

# Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to Wheat Blast disease

## Evaluación de trigos sintéticos hexaploides para resistencia a la enfermedad Piricularia o Brusone

Cinthia Carolina Cazal-Martínez\*, Alice Rocio Chávez, Yessica Magaliz Reyes-Caballero, Man Mohan Kohli, Departamento de Investigación, Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas, Central, Avenida Brasilia 840, Asunción, Paraguay; Pastor Enmanuel Pérez-Estigarríbia, Facultad de Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, Mcal. Estigarribia Km 11,5. Central, San Lorenzo, Paraguay. \*Autor de correspondencia: cccazalm86@gmail.com

Recibido: 31 de Julio, 2018.

Aceptado: 19 de Octubre, 2018.

Cazal-Martínez CC, Chávez AR, Reyes-Caballero YM, Kohli MM and Pérez-Estigarríbia PE. 2018. Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to Wheat Blast disease. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 35-49.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1807-5

Primera publicación DOI: 10 de Noviembre, 2018.

First DOI publication: November 10, 2018.

**Resumen.** La enfermedad Brusone en trigo es causada por el hongo *Pyricularia oryzae* patotipo *Triticum*. Desde hace 30 años, esta enfermedad ha sido endémica de Sudamérica hasta su aparición en Bangladés en el año 2016, abriendo la posibilidad de su expansión a otras regiones. Considerando poca disponibilidad de las fuentes de resistencia conocida en trigo y conociendo la resistencia de los trigos sintéticos hexaploides (TSHs) a distintos tipos de estrés, el objetivo de este trabajo fue evaluar una colección por su resistencia a la Piricularia. Los ensayos fueron realizados en el Centro de Investigación Hernando Bertoni, Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, Paraguay. Las infecciones

**Abstract.** Wheat Blast disease is caused by the fungus *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum*. The disease has been endemic to tropical South American region for over 30 years until 2016, when it occurred in Bangladesh, opening the possibility of its expansion to other regions. Considering the limited availability of known sources of resistance in wheat and the synthetic hexaploid wheats are known to be a source of resistance to multiple type of stresses, the objective of this research was to evaluate a collection of synthetic hexaploid wheats for their resistance to Wheat Blast. The experiments were carried out in the Hernando Bertoni Research Center, Paraguayan Institute of Agricultural Technology, Paraguay. Test spikes were inoculated, concentration of  $5 \cdot 10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup>. The reaction was evaluated 15 days after inoculation and observed for next 15 days to calculate the disease-progress. Sixty-four synthetic hexaploid wheats, provided by the International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, were subjected to infections by isolate (P14ATae039) of *P. oryzae*, 18 materials were selected based on their maximum values of reaction, to be reevaluated with two

fueron realizadas en espigas, concentración  $5.10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup>. La reacción se evaluó a los 15 días después de la inoculación y observada durante los próximos 15 días para calcular el avance de la enfermedad. Sesenta y cuatro TSHs proporcionados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México, fueron sometidos a infecciones por un aislado (P14ATae039) de *P. oryzae.*, donde 18 materiales fueron seleccionados por su valor máximo de reacción, para una reevaluación con dos aislados P14ATae039 y P14YTae031. Los trigos TS29, TS49 fueron identificados como nuevas fuentes de resistencia a Brusone, al igual que TS73 que es moderadamente susceptible, pero de distinto origen genético. Para nuestro conocimiento este es el primer reporte de selección de los trigos sintéticos hexaploides como nuevas fuentes de resistencia genética para Brusone de trigo.

**Palabras clave:** Enfermedad fúngica, resistencia a patógeno, *Aegilops tauschii*, *Triticum durum*.

La enfermedad Piricularia o Brusone de trigo, es considerada como una de las enfermedades emergentes en el mundo, causada por el hongo *Pyricularia oryzae*, (sinónimo *Magnaporthe oryzae* Catt.) (Couch y Kohn, 2002). Su especificidad en trigo fue atribuida a una subpoblación denominada como *Triticum patotipo* (MoT) por Cruz y Valent (2017).

Brusone ha sido una enfermedad endémica en la región tropical de Sudamérica, abarcando los llanos de Bolivia, Brasil central y centro sur y Paraguay (Kohli *et al.*, 2011), hasta su primer reporte en Bangladés en el año 2016 (Malaker *et al.*, 2016), lo que evidencia la posibilidad de su expansión en otras regiones similares. Teniendo en cuenta que el control químico es poco eficaz y en condiciones favorables las pérdidas pueden ser de hasta 80% de la producción (Kohli *et al.* 2011), la búsqueda

different isolates P14ATae039 and P14YTae031. TS29, TS49 synthetic wheat were identified as new sources of resistance to wheat blast and TS73 wheat that is moderately susceptible, but of different genetic origin. To our best knowledge, this is the first report of synthetic hexaploid wheats selected as new sources of genetic resistance to wheat blast disease.

**Key words:** Fungal disease, resistance to pathogen, *Aegilops tauschii*, *Triticum durum*.

The Wheat Blast disease is considered one of the emerging diseases in the world, and is caused by the fungus *Pyricularia oryzae*, (synonym *Magnaporthe oryzae* Catt.) (Couch and Kohn, 2002). Its specificity in wheat was attributed to a subpopulation named *Triticum* pathotype (MoT) by Cruz and Valent (2017).

This disease has been endemic to the tropical region of South America, covering the plains of Bolivia, central and south-central Brazil, and Paraguay (Kohli *et al.*, 2011), up to its first report in Bangladesh in 2016 (Malaker *et al.*, 2016), which shows its possibility of expansion to other similar regions. Considering that chemical control is not very efficient and under favorable conditions, losses may be of up to 80% of the production (Kohli *et al.* 2011), the search for resistance to this pathogen is crucial to ensure the regional and global production of wheat.

The most efficient resistance to wheat blast reported recently is related to the translocation of the 2NS/2AS, from the *Triticum ventricosum* (Tausch) Cess, (Cruz *et al.* 2016). In a recent study, Chávez and Kohli (2018) identified only two of the commercial Paraguayan wheat varieties with resistance and moderate resistance, displaying the urgency of broadening its genetic base.

de resistencia a éste patógeno es primordial para asegurar la producción de trigo regional y mundial.

Actualmente la resistencia a Brusone más eficiente reportada es la asociada a la translocación del 2NS/2AS, proveniente de *Triticum ventricosum* (Tausch) Cess, (Cruz *et al.* 2016). En un estudio reciente, Chávez y Kohli (2018), identificaron solo dos de las variedades comerciales de trigo paraguayo con resistencia y resistencia moderada, demostrando la necesidad urgente de ampliar su base genética.

Considerando la posibilidad de encontrar mayor variabilidad genética en las especies aliadas al trigo, se identificaron resistencia en dos especies *Aegilops tauschii* y *Aegilops umballulata*. Los Trigos Sintéticos Hexaploides (TSHs), son resultados de las cruces entre trigos duros (*Triticum durum* L.,  $2n=4x=28$ , AABB) y la especie aliada, *Ae. tauschii* ( $2n=2x=14$ , DD) (Ogbonnaya *et al.*, 2013). Varios de los TSHs han mostrado su potencial como fuente importante de alelos para mejorar características agronómicas, como tamaño y forma de granos (Masood *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2013; Rasheed *et al.*, 2014), calidad del pan (Lu *et al.*, 2005), resistencias a estreses abióticos (Sohail *et al.*, 2011) y bióticos (Gul Kazi *et al.*, 2012; Jighly *et al.*, 2016) Teniendo en cuenta éstos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar un grupo de TSHs según su reacción a la enfermedad Brusone bajo condiciones controladas de infección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Hernando Bertoni dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (CIHB-IPTA), Caacupé, Paraguay.

Los aislados utilizados, proveniente de las espigas de trigo, fueron identificados morfológicamente

Considering the possibility of finding greater genetic variability in the species allied to wheat, Urushima and Kato (1994) explored *Aegilops* species and found resistance in two species: *Ae. tauschii* and *Ae. umballulata*. The Synthetic Hexaploid Wheats (SHWs) are a result of crosses between durum wheats (*Triticum durum* L.,  $2n=4x=28$ , AABB) and the allied species, *Ae. tauschii* ( $2n=2x=14$ , DD) (Ogbonnaya *et al.*, 2013). Several of the SHWs have proven their potential as an important source of alleles for the improvement of agronomic traits, such as grain size and shape (Masood *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2013; Rasheed *et al.*, 2014), bread quality (Lu *et al.*, 2005), resistance to abiotic (Sohail *et al.*, 2011) and biotic stresses (Gul Kazi *et al.*, 2012; Jighly *et al.*, 2016). Taking this into account, the aim of this work was to evaluate a group of SHWs according to their reaction to the wheat blast disease under controlled conditions of infection.

## MATERIALS AND METHODS

Trials were carried out in the Hernando Bertoni Research Center, Paraguayan Institute of Agricultural Technology, (CIHB-IPTA), Caacupé, Paraguay.

The isolates used, from the wheat spikes, were morphologically identified following Klaubauf *et al.*, (2014) and confirmed with the specific molecular marker MoT3 (Pieck *et al.*, 2016). Previous evaluations in materials of known reactions of susceptibility and resistance (Caninde 11 and Milan) confirm their capability for infection.

Inoculum were obtained following the method suggested by Marangoni *et al.* (2013). The pieces of filter paper, 0,5 cm in diameter with preserved isolates, were planted in Petri dishes with Oat meal Agar (OA), and incubated for 12 days at 25 °C with

según Klaubauf *et al.*, (2014) e identificados con el marcador molecular específico MoT3 (Pieck *et al.*, 2016). Las evaluaciones previas en materiales de conocida reacción de susceptibilidad y resistencia (Caninde 11 y Milan) confirman su capacidad de infección.

La obtención del inóculo fue lograda mediante la metodología sugerida por Marangoni *et al.* (2013). Los pedazos del papel filtro de 0,5 cm de diámetro con aislados conservados, fueron sembrados en placas de Petri con medio de cultivo Agar-Avena (AA) e incubados durante 12 días a 25 °C con fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente para forzar la esporulación, se aplastaron los micelios en placa y fueron incubados bajo luz constante por 72 horas.

Las inoculaciones forzadas fueron realizadas en mínimo 6 y máximo 10 espigas por genotipo en el estado fenológico de antesis, utilizando un atomizador 1/5 HP 58 PSI *Oilless Airbrush Compressor Kit*, a una concentración de  $5.10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup>. Se utilizó aproximadamente 0,3 mL de inóculo para cada espiga. Las plantas inoculadas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (28±2 °C) y humedad (85±5 %), por un periodo de 72 horas para ambos ensayos.

Los TSHs son materiales con amplia variabilidad en cuanto a su reacción a distintas enfermedades. Considerando reacciones diferenciales en *P. oryzae*, incluso entre aislados viejos y nuevos reportado por Cruz *et al.*, (2016), se utilizó el valor máximo de reacción (VMR) para clasificar los TSHs y garantizar la reproducibilidad del ensayo. La opción de ponderar el material según el VMR sobre el total de espigas evaluadas permite descartar sesgos por escapes fortuitos a la infección (es decir, plantas susceptibles con reacción nula). Este criterio de clasificación es robusto para selección de materiales según su respuesta a la infección, ya que solo los genotipos con magnitud bajo de VMR muestran resistencia.

light periods of 12 hours. Later, in order to force sporulation, the mycelia were crushed on the dish and incubated under constant light for 72 hours.

Forced inoculations were carried out on a minimum of 6 and a maximum of 10 spikes per genotype in the phenological stage of anthesis, using a 1/5 HP 58 PSI *Oilless Airbrush Compressor Kit*, at a concentration of  $5.10^4$  conidia.mL<sup>-1</sup>. Approximately 0,3 mL of inoculum was used for each spike. The inoculated plants were kept under controlled temperature (28±2 °C) and humidity conditions (85±5 %) for a period of 72 hours for both trials.

SHWs are materials with a broad variability in terms of their reactions to different diseases. Considering differential reactions in *P. oryzae*, even between old and new isolates reported by Cruz *et al.*, (2016), the maximum value of reaction (MVR) was used to classify the SHWs and guarantee the reproducibility of the test. The option of pondering the material according to the MVR over the total of spikes evaluated helps discard biases due to fortuitous escapes to the infection (that is, susceptible plants with no reaction). This classification criterion is robust for the selection of materials according to their response to the infection, since only the genotypes with a low MVR display resistance.

