

Estudio de la diversidad del hongo responsable de la piriculariosis del arroz, y su aplicación

Odile Faivre-Rampant¹, Henri Adreit², Joëlle Milazzo², Dounia Saleh^{2,10}, Manuel Aguilar-Portero³, María del Mar Catala⁴, Jorge Pérez⁵, Ramón Carreres⁵, José-María Osca-Lluch⁶, Luis Marques-Falcó⁷, Dimitris Katsantonis⁸, Elisabetta Lupotto⁹, Pietro Piffanelli¹, Elisabeth Fournier¹⁰, Didier Tharreau²

¹ Parco Tecnologico Padano, Via Einstein, 26900 Lodi, Italia

² CIRAD, UMR BGPI, TA A54/K, 34398 Montpellier cedex 05, Francia

³ Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Centro IFAPA Las Torres-Tomejil, Alcalá del Río, Sevilla, España.

⁴ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Cabrils, España

⁵ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46410 Sueca, España

⁶ Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, España

⁷ Copsemar, Avenida del Mar 1, 46410 Sueca, España

⁸ National Agricultural Research Foundation, Cereal Institute, PO Box 60411, 57001 Thessaloniki, Grecia

⁹ Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione specializzata per la Risioltura, 13100 Vercelli, Italia

¹⁰ INRA, UMR BGPI, TA A54/K, 34398 Montpellier cedex 05, Francia

Autor para correspondencia: Didier Tharreau, Tel: +33 4 67 99 62 4839; e-mail: tharreau@cirad.fr

Resumen: *Magnaporthe oryzae* es responsable de la enfermedad más importante del arroz en Europa. En este trabajo se recogieron 987 aislados de este hongo en siete países europeos productores de arroz, y se investigó su diversidad genética con 11 marcadores microsatélite. Los genotipos multilocus (MLGs) más frecuentes son comunes a los países europeos. Sin embargo, algunos son específicos de los distintos países, o incluso de determinadas áreas de cultivo. La diversidad genotípica media en los campos de cultivo revela que, a pesar de que hay uno o dos genotipos dominantes, frecuentemente coexisten varios genotipos. La hipótesis del arroz rojo como una fuente de inóculo primario no se puede excluir. La evolución genética de *M. oryzae* se ha investigado en dos de estos países en los últimos 25 años: en Francia se han observado cambios significativos de la población con el tiempo, al contrario que en Italia. Estos datos muestran que hay un importante flujo de genes entre las zonas arroceras europeas, probablemente a través del transporte de semillas infectadas. También muestran evidencias de diferenciación en una escala geográfica muy pequeña, lo que sugiere una adaptación local.

Palabras clave: *Magnaporthe oryzae*, arroz, diversidad genética, Europa, migración, selección.

Introducción

Magnaporthe oryzae es un hongo patógeno que causa la piriculariosis (la fallada, el quemado, o el añublo en Latinoamérica) del arroz y de otras especies de la familia Poaceae. La enfermedad se distribuye por todo el mundo, incluyendo las regiones de cultivo templadas como Europa o Japón. La selección y el cultivo de variedades de arroz resistentes es una de las estrategias más eficientes y rentables para controlar esta enfermedad. Pero la mayoría de las variedades resistentes a la piriculariosis son atacadas por nuevas razas virulentas de dos a

seis años después de empezar a cultivarse (Bonman et al, 1992). Parte del fracaso para mejorar la resistencia de manera duradera es debido a nuestro limitado conocimiento de la dinámica y evolución de las poblaciones del hongo.

Se han realizado numerosos estudios sobre las poblaciones de *M. oryzae* (Levy et al, 1991; Han et al, 1993; Levy et al, 1993; Xia et al, 1993; Correa-Victoria et al, 1994; Chen et al, 1995; Roumen et al, 1997; Don et al, 1999a; Don et al, 1999b; Correll et al, 2000; Xia et al, 2000; Park et al, 2003; Javan-Nikkah et al, 2004; Park et al, 2008; Lara-Alvarez et al, 2010), que han permitido caracterizar o confirmar las características biológicas de esta especie. Los estudios de poblaciones han demostrado que este patógeno se reproduce clonalmente en la mayoría de las áreas de cultivo de arroz, con excepciones en el putativo centro de origen de esta especie (Zeigler, 1998; Kumar et al, 1999; Tharreau et al, 2009; Saleh et al, 2012). El análisis a nivel mundial también sugiere migraciones intercontinentales (Tharreau et al, 2009). A escala europea, los estudios de poblaciones preliminares revelan que hay pocos linajes clonales (6-7), la mitad de los cuales son específicos de un país, y la otra mitad está presente en la mayoría de los países (Jorge 1996; Roumen et al, 1997; Piotti et al, 2005; Lara Álvarez et al, 2010). Estos resultados confirman la migración entre zonas arroceras relativamente distantes (varios cientos de km). Puesto que las esporas de *M. oryzae* se dispersan solamente en distancias cortas (Nottéghem, 1977), se sospecha que la migración a larga distancia es el resultado del transporte de semillas de arroz infectadas (Tharreau et al, 2009).

Sin embargo, no se consideraron algunas cuestiones, por lo que importantes características biológicas continúan siendo escasamente conocidas. La migración, supervivencia e incluso la diversidad del patógeno no fueron evaluadas adecuadamente en estudios anteriores, ya que el tamaño de muestra y el método de muestreo utilizado en realidad no permiten caracterizar la estructura de la población europea, ni evaluar la importancia de la migración. En términos generales, la estructura de la población y la diversidad a escala de campo no están bien documentadas, sobre todo en los campos de cultivo, pues los estudios publicados se basan sobre todo en la recogida de muestras en parcelas experimentales donde se cultivan diversas variedades. Las variedades de arroz tienen genes de resistencia diferentes que excluyen específicamente algunas cepas. Por lo tanto, la estructura de la población observada depende de las variedades de arroz de las que se recogió el hongo. Además, se realizaron muy pocos muestreos adecuados, con un número suficiente de cepas recogidas de la misma variedad de arroz, para medir la diversidad a nivel de campo. Entre estos pocos estudios, uno realizado en Corea mostró una diversidad genotípica en los campos de arroz sorprendentemente alta, ya que casi todos los aislados tenían un único genotipo multilocus (MLG; Park et al, 2008). Por el contrario, en dos campos de cultivo ampliamente muestreados en Arkansas (EE.UU.), Xia et al (2000) demostraron que había varios MLGs presentes en cada campo, pero que uno o dos de ellos eran dominantes. La evolución de la población a través del tiempo también está pobremente documentada. La composición en linajes no cambió en 20 años, un periodo en el que siete variedades dominantes ocuparon el 70% de los campos de arroz en Corea (Park et al, 2003). En Arkansas, durante 17 años, la tendencia evolucionó generalmente de cuatro a dos linajes clonales (sensu Levy et al, 1991.), siendo uno de ellos dominante (95%; Correll et al, 2009.). Sin embargo, en otros lugares se observaron importantes variaciones interanuales: en Japón, los linajes originales desaparecieron con los cambios varietales (Don et al, 1999b); y en el sur de España también se observaron drásticas variaciones interanuales de los linajes clonales (Lara-Alvarez et al, 2010), que no pudieron ser explicadas.

