



Variabilidad de *Puccinia sorghi* en la zona maicera núcleo Argentina

Mirian del Pilar Gonzalez¹, Guillermo Eyherabide² & Irma Graciela Laguna³

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, CC14, 2125 Zavalla, Argentina; ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, CC 17, 2700 Pergamino, Argentina; ³Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, Córdoba, Argentina

Autor para correspondencia: Mirian del Pilar Gonzalez, e-mail: mgonzale@unr.edu.ar

RESUMEN

La roya común causada por *Puccinia sorghi* es una de las enfermedades endémicas de maíz (*Zea mays*) en Argentina. Se presenta cada año con diferentes niveles de severidad dependiendo del genotipo del hospedante, el biotipo del patógeno y las condiciones ambientales. Se estima una pérdida en el peso del grano entre 3 y 8% por cada 10% del total de área afectada. *P. sorghi* es un hongo heteroico que completa su ciclo en un hospedante alternativo: *Oxalis* spp. El ciclo completo se produce en las regiones con inviernos favorables. El objetivo de este estudio fue describir los factores involucrados en la virulencia del patógeno en la interacción *Zea mays-Puccinia sorghi*. Usando isolíneas Rp se identificaron 10 patotipos de *P. sorghi*, a partir de 16 aislamientos de diferentes localidades de la Provincia de Santa Fe (Oliveros, Venado Tuerto and Zavalla) y Buenos Aires (Pergamino). Se detectaron polimorfismos en el ADN por la metodología de RAPD en los diferentes aislamientos de *P. sorghi*. Estos experimentos muestran la heterogeneidad genética del patógeno en esta zona. Se determinó un alto consenso (81,4%) entre los resultados obtenidos a través de las isolíneas Rp y RAPD.

Palabras-clave: *Zea mays*, *Oxalis* spp., RAPD, roya común, Rp lines.

ABSTRACT

Variability of *Puccinia sorghi* in the core corn-growing region of Argentina

Common rust caused by *Puccinia sorghi* is one of the endemic diseases of corn in Argentina. It appears every year with different levels of severity depending on the genotype of the host, the biotypes of the pathogen, and the environmental conditions. Estimates of grain weight losses ranged from about 3 to 8% for 10% of the total leaf area affected. *P. sorghi* is a heteroic fungus that completes its cycle on an alternative host, *Oxalis* spp. Its complete cycle is feasible in mild winter regions around the world. The objective of this study was to describe the factors involved in the virulence of the pathogen in the interaction *Zea mays-Puccinia sorghi*. Using Rp isolines, 10 pathotypes of *P. sorghi* were identified from 16 isolates obtained from different locations in the provinces of Santa Fe (Oliveros, Venado Tuerto and Zavalla) and Buenos Aires (Pergamino). Polymorphisms in the DNA of the different isolates of *P. sorghi* from this core corn-growing region of Argentina were detected by RAPD methodology. These experiments showed the genetic heterogeneity of the pathogen in this area. A high consensus rate was determined (81.4 %) between the results obtained from the virulence biotypes and the results obtained by RAPD.

Key words: *Zea mays*, *Oxalis* spp., common rust, RAPD, Rp lines.

La “roya común” causada por *Puccinia sorghi* Schwein., se presenta todos los años en la región productora núcleo de maíz, en Argentina, con diferentes niveles de severidad (Gonzalez et al., 2009); la cual depende del genotipo del hospedante, la virulencia del patógeno y las condiciones ambientales. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan por la presencia de urediniosoros con urediniosporas. Es un patógeno policíclico, cada ciclo tarda aproximadamente 10 días. Al final del cultivo del maíz aparecen los teliosoros con teliosporas. Esta enfermedad se puede presentar en las primeras hojas nacidas, alcanzando su máxima expresión en las 4 semanas posteriores a la antesis. Sobre *Oxalis* spp. se producen los estadios picnico y aescidico. Se estimaron reducciones de peso del grano entre 3 a 8% por cada 10% del total de área foliar afectada (White,

