187

CIMMYT. 2019 (a). ¿Qué es el brusone del trigo? Explicativos. CIMMYT global wheat program. Consultado en línea 20/03/2020. Disponible en: <https://www.cimmyt.org/es/noticias/que-es-el-brusone-del-trigo/>

CIMMYT. 2019 (b). Understanding and managing the threat of wheat blast in South Asia, South America, and beyond. CIMMYT global wheat program. Consultado en línea 20/03/2020. Disponible en: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/16947/57941.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Coelho, M.A.; Torres, G.A.; Cecon, P.R.; Santana, F. 2016. Sowing date reduces the incidence of wheat blast disease. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51(5): 631-637. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500025

Couch, B.; Kohn, L. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683-693.

Couch, B.; Fudal, I.; Lebrun, M.H.; Tharreau, D.; Valent, B.; van Kim, P.; Notteghém, J.L.; Kohn, L. 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. *Genetics* 170: 613-630.

Cruz, C.D.; Kiyuna, J.; Bockus, W.; Todd, T.; Stack, P.; Valent, B. 2015. *Magnaporthe oryzae* conidia on basal wheat leaves as a potential source of wheat blast inoculum. *Plant Pathology* 64:1491-1498.

- Cruz, C.D.; Peterson, G. L.; Bockus, W. W.; Kankanala, P.; Dubcovsky, J.; Jordan, K. W.; Valent, B. 2016. The 2NS translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the *Triticum* pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Science* 56:990–1000. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.07.0410>
- Cruz, C.D.; Valent, B. 2017. Wheat blast disease: danger on the move. *Tropical Plant Pathology*. Springer. DOI: 10.1007/s40858-017-0159-z
- Cruz, C.D.; Santana, F.; Todd, T.; Maciel, J.; Kiyuna, J.; Baldelomar, D.; Cruz, A.; Lau, D.; Seixas, C.; Goulart, A.; Sussel, A.; Schipanski, C.; Chagas, D.; Coelho, M.; Montecelli, T.; Utiamada, C.; Custodio, A.; Rivadeneira, M.; Bockus, W.; Valent, B. 2019. A multi-environment assessment of fungicide performance for managing wheat head blast (WHB) in Brasil and Bolivia. *Tropical Plant Pathology* 44:183-191. DOI: 10.1007/s40858-018-0262-9
- Danelli, A. 2015. Virulência, processo infeccioso e sensibilidade a fungicidas de *Magnaporthe oryzae* associado à cultura do trigo. Thesis (Ph.D. course in Agronomy) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.
- Danelli, A.; Fernandes, J. M. C.; Maciel, J. L. N.; Boaretto, C.; Forcelini, C.A. 2019. Monitoring *Pyricularia* sp. airborne inoculum in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Summa Phytopathologica* 45(4):361-367. DOI: 10.1590/0100-5405/178086
- de Asis Reges, J.T.; Negrisoli, M.M.; Doriga, A.F.; Castroágudín, V.L.; Maciel, J.L.N.; Ceresini, P.C. 2016. *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* from invasive grasses infect signal grass, barley and wheat. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 46: 206-214.
- Dirchwolf, P.; Gutiérrez, S.; Carmona, M. 2015. Sensibilidad in vitro de *Pyricularia grisea* a tres mezclas de fungicidas. In vitro sensitivity of *Pyricularia grisea* to three fungicides

mixtures. Presentado en el XXXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia. 10 a 12 de Febrero de 2015, Araras, San Pablo, Brasil.

Dorigan, A. F.; de Carvalho, G.; Poloni, N. M.; Negrisoli, M. M.; Maciel, J. L. N.; Ceresisni, P. C. 2019. Resistance to triazole fungicides in *Pyricularia* species is associated with invasive plants from wheat fields in Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy* 41. Doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.39332

Durante, L.G.; Bacchi, L.M.; de Souza, Y.E.; Graichen, F.E. 2018. Reaction of wheat plants and alternative hosts to *Magnaporthe oryzae*. *Arquivos do Instituto Biologico* 85:1-6. DOI: 10.1590/1808-1657000952017

Ebbole, D.J. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Anual Review of Phytopathology* 45: 437-456.

Farman, M.; Peterson, G.; Chen, L.; Starnes, J.; Valent, B.; Bachi, P.; Murdock, L.; Hershman, D.; Pedley, K.; Fernandes, J.M.; Bavaresco, J. 2017. The *Lolium* pathotype of *Magnaporthe oryzae* recovered from a single blasted wheat plant in the United States. *Plant Disease* 101:684-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0700-RE>

Fernandes, J.M.; Pavan, W. 2010. Sistemas de predicción para enfermedades en cereales de invierno: Fusariosis y Brusone. Pp. 37-39. En: Pereyra, S.; Díaz de Ackerman, M.; Germán, S.; Cabrera, K. (eds.). Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Unidad de comunicación y transferencia de tecnología del INIA. Montevideo, Uruguay.

Fernandes, J.M.C.; Nicolau, M.; Pavan, M.; Amaral, C.; Karrei, M.; de Vargas, F.; Boeira, J.L.; Tagliari, A.; Tsukahara, R. 2017. A weather-based model for predicting early season inoculum build-up and spike infection by the wheat blast pathogen. *Tropical Plant Pathology* 42:230–237. DOI 10.1007/s40858-017-0164-2

- Gladieux, P.; Condon, B.; Ravel, S.; Soanes, D.; Maciel, J.L.N.; Nhani, A.; Chen, L.; Terauch, R.; Lebrun, M.H.; Tharreau, D.; Mitchell, T.; Pedley, K.; Valent, B.; Talbot, N.; Farman, M.; Fournier, E. 2018. Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. mBio. DOI: 10.1128/mBio.01219-17
- Gladieux, P.; Ravel, S.; Rieux, A.; Cros-Arteil, S.; Adreit, H.; Milazzo, J.; Thierry, M.; Fournier, E.; Terauchi, R.; Tharreau, D. 2018. Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. mBio. DOI: 10.1128/mBio.01806-17
- Gomes, D.; Rocha, V.; Pereira, O.; de Souza, M. 2017. Damage of wheat blast on the productivity and quality of seeds as a function of the initial inoculum in the field. Journal of Seeds Science 39(1):66-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n117268866>
- Goulart, A.C.P.; Paiva, F. de A. 1990. Transmissão de *Pyricularia oryzae* através de sementes de trigo (*Triticum aestivum*). Fitopatologia Brasileira 15(4):359-362.
- Goulart, A.; Paiva, F. 1992. Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 17(3):321-325.
- Goulart, A.; Paiva, F. 1993. Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de *Helminthosporium sativum* e *Pyricularia oryzae*. Summa Phytopathologica 19:199-202
- Goulart, A.; Paiva, F. 2000. Avaliação de perdas no rendimento de grãos de trigo causados por *Pyricularia grisea*, no período de 1988 a 1992, em Mato Grosso do Sul. Boletim de pesquisa N°7. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados, MS. 31 p.

- Goulart, A.; Souza, P.G.; Urashima, A.S. 2007. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. Summa Phytopathologica 33:358-363. DOI: 10.1590/S0100-54052007000400007
- Gupta, D.R.; Reyes, C.S.; Win, J.; Soares, D.M.; Ryder, L.S.; Croll, D.; Bhattacharjee, P.; Hossain, M.S.; Mehmud, N.U.; Mehmud, M.S.; Surovy, M.Z.; Talbot, N.J.; Kamoun, S.; Islam, M.T. 2018. The MoT3 assay does not distinguish between *Magnaporthe oryzae* wheat and rice blast isolates from Bangladesh. Biorxiv. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/345215>
- Gutiérrez, S.A.; Cúndom, M.A. 2015. *Pyricularia oryzae* en cultivos de cebada en Corrientes (Argentina). Summa Phytopathologica 41(4):318-320.
- Halmos, S. 1970. Inoculum sources of *Pyricularia grisea*, the cause of pitting disease of bananas. Phytopathological Notes 60:183–4.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica 4(1). art. 4: 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Helguera, M.; Khan, I. A.; Kolmer, J.; Lijaveztky, D.; Zhong-Qi, L.; Dubcovsky, J. 2003. PCR assays for the Lr37-Yr17-Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Science 43(5):1839–1847. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1839>
- Igarashi, S.; Utiamada, C.M.; Igarashi, L.C.; Kazuma, A.H.; Lopes, R.S. 1986. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. Fitopatologia Brasileira 11:351- 352.

