

Informe final publicable de proyecto

Herramientas para el diagnóstico, estudio y manejo de la estría bacteriana de trigo causada por *Xanthomonas translucens*

Código de proyecto ANII: FCE_1_2017_1_135561

29/03/2022

SIRI TOMÁS, María Inés (Responsable Técnico - Científico)

CROCE PAULLIER, Valentina (Investigador)

CASTRO DERÉNYI, Marina (Investigador)

DENIS CALICIOTTI, Nicol Florencia (Investigador)

GONZÁLEZ PARODI, Silvana Noemi (Investigador)

LAPAZ EUGUI, María Inés (Investigador)

PEREYRA CORREA, Silvia Antonia (Co-Responsable Técnico-Científico)

PIANZZOLA ALVAREZ, María Julia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\
ORGANIZACIONES SIN FINES DE LUCRO. MESA NACIONAL DEL TRIGO \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Las bacteriosis en cultivos de trigo constituyen una problemática que ha incrementado significativamente su relevancia en la última década y sobre la cual existen escasos antecedentes de investigación a nivel nacional. El objetivo de este proyecto fue generar conocimiento sobre esta problemática en Uruguay. Para ello, se realizó un relevamiento de chacras (2017-2019) y se obtuvo una colección de cepas de *Xanthomonas* spp., que fueron caracterizadas y asignadas a dos especies diferentes: i) *X. translucens* pv. *undulosa* (Xtu), patovar asociado a estría bacteriana de trigo, y ii) *Xanthomonas prunicola* (Xp), especie que sólo se ha reportado como patógena de durazno pelón en España. Se verificó la patogenicidad en trigo de ambas especies, aunque con sintomatologías diferentes: Xtu generó síntomas de necrosis marrón característicos de estría bacteriana, mientras que Xp produjo síntomas de necrosis seca, que también fueron observados con frecuencia en chacras de producción. También se desarrollaron métodos moleculares de detección por PCR cuantitativa (qPCR). Estos métodos serán utilizados para cuantificar a ambos patógenos en plantas y lotes de semilla y profundizar en futuros estudios epidemiológicos. Por último, se optimizaron e implementaron metodologías de screening de resistencia a ambas especies bajo condiciones controladas y a campo, generando información sobre la resistencia disponible en cultivares y líneas del programa de mejoramiento. En suma, los resultados obtenidos revelan que las principales bacteriosis que afectan los cultivos de trigo en Uruguay son la estría bacteriana asociada a Xtu y una nueva patología de trigo causada por Xp no reportada previamente y sobre la cuál es necesario seguir profundizando. La ejecución de este proyecto permitió generar conocimiento original sobre un tema relevante para el sector productivo nacional. Se consolidó una nueva línea de investigación interdisciplinaria e interinstitucional, generando capacidades que contribuirán a la implementación de estrategias eficientes de manejo de estas enfermedades.

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agronomía, reproducción y protección de plantas / Fitopatología

Palabras clave: bacteriosis / *Xanthomonas translucens* / trigo /

Introducción

El trigo es el cultivo de invierno de mayor importancia en Uruguay. Se han sembrado en promedio 342.000 hectáreas en los últimos nueve años, con una producción promedio de 1055 toneladas anuales (MGAP-DIEA 2019). Las características agroecológicas de producción de trigo en nuestro país determinan que las enfermedades sean uno de los factores limitantes más importantes para el logro de rendimientos y calidad adecuados y estables a través de los años, así como una de las causas principales de retiro de cultivares de la producción. A su vez, las transformaciones ocurridas en los últimos años en los sistemas de producción como la utilización generalizada de la siembra directa, la creciente intensificación en la agricultura incluyendo una menor diversificación en las secuencias de los cultivos, incremento en el área de algunos cultivos y cultivares, incremento en el uso de agroquímicos y escasa diversidad de los cultivares sembrados, han inducido cambios en la dinámica de las poblaciones de patógenos y sus problemáticas asociadas (Pereyra et al. 2011).

Las enfermedades de origen fúngico, tales como manchas foliares causadas por hongos de los géneros *Drechslera* y *Zymoseptoria*, oidio, royas y fusariosis de la espiga, han sido factores principales que afectan la producción de trigo (Pereyra 2013). En los últimos 20 años se ha generado información nacional relacionada a la epidemiología de estos patógenos contribuyendo al manejo de estas enfermedades. A nivel de producción, existe una mayor disponibilidad de cultivares con resistencia a algunas de estas enfermedades y se adoptó en forma generalizada el uso de fungicidas para lograr un control eficiente de las mismas. Ambos factores, entre otros, han contribuido a que las hojas de los cultivos puedan permanecer sanas y así puedan ser colonizadas por otros microorganismos (Pereyra 2013).

A pesar de que las bacteriosis de trigo han sido consideradas de relevancia secundaria en comparación con enfermedades fúngicas, en las últimas décadas se han reportado un incremento considerable en su prevalencia e incidencia (Duveiller et al. 1997). Entre las enfermedades bacterianas que afectan cultivos de trigo, solo la estría bacteriana genera pérdidas significativas, y es la problemática que se propuso abordar en este proyecto.

Esta enfermedad ha ocupado un papel secundario frente a otras enfermedades causadas por hongos, de mayor impacto económico. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento progresivo en la incidencia de bacteriosis en trigo, que podría atribuirse a múltiples factores incluyendo: el uso sistemático de fungicidas que disminuyen la población de hongos a nivel de la superficie de la hoja contribuyendo a la colonización por bacterias, la ocurrencia frecuente de

condiciones ambientales favorables para la infección y desarrollo, y la falta de priorización de estas enfermedades en programas de mejoramiento, lo que ha llevado al uso generalizado de cultivares susceptibles a enfermedades bacterianas.