Two independent evaluations were carried out on synthetic wheats. In a first evaluation, 64 genotypes of SHWs (Table 1), provided by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), were inoculated with a monosporic isolate (P14ATae039) of the fungus *P. Oryzae*.

In a second evaluation, based on the maximum values of reaction (MVR) for wheat blast on the spike, 18 materials were selected for a second evaluation. The chosen genotypes displayed MVR between resistant and moderately resistant, and as a form of susceptibility control, other susceptible

Se realizaron dos evaluaciones independientes del trigo sintético. En una primera evaluación, 64 genotipos de TSHs (Cuadro 1), proporcionados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), fueron inoculados con un aislado monospórico (P14ATae039) del hongo *P. Oryzae*.

En una segunda evaluación, con base a los valores máximos de reacción (VMR) al Brusone en la espiga, 18 materiales fueron seleccionados para una segunda evaluación. Los genotipos seleccionados presentaron VMR de resistentes a moderadamente resistentes y de modo a control de susceptibilidad se incluyeron otros materiales de reacción susceptibles. Para cubrir un mayor rango de variabilidad patogénica, dos aislados virulentos, P14ATae039 y P14YTae031 fueron utilizados en la segunda inoculación.

La reacción de la enfermedad fue evaluada a los 15 días después de la inoculación (DDI), utilizando la escala propuesta por Chavez *et al.* (2017) modificada para el VMR de siguiente manera: 0 = Sin infección, 1 = Hasta el 10% de la espiga necrosada (resistente), 2 = Hasta el 40% de la espiga necrosada (moderadamente resistente), 3 = Hasta el 60% de la espiga necrosada (moderadamente susceptible) y 4 = 100% de la espiga necrosada (susceptible). Posterior a este periodo, las espigas de siete genotipos que mostraron resistencia o moderada resistencia en la primera lectura y un testigo susceptible se mantuvieron en condiciones descritas anteriormente, para observar el desarrollo de la infección en espigas para los dos aislados por un periodo de 30 días. Para el progreso de la enfermedad, se utilizó el Diseño Completamente al Azar, cada espiga representa una unidad experimental donde se observó la reacción a los 8, 15, 22 y 30 DDI. El cálculo del valor del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) se realizó mediante la función AUDPC (Área Bajo la Curva del Progre-

reaction materials were included. In order to cover a broader range of pathogenic susceptibility, two virulent isolates, P14ATae039 and P14YTae031, were used in the second inoculation.

The reaction to the disease was evaluated 15 days after inoculation (DAI), using the scale proposed by Chavez *et al.* (2017), modified for the MVR as follows: 0 = No infection, 1 = Up to 10% of the spike necrotized (resistant), 2 = Up to 40% of the spike necrotized (moderately resistant), 3 = Up to 60% of the spike necrotized (moderately susceptible), and 4 = 100% of the spike necrotized (susceptible). After this period, the spikes of seven genotypes that displayed resistance or moderate resistance in the first reading, along with a susceptible control, were kept in the conditions described above, to observe the development of the spike infection for both isolates for a 30-day period. For the progress of the disease, we used a totally randomized design; each spike represents an experimental unit in which the reaction was observed at 8, 15, 22 and 30 DAI. The calculation of the value of the area under the disease progress curve was carried out using the function AUDPC, implemented in the package *agricolae* for R version 3.4.2. Analyses of the AUDPC underwent an ANOVA and the comparisons between averages were performed by Test: LSD Fisher Alfa=0,05.

## RESULTS AND DISCUSSION

The data of the first infection and classification of the 64 SHWs based on their maximum values of reaction to an isolate (P14ATae039) are shown in Table 2.

Based on the first evaluation of synthetic wheats, over 10% of the SHWs were classified as Resistant (MVR 0-1), 34% were classified as moderately resistant or moderately susceptible (MVR between 2 and 3), and over 55% as susceptible (MVR 4).

**Cuadro 1. Lista de los trigos sintéticos hexaploides proveídos por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).**

**Table 1. List of synthetic hexaploid wheats provided by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT).**

Código	Pedigree
TS2	DOY1/AE. SQUARROSA (188)
TS3	ALTAR84/AE.SQUARROSA (193)
TS4	ALTAR84/AE.SQUARROSA (198)
TS15	ALTAR84/AE.SQUARROSA (219)
TS22	CROC1/AE. SQUARROSA (224)
TS23	ACO89/AE. SQUARROSA (309)
TS28	YAV-3/SCO//J069/CRA/3/YAV79/4/AE.SQUARROSA (498)
TS29	DOY1/AE. SQUARROSA (511)
TS32	68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (629)
TS33	FGO/USA2111//AE.SQUARROSA (658)
TS34	CROC-1/AE. SQUARROSA (725)
TS35	68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (781)
TS36	68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (783)
TS37	YAR/AE.SQUARROSA (783)
TS39	68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (878)
TS43	68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (890)
TS49	LCK59.61/Ae. SQUARROSA (313)
TS50	LCK61/Ae. SQUARROSA (324)
TS53	GAN/AE.SQUARROSA (408)
TS54	SCA/AE.SQUARROSA (518)
TS55	YAR/AE.SQUARROSA (518)
TS57	SNIPE/YAV79//DACK/TEAL/3/A.SQUARROSA (629)
TS58	D67.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (633)
TS59	D67.2/PARANA//AE.SQUARROSA (659)
TS60	SNIPE/YAV79//DACK/TEA/3/AE.SQUARROSA (700)
TS61	TRN/AE.SQUARROSA (700)
TS62	SNIPE/YAV79//DACK/TEA/3/AE.SQUARROSA (877)
TS63	GAN/AE.SQUARROSA (897)
TS64	YAV-2/TEZ//AE.SQUARROSA (895)
TS65	ARLIN/AE.SQUARROSA (283)
TS67	RASCON/AE. SQUARROSA (312)
TS68	SCOT/MEXI-1//AE. SQUARROSA (314)
TS69	DOY1/AE. SQUARROSA (333)
TS70	DOY1/AE.SQUARROSA (428)

Continúa Cuadro 1

## Continúa Cuadro 1

Código	Pedigree
TS71	DOY1/AE.SQUARROSA (458)
TS72	GREEN/AE.SQUARROSA (458)
TS73	SCA/AE.SQUARROSA (409)
TS74	CP18/GDIZ/3/GOOD//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (409)
TS76	ALTAR84/AE.SQUARROSA (502)
TS77	CROC-1/AE. SQUARROSA (517)
TS78	ZETA/AE. SQUARROSA (1024)
TS79	ZETA/AE. SQUARROSA (1027)
TS80	DOY1/AE.SQUARROSA (1030)
TS82	CROC1/AE. SQUARROSA (210)
TS86	GAN/AE. SQUARROSA (236)
TS87	SORA/AE. SQUARROSA (323)
TS88	D66.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (308)
TS89	LCK59.61/Ae. SQUARROSA (693)
TS90	ZETA/AE. SQUARROSA (1025)
TS91	DOY1/AE.SQUARROSA (1027)
TS92	ZETA/AE. SQUARROSA (386)
TS94	ZETA/AE. SQUARROSA (533)
TS95	CP18/GDIZ/3/GOOD//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (1018)
TS97	ZETA/AE. SQUARROSA (1038)
TS98	ZETA/AE. SQUARROSA (1053)
TS99	CROC1/AE. SQUARROSA (212)
TS100	ZETA/AE.SQUARROSA (368)
TS101	ARLIN-1/AE.SQUARROSA (430)
TS102	D67.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (1015)
TS103	GAN/AE.SCUARROSA (206)
TS104	ARLIN-1/AE.SQUARROSA (335)
TS105	GAN/AE.SQUARROSA (335)
TS106	68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (385)
TS109	DOY1/AE.SQUARROSA (534)

so de la Enfermedad, ABCPE) implementada en el paquete *agricolae* para R versión 3.4.2. Análisis de los datos del ABCPE por aislado se sometieron a un ANOVA y las comparaciones entre medias se realizaron por Test: LSD Fisher Alfa=0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de la primera infección y la clasificación de los 64 TSHs con base a sus valores máximos de reacción a un aislado (P14ATae039) están presentados en el Cuadro 2.

Con base a la primera evaluación de los trigos sintéticos, más del 10% de los TSHs fueron clasificados como Resistentes (VMR 0-1), un 34% fueron clasificados como moderadamente resistentes o moderadamente susceptibles (VMR entre 2 y 3), y más del 55% como susceptibles (VMR 4).

Al igual que Gul Kazi *et al.* (2012) y Das *et al.* (2015), las reacciones a enfermedades fúngicas

Like in Gul Kazi *et al.* (2012) and Das *et al.* (2015), the reactions to fungal diseases using characteristics have been differentiated in this study. The correct phenotyping of these materials is crucial for the selection of the SHWs that can be used as parents in the breeding programs and/or in different studies of molecular characterization and genic expression, differential to the interaction of wheat and *P. oryzae*.

The MVR of the preselected 18 SHWs, with two isolates (P14ATae039 and P14YTae031), is graphed in Figure 1.

The data shown in Figure 1 indicates that only one of the genotypes (TS29) was resistant to both isolates; seven were classified as intermediates (TS77, TS53, TS101, TS78, TS32, TS22 and TS63), since they presented the resistant to moderately resistant reaction to one of the isolates, but moderately resistant to moderately susceptible for the other. This interaction trait was reported by Chávez and Kohli (2018), where moderately resistant varieties for one isolates showed a

**Cuadro 2. Clasificación de los 64 genotipos TSHs infectados por P14ATae039, según su valor máximo de reacción a la *Pyricularia*. Caacupé, 2018.**

**Table 2. Classification of the 64 SHW genotypes infected with P14ATae039, according to their maximum value of reaction to the *Pyricularia*. Caacupé, 2018.**

ESCALA DE REACCIÓN							
Resistente (R) (0-1)	Moderadamente Resistente (MR) (2)	Moderadamente Susceptible (M) (3)	Susceptibles (S) (4)				
TS101 <sup>z</sup>	TS4 <sup>z</sup>	TS32 <sup>z</sup>	TS87	TS50	TS70 <sup>z</sup>	TS100	
TS34	TS22 <sup>z</sup>	TS64	TS103	TS54 <sup>z</sup>	TS71	TS102	
TS53 <sup>z</sup>	TS28	TS67	TS2	TS55	TS72 <sup>z</sup>		
TS73	TS29 <sup>z</sup>	TS68	TS3	TS57	TS76		
TS77 <sup>z</sup>	TS33 <sup>z</sup>	TS74 <sup>z</sup>	TS15	TS58	TS82		
TS78 <sup>z</sup>	TS49 <sup>z</sup>	TS79	TS23	TS59	TS86		
TS105 <sup>z</sup>	TS63 <sup>z</sup>	TS80	TS35	TS60	TS88		
	TS89	TS92	TS36	TS61	TS91		
	TS90 <sup>z</sup>	TS95	TS37	TS62	TS94		
	TS98	TS104	TS39 <sup>z</sup>	TS65	TS97		
	TS109	TS106	TS43	TS69	TS99		

<sup>z</sup>TSHs seleccionados para una segunda evaluación / SHWs selected for a second evaluation.



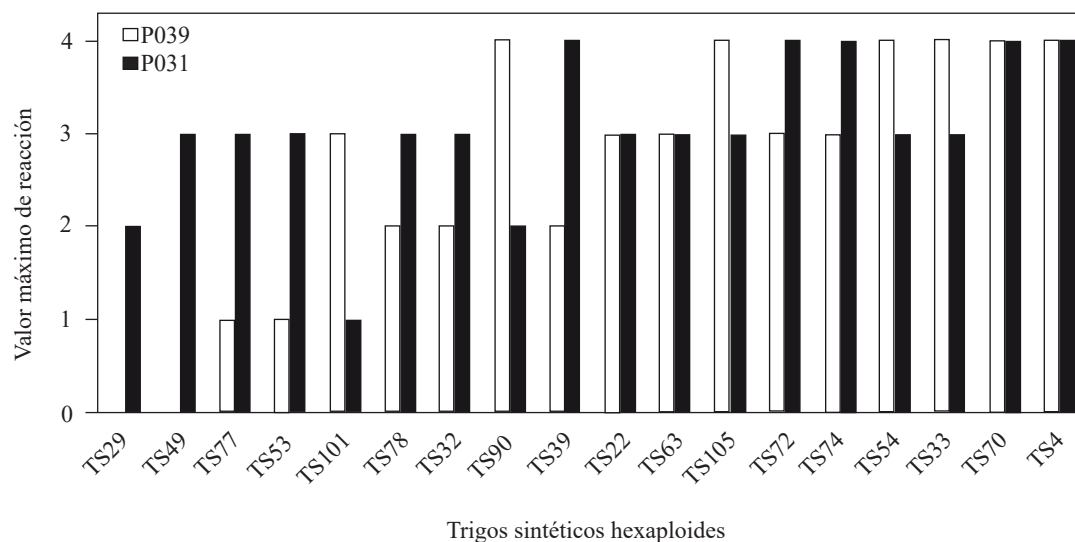
utilizando características fenotípicas se han diferenciado en este estudio. El fenotipado correcto de estos materiales es fundamental para la selección de los TSHs que puedan ser utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento y/o en diferentes estudios de caracterización molecular y expresión génica diferencial a la interacción de trigo y *P. oryzae*.

El VMR de los preseleccionados 18 TSHs, con dos aislados (P14ATae039 y P14YTae031), está graficado en la Figura 1.

Los datos presentados en la Figura 1 muestran que solo uno de los genotipos (TS29) fue resistente a los dos aislados, siete fueron clasificados como intermedios (TS77, TS53, TS101, TS78, TS32 y TS63), ya que presentan la reacción resistente a moderadamente resistente para uno de los aislados, pero moderadamente resistente a moderadamente susceptibles para el otro. Esta característica de interacción fue reportada por Chávez y Kohli (2018), donde variedades moderadamente resistentes para

moderadamente susceptible for the other. This type of reaction specificity may probably be explained by the genetic flow between isolates from different hosts, which gives the isolates a virulence variation (Gladieux *et al.*, 2018).

The data displayed in Figure 2 shows the differences in the average progress of the disease amongst the genotypes identified as resistant or moderately resistant. Only three of the genotypes, TS49, TS53 and TS77, kept their resistance or moderate resistance for the 30-day period. The materials TS29, TS73 and TS101 changed their reaction from moderate resistance to moderate susceptibility, while the synthetic TS78 became susceptible at the end of the 30 days. The SHW TS105, used as a control, was susceptible throughout its development. Considering the differential reactions presented by the materials to the different isolates, the progress of the disease was analyzed in a second instance and is shown in Figures 3a and 3b. The results show a significant



**Figura 1. Valores máximos de reacción de 18 TSHs a las infecciones forzadas de dos aislados de *P. oryzae*. Reacciones al aislado P14ATae039 (P039), y reacciones al aislado P14YTae031 (P031). Caacupé, 2018.**

**Figure 1. Maximum values of reaction of 18 SHWs to the forced infections of two isolates of *P. oryzae*. Reactions to the isolate P14ATae039 (P039) and reactions to the isolate P14YTae031 (P031). Caacupé, 2018.**

un aislado mostraron reacción moderadamente susceptible para el otro. Éste tipo de especificidad de reacciones podría ser explicada probablemente por el flujo genético entre aislados provenientes de distintos huéspedes, lo que le otorga una variación de virulencia a los aislados (Gladieux *et al.*, 2018).

Los datos presentados en la Figura 2 muestran las diferencias en el desarrollo promedio de la enfermedad entre los genotipos identificados como resistente o moderadamente resistente. Solo tres de los genotipos, TS49, TS53 y TS77 mantuvieron su resistencia o moderada resistencia por el periodo de 30 días. Los materiales TS29, TS73 y TS101 cambiaron su reacción de moderada resistencia a moderada susceptibilidad, cuando el sintético TS78 llegó a ser susceptible a final de 30 días. El TSH TS105, usado como testigo, fue susceptible durante todo su desarrollo. Considerando las reacciones diferenciales que presentan los materiales a los diferentes aislados se analizó el desarrollo de la infección en una segunda instancia y esta presentada en las Figuras 3a y 3b. Los resultados muestran una interacción significativa entre los trigos sintéticos evaluados y los dos aislados de *P. oryzae*, lo que confirma los resultados de Cruz *et al.*, (2016), donde los cultivares

interaction between the synthetic wheats evaluated and the two isolates of *P. oryzae*, which confirms the results obtained by Cruz *et al.*, (2016), in which the Overland and RonL cultivars were resistant to an isolate, but susceptible to the other.

Wheats *viz.* TS29 and TS49 were relatively stable in maintaining their resistance or moderate resistance, and other *viz.* TS73, TS78 and TS105 were moderately susceptible or susceptible to both isolates. However, the remaining SHWs *viz.* TSHs TS53, TS77 and TS101, have a significantly different reaction between the two isolates (Figure 1).

Synthetic wheat TS101 was resistant to isolate P031, yet susceptible to P039; wheats TS53 and TS77 were between moderately susceptible and susceptible to P031, yet resistant to P039 (Figure 3).

This result is consistent with those obtained by Chávez *et al.* (2018), who observed an interaction of the varieties with different isolates of *P. oryzae*. This interaction of genotypes with different isolates extends to a greater number of isolates under study (data not reported here).

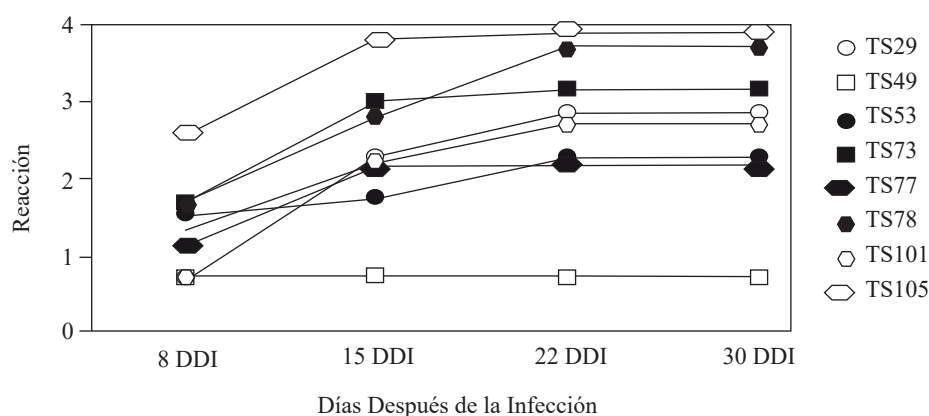
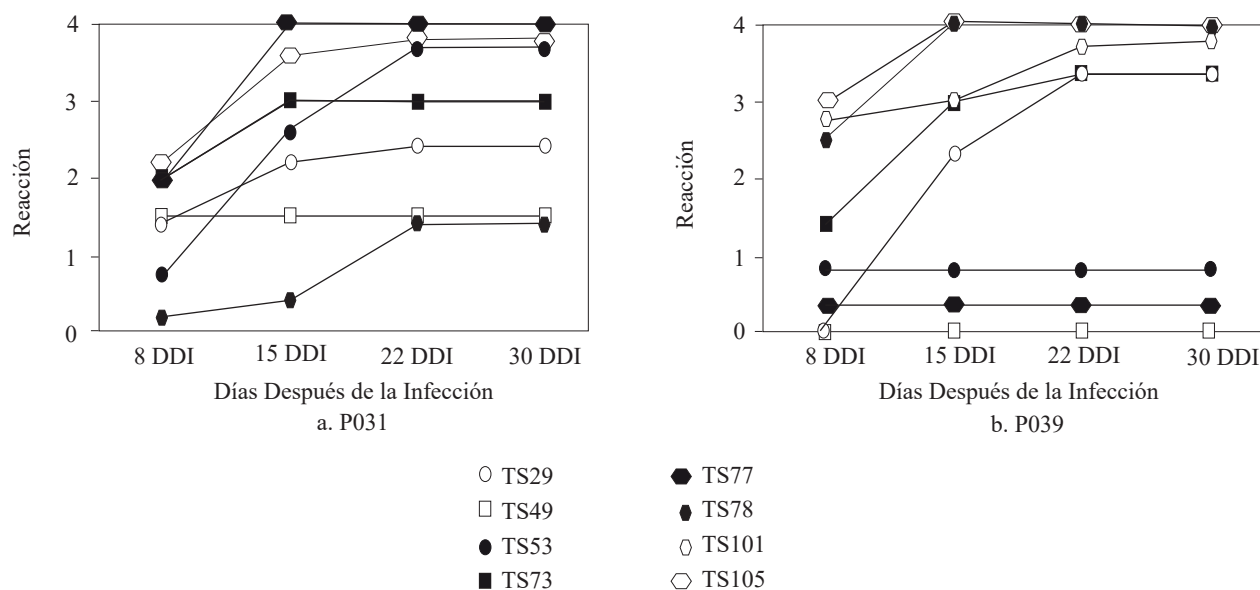


Figura 2. El promedio del progreso de la infección a los 8, 15, 22 y 30 DDI en ocho genotipos de trigo sintéticos hexaploides seleccionados. Caacupé, 2018.

Figure 2. The average disease progress at 8, 15, 22 and 30 DAI in eight selected synthetic hexaploid wheat genotypes. Caacupé, 2018.



**Figura 3.** Evolución de la reacción a la infección y su desarrollo contra aislado P14YTae031 (P031) (a) y P14ATae039 (P039) (b) en ocho trigos sintéticos hexaploides a los 8, 15, 22 y 30 DDI. Caacupé, 2018.

**Figure 3.** Evolution of the reaction to the infection and its development against the isolate P14YTae031 (P031) (a) and P14ATae039 (P039) (b) in eight synthetic hexaploid wheats at 8, 15, 22 and 30 DAI. Caacupé, 2018.

de Overland y RonL, fueron resistentes para un aislado pero susceptibles para el otro.

Los trigos *viz.* TS29, TS49 fueron relativamente estables en mantener su resistencia o moderada resistencia y otros *viz.* TS73, TS78 y TS105 fueron moderadamente susceptibles o susceptibles para los dos aislados. Sin embargo, los restantes TSHs *viz.* TSHs TS53, TS77 y TS101, tienen reacción significativamente diferente entre los dos aislados (Figura 1).

El trigo sintético TS101 fue resistente para el aislado P031, pero susceptible para P039 los trigos TS53 y TS77 fueron de moderadamente susceptible a susceptible para P031, pero resistentes para P039 (Figura 3).

Este resultado es congruente con lo hallado por de Chávez *et al.* (2018) quienes observaron interacción de las variedades con distintos aislados de *P. oryzae*. Esta interacción de genotipos de trigo con diferentes aislados se extiende a un mayor número de aislados bajo estudio (datos no reportados aquí).

In order to study the progress of the disease in the preselected wheats, the area under the disease progress curve was calculated for both isolates, Table 3.

If we analyze the data presented in Table 3, on average, and considering the wheat by isolate interaction, the progress of the disease for both isolates is significantly different. In a similar study on four isolates of *P. oryzae*, Lule *et al.* (2014) did not find significant differences in the AUDPC in rice when interacting with its host, but they did when comparing isolates.

The data of the area under the disease curve confirm the classification of the materials based on the maximum value of infection, without considering the materials with differential reactions. Only synthetic wheats TS29 and TS49 changed their classification based on the maximum value of infection and area under the disease curve.

Con el objetivo de estudiar el avance de la enfermedad en los trigos preseleccionados, el área bajo la curva del progreso fue calculada para los dos aislados, Cuadro 3.

Si se analizan los datos presentados en el Cuadro 3, en promedio y considerando la interacción trigo por aislado, el avance de la enfermedad para los dos aislados es significativamente diferente. En un estudio similar sobre cuatro aislados de *P. oryzae*, Lule *et al.* (2014), no encontraron diferencias significativas en el ABCPE en arroz al interactuar con su hospedero, pero sí al comparar entre aislados.

Los datos del área bajo de curva de la enfermedad corroboran la clasificación de los materiales con base al valor máximo de infección, sin tener en cuenta los materiales con reacción diferencial. Solo los trigos sintéticos TS29 y TS49, cambiaron su clasificación en base al valor máximo de infección y área bajo la curva de la enfermedad.

The TS29, classified as moderately resistant due to its maximum value of infection, was considered moderately susceptible, since it presented a greater progress of the disease after the evaluation of 15 DAI.

The situation with the TS49 was the complete opposite of the reaction of the TS29, since it had a much slower development to reach a lower AUDPC. This selection strategy using AUDPC for this pathogen was also used by Prabhu *et al.* (2003) to classify the reactions of six elite lines of rice in a breeding program. Jeger and Viljanen-Rollinson (2001) agree that the progress of the disease is a more accurate and precise estimate for the selection of materials for a breeding program or genetic studies, helping identify the most stable materials in time.