En las zonas templadas no hay arroz cultivado durante más de seis meses, de modo que, a diferencia de algunos agrosistemas tropicales de arroz, la epidemia de piriculariosis se detiene durante el invierno. Se demostró que las semillas infectadas son una posible fuente de inóculo primario (Long et al, 2001). La hibernación en la paja de arroz o en el suelo es difícil

de probar, pero parece poco probable porque *M. oryzae* no forma estructuras capaces de sobrevivir al frío y la competencia con microorganismos. *M. oryzae*, como especie, es patógeno de diferentes plantas huéspedes. Pero las cepas patógenas de arroz se han especializado y no se ha demostrado que las poblaciones procedentes de malas hierbas causen la enfermedad en arroz en condiciones naturales. Por lo tanto, la hipótesis de la hibernación en una especie huésped alternativa y diferente es también poco probable en las zonas templadas. Sin embargo, el arroz salvaje (también llamado arroz rojo) se encuentra frecuentemente entre el arroz cultivado en Europa. Debido a que el arroz rojo y el arroz cultivado pertenecen a la misma especie (*Oryza sativa*), las cepas de *M. oryzae* de arroz son patógenas del arroz rojo. Por lo tanto, esta maleza podría servir como una fuente de inóculo primario en las zonas templadas.

En este estudio se ha caracterizado la diversidad de una colección de más de 980 cepas recolectadas en siete países europeos con marcadores moleculares (microsatélites). Esta colección reúne cepas aisladas en los últimos 20 años, e incluye muestreos recientes diseñados para investigar cuestiones específicas. Se han aprovechado estos datos para intentar responder a las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la estructura de la población del hongo causante de la piriculariosis del arroz en Europa? ¿Son las migraciones entre las zonas de cultivo de arroz tan frecuentes que ésta se puede considerar una única población?
- ¿Cómo cambiaron estas poblaciones en los últimos 20 años?
- ¿Cuál es la diversidad a escala de campos de cultivo?
- ¿Cuál es la principal fuente de inóculo? Hemos testado, en particular, la hipótesis de que el arroz rojo pudiera ser la fuente primaria de inóculo.

Resultados

Recolección de muestras y aislamiento del hongo

Los aislados se obtuvieron de muestras infectadas de arroz (hojas, cuello, raquis y semillas) durante diferentes años (de 1986 a 2009) a partir de diversas variedades de arroz cultivadas en siete países europeos: España, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Portugal, y Turquía. Adicionalmente, se realizó un muestreo específico a nivel de campo: se aislaron de 10 a 30 cepas de un mismo campo de cultivo, en Francia, Grecia, Hungría, España y Turquía. En Francia se tomaron también muestras de plantas de arroz rojo infectadas paralelamente a las de arroz cultivado, en varios campos. Diversidad genética de *M. oryzae* y estructura de la población a escala europea

La diversidad genotípica de 987 cepas de *M. oryzae*, muestreadas en siete países europeos productores de arroz, con 11 marcadores microsatélites independientes, permitió su asignación a 125 genotipos multilocus (MLGs). Nueve de ellos se observaron al menos 40 veces, lo que representa el 58% del número total de cepas (Fig. 1). El genotipo más frecuente (MLG14) se detectó 107 veces (11%). Otros once MLGs se repitieron entre 10 y 19 veces, 45 se repitieron entre 2 y 9 veces, y 60 sólo una vez (Fig. 1). Debido a datos faltantes, 21 genotipos no se pudieron atribuir inequívocamente a un MLG definido y fueron clasificados como no-determinado (nd). Los seis genotipos más frecuentes (MLG14, 1, 39, 3, 21, y 7) estaban presentes en la mayoría de los países europeos productores de arroz, como Francia, Italia, Grecia, España y Portugal. Al mismo tiempo, algunos genotipos fueron encontrados específicamente en sólo uno de estos países, como ocurre con MLG9 y 107, observados 43 y 41 veces en Francia y en España, respectivamente. En Turquía, los dos genotipos principales (MLG103 y 115) se observaron 14 y 3 veces, respectivamente. El primero de estos, MLG103, también corresponde a una cepa de Portugal. Tres genotipos de menor importancia se

observaron también una vez en ese país (MLG88, 113, y 114). En Hungría, las cepas de *M. oryzae* revelaron dos genotipos específicos y frecuentes: MLG75 y 77, repetidos 14 y 6 veces respectivamente, así como otros cuatro MLGs menores, representados por una sola cepa (MLG76, 78, 79, y 80). Por lo tanto, a diferencia de otros países, todos los MLGs que se encontraron en Hungría fueron específicos de este país.

A partir de este amplio conjunto de datos que hemos obtenido, emerge una clara evidencia de que los MLGs más comunes son compartidos por todos los países europeos, como sugerían los resultados preliminares anteriores (Jorge, 1996; Roumen et al, 1997). Sin embargo, mostramos que hay algunos MLGs específicos de cada país, lo que sugiere una cierta diferenciación entre los países europeos.

La diversidad genética dentro de los países

Para investigar la existencia de diferenciación local, se examinó la distribución de MLGs a nivel regional dentro de los países. En Francia se definieron dos regiones de muestreo (Camarga Norte y Sur, a 30 km de distancia una de otra). Nuestro análisis reveló que la distribución de MLGs es diferente en las dos zonas de muestreo (Test de χ^2 , $P < 0,0001$). Algunos genotipos estuvieron significativamente más representados o fueron, incluso, específicos, al norte de Camarga (MLG14, 7, 17 y 48) o al sur de Camarga (MLG1, 39, 21 y 9; Fig. 2a). En España, Grecia e Italia, las muestras también se recogieron en diferentes áreas, separadas entre sí por al menos 50 kilómetros. En España se realizaron muestreos en tres regiones diferentes: Andalucía en el sur (delta del Guadalquivir), Cataluña (delta del Ebro) en el norte, y Valencia (zona de la laguna de la Albufera) en el centro. La figura 2b muestra que los tres genotipos más frecuentes se encuentran, bien en las tres zonas (MLG107), o bien en Valencia y Cataluña (MLG23 y 3). Por otra parte, algunos MLGs fueron específicos de Andalucía, como MLG66, 44, y 106. En Grecia, las muestras fueron recogidas en dos regiones del norte: Tesalónica y la zona nordeste de Tesalónica. Todos los genotipos identificados fueron, o específicos (MLG44), o predominaron en una sola región (MLG7 y 59 o MLG39; Figura 2c). En Italia, los muestreos se llevaron a cabo en tres áreas diferentes: dos sitios en Lombardia-Piamonte, a una distancia de 70 km, y el tercero en Venecia. El genotipo más frecuente (MLG14) se detectó en las tres áreas y no se detectó ningún MLG específico en ninguna de estas regiones (Fig. 2d).