- Inoue, Y.; Vy, T.P.T.; Yoshida, K.; Asano, H.; Mitsuoka, C.; Asuke, S.; Anh, V.L.; Cumagun, C.J.R.; Chuma, I.; Terauchi, R.; Kato, K.; Mitchell, T.; Valent, B.; Farman, M.; Tosa, Y. 2017. Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. *Science* 357:80–83.
- Kato, H.; Yamamoto, M.; Yamaguchi-Ozaki, T.; Kadouchi, H.; Iwamoto, Y.; Nakayashiki, H. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusidae and Zingiberaceae plants. *Journal of General Plant Pathology* 66(1):30-47.
- Kim, C.K. 1994. Blast management in high input, high yield potential temperature rice ecosystems. Pp. 451-454. In: Zeigler, R. S.; Leong, S. A.; Teng, P. S. (Orgs). *Rice blast disease*. Wallingford: CAB International.
- Klaubauf, S.; Tharreau, D.; Fournier, E.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W.; de Vries, R.P.; Lebrun, M.H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology* 79:85-120.
- Kohli, M.; Viedma, L.; Cubilla L. 2007. Avances en la investigación triguera y los desafíos futuros. Pp. 9-19. En: Kohli, M.; Cubilla, L. (eds). *Primer seminario nacional de trigo: Del grano al pan*. CAPECO. Asunción. Paraguay.
- Kohli, M.; Pedretti, R.; Viedma, L. 2010. History of wheat breeding in Paraguay. In: Vendredi 2010. *Wheat breeding: country perspectives*.
- Kohli, M.; Mehta Y.R.; Guzman E.; De Viedma, L.; Cubilla, L.E. 2011. *Pyricularia* blast- a threat to wheat cultivation. *Czech Journal Genet Plant*. 47:130-134.

- Kohli, M.; Cabrera, G.; Cubilla L.E. 2012. Guía práctica para el manejo y la producción de trigo. IPTA/CAPECO/INBIO. Asunción, Paraguay. 52 p.
- Kohli, M. 2013. Las enfermedades de trigo y su manejo. Revista Todo campo. Editorial El país. Asunción. Paraguay. 12 p.
- Kohli, M.; Cazal, C.C.; Chávez, A. 2020. Integrated management of wheat blast disease. Pp. 175-194. In: Kumar, S.; Kashyap, P.L.; Singh, G.P. (eds). Wheat blast. Boca Raton. FL. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429470554>
- Lima, M.I.P.M. 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
- Maciel, J.L. N.; Ceresini, P.C.; Castroagudín, V.L.; Zala, M., Kema; G.H.J.; McDonald, B.A. 2014. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. *Phytopathology* 104:95-107.
- Malaker, P.K.; Reza, M.M.A.; Hakim, M.A.; Barma, N.C.D.; Mannaf, M.A.; Khaleque, M.A.; Islam, R.; Tiwari, T.P.; Duvellier, E. 2016. Occurrence of wheat blast in Bangladesh. Pp. 128. In: Madeiros Del Ponte, E.; Bergstrom, G.; Pavan, W.; Lazzaretti, A.; Cunha Fernandes, J.M. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Marangoni, M.; Nunes, M.; Fonseca, N.; Mehta, Y.R. 2013. Pyricularia blast on white oats- a new threat to wheat cultivation. *Tropical Plant Pathology* 38(3):198-202.
- March, G.J.; Oddino, C.M.; Marinelli, A.D. 2013. Introducción a la epidemiología agrícola. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.

- Mehta, Y.; Baier, A. 1998. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticales e trigo no Estado do Paraná. Grupo Paulista de Fitopatologia.
- Mehta, Y.R.; Nunes, M.P.; Oliveira, J.C. 2006. Ocorrência de brusone em aveia no Estado do Paraná. Páginas 55-67. In: Resultados experimentais. XXVI Reuniao de Comissao Brasileira de Pesquisa de aveia, Guarapuva, Paraná, Brazil.
- Moreira, S.I.; Ceresini, P.C.; Alves, E. 2015. Reproducao sexuada em *Pyricularia oryzae*. Summa Phytopathologica 41(3):172-182.
- Naumann, C.; Coronel, M. 2008. Atlas ambiental del Paraguay: con fines educativos. Cooperación Técnica Alemana GTZ. Secretaría del ambiente del Paraguay SEAM. Ministerio de Educación y Cultura del Paraguay MEC. Asunción, Paraguay. 84 p.
- Oliveira, S.C.; Castroagudin, V.L.; Maciel, J.L.N.; Pereira, D.A.S.; Ceresini, P.C. 2015. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. Summa Phytopathologica 41(4):298-304.
- Pedretti, R.; Viedma, L.; Kohli M. 2004. Evolución histórica de la investigación del trigo en el Paraguay. En: Avances y resultados de la investigación del trigo en el Paraguay. Publicación especial MAG/IICA/CAPECO. Asunción. Paraguay
- Perelló, A. 2014. Enfermedades nuevas y emergentes en trigo. Pp. 186-200. En: Cordo, C.; Sisterna, M. 2014 (eds). Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Perelló, A.; Martínez, I.; Molina, M. 2015. First report of virulence and effects of *Magnaporthe oryzae* isolates causing wheat blast in Argentina. Plant Disease 99:1177.

- Perelló, A. 2016. Update on recent wheat blast research progress in Argentina. Pp. 146. In: Madeiros Del Ponte, E.; Bergstrom, G.; Pavan, W.; Lazzaretti, A.; Cunha Fernandes, J.M. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Pieck, M.; Ruck, A.; Farman, M.; Peterson, G.; Stack, J.; Valent, B.; Pedley, K. 2017. Genomics-based marker discovery and diagnostic assay development for wheat blast. *Plant Disease* 101(1):103-109.
- Pizolotto, C.A.; Maciel, J.L.N.; Frenandes, J.M.C.; Boller, W. 2016. Saprotrophic survival of *Magnaporthe oryzae* in infested wheat residues. Pp. 150. In: Madeiros Del Ponte, E.; Bergstrom, G.; Pavan, W.; Lazzaretti, A.; Cunha Fernandes, J.M. Book of Abstracts. 5th International Symposium on Fusarium head blight. 2nd International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Passo Fundo, RS. BR.
- Pizolotto, C.A.; Maciel, J.L.N.; Frenandes, J.M.C.; Boller, W. 2018. Saprotrophic survival of *Magnaporthe oryzae* in infested wheat residues. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1578-5>
- Prabhu, A.S.; Filippi, M.C.; Castro, N. 1992. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia oryzae* affecting rice, wheat, and grasses in Brazil. *Tropical Pest Management* 38(4):367-371. DOI: 10.1080/09670879209371729
- Reis, E.M.; Santos, H.P. 1985. População de *Helminthosporium sativum* no ar quatificado atraves de uma armadilha tipo cata-vento, *Fitopatologia Brasileira* 10:515-519.
- Reis, E.M.; Casa, R.T; Forcelini, C.A. 2005. Doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.). Pp. 627-638. Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.; Bergamin, A.; Camargo, L. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Volumen 2. 4 ed. São Paulo, BR. Ceres.

- Ribot, C.; Hirsch, J.; Balzergue, S.; Tharreau, D.; Notteghem, J.L.; Lebrun, M.H.; Morel, J.B. 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Journal of Plant Physiology 165(1):114-124. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.06.013
- Ruíz Díaz, G. 2007. El incremento de la producción de trigo dentro de la política agrícola nacional: los desafíos futuros. Pp. 3-6. En: Kohli, M; Cubilla, L (eds). Primer seminario nacional de trigo: Del grano al pan. CAPECO. Asunción. Paraguay.
- Sadat, M.A; Choi, J. 2017. Wheat blast: a new fungal inhabitant to Bangladesh threatening world wheat production. The Plant Pathology Journal 33(2): 103-108. DOI: 10.5423/PPJ.RW.09.2016.0179
- Sharma, R.K; Singh, P.K. 2020. Wheat blast. A global threat to wheat production. Pp. 1-18. In: Kumar, S.; Kashyap, P.L.; Singh, G.P. (eds). Wheat blast. Boca Raton. FL. CRC Press. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429470554>
- Servín, M.B.; Rojas, A. 2014. Estudio país N°2: Paraguay. El sector trigo en el Paraguay: potencialidades de innovación y aprendizajes. Red Sudamericana de Economía Aplicada. 40 p.
- Tagle, A.G; Chuma, I.; Tosa, Y. 2015. Rmg7 a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. Phytopathology 105(4):495-499. DOI: 10.1094/PHYTO-06-14-0182-R
- Tembo, B.; Mulenga, R.M.; Sichilima, S.; M'siska, K.K.; Mwale, M.; Chikoti, P.; Singh, P.; He, X.; Pedley, K.; Peterson, G.; Singh, R.; Braun, H.J. 2020. Detection and characterization of fungus (*Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum*) causing wheat blast disease on raised grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Zambia. Plos one 15(9): e0238724. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238724>