Considering the genetic variability within the different collections of *Ae tauschii* crossed to obtain

**Cuadro 3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en ocho trigos sintéticos hexaploides. Caacupé, 2018.**  
**Table 3. Area under the disease progress curve in eight synthetic hexaploid wheats. Caacupé, 2018.**

Trigos Sintéticos Hexaploides <sup>x</sup>	Área bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) <sup>y</sup>	
	P14YTae031	P14ATae039
TS49	33 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>
TS77	81 <sup>c</sup>	7.3 <sup>a</sup>
TS53	70.3 <sup>c</sup>	16.5 <sup>a</sup>
TS29	59.9 <sup>abc</sup>	54.7 <sup>b</sup>
TS73	66.7 <sup>bc</sup>	64 <sup>bc</sup>
TS78	63.2 <sup>abc</sup>	73.8 <sup>bc</sup>
TS101	32.7 <sup>a</sup>	82.8 <sup>bc</sup>
TS105	75.1 <sup>c</sup>	84.5 <sup>c</sup>
Promedio por aislado <sup>z</sup>	60.3 <sup>a</sup>	47.9 <sup>b</sup>

<sup>x</sup>Test: LSD Fisher Alfa=0,05. *Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)* / Test: LSD Fisher Alfa=0,05. Averages with a common letter are not significantly different (p > 0,05).

<sup>y</sup>Valor promedio de ABCPE por TSHs / Average value of AUDPC by SHWs.

<sup>z</sup>Valor promedio de ABCPE con interacción por aislados / Average value of AUDPC with interaction by isolations.

El TS29, clasificado moderadamente resistente por su valor máximo de infección fue considerado moderadamente susceptible por presentar un mayor desarrollo de la enfermedad post posterior a la evaluación de 15 DDI.

La situación del TS49, fue completamente opuesta a la reacción del TS29, y que tuvo un desarrollo mucho más lento para llegar a una menor ABCPE. Esta estrategia de selección mediante ABCPE, para éste patógeno, también fue utilizada por Prabhu *et al.* (2003) para clasificar la reacción de seis líneas élites de arroz en un programa de mejoramiento. Jeger y Viljanen-Rollinson (2001) concuerdan que el progreso de la enfermedad es una estimación más acertada y precisa para la selección de materiales para un programa de mejoramiento o estudios genéticos, permitiendo identificar los materiales más estables en el tiempo.

Considerando la variabilidad genética existente entre las diferentes colecciones de *Ae tauschii* cruzadas para la obtención de los TSHs, este tipo de reacciones son esperadas. Resultados similares, fueron reportadas por Guz Kazi *et al.*, 2012 y Masood *et al.*, (2016) en sus estudios sobre reacción a las enfermedades como en características agronómicas y de calidad en general.

En un estudio asociado al genoma completo del trigo, Jighly *et al.*, (2016) han mapeado regiones conocidas para resistencia múltiples a patógenos fúngicos en una colección de TSHs. Además de identificar la presencia de combinaciones previamente reportadas en trigos harineros, ellos pudieron observar interacciones para varias enfermedades individualmente. Su afirmación que el uso de marcadores para la introducción de resistencias múltiples a las enfermedades desde TSHs puede ser una fuente importante para la creación de las variedades elite es muy válida para el caso actual donde las fuentes de resistencia son muy limitadas.

the SHWs, this type of reactions is to be expected. Similar results were reported by Guz Kazi *et al.*, 2012 and Masood *et al.* (2016) in their studies on the reaction to diseases as well as in agronomical traits and in quality in general.

In a study related to the complete wheat genome, Jighly *et al.*, (2016) mapped regions known for the resistance to multiple fungal pathogens in a collection of SHWs. Aside from identifying the presence of combinations previously reported in bread wheats, they were able to observe interactions for various diseases individually. Their assertion that the use of markers for the introduction of multiple resistances to diseases from SHWs can be an important source for the creation of elite varieties is very valid for the case in question, where sources of resistance are very limited.

It is worth mentioning that no molecular markers have yet been identified for the resistance to *P. oryzae* that validate their presence in the SHWs. Although TS29 and TS49 can be considered parents for the breeding programs and can be combined with each other, genotypes such as TS49 are the most valuable to provide a higher level of resistance and low progress of the disease until the end of the infection.

## CONCLUSION

Taking advantage of the wide variability that exists in the hexaploid synthetic wheats, new sources of resistance to wheat blast, from different genetic origins were identified. These genetic resources represent a move forward in the search for more variability for resistance to *P. oryzae* in wheat, which is currently very narrow and may serve as a source to transfer its resistance to future varieties worldwide.

Cabe mencionar que hasta ahora no se ha identificado marcadores moleculares para la resistencia a *P. oryzae* que convaliden su presencia en los TSHs. Aunque TS29 y TS49 pueden ser considerados como progenitores para los programas de mejoramiento y pueden ser combinados entre sí, son los genotipos como TS49, los más valiosos para otorgar un mejor grado de resistencia y bajo progreso de la enfermedad hasta final de la infección.

## CONCLUSIÓN

Aprovechando de la amplia variabilidad que existe en los trigos sintéticos hexaploides, nuevas fuentes de resistencia a Brusone en trigos, provenientes de distintos orígenes genéticos, fueron identificados. Estos recursos genéticos representan un gran avance en la búsqueda de mayor variabilidad para resistencia a *P. oryzae* en trigo, cuya base actual es muy estrecha y que pueden servir como fuente para transferir su resistencia a las futuras variedades a nivel mundial.

## AGRADECIMIENTOS

A los Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, México, por proporcionar la colección de trigo sintéticos hexaploides y al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, IPTA, por las facilidades de instalaciones en el Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay.

## LITERATURA CITADA

- Chávez, A., Casal, C. and Kohli, M. M. 2017. Difference in the reaction to *Pyricularia oryzae* of wheat materials in the vegetative and reproductive stages. *Investigación Agraria*, 19(1), 56–63. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2017.junio.56-63>
- Chávez, A. R. and Kohli, M. M. 2018. Patogenicidad de *Magnaporthe oryzae* en variedades y líneas de trigo cultivadas en Paraguay. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 1–11. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1712-3>
- Couch, B. C. and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT, Mexico, for providing the collection of hexaploid synthetic wheats, and to the Paraguayan Agricultural Technology Institute, for their facilities in the Hernando Bertoni Research Center, Caacupé, Paraguay.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4), 683–693. <https://doi.org/10.2307/3761719>
- Cruz, C. D., Peterson, W., Bockus, W. W., Kankanala, P., Dubcovsky, J., Jordan, K. W., Akhunov, E., Chumley, F., Baldeomar, F., Valent, B. (2016). The 2NS Translocation from *Aegilops ventricosa* Confers Resistance to the Triticum Pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Science*, 56(3), 990–1000. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.07.0410>
- Cruz, C. D., and Valent, B. (2017). Wheat blast disease: danger on the move. *Tropical Plant Pathology*, 42(3), 210–222. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0159-z>
- Das, M. K., Bai, G., Mujeeb-Kazi, A. and Rajaram, S. 2015. Genetic diversity among synthetic hexaploid wheat accessions (*Triticum aestivum*) with resistance to several fungal diseases. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(8), 1285–1296. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0312-9>
- Gladieux, P., Condon, B., Ravel, S., Soanes, D., Maciel, J. L. N., Nhani, A., Chen, Li., Terauchi, R., Lebrun, M., Tharreau, D., Mitchell, T., Pedley, K., Valent, B., Talbot, N., Farman, M., Fournier, E. 2018. Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *American Society for microbiology*, 9(1), e01219-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01219-17>
- Gul Kazi, A., Awais, R., Tariq, M. and Mujeeb-Kazi, A. 2012. Molecular and morphological diversity with biotic stress resistances of high 1000-grain weight synthetic hexaploid wheats. *Pakistan Journal of Botany*, 44(3), 1021–1028. Retrieved from file:///C:/Users/user/Downloads/Gul-Kazietal2012PJB.pdf
- Jeger, M. J. and Viljanen-Rollinson, S. L. H. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s001220051615>
- Jighly, A., Alagu, M., Makdis, F., Singh, M., Singh, S., Emebiri, L. C., & Ogbonnaya, F. C. 2016. Genomic regions conferring resistance to multiple fungal pathogens in synthetic hexaploid wheat. *Molecular Breeding*, 36(9). <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0541-4>
- Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., de Vries, R. P., Lebrun, M.-H. (2014). Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology*, 79, 85–120. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.004>

- Kohli, M., Mehta, Y. R., Guzman, E., de Viedma, L. and Cubilla, L. E. 2011. Pyricularia blast-a threat to wheat cultivation. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47(SPEC. ISSUE 1), 130–134. <https://doi.org/DOI:10.17221/3267-CJGPB>
- Lu, C. M., Yang, W. Y., Zhang, W. J. and Lu, B. R. 2005. Identification of SNPs and development of allelic specific PCR markers for high molecular weight glutenin subunit D tx1.5 from *Aegilops tauschii* through sequence characterization. Journal of Cereal Science, 41(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.05.006>
- Lule, D., de Villiers, S., Fetene, M., Bogale, T., Alemu, T., Geremew, G., Gashaw, G., Tesfaye, K. 2014. Pathogenicity and yield loss assessment caused by *Magnaporthe oryzae* isolates in cultivated and wild relatives of finger millet (*Eleusine coracana*). Indian Journal of Agricultural Research, 48(4), 258–268. <https://doi.org/10.5958/0976-058X.2014.00659.3>
- Malaker, P. K., Barma, N. C. D., Tiwari, T. P., Collis, W. J., Duveiller, E., Singh, P. K., Joshi, A., Singh, R., Braun, H., Peterson, G., Pedley, K., Farman, M., Valent, B. 2016. First Report of Wheat Blast Caused by *Magnaporthe oryzae* Pathotype *triticum* in Bangladesh. Plant Disease, PDIS-05-16-0666-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0666-PDN>
- Marangoni, M. S., Nunes, M. P., Fonseca, J. N., & Mehta, Y. R. 2013. Pyricularia blast on white oats - a new threat to wheat cultivation. Tropical Plant Pathology, 38(3), 198–202. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000004>
- Masood, R., Ali, N., Jamil, M., Bibi, K., Rudd, J. C. and Mujeeb-Kazi, A. 2016. Novel genetic diversity of the alien D-genome synthetic hexaploid wheat ( $2n=6x=42$ , Aabddd) germplasm for various phenology traits. Pakistan Journal of Botany, 48(5), 2017–2024. [https://doi.org/10/2016;48\(5\):2017-2024](https://doi.org/10/2016;48(5):2017-2024)
- Ogbonnaya, F. C., Abdalla, O., Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A. G., Xu, S. S., Gosman, N., Lagudah, Evans S., Bonnett, D., Sorrells, M., Tsujimoto, H. 2013. Synthetic hexaploids: Harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement. Plant Breeding. Reviews 37 (First Edition). <https://doi.org/10.1002/9781118497869.ch2>
- Okamoto, Y., Nguyen, A. T., Yoshioka, M., Iehisa, J. C. M. and Takumi, S. 2013. Identification of quantitative trait loci controlling grain size and shape in the D genome of synthetic hexaploid wheat lines. Breeding Science, 63(4), 423–429. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.423>
- Pieck, M. L., Ruck, A., Farman, M., Peterson, G. L., Stack, J. P., Valent, B., & Pedley, K. F. 2016. Genomics-Based Marker Discovery and Diagnostic Assay Development for Wheat Blast. Plant Disease, PDIS-04-16-0500-RE. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0500-RE>
- Prabhu, A. S., De Castro, E. D. M., De Araújo, L. G. and Berni, R. F. 2003. Resistance spectra of six elite breeding lines of upland rice to *Pyricularia grisea*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 38(2), 203–210. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000200006>
- Rasheed, A., Xia, X., Ogbonnaya, F., Mahmood, T., Zhang, Z., Mujeeb-Kazi, A. and He, Z. 2014. Genome-wide association for grain morphology in synthetic hexaploid wheats using digital imaging analysis. BMC Plant Biology, 14(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-128>
- Sohail, Q., Inoue, T., Tanaka, H., Eltayeb, A. E., Matsuoka, Y. and Tsujimoto, H. 2011. Applicability of *Aegilops tauschii* drought tolerance traits to breeding of hexaploid wheat. Breeding Science, 61(4), 347–357. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.347>