Para caracterizar con mayor precisión la diversidad a escala sub-regional, se compararon las cepas del hongo recogidas de cuatro campos en Francia en 2006 y 2009. La composición en MLG fue significativamente diferente de una parcela a otra (Fig. 3). El número total de MLGs por campo fue de entre cuatro y ocho. En tres de las parcelas (Vigne - Euro, Chartrousse - Ambra y Juge), un MLG representó más de 50% del número total de cepas mientras que en otros cuatro (Gimeau, Manusclat, Chartrousse - X, Eyselle) fueron dos los MLG dominantes. Hubo dos pares de MLGs que se encontraron en tres de las parcelas: MLG14 y 17 en 2006, y MLG1 y 43 en 2009, pero no solo fueron diferentes entre años, sino que también sus frecuencias fueron significativamente diferentes entre campos. El segundo MLG dominante fue también diferente en estas parcelas. La comparación de las cepas aisladas en una misma localidad (Chartrousse) a partir de dos variedades diferentes (Ambra y una variedad distinta, no identificada) también mostró diferencias significativas en la distribución de MLG. Sobre Ambra se detectaron cinco MLGs, de los cuales MLG1 representaba el 80% de las cepas. Sobre la otra variedad, cultivada en un campo adyacente, se observaron seis MLGs, dos de ellos dominantes: también MLG1 (significativamente menos frecuente que en Ambra, 40%) y MLG39 (Fig. 3). Por lo tanto, mostramos una marcada estructuración geográfica, incluso a una escala pequeña (20.000 ha de arroz distribuidas en una área de 150.000 ha en total para Camarga) y un impacto fuerte de la variedad de origen sobre la estructura de la población.

Se observan MLGs específicos de diferentes áreas de cultivo de arroz en estos países. Este resultado sugiere que existe diferenciación local. Tal diferenciación puede ser el resultado de diferencias en las fuentes de inóculo (lotes de semillas), en las variedades de arroz con distintos niveles de resistencia que se cultivan en cada zona, o en las condiciones agroambientales, o de una combinación de estos factores con un flujo limitado de genes entre campos.

Diversidad genética a nivel de campo

La diversidad genética fue evaluada a nivel de campo. Para este estudio sólo fueron consideradas las muestras que contenían más de 10 cepas recolectadas en un mismo campo de cultivo, de plantas de una sola variedad. Así, se analizaron siete muestras procedentes de Francia, cinco de Grecia, cinco de España y una de Turquía. La diversidad genotípica varió de 0,31 hasta 0,82 con un valor promedio de 0,62 (Tabla 2). El número de MLGs por campo fue de entre tres y ocho, con un promedio de 4,9 (para un promedio de 15,9 cepas por muestra; Tabla 2). En la mayoría de estas 18 poblaciones, uno o dos MLGs representaron más del 50% de las cepas (nueve y ocho poblaciones respectivamente). Los MLGs encontrados en un mismo campo estaban genéticamente más relacionados que los MLGs encontrados en el conjunto de Europa, como demuestra la distribución de las distancias medias entre MLGs. Esto sugiere que, en un campo, los diferentes genotipos detectados derivan principalmente unos de otros por mutaciones.

Arroz rojo vs arroz cultivado

Para probar si el arroz rojo es una posible fuente de inóculo para la piriculariosis del arroz cultivado, se compararon las estructuras de población de estos dos huéspedes en Francia. Para ello utilizamos las muestras recogidas entre 2006 y 2009 sobre ambos huéspedes en un mismo campo o en campos contiguos. Si el arroz rojo es la fuente del inóculo, se espera que las estructuras de la población sean similares. En conjunto, la distribución en los diferentes MLGs no fue significativamente diferente (prueba χ^2 , $P = 0,95$; Fig. 4). Quince MLGs fueron comunes a ambos huéspedes, aunque otros 24 y 12 MLGs se identificaron sólo en el arroz cultivado y en el arroz salvaje, respectivamente. Pero la mayoría de estos MLGs específicos representaron menos de 2,6% del número total de cepas, y, probablemente, no fueron detectados sobre el otro huésped por su limitada presencia. Estos datos sugieren que las poblaciones de ambos huéspedes son similares y que el arroz rojo puede representar una fuente de inóculo primario. Sin embargo, las frecuencias de cinco MLGs fueron significativamente diferentes entre los dos huéspedes (prueba χ^2 , $P < 0,01$): MLG7, 21 y 27 estuvieron significativamente más representados en el arroz rojo, mientras que en el arroz cultivado, los genotipos MLG39 y 43 fueron dominante y único, respectivamente (Fig. 4). Esto puede sugerir cierta especificidad. Para probar esta hipótesis, y porque la estructura genética general puede no reflejar la estructura local, se compararon las frecuencias para las cepas aisladas en un mismo lugar, en cuatro campos. En tres de estos campos (1, 3, 4; Fig. 5), uno o dos MLGs estuvieron significativamente más representados en un huésped que en otro, incluyendo los MLG7, 39 y 43 mencionados arriba. Sin embargo, en cada campo, la distribución general de MLGs no fue significativamente diferente entre las muestras recogidas de arroz rojo y de arroz cultivado. En tres campos (1, 2, 4; Fig 5) el MLG dominante fue el mismo en ambos huéspedes. Basándose en estos resultados, parece que el arroz rojo y el arroz cultivado hospeden las mismas cepas. Por lo tanto, la hipótesis del arroz rojo como fuente de inóculo primario para el arroz cultivado no se puede excluir.

*Evolución del polimorfismo de *M. oryzae* durante los últimos 25 años*

En Francia y en Italia se han recogido muestras de piriculariosis regularmente desde 1986. Por lo tanto, decidimos estudiar la evolución de los MLGs a través de esos 25 años en estos dos

países. Aunque el tamaño de las muestras está bastante desequilibrado, tratamos de estudiar la evolución de la población a través del tiempo mediante la comparación de la frecuencia de los MLGs en Francia durante los períodos 1986-1994 (19 cepas), 1996-2000 (13 cepas) y 2001-2009 (444 cepas). La mayoría de los MLGs dominantes antes de 1994 todavía estaban presentes en 2001-2009 (MLG1, 7 y 9; Fig. 6a), pero sus frecuencias cambiaron significativamente. Se detectaron MLGs específicos de cada período: los MLGs contemporáneos MLG14 (el más frecuentemente observado en Europa), 39 y 21 no se detectaron en los períodos anteriores; por el contrario, otros han desaparecido hace tiempo o recientemente (MLG4, 5, 10, 12, 13, 94, 122 y 123), o están desapareciendo (MLG2, 6, 8, y 11). En general, el cambio de composición de la población parece gradual; algunos genotipos desaparecen y algunos otros aparecen progresivamente, una evolución que se puede observar en un plazo de 8-10 años. En contraste, la población italiana parece mucho más estable (Fig. 6b), a pesar de que aparecen en bajas frecuencias nuevos MLGs (solamente en 2001-2009).

Discusión

Nuestro análisis de la diversidad genética de 987 cepas europeas del hongo responsable de la piriculariosis del arroz ha demostrado que los MLGs más frecuentes se observaron en la mayoría de los países europeos examinados. Estos datos están de acuerdo con resultados anteriores (Jorge, 1996; Roumen et al, 1997) que apoyan una extensa distribución de algunos linajes. Como la dispersión a larga distancia por esporas es poco probable, esta distribución relativamente amplia de MLGs entre muchos países distantes podría explicarse por el intercambio de semillas infectadas entre esos países. De hecho, en Europa no se requiere control fitosanitario de la presencia del hongo de la piriculariosis en las semillas comerciales. En los últimos 20 años, la mayoría de las nuevas variedades cultivadas en Francia se habían cultivado también en Italia antes y, a causa de la importante capacidad de producción de semillas, la mayoría de la semilla utilizada en Francia provenía de Italia. Por lo tanto, el flujo de semillas de arroz ocurre principalmente de Italia a Francia. Al comparar el año de la primera detección en la muestra de los MLGs presentes en Italia y en Francia en los últimos 20 años, 14 MLGs fueron detectados antes en Italia frente a 3 en Francia (datos no presentados). La transferencia intercontinental de material vegetal por los seres humanos, que resulta en un flujo de genes importante, ya se ha observado afectando a diferentes patógenos (Zhou et al, 2007; Fry, 2008; Robin et al, 2009) y se sospechaba también para *M. oryzae* (Tharreau et al, 2009). La importancia de las semillas infectadas como inóculo primario se demostró ya para *M. oryzae* (Long et al, 2001, Faivre-Rampant et al, 2012).

Se compararon las estructuras de población del arroz rojo y del cultivado en Francia para probar si el primero puede ser una posible fuente de inóculo para el segundo. La hipótesis de que el arroz rojo es una fuente primaria de inóculo en Europa no puede ser excluida. Pero, en algunos casos, algunos MLGs son específicos de uno u otro huésped. Por lo tanto, nuestro estudio reveló que, en algunos casos, las dos poblaciones pueden ser diferenciadas. Además, las observaciones de campo muestran claramente que el arroz rojo no es la única fuente de inóculo primario, porque campos de arroz sin presencia de arroz rojo durante varios años, pueden verse severamente atacados. En tales casos, las semillas infectadas son probablemente la fuente primaria de inóculo, como se demostró anteriormente (Long et al, 2001).

Este trabajo también confirmó, con una muestra mucho más amplia de cepas, la existencia de algunos MLGs específicos a nivel nacional, lo que sugiere una diferenciación entre los países europeos. Este fue el caso de Francia, España, Turquía y Hungría. Todos los MLGs húngaros son específicos. En este caso particular, el limitado intercambio de semillas de arroz entre Hungría y los otros países europeos productores de arroz es suficiente para explicar esta diferenciación. Este factor también puede ser importante para Turquía.

países. Aunque el tamaño de las muestras está bastante desequilibrado, tratamos de estudiar la evolución de la población a través del tiempo mediante la comparación de la frecuencia de los MLGs en Francia durante los períodos 1986-1994 (19 cepas), 1996-2000 (13 cepas) y 2001-2009 (444 cepas). La mayoría de los MLGs dominantes antes de 1994 todavía estaban presentes en 2001-2009 (MLG1, 7 y 9; Fig. 6a), pero sus frecuencias cambiaron significativamente. Se detectaron MLGs específicos de cada período: los MLGs contemporáneos MLG14 (el más frecuentemente observado en Europa), 39 y 21 no se detectaron en los períodos anteriores; por el contrario, otros han desaparecido hace tiempo o recientemente (MLG4, 5, 10, 12, 13, 94, 122 y 123), o están desapareciendo (MLG2, 6, 8, y 11). En general, el cambio de composición de la población parece gradual; algunos genotipos desaparecen y algunos otros aparecen progresivamente, una evolución que se puede observar en un plazo de 8-10 años. En contraste, la población italiana parece mucho más estable (Fig. 6b), a pesar de que aparecen en bajas frecuencias nuevos MLGs (solamente en 2001-2009).

Discusión

Nuestro análisis de la diversidad genética de 987 cepas europeas del hongo responsable de la piriculariosis del arroz ha demostrado que los MLGs más frecuentes se observaron en la mayoría de los países europeos examinados. Estos datos están de acuerdo con resultados anteriores (Jorge, 1996; Roumen et al, 1997) que apoyan una extensa distribución de algunos linajes. Como la dispersión a larga distancia por esporas es poco probable, esta distribución relativamente amplia de MLGs entre muchos países distantes podría explicarse por el intercambio de semillas infectadas entre esos países. De hecho, en Europa no se requiere control fitosanitario de la presencia del hongo de la piriculariosis en las semillas comerciales. En los últimos 20 años, la mayoría de las nuevas variedades cultivadas en Francia se habían cultivado también en Italia antes y, a causa de la importante capacidad de producción de semillas, la mayoría de la semilla utilizada en Francia provenía de Italia. Por lo tanto, el flujo de semillas de arroz ocurre principalmente de Italia a Francia. Al comparar el año de la primera detección en la muestra de los MLGs presentes en Italia y en Francia en los últimos 20 años, 14 MLGs fueron detectados antes en Italia frente a 3 en Francia (datos no presentados). La transferencia intercontinental de material vegetal por los seres humanos, que resulta en un flujo de genes importante, ya se ha observado afectando a diferentes patógenos (Zhou et al, 2007; Fry, 2008; Robin et al, 2009) y se sospechaba también para *M. oryzae* (Tharreau et al, 2009). La importancia de las semillas infectadas como inóculo primario se demostró ya para *M. oryzae* (Long et al, 2001, Faivre-Rampant et al, 2012).

Se compararon las estructuras de población del arroz rojo y del cultivado en Francia para probar si el primero puede ser una posible fuente de inóculo para el segundo. La hipótesis de que el arroz rojo es una fuente primaria de inóculo en Europa no puede ser excluida. Pero, en algunos casos, algunos MLGs son específicos de uno u otro huésped. Por lo tanto, nuestro estudio reveló que, en algunos casos, las dos poblaciones pueden ser diferenciadas. Además, las observaciones de campo muestran claramente que el arroz rojo no es la única fuente de inóculo primario, porque campos de arroz sin presencia de arroz rojo durante varios años, pueden verse severamente atacados. En tales casos, las semillas infectadas son probablemente la fuente primaria de inóculo, como se demostró anteriormente (Long et al, 2001).

Este trabajo también confirmó, con una muestra mucho más amplia de cepas, la existencia de algunos MLGs específicos a nivel nacional, lo que sugiere una diferenciación entre los países europeos. Este fue el caso de Francia, España, Turquía y Hungría. Todos los MLGs húngaros son específicos. En este caso particular, el limitado intercambio de semillas de arroz entre Hungría y los otros países europeos productores de arroz es suficiente para explicar esta diferenciación. Este factor también puede ser importante para Turquía.

Nuestro análisis muestra que, a nivel de campo, hay una diversidad genética y que varios genotipos coexisten. Además, mostramos una marcada estructuración geográfica a una escala pequeña y un impacto fuerte de la variedad de origen sobre la estructura de la población. Estas informaciones son importantes para el manejo de la piriculariosis.

Agradecimientos

Queremos agradecer a Laura Crispino y Gianluca Bruschi su excelente apoyo técnico. Este trabajo fue financiado en parte con fondos de la Unión Europea (proyecto EURIGEN del GENRES Programme, proyecto Action 049), de Génoplante (proyecto ERA-Net-Plant Genomics GENEBLAST), de FranceAgrimer, de la Fondazione Cariplo (proyecto RICEIMMUNITY) y del Ministerio Italiano de Agricultura (proyecto VALORYZA).