1999). En estados Unidos de Norte América se determinó la existencia de varias razas de *Puccinia sorghi* utilizando líneas isogénicas con genes Rp para monitorear la virulencia en las poblaciones del patógeno (Hulbert et al., 1991; Groth et al., 1992, Hu et al., 1997). Una nueva raza de *P. sorghi* quebró la resistencia del gen Rp1D (Pataky & Pate, 2001; Pataky & Campana, 2007). En Brasil, Von Bülow (1967) determinó la existencia de 13 razas del patógeno usando isolíneas Rp. En Argentina desde los trabajos de virulencia de Vallega (año?) con líneas experimentales de maíz (Gonzalez, 2007), no se reportaron nuevos trabajos hasta el año 1998 en el que se realizaron experimentos de campo utilizando por primera vez en el país líneas con genes Rp (Gonzalez, 2000). Pataky et al. (2001) evaluaron en campo la severidad de este patógeno en cultivares de maíz dulce

con genes Rp1D en Argentina, México, Sudáfrica y Hawai. La profundización en el conocimiento de las razas, sus frecuencias y la evolución de de la virulencia de éstas podría ser útil para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes.

Para *Puccinia sorghi* no se encontró ningún reporte de estudio de patotipos a nivel molecular. Villaréal et al. (2002) evaluaron la variabilidad genética por AFLP en la población de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* en Francia. Steele et al. (2001) combinaron técnicas de RAPD y AFLP para determinar la variación a nivel molecular de diferentes aislamientos de Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Dinamarca y Colombia. El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad para la virulencia de la población de *Puccinia sorghi* en Argentina sobre aislamientos Rp, caracterizar la variabilidad a nivel molecular y analizar la semejanza entre los patotipos y los fenotipos moleculares.

Para determinar la variabilidad en la virulencia de *P. sorghi* en líneas Rp se recolectaron hojas de maíz con urediniosoros en lotes comerciales de las localidades de Oliveros, Pergamino, Zavalla y Venado Tuerto. De las hojas obtenidas de cada localidad, en forma individual se recortaron trozos con urediniosoros, se tomaron 20 trozos y se colocaron en un asperjador con 100 cc de agua bidestilada y 2 gotas de tween 20. En invernadero, en macetas de 14 cm se colocó una mezcla de tierra y perlita de lava volcánica, se sembraron semillas de un híbrido comercial de maíz de alta susceptibilidad. Las plantas fueron periódicamente fertilizadas con el agua de riego, utilizando fertilizante triple 15 (N: 15, P: 15 y K: 15). Cuando estas plantas tuvieron 2 a 4 hojas se inocularon y fueron colocadas en cámara húmeda por 24 hs, la temperatura varió entre 16 y 25°C. A los 10 días se seleccionaron 4 urediniosoros de cada una de las plantas y se inocularon con el auxilio de un pincel mojado en agua y tween 20. La inoculación se realizó en 5 plantas por maceta para cada uredinioso. Así se obtuvo un aislamiento a partir de un solo soro. Los aislamientos obtenidos fueron: Oliveros (O1 a O4), Pergamino (P1 a P4), Zavalla (Z1 a Z4) y Venado Tuerto (V1 a V4). Se realizaron inoculaciones posteriores para multiplicar las urediniosporas. Con cada uno de los 16 aislamientos se inocularon de 5 a 10 plantas de cada aislamiento con los genes Rp (rp1, Rp1D, Rp1E, Rp1G, Rp1H, Rp1N, Rp3, Rp4A y Rp1GFJ). Las aislamientos fueron proporcionadas por el Dr. Jerald Pataky (Dep. Crop Sc. University of Illinois) y por el Dr. Scott Hullbert (Univ. of Kansas, US). Todas las aislamientos tienen un gen mayor. En algunas de ellas intervino como progenitora la línea R 168 o H 95. Las plantas se inocularon luego de 10 días de la siembra, manteniendo las mismas condiciones en la siembra e invernadero. Se utilizó un DCA. Se repitió este experimento 2 veces. En la evaluación realizada a los 10 días de la inoculación se determinó como positiva la reacción de aquellas plantas que mostraron susceptibilidad con urediniosoros bien desarrollados y como negativa, las plantas que presentaban resistencia manifestada con pequeños puntos cloróticos o no presentaban síntomas. Se elaboró una tabla de contrastes

colocando 0 cuando no se presentaba infección y 1 cuando aparecieron urediniosoros. Los resultados se colocaron en una matriz básica de datos que fue procesada en el programa *PC-Ord* para el análisis multivariado. (McCune & Mefford, 1990). Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) usando matriz de variancia-covariancia, con el objeto de establecer la estructura general de los datos para visualizar si se ubican al azar en el plano determinado por los primeros ejes o si es observable alguna tendencia; y el agrupamiento *Cluster Analysis*, mediante el método de Ward y la distancia euclídea como medida de disimilitud, para establecer si las muestras se agrupan en función de algún patrón.

En el estudio de la variabilidad a nivel molecular, se utilizaron los mismos aislamientos con los que se determinaron los biotipos del patógeno. La recolección de las urediniosporas se realizó con una bomba de vacío. La extracción del ADN se realizó a través del método utilizado por Chen et al. (1993) modificado por Gonzalez (2007), colocando en un mortero entre 20 y 30 mg de urediniosporas que se mezclaron con igual cantidad de arena y se molieron suavemente hasta convertirlas en un polvo fino. Luego, cada muestra se trasladó a un tubo de 2 µL agregándole 800 µL de *buffer* de extracción 1 X (0.1 mL de TrisCl pH 7.5 (1 M), 0.14 mL de NaCl 5 M, 0.1 mL de EDTA pH 8 0.5 M y 0.46 mL de agua UP) y se agitó en un vortex. Se incubó durante 10 minutos en un baño a 65°C. Posteriormente se agregaron 100 µL de CTAB 10%, se homogeneizó en el vortex y se adicionaron 100 µL de SDS 20%, se mezcló la suspensión por suave inversión manteniéndose a 65°C en baño de inmersión con agitación durante 45 minutos. Después se agregaron 950 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por suave inversión del tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 25 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo, se colocaron 10 µL de ARNasa 10% y se dejó a 37°C durante 90 minutos aproximadamente. Posteriormente, se adicionó igual volumen de cloroformo- alcohol isoamílico. Se mezcló por inversión del tubo durante 10 minutos y se centrifugó 20 minutos a 14.000 rpm. Al sobrenadante se agregó el 60% del volumen de isopropanol frío dejándolo reposar por 10 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet se lavó con 1 mL de alcohol 70%. Se volvió a centrifugar, se descartó el alcohol y se dejó secar el pellet resuspendiéndolo en 50 µL de agua HPLC. La concentración de ADN obtenido de cada muestra se determinó por medición espectrofotométrica de la absorbancia (Abs) a 260 nm y la pureza se evaluó mediante el índice de Abs 260 nm / Abs 280 nm (121). La integridad del ADN genómico se evaluó por la presencia de una banda de alto peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa a 0,7% en 1X de buffer TAE (40 mM Tris, 5 mM acetato de sodio y 0,77 mM EDTA) a 40 mA, en sistema sumergido y teñidos con bromuro de etidio (Stambrook et al., 1989). Una vez cuantificados todos los

ADN, fueron llevados a una concentración stock de 300 ng/ μ L. Se utilizaron soluciones de trabajo a una concentración de 5 ng/ μ L. El análisis de RAPD fue desarrollado a partir de 16 cebadores arbitrarios decaméricos (Operon Technologies, USA), los cuales fueron seleccionados por su repetibilidad y polimorfismo a partir de un total de 115. Las secuencias de los 16 cebadores fueron: OPA-18(AGGTGACCGT), OPP-13(GGAGTGCCTC), OPL-12(GGGCGGTACT), OPN-04(GACCGACCCA), OPN-11(TCGCCGAAA), OPI-14(TGACGGCGGT), OPI-16(TCTCCGCCCT), OPI-17(GGTGGTGATG), OPK-04(CCGCCAAAC), OPK-19(CACAGGCGGA), OPI-06(AAGGCGGCAG), OPI-20(AAAGTGCGGG), OPI-07(CAGCGACAAG), OPI-07(CAGCGACAAG), OPI-09(TGGAGAGCAG), OPF-09(CCAAGCTTCC) y OPH-03(AGACGTCCAC). Cada reacción de amplificación fue realizada en un volumen de 20 μ L, constituido por 10X PCR Buffer (Invitrogen) + BSA, 2,5 μ M de cada uno de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); 15 ng/ μ L de *primer*, 50 mM Cl_2Mg , 5u/ μ L de Taq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI) y agua HPLC. La PCR fue llevada a cabo en un termociclador marca Eppendorf, modelo *Mastercycler gradient* con el siguiente programa de ciclado: Desnaturalización a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturalización a 93°C 15 segundos, hibridación a 36°C 30 segundos, extensión a 72°C 1 minuto y 30 segundos y extensión final a 72°C 10 minutos. Después de la amplificación 5 μ L de cada muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa a 1,6% en una solución buffer TBE (0,089 M Tris-borato, 0,089M de ácido bórico y 0,002 M de EDTA) a 0,5%. Se usó marcador de peso molecular de 1- Kb (0,15 μ g) (Invitrogen) para estimar el tamaño de cada fragmento de ADN amplificado. La electroforesis se realizó a 50 V durante 90 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g / mL) durante 15 minutos y fotografiado con luz ultravioleta. Cada banda se registró como presente o ausente para obtener una matriz binaria básica de datos que incluyó los aislamientos fúngicos estudiados. Este experimento se repitió 2 veces. El análisis de variación molecular se realizó utilizando el coeficiente de similitud *Simple Matching Coefficient*. Los datos se analizaron a través de análisis de agrupamiento con el método UPGMA, utilizando el programa *NTSYS 2.0* (Exeter Software, Setauket, NY). Con el fin de determinar la asociación de los tipos de virulencia con los patrones de RAPD se comparó la similitud o correspondencia entre la matriz obtenida por medio de las isolíneas Rp y aquella conseguida por medio de la técnica de RAPD. Se utilizó el programa *Procrustes* Generalizado del paquete estadístico Info –Gen, *Software* para el análisis estadístico de datos genéticos (Balzarini & Di Rienzo, 2003).

De la evaluación de las isolíneas se identificaron 10 patrones de virulencia (patotipos) a partir de 16 aislamientos, considerando el 100% de similaridad. No hubo diferencia entre patrones de virulencia por localidad. El análisis de componentes principales no reveló ninguna

tendencia y los aislamientos aparecieron distribuidos al azar en las localidades. Los resultados del análisis y las pruebas de virulencia se muestran en la Figura 1. Con los 16 cebadores seleccionados por su repetibilidad y grado de polimorfismo entre los 115 evaluados, fueron analizadas 38 bandas polimórficas. Se obtuvo el dendrograma de la Figura 2, donde se observan 15 fenotipos moleculares a partir de 16 aislamientos del patógeno. Al comparar la concordancia entre fenotipos moleculares y tipos de virulencia se observó una alta correlación entre ambas matrices (81,4%).

Los resultados obtenidos en este trabajo establecen la presencia de 10 patotipos de *Puccinia sorghi* a partir de 16 aislamientos de este hongo, obtenidos en la zona núcleo maicera en Argentina. Estos resultados confirman la hipótesis planteada en trabajos de campo realizados previamente con líneas poseedoras de los genes Rp, en los que solo 5 isolíneas (Rp 1J, M, N; Rp3 A y C) de 23 eran resistentes a la población de *P. sorghi*. (Gonzalez, 2000). Todos los patotipos presentes fueron virulentos a Rp 1D. Esto también ocurrió en Estados Unidos, en donde, trabajos hechos hasta 1998 encontraron pocos patotipos en la población local de *P. sorghi* y ninguno afectaba a Rp 1 D (Hulbert et al., 1991; Groth et al., 1992, Hu et al., 1997). Al pasar los años hay mayor cantidad de líneas Rp susceptibles a la población patógena. Es decir que la variación de las poblaciones se encuentra en constante progreso. Una nueva raza de *P. sorghi* apareció en 1999 y quebró la resistencia del gen Rp1D (Pataky & Pate, 2001; Pataky & Campana, 2007). Así, a partir del año 2000, con la idea de probar la resistencia de los híbridos de maíz dulce con genes Rp1D, Pataky et al. (2001) evaluaron la severidad de este patógeno frente a los patotipos presentes en Argentina, México, Sudáfrica y Hawaii. Para el sur de Brasil, Von Bülow (1967), determinó 13 biotipos partiendo de 6 localidades con 6 líneas diferenciales de genes Rp, utilizando igualmente aislamientos monosómicos, lo que confirma la existencia de alta variabilidad también para Brasil. Según Hu et al., 1997, la combinación de alelos tales como Rp 1 DJ confieren resistencia parcial, o sea que dejarían de comportarse como genes que otorgan resistencia vertical y son más eficientes frente a las razas. En este trabajo al probarse líneas con varios genes, también se encontró mayor efectividad y esta combinación sería eficiente contra varios biotipos. La situación epidemiológica varía entre Estados Unidos y el hemisferio sur donde encontramos *Oxalis* spp. en invierno, por lo tanto, se produce el ciclo completo y se encuentra una alta variabilidad del hongo en general y también de la virulencia. En el cinturón maicero de Estados Unidos, la aparición de nuevas razas es mucho más lenta y las nuevas razas llegan del sur, desde la zona maicera de México

Los marcadores de tipo RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*) son especialmente útiles para el análisis de parásitos obligados por la escasa cantidad de ADN requerido para la amplificación: 200 ng de ADN (Chen et al., 1993). Esta cantidad de ADN se puede obtener a partir de 20 y 30 mg de urediniosporas. No se registra bibliografía

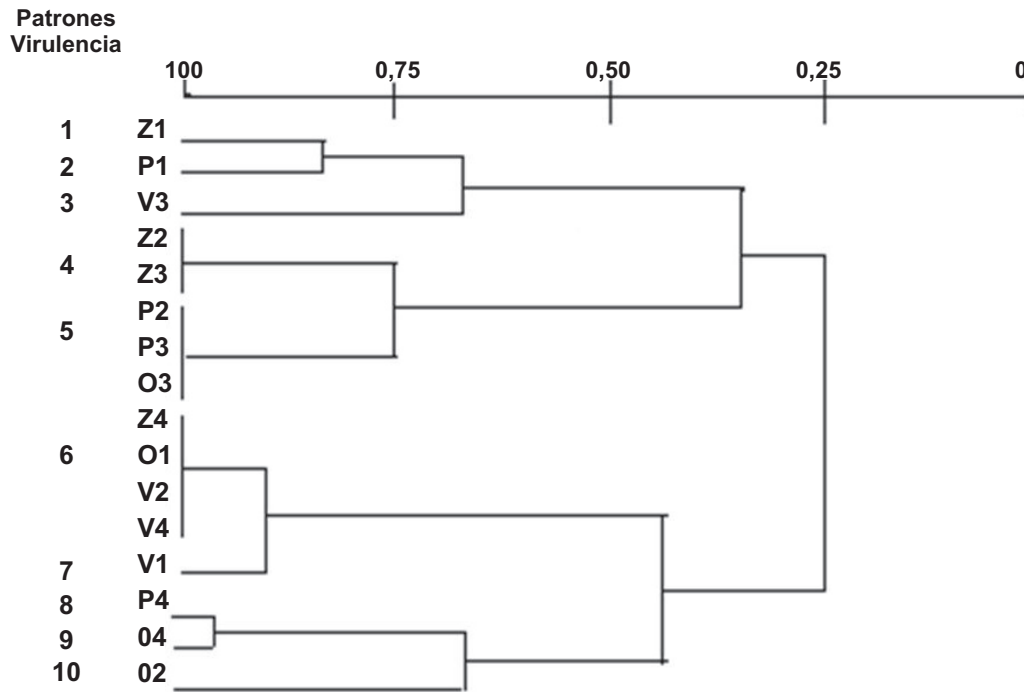


FIGURA 1 - Dendrograma mostrando la similitud (entre 100 y 0 %) de 16 aislamientos de *Puccinia sorghi* de Argentina por su reacción sobre las isólinas de maíz portadoras de genes Rp. Listado de tipos de virulencia en base al 100% de similitud entre los diferentes aislados.