Esta enfermedad tiene una distribución global, afectando cultivos en África, América del Sur y del Norte, Asia y Europa del Este (Sands and Fourrest 1989; Murray and Brennan 2009; Duveiller et al. 1997; Khojasteh et al. 2019; Egorova et al. 2014; Raja et al. 2010; Kandel et al. 2012). Su prevalencia ha aumentado recientemente a nivel mundial (Kandel et al. 2012; Adhikari et al. 2011; Curland et al. 2018; Khojasteh et al. 2019). Se tiene poca información del impacto de esta enfermedad en el rendimiento y calidad de grano. Generalmente, las pérdidas en rendimiento de los cultivos rondan el 10% y ha llegado hasta un 40% en los brotes más severos (Forster and Schaad, 1988, Duveiller et al. 1997). La pérdida de rendimiento es una función lineal del porcentaje de área de hoja bandera afectada, probablemente debido al efecto de la reducción del área fotosintéticamente activa y su implicancia en el llenado del grano (Duveiller and Maraitte, 1993). Debido a la ocurrencia esporádica de esta enfermedad la investigación en la epidemiología y métodos de control, así como la obtención de cultivares con resistencia se han visto dificultados.

La estría bacteriana es causada por bacterias de la especie *Xanthomonas translucens* (Jones et al. 1917; Vauterin et al. 1995). Existen diez patovares actualmente reportados para esta especie. Entre ellos, *X. translucens* pv. *cerealis*, *X. translucens* pv. *secalis*, *X. translucens* pv. *translucens* y *X. translucens* pv. *undulosa* causan BLS en distintos cereales (Curland et al. 2018; Sapkota et al. 2020). *X. translucens* pv. *undulosa* y *X. translucens* pv. *translucens* son considerados económicamente relevantes a nivel internacional, siendo *X. translucens* pv. *undulosa* el patovar más comúnmente asociado a BLS en diferentes regiones productoras de trigo (Khojasteh et al. 2019; Curland et al. 2018; Bragard et al. 1997). Este patógeno fue reportado por primera vez en Uruguay en 1986 (Frommel 1986).

La enfermedad se presenta con síntomas característicos en hojas (estría bacteriana) y en espigas (gluma negra). Los síntomas en hoja pueden comenzar tempranamente si se dan condiciones de agua libre sobre la superficie foliar y temperaturas superiores a 20°C. Sin embargo, los síntomas se hacen notorios generalmente entorno a la espigazón. Los primeros síntomas se manifiestan como lesiones pequeñas, húmedas que luego se alargan y adquieren la forma estrías lineales, acuosas, de color marrón oscuro que se extienden pudiendo abarcar toda la hoja. En condiciones de alta humedad puede verse un exudado bacteriano como pequeñas gotas en la superficie de la lesión formando posteriormente estrías. Los síntomas se presentan en hojas superiores, lo que los distinguen de los síntomas causados por hongos que progresan de la base de la planta hacia las hojas superiores. En la espiga se produce decoloración basal de la gluma y amarronamiento de la parte superior de las mismas y aristas (Pereyra et al., 2005). El síntoma en espiga se puede confundir con melanismo producido por estrés abiótico de origen fisiológico, que se presenta en materiales derivados de ciertos genotipos de trigo.

La semilla constituye la fuente primaria de inóculo de este patógeno, siendo responsable de la transmisión de la enfermedad a gran escala (Duveiller and Bragard, 2017). La bacteria se localiza en las cubiertas externas de la semilla y dependiendo de las condiciones de almacenamiento puede sobrevivir hasta 3 años o más (Forster and Schaad, 1990). Se ha establecido que la tasa de transmisión a partir de semilla es relativamente baja, sin embargo, puede ser suficiente para desencadenar brotes importantes a nivel de campo bajo condiciones ambientales favorables (Schaad, 1988).

La ocurrencia de brotes aumenta en condiciones de alta humedad, lo que favorece la liberación de exudados de tejidos infectados y dispersión del patógeno a otras plantas a través de viento, lluvia, riego, insectos, etc. La temperatura es otro factor ambiental que tiene una influencia importante en la epidemiología de este patógeno (Duveiller and Maraitte 1995). Los síntomas se evidencian cuando la temperatura es lo suficientemente alta como para favorecer la multiplicación de la bacteria dentro de los tejidos del hospedero hasta alcanzar concentraciones mayores a 108 ufc/g de hoja. Las bajas temperaturas retardan la multiplicación de la bacteria y el desarrollo de la enfermedad (Duveiller et al. 1997).

El control de las enfermedades bacterianas que afectan a los cultivos es complejo y generalmente requiere una estrategia de manejo integrado que combine diferentes medidas preventivas y culturales en combinación con la resistencia genética del hospedero. En el caso de la estría bacteriana de trigo, es fundamental descartar la semilla infectada como fuente de inóculo primaria. La diseminación a gran escala de *X. translucens* a través de semilla ha llevado al establecimiento de restricciones cuarentenarias en varios países, principalmente en las regiones donde el patógeno aún no se encuentra establecido (EPPO A2 list, 2016).

Existen varios protocolos para testear la presencia del patógeno en semilla, incluyendo métodos tradicionales basados en el aislamiento de la bacteria en medios selectivos, ensayos de inoculación sobre plantas hospederas, ensayos bioquímicos y serológicos (Duveiller and Bragard, 2017). Sin embargo, estas metodologías presentan desventajas para ser aplicadas como métodos de rutina porque son laboriosas, requieren varios días de incubación, o presentan limitaciones en cuanto a su especificidad para realizar un diagnóstico a nivel de patovar. En los últimos años se ha incrementado significativamente la cantidad de información genómica disponible, lo que representa un insumo muy valioso para el

desarrollo de nuevos métodos de detección confiables y con una mayor resolución a nivel taxonómico.