Referencias

- Adamcikova K., Juhasova G. y Kobza M. (2006). Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Stivnicko-krupinska subpopulation in Slovakia. *Plant Protection Science* 42: 119-124.
- Adreit H., Santoso, Andriantsimalona D., Utami D.W., Nottéghem J.L., Lebrun M.H. y Tharreau D. (2007). Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes* 7: 667-670.
- Aguin O., Mata M., Mansilla J.P. y Romero A. (2005). Occurrence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Galicia (NW Spain). *Acta Horticulturae* 693: 597-603.
- Bonman J.M., Khush G.S. y Nelson R.J. (1992). Breeding rice for resistance to pests. *Annual Review of Phytopathology* 30: 507-528.
- Braganca H., Simoes S., Onofre N., Tenreiro R. y Rigling D. (2007). *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology* 37: 391-402.
- Chen D., Zeigler R.S., Leung H. y Nelson R.J. (1995). Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in Philippines. *Phytopathology* 85: 1011-1020.
- Correa-Victoria F.J., Zeigler R.S. y Levy M. (1994). Virulence characteristics of genetic families of *Pyricularia grisea* in Colombia. In: Zeigler R.S., Leung S.A., Teng P.S., eds. *Rice Blast Disease*. Wallington, Oxon, UK: CABI/IRRI, 211-229.
- Correll J.C., Harp T.L., Guerber J.C., Zeigler R.S., Liu B., Cartwright R.D. y Lee F.N. (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology* 90: 1396-1404.
- Correll J.C., Boza E.J., Seyran E., Cartwright R.D., Jia Y.L. y Lee F.N. (2009). Examination of the rice blast pathogen population diversity in Arkansas, USA - Stable or unstable? In: Wang G.L. and Valent B., eds. *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer-Verlag, 217-228.
- Cortesi P., Rigling D. y Heiniger U. (1998). Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss populations of *Cryphonectria parasitica*. *European Journal of Forest Pathology* 28: 167-176.
- Don L.D., Urashima A.S., Tosa Y., Nakayashiki H. y Mayama S. (1999a). Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. *Annual Phytopathological Society of Japan* 65: 15-24.

- Don L.D., Tosa Y., Nakayashiki H. y Mayama S. (1999b). Population structure of the rice blast pathogen in Vietnam. *Annual Phytopathological Society of Japan* 65: 475-479.
- Dutech C., Fabreguettes O., Capdevielle X. y Robin C. (2010). Multiple introductions of divergent genetic lineages in an invasive fungal pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in France. *Heredity* 105: 220-228.
- Excoffier L., y Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Faivre-Rampant O., Geniès L., Piffanelli P. y Tharreau D. (2012). Rice blast is transmitted from seeds to adult plants in a non-systemic way. *Plant Pathology* in press.
- Fry W. (2008). Plant diseases that changed the world: *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9: 385-402.
- Fry W.E. y Goodwin S.B. (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease* 81: 1349-1357.
- Goodwin S.B., Cohen B.A., Deahl K.L. y Fry W.E. (1994). Migration from northern Mexico was the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84: 553-558.
- Han S.S., Ra D.S. y Nelson R.J. (1993). Comparison of RFLP-based phylogenetic trees and pathotypes of *Pyricularia oryzae* in Korea. *Rural Development and Administration Journal of Agricultural Science* 35: 315-323.
- Javan-Nikkhah M., McDonald B.A., Banke S. y Hedjaroude G.A. (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR Fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology* 110: 909-919.
- Jorge V. (1996). *Analyse génétique de la structure des populations européennes de Magnaporthe grisea*. Master in Plant Pathology, University of Paris-Sud, France (in French, with English abstract).
- Juhasova G., Kobza M. y Adamcikova K. (2005). Diversity of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr vegetative compatibility (vc) types in Slovakia. *Acta Horticulturae* 693: 635-640.
- Kumar J., Nelson R.J. y Zeigler R.S. (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics* 152: 71-84.
- Lara-Álvarez I., Tharreau D., Aguilar-Portero M. y Castejón-Muñoz M. (2010). Evidence for rapid changes in the population genetic structure of *Magnaporthe oryzae* in Southern Spain. *Journal of Phytopathology* 158: 785-791.
- Levy M., Romao J., Marchetti M.A. y Harmer J.E. (1991). DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotypic diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 3: 95-102.
- Levy M., Correa-Victoria F.J., Zeigler R.S., Xu S. y Harmer J.E. (1993). Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83: 1427-1433.
- Long D.H., Correll J.C., Lee F.N. y TeBeest D.O. (2001). Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant Disease* 85: 612-616.
- Nottéghem J.L. (1977). Mesure au champ de la résistance horizontale du riz à *Pyricularia oryzae*. *L'Agronomie Tropicale* 32: 400-412 (in French).

- Park S.Y., Milgroom M.G., Han S.S., Kang y Lee Y.H. (2003). Diversity of pathotypes and DNA fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. *Phytopathology* 93: 1378-1385.
- Park S.Y., Milgroom M.G., Han S.S., Kang S. y Lee Y.H. (2008). Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea. *Phytopathology* 98: 436-442.
- Perlerou C. y Diamandis S. (2006). Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. *Forest Pathology* 36: 413-421.
- Perrier X. y Jacquemoud-Collet J.P. (2006). DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Perrier X, Flori A, Bonnot F. 2003. Data analysis method. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszman JC, eds. *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Enfield Science, Montpellier, France: 43-76.
- Piotti E., Rigano M.M., Rodino D., Rodolfi M., Castiglione S., Picco A.M. y Sala F. (2005). Genetic structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. isolates from Italian paddy fields. *Journal of Phytopathology* 153: 80-86.
- Pritchard J.K., Stephens M. y Donnelly P.. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59.
- Brook N.Y: The State University of New York at Stony Brook.
- Robin C., Anziani C. y Cortesi P. (2000). Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730-737.
- Robin C. y Heiniger U. (2001). Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 361-367.
- Robin C., Capdevielle X., Martin M., Traver C. y Colinas C. (2009). *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathology* 58: 527-535.
- Roumen E., Levy M. y Nottéghem J.L. (1997). Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology* 103: 363-371.
- Saleh D., Xu P., Shen Y., Li C.Y., Adreit H., Milazzo J., Ravigné V., Bazin E., Nottéghem J.L., Fournier E. y Tharreau D. (2012). Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology* 21:1330-1344.
- Silué D., Nottéghem J.L. y Tharreau D. 1992. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82: 577-580.
- Sotirovski K., Papazova-Anakieva I., Grunwald N.J. y Milgroom M.G. (2004). Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology* 53: 325-333.
- Teacher A.G.F. y Griffiths D.J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources* 11: 151-153.
- Tharreau D., Fudal I., Andriantsimialona D., Santoso, Utami D., Fournier E., Lebrun M.H. y Nottéghem J.L. (2009). World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Wang GL, Valent B, eds. Springer-Verlag, 209-215.

- Xia J.Q., Correl J.C., Lee F.N., Marchetti M.A. y Rhoads D.D. (1993). Fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83: 1029-1035.
- Xia J.Q., Correl J.C., Lee F.N. y Ross W.J. (2000). Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selection. *Plant Disease* 84: 877-884.
- Zamora P., Martín A.B., Arrate J., Rigling D. y Diez J.J. (2008). Detection of the vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Castilla y León region. *Acta Horticulturae* 784 : 159-162.
- Zeigler R.S. (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology* 36: 245-249.
- Zhou X., Burgess T.I., De Beer Z.W., Lieutier F., Yart A., Klepzig K., Carnegie A., Mena Portales J., Wingfield B.D. y Wingfield M.J. (2007). High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology* 16: 89-99.

Tabla 1 Descripción de los primers y rango de tamaños alélicos de los 11 marcadores microsatélites usados para estudiar la diversidad genética de *Magnaporthe oryzae* en Europa

Marker name	Repeat motif	Primers	Multiplex pool	Allele size range (bp)
Pyms37-38	CA/GT ₆ +CT/GA ₁₂	F: (NED)-ACCCTACCCCACTCATTTTC R: AGGATCAGCCAATGCCAAGT	4	188-278
Pyms47-48	TA ₁₅	F: (FAM)-TCACATTTGCTTGTCTGGAGT R: AGACAGGGTTGACGGCTAAA	1	156-195
Pyms63-64	CT/GA ₁₅	F: (NED)-TTGGGATCTTCGGTAAGACG R: GCCGACAAGACACTGAATGA	3	149-177
Pyms77B-78	CA/GT ₂₄	F: (PET)-AGGCTCTCTGCCTACGAAGT R: GCTTTTCGGCAAGCCTAATC	2	220
Pyms83-84B	TCA/AGT ₁₃	F: (PET)-GTCTGCCTCGACTCCTTCAC R: GCAAAGTTGTTTGAGCAAGG	3	112
Pyms233-234	CAG/GTC ₁₀	F: (FAM)-TGAGATGGACCGCATGATTA R: TTGATGGCAGAGACATGAGC	4	239-283
Pyms319-320	CAA/GTT ₆	F: (NED)-TAAGACCACTGGCGGAATCT R: GGCTTTGTCTGGTTGTACGG	4	283-292
Pyms409-410	TA/AT ₂₃	F: (FAM)-TCCCAGTACTTGCCCATCTC R: CTCCGATTCA TGGCACACAC	2	311
Pyms427-428	AT/TA ₁₆	F: (VIC)-CTGTCAACCAACCAAGACG R: TTGCCCTGATTTGTGTCAGTCA	1	196-242
Pyms607-608	GCA/CGT ₁₃	F: (VIC)-CCCAAGCTCCATAATACGCTAC R: TCCGAGACTCTTTGGATAGCAC	3	271-302
Pyms657-658	CA/GT ₁₂	F: (VIC)-ATCAGTCCGAACCCACAAAGC R: ATGTGTGGACGAACCAATCC	2	161-171

Tabla 2 Diversidad genética de *Magnaporthe oryzae* en 18 campos de Europa (FR: Francia, GR: Grecia, SP: España, TR: Turquía).

	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FR6	FR7	GR1	GR2	GR3	GR6	GR7	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	TR1	Average
Sample size	10	11	13	15	23	23	37	10	10	10	10	10	12	13	13	18	29	19	15.9
No of MLG	7	7	3	3	5	6	8	6	7	4	4	3	7	3	6	3	3	4	4.9
Genotypic diversity	0.82	0.81	0.46	0.34	0.31	0.71	0.77	0.80	0.82	0.70	0.58	0.58	0.81	0.38	0.78	0.54	0.47	0.43	0.62
Frequency of most frequent MLG	0.30	0.27	0.69	0.80	0.83	0.39	0.32	0.30	0.30	0.40	0.60	0.50	0.33	0.77	0.31	0.61	0.66	0.74	0.51

Figura 1: Distribución de genotipos multilocus (MLGs) representativos de la diversidad genética de *Magnaporthe oryzae* en siete países europeos: Francia, Grecia, Hungría, Italia, Portugal, España y Turquía.

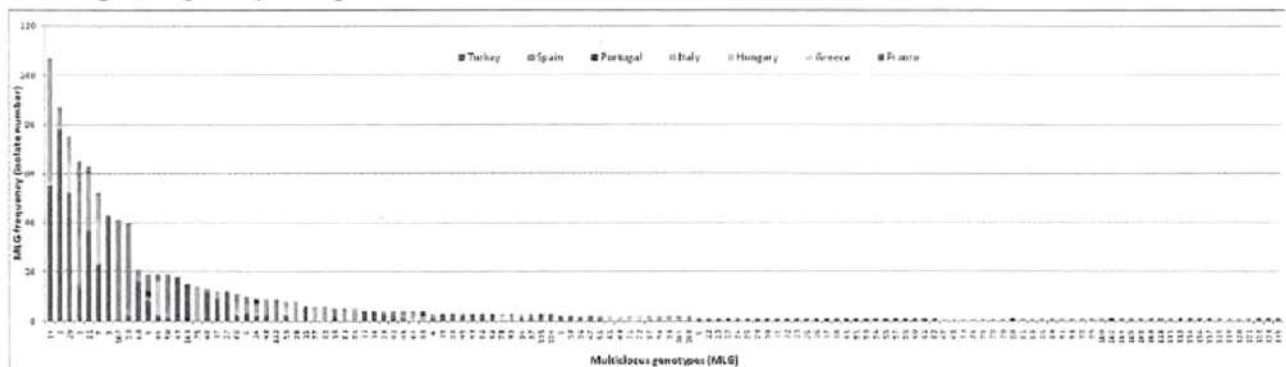
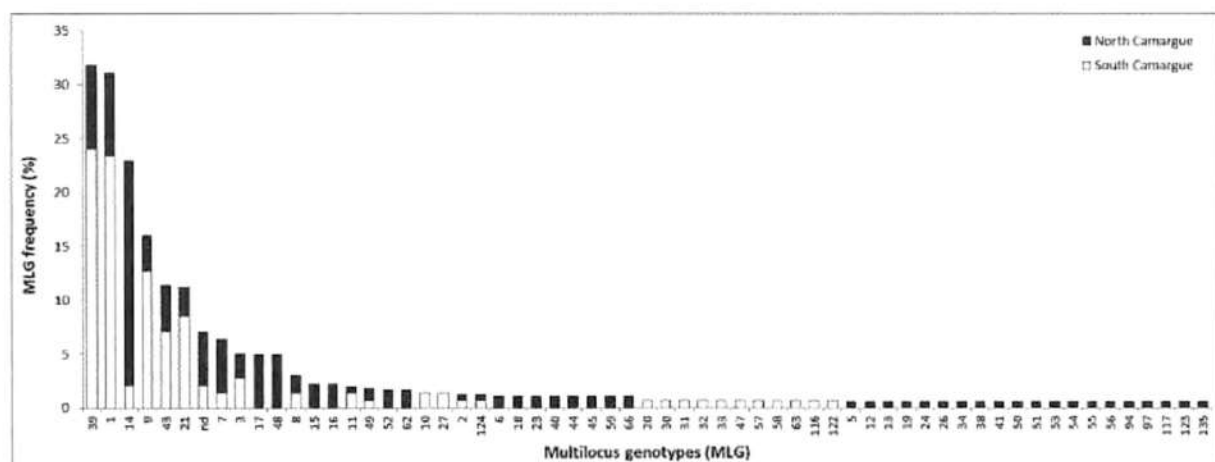
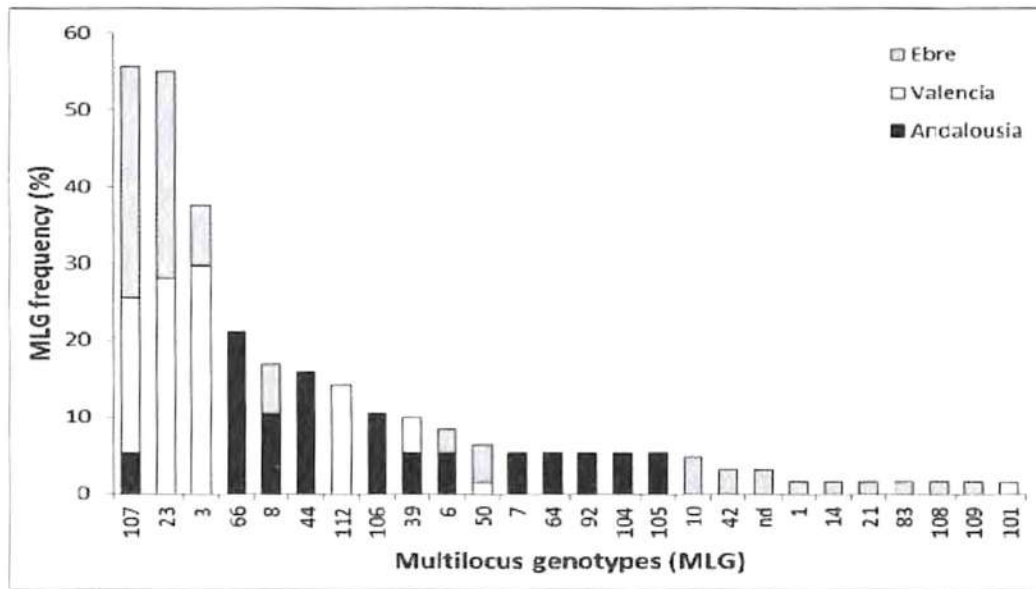