- Teng, P.; Klein-Gebbinck, H.; Pinnschmidt, H. 1991. An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. Pp. 1-30. In: Rice Blast Modeling and Forecasting – Selected Papers From the International Rice Research Conference. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.
- Toledo, J.; Escobar, R. 2002. Piricularia o bruzone del trigo. Santa Cruz: CIAT. 20p.
- Tosa, Y.; Hirata, K.; Tamba, H.; Nakagawa, S.; Chuma, I.; Isobe, C.; Osue, J.; Urashima, A.S.; Don, L.D.; Kusaba, M.; Nakayashiki, H.; Tanaka, A.; Tani, T.; Mori, N.; Mayama, S. 2004. Genetic constitution and pathogenicity of *Lolium* isolates of *Magnaporthe oryzae* in comparison with host species-specific pathotypes of the blast fungus. *Phytopathology* 94:454-462.
- Urashima, A. S.; Igarashi, S.; Kato, H. 1993. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Disease* 77:1211-1216.
- Urashima, A.; Kato, H. 1998. Pathogenic relationship between isolates of *Pyricularia grisea* of wheat and other hosts at different host developmental stages. *Fitopatologia Brasileira* 23(1):30-35.
- Urashima, A.; Lavorent, N.; Goulart, A.; Metha, Y. 2004 (a). Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 29:511-518.
- Urashima, A.; Dias, T.; Bueno, C.R.N.C.; Favaro, M.A.; Arruda, M.A.; Mehta, Y.R. 2004 (b). Triticale and barley: new hosts of *Magnaporthe grisea* in São Paulo, Brazil- Relationship with blast of rice and wheat. Pp.251-260. In: Kawasaki (ed.), Rice blast: Interaction with rice and control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

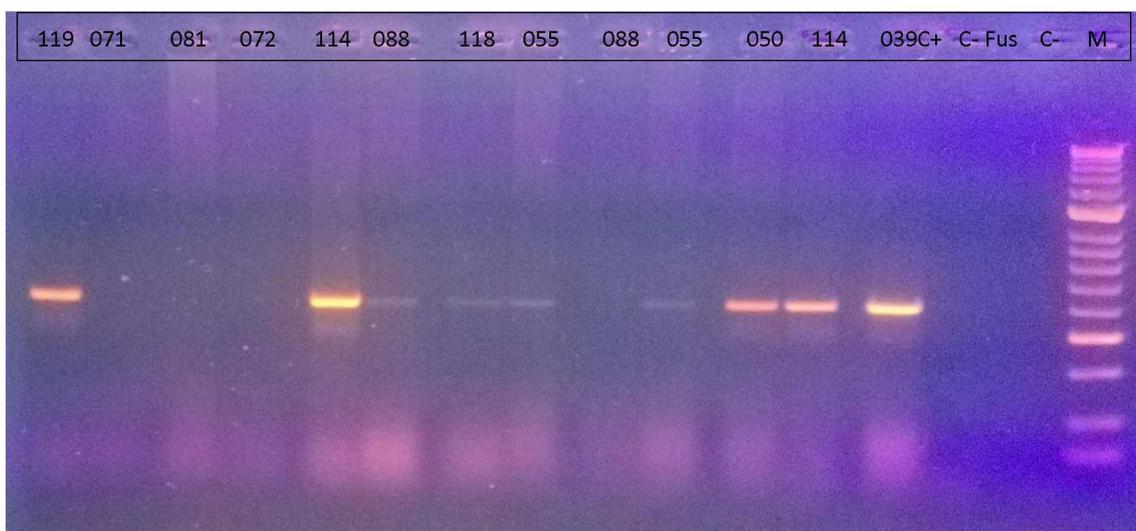
- Urashima, A.S.; Leite, S.F.; Galbieri, R. 2007. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. Summa Phytopathologica 33:275-279. DOI: 10.1590/S0100-54052007000300011.
- Valent, B.; Chumley, F.G. 1991. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Phytopathology 29:443–467.
- Valent, B.; Farral, L.; Chumley, F. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127:87-101.
- Valent, B.; Farman, M.; Tosa, Y.; Begerow, D.; Fournier, E.; Gladieux, P.; Islam, M.; Kamoun, S.; Kemler, M.; Kohn, L.; Lebrun, M.H.; Stajich, J.E.; Talbot, N.; Terauchi, R.; Tharreau, D.; Zhag, N. 2019. *Pyricularia graminis-tritici* it's not the correct species name for the wheat blast fungus: response to Ceresini et al. (MPP 20:2). Molecular Plant Pathology 20(2):173–179. DOI: 10.1111/mpp.12778
- Vázquez, F. 2006. Territorio y población. Nuevas dinámicas regionales en el Paraguay. Asociación paraguaya de estudios de población, ADEPO; Cooperación técnica alemana, GTZ; Fondo de población de las naciones unidas, UNFPA. Asunción, Paraguay. 201 p.
- Verzignassi, J.R.; Poltronieri, L.S.; Benchimol, R.L.; Santos de França, S.K.; de Arruda, E.; Dornelas, C. 2012. *Magnaporthe oryzae*: novo patógeno em *Brachiaria brizantha* cv. Marandú no Pará. Summa Phytopathologica 38(3):254.
- Viedma, L.Q.; Morel, W. 2002. Añublo o Piricularia del Trigo. Díptico. MAG/DIA/CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.
- Viedma, L. 2009. Manejo integrado de enfermedades en trigo. Pp. 67-72. En: Kohli, M; Cubilla, L; Viedma, L (eds). Segundo seminario nacional de trigo. Del grano al pan. CAPECO. Asunción, Paraguay. 140 p.

- Viedma, L. 2010. Manejo integrado de la mancha amarilla y la piricularia en el cultivo de trigo en el Paraguay. Pp. 31-42. In: Kohli, M; Cubilla, L; Cabrera, G (eds.). Tercer seminario nacional de trigo, Del grano al pan. CAPECO-INBIO. Asunción Paraguay. 168 p.
- Yasuhara-Bell, J.; Pieck, M.L.; Ruck, A.; Farman, M.L; Peterson, G.L.; Stack, J.P.; Valent, B.; Pedley, K.F. A. 2019. Response to Gupta et al. (2019) Regarding the MoT3 Wheat Blast Diagnostic Assay. *Phytopathology* 109:509-511. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-18-0397-LE>
- Zhang, S.W.; Mayama, S.; Tosa, Y. 2008. Identification of two genes for resistance to *Triticum* isolates of *Magnaporthe oryzae* in wheat. *Genome* 51:216-221. DOI: 10.1139/G07-094

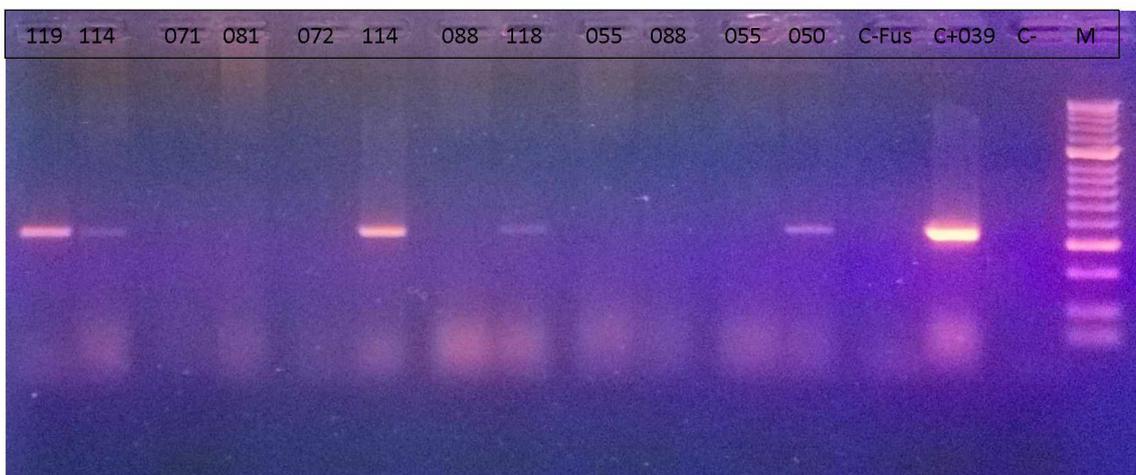
APENDICE

ANEXO

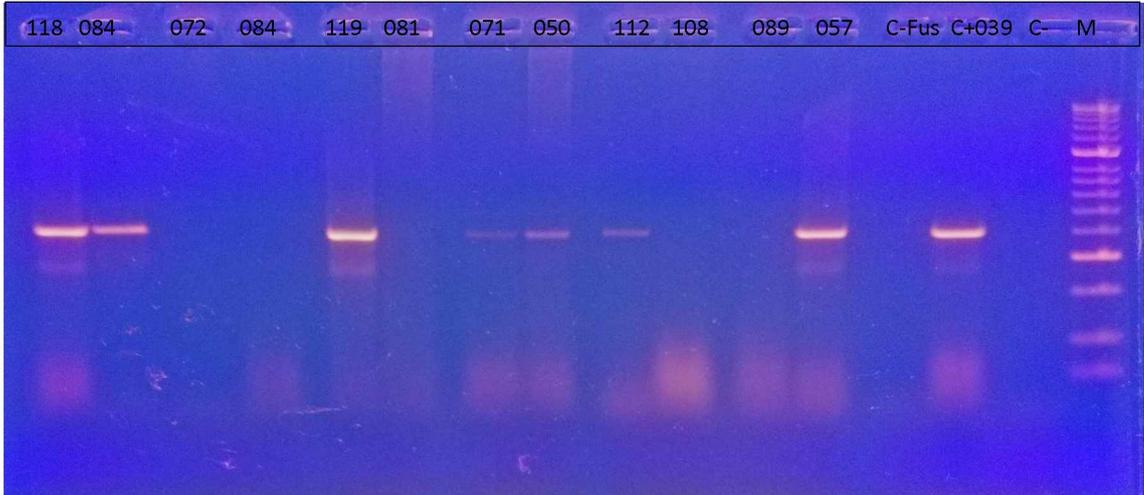
6.1. Geles correspondientes a las muestras de hojas inoculadas con los distintos aislados.



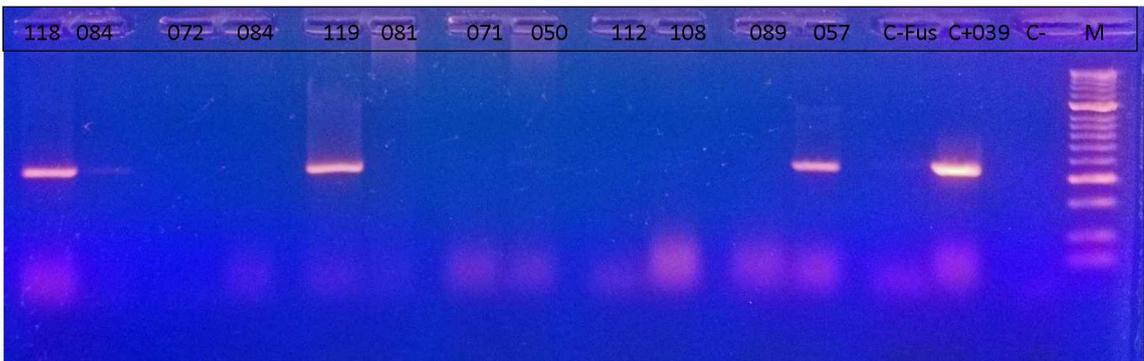
6.1.1 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



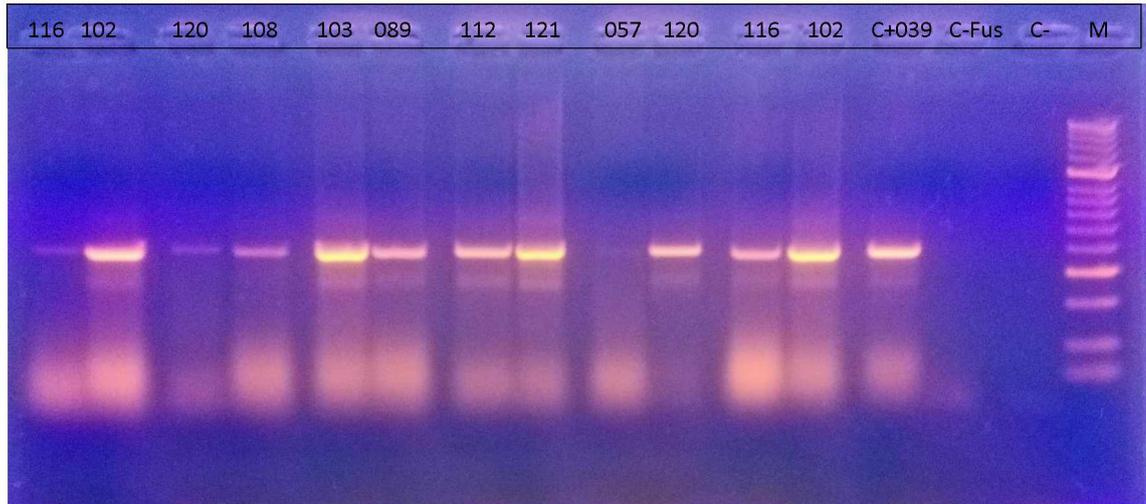
6.1.2 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



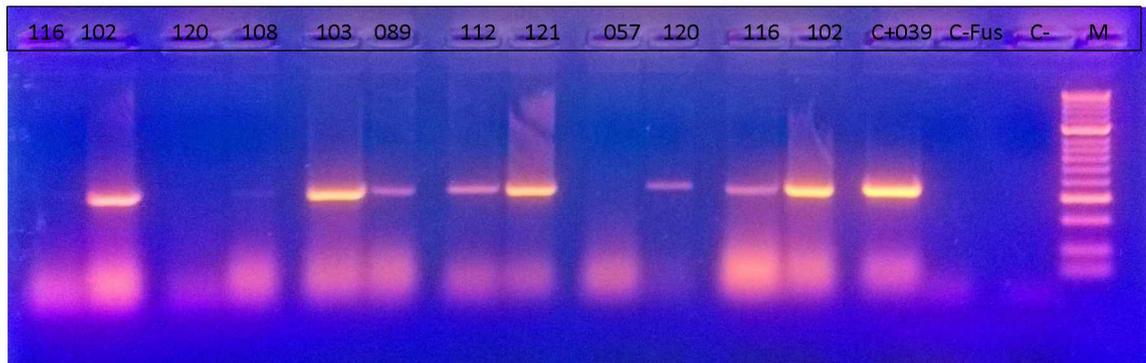
6.1.3 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



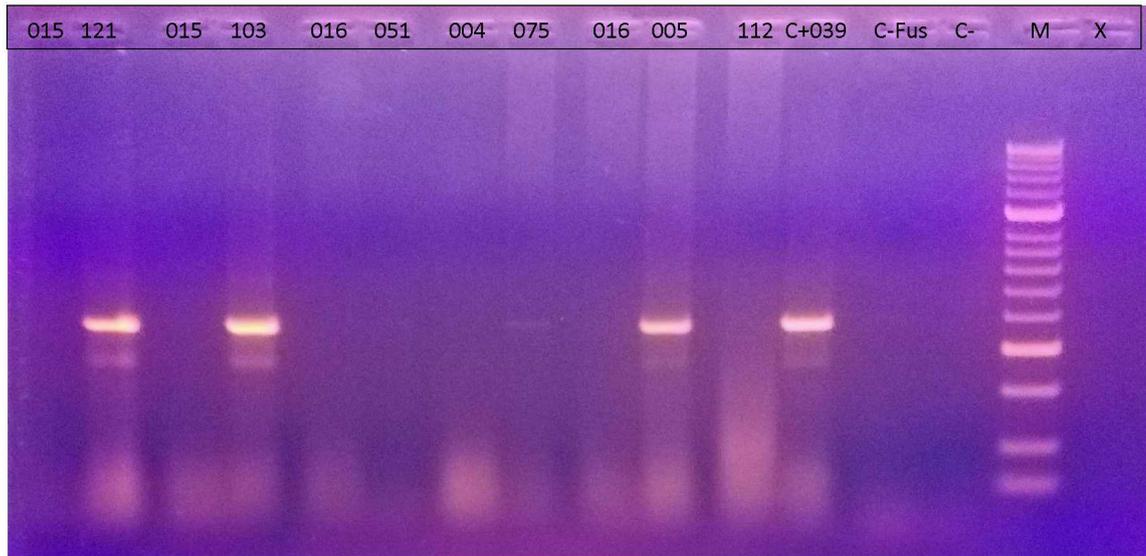
6.1.4 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



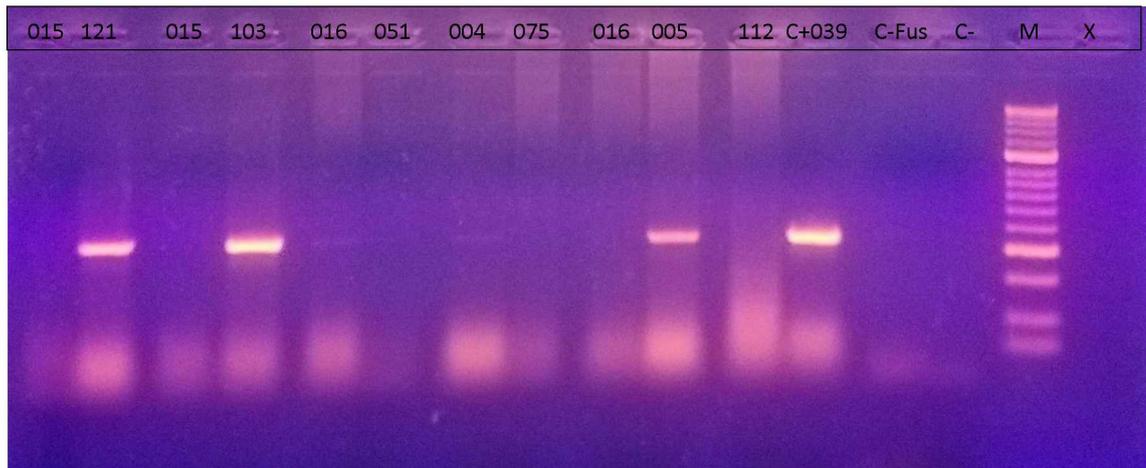
6.1.5 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



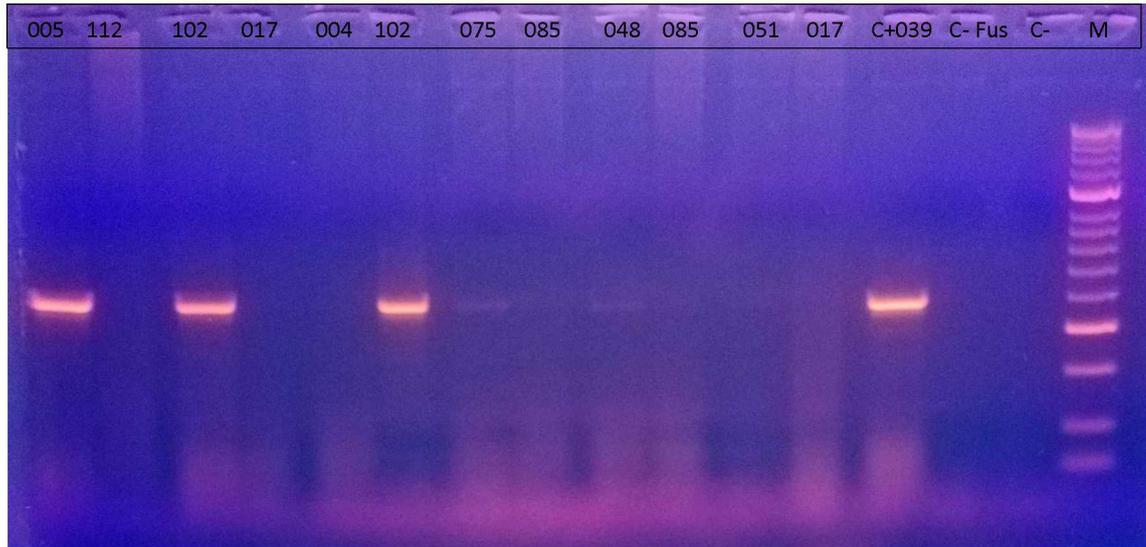
6.1.6 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



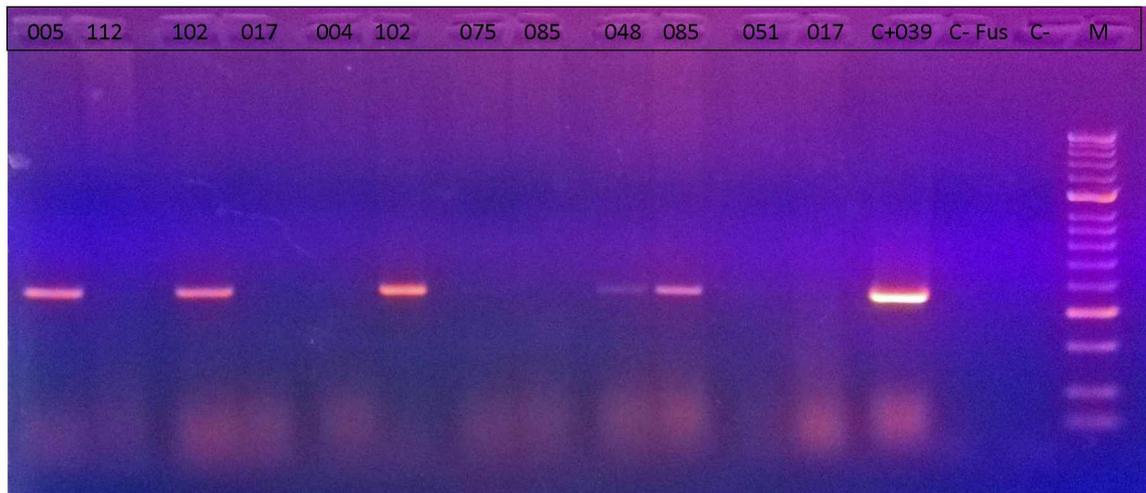
6.1.7 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



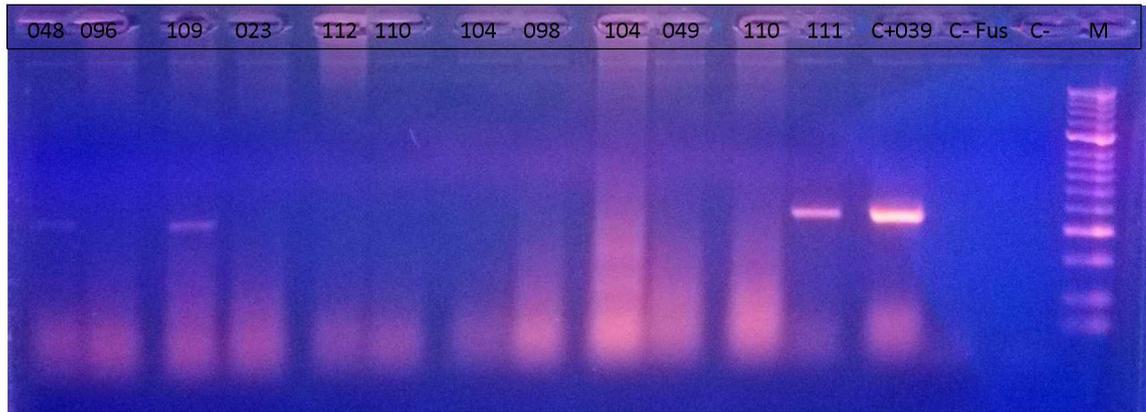
6.1.8 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



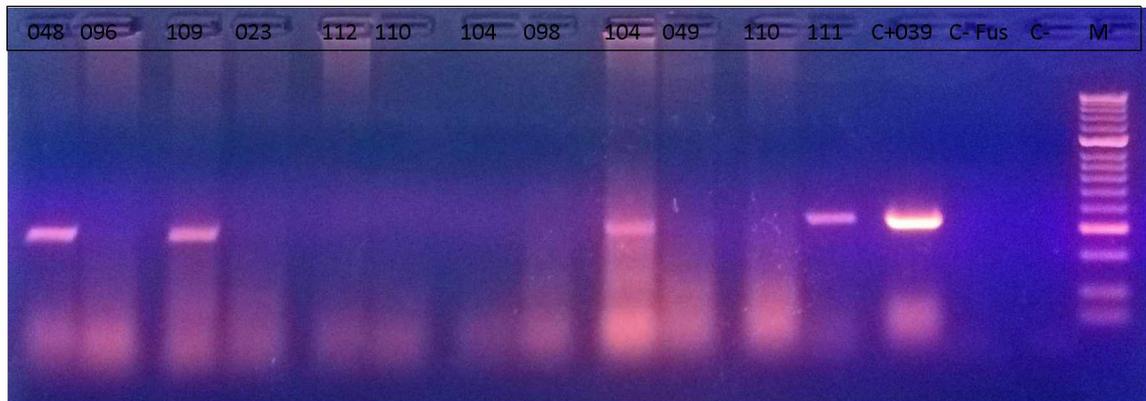
6.1.9 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



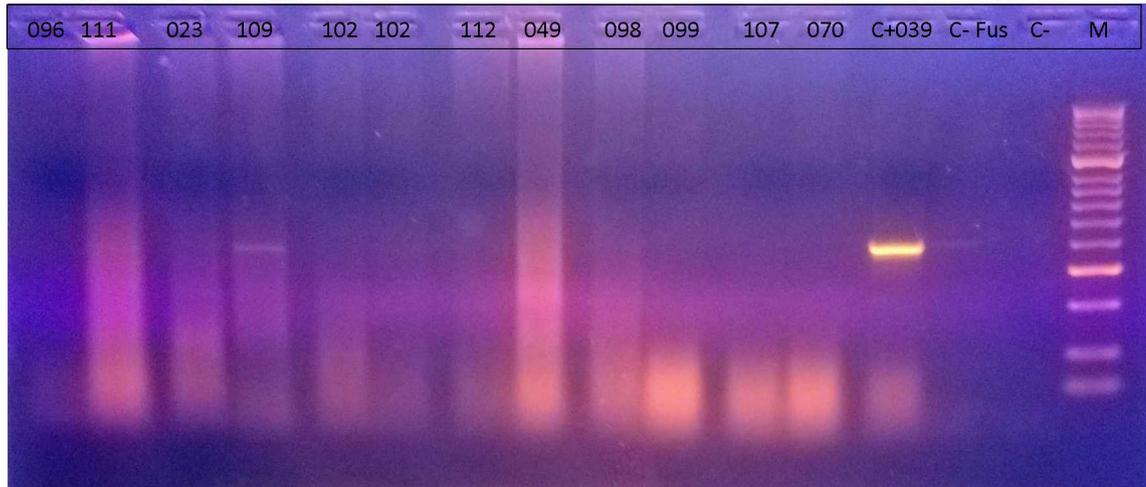
6.1.10 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



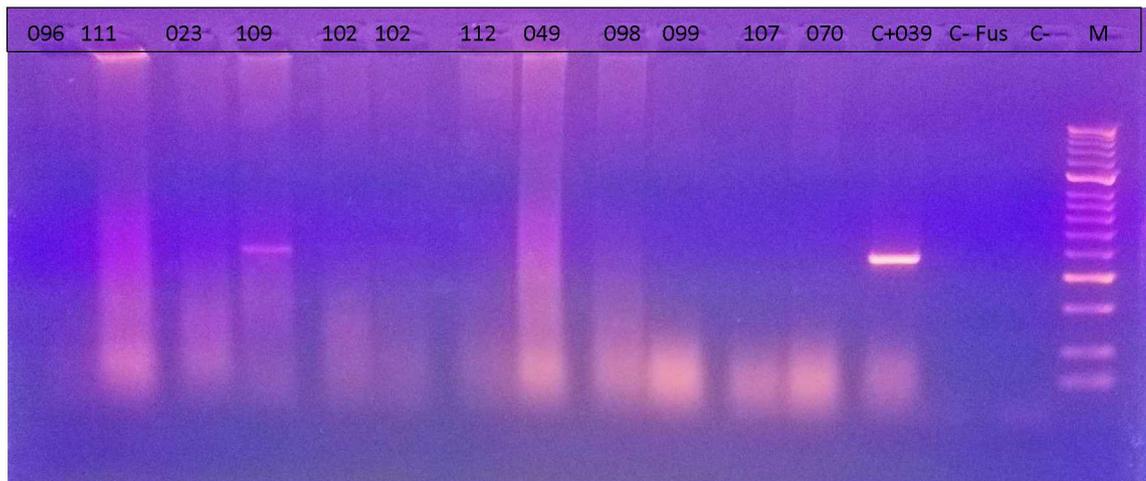
6.1.11 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



6.1.12 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



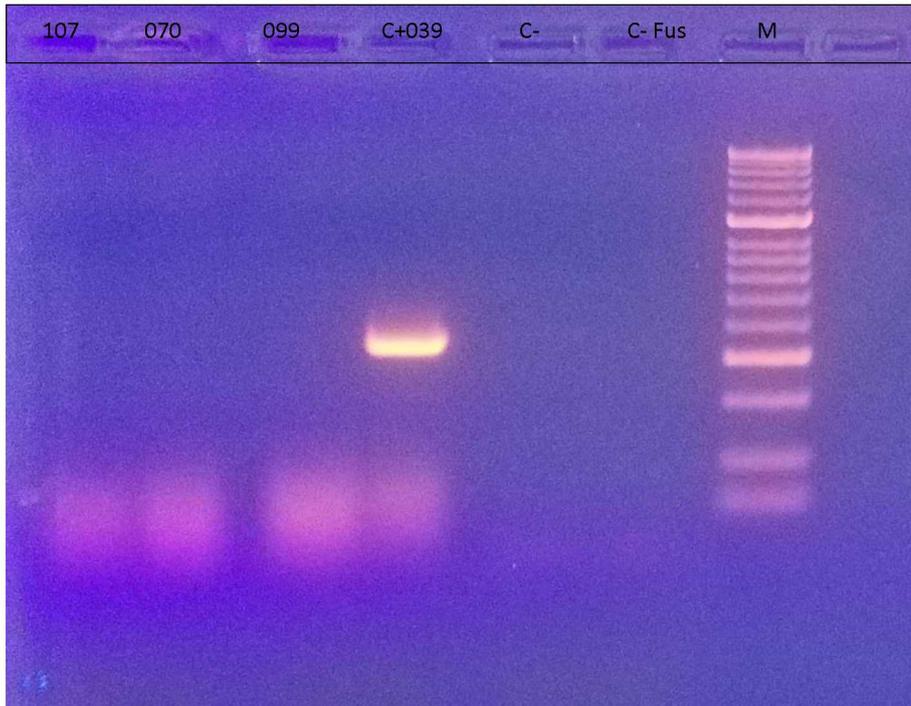
6.1.13 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular



6.1.14 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.

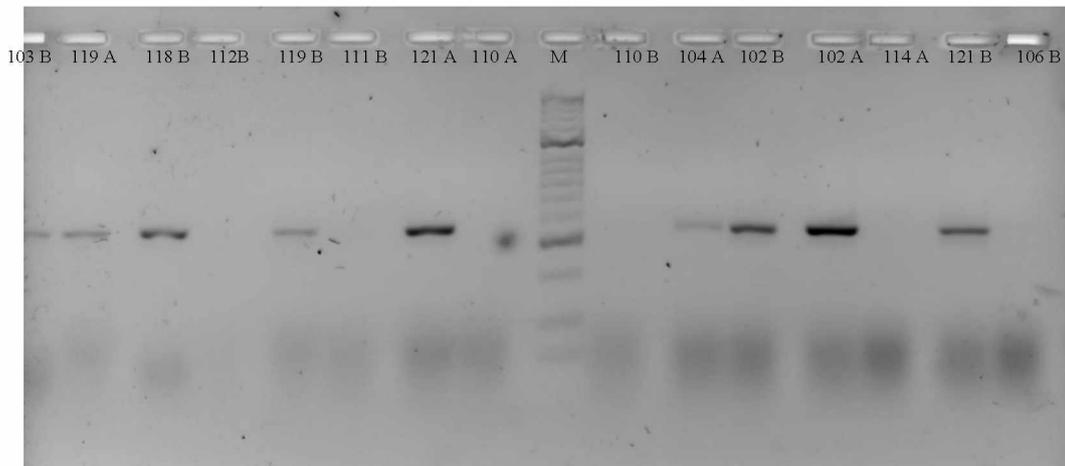


6.1.15 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.

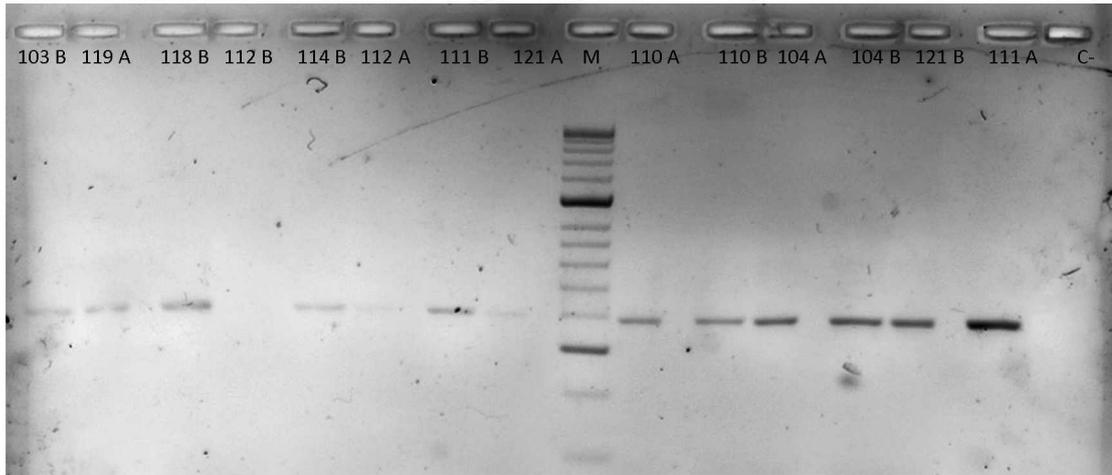


6.1.16 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.

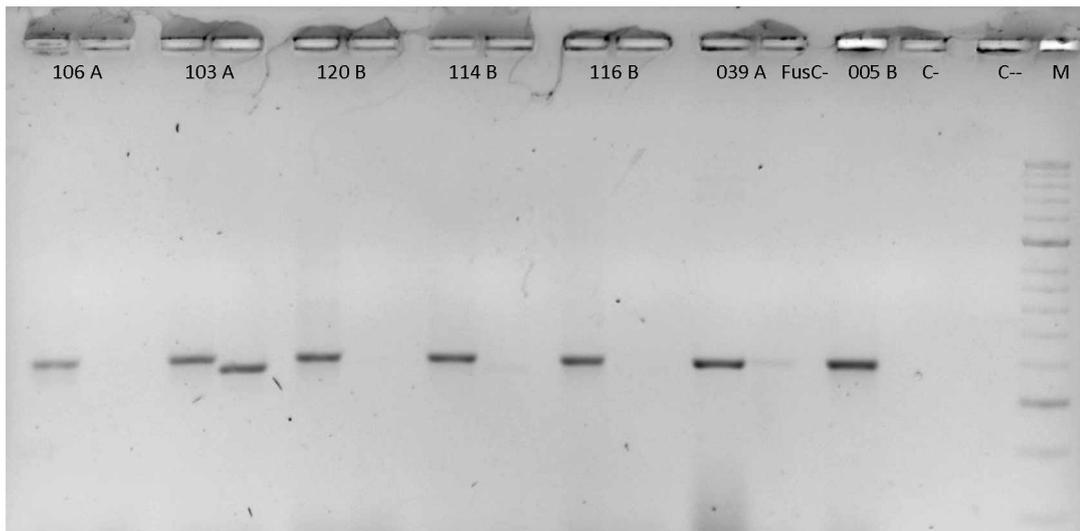
6.2 Geles correspondientes a las muestras de ADN micelial de los aislados



6.2.1 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; M = Marcador de peso molecular.



6.2.2 Marcador Pot-2^a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; M = Marcador de peso molecular, C- control negativo mix de PCR.



6.2.3 Marcadores Pot-2a (izquierda)/MoT3(derecha). El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; M = Marcador de peso molecular, 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.

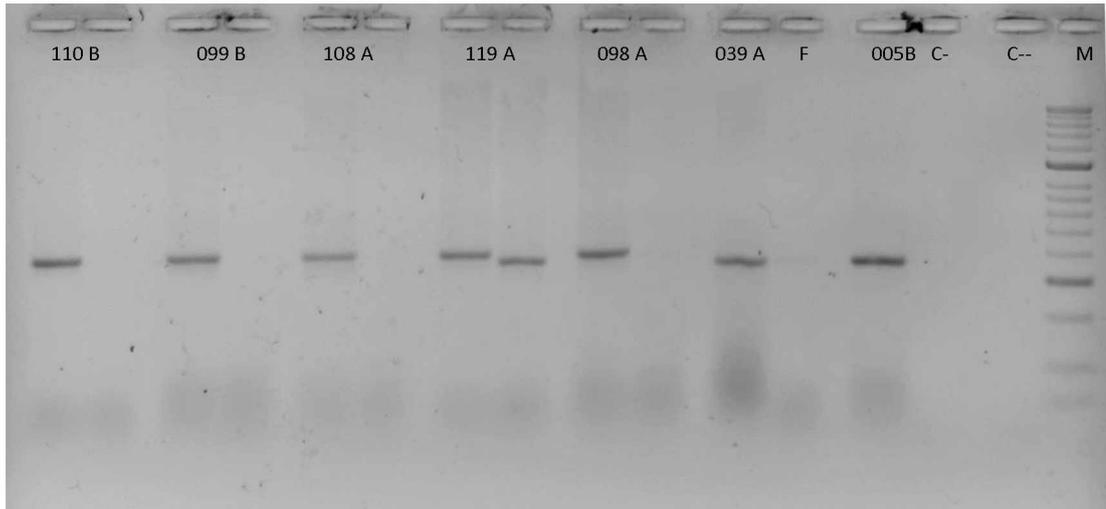
039 A : Control + (*Pyricularia trigo*) – Mix con primers Pot-2a

F : *Fusarium* (C-) – Mix con primers Pot-2a

005 B: Control + (*Pyricularia trigo*) – Mix con primers Pot-2a

C- : control negativo mix – Mix con primers Pot-2a

C--: control negativo mix– Mix con primers Pot-2a



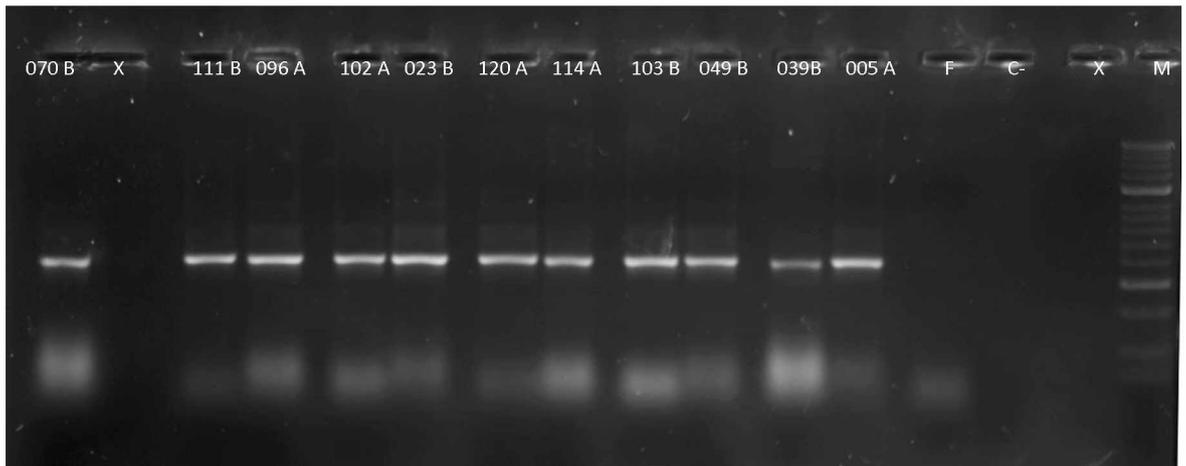
039 A : Control + (*Pyricularia trigo*) – Mix con primers MoT3

F : *Fusarium* (C-) – Mix con primers MoT3

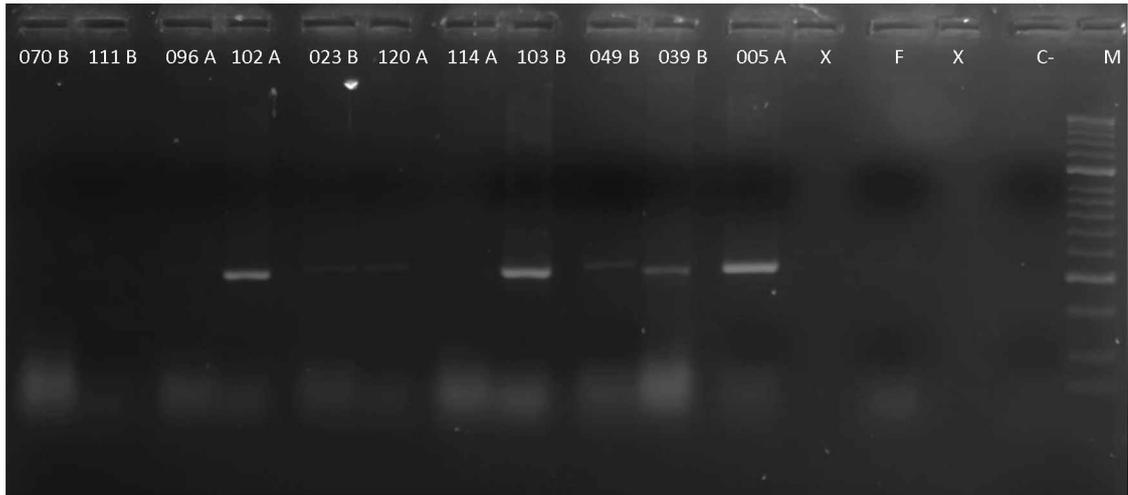
005 B: Control + (*Pyricularia trigo*) – Mix con primers MoT3