El uso de cultivares con cierto grado de resistencia es la mejor medida para reducir las pérdidas causadas por esta enfermedad, ya que reduce el riesgo de ocurrencia de brotes y la severidad de los mismos. A nivel mundial se han identificado fuentes con resistencia incompleta a *X. translucens* tales como los cultivares Mochis, Pavón, Angostura y Turaco y cinco genes asociados con esta resistencia (BlS1–BlS5) (Duveiller et al. 1993). Se ha postulado que la resistencia a la estría bacteriana en trigo está gobernada por múltiples genes y es de herencia cuantitativa (Duveiller et al. 1993; Tillman et al. 1996; Kandel et al. 2012). En los últimos años se han realizado screenings de resistencia en diversos genotipos de trigo lo que ha permitido identificar nuevas fuentes de resistencia a estría bacteriana (Adikahari et al. 2011; Kandel et al. 2012). Se

observó una respuesta diferencial frente a la inoculación con diferentes cepas de *X. translucens* pv. *undulosa*, lo que resalta la importancia de realizar evaluaciones frente al tipo de cepa predominante en una región dada, o utilizando varias cepas representativas de la diversidad existente a nivel del patógeno (Adikahari et al. 2011). En Uruguay, se ha comenzado la caracterización de algunos cultivares por su comportamiento frente a la estría bacteriana, en base a la información colectada en ensayos y colecciones donde han existido infecciones uniformes, naturales de esta enfermedad. En los pocos materiales caracterizados hasta el momento se puede ver variabilidad en el comportamiento frente a esta enfermedad (Pereyra, 2013).

Este Proyecto se enmarcó en una colaboración iniciada entre investigadoras del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química-UdelaR y de la estación experimental La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. La integración de ambos grupos de investigación permitió complementar diferentes capacidades y enfocarlas al estudio de las problemáticas sanitarias de origen bacteriano en cultivos extensivos, específicamente en trigo.

Existen escasos antecedentes de investigación fundamental sobre la estría bacteriana de trigo en nuestro país y se desconoce el tipo de patógenos presentes. El desafío de manejar nuevas problemáticas sanitarias implica contar con información relacionada a la biología de las distintas enfermedades para poder desarrollar e implementar medidas de control para su manejo. Este Proyecto apuntó a generar conocimiento fundamental sobre esta enfermedad en nuestro país. Se realizó un relevamiento de chacras de trigo en diferentes localidades y zafras de producción, a partir del cual se colectaron muestras de hojas con síntomas de bacteriosis. Este relevamiento permitió generar una colección de aislados de *Xanthomonas* spp. patógenas de trigo, que fue caracterizada mediante métodos moleculares, análisis genómicos y ensayos de patogenicidad en trigo y otros hospederos. Por otro lado, en el marco de este proyecto se propuso generar herramientas que permitan avanzar en las dos principales medidas de manejo de esta enfermedad: el desarrollo de métodos moleculares de diagnóstico y la optimización de metodologías de screening para la identificación de fuentes de resistencia a partir del germoplasma de trigo disponible. El alcance de este proyecto es de relevancia para los productores de trigo ya que podría proveer herramientas para una caracterización adecuada de las variedades disponibles a nivel de la producción, así como para los programas de mejoramiento para identificar fuentes de resistencia efectivas y contar con condiciones uniformes para la selección de líneas resistentes.

Metodología/diseño del estudio

Se describen a continuación las actividades y metodología utilizada para abordar los objetivos específicos desarrollados en el proyecto.

Objetivo específico 1: Evaluar la incidencia de estría bacteriana en cultivos de trigo de Uruguay.

En las zafras 2018-2019 se muestrearon 61 chacras comerciales para la caracterización de las poblaciones de *Xanthomonas* presentes en trigo en Uruguay (OE-2). De estas se estimó el dato parcial de prevalencia de estría bacteriana (porcentaje de chacras con síntoma y presencia de *Xanthomonas* confirmadas en laboratorio). Adicionalmente, en 2020 se relevaron 220 chacras con monitoreo principal en severidad de royas y adjunto en manchas foliares fúngicas y bacterianas. Con el objetivo de contar con información que estime el daño de estría bacteriana en cultivares susceptibles, se realizaron estimaciones a partir de los experimentos de campo del OE-4.

Objetivo específico 2: Caracterización de las poblaciones de *Xanthomonas* que afectan los cultivos de trigo en Uruguay.

Relevamiento de chacras de trigo y aislamiento de cepas.

Se realizó el relevamiento de 61 predios, incluyendo 4 chacras muestreadas en 2017, previo al inicio del proyecto; 30 en 2018 y 27 en 2019. Los muestreos se realizaron en octubre-noviembre y abarcaron los departamentos de San José,

Colonia, Soriano, Río Negro, Paysandú y Flores (Figura 1).

Se tomaron muestras de hojas con síntomas de bacteriosis, siguiendo un patrón circular dentro de cada chacra, manteniendo aproximadamente 20 metros entre cada punto. En el muestreo se abarcaron 15 cultivares de trigo utilizados por productores en la región.

Se seleccionaron muestras representativas de cada chacra y se realizaron los aislamientos a partir de la zona de avance de la lesión en medio Wilbrink (WBA). Se reaislaron colonias con apariencia típica de *Xanthomonas* para obtener cultivos puros (Figura 2). Las cepas aisladas se conservaron con glicerol 10% a -70°C .

Identificación primaria de los aislamientos.

En una primera instancia se utilizó el par de primers T1/T2, específicos para la especie *X. translucens* (Maes et al. 1996). Las amplificaciones se realizaron por qPCR, con Power SYBR™ Green PCR Master Mix. Se realizó una curva de temperatura de melting para cada reacción al final de cada programa de amplificación.

Se amplificó y secuenció el gen ARNr 16S para confirmar la identidad de las cepas que dieron resultados negativos o dudosos por qPCR. Las amplificaciones se realizaron con los primers universales 27F/1492R y los productos de amplificación se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas con software Geneious Pro4.8.5 (Biomatters-Nueva Zelanda), y se compararon con secuencias disponibles en la base de datos GenBank usando la herramienta BLAST.

