

**Caracterización de aislamientos argentinos del
agente causal de la mancha de la hoja del trigo
(*Mycosphaerella graminicola*) e identificación de
marcadores moleculares asociados a genes de
resistencia al patógeno**



Lic. Nadia Sabiela Castillo

Director: Dra. María Rosa Simón

Codirector: Dra. Mónica Mirta Steciow

Facultad de Ciencias Naturales y Museo- UNLP

2009

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a CONICET, por hacer posible esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, por brindarme el espacio y el apoyo para realizar mi trabajo.

A mi querida Facultad de Ciencias Naturales y Museo, por darme los mejores recuerdos y por permitir este paso en mi carrera profesional.

Al personal de la Estación Experimental Julio Hirschhorn, por su colaboración.

Este trabajo está dedicado a todas las personas que estuvieron al lado mío y que me acompañaron en este largo camino. Gracias!

A mi directora María Rosa, por su gran compromiso y dedicación con este trabajo.

A mi codirectora Mónica, por su predisposición y aliento.

A Cristina, por su compromiso, apoyo y estímulos que fueron tan importantes para mí.

A Ana, por su desinteresada colaboración durante mis pruebas moleculares.

A Nora, Cris C., Naty K., Naty C. y Mati , por hacer más agradables mis días en el campo.

A mis Compañeros del CIDEFI y de Cereales, por la ayuda incondicional que me brindaron y por todos los gratos momentos compartidos.

A Federico, Néstor, Bernardo, Mariano, Juan, Santiago, Mauro y José, por su grata colaboración en mis ensayos.

A mis Amigas y Amigos, por ayudarme a seguir adelante y darme las fuerzas que necesité en muchos momentos.

A Matias, por acompañarme y alentarme en cada paso.

A mi Familia, por apoyarme siempre en lo que elegí y sigo eligiendo y por enseñarme a no bajar los brazos.

Contenidos

Resumen	3
Abstract	6
CAPITULO 1 INTRODUCCION GENERAL	8
1. Introducción General	9
1.1. La mancha de la hoja. Importancia	13
1.2. El agente causal y su dispersión	13
1.3. El manejo integrado de la enfermedad	19
1.4. La resistencia genética	22
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo general	24
2.2. Objetivos particulares	25
3. Hipótesis de trabajo	25
Diagrama de la tesis	26
CAPITULO 2 CARACTERIZACION MOLECULAR DEL PATOGENO	27
Resumen	28
Introducción	29
2.1. Marcadores Moleculares y su aplicación al control de la enfermedad	29
Hipótesis	34
Materiales y métodos	35
2.1. Caracterización de aislamientos del patógeno	35
2.1.1. Recolección de muestras y obtención de aislamientos de <i>M. graminicola</i>	35
2.1.2. Método de muestreo	36
2.1.3. Aislamientos del patógeno	36
2.1.4. Medios de cultivo empleados	41
2.1.6. Caracterización genética de los aislamientos de <i>Septoria tritici</i>	46
2.1.6.1. Determinación del patrón molecular de cada aislamiento (amplificación por marcadores moleculares ISSR y electroforesis)	46
2.1.6.2. Análisis de los datos	47
Resultados	48
Discusión	52
CAPITULO 3 RESISTENCIA GENETICA DETERMINADA EN TRIGO	57
Resumen	58
Introducción	60
Hipótesis	64
Materiales y Métodos	64
3.1. Germoplasma utilizado	64
3.2. Datos climáticos	68
3.3. Inoculación	69
3.4. Evaluación de severidad	71
3.5. Análisis de los datos	71
Resultados	72
Plántula	72
Estadio Adulto	88
Discusión	114
CAPITULO 4 MAPEO DE LA RESISTENCIA CUANTITATIVA A LA MANCHA DE LA HOJA EN EL TRIGO ESPELTA	121

Resumen	122
Introducción	123
Hipótesis	125
Materiales y Métodos	126
4.1. Screening preliminar de los aislamientos a utilizarse	126
4.1.1. Material vegetal utilizado.....	126
4.1.2. Aislamientos del hongo.....	126
4.1.3. Evaluación de la enfermedad	127
4.2. Mapeo de la población	127
4.2.1. Germoplasma utilizado.....	127
4.2.2. Evaluación de la enfermedad	128
4.2.3. Análisis de microsatélites y QTL's	129
Resultados	130
4.1. Screening de los progenitores.....	130
4.2. Mapeo de la población	131
4.2.1. Test de patogenicidad.....	131
4.2.2. Análisis de genotipos y QTL's.....	133
Discusión	138
CAPITULO 5 DISCUSION GENERAL Y RECOMENDACIONES	141
Futuras investigaciones	148
Bibliografía	149