C- : control negativo mix – Mix con primers MoT3

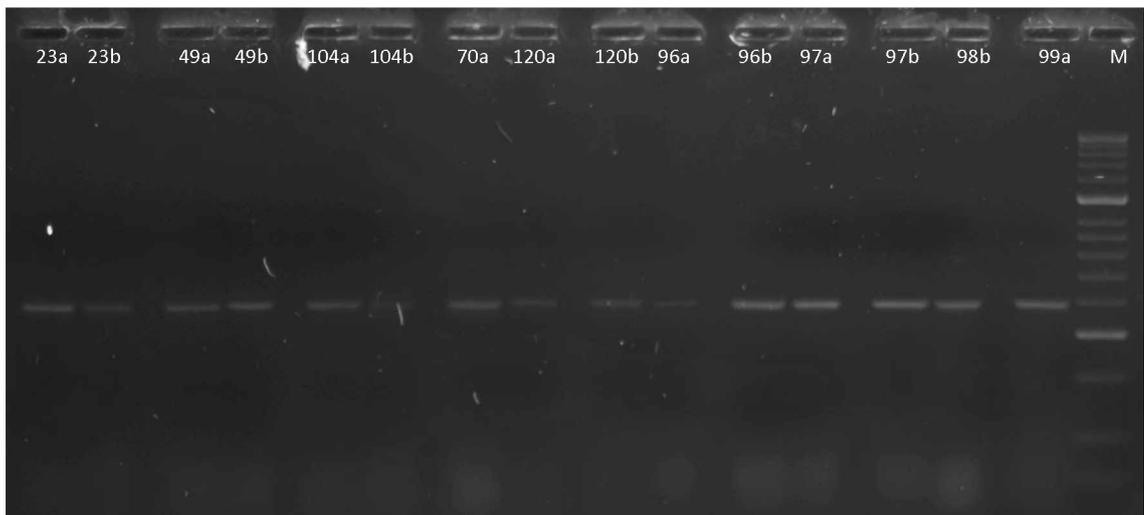
C--: control negativo mix– Mix con primers MoT3



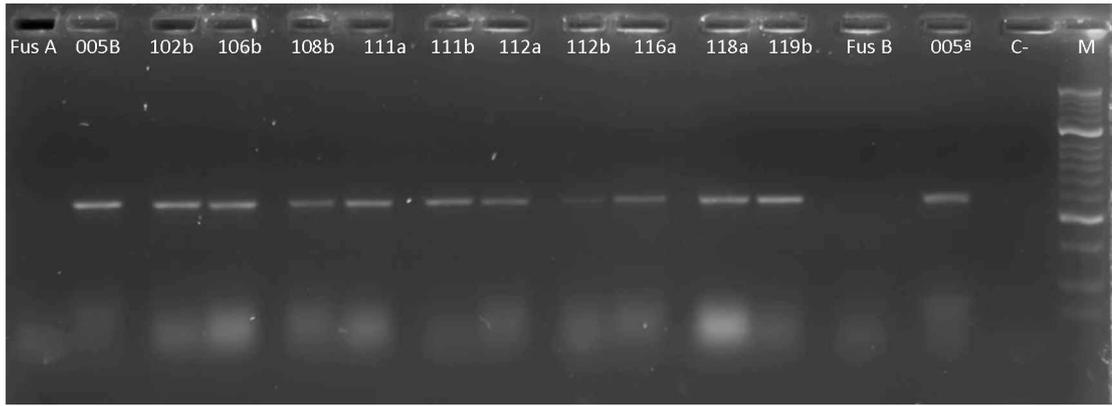
6.2.4 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular, x= pocito vacío.



6.2.5 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular, x= pocito vacío.



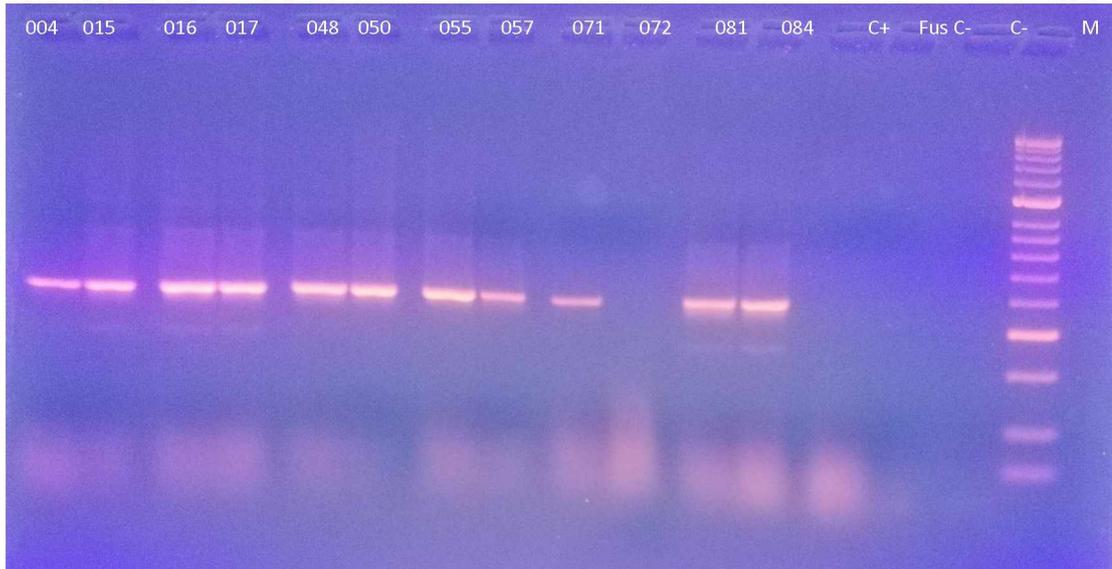
6.2.6 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular, x= pocito vacío.



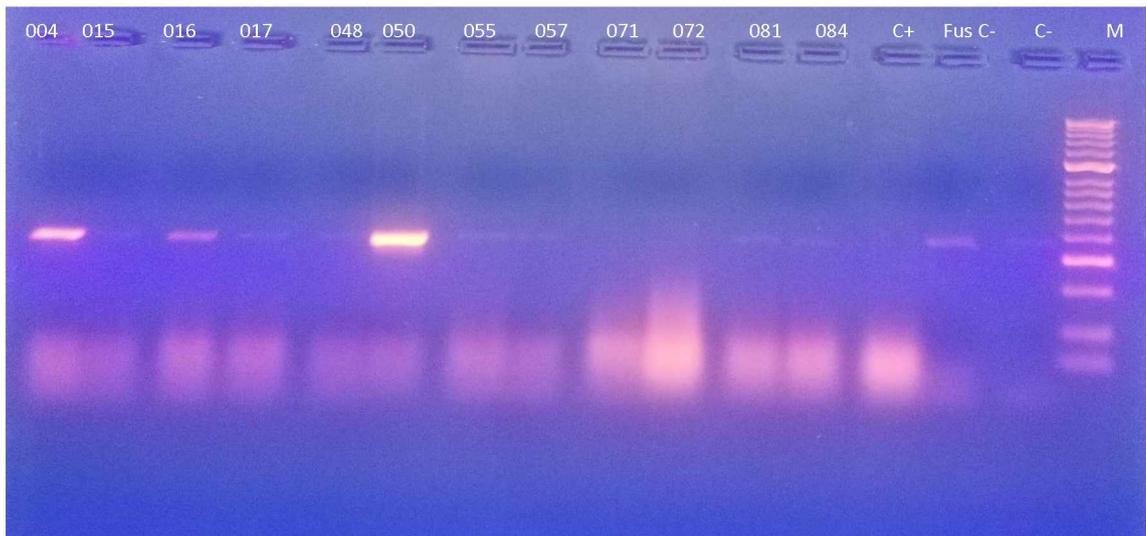
6.2.7 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 005C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



6.2.8 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



6.2.8 Marcador Pot-2a. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.



6.2.8 Marcador MoT3. El número observado en el cuadro de texto superior corresponde al número de aislado, se corrieron dos muestras de cada aislado, A y B; 039C+ = control positivo de ADN, C- Fus= control negativo de ADN (*Fusarium* sp.), C- = Control negativo mix de PCR, M = Marcador de peso molecular.

6.3. Datos de fecha de siembra, variedad y manejo del cultivo de los campos comerciales muestreados durante el ciclo 2018.

Campo N°	Departamento	Fecha de siembra aproximada	Variedad	Manejo del cultivo
1	Alto Paraná	30/05/2018	TBIO Toruk	Siembra convencional Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
2	Alto Paraná	2/05/2018	CD 150	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
3	Alto Paraná	2/05/2018	CD 116	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
4	Itapúa	10/05/2018	TBIO Toruk	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
5	Itapúa	10/05/2018	CD 150	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra convencional
6	Itapúa	28/05/2018	Itapúa 80	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
7	Canindeyú	4/05/2018	Caninde 11	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
8	Canindeyú	4/05/2018	CD 150	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida Siembra directa
9	Canindeyú	5/05/2018	CD 1184	Con aplicación de herbicidas, fungicidas, insecticida