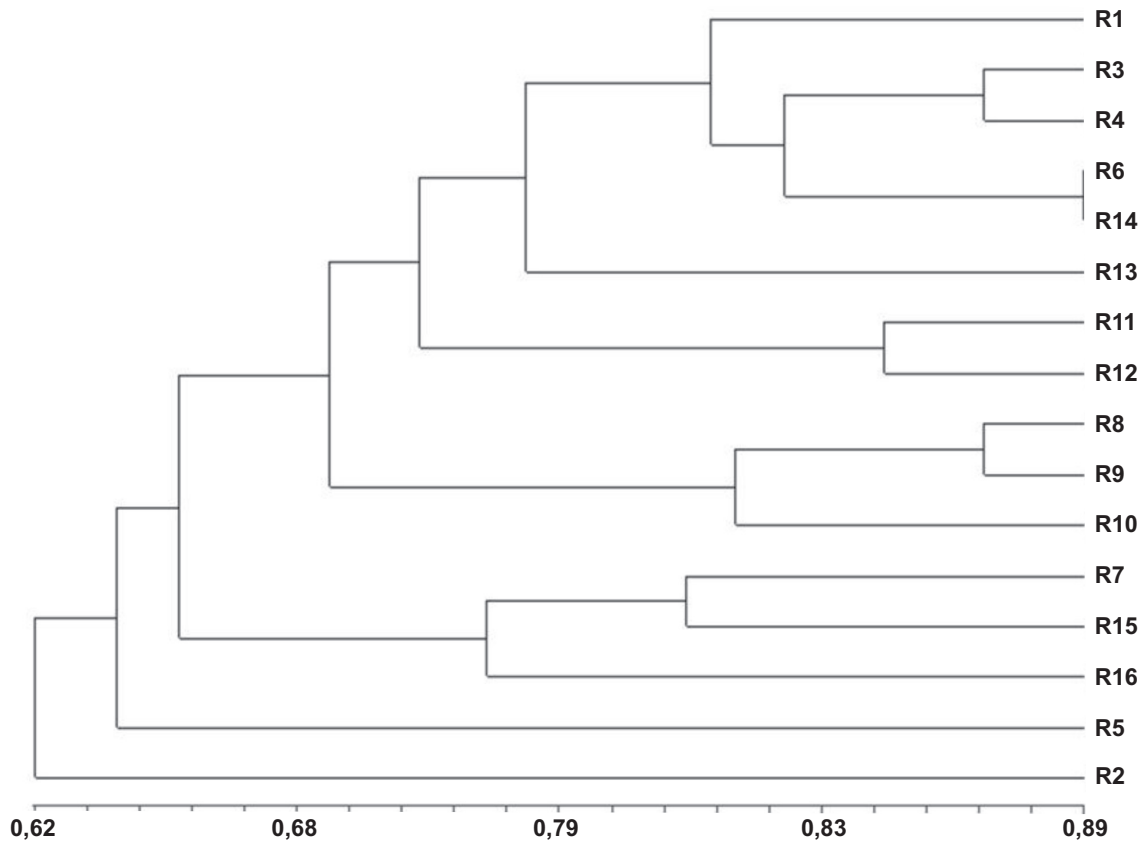


FIGURA 2 - Dendrograma mostrando la similaridad (entre 89 y 0 %) de los 16 aislamientos de *Puccinia sorghi* de Argentina por su presencia o ausencia de polimorfismos en la técnica de RAPD.

relacionada a estudios de la variabilidad de *P. sorghi* por ninguna de estas técnicas moleculares propuestas para otras especies del mismo género. En el presente trabajo, utilizando el método de RAPD fueron detectados una gran cantidad de polimorfismos en el ADN de los diferentes aislados de *Puccinia sorghi* provenientes de la zona maicera núcleo, mostrando la gran heterogeneidad genética del patógeno entre los aislamientos de las cuatro localidades analizadas. Se obtuvieron 15 fenotipos moleculares a partir de los 16 aislamientos utilizados. Wingfield et al. (2004) evaluaron los géneros más antiguos de royas en relación con los más evolucionados. Utilizando técnicas como el AFLP, Villaréal et al. (2002) evaluaron la variabilidad genética en la población de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* en Francia. Steele et al. (2001) determinaron gran variación molecular en Australia y Nueva Zelanda. En nuestro trabajo encontramos un alto consenso (81,4%) entre la matriz obtenida a partir de isolíneas Rp y la obtenida por RAPD. Otros investigadores como Chen et al. (1993), con *Puccinia striiformis* encontraron una correlación de 20,6%. En general la baja asociación entre patrones de virulencia y RAPD para la mayoría de los casos citados en la bibliografía, indicaría que los polimorfismos de ADN registrados podrían ser independientes de la virulencia y que la selección por virulencia sobre hospedantes con resistencia raza-específica juega un rol importante en la determinación de las estructuras de raza del patógeno. La profundización en el conocimiento de los patotipos, sus frecuencias y la evolución de éstos podría ser útil para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes. Estas consideraciones que refuerzan la importancia del uso de resistencia parcial, deberían ser tenidas en cuenta por los fitomejoradores, sobre todo en el momento de realizar la evaluación de líneas ya que los biotipos presentes varían con la región y en el tiempo.

REFERENCIAS

- Balzarini M & Di Rienzo J (2003) Info-Gen Software para el análisis estadístico de los datos genéticos. Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- Chen X, Line R, Leug H (1993) Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to the other rusts. *Phytopathology* 85:1335-1342.
- Gonzalez M (2000) First report of virulence in argentine populations of *Puccinia sorghi* to Rp resistance genes in corn. *Plant Disease* 84:921.
- Gonzalez M (2007) Caracterización de factores de resistencia y virulencia en la interacción *Zea mays-Puccinia sorghi*. Tesis de Doctorado. Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- González M, Ghio A, Incremona M, Cruciani M, González A, Papucci S, Pedrol H, Castellarín J (2009) Roya común del maíz (*Puccinia sorghi*) en las localidades de Venado Tuerto, Carcarañá, Zavalla y Oliveros. Para Mejorar la Producción. *Maíz* 41:71-74.
- Groth J, Pataky J, Gingera G (1992) Virulence in eastern north american population of *Puccinia sorghi* to Rp resistance genes in corn. *Plant Disease* 76:1140-1144.
- Hu G, Webb C, Hulbert S (1997) Adult plant phenotype of the Rp1-DJ compound rust resistance gene in maize. *Phytopathology* 87:236-241.
- Hulbert S, Lions P, Bennetzen J (1991) Reactions of maize lines carrying Rp resistance genes to isolates of the common rust pathogen, *Puccinia sorghi*. *Plant Disease* 75:1130-1133
- McCune B, Mefford M (1990) PC-ORD Multivariate analysis of ecological data. Version 2.0. Gleneden Beach, OR. USA.
- Pataky J, Pate M (2001) Resistance genes in the rp1 region of maize effective against *Puccinia sorghi* virulent on the Rp1-D gene in North America. *Plant Disease* 85:165-168.
- Pataky J, Gonzalez M, Brewbaker J, Kopplers R (2001) Reaction to Rp-resistant, processing sweet corn hybrids to population of *Puccinia sorghi* virulent on corn with the Rp 1-D gene. *HortScience* 36:324-327.
- Pataky J, Campana M (2007) Reduction in common rust severity conferred by the Rp1D gene in sweet corn hybrids infected by mixtures of Rp1D-virulent and avirulent *Puccinia sorghi*. *Plant Disease* 91:1484-1488.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (Eds.) (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. New York NY.
- Steele K, Humpheys E, Welling C, Dickinson M. (2001). Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* by use of molecular markers. *Plant Pathology* 50:147-180.
- Villaréal L, Lannoud C, Vaillavieille-Pope C, Neema C (2002) Genetic variability in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6138-6145.
- Von Bülow J. (1967). As ferrugens (*Puccinia sorghi*, *P. polysora*, *Physopella zaeae*) do milho (*Zea mays*). III. Raças da ferrugem comum (*P. sorghi*) e linhagens diferenciais de milho. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 2:299-235.
- White D (1999) Compendium of corn diseases. Saint Paul MN. APS Press.

TPP 48 - Recebido 16 Noviembre 2009 - Aceptado 20 Junio 2011
 Editor de Sección: Carlos R. Casela