Identificación y tipificación de las cepas mediante MLSA-MLST

Se utilizó un esquema MLSA/MLST basado en las secuencias parciales de *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* y *rpoD* utilizado previamente en la especie *X. translucens* (Curland et al. 2018; Khojasteh et al. 2019). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas, concatenadas y alineadas con el software Geneious Pro4.8.5. También se incluyeron en el análisis secuencias de cepas de referencia para determinar la posición filogenética de las cepas uruguayas. Los árboles filogenéticos se reconstruyeron en MEGAX 10.1.0. aplicando el método Maximum-Likelihood con un Bootstrap de 1000 réplicas. Las cepas identificadas como *X. translucens* fueron tipificadas por MLST. Se asignó un número de alelo a cada secuencia única por locus y el secuenciotipo (ST) de cada cepa se definió como la combinación de estos números de alelos.

Para las cepas identificadas como *Xanthomonas* spp. (no *translucens*), no se logró amplificar el gen *fyuA* por lo que se realizó un análisis separado con los otros tres genes. Para determinar su posición filogenética, se incluyeron secuencias de todas las especies de *Xanthomonas* actualmente reportadas.

Ensayos de patogenicidad

En base al análisis MLSA/MLST realizado se seleccionaron 40 cepas representativas de la colección para ensayos de patogenicidad bajo condiciones controladas. Las cepas conservadas a -70°C se plaquearon en WBA y se incubaron por 72h a 28°C . Se prepararon suspensiones bacterianas ajustadas a una $\text{DO}_{600}=0.01$ (107 UFC/mL).

En los ensayos de patogenicidad se utilizaron plantines en estadio de 3 hojas (Z1.3) de trigo cultivar Tijereta, susceptible a estría bacteriana (Zadoks et al. 1974). Se infiltró la tercera hoja de cada planta con aproximadamente 100 μL de suspensión bacteriana usando una jeringa sin aguja (Figura 3).

La cepa *X. translucens* pv. *undulosa* CIX88 (Minnesota, USA) se utilizó como control positivo, y solución de NaCl 0.9 % como control negativo. Se realizaron 6 réplicas por cada cepa y control. Las plantas inoculadas se mantuvieron en condiciones controladas a 27°C con humedad relativa de 75% y un fotoperíodo de 12h. Se realizó la lectura de los síntomas 12 días post-inoculación. Se cumplieron los postulados de Koch al aislar las cepas inoculadas en WBA a partir de la hoja infiltrada. Se confirmó identidad de los aislados por morfología y qPCR con primers específicos T1/T2. Todo el ensayo se repitió una vez.

Evaluación de patogenicidad sobre diferentes hospederos.

Se realizaron ensayos para evaluar el rango de hospederos de las cepas de *Xanthomonas* asociadas a síntomas de necrosis seca en trigo.

El set de hospederos evaluados incluyó especies gramíneas presentes en nuestro sistema de producción: trigo (cultivares INIA Tijereta y LE 2462), cebada (cultivar Arrayan), Avena sativa (avena), *Lolium multiflorum* (raigrás), *Dactylis glomerata*, *Bromus catharticus* y *Festuca arundinacea*. Se prepararon tres macetas para cada combinación de cepa-hospedero, con dos plantas por maceta en estado de 3 a 5 hojas completamente desplegadas al momento de la inoculación.

Se seleccionaron 3 cepas de *Xanthomonas* aisladas en Uruguay (MAI5037, MAI5069 y MAI5084) y 3 cepas de Minnesota-USA (CIX97, CIX249 y CIX383) que quedaron agrupadas en el mismo clado que las cepas uruguayas asociadas a necrosis

seca en el análisis MLSA realizado. Se incluyeron además cepas de referencia como control: *X. prunicola* CFBP8353T, cepa tipo de la especie, aislada de durazno pelón; *X. translucens* pv. *translucens* CFBP2054T, cepa tipo de la especie, asociada a estría bacteriana en cebada; y *X. translucens* pv. *undulosa* CFBP2055PT, cepa patotipo, principalmente asociada a estría bacteriana de trigo. Se realizaron también controles de inoculación con solución salina.

La inoculación se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámaras con condiciones controladas, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo de 12 horas. Los síntomas se evaluaron a los 7 dpi. El ensayo completo se realizó dos veces.

Secuenciación y análisis genómico de las cepas de *Xanthomonas* patógenas (no *translucens*).

En base a los hallazgos obtenidos, se decidió profundizar en la caracterización de las cepas de *Xanthomonas* asociadas a síntomas de necrosis seca mediante un abordaje genómico. Se secuenciaron las mismas 6 cepas de *Xanthomonas* evaluadas en el ensayo de rango de hospederos.

Las secuencias genómicas fueron obtenidas mediante la plataforma Illumina Hi-Seq-2500 (servicio de secuenciación, Universidad de Ohio). También se secuenciaron utilizando la plataforma Oxford Nanopore MinION implementada en por el grupo de trabajo en el marco de este proyecto. Se analizaron los reads obtenidos, evaluando la cantidad, largo, calidad de las secuencias y contenido de GC, usando FastQC (Andrews 2010). Se realizó el ensamblaje de novo de cada genoma, usando reads cortos (Illumina) con SPAdes (Bankevich et al. 2012) y reads largos con Flye (Kolmogorov et al. 2019). También se realizaron ensamblajes híbridos usando ambos tipos de reads con Unicycler (Wick et al. 2017). Se analizó la calidad de cada ensamblaje en base a la cantidad de contigs, N50 y L50, mediante la herramienta QUAST (Gurevich et al. 2013).

Se realizó la predicción de las secuencias codificantes y anotación automática de los genomas ensamblados por SPAdes y Unicycler, mediante RAST (Aziz et al. 2008) y Prokka (Seemann 2014).

Para realizar la identificación a nivel de especie se calcularon los índices de relación genómica global ANI (Average Nucleotide Identity) y dDDH (Digital DNA-DNA Hybridization). La asignación de especie se realizó en base a las distancias intergenómicas con cepas tipo de referencia de *Xanthomonas* spp., utilizando como valores de corte 95% (ANI) y 70% para dDDH (Konstantinidis and Tiedje 2005; Goris et al. 2007).

Objetivo específico 3: Desarrollo de métodos moleculares de diagnóstico y cuantificación de *X. translucens* y *X. prunicola*.

Se desarrollaron métodos basados en qPCR, tecnología que presenta varias ventajas frente a otros métodos de detección. Se optó por utilizar sondas de hidrólisis (TaqMan®) por presentar mayor especificidad que los agentes intercalantes.

Se diseñaron varios sistemas de primers/sonda dirigidos a regiones específicas del gen *inaX* (proteína de nucleación del hielo) para ambas especies patógenas utilizando el software Primer3 (Untergasser et al. 2012). Se verificaron los parámetros termodinámicos y se realizaron alineamientos de secuencias *inaX* de cepas blanco y no blanco, seleccionando el set de primers/sonda más adecuado para cada especie (Tabla 1). Las sondas para *X. translucens* y *X. prunicola* se acoplaron a diferentes fluoróforos (FAM y HEX respectivamente), para poder evaluar su uso en reacciones multiplex.

Las amplificaciones se realizaron en un equipo RotorGenne-6000 utilizando una mezcla de reacción comercial (Luna-Universal-Probe-qPCR-Master-Mix, Qiagen). Para cada sistema se ajustaron las condiciones de amplificación. Para evaluar la performance y sensibilidad de detección se analizaron diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *X. translucens* pv. *undulosa* y *X. prunicola* en un rango de concentraciones de 10 ng/μl–100 fg/μl. Se construyeron curvas de calibración determinando límite de detección, rango dinámico lineal y eficiencia de la reacción de amplificación. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN a partir de muestras de hojas y lotes de semilla de trigo. El efecto de la matriz se evaluó en las diferentes condiciones ensayadas. Para ello, se prepararon curvas de calibración para cada patógeno, pero utilizando ADN vegetal (matriz) en lugar de agua como diluyente y se compararon los parámetros respecto a los obtenidos en las respectivas curvas sin matriz.

Objetivo específico 4: Desarrollo de metodologías de screening a campo para la evaluación de resistencia a estría bacteriana en germoplasma disponible a nivel de producción y líneas avanzadas de mejoramiento.

Ajuste de metodologías de inoculación a campo.

Se sembraron tres genotipos de trigo de ciclo similar y con comportamiento diferencial conocido frente a estría bacteriana (Castro et al., 2017-2020) en área experimental en INIA-La Estanzuela: INIA-Tijereta (susceptible), LE-2346 (susceptibilidad intermedia) e INIA-Gorrión (resistente). Los ensayos se sembraron en un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial con factores: régimen de humedad (dos: con y sin riego por aspersión), cultivar (tres:

susceptible, intermedio, resistente), momento de inoculación con Xtu (seis: testigo sin inocular, inoculaciones a fin de macollaje-Z30, elongación a tres nudos visibles-Z33, hoja bandera-Z38, Z30+Z33, Z33+Z38) con tres repeticiones. Se realizaron aplicaciones de fungicidas tempranamente para eliminar interferencia de enfermedades a hongos. La inoculación se realizó con tres cepas de Xtu (MAI 5057, MAI5061, MAI5031) identificadas en este trabajo a nivel molecular y patogénico. El inóculo se preparó cultivando cada cepa por separado en tres placas con medio Wilbrink's por tres días a 27°C. Luego se lavaron con solución salina al 0.85% y se combinaron ajustando a una suspensión de 108 UFC/ml. El inóculo se aplicó con Hashuta®, calibre de salida de agua máximo a #6, caudal 30ml/s, dos pasadas en ambas direcciones. Se determinó severidad de estría bacteriana (% de área foliar enferma) entre elongación – tres nudos (Z33) y comienzo de llenado de grano (medio grano desarrollado Z70-7.08) en tres o cuatro lecturas.

Caracterización de materiales de trigo en producción y líneas avanzadas, identificación de fuentes de resistencia.

Se sembraron a campo genotipos de trigo en parcelas de dos surcos de un metro en el campo experimental de Protección Vegetal (INIA-La Estanzuela) en 2019 y 2020. Se incluyeron cultivares comerciales, líneas avanzadas en dos o más años de evaluación, fuentes de resistencia reportadas a nivel internacional y testigos susceptibles conocidos. Se utilizaron los mismos aislados y metodologías descriptas anteriormente, con inoculaciones a z30+z33. Se determinó severidad de estría bacteriana (% de área foliar enferma) a llenado de grano (Z80). Se evaluaron además el comportamiento de los cultivares en producción y líneas avanzadas, en los ensayos de evaluación de cultivares en La Estanzuela (Colonia) y Young (Rio Negro). Se determinó severidad de estría bacteriana entre comienzo de llenado de grano (fin de floración) a grano lechoso-lechoso pastoso.

Resultados, análisis y discusión

1. Relevamiento de cepas de *Xanthomonas* patógenas de trigo en Uruguay: identificación preliminar y evaluación de patogenicidad

Los muestreos consecutivos realizados permitieron la obtención de la primera colección regional de cepas del género *Xanthomonas* que afectan cultivos de trigo en Uruguay (Tabla 2).

Se obtuvieron 63 cepas de *Xanthomonas* con colonias amarillas y mucoides típicas de este género. Estas cepas fueron aisladas de 53 chacras de producción a partir de hojas pertenecientes a 15 cultivares de trigo diferentes. La identificación con primers específicos fue positiva para 44 cepas que fueron identificadas como *X. translucens*. Por otro lado, las otras 19 cepas dieron un resultado dudoso de amplificación, detectándose fluorescencia débil y tardía, con valores de Ct > 22 y un pico de melting similar al obtenido para cepas de *X. translucens* (Figura 4). Se amplificó y secuenció el gen del ARNr 16S de estas cepas dudosas, verificando un porcentaje de identidad de 99% con múltiples especies del género *Xanthomonas*. Por lo tanto, se pudo identificar a estas cepas a nivel de género como *Xanthomonas* spp. pero no se logró por este método una identificación a nivel de especie.

Basado en los resultados obtenidos con primers T1/T2 y el origen geográfico de las muestras, se seleccionaron 30 cepas de *X. translucens* y 10 cepas de *Xanthomonas* spp. (no *translucens*) para ensayos de patogenicidad en un cultivar de trigo susceptible a estría bacteriana (cv. Tijereta). Como puede observarse en la Figura 5, todas las cepas de *X. translucens* generaron necrosis marrón, síntoma típico de estría bacteriana que también fue producido por la cepa de referencia utilizada, *X. translucens* pv. *undulosa* CIX88. Por otro lado, las cepas de *Xanthomonas* spp. que tuvieron amplificación débil con primers T1/T2, generaron necrosis seca en las plantas infiltradas, un síntoma atípico y claramente diferenciado al observado para estría bacteriana. Estos resultados fueron obtenidos de forma consistente en cada ensayo de patogenicidad realizado.

2. Identificación molecular y diversidad genética de las poblaciones de *X. translucens* causantes de estría bacteriana de trigo en Uruguay.

Se profundizó en la identificación y tipificación de las cepas identificadas como *X. translucens*. Para ello, se utilizó la técnica Multilocus Sequence Analysis and Typing (MLSA-MLST). Este método está basado en la comparación de secuencias de ADN de múltiples genes housekeeping concatenadas (Maiden et al. 1998; Pérez-Losada et al. 2013). En este caso se utilizó un esquema previamente reportado para evaluar diversidad dentro del género *Xanthomonas* (Young, 2008) y en particular dentro del grupo *X. translucens*. Se incluyeron secuencias de cepas de referencia para los diferentes patovares de *X. translucens*. Todas las cepas aisladas de Uruguay se agruparon juntas en un mismo clado, junto con la cepa patotipo de *X. translucens* pv. *undulosa* LMG892PT y cepas aisladas de cultivos de trigo en Estados Unidos también identificadas como *X. translucens* pv. *undulosa* (Curland et al. 2018) (Figura 6). En suma, todas las cepas de *X. translucens* que producen síntomas de necrosis marrón en trigo, fueron identificadas como *X. translucens* pv. *undulosa*. Este resultado se corresponde con los obtenidos en otros estudios, en los que se ha reportado una clara prevalencia del patovar *undulosa*

como el causante de estría bacteriana en cultivos de trigo (Adhikari et al., 2011; Curland et al., 2018; Khojasteh et al., 2019). En análisis MLST permite profundizar más en la diversidad de las poblaciones, permitiendo discriminar los aislados a nivel de cepa. El análisis realizado asignó 4 STs entre las 39 cepas de *X. translucens* pv. *undulosa* de Uruguay de la colección (Tabla 2, Figura 6B). Las estadísticas de diversidad para cada locus y las secuencias concatenadas muestran que existe muy poca diversidad entre las cepas de *X. translucens* pv. *undulosa* presentes en Uruguay. Existen solo 4 sitios polimórficos entre los 2645 sitios analizados en las secuencias concatenadas (Tabla 3). Tres de los STs encontrados ya fueron reportados previamente en otros estudios. El ST más prevalente en Uruguay es el ST 2 (51.3 % de las cepas), seguido por el ST 4 (28.2 %) y por el ST 1 (15.4 %). El ST 2 es el ST de la cepa patotipo de *X. translucens* pv. *undulosa* LMG 892PT y se predice que es el genotipo fundador del patovar (Curland et al. 2018; Khojasteh et al. 2019). A las cepas MAI5034 y MAI5042 se les asignó un ST previamente no reportado (ST 3), que es una variante en un único locus (*rpoD*) del ST 2. El análisis eBURST realizado permite visualizar la frecuencia y relaciones entre los diferentes STs encontrados (Figura 6B). En este caso, todas las cepas forman un único complejo clonal cuyo genotipo fundador está representado por el ST 2.

3. *Xanthomonas prunicola*: una nueva especie patógena de trigo.

Los resultados obtenidos a partir de la identificación preliminar de las cepas aisladas revelaron un hallazgo no esperado: la existencia de cepas patógenas de trigo que no pertenecen a la especie *X. translucens*.

Se realizó un análisis MLSA incluyendo en el análisis cepas de referencia de todas las especies de *Xanthomonas* reportadas (Figura 7). Las cepas que generaron necrosis seca se agruparon en un mismo clado, junto a otras cuatro cepas no caracterizadas aisladas de trigo en Minnesota, USA (W2.22, W2.24, CIX89, CIX97). Este análisis conjunto fue posible gracias a una colaboración que se estableció con el grupo de la Dra. Rebecca Curland en el marco de este proyecto. Según el análisis filogenético realizado la especie con la que están más relacionada es *X. prunicola*, un patógeno recientemente reportado, aislado como patógeno de durazno pelón en España (López et al. 2018).

Para confirmar este resultado se realizó el análisis genómico de 3 cepas de Uruguay y 3 cepas de Estados Unidos. Este análisis no estaba prevista en el cronograma original pero se consideró necesario para poder confirmar la identidad de las cepas de *Xanthomonas* patógenas asociadas a síntomas de necrosis seca. El abordaje utilizado implicó el uso de dos plataformas de secuenciación complementarias. Por un lado, se utilizó la plataforma Illumina a través de una colaboración establecida con la Dra. Verónica Roman-Reyno de la Universidad de Ohio. Posteriormente se adquirió en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química un secuenciador MinION Nanopore que se utilizó para secuenciar las mismas 6 cepas complementando la información de secuencia disponible y logrando ensamblajes híbridos completos y de buena calidad para todas las cepas (Tabla 4). Para realizar la identificación a nivel de especie se calcularon los índices de relación genómica global (ANI, dDDH) y se compararon con la cepa de referencia más cercana (*X. prunicola* CFBP8353) (Tabla 5). En base a los criterios establecidos para la diferenciación de especies, se confirmó que las 6 cepas pertenecen a la especie *X. prunicola*.

También se realizaron ensayos de patogenicidad en diversas gramíneas incluyendo trigo, cebada, avena, *Bromus*, raigrás, festuca y *Dactylis*. Se encontraron diferencias en el rango de hospederos y en los síntomas generados por las cepas de *X. prunicola* aisladas de trigo respecto a la cepa de referencia de *X. prunicola* aislada de durazno pelón en España.

Los síntomas causados por estas cepas son marcadamente diferentes a los de estría bacteriana causados por cepas de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Esta distinción a nivel patogénico se ve sustentada además por una clara diferenciación a nivel filogenético. El hallazgo de cepas tan similares y aisladas de regiones tan distantes sugiere que esta bacteria se encuentra distribuida a nivel global en asociación con los cultivos de trigo. Es necesario continuar profundizando en el estudio de esta nueva especie patógena de trigo para poder comprender su epidemiología y relevancia para la producción de trigo tanto a nivel local como internacional.

4. Evaluación de la incidencia y severidad de estría bacteriana en cultivos de trigo de Uruguay

Durante el período del presente proyecto (zafra 2018, 2019 y 2020) ocurrieron epifitias tempranas de roya estriada o amarilla (causada por *Puccinia striiformis*) en el ciclo fenológico de los cultivos comerciales de trigo. Esto, sumado a la interferencia adicional de septoriosis en hojas y la ocurrencia tardía de estría bacteriana en esos años, determinó que no fuera posible estimar en forma precisa la incidencia y severidad de la enfermedad objetivo de este proyecto en las chacras relevadas durante esos años.

Con el objetivo de contar con información que estime el daño de estría bacteriana en cultivares susceptibles, se llevaron a cabo cuatro experimentos de campo en 2019 y 2020. Las pérdidas de rendimiento de grano en el cultivar INIA Tijeleta, susceptible a estría bacteriana, estimadas en promedio fueron de 5%, con niveles máximos promedio de 40% de severidad en el estado de cuarto-medio grano desarrollado (Z70-7.08, Zadoks et al., 1975) y un desarrollo de la estría bacteriana estimada en el ciclo como área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) correspondiente a 2603. El tratamiento testigo sin inocular presentó un rango de 1-15% de severidad máxima de estría bacteriana al mismo estado y

AUDPC correspondiente a 637. Las pérdidas promedio en peso hectolítrico (PH) se estimaron en 3% (78.83 kg/hl vs. 80.85 kg/hl), mientras que las mermas en peso de mil granos fueron de 4% (30.47 g vs. 32.82 g).

Las correlaciones entre la severidad al estado de cuarto-medio grano desarrollado (Z70-7.08) y todas las variables productivas fueron bajas (Tabla 4), solo significativas la relación de rendimiento de grano con severidad a Z70-7.08 y AUDPC. Se estimaron ecuaciones de pérdidas en función de distintos niveles de severidad de estría bacteriana en relación con el rendimiento de grano y la calidad física del grano (PH y PMG) (Tabla 5).

Será necesario ampliar esta primera estimación nacional para cuantificar las pérdidas causadas por estría bacteriana en trigo en ambientes que promuevan la ocurrencia de mayores niveles de severidad y cultivares con comportamiento diferencial frente a la enfermedad.

5. Optimización de metodologías para la evaluación de resistencia a estría bacteriana a nivel de campo y caracterización de germoplasma de trigo.

Existieron diferencias significativas entre tratamientos del momento de inoculación, condiciones de riego y cultivar para la severidad de estría bacteriana en las distintas lecturas ($P < 0.0001$; datos no presentados) y en especial, en el desarrollo de la enfermedad (AUDPC) (Tablas 6, 7 y 8, respectivamente). Independientemente del año, se identificó que los mayores niveles de severidad de estría bacteriana en los distintos estados fenológicos evaluados, ocurrieron cuanto más temprano se realiza la inoculación (fin de macollaje-Z30) o con inoculaciones dobles tempranas: a fin de macollaje y elongación a tercer nudo visible (Z30+Z33). Esta metodología se potenció mediante el uso de riego según el régimen establecido de tres riegos diarios (a la mañana-9:00, primera hora de la tarde 14:00 y tardecita- 18-18:30).

Más allá del comportamiento del cultivar, aún cuando existieron diferencias significativas entre cultivares, fue posible inducir desarrollo de niveles altos de estría bacteriana mediante inoculaciones tempranas en Z30 o dobles Z30+Z33 (Tabla 9).

Los factores que presentaron diferencias significativas entre tratamientos fueron el riego ($P < 0.0001$) y el cultivar ($P < 0.0001$) para rendimiento de grano. El 2020 fue un año de temperaturas más frescas durante la primavera (óptimo en etapa de llenado de grano) y régimen hídrico aceptable para la mayor expresión del potencial de rendimiento de los cultivos de trigo (se registró a nivel nacional un récord histórico en el rendimiento promedio nacional). En el caso de 2019, existió restricción hídrica en ciertas etapas del cultivo, el riego suministrado pudo haber contribuido a la mínima diferencia significativa registrada (Tabla 10). Por otra parte, las diferencias significativas entre los cultivares en el rendimiento demuestran la expresión de los diferentes potenciales que poseen desde su genética (Tabla 11).

Los resultados obtenidos en relación a la baja disminución de rendimiento de grano en relación a la severidad de estría bacteriana al comienzo de llenado de grano o en su desarrollo total (AUDPC), en baja correlación y significancia explican lo antes expresado.

En el mismo sentido, para peso hectolítrico y peso de mil granos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.047$ y $P < 0.05$, respectivamente) entre cultivares.

Conclusiones y recomendaciones

Las bacteriosis en cultivos de trigo constituyen una problemática que ha incrementado significativamente su relevancia en la última década, y sobre la cual existen escasos antecedentes de investigación a nivel nacional. Los resultados obtenidos en este proyecto revelan que las principales bacteriosis que afectan los cultivos de trigo en Uruguay son la estría bacteriana asociada a *Xanthomonas translucens* y una nueva patología de trigo causada por la especie *Xanthomonas prunicola*, no reportada previamente. Este es un hallazgo novedoso en el que se deberá continuar profundizando en futuras investigaciones. A través de la ejecución de este proyecto se logró generar conocimiento original sobre esta problemática en Uruguay, así como desarrollar herramientas que contribuirán a la implementación de medidas eficientes de manejo de esta problemática. Entre ellas se destaca el desarrollo de métodos moleculares de detección de estos patógenos en muestras en plantas y lotes de semilla. También se implementaron metodologías de inoculación bajo condiciones controladas y a campo que serán de utilidad para la identificación de nuevas fuentes de resistencia en germoplasma de trigo disponible.

Referencias bibliográficas

- Curland, Rebecca D., Liangliang Gao, Cory D. Hirsch, and Carol A. Ishimaru. 2020. "Localized Genetic and Phenotypic Diversity of *Xanthomonas Translucens* Associated with Bacterial Leaf Streak on Wheat and Barley in Minnesota." *Phytopathology* 110 (2): 257–66. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-19-0134-R>.
- Curland, Rebecca D, Liangliang Gao, Carolee T Bull, Boris A Vinatzer, Ruth Dill-Macky, Leon Van Eck, and Carol A Ishimaru. 2018. "Genetic Diversity and Virulence of Wheat and Barley Strains of *Xanthomonas Translucens* from the Upper Midwestern United States." *Phytopathology* 108 (4): 443–53. <https://doi.org/10.1094/PHTO-08-17-0271-R>.
- Duveiller, E., L. Fucikovsky, and K. Rudolph. 1997. *The Bacterial Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT. <http://hdl.handle.net/10883/1227>.
- Forster, R. L., and N. W. Schaad. 1988. "Control of Black Chaff of Wheat with Seed Treatment and a Foundation Seed Health Program." *Plant Disease* 72 (11): 935. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0935>.
- Frommel, M. 1986. "Xanthomonas Campestris Pv. Translucens (J.J. y R.) DYE, Agente Causal de La Estría Bacteriana Del Trigo (T. Aestivum L.) En El Uruguay."
- Garita-Cambroner, Jerson, Ana Palacio-Bielsa, María M. López, and Jaime Cubero. 2017. "Pan-Genomic Analysis Permits Differentiation of Virulent and Non-Virulent Strains of *Xanthomonas Arboricola* That Cohabit *Prunus* Spp. and Elucidate Bacterial Virulence Factors." *Frontiers in Microbiology* 8 (APR): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00573>.
- Khojasteh, Moein, S. Mohsen Taghavi, Pejman Khodaygan, Habiballah Hamzehzarghani, Gongyou Chen, C. Bragard, Ralf Koebnik, and Ebrahim Osdaghi. 2019. "Molecular Typing Reveals High Genetic Diversity of *Xanthomonas Translucens* Strains Infecting Small-Grain Cereals in Iran." Edited by Eric V. Stabb. *Applied and Environmental Microbiology* 85 (20): 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01518-19>.
- Librado, P, and J Rozas. 2009. "DnaSP v5?: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data" 25 (11): 1451–52. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- López, María M., Pablo Lopez-Soriano, Jerson Garita-Cambroner, Carmen Beltrán, Geraldine Taghouti, Perrine Portier, Jaime Cubero, Marion Fischer Le Saux, and Ester Marco-Noales. 2018. "Xanthomonas Prunicola Sp. Nov., a Novel Pathogen That Affects Nectarine (*Prunus Persica* Var. Nectarina) Trees." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (6): 1857–66. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002743>.
- Maes, M., P. Garveva, and O. Kamoen. 1996. "Recognition and Detection in Seed of the *Xanthomonas* Pathogens That Cause Cereal Leaf Streak Using rDNA Spacer Sequences and Polymerase Chain Reaction." *Phytopathology* 86 (1): 63. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-63>.
- Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, et al. 1998. "Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 3140–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>.
- MGAP-DIEA. 2019. "Anuario Estadístico Agropecuario 2019." Montevideo, Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea>.
- Pereyra, Silvia. 2013. *Nuevos Desafíos Para El Manejo de Enfermedades En Cereales de Invierno*. Edited by E. Hoffmann, A. Ribeiro, O. Ernst, and F. García. 3rd National Agriculture Symposium. Facultad d. Paysandú, Uruguay: Hemisferio Sur.
- Pérez-Losada, Marcos, Patricia Cabezas, Eduardo Castro-Nallar, and Keith A Crandall. 2013. "Pathogen Typing in the Genomics Era: MLST and the Future of Molecular Epidemiology." *Infection, Genetics and Evolution* 16 (June): 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>.
- Sambrook, J. F., and D Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbour Press. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sands, O C (Montana State Univ. (USA). Dept. of Plant Pathology), G Mizrak, V N Hall, H K Kim, H E Bockelman, and M J Golden. 1986. "Seed Transmitted Bacterial Diseases of Cereals: Epidemiology and Control." *Arab Journal of Plant Protection*.
- Young, J. M., D. C. Park, H. M. Shearman, and E. Fargier. 2008. "A Multilocus Sequence Analysis of the Genus *Xanthomonas*." *Systematic and Applied Microbiology* 31 (5): 366–77. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>.
- Zadoks, J. C., T. T. Chang, and C. F. Konzak. 1974. "A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals." *Weed Research* 14 (6): 415–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>.
- Zarei, S., S. M. Taghavi, H. Hamzehzarghani, E. Osdaghi, and J. R. Lamichhane. 2018. "Epiphytic Growth of *Xanthomonas Arboricola* and *Xanthomonas Citri* on Non-Host Plants." *Plant Pathology* 67 (3): 660–70. <https://doi.org/10.1111/ppa.12769>.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)