Figura 2: Distribución de genotipos multilocus (MLGs) representativos de la diversidad genética de *Magnaporthe oryzae* dentro de Francia, España, Grecia e Italia. (A) Area arrocera francesa: Camarga (norte y sur); (B) Areas arroceras españolas: Delta del Ebro (norte), Valencia (centro) y Andalucía (sur); (C) Areas arroceras griegas cerca de Tesalónica (GR1) y al nordeste de Tesalónica (GR2); (D) Areas arrozales italianas: Piemonte-Lombardía (IT1, IT2) y Veneto (IT3).

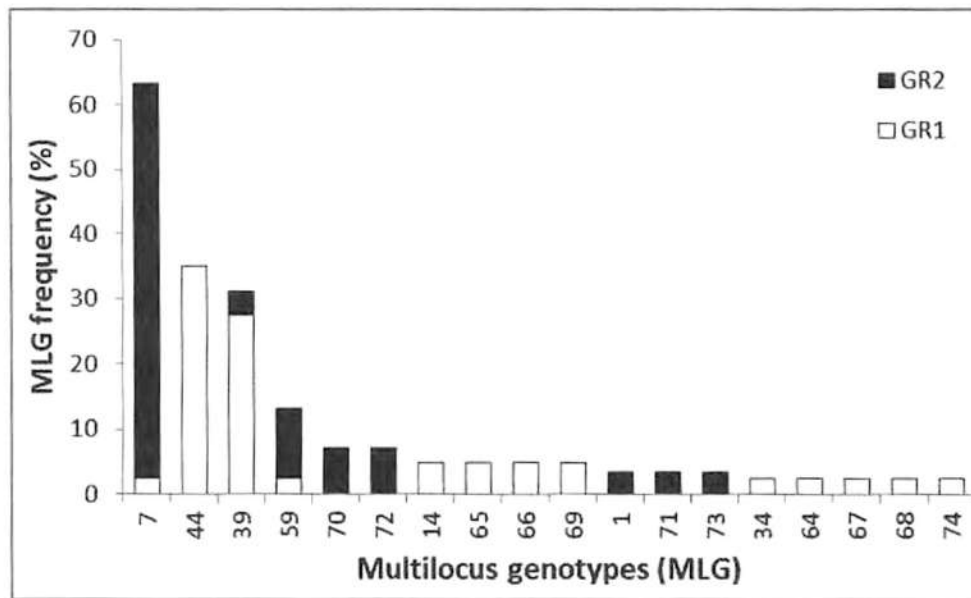
A.



B.



C.



D.

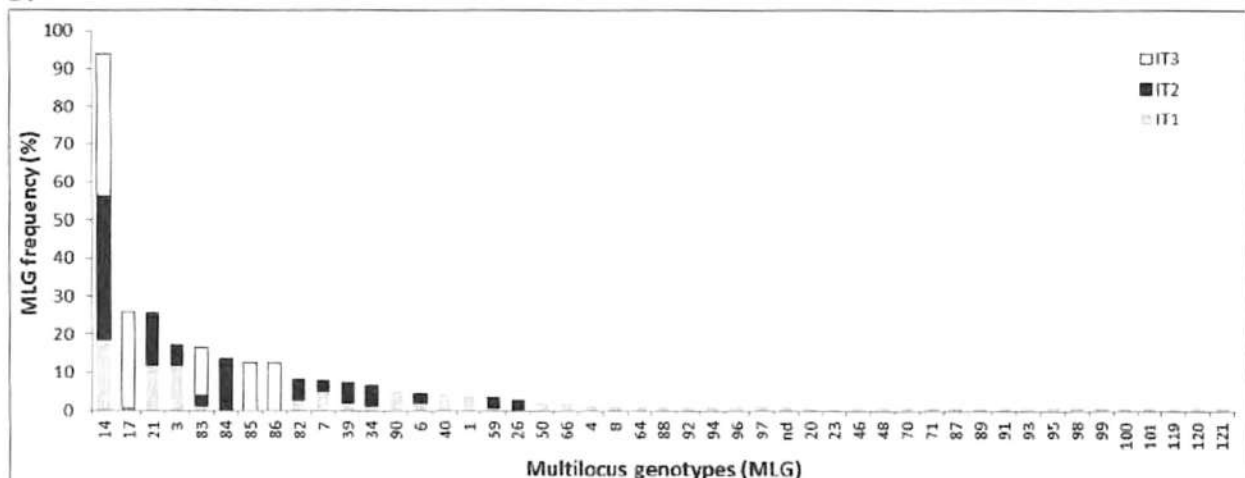


Figura 3: Diversidad genotípica en seis campos de cultivo en Francia. Cada campo es designado por el nombre del lugar y el nombre de la variedad entre corchetes (X o Y = nombre varietal indeterminado).

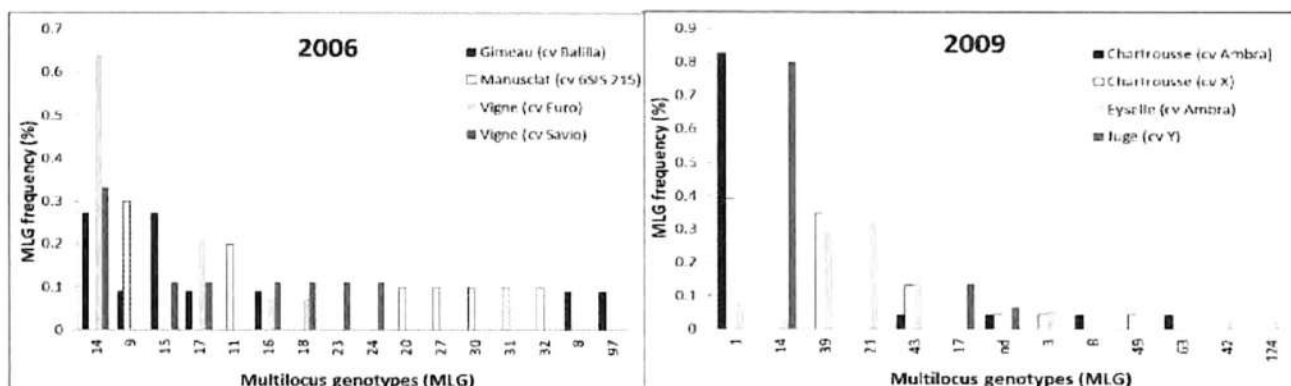


Figura 4: Diversidad genotípica observada en Francia en arroz cultivado y en arroz salvaje del mismo campo de cultivo o de campos adyacentes.