Resumen

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es el cultivo más extensamente sembrado y consumido como alimento en el mundo. En el año 2020, la población mundial alcanzará 7500 millones de habitantes y esto generará un aumento de la demanda de alimentos. Para incrementar el rendimiento, el mejoramiento es una herramienta fundamental junto con la adopción de nuevas tecnologías de cultivo. El mejoramiento del trigo está enfocado a la obtención de cultivares ampliamente adaptados, con resistencia a enfermedades, buena calidad panadera y altos rendimientos estables a través de un amplio rango de ambientes. Incorporar resistencia a los principales patógenos es una prioridad ya que no es posible lograr rendimientos estables sin adecuada resistencia a las principales enfermedades. Una de las principales enfermedades de origen fúngico que afectan al cultivo de trigo es la Septoriosis ó Mancha de la Hoja (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz. f. asexual; *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroeter, in Cohn f. sexual), la cual produce a nivel mundial daños que oscilan entre 31 y 54% de reducción en el rendimiento y en Argentina entre 17 y 50% dependiendo del estado fenológico en el que ocurre y del índice de infección. La mancha de la hoja y la mancha amarilla son las manchas foliares de mayor importancia en Argentina. El manejo integrado de enfermedades se basa en la resistencia genética conjuntamente con medidas culturales (rotaciones, laboreos de suelo, ajuste de la fecha y época de siembra, elección correcta de genotipos, manejo de la fertilización, aplicación de fungicidas, calidad de la semilla y control biológico). La resistencia genética es una alternativa de control sustentable, con una relación costo efectividad relativamente baja y sin impacto sobre el medio ambiente. Además determina el éxito de otras estrategias de control. La resistencia cuantitativa y cualitativa ha sido detectada en el patosistema *Triticum aestivum*- mancha de la hoja, sin embargo pocas variedades comerciales muestran aceptables niveles de resistencia. El conocimiento de la estructura de las poblaciones del patógeno y la localización de genes y QTL's en germoplasma resistente a través de herramientas moleculares podría facilitar la incorporación de resistencia genética en los cultivares comerciales. La caracterización de la población de este patógeno ha sido limitada en nuestro país, y los cultivares no han sido probados con aislamientos agrupados por sus patrones moleculares. Esto es importante para conocer si algunos de los genotipos predominan dentro de una subregión triguera en Argentina. En este

sentido, se estudió la diversidad de la población de *Mycosphaerella graminicola* utilizando un elevado número de aislamientos de distintas localidades de la Región Triguera Argentina, subregión IV (SE de la Provincia de Buenos Aires) y II Sur (parte central de la Provincia de Buenos Aires) a través de su caracterización con marcadores moleculares. Ciento veintisiete aislamientos fueron probados con 10 primers ISSR: (GACA)₄; (AAC)₇; (ATC)₇; (AC)₉; (AAG)₇; (AG)₉; (AGC)₅; (CAG)₅; (GTG)₅ y (GACAC)₃. Solo 83 amplificaron y se obtuvieron 81 haplotipos distintos (diversidad genotípica= 98 %). El tamaño de las bandas polimórficas varió en un rango de 200 a 8000 pb y el mayor número de fragmentos de ADN polimórfico fue producido por los primers (ATC)₇ y (GTG)₅. Los resultados revelaron un alto grado de variabilidad genotípica en las poblaciones de *M. graminicola* de estas dos subregiones. El conocimiento de esta variabilidad también permite evaluar la resistencia del germoplasma argentino de trigo frente a aislamientos que representen distintos genotipos del patógeno. Por eso, a partir de la caracterización molecular de nuestros aislamientos, se eligieron 16 de ellos (1, 2, 14, 20, 24, 52, 201, 205, 217, 226, 230, 243, 244, 247, 248 y 254) de acuerdo a sus diferentes patrones. Se inocularon sobre un set de cultivares argentