



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

**Evaluación de grupos genéticos y patogenicidad
de aislados de *Gaeumannomyces graminis* var.
tritici obtenidos en el sur de Chile.**

Memoria de título presentada como
parte de los requisitos para optar al
título de Ingeniero Agrónomo

María Paz Castro Tapia

Valdivia – Chile

2013

PROFESOR PATROCINANTE:



Ernesto Moya Elizondo
Ing. Agr., M.Cv., Ph.D.
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

PROFESORES INFORMANTES:



Laura Böhm Stoffel
Ingeniero Agrónomo
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Universidad Austral de Chile



Judith Carrasco Paradis
Lic. Cs. Biológicas, Mg. Sc
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Universidad Austral de Chile.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCIÓN	5
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	El cultivo de trigo	7
2.2	Enfermedades que afectan al trigo	7
2.3	El “mal del pie”	8
2.3.1	Taxonomía	8
2.3.2	Características generales de la patología	9
2.3.3	Ciclo biológico del patógeno	10
2.3.4	Condiciones predisponentes para el ataque	12
2.3.5	Manejos agronómicos y control	13
2.3.5.1	Control cultural	13
2.3.5.2	Control biológico: suelos supresivos	15
2.4	El “mal del pie” en la zona Sur de Chile	16
2.5	Grupos genéticos para <i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>	16
2.5.1	La variabilidad genética	17
2.5.2	Importancia de la determinación de la variabilidad genética en hongos fitopatógenos	17
2.5.3	Variabilidad genética en <i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>	18
2.5.4	PCR como método de identificación	19
3	MATERIALES Y METODOS	21

3.1	Materiales	21
3.1.1	Procedencia del material biológico	21
3.1.2	Materiales de laboratorio utilizados para aislamientos y prueba de patogenicidad	21
3.1.3	Materiales utilizados para evaluación molecular	23
3.1.4	Materiales utilizados en terreno para la extracción de muestras	23
3.2	Métodos	23
3.2.1	Limpieza de muestras	23
3.2.2	Aislamiento de patógenos	24
3.2.3	Evaluación de la patogenicidad	24
3.2.4	Evaluación de incidencia y severidad	26
3.2.5	Extracción y cuantificación de ADN	26
3.2.6	Evaluación molecular de genotipos de <i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>	27
3.3	Análisis estadísticos	28
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
4.1	Evaluación molecular de especies de <i>G.graminis</i> en los aislados evaluados	29
4.2	Determinación de patogenicidad mediante evaluación de incidencia y severidad de los aislados	36
5	CONCLUSIONES	43
6	BIBLIOGRAFÍA	44
7	ANEXOS	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Origen de los distintos aislados de hongos obtenidos desde sementeras de trigo del sur de Chile utilizadas en esta investigación.	22
2	Resumen de la clasificación de aislados.	35

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Daño generado por <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> sobre plantas de trigo.	10
2	Ciclo biológico de <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	11
3	Disminución del rendimiento de trigo por el aumento del “mal del pie” derivado de rotaciones inadecuadas de cultivos	15
4	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR para aislados utilizando los partidores específicos para <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , GGT-RT/NS5 (410 pb).	30
5	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de 14 aislados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> , utilizando los partidores G1R/G1F específicos para grupo genético G ₁ (800 a 1100 pb).	31
6	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de los cinco aislados <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> utilizando los partidores G2R/G2F específicos para grupo genético G ₂ (1900 pb).	33
7	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de los cinco aislados <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> utilizando los partidores G1R/G1F específicos para grupo genético	34

G₁ (800 a 1100 pb).

- | | | |
|----|--|----|
| 8 | Severidad de la infección observada en plantas de trigo cv. Otto-Baer de 60 días para 26 aislados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> y cuatro aislados de <i>Phaeosphaeria</i> sp, determinada según escala de necrosis radicular de Hornby (1988). | 36 |
| 9 | Porcentaje de área ennegrecida (%) observada en plantas de trigo cv. Otto-Baer de 60 días para 25 aislados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> y cuatro aislados de <i>Phaeosphaeria</i> sp. | 38 |
| 10 | Plantas de trigo de 60 días evidenciando distintos niveles de daño por <i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i> . | 39 |
| 11 | Porcentaje de incidencia (%) en plantas de trigo de 60 días cv. Otto-Baer inoculadas con 25 aislados <i>G.graminis</i> y cuatro <i>Phaeosphaeria</i> . spp, seleccionados para las pruebas de patogenicidad | 40 |

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Método CTAB de extracción de ADN, amplificación y análisis de secuencias utilizado por ARISMENDI (2010)	49
2	Protocolo de preparación de inóculo de <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (ANDRADE, 2011)	52
3	Escala visual de necrosis radicular de HORNBY (1998)	54
4	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de diez aislados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (DAVAL <i>et al.</i> 2009), para comprobar especificidad de partidores GGT-RP/NS5 (FOULY y WILKINSON, 2000).	55
5	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de 25 aislados seleccionados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> , utilizando los partidores GGT-RP/NS5 (FOULY y WILKINSON, 2000)	56
6	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificador por PCR de aislados seleccionados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> para comprobar especificidad de partidores G1R/G1F (parte inferior del gel) y G2R/G2F (parte superior) para la identificación de grupos genéticos G ₁ y G ₂ respectivamente.	57

7	Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificador por PCR de aislados seleccionados de <i>Gaeumannomyces graminis</i> , para comprobar especificidad de partidores G2R/G2F (1900 pb) para identificar grupos genéticos G ₂	58
---	--	----

RESUMEN

El “mal del pie”, causado por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (“Ggt”) , es una enfermedad recurrente en cultivos de trigo en el sur de Chile. El grado de severidad del ataque de este patógeno está asociado a la existencia de diferentes grupos genéticos. No obstante lo anterior, en Sudamérica y en Chile en particular no existen estudios sobre la presencia de estos grupos y su relación con la severidad de su infección. La presente investigación evaluó la existencia de grupos genéticos diferenciados para la especie *G.graminis* var. *tritici* en aislados obtenidos desde sementeras de trigo, y comparó el grado de patogenicidad de estos aislados a través de la evaluación de la severidad de daño en raíces. Se obtuvieron aislamientos de hongos desde el primer internudo de tallos de trigo, los que fueron colectados desde 48 sementeras de trigo comercial ubicadas en las regiones de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, muestreadas entre diciembre de 2011 y febrero del 2012. Mediante observación microscópica y caracterizaciones morfológicas se seleccionaron 25 posibles aislamientos de Ggt, los cuales fueron crecidos en APD y en granos de avena. Estos aislados fueron utilizados para establecer ensayos de severidad y análisis moleculares. A través del uso de partidores específicos se determinó la presencia de los grupos genéticos G_1 y G_2 y si los aislados correspondían a Ggt. La patogenicidad de los hongos aislados fue determinada mediante la evaluación de la severidad de daño causado por los aislados sobre raíces de plantas de 60 días de trigo intermedio cv. Otto-Baer, crecidas en bioensayos con suelo estéril e inoculado con avena infestada en macetas individuales bajo invernadero. Se determinó molecularmente que de los 25 hongos aislados originales, sólo cinco correspondieron a Ggt y de estos sólo dos clasificaron como G_2 , mientras que los tres restantes no amplificaron para este grupo ni para G_1 . Este resultado sugiere la existencia de un nuevo grupo genético en Ggt. Los niveles de severidad observados entre los aislados en las pruebas de patogenicidad variaron entre sin infección hasta 91,7%. Los aislados identificados molecularmente como *G.graminis* var. *tritici* desarrollaron la sintomatología característica de la enfermedad en plantas de trigo y presentaron índices variables de

severidad (entre 0,8 y 21,2% para aislados G_2 y de 28,3 a 91,7% para el presunto grupo G_3). Estos resultados muestran que en los predios del sur de Chile muestreados sólo se presenta el grupo genético diferenciado G_2 y que el grupo G_1 estaría ausente. En adición a lo anterior, se detectó la presencia de un posible nuevo grupo para la especie Ggt (identificado como G_3) y que genera infecciones más severas que G_2 sobre plantas de trigo.

SUMMARY

The "Take-all", caused by the fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ("Ggt"), is a recurrent disease on wheat crops in southern Chile. The severity level on the attack of this infectious agent is associated to the existence of different genetic groups. However, in South America and Chile, in particular, there are not studies about the presence of these groups and their relation with the severity of their infection. The present investigation assessed the existence of differentiated genetic groups for the specie *G.graminis* var. *tritici* in isolates obtained from wheat fields, and compared the pathogenicity level of this isolates through the evaluation of the severity level in root's damage. Fungus isolates obtained from the first internode of wheat stems were collected from 48 commercial wheat fields located in La Araucanía, Los Ríos and Los Lagos regions, which were sampled between December of 2011 and February of 2012. Through microscopic observations and morphological characterizations 25 possible isolates were selected, which were grown in APD and oat grains. These isolated were used to establish severity assays and molecular analysis. Through the use of the specific primers it was determined the presence of the genetic groups G₁ and G₂ and if the isolates belong to Ggt. The pathogenicity of the isolated fungus was determined through the severity evaluation of the damage caused by the isolates on 60 days intermediate Otto-Baer wheat, grown on bioassays with sterile soil and inoculated with infected oat grains in individual pots under greenhouse. It was molecularly determined that from the 25 original isolated fungus, only five of them corresponded to Ggt and of these only two were classified as G₂, while the remaining three did not amplified for this group or G₁. This result suggests the existence of a new genetic group in Ggt. The severity levels observed in the isolates in the pathogenicity test vary from no infection to 91,7%. The isolates molecularly identified as *G.graminis* var. *tritici* developed the characteristic disease symptoms in wheat plants and present variable severity levels (between 0,8 and 21,2% to G₂ isolates and from 28,3 to 91,7% for the presumed G₃ group). These results show that in southern Chile sampled fields there is only the presence of G₂ differentiated genetic group and G₁ group is absent. In addition, the

presence of a possible new group was detected for the Ggt specie (identify as G_3) and develops more severe infections than G_2 on wheat plants.

1 INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es actualmente el cereal de mayor área de producción a nivel mundial. Su importancia tanto económica como nutricional radica en su rol como ingrediente base de varios alimentos de consumo cotidiano. En Chile, el trigo es el cultivo anual con la mayor superficie sembrada, alcanzando en promedio 253.627 hectáreas entre los años 2012 y 2013. En la actualidad se produce en el país aproximadamente 1.213.101 toneladas de trigo al año, alcanzando rendimientos promedios de 49,5 quintales métricos por hectárea.

Durante el cultivo del trigo, diversas plagas y enfermedades afectan su normal crecimiento y desarrollo. Dentro de este contexto las enfermedades fungosas son las más comunes y generan grandes impactos en el cultivo, pudiendo causar pérdidas cuantiosas en la producción, si existen las condiciones favorables para el desarrollo del patógeno. Cabe destacar que estas enfermedades pueden afectar al cultivo del trigo desde el establecimiento hasta la cosecha y también durante el almacenamiento de los granos.

Una de las enfermedades más comunes que afectan a este cultivo es el “mal del pie”, causada por el hongo *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & D.Olivier var. *tritici* J.Walker. Este patógeno perteneciente al orden Ascomycota, afecta las raíces del cultivo generando necrosis en los tejidos infectados, pudiendo llegar a provocar grandes pérdidas en la producción final. En el sur de Chile esta enfermedad fungosa es una de las más comunes, especialmente entre las regiones de La Araucanía y de Los Lagos.

Estudios recientes han demostrado la existencia de dos grupos genéticos distintos en la especie *G.graminis* var. *tritici* denominados grupo G₁ y grupo G₂. Estos grupos genéticos coexisten incluso en un mismo predio y generan niveles variables de la enfermedad “mal del pie” en cultivos de trigo. No obstante lo anterior, en Chile y en Sudamérica no existen estudios sobre la presencia de estos grupos genéticos ni de su distribución, ocurrencia y patogenicidad sobre los cultivos que afecta.

La presente investigación está basada en la hipótesis de que existen dos o más grupos genéticos para la especie *G.graminis* var. *tritici*, en sementeras de trigo presentes entre las regiones de La Araucanía y de Los Lagos en Chile.

El presente estudio tiene como objetivo general determinar a través de herramientas biomoleculares la presencia ó ausencia de diferentes grupos genéticos en aislados de la especie *G.graminis* var. *tritici* recolectadas desde sementeras de trigo en predios distribuidos en las regiones de La Araucanía, Los Ríos, y Los Lagos.

Los objetivos específicos del estudio contemplan:

- 1.- Determinar la especificidad de partidores específicos para la determinación de grupos genéticos en especies de *G.graminis* aislados desde el primer internudo de plantas de trigo colectadas entre las regiones de La Araucanía y Los Lagos.
- 2.- Evaluar la patogenicidad de los aislados de *G.graminis* var. *tritici* a través de la determinación de incidencia y severidad en plantas de trigo.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo del trigo

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) es un cultivo anual herbáceo perteneciente a la familia Poaceae, cultivado extensamente en el mundo. Actualmente es el cereal con mayor superficie cultivada en Chile, y constituye una de las bases de la alimentación humana, representando aproximadamente un 34% de la ingesta calórica y 50% de las proteínas que consume un chileno en promedio (MELLADO, 1998). En Chile, la producción de trigo de los años 2011 y 2012 ascendió a 1.213.101 toneladas, de las cuales aproximadamente 77,4% fueron producidas principalmente entre las regiones del Maule y de La Araucanía (ODEPA, 2011).

La demanda creciente por este cultivo ha guiado el desarrollo de su mejoramiento genético, el cual busca aumentar la producción por superficie cultivada, y de este modo satisfacer la demanda mundial. De esta forma, a través del tiempo, se han obtenido variedades de trigo que expresan buenos rendimientos, con requerimientos mínimos de control químico para enfermedades y plagas, lo que además de bajar costos disminuye los daños al medio ambiente (MELLADO, 2007). Actualmente también existen variedades que resisten de mejor forma diversas condiciones tanto bióticas como abióticas que le afectan. Entre ellas destaca la resistencia a diversas condiciones del suelo, sequías, enfermedades causadas por microorganismos, además de presentar mejoras en aspectos productivos, tales como rendimiento y calidad de grano, eficiencia en el uso de nutrientes, capacidad de macollaje, entre otros.

2.2 Enfermedades que afectan al trigo

Las enfermedades del trigo que afectan hojas, tallos, espigas y raíces, ocasionan un trastorno negativo en el metabolismo que se traduce en pérdida de producción y calidad del grano (MELLADO, 2007). Estas enfermedades pueden ser producidas tanto por factores abióticos como bióticos.

Dentro de los componentes abióticos del agroecosistema que pueden generar anomalías en el cultivo destacan aquellas relacionadas a deficiencias en planes de fertilización y riego (excesos o insuficiencias), sequías o exceso de lluvia, a las cuales pueden equivocadamente atribuirse problemas que tienen su explicación en la presencia de agentes infecciosos (MADARIAGA y LATORRE, 2004).

En relación a las enfermedades de origen biótico, el trigo es afectado por una serie de macro y microorganismos que alteran el normal funcionamiento de la planta, generando impactos en la producción, las cuales pueden llevar a grandes pérdidas económicas si existen las condiciones para el desarrollo del patógeno (MADARIAGA y LATORRE, 2004). El cultivo en cuestión puede ser atacado indistintamente por insectos, hongos, bacterias, virus y nemátodos en cualquiera de sus etapas fenológicas y productivas. Sin embargo, la mayoría de las patologías descritas para el trigo son producidas por hongos.

Dentro de las enfermedades fungosas más relevantes que atacan al cultivo del trigo, destacan la roya estriada (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend), roya colorada (*Puccinia triticina* f. sp. *tritici* Erikss), y roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn); septoriosis (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz); oídio (*Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer); carbón hediondo (*Tilletia foetida* (Wallr.) Liro); carbón volador (*Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.), mancha ocular del tallo (*Oculimacula yallundae* syn: *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner), entre otros. Sin embargo, una de las enfermedades fungosas que más daños causa en los cultivos de trigo tanto a nivel mundial como nacional es el “mal del pie” o pietín de los cereales, causado por el agente *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (MELLADO, 2007).

2.3 El Mal del pie

A continuación, se presentan brevemente las principales características tanto biológicas como epidemiológicas del agente patógeno en estudio.

2.3.1 Taxonomía

- Reino : Fungi

- Phylum: Ascomycota
- Clase : Sordariomycetes
- Subclase: Sordariomycetidae
- Familia: Magnaporthaceae
- Género: *Gaeumannomyces*
- Especie: *G.graminis* var. *tritici*

2.3.2 Características generales de la patología. El “mal del pie” es una enfermedad fungosa altamente destructiva que afecta a la zona radical de la planta de trigo y es causada por el patógeno habitante del suelo *G. graminis* var. *tritici*. Esta enfermedad fungosa de distribución mundial es una de las más devastadoras, y está presente en casi todas las zonas productoras de trigo (Huber y McCay-Buis, 1993, citados por ANDRADE, 2002). Según COOK (2003), el “mal del pie” es la enfermedad fungosa que afecta raíces más estudiada y con mayor importancia en cultivos de trigo alrededor del mundo.

El agente causal desarrolla su micelio sobre las raíces y cuello de la planta de trigo para luego penetrar los tejidos, generando una pudrición generalizada. Una vez en el interior de las raíces, el patógeno comienza a desarrollarse a través de la capa de células del córtex, llegando hasta el floema y xilema. Los conductos colonizados ven interrumpido el transporte de agua y nutrientes, generando deficiencias nutricionales e hídricas en la planta hospedera (Clarkson *et al.*, 1975, citado por THOMAS, 2004). El patógeno debilita la zona radical, presentándose zonas ennegrecidas y pudrición de la base de las cañas y de la corona (LATORRE, 1988). Como consecuencia de este ataque, la planta comienza a evidenciar síntomas de desnutrición y falta de hidratación, como por ejemplo clorosis, retraso en el crecimiento y marchitamiento foliar (Figura 1).

A largo plazo estas deficiencias provocadas indirectamente por el hongo se traducen en la formación de espigas blancas y vanas, generando importantes daños en la producción (MADARIAGA y LATORRE, 2004). Cuando los ataques por “mal del pie”

son muy severos, las plantas generalmente no producen granos, y cuando éstos se forman son escasos, pequeños y deshidratados (MELLADO, 2007). ANDRADE (1995) asegura que en la medida en que los ataques se presenten en estados tempranos de desarrollo de la planta de trigo, más destructiva es la enfermedad, lo cual coincide con COOK (2003), quien afirma que en ataques muy severos se desencadena la muerte prematura de plántulas de trigo.



FIGURA 1 Daño generado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* sobre plantas de trigo. A la izquierda, zonas cloróticas en siembra de trigo asociadas a infección por “mal del pie”. A la derecha, se observan plantas de trigo con zonas necróticas oscuras en la base del tallo y escaso desarrollo radical a causa de la acción infectiva del patógeno.

FUENTE: Imagen izquierda: MATHRE (2000)

2.3.3 Ciclo biológico del patógeno. El ciclo de la enfermedad tiene dos fases distintivas, una saprofítica y otra parasítica. Como se observa en la Figura 2, en su primera etapa, el hongo permanece como micelio en los residuos del cultivo de trigo o en otras gramíneas (malezas), usando este sustrato como fuente de alimentación para

atacar al próximo cultivo de trigo (COOK, 2003). La etapa parasítica toma lugar cuando las raíces de la nueva planta de trigo entran en contacto con el micelio del hongo, el cual coloniza la zona radical y penetra los tejidos (MacNISH, 1994). *G.graminis* var. *tritici* produce hifas corredizas oscuras que cubren superficialmente los tejidos de raíces y corona, y a partir de este micelio se desarrollan hifas hialinas que son las que penetran los tejidos y se encargan de obtener nutrientes desde el hospedero (COOK, 2003). Ambos micelios, oscuro y hialino, se desarrollan tanto en el exterior como interior de los tejidos de la planta y extendiéndose hacia otras, ampliando el área afectada. A consecuencia de esto, se genera la pudrición de la zona infectada, perturbándose el transporte de agua, nutrientes y asimilados a través de la planta. Cabe destacar que sólo las plantas que han sido severamente afectadas mueren prematuramente (COOK, 2003); mientras que aquellas que han sido atacadas con un menor nivel de severidad continúan su desarrollo, siendo éstas la mayor fuente de inoculo para la temporada siguiente. En cuanto a la diseminación del patógeno, al tratarse de un habitante común del suelo esta es principalmente llevada a cabo por el transporte de suelo infectado y plantas enfermas (GALDAMES y FRANCE, 1996)

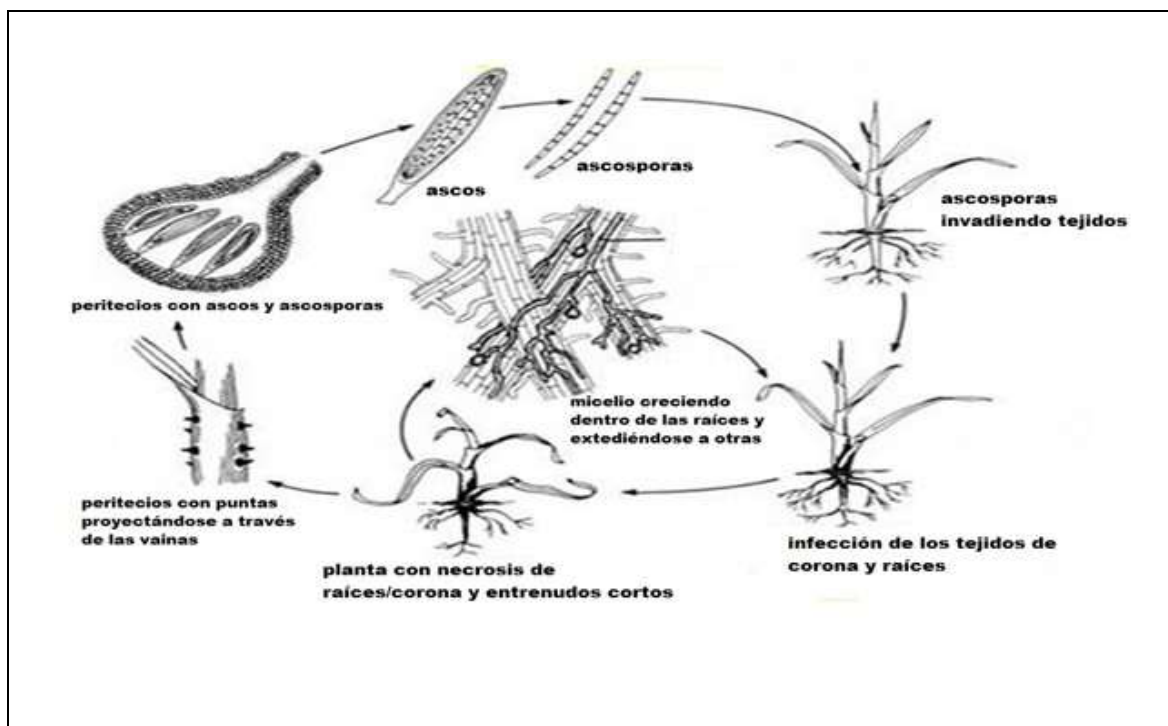


FIGURA 2 Ciclo de vida de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

FUENTE: Adaptado de THOMAS (2004)

2.3.4 Condiciones predisponentes para el ataque. El ataque que *G. graminis* var. *tritici* puede causar en las plantas de trigo está íntimamente relacionada al pH del suelo en el que habita. De este modo, el patógeno ve favorecida su actividad en suelos con una reacción del suelo inferior a 5.5 o mayores a 7.0 (MELLADO, 2007). La producción de ascosporas se favorece con temperaturas entre 12°C y 18°C, por lo tanto ésta también sería una condición que predispone al ataque, aunque cabe destacar que las ascosporas del patógeno no son funcionales y no representan la principal forma de diseminación. Suelos húmedos, compactos y de baja fertilidad propician el desarrollo del agente causal (CARMONA, 2001). La materia orgánica también influye en la actividad del hongo, registrándose mayores daños en aquellos suelos que tengan un mayor nivel de ésta (LATORRE, 2007). ANDRADE (1995) señala que altas pluviometrías durante el desarrollo del cultivo, deficiencias nutricionales, constantes fertilizaciones orgánicas, alto nivel de nitrógeno en forma de nitrato y rotaciones cortas también propician a la infección.

Considerando la información recientemente publicada por SANTIBAÑEZ (2012), el territorio correspondiente a la zona de muestreo abarcada por el estudio posee una temperatura mínima promedio de 8,5°C y una máxima de 22°C, con una humedad relativa promedio del 85,95% para la Región de los Ríos, 7°C como temperatura mínima y 17,6°C como máxima, con una humedad relativa del 82,5% para la Región de los Lagos, y finalmente temperaturas mínimas y máximas promedio de 9.1°C y 21.7°C, con un 81,9% de HR para la Región de la Araucanía. Si a los registros anteriormente nombrados se suma la existencia de suelos principalmente ácidos y con altos niveles de materia orgánica, se obtiene una zona geográfica del país en donde el desarrollo de la infección causada por *G. graminis* var. *tritici* se ve altamente favorecida.

Además de las causas mencionadas previamente, factores como el precio relativamente estable que incentiva la siembra de trigo, las escasas alternativas de rotación con cultivos que tengan mercado, y la presencia de gramíneas susceptibles al hongo y resistentes a herbicidas aplicados al trigo, ayudan a que sea ésta una de las enfermedades más importantes en el país (MELLADO, 2007). Otra práctica agrícola que predispone la actividad del patógeno, es sembrar trigo después de una pradera

natural, donde predominan especies poáceas que son atacadas por el hongo (MADARIAGA y LATORRE, 2004).

2.3.5 Manejos agronómicos y control. Según ANDRADE (1995), esta patología no responde a los métodos tradicionales de control que se aplican con éxito en otras enfermedades, y que su ocurrencia en cultivos de trigo está dada por una compleja relación entre factores del ambiente, de la planta y del mismo patógeno. A pesar de los múltiples productos químicos existentes en el mercado para el control de diversas enfermedades fungosas, para el “mal del pie” el control químico es aún insatisfactorio (Hornby, 1998 citado por ANDRADE, 2004). Esta enfermedad en particular ha atraído la atención de diversas empresas de agroquímicos para la búsqueda de un fungicida efectivo, sin embargo ninguno de los compuestos ensayados para el control del patógeno se puede encontrar en el comercio (Bateman, 1989 citado por FREEMAN y WARD, 2004). En complemento a lo anterior, COOK (2003) afirma que un efectivo control de enfermedades fungosas que ataquen raíces depende del uso de fumigantes de suelo, y que el costo de esta aplicación no es rentable para un cultivo como el trigo. Por su parte, SADEGHI *et al.* (2012) en conjunto con otros autores, afirman que *G.graminis* var. *tritici* es un hongo que presenta cierto nivel de variabilidad genética derivado de la posible exposición a cambios ambientales, por lo que es difícil encontrar fungicidas que mantengan su efectividad a largo plazo. Por lo tanto controlar químicamente a *G.graminis* var. *tritici* es complejo, tanto del punto de vista biológico como económico. Si a esto se suma la inexistente resistencia varietal para la enfermedad, se obtiene un patógeno difícilmente controlable por los métodos tradicionales que pueden funcionar con gran eficiencia en otras enfermedades.

Sin embargo lo anterior, existen algunas medidas que pueden disminuir cuantiosamente el ataque por *G.graminis* var. *tritici* en campos de trigo, las cuales se centran básicamente en prácticas culturales y control biológico

2.3.5.1 Control cultural. Debido a la complejidad del control de esta enfermedad es que las prácticas de tipo cultural como la rotación de cultivos han tomado cada vez más relevancia; según FREEMAN y WARD (2004) esta medida de control es la más

practicada e importante en cultivos de trigo que presenten la enfermedad alrededor del mundo. La rotación es hoy en día una de las más utilizadas y eficientes, ya que además de controlar al patógeno, otorga numerosos beneficios como mantener y mejorar los contenidos de materia orgánica y nutrientes del suelo, reducir erosiones hídricas y eólicas, mejorar drenaje y aireación del suelo, y reducir la incidencia de malezas e insectos (SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN, SAGARPA, 2007). Según lo indicado por URUGUAY, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA (INIA LA ESTANZUELA) (2004) esta medida está basada en la eliminación de la fuente nutricional del agente causal, rotando con especies no susceptibles al patógeno que se desea controlar, de este modo se está eliminando el hospedero principal e interrumpiendo el ciclo biológico. La eficiencia de esta práctica cultural para el control de la enfermedad radica en la naturaleza específica del patógeno, el cual es altamente dependiente de restos de cultivo de trigo infestados para su sobrevivencia (COOK, 2003). Para un eficaz control de este patógeno se recomienda sembrar antes de trigo especies como avena, lupino, raps, maíz, trébol, arveja, poroto, entre otros (MELLADO, 2007). Asociada a esta práctica cultural, existen otras que pueden disminuir la incidencia y severidad de *G.graminis* var. *tritici* en potreros de trigo, tales como el manejo de fechas de siembra, manejo de residuos de cosecha, aplicación de adecuados planes de fertilización y control de malezas (FREEMAN y WARD, 2004).

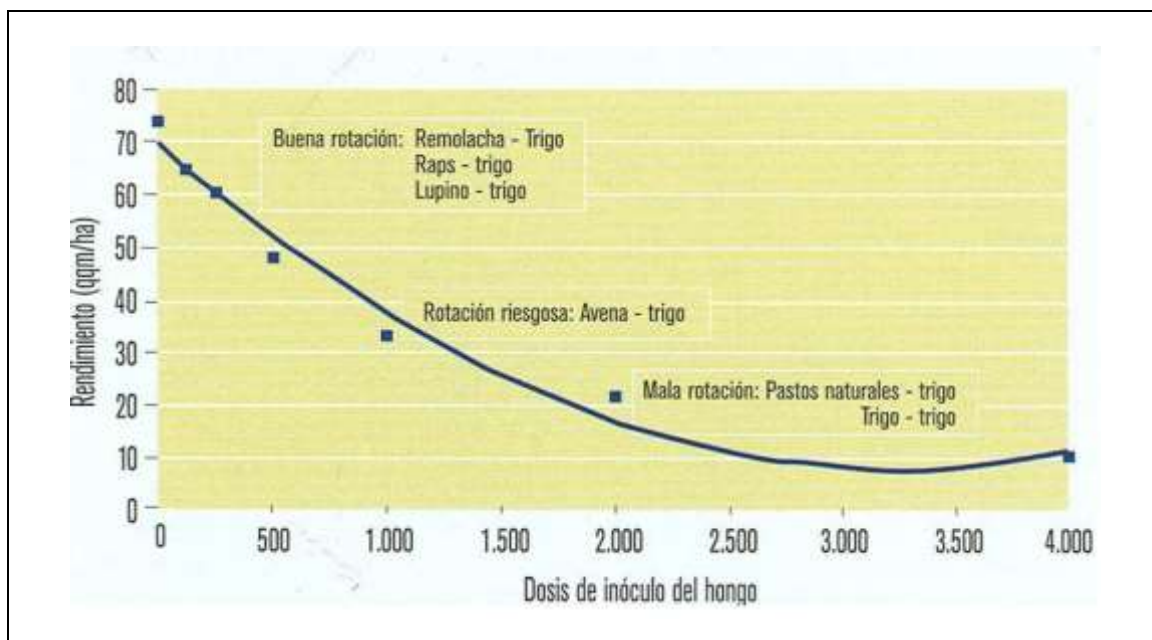


FIGURA 3 Disminución del rendimiento de trigo por el aumento del “mal del pie” derivado de rotaciones inadecuadas de cultivos.

FUENTE: MADARIAGA (2011)

Como se observa en la Figura 3, en la medida en que los productores sigan practicando rotaciones poco adecuadas luego de una siembra de trigo, el inóculo en el suelo aumenta, disminuyendo cuantiosamente el rendimiento del cultivo. Alternar con remolacha, raps y lupino se vuelve la opción más segura que favorece la disminución de inóculo en el suelo y, por consiguiente, mejoras en el rendimiento.

2.3.5.2 Control biológico: Suelos supresivos. Enmarcado en el concepto de Manejo Integrado de Plagas, el biocontrol de la enfermedad basado en la existencia de suelos supresivos está siendo cada vez más estudiado. Según HAAS y DÉFAGO (2005), un suelo supresivo es “un suelo en donde las plantas no sufren de ciertas enfermedades, o donde la severidad de la enfermedad es reducida aunque la planta hospedera sea susceptible”. La existencia de suelos naturalmente supresivos para la pudrición radical es considerada de gran relevancia en la investigación acerca de microorganismos potencialmente controladores del agente causal (Ryder *et.al.*, 1990; Cook 1990 citados por ANDRADE *et.al.*, 2001). Este efecto de declinación de la enfermedad es llevado a

cabo por microorganismos antagónicos de *G.graminis* var. *tritici*, tales como *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., los cuales generan compuestos antifúngicos que controlan el desarrollo de la enfermedad. Según MAZZOLA (2004), el efecto de supresión del ataque causado por *G.graminis* var. *tritici* se induce en el suelo luego de varias siembras consecutivas de trigo, y se atribuye principalmente a la producción del antibiótico 2,4 diacetilfluoroglucinol por parte de microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. Estos microorganismos son capaces de controlar al agente causal del “mal del pie” tanto en su etapa saprofítica como parasítica generando una acción protectora en la rizósfera de las plantas de trigo mediante la producción de este antibiótico (FREEMAN y WARD, 2004). Además del mecanismo de antibiosis, estos antagonistas frenan la acción patógena de *G.graminis* var. *tritici* mediante la competencia por nutrientes como el hierro (NASRAOUI *et.al.*, 2007).

2.4 El “mal del pie” en la zona sur de Chile

Suelos con elevados contenidos de materia orgánica, como lo son los Trumaos de la zona sur de Chile favorecen al “mal del pie” en trigo (LATORRE, 2007). Además, una alta humedad relativa y temperaturas entre 12°C y 18°C, que son comunes en esta área, favorecen el ataque de este hongo. Por lo anterior, ANDRADE (2004), asegura que es esta zona del país la más afectada por *G. graminis* var. *tritici*, especialmente aquellos suelos productores de cereales entre la región de La Araucanía y Los Lagos.

La gran extensión de superficie cultivada con trigo y otros cereales en las regiones especificadas, hace que este hongo sea de común ocurrencia. Sumado a lo anterior, el buen precio del trigo o la falta de alternativas rentables, incentiva a los productores a repetir siembras de este cereal, aumentando los riesgos de presencia de enfermedades fungosas como el “mal del pie” que disminuyen cuantiosamente el rendimiento.

2.5 Grupos genéticos para *G. graminis* var. *tritici*

Como ya es sabido, la variabilidad genética de los hongos fitopatógenos ha sido ampliamente estudiada a través de los años. Numerosos estudios genéticos de hongos

que atacan cultivos han entregado valiosa información que da cuenta de la variabilidad que pueden presentar estos microorganismos y de qué forma se puede utilizar para ampliar el conocimiento acerca de la biología del patógeno y mejorar los planes de control. Como en otras especies fungosas de importancia agrícola, el agente causal del “mal del pie” también presenta cierto grado de variabilidad genética que ha derivado en la existencia de dos grupos genéticos diferenciados, los cuales presentan diferentes niveles de severidad en sus infecciones. (LEBRETON *et al.*2004).

2.5.1 La variabilidad genética

La variabilidad genética de las especies es un fenómeno común y constante en la naturaleza, considerándose un mecanismo altamente necesario para que los distintos organismos evolucionen y se adapten (ASTORGA y ORTIZ, 2006). Esta puede ser observada tanto a nivel de individuos como de poblaciones (FIGUEROA *et al.*2006), y en relación a los hongos fitopatógenos, es una de las razones que deriva en la alta adaptabilidad a sus ambientes, caracterizándolos como organismos en constante evolución (McDONALD, 1997) y por consiguiente, difíciles de manejar.

2.5.2 Importancia de la determinación de la variabilidad genética en hongos fitopatógenos. Numerosos estudios acerca de la existencia de diversos grupos genéticos para una misma especie han sido desarrollados en los últimos años. McDONALD (1997), recalca la importancia de estudiar la estructura genética de los hongos fitopatógenos, debido a que constantemente se adaptan a los cambios en sus ambientes para sobrevivir. El autor menciona que estos cambios en los ecosistemas agrícolas podrían estar basados en el uso de variedades resistentes, aplicaciones de agroquímicos y fertilizantes, nuevos métodos de irrigación e incluso la rotación de cultivos.

Estudios sobre variabilidad genética en el control de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, asociado a resistencia a fungicidas en vides en Chile (ESTERIO y AUGER, 2006) y en numerosos hospederos a nivel mundial (GIRAUD *et.al.*, 1999) han revelado la importancia de la evaluación de diversos grupos genéticos para enfermedades fungosas de importancia económica. En ambos estudios se menciona la relevancia de

la identificación de poblaciones diferenciadas, con el fin de conocer la ocurrencia y distribución espacial del patógeno en relación a factores ambientales tanto bióticos como abióticos. Según Wolfe y Caten (1987), citados por McDONALD (1997), el estudio de la estructura genética de las diversas poblaciones de hongos fitopatógenos es algo recurrente hace ya varios años, y viene en respuesta a la necesidad creciente de implementar estrategias de control efectivas. En relación a lo anterior, GIRAUD *et al.*(1999) coincide en mencionar que la importancia de estos análisis radica en conocer la existencia de poblaciones diferenciadas para posibilitar el desarrollo de nuevos y eficientes métodos de control. En adición a lo anterior, se ha señalado que una de las causas de la eficacia limitada de algunos planes de manejo de enfermedades es el poco conocimiento e investigación acerca de la variabilidad y estructura genética de las poblaciones de microorganismo fitopatógenos (Martin y English, 1997 citados por FIGUEROA *et al.*2006).

De este modo es posible el desarrollo de métodos de control basados en las características distintivas de cada uno de los grupos genéticos diversos que pueden existir de una misma especie (época del año en la cual aparecen con más frecuencia, temperaturas favorables para la infección, resistencia a productos químicos, entre otros), de esta forma se está atacando al problema de manera más específica y eficiente.

2.5.3 Variabilidad genética en *G.graminis* var. *tritici*. DAVAL *et.al.*, en un estudio publicado el año 2009, titulado “Genetic evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* into two major groups” (“Evidencia genética de la diferenciación de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en dos grandes grupos”) determinaron la presencia de dos grupos genéticos distintos para el hongo *G. graminis* var. *tritici*, en una colección de aislados obtenidos desde plantas de trigo de campos distribuidos entre Alemania, Reino Unido, Australia, Francia, Irlanda, China, Estados Unidos, Dinamarca y Bélgica. Los grupos obtenidos habían sido descritos con diferentes herramientas moleculares (PCR, RFLP, RAPD y AFLP) en diferentes escalas geográficas y con un número variable de tamaño de poblaciones, y por lo mismo habían recibido diferentes nombres (G_1 y G_2 , T_1 y T_2 , A_1 y A_2 , entre otros.). No obstante lo anterior, e independiente de la herramienta molecular utilizada o el número

de aislados analizados, se observaron diferencias entre los dos grupos genéticos. Los grupos G_1 y G_2 muestran diferencias en cuanto a la frecuencia con la que aparecen en monocultivos de trigo. Los aislados G_1 mostraron ser más frecuentes en las primeras siembras de este cultivo, mientras que G_2 demostró serlo en siembras posteriores. Adicional a esto, también se determinó la severidad de los ataques, en donde G_2 demostró ser significativamente más agresivo que G_1 en ensayos realizados *in vitro*. Este estudio también determinó que ambos grupos genéticos coexisten y pueden encontrarse incluso dentro del mismo potrero generando niveles variables de la enfermedad mal del pie en cultivos de trigo. Estudios similares, como los publicados por LEBRETON *et al.*(2004) y SADEGHI *et al.*(2012) también confirman, mediante el uso de diversas herramientas moleculares, la presencia de dos grupos genéticamente diferenciados para la especie *G.graminis* var. *tritici* en muestras de trigo, coincidiendo en que aquellos aislados clasificados como G_2 desarrollan infecciones más agresivas sobre su hospedero que aquellos registrados como G_1 .

A pesar de la existencia de estas investigaciones, en Chile y Sudamérica aún no se han desarrollado investigaciones apuntadas al estudio de la variabilidad genética de esta enfermedad fungosa de gran relevancia, especialmente en el sur de Chile.

2.5.4 PCR como método de identificación. Los hongos patógenos han sido identificados y clasificados tradicionalmente mediante sus características morfológicas, fisiológicas y químicas debido a ciertas ventajas que provee el método como la utilización de pocos equipos o herramientas de laboratorio y es económico. Sin embargo algunos de los mayores problemas con el método clásico de identificación es la experiencia y habilidad que se requiere para clasificar un patógeno o diferenciar genotipos, además del tiempo que requiere el crecimiento de micelio y estructuras distintivas para la identificación, crecimiento que muchas veces no ocurre o debe repetirse (KLICH y MULLANEY, 2004). Dentro de este contexto, el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR para su sigla en inglés “Polimerase Chain Reaction”) es considerado una valiosa herramienta con amplias aplicaciones en el campo de la biología molecular (EDEL, 1998), que incluyen el estudio de la genética de poblaciones, evolución molecular, pruebas de paternidad, detección de agentes infecciosos, incluso en medicina forense y criminalística (ESPINOZA, 2007). El método

se basa en la amplificación exponencial de fragmentos específicos del ADN mediante la síntesis *in vitro* de ADN (Saiki *et al.*1985; Mullis *et al.*1986; MULLIS y FALOONA, 1997 citados por EDEL, 1988). Básicamente, esta reacción simula a nivel de laboratorio lo que realmente ocurre en la célula al momento de la síntesis de ADN. El material genético de la muestra se une en mezcla con una serie de reactivos los cuales son llevados a un termociclador, donde se exponen a diversos ciclos de temperatura. La temperatura gobierna en todos los procesos que ocurren durante la amplificación del material genético (McPHERSON y MOLLER, 2006). Son estas diferentes temperaturas las que gatillan los procesos de la amplificación: a los 94°C ocurre la desnaturalización de la hebra de ADN, logrando su separación; en el rango de los 40 – 72°C se da lugar la unión del partidor a la hebra y finalmente a los 72°C ocurre la síntesis de nuevo material genético (McPHERSON y MOLLER, 2006).

El uso reiterado de ésta técnica molecular se basa en las ventajas que posee, entre ellas destaca la posibilidad de analizar y sintetizar gran cantidad de ADN con poca cantidad de material genético disponible en un corto tiempo, pueden ser sintetizados materiales genéticos de cualquier organismo vivo o muerto, permite la amplificación de secuencias muy específicas de ADN, entre otras. Es por estas razones que el desarrollo de herramientas para la identificación de hongos se ha tornado en una herramienta valiosa al momento de caracterizar patógenos basados en su información genética para esclarecer aspectos relacionados a su ecología, biología y genética (CARTER *et al.*2004).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Los diversos materiales utilizados para las distintas actividades prácticas se detallan a continuación.

3.1.1 Procedencia del material biológico. El material utilizado proviene de un muestreo realizado a 48 sementeras de trigo distribuidas entre las regiones de la Araucanía, Los Ríos y Los Lagos que fueron muestreados entre los meses de diciembre de 2012 y febrero de 2012. El muestreo de cada potrero se realizó caminando en un transecto diagonal a partir 30 m desde el borde del campo y en 30 puntos sobre la diagonal se retiraron dos plantas de trigo, las cuales fueron colocadas en una bolsa de plástico y llevadas al laboratorio para posteriores análisis.

La elección de la zona muestreada va en relación al proyecto FONDECYT de Iniciación Nº 11110105, en el cual está inserta la presente investigación, denominado “Reducción del mal del pie y efecto de extractos de plantas en las poblaciones bacterianas asociadas a este fenómeno en cultivos de trigo en la zona Sur de Chile”, además de ser esta enfermedad fungosa una de las más relevantes en el territorio mencionado.

3.1.2 Materiales de laboratorio utilizados para aislamientos y prueba de patogenicidad. Los diversos materiales utilizados para el aislamiento y pruebas de patogenicidad se detallan a continuación:

Agar Papa Dextrosa (Merck®), ácido láctico (Sigma®), placas Petri de 9 cm de diámetro, cámara de flujo laminar Labconco (Modelo 36139-00B), cámara de incubación Heraeus (Modelo BK-600), autoclave, tubos de PVC, diversos materiales desechables y reutilizables. Además se utilizaron diversos materiales descritos en el Protocolo de preparación de inóculo de *G. graminis var tritici*, descrito por ANDRADE (2011), (Anexo 2).

Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Fitopatología e Invernadero del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

CUADRO 1 Origen de los distintos aislados de hongos obtenidos desde sementeras de trigo del sur de Chile utilizadas en esta investigación.

Aislado	Campo	Área	Región
C4G	El Molino	Collipulli	Araucanía
C22K	El Encanto, Pot . Perú	Gorbea	Araucanía
P1E	Fndo. Santa Helena	Paillaco	Los Ríos
P2E	Futróno	Futróno	Los Ríos
P7G	Fndo Paillaco	Paillaco	Los Ríos
C37I	Choroi II	Peñaflor	Los Ríos
C31C	Campo 2	Trumao	Los Lagos
C2D	Sta Rosa	Collipulli	Araucanía
C6Q	Fndo Filadelfia	Quino	Araucanía
P10G	Pichirropulli	Paillaco	Los Ríos
C3D	Los Castaños	Collipulli	Araucanía
C9C	Kuschke	Rehuecoyan	Araucanía
C25B	Las Pataguas	Quino	Araucanía
C29Q	Chanco	Quino	Araucanía
C39O	Tringlo, San pedro	Mafil	Los Ríos
C40J; C40P	Putabla	Putabla	Los Ríos
C40G	Putabla	Putabla	Los Ríos
C41P	Parcela 7	Peñaflor	Los Ríos
P3T	Parcela 26, El Salto	Los Lagos	Los Ríos
P5E	De Maihue	Paillaco	Los Ríos
P9I	Parcela 2, Los Silos	Paillaco	Los Ríos
C30L	Campo 1	Trumao	Los Lagos
C35A; C35L	Pinares	Osorno	Los Lagos
C11A	El Hualle	Cajón	Araucanía
C13L	Pot. Laurel	Cajón	Araucanía
C19A	Pot. Pino II	Cajón	Araucanía
C27D	Pot. Flor Azul	Quino	Araucanía

3.1.3 Materiales utilizados para la evaluación molecular. Para la extracción de ADN y posterior PCR se utilizaron los siguientes equipos: Termobloque Labnet AccuBlock™, microcentrífuga refrigerada Spectrafuge 24D, termociclador Labnet MultiGene™ International Inc., micropipetas, vortex Labnet.

Para la extracción de ADN se utilizó el método CTAB de extracción utilizado por ARISMENDI (2010), el cual se adjunta en ANEXOS. Para la reacción de PCR se utilizaron los reactivos, ciclos térmicos y partidores específicos para los grupos genéticos G₁ y G₂ descritos por DAVAL *et al.*(2009). Para la identificación a nivel de especie de los hongos evaluados, se utilizaron los partidores específicos y ciclos térmicos descritos por FOULY y WILKINSON (2000).

En la electroforesis se utilizó agarosa al 1%, buffer de carga, producto PCR, marcador de peso molecular, bromuro de etidio, transluminador de luz UV Vilber-Lourmat ECX-F20-M, cámara de electroforesis Advance y material del tipo desechable como reutilizable. Las imágenes obtenidas fueron capturadas por un fotodocumentador marca NEON.

3.1.4 Materiales utilizados en terreno para la extracción de muestras. Los materiales utilizados en terreno para obtener las muestras de trigo desde los potreros fueron los siguientes: GPS, bolsas de plástico para almacenar plantas de trigo colectadas y pala.

3.2 Métodos

Los métodos desarrollados tanto para los ensayos de laboratorio como análisis estadísticos se detallan a continuación.

3.2.1 Limpieza de muestras. Una vez en laboratorio, las muestras colectadas desde los diferentes potreros fueron separadas en grupos de 20 plantas de trigo. A continuación se cortaron las plantas a nivel del tercer internudo aproximadamente, y a

su vez fueron separadas las espigas. Los tallos cortados fueron despojados de las raíces. Finalmente se separaron tallos, espigas y raíces, ubicando a los dos primeros en bolsas de papel y a las raíces en tubos Falcon plásticos de 50 mL. Todas las bolsas y tubos fueron rotulados con la fecha y lugar de muestreo.

3.2.2 Aislamiento de patógenos. Se realizaron aislamientos de posibles patógenos presentes en la zona del primer internudo de 20 tallos escogidos al azar a partir de las 20 plantas de trigo colectadas. Los tallos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0,05% de cloro activo por diez min, seguido de tres lavados de 10 min cada uno en agua destilada estéril. Los tallos posteriormente fueron secados en toalla de papel estéril. Posteriormente trozos de 3 mm de la base del primer internudo de cinco tallos fueron desinfectados con alcohol al 75% y sembrados en una placa Petri con medio Agar Papa Dextrosa (APD) (Merck®) al 20%, bajo una cámara de flujo laminar (Labconco, Modelo 36139-00B). Las placas fueron incubadas en una cámara de incubación (Heraeus, Modelo BK-600) a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. Posteriormente se aislaron puntas de hifa en una placa con APD al 20% para obtener un cultivo puro. Estos aislados puros posteriormente fueron usados tanto para pruebas moleculares como de patogenicidad.

3.2.3 Evaluación de la patogenicidad. Se preparó inóculo para las pruebas de patogenicidad infestando granos de avena con los aislados puros, como lo describe el protocolo de preparación de inóculo de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (ANDRADE, 2011), adjuntado en Anexos. Se extrajeron con un sacabocado seis trozos de agar de 1 cm de diámetro desde un cultivo puro y fresco de cada hongo aislado que había sido crecido individualmente en medio APD por 7 días a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una cámara de incubación. Estos trozos de agar con el hongo fueron depositados en matraces de 200 ml que contenían 200 g de semillas de avena estéril, proceso llevado a cabo bajo cámara de flujo laminar.. Los granos de avena habían sido previamente mezclados con 40 ml de agua destilada y reposados durante una noche, para posteriormente ser autoclavados en dos ocasiones a 1 atm por 60 min a 120°C .

El hongo fue incubado en los granos de avena durante 25 días a temperatura ambiente en una cámara oscura. Luego de este periodo, los granos de avena inoculados fueron secados sobre una bandeja cubierta con papel durante una semana en una pieza calefaccionada. Durante este tiempo de secado se sacudieron y movieron los granos para facilitar su aireación. Finalmente los granos de avena inoculados fueron almacenados en bolsas de papel nueva y mantenidos en refrigeración a 4°C. De la totalidad de aislados puros obtenidos se seleccionaron 25 mediante observaciones microscópicas, caracterizaciones morfológicas y forma en la cual infectaban a los granos de avena. Adicionalmente, se escogieron cuatro aislados (C11A, C13L, C19A y C27D) de *Phaeosphaeria* sp., hongo epífítico comúnmente asociado a infecciones de tallo en trigo, con el fin de evaluar su patogenicidad. Estos 29 aislados seleccionados fueron utilizados para llevar a cabo las pruebas de patogenicidad (Cuadro 1).

En conjunto a estas actividades, se preparó una mezcla tinalizada de sustrato que contenía suelo orgánico Tierra Biológica ANASAC y arena de río lavada en una proporción de 2:1. El tinalizado se realizó exponiendo a la mezcla de sustrato a un golpe de calor diario por tres días, en autoclave. Cada golpe térmico fue por un período de 30 min a una temperatura de 120°C, posteriormente se dejaba enfriar por 12 horas hasta la próxima exposición, procurando mover el saco con sustrato para asegurar su homogeneidad. Se llenaron macetas de PVC de 25 cm de alto por 32 mm de diámetro con 80 g de sustrato en los cuales se depositaron dos granos de avena infectados por los aislados seleccionados. Se colocó un grano de avena infestado a 14 cm y un segundo a 11 cm desde la parte superior, cubriéndose con sustrato para posteriormente sembrar cada maceta con una semilla pregerminada de trigo cv. Otto-Baer. El pregerminado de semillas de trigo se realizó dos días previo a la siembra, en placas Petri con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril y mantenidos a 24°C en una cámara de incubación. Cada uno de los 29 aislados seleccionados fueron considerados un tratamiento, con seis repeticiones cada uno. Adicionalmente, se prepararon dos tratamientos controles, cada uno con seis repeticiones. Uno de los controles contempló la siembra de semillas de trigo sin avena y el otro la siembra de semillas de trigo junto a semillas de avena sin inocular. Las plantas de trigo crecieron 60 días bajo invernadero, regadas día por medio y fertilizadas con una solución de Urea al 3% en dos aplicaciones parcializadas de 30 ml por tubo cada una. En cuanto al

control de plagas y enfermedades, sólo se aseguró la esterilidad del suelo en el cual fueron sembradas las semillas de trigo para descartar la posible presencia de inoculo de patógenos de suelo. No se utilizaron agroquímicos. Después de ese periodo se evaluó el nivel de severidad de daño en raíces, como se describe en el punto 3.2.4.

3.2.4 Evaluación de incidencia y severidad. De cada una de las macetas se extrajeron las plantas de trigo en estado de desarrollo 1.2 en escala Zadoks, cuyas raíces fueron lavadas cuidadosamente, para luego determinar de forma visual la severidad causada por cada hongo en estas raíces, utilizando la escala descrita por HORNBY (1998). Esta escala visual permite determinar el porcentaje de área total infectada de la zona del primer internudo y zona radical por medio de la asignación de una de 11 categorías de severidad que es atribuida a un porcentaje de ennegrecimiento de la zona radical que es observado en las raíces de las plantas de trigo (Anexo 3). La incidencia fue determinada calculando el total de plantas que presentaron infección, descartando del cálculo a aquellas que figuraban dentro de la categoría 1 de Hornby. Posteriormente, los resultados obtenidos en la escala visual fueron transformados según la metodología descrita por LITTLE y JACKSON (1978), y expresados como porcentaje de ennegrecimiento de la zona radical y primer internudo, para un mejor análisis de los resultados.

3.2.5 Extracción y cuantificación de ADN. Para la extracción de ADN de las muestras se utilizó el método CTAB de extracción utilizado por ARISMENDI *et al.*(2010), que se describe en la sección de ANEXOS. Las muestras analizadas consistieron en micelio crecido en APD por siete días, obtenido desde los tallos de trigo recolectados desde las diversas sementeras distribuidas en las regiones mencionadas para el estudio como se describe en el subcapítulo 3.2.2. El micelio luego fue conservado en Buffer TE a -12°C para la posterior extracción de ADN. La cuantificación de ADN extraído en cada muestra fue realizada en un equipo Nanoquant en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Bioquímica y Microbiología.

3.2.6 Evaluación molecular de genotipos de *G.graminis* var. *tritici*. Para determinar la especificidad de partidores específicos para la determinación de grupos genéticos en especies de *G. graminis* var. *tritici* aislados desde el primer internudo de plantas de trigo colectados entre las regiones de La Araucanía y Los Lagos se realizaron reacciones de PCR basadas en los protocolos descritos por DAVAL *et al.*(2009), y utilizando ADN de *G.graminis* var. *tritici* obtenido en el laboratorio del mismo autor, para ser usados como controles positivos. Brevemente, la reacción de amplificación para los grupos en estudio contiene 2.5 μ L de buffer PCR, 1.0 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 0.5 μ L de dNTP's (0,25 mM cada uno), 0.5 μ L (10 pM) de los respectivos partidores para los grupos genéticos G_1 y G_2 (G1R/G1F y G2R/G2F, respectivamente), 0.1 μ L de Taq polimerasa (Invitrogen), 18.9 μ L de Agua + PVP al 2% y 1 μ L de ADN de la muestra previamente extraída. En cuanto a los ciclos térmicos para realizar la reacción de PCR para la determinación de grupos genéticos, se comenzó con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. La elongación final se realizó a 72°C por 7 minutos. Para clasificar los aislados a nivel de especie, se utilizaron los partidores GGT-RP/NS5 (FOULY y WILKINSON, 2000) previamente validados con controles positivos de *G.graminis* var.*tritici* utilizados por DAVAL *et al.*(2009), enviados desde Francia (Anexo 4). Esta reacción de PCR comienza con una desnaturalización inicial a 93°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 5 min. Luego de la reacción PCR se verificó la presencia del producto de amplificación mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% p/v en tampón TEB al cual se le adicionó 4 μ L de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 volt durante 30 min. Las bandas resultantes se visualizaron en un transiluminador de luz UV y posteriormente registradas en un fotodocumentador.

Tanto la extracción de ADN como la posterior evaluación molecular de los aislados se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Silvoagrícola del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

Para comprobar las amplificaciones a nivel de grupo genético se trabajó con ADN de tres aislados de *G. graminis* var. *tritici* que DAVAL *et al.*(2009) utilizó en su

investigación: PG29 (aislado francés), PG50 y PG52 (aislados australianos). Estos aislados fueron validados previo a su uso con los aislados investigados en este trabajo.

3.3 Análisis estadísticos

Se utilizó estadística descriptiva para analizar en primera instancia la incidencia y severidad de los aislados sobre las plantas de trigo. En adición a lo anterior, y utilizando los datos obtenidos con la escala de Hornby, se evaluó la existencia de diferencias estadísticas en la severidad de las infecciones mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y se evaluó diferencias de medias para cada aislado fungoso utilizando un test de Tukey ajustado para datos no paramétricos ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los packages "rcmdr" y "abind" del software "R" (www.r-software.org).

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Evaluación molecular de especies de *Gaeumannomyces graminis* en los aislados evaluados

Tradicionalmente las especies de *G.graminis* han sido identificadas por métodos convencionales de clasificación. Según lo afirmado por RACHDAWONG *et al.*(2002), estos métodos se basan generalmente en la caracterización de los síntomas desarrollados en el hospedero, tamaño y morfología de peritecios y ascosporas, tipo de hifopodias y ensayos de patogenicidad. En los casos de caracterización de ascosporas y pruebas de patogenicidad, el autor señala que éstas son muchas veces difíciles de interpretar ya que en el caso de la observación microscópica de ascosporas los rangos de tamaño se traslapan dificultando la clasificación, y en cuanto a las pruebas de patogenicidad el organismo en estudio puede perder virulencia durante el almacenamiento prolongado. Todas las prácticas mencionadas son laboriosas, llevan tiempo y no siempre llegan a una identificación satisfactoria (RACHDAWONG *et al.*2002). En complemento a lo anterior, FOULY y WILKINSON (2000) señalan que la producción de peritecios es una práctica poco decidora en cuanto a la identificación de especies de *G.graminis*, ya que rara vez el patógeno los produce en situaciones de campo, y en ensayos *in vivo* se ha registrado que sólo cerca del 50% de los aislados los producen. Dentro de este contexto, las herramientas moleculares prestan grandes utilidades al momento de identificar las diferentes variedades dentro de la especie en estudio. Como lo señalan FOULY y WILKINSON (2000) y RACHDAWONG *et al.*(2002), la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) es una herramienta altamente útil y sensible en la identificación cuando los partidores han sido cuidadosamente diseñados.

Como se muestra en el Cuadro 2, de los 25 aislados seleccionados visualmente como *G.graminis*, se pudo identificar en una primera amplificación como correspondientes a la especie causal de “mal del pie” en trigo a los aislados C30L, C39O, C40J, C40P, P10G, C3D y C25B. Estos dos últimos aislados presentaron bandas poco nítidas de 410 pb (asociadas al patógeno de estudio) en dicha amplificación. Por lo anterior, todos los aislados que amplificaron para la especie *G. graminis var. tritici* en primera instancia además de aquellos en los cuales no se tenía seguridad, se volvieron a evaluar

molecularmente de modo de obtener con mayor certeza la clasificación a nivel de especie. Como se muestra en la Figura 4, finalmente se descartó a los aislados C3D y C25B como pertenecientes a la especie de estudio, y se confirmó la clasificación de los aislados C30L, C39O, C40J, C40P y P10G, como variedad *tritici*. Los aislados C4G, C22K, P1E, P2E, P7G, C37I y C31C fueron identificados como *G. graminis* var. *avenae*. El resto de los aislados (13 aislados) fueron considerados como posibles *G. graminis* var. *graminis*, dado que no hubo amplificación de bandas al usar los partidores mencionados y basados en lo descrito por FOULY y WILKINSON (2000), (Anexo 5).

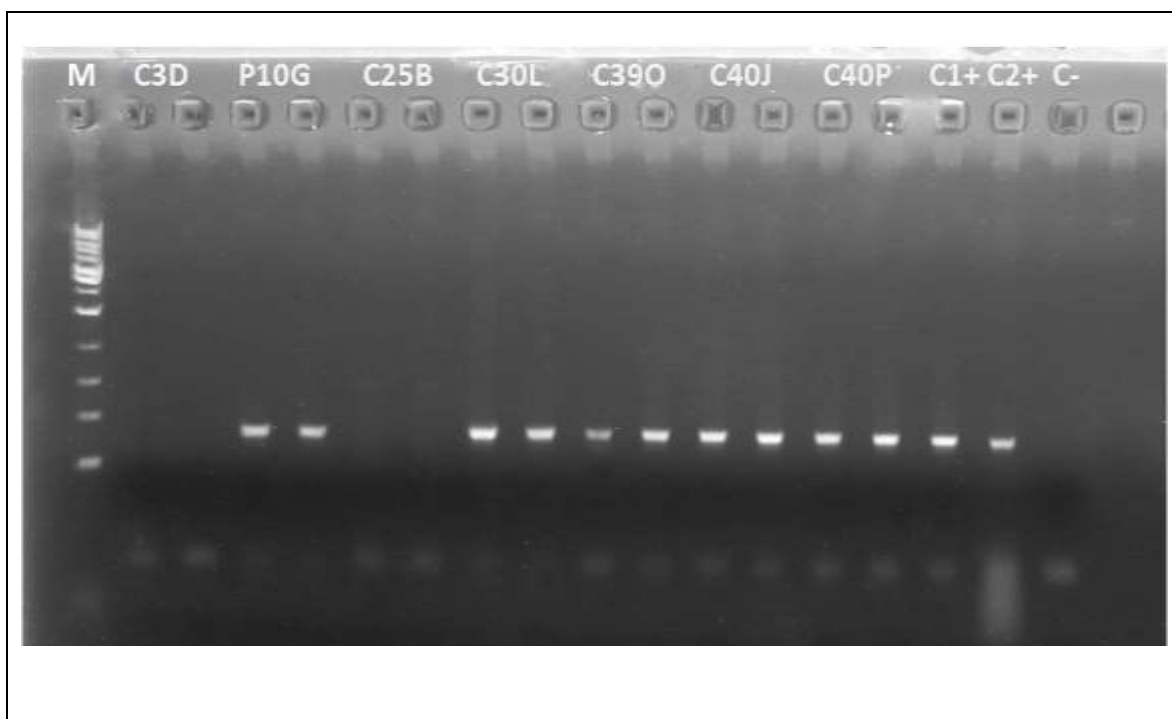


FIGURA 4 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR para aislados utilizando los partidores específicos para *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* GGT-RT/NS5 (410 pb). Controles positivos C1 y C2 corresponden a ADN de *G.graminis* var. *tritici* obtenido de aislado INIA Remehue Osorno y aislado del predio Las Vertientes de Osorno año 2010, respectivamente. Control negativo C- corresponde a Mix PCR sin ADN. M: marcador de peso molecular (1 kb).

Es de importancia mencionar, que para asegurar la identificación a nivel de especie de los 9 nueve aislados que no presentaron bandas de amplificación utilizando los partidores de FOULY y WILKINSON (2000), se debería considerar una amplificación de la región ITS con partidores universales y posterior secuenciación, de modo de clarificar la naturaleza de los aislados. Cabe destacar que existen otras especies de hongos que pueden ser confundidas con el patógeno asociado a “mal del pie” en trigo, como son *Ophiosphaerella herpotricha* o *Wojnowicia graminis*, dado que se asemejan en su morfología al citado patógeno.

Luego de evaluar molecularmente a los aislados a nivel de especie, se determinó la especificidad de los partidores para la clasificación a nivel de grupo genético en especies identificadas como *G. graminis* var. *tritici*, variedad *avenae* y posiblemente la variedad *graminis* u otras especie de hongos. Para analizar la especificidad de los partidores G1R/G1F y G2R/G2F se incluyó a la totalidad de los aislados seleccionados para el estudio y posteriormente se realizaron los análisis para determinar grupo genético en aquellos aislados ya clasificados como *G.graminis* var.*tritici*.

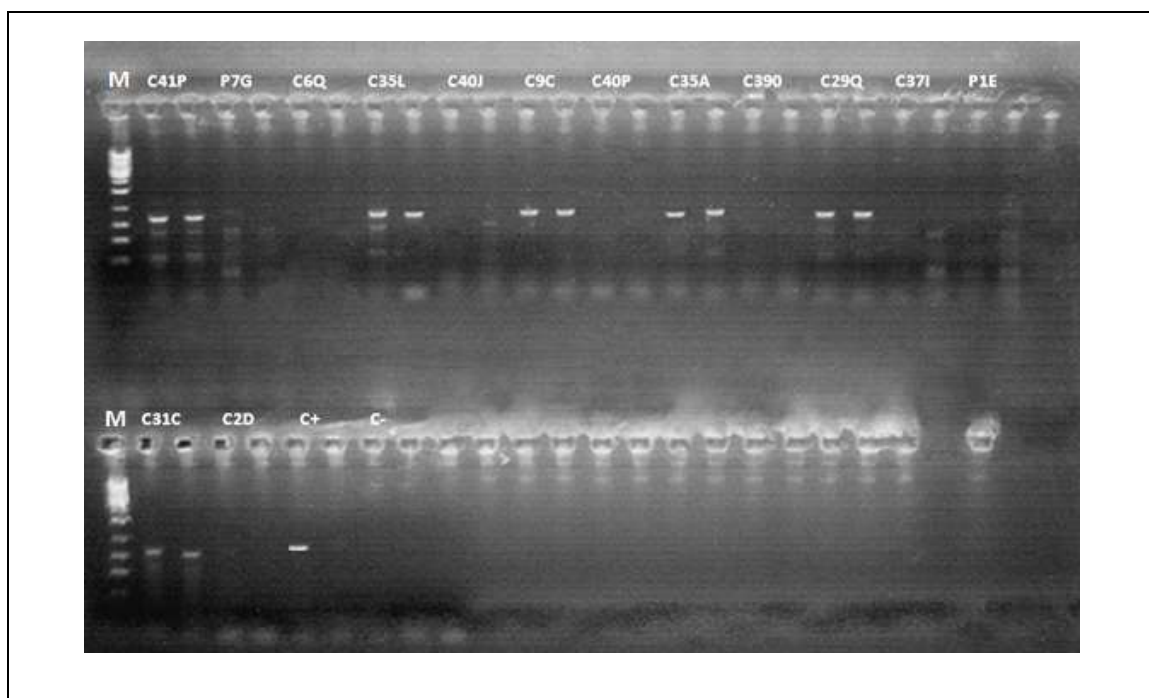


FIGURA 5 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de 14 aislados de *Gaeumannomyces graminis*, utilizando los

partidores G1R/G1F específicos para grupo genético G₁ (800 a 1100 pb). Control positivo C+ corresponde a ADN de aislado *G.graminis* var. *tritici* G₁ proveniente de Francia. Control negativo C- corresponde a Mix PCR sin ADN. M: marcador de peso molecular (1 kb)

La Figura 5 muestra una de las amplificaciones en donde se analizaron 14 de los 25 aislados fungosos originales para analizar la especificidad de los partidores G1R/G1F. En ella se observa que sólo amplificaron bandas entre 800 y 1100 pb (asociadas al grupo genético G₁) los siguientes aislados: C41P, C35L, C9C, C35A, C29Q, y C31C. De estos, ninguno correspondió a la variedad *tritici*, mientras que el aislado C31C correspondió a la variedad *avenae*. Esto nos indica que los partidores para el grupo genético G₁ no son lo suficientemente específicos para la variedad *tritici*, pudiendo ser amplificado a partir de ADN de otras especies de hongos y/o variedades de *G. graminis*. La especificidad de los partidores G2R/G2F (grupo genético G₂) también fue evaluada (Anexos 6 y 7), pero en este caso resultaron ser más específicos que G1R/G1F, ya que amplificaron mayormente para aislados de la especie *G.graminis* var. *tritici*. En el caso de los aislados C4G y C3D (var. *avenae* y var. *graminis*) también amplificaron para estos partidores, sin embargo C3D amplificó en un primer análisis para la variedad *tritici*, por lo cual existe la posibilidad que la muestra de ADN haya estado contaminada con ADN de la variedad *tritici*.

La especificidad de los partidores G1R/G1F y G2R/G2F pudo haberse visto afectada por una serie de factores, entre los que destacan: utilización de aislados y metodologías diferentes a las usadas en la investigación de DAVAL *et al.* (2009), baja calidad y/o cantidad de ADN en las muestras (ng/μL), dificultades en el manejo de protocolos, entre otros. Sin embargo lo anterior, éstas posibles razones del bajo desempeño del partidor fueron descartadas al analizar con mayor profundidad las condiciones en las que se extrajo el ADN (uso de aislados puros y correcto seguimiento de protocolos) y la cuantificación de ADN (cantidad y calidad adecuadas para amplificaciones satisfactorias). Verificando la metodología de extracción que utilizó DAVAL *et al.*(2009) (protocolo de Lee *et al.*1988), esta difiere en algunos puntos de la utilizada en esta investigación (ARISMENDI *et al.*2010), sin embargo esto no debiera significar un problema que derive en una menor especificidad del partidor, ya que se trabajó con aislados puros. Descartando estas razones, se determinó que la

baja especificidad puede derivarse de problemas al diseñar el partidador, la presencia de otras especies distintas a *G.graminis* var. *tritici* al momento de evaluarlo y propios errores al seleccionar los aislados que visualmente respondían a la misma morfología de *G.graminis* var. *tritici*. Cabe constatar que los partidores para identificar los grupos genéticos fueron validados usando ADN de tres de los 98 aislados de *G.graminis* var. *tritici* (aislados PG29, PG50 y PG52), que habían sido usados previamente en los trabajos realizados por DAVAL *et al.*(2009).

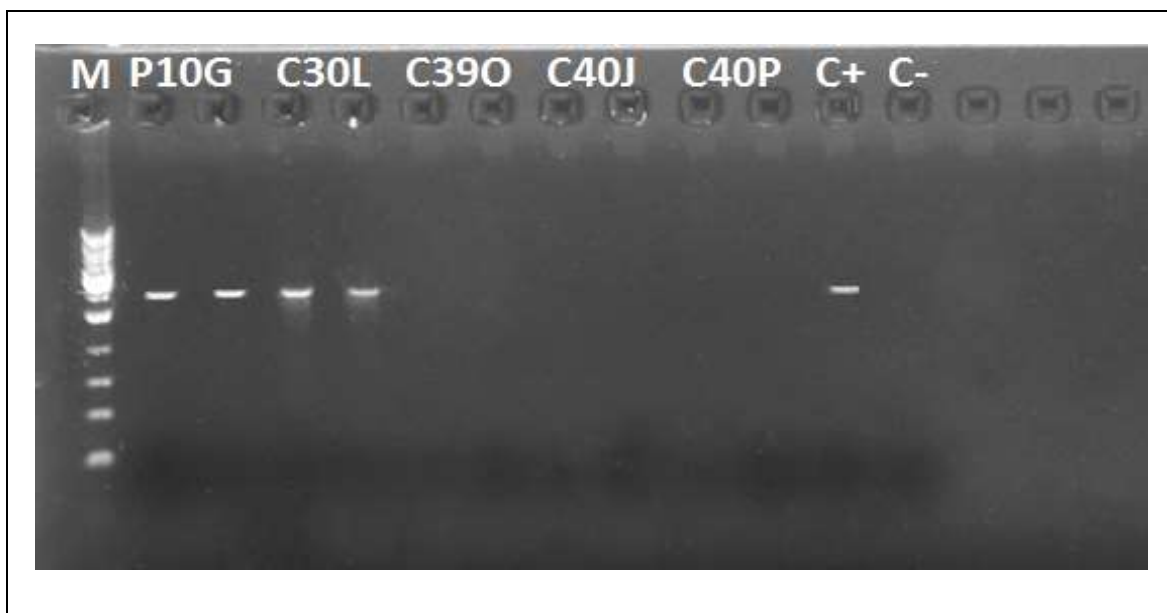


FIGURA 6 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de los cinco aislados *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* utilizando los partidores G2R/G2F específicos para grupo genético G₂ (1900 pb). Control positivo C+ corresponde a aislado “Ggt 2010-3” grupo G₂ proveniente de INIA Carillanca. Control negativo C- corresponde a Mix PCR sin ADN. M: marcador de peso molecular (1 kb).

En la Figura 6 se muestra la amplificación para determinar grupos genéticos en los cinco aislados confirmados como *G.graminis* var. *tritici* previamente. En ella se observa que de los cinco aislados, sólo P10G y C30L correspondieron a G₂, mientras que los

tres restantes no amplificaron para este grupo. Posteriormente, los aislados C40J, C40P y C39O fueron analizados nuevamente utilizando el partidor G1R/G1F para el grupo G₁, como se muestra en la Figura 7. En ella se observa que estos tres aislados tampoco amplifican para el grupo G₁, al no presentar bandas nítidas a la altura de 800 a 1100 pb, bandas que sí fueron observadas en la muestra de ADN del aislado francés PG29 G₁ (control positivo), facilitado por Stephanie Daval (INRA, Universidad de Rennes, Francia).

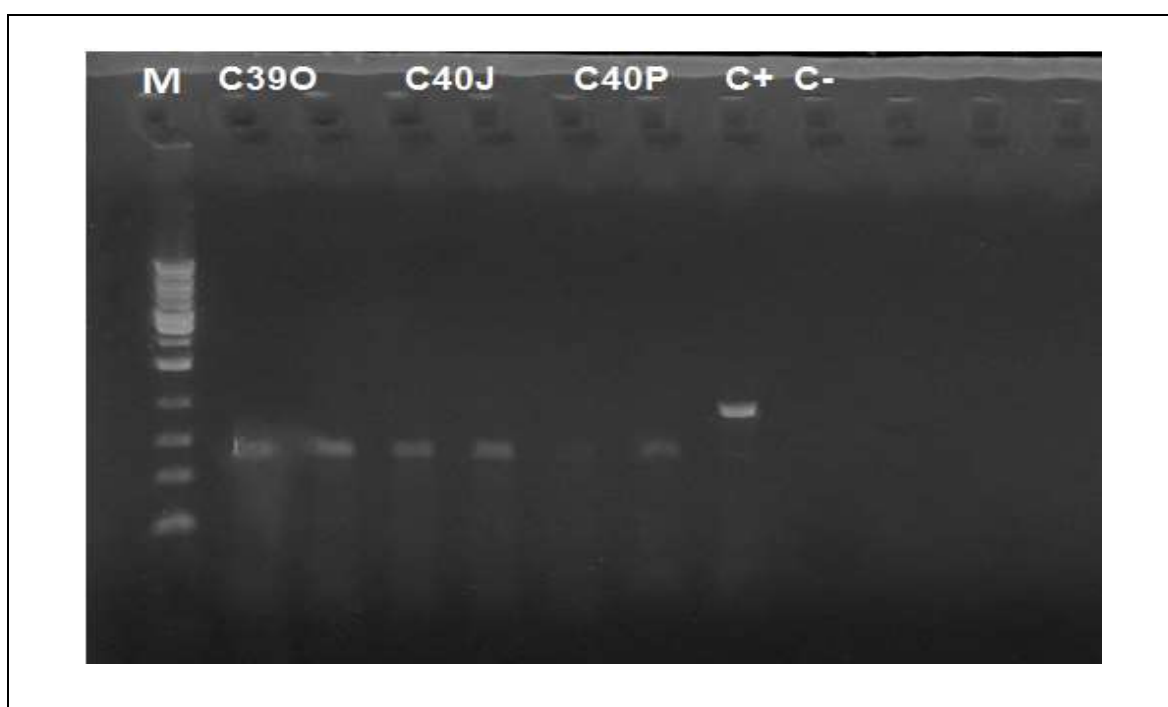


FIGURA 7 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de los tres aislados *Gaeumannomyces graminis* var. tritici utilizando los partidores G1R/G1F específicos para grupo genético G₁ (800 a 1100 pb). Control positivo C+ corresponde a aislado PG29 grupo G₁ (Francia). Control negativo C- corresponde a Mix PCR sin ADN. M: marcador de peso molecular (1 kb).

Resumiendo las evaluaciones moleculares desarrolladas a nivel de especie y grupo genético, se determinó que de aquellos aislados identificados molecularmente como *G.graminis* var. *tritici*, sólo dos de ellos amplificaron para uno de los dos grupos genéticos diferenciados conocidos, mientras que los tres restantes al no poder ser clasificados como G₁ ó G₂ se les denominó G₃. El detalle de la clasificación de los aislados a nivel de especie, grupo genético y región se muestra en el Cuadro 2.

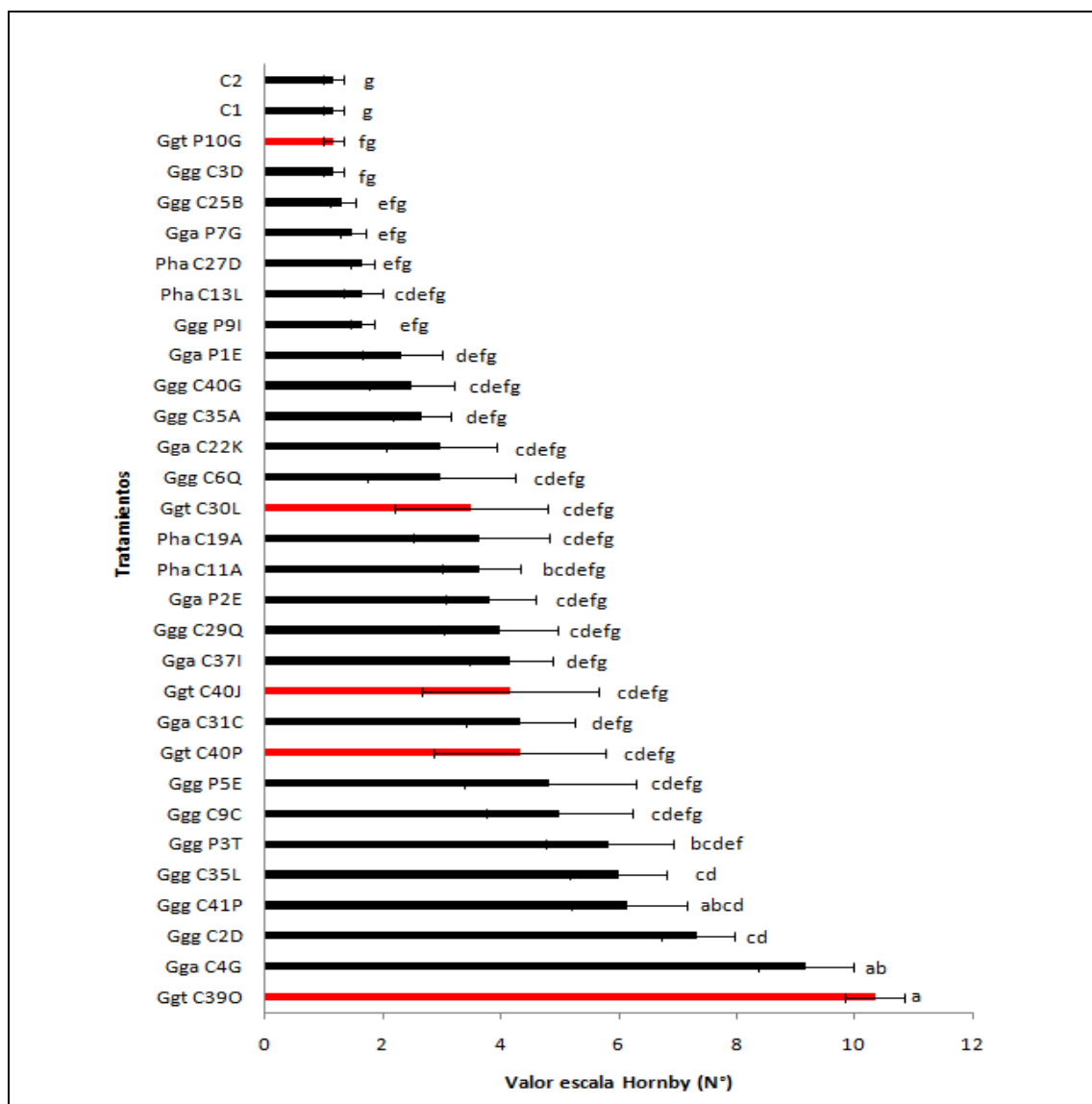
CUADRO 2 Resumen de la clasificación de aislados.

Aislado	Región	Grupo genético	Especie
C2D	La Araucanía	- ¹	<i>G. graminis</i>
C3D	La Araucanía	G2	<i>G. graminis</i>
C40G	La Araucanía	- ¹	<i>G. graminis</i>
C4G	La Araucanía	G2	<i>G.graminis</i> var. <i>avenae</i>
C6Q	La Araucanía	- ¹	<i>G. graminis</i>
C9C	La Araucanía	G1	<i>G. graminis</i>
C22K	La Araucanía	- ¹	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
C25B	La Araucanía	G1	<i>G. graminis</i>
C29Q	La Araucanía	G1	<i>G. graminis</i>
C30L	Los Lagos	G2	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>
C31C	Los Lagos	G1	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
C35A	Los Lagos	G1	<i>G. graminis</i>
C35L	Los Lagos	G1	<i>G. graminis</i>
C37I	Los Ríos	- ¹	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
C39O	Los Ríos	G3 ²	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>
C40J	Los Ríos	G3 ²	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>
C40P	Los Ríos	G3 ²	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>
C41P	Los Ríos	G1	<i>G. graminis</i>
P1E	Los Ríos	- ¹	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
P2E	Los Ríos	- ¹	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
P3T	Los Ríos	G1	<i>G. graminis</i>
P5E	Los Ríos	G1	<i>G. graminis</i>
P7G	Los Ríos	- ¹	<i>G. graminis</i> var. <i>avenae</i>
P9I	Los Ríos	G1	<i>G. graminis</i>
P10G	Los Ríos	G2	<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i>

¹ para aislados que no amplificaron para ningún grupo genético, conocido o desconocido

² Especies de *G. graminis* var. *tritici* que no amplificaron para ninguno de los dos grupos genéticos conocidos.

4.2 Determinación de patogenicidad mediante evaluación de incidencia y severidad de los aislados



Ggt: aislados clasificados como *G.graminis* var. *tritici* ; Gga: *G. graminis* var. *avenae*; Ggg: posibles *G.graminis* var. *graminis*; Pha: *Phaeosphaeria* sp.

FIGURA 8 Severidad de la infección observada en plantas de trigo cv. Otto-Baer de 60 días para 25 aislados de *Gaeumannomyces graminis* y cuatro aislados de *Phaeosphaeria* sp, determinada según escala visual de necrosis radicular de Hornby (1988). Barras sobre cada columna corresponden a error estándar. Letras distintas indican diferencias entre los aislados o tratamientos. Barras rojas identifican aislados var. *tritici*.

En la Figura 8 se observan los resultados para los datos de severidad registrados con la escala visual de Hornby (Anexo 3), donde existieron diferencias estadísticamente significativas (Kruskall-Wallis $H_{(30)}=104,88$; $p<0,001$) entre tratamientos. En ella se puede apreciar que la mayoría de los aislados no presenta diferencias estadísticas con respecto a su nivel de infección con respecto a los controles. Asimismo, se observó que ambos tratamientos controles sin inóculo se comportaron de igual forma, alcanzando según la escala de Hornby un nivel de infección entre 0 y 5% de daño presente en las raíces y sin mostrar diferencias estadísticas entre ellos.

Para facilitar el entendimiento de los resultados, los datos obtenidos en la escala visual de Hornby fueron transformados basados en las metodologías descritas por LITTLE y JACKSON (1978) y posteriormente expresados en porcentaje de área ennegrecida (%), como se muestra en la figura 9. Como se observa en ambas figuras, en relación a los cuatro aislados *Phaeosphaeria* sp, estos no presentaron diferencias estadísticas entre ellos ni con la mayoría de los aislados restantes, promediando entre ellos un 13,3% de severidad sobre las raíces de plantas de trigo. Aquellos aislados clasificados como *G.graminis* var. *avenae* promediaron un 26,7% de severidad en raíces, entre los cuales no se observó diferencia estadística a excepción del aislado C4G, el cual promedió 78,3% de infección sobre su hospedero y fue el segundo aislado más patogénico de los 29 incluidos en las pruebas de patogenicidad. En el caso de los supuestos aislados var. *graminis*, tampoco se apreciaron diferencias estadísticas entre ellos, promediando alrededor de 25,7% de severidad de la infección en las raíces de trigo. En cuanto a los aislados clasificados como el agente infeccioso de estudio (*G.graminis* var. *tritic*) C40J, C40P, C30L y P10G no presentaron diferencias estadísticas entre ellos, pero si con respecto al aislado C39O.

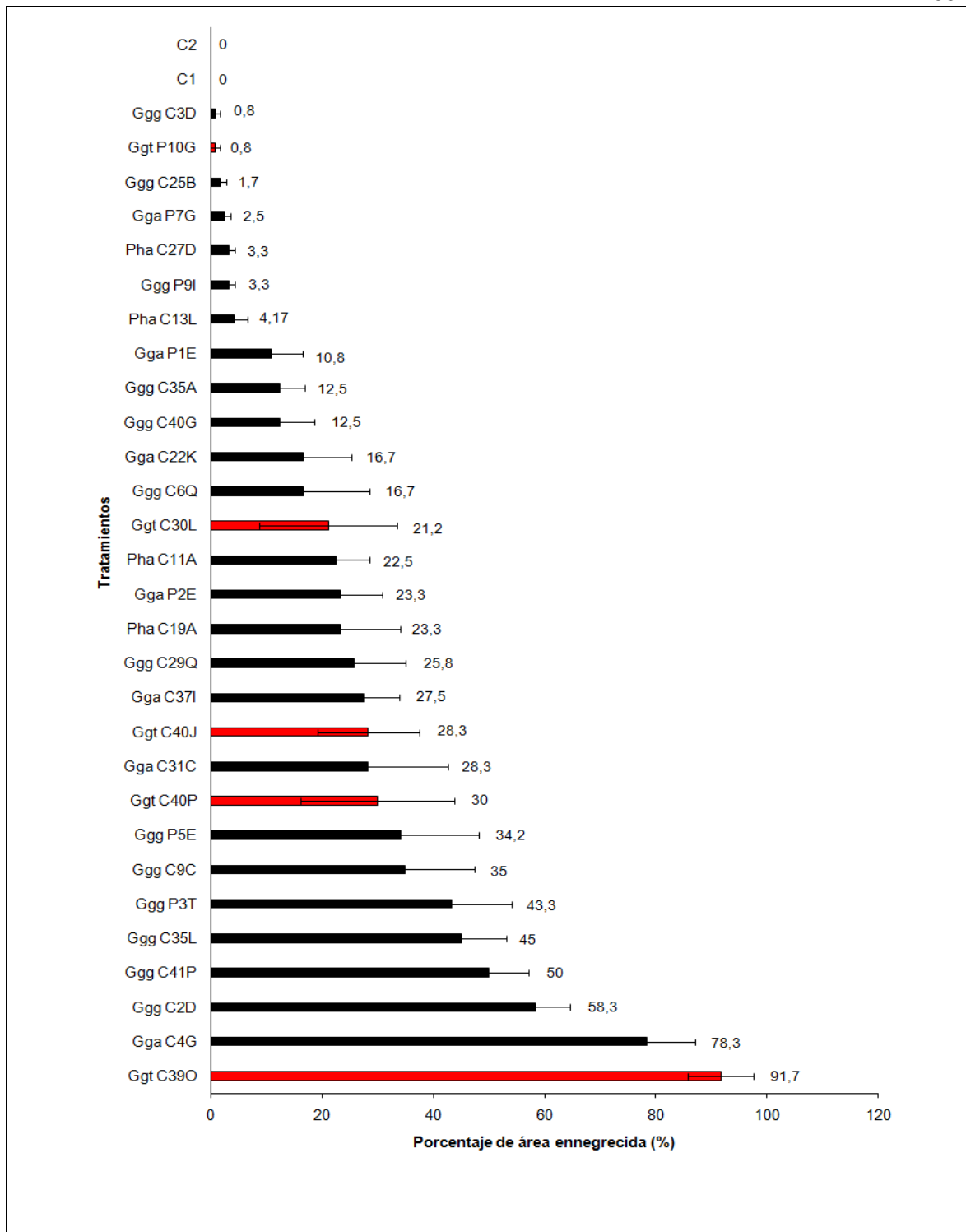


FIGURA 9 Porcentaje de área ennegrecida (%) observada en plantas de trigo cv. Otto-Baer de 60 días para 25 aislados de *Gaeumannomyces graminis* y cuatro aislados de *Phaeosporeria* sp. Barras sobre cada columna corresponden a error estándar. Barras rojas identifican aislados var. *tritici*.

Los aislados var. *tritici* promediaron un 34,4% de severidad en las raíces de su hospedero. De éstos, solo dos de ellos amplificaron para el grupo genético G₂ (C30L y P10G), mientras que los tres restantes (C40J, C40P y C39O) no pudieron ser clasificados dentro de ningún grupo genético diferenciado conocido para *G. graminis* var. *tritici*, por lo cual fueron clasificados como un posible nuevo grupo G₃. Considerando los niveles de infección registrados, el grupo G₂ promedia un nivel de severidad del 11%, mientras que el supuesto nuevo grupo G₃ registra un 50% de daño sobre tejidos.



FIGURA 10 Plantas de trigo de 60 días evidenciando distintos niveles de daño por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Aislados C39O G₃ (A), P10G G₂ (B) y controles negativos (C)

En la Figura 10 se observa los diferentes niveles de daño que alcanzaron dos aislados *G. graminis* var. *tritici* contrastantes en cuanto a la infección desarrollada sobre plantas de trigo, en comparación con ambos controles no inoculados. Es así como el aislado C39O, clasificado como posible G₃, demuestra evidentes daños a nivel de primer

internado y sistema radical estimados en 91,7% mientras que P10G, clasificado como G_2 , solo generó un 0,8% de infección, daño que no varía con respecto al que presentaron los controles negativos. Lo anterior da cuenta de una clara diferencia en la agresividad de las infecciones de los diferentes grupos genéticos, donde se puede afirmar que el posible nuevo grupo G_3 es más infectivo ó patogénico que G_2 en esta investigación. No obstante lo anterior, al no tener aislados clasificados como G_1 en la zona muestreada, no se puede asegurar que G_3 es el más agresivo de los tres grupos observados hasta esta fecha.

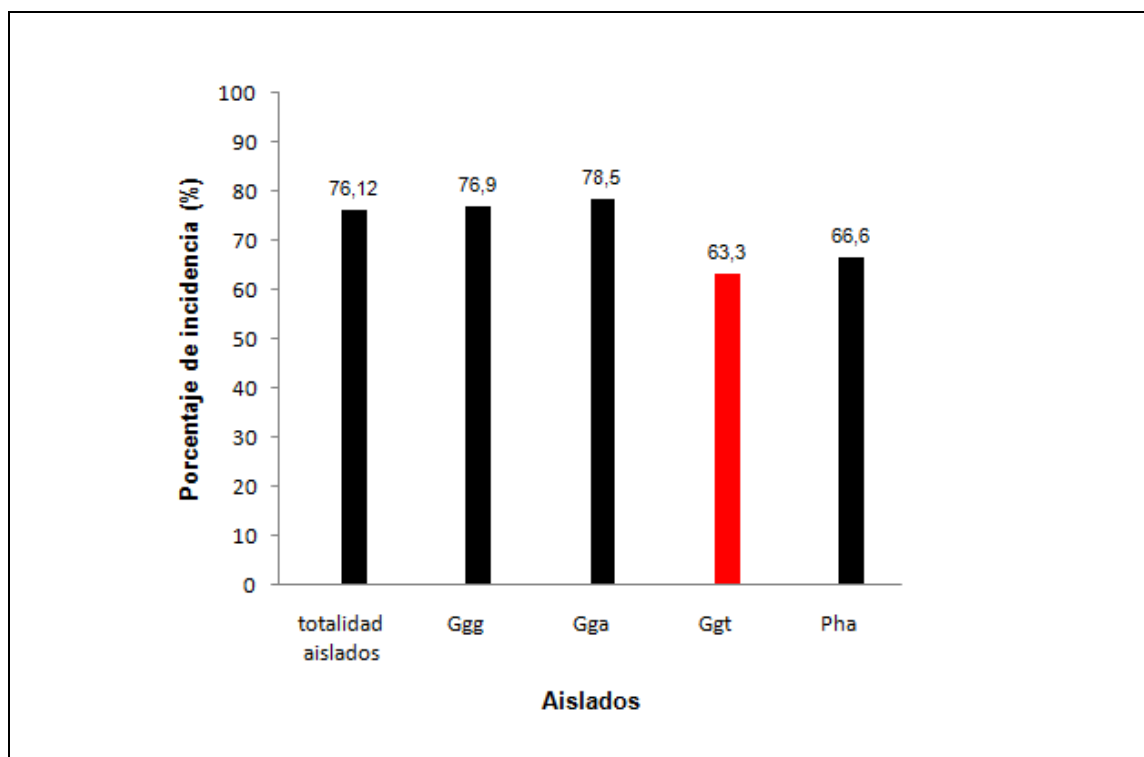


FIGURA 11 Porcentaje de incidencia (%) en plantas de trigo de 60 días cv. Otto-Baer inoculadas con 25 aislados *G.graminis* y cuatro *Phaeosphaeria* spp, seleccionados para las pruebas de patogenicidad. Ggg: 13 Posibles aislados *G.graminis* var. *graminis*; Gga: siete aislados *G.graminis* var. *avenae*, Ggt: cinco aislados *G.graminis* var. *tritici*; Pha: cuatro aislados *Phaeosphaeria* spp.

La Figura 11 demuestra los distintos niveles de incidencia que registraron las plantas de trigo en las pruebas de patogenicidad. Para la determinación de ésta, se marginó del cálculo a todas aquellas plantas que fueron asignadas con la categoría 1 en la escala visual de Hornby, correspondiente entre 0 y 5% de infección. Como puede observarse, un alto porcentaje de ellas presentó algún nivel de infección en los tejidos de la zona radical y del primer internudo. *Phaeosphaeria* sp, *G. graminis* var. *avenae*, *G.graminis* u otro de los posibles hongos involucrados presentaron algún daño de raíces en plantas de trigo, por lo cual debería seguir profundizándose en el impacto que estos tienen sobre el cultivo bajo condiciones de campo.

Según lo expresado por LEBRETON *et al.* (2004), DAVAL *et al.*(2009) y SADEGHI *et al.*(2012), *G.graminis* var. *tritici* es una especie que presenta poblaciones o grupos diferenciados intraespecíficos (G_1 y G_2), los cuales difieren en su nivel infectivo. En sus respectivos estudios, los autores coinciden en asegurar que aquellos aislados pertenecientes a G_2 desarrollan infecciones más severas que aquellos clasificados como G_1 . En relación a esto, LEBRETON *et al.* (2004), afirma que los aislados del grupo G_2 logran cerca del 38% de daño en las zonas analizadas de la planta, mientras que aquellos pertenecientes a G_1 sólo desarrollan 29,5% de infección sobre su hospedero. Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en esta investigación, ya que el grupo G_2 sólo promedió un 11% de daño en las plantas de trigo analizadas, mientras que el grupo G_1 estuvo ausente. Aquellos aislados que no amplificaron para ninguno de los dos grupos genéticos diferenciados conocidos fueron clasificados como grupo genético G_3 , los cuales promediaron los más altos niveles infectivos de la totalidad de aislados clasificados como *G.graminis* var. *tritici* (50%). Este resultado permite presumir la existencia de un tercer grupo genético hasta el momento desconocido para *G.graminis* var. *tritici*, el cual en este caso generó infecciones más agresivas que los clasificados como G_2 .

En relación a la distribución geográfica de los aislados, DAVAL *et al.* (2009) señala que ésta puede explicarse, entre otras, por las divergencias tanto alopátricas como simpátricas (aislaciones por presencia y ausencia de barreras geográficas, respectivamente) que hayan presentado estos grupos genéticos diferenciados y que puedan haber influido en su distribución en diferentes áreas. En complemento a lo anterior, LEBRETON *et al.*(2004) indica que la presencia de uno u otro grupo genético

puede estar inducida por prácticas como los monocultivos de trigo, donde en primeras siembras como en aquellas de más larga data el grupo genético G_2 es más recurrente, mientras que G_1 lo es en siembras intermedias. No obstante lo anterior, y a pesar de haber observado la presencia del grupo G_3 sólo en la región de Los Ríos y a G_2 tanto en Los Ríos como Los Lagos, no se puede atribuir esta distribución geográfica diferenciada a alguno de los fenómenos anteriormente mencionados, dado el bajo número de aislados que fueron analizados. Si en el futuro se quisiera desarrollar un estudio acerca de la distribución geográfica de grupos genéticos presentes en el agente infeccioso asociado a “mal del pie” en trigo, se deberían muestrear una mayor cantidad de campos con diferentes tipos de manejo, con el fin de obtener una mayor cantidad de aislados y asociar ciertas prácticas agronómicas a la distribución que se presente.

5 CONCLUSIONES

La presente investigación demostró la presencia de dos grupos genéticos para aislados de la especie *G.graminis* var. *tritici* obtenidos desde sementeras de trigo localizadas entre las regiones de La Araucanía y de Los Lagos en Chile. De la totalidad de aislados evaluados, se determinó que cinco de ellos pertenecían a la especie *G.graminis* var. *tritici*, de los cuales dos aislados pertenecían al grupo genético G₂ y los tres restantes pertenecían a un nuevo grupo genético que se denominó G₃. Se comprobó la ausencia del grupo G₁ en los aislados obtenidos desde los predios muestreados.

En relación a la especificidad de los partidores utilizados para la identificación de grupos genéticos, el partidor G2R/G2F (G₂) demostró ser más específico que G1R/G1F (G₁), ya que amplificó mayormente aislados que pertenecían a la especie *G.graminis* var. *tritici*, mientras que G1R/G1F pudo amplificar para otros aislados distintos a esta especie. No obstante lo anterior, este trabajo demuestra que la especificidad de estos partidores debería estar fuertemente correlacionada a una adecuada identificación de la especie del patógeno *G.graminis* var. *tritici*.

En cuanto a la patogenicidad basada en la severidad de las infecciones, se observaron claras diferencias entre los grupos genéticos, siendo aquellos identificados como G₂ menos agresivos que los clasificados como G₃. Los aislados G₂, correspondientes a P10G y C30L (localidades de Pichirropulli y Trumao respectivamente), presentaron niveles moderados de daño en sus hospederos. Aquellos clasificados como G₃, correspondientes a los aislados C40J, C40P y C39O (localidades de Putabla y Máfil, respectivamente), presentaron niveles de severidad que variaron entre moderados y altos.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADE, O. 1995. Seminario de Protección Vegetal, Temuco, Chile. 25 de Agosto 1995.
- ANDRADE, O., CAMPILLO, R. y CONTRERAS, E. 2001. Variaciones del contenido de Mn de dos suelos sometidos a esterilización y su efecto sobre la pudrición radical o “mal del pie” del trigo. *Agricultura Técnica (Chile)*. 61 (3): 339-351
- ANDRADE, O. 2002. Efectividad de diferentes desinfectantes de semilla sobre la pudrición radical (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) del trigo en el sur de Chile. INIA Carillanca. Temuco, Chile. 16 p
- ANDRADE, O. 2004. Efectividad de diferentes desinfectantes de semillas sobre la pudrición radical (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) del trigo en el sur de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)*. 64 (2): 111 – 126.
- ARISMENDI, N., ANDRADE, N., RIEGEL, R. y CARRILLO, R. 2010. Presence of a phytoplasma associated with witches'-Broom disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR, and DNA sequencing. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(1): 26-33.
- ASTORGA, M y ORTIZ, J. 2006. Variabilidad genética y estructura poblacional del Tunicado (*Pyura chilensis* Molina, 1782) en la costa de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 423-434. 2006.
- AUGER, J y ESTERIO, M. 2006. Implicancias de la variabilidad genética en el control de *Botrytis cinerea* en vides en Chile: Resistencia a fungicidas. Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile. Santiago, Chile. 8 p
- CARMONA, M. 2001. Guía práctica de enfermedades de trigo. Syngenta. 28 p.
- CARTER, D., TRAN-DINH, N., MARRA, R y VERA, R. 2004. The Development of genetic markers from fungal genome initiatives. *En: Arora, D., y Khachatourians, G. 2004. Applied Mycology and Biotechnology. Amsterdam.*

- Elsevier B.V. pp: 1-28 (Online).
 <<http://books.google.cl/books?id=2nVkpDS5LEUC&pg=PR4&lpg=PP1&dq=applied+mycology+and+biotechnology&hl=es#v=onepage&q&f=false>> (22 Enero, 2013)
- CHILE, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLITICAS AGRARIAS, ODEPA (2011).
- COOK, R. 2003. Review Take-all of wheat. Washington State University. Pullman. Estados Unidos. 14p.
- DAVAL, S., LEBRETON, L., GAZENGEL, A., GUILLERM-ERCKELBOUDT, Y. y SARNIGUET, A. 2009. Genetic evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* into two major groups. INRA Universidad Rennes. Le Rheu , Francia. 14 p.
- EDEL, V. 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. *En*: Bridge, P. D., Arora, D.K., Reddy, C.A. y Elander, R.P. 1998. Applications of PCR in Mycology. Reino Unido. University Press, Cambridge. pp: 1-20. (Online).
 <<http://books.google.cl/books?id=iJL0AZvHwzcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>> (22 Enero, 2013).
- ESPINOZA, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *En*: Aguirre, X., Eguiarte, L. y Souza, V. 2007. México, D.F. Instituto Nacional de Ecología. pp: 517 – 539.
- FIGUEROA, O., DELGADO, Y., PEÑA, E., LEON, R., ELIAS, R. 2006. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Matanzas, Cuba. 30 p.
- FOULY, H. M., y WILKINSON, H. T. 2000. Detection of *Gaeumannomyces graminis* varieties using polymerase chain reaction with variety-specific primers. *Plant Disease*. 84:947-951.
- FREEMAN, J y WARD, E. 2004. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology*. 5 (4): 235 – 252.
- GALDAMES, R y FRANCE, A. 1996. Enfermedades en las praderas. *En*: Ruiz, I. 1996. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chile. pp: 268- 285

- KLICH, M y MULLANEY, E. 2004. Molecular Methods for Identification of Plant Pathogenic Fungi. *In*: Arora, D. 2004. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. pp: 81-92. (Online). <http://books.google.cl/books?id=TO5O0eBfFUQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> (20 Enero, 2013)
- GIRAUD, T., FORTINI, D., LEVIS, C., LEMARQUE, P., LEROUX, P., LOBUGLIO, K. y BRYGOO, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967- 973
- HAAS, D y DÉFAGO, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* (Alemania). 13 p.
- HORNBY, D. 1998. Take-all disease of cereals: a regional perspective. CAB international, Wallingford, Reino Unido. 384 p
- LATORRE, B. 1988. Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Segunda edición. Santiago, Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. pp: 37-55
- LEBRETON, L., LUCAS, P., DUGAS, F., GUILLERM, AY., SCHOENY, A. y SARGUINET, A. (2004). Changes in population structure of the soilborne fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* during continuous wheat cropping. *Environmental Microbiology* 6: 1174-1185
- LITTLE T. y JACKSON HILL, F. 1978. Agricultural Experimentation. Design and analysis . 1era edición. John Wiley and Sons editores. 350 pp.
- MADARIADA, R. 2001. Manejo Integrado de Enfermedades del trigo. Tierra Adentro (Chile). 37: 37-39.
- MADARIAGA, R. y LATORRE, B. 2004. Revisión de las enfermedades del trigo. Santiago, Chile. 25 p
- MATHRE, D.E. 2000. Take-all Disease on Wheat, Barley, and Oats. (On line). Plant HealthProgress.<<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/take-all/>> (20 Mayo, 2013)

- MAZZOLA, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:35–59
- MacNISH, G. 1994. Take-all disease of cereals. Department of Agriculture Western Australia. 6 p.
- McDONALD, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology (USA)* 87:448-453.
- McPHERSON, M. y MOLLER, S. 2006. PCR. 2°. USA. Taylor & Francis Group. 278 p. (Online). <http://books.google.cl/books?id=NSSFjn2SuUC&printsec=frontcover&dq=PCR&hl=es&sa=X&ei=u2__UPT8M4Tc8ASfioHQBw&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=PCR&f=false> (24 Enero, 2013).
- MELLADO, M. 1998. Análisis del cultivo del trigo en Chile durante el siglo veinte. *Agricultura Técnica* 58:230-240.
- MELLADO, M. 2007. El trigo en Chile. Cultura, Ciencia y Tecnología. Colección de libros INIA. Chile. 684 p.
- MÉXICO, SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN, SAGARPA (2007).
- NASRAOUI, B., HAJLAOUI, M., GARGOURI, S., KREMER, R. 2007. Biological control of wheat Take-all disease: II – Rapid screening for selection of bacteria suppressive to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in laboratory with greenhouse and field confirmation trials. *Tunisian Journal of Plant Protection.* 2: 35-46.
- RACHDAWONG, S., CRAMER, C.L., GRABAU, E.A., STROMBERG, V.K., LACY, G. H., y STROMBERG, E. L. 2002. *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*, *graminis*, and *tritici* identified using PCR amplification of avenacinase-like genes. *Plant Dis.* 86:652-600.
- SADEGHI L, ALIZADEH A, SAFAIE N, JAMALI SH (2012) Genetic Diversity of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Populations Using RAPD and ERIC Markers. *J Plant Pathol Microb* 3:143.
- SANTIBAÑEZ, P. 2012. Boletín Agroclimático Regional (Chile) 14 p.

THOMAS, S. 2004. The development and utilization of assays to characterize populations of *Gaeumannomyces graminis*. Tesis de Doctorado, Ohio State University. Ohio. 219 p.

URUGUAY, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA, INIA LA ESTANZUELA (2004).

7 ANEXOS

ANEXO 1 Método CTAB de extracción de ADN para amplificación y análisis de secuencias utilizado por ARISMENDI *et al.*(2010).

1. Colocar el micelio en buffer TE pH 8.0.
2. Al iniciar la extracción, eliminar el buffer TE centrifugando a 5000-6000 xg por 5 min.
3. Agregar 500 μ L de buffer de extracción (CTAB 2% + β -mercaptoetanol 0.2%***) precalentado a 65°C. Incubar por 30 min a 60°C.
4. Agregar 500 μ L de cloroformo-octanol (24:1) previamente enfriado a -20°C. Mezclar por inversión.
5. Centrifugar 5.000xg por 10 min a 4°C.
6. Rescatar en un tubo de 1,5 mL (estéril) la fase acuosa superior y agregar un volumen igual a lo rescatado (400-350 μ L) de cloroformo-octanol (24:1).
7. Centrifugar 5.000xg por 5 min a 4°C.
8. Rescatar de nuevo el sobrenadante (300 μ L aprox.). Agregar la mitad del volumen extraído (150 μ L) de acetato de amonio 7,5 M y además, agregar 70% (220 μ L aprox.) del volumen total de isopropanol frío (-20°C). Mezclar por inversión y dejar precipitar a -20°C por 30 a 60 min.
9. Centrifugar 13.000xg por 20 min a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de ADN con 200 μ L de etanol 70% frío (-20°C). Centrifugar 11000 xg por 5 min a temperatura ambiente.
11. Repetir el paso 8 y 9 si el pellet se observa muy sucio. El pellet debiera estar blanquecino para considerarlo limpio.
12. Eliminar el etanol y secar el pellet a temperatura ambiente con los tubos abiertos hacia arriba durante 30-40 min.
13. Resuspender el pellet de ADN 25, 50 ó 100 μ L de buffer TE pH 8.0 y conservar -20 a -80°C. Se recomienda utilizar alícuotas o diluciones para reacciones de PCR. Cuantificar si fuera necesario.

Soluciones:**Preparación de CTAB 2%**

CTAB 2%	100 ml	
Tris-HCl 1 M pH 8,0	0,1 M	10 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	10 mM	2 ml
NaCl 5 M	1,4 M	28 ml
H ₂ O bidestilada estéril		
CTAB	2 % p/v	2 g
** b-mercaptoetanol	0,2%	200 µl

Realizar con H₂O bidestilada estéril. ** Al momento realizar la extracción, agregue el β-mercaptoetanol para tener una concentración final de 0,2%. Guarde a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1M pH 8,0 **100 ml**

Tris base	12,1 g
H ₂ O grado biología molecular	80 ml

Ajuste el pH con HCl. Afore a 100 ml con agua bidestilada y autoclave la solución. Guarde a temperatura ambiente.

EDTA 0,5M pH 8,0 **100 ml**

EDTA-Na ₂	18,61 g
H ₂ O grado biología molecular	50 ml

Ajuste el pH con NaOH. Afore a 100 ml con agua bidestilada y autoclave la solución. Guarde a temperatura ambiente.

Etanol 70% 100 mL

Etanol absoluto 70 ml

H₂O bidestilada estéril 30 ml

con H₂O bidestilada estéril. Guarde a -20°C.

Cloroformo : octonaol (24:1) 125 mL

Cloroformo 120 ml

Octanol 5 ml

Agregue los reactivos a una botella ámbar y guarde a temperatura ambiente.

Buffer TE 1X 100 ml

Tris-HCl 1 M pH 8,0 10 mM 1 ml

EDTA 0,5 M pH 8,0 1 mM 0,2 ml

Enrase con H₂O bidestilada estéril y autoclave la solución. Guarde a 4°C.

ANEXO 2 Protocolo de preparación de inóculo de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (ANDRADE, 2011)¹.

1. Llenar matraces de 1 Lt a $\frac{3}{4}$ de capacidad con granos de avena enteros.
2. Lavar con agua caliente 3 veces consecutivas, agitando vigorosamente los matraces para eliminar contaminantes.
3. Lavar 2 veces consecutivas con agua destilada.
4. Llenar con agua destilada los matraces, cubriendo los granos y mantener por 8 horas.
5. Escurrir agua de los matraces y tapar con algodón.
6. Esterilizar por 15-20 minutos (sin exceder este tiempo), retirando del autoclave a la mayor brevedad.
7. Esterilizar por segunda vez después de 24 horas.
8. Inocular los granos estériles con trozos de agar + Ggt (utilizar idealmente tubos de vidrio estériles, empleados como sacabocados, para inocular por los bordes y al centro de los granos sin extraer totalmente el tapón de algodón).
9. Incubar a temperatura ambiente por 40 días.
10. Una vez colonizados la totalidad de los granos (micelio con coloración oscura), colocarlos sobre una bandeja limpia, y secarlos por 72-96 horas bajo campana de flujo laminar.
11. Una vez secos, molerlos en licuadora industrial o similar por 20-30 segundos cada vez (sin dejar que la temperatura aumente por acción de las cuchillas, lo cual daña el inóculo), eliminando la harinilla y otros con tamices y dejando solamente las paleas y lemas.
12. Continuar la molienda y tamizado, para obtener partículas de paleas y lemas de 0,5-1 mm , las cuales corresponderán al inóculo.
13. Guardar en matraz seco y limpio, con tapón a 4-5°C hasta su empleo
14. El inóculo así preparado y seco puede mantenerse más de 1 año en refrigerador.

Como inóculo puede igualmente emplearse el grano de avena colonizado y entero. Sin embargo, debe ajustarse muy bien la dosificación para evitar la muerte temprana de las plantas.

En trabajos con suelo, especialmente si está estéril, se emplea inóculo molido en proporción 0,1% p/p. En suelo sin esterilizar puede emplear 0,5% p/p.

¹ No corresponde a una investigación publicada.

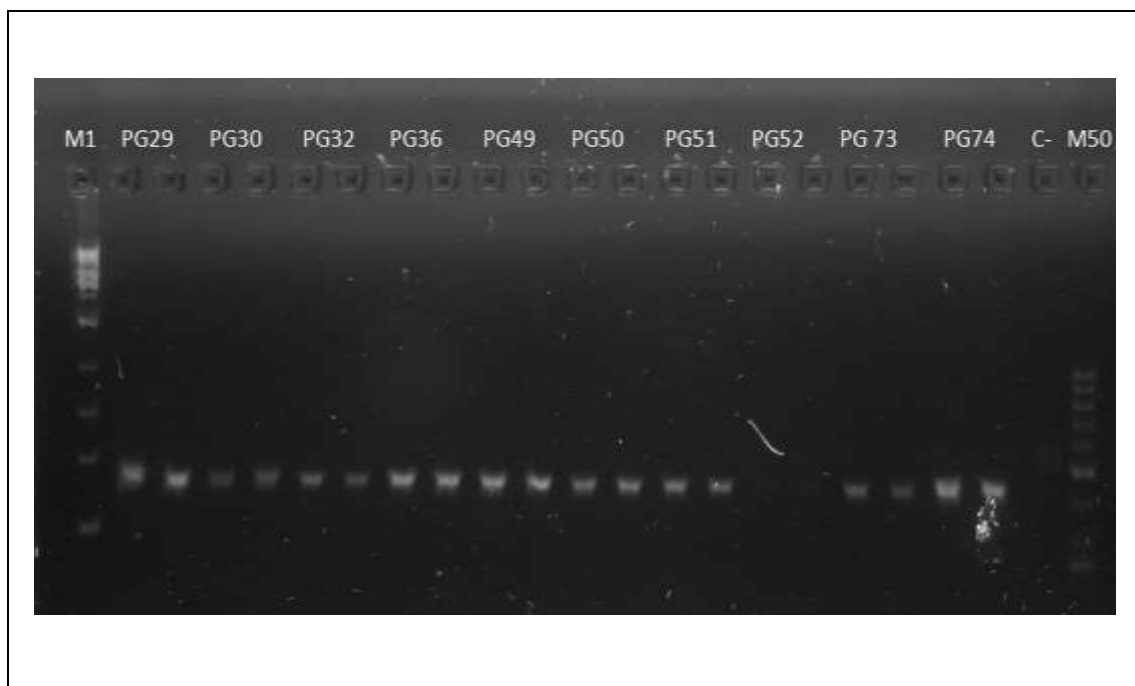
ANEXO 3 Escala visual de necrosis radicular de HORNBY (1998)

Categorías	Porcentaje de ennegrecimiento
1	0 - 5
2	5 - 10
3	10 - 20
4	20 - 30
5	30 - 40
6	40 - 50
7	50 - 60
8	60 - 70
9	70 - 80
10	80 - 90
11	90 - 100

FUENTE: HORNBY (1998)

En el Anexo 3 se especifican las 11 diferentes categorías que componen a la escala de Hornby para determinar la severidad de la infección. Cada una de estas clases es atribuida a un porcentaje de ennegrecimiento de la zona radicular que es observado en las plantas de trigo.

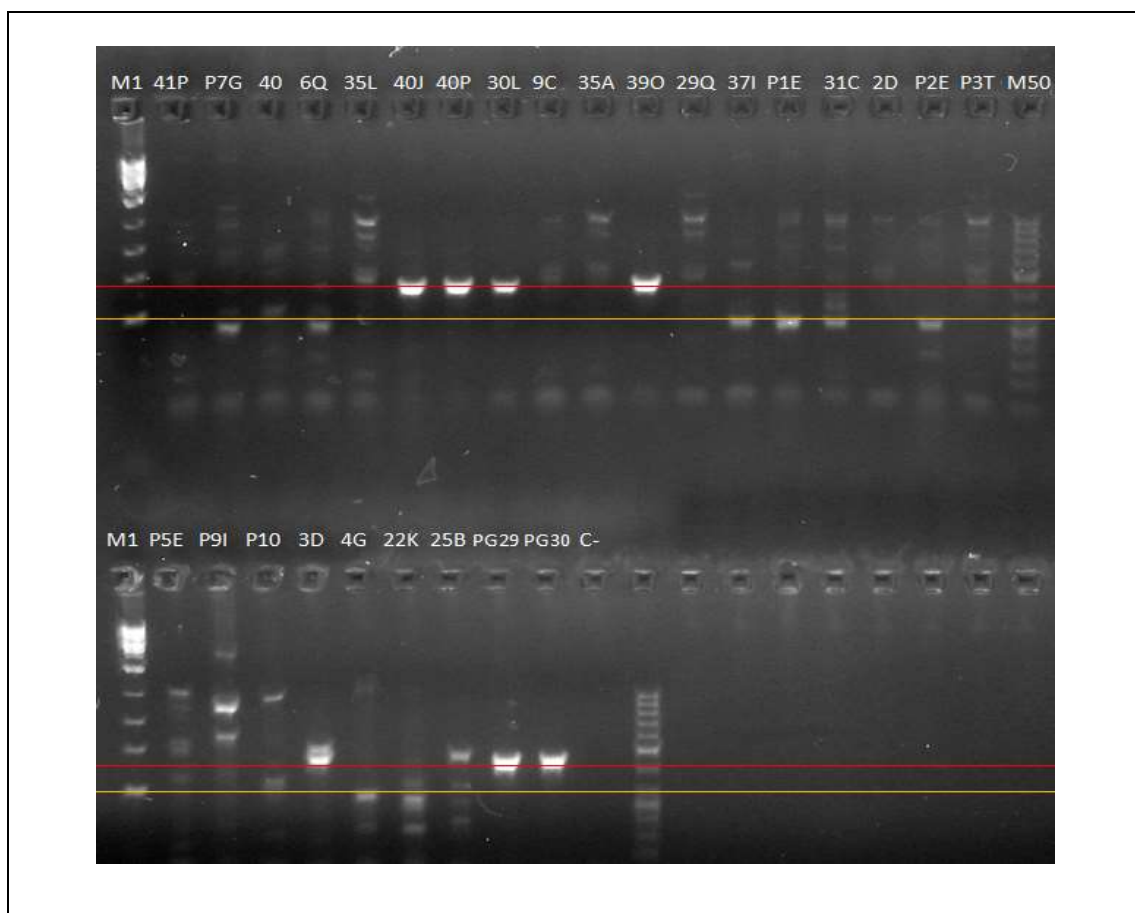
ANEXO 4 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de diez aislados de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (DAVAL *et al.* 2009), para comprobar especificidad de partidores GGT-RP/NS5 (FOULY y WILKINSON, 2000). Control negativo (C-) corresponde a Mix PCR sin ADN. M1: Marcador de peso molecular (1 kb). M50: Marcador de peso molecular (50 kb)



FUENTE: ARISMENDI (2013)¹

¹ No corresponde a una investigación publicada

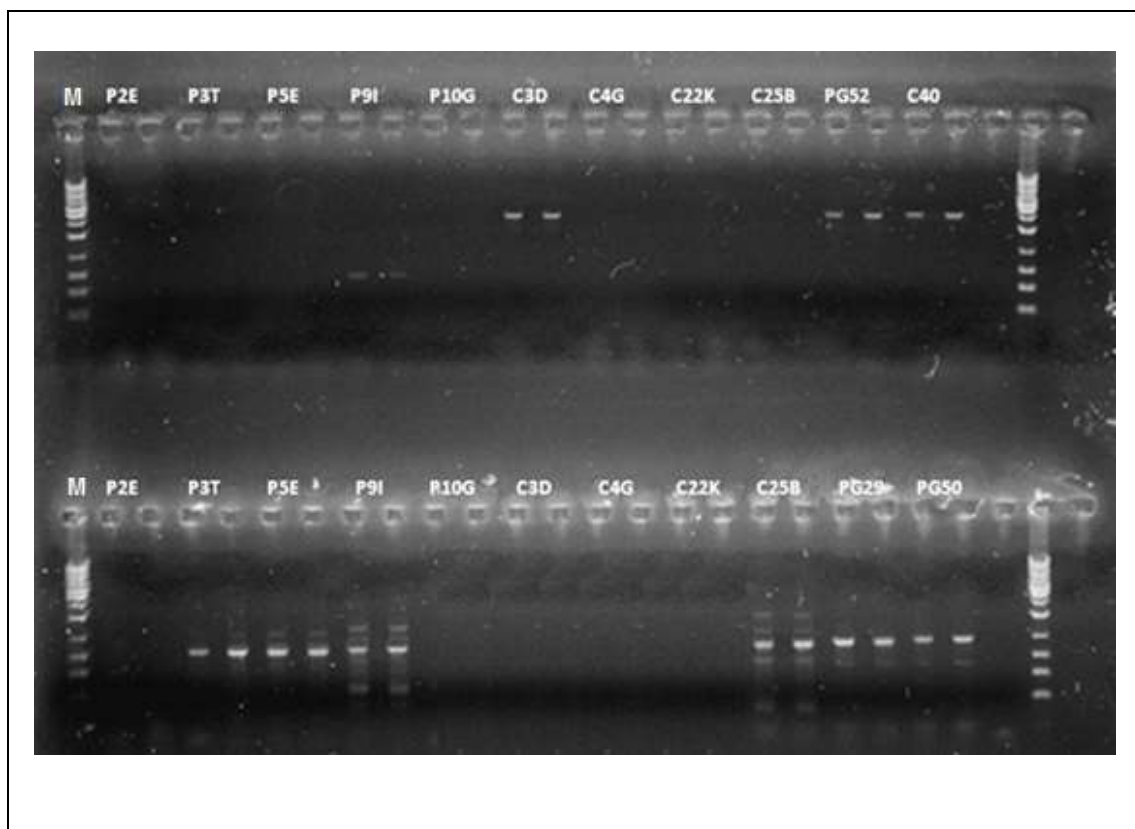
ANEXO 5 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de 25 aislados seleccionados de *Gaeumannomyces graminis*, utilizando los partidores GGT-RP/NS5 (FOULY y WILKINSON, 2000). Aislados PG29 y PG30 corresponden a controles positivos de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* desde Francia. Control negativo (C-) corresponde a Mix PCR sin ADN. M1: marcador de peso molecular (1 kb). M50: marcador de peso molecular (50 kb). Líneas rojas y amarillas identifican 410 pb y 300 pb, asociadas a var. *tritici* y var. *avenae*, respectivamente.



FUENTE: ARISMENDI (2013)¹

¹ No corresponde a una investigación publicada

ANEXO 6 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de aislados seleccionados de *Gaeumannomyces graminis* para comprobar especificidad de partidores G1R/G1F (parte inferior del gel) y G2R/G2F (parte superior) para la identificación de grupos genéticos G_1 y G_2 respectivamente. Aislado PG52 (Australia) utilizado como control positivo para G_2 , PG29 y PG50 (Francia y Australia) utilizados como control positivo para G_1 .



ANEXO 7 Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN amplificado por PCR de aislados seleccionados de *Gaeumannomyces graminis*, para comprobar especificidad de partidores G2R/G2F (1900 pb) para identificar grupos genéticos G₂.