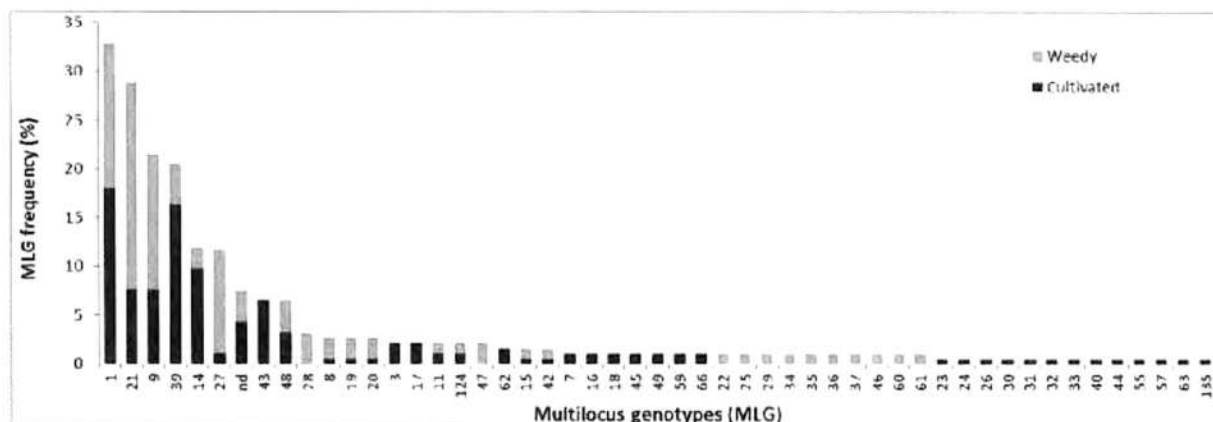


Figura 5: Diversidad genotípica observada en cuatro campos de cultivo de Francia en arroz cultivado y salvaje. *frecuencia significativamente diferente entre arroz salvaje y cultivado (test χ^2 , <0.05).

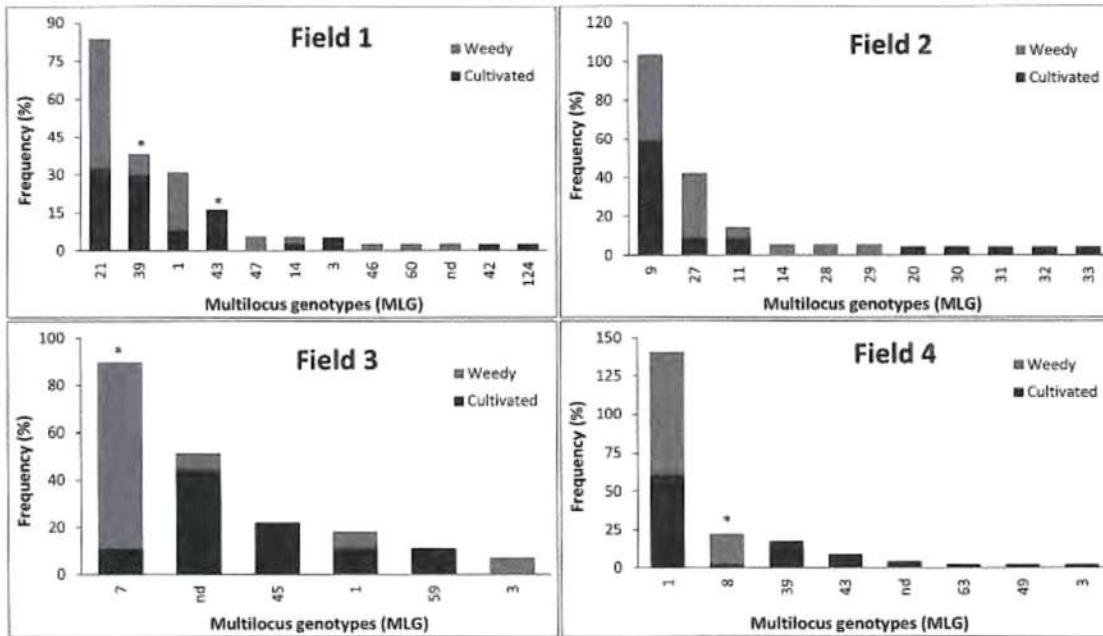
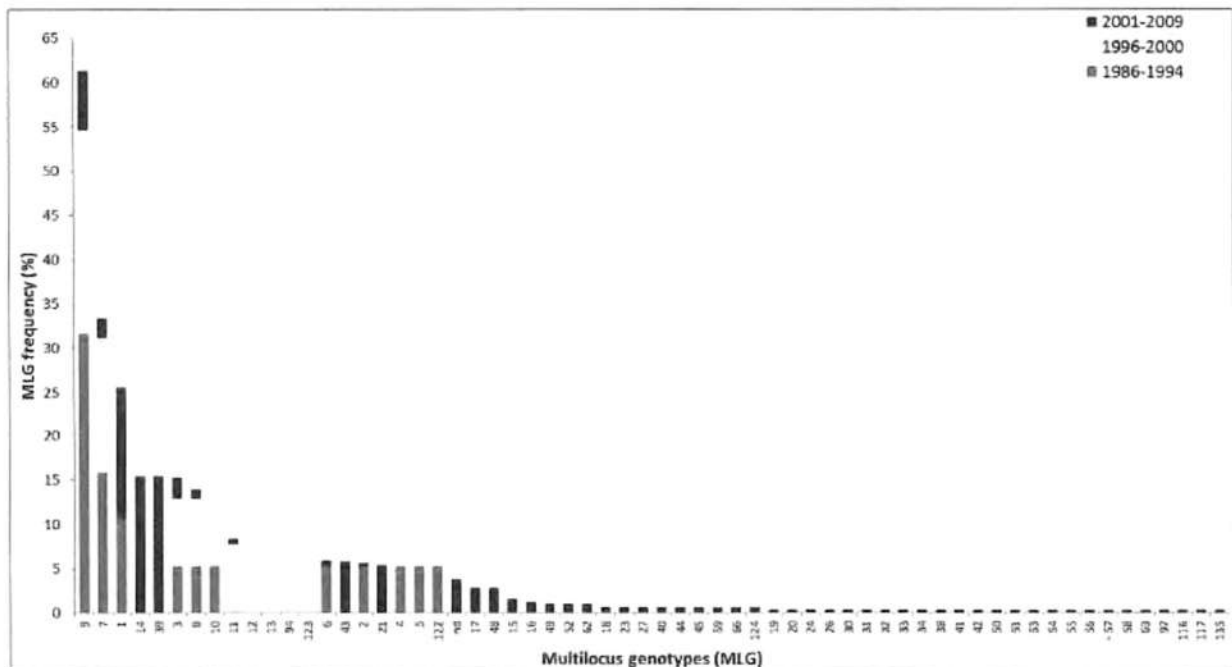


Figura 6: Evolución del polimorfismo de *Magnaporthe oryzae* en Francia (A) e Italia (B) en los últimos 25 años.

A.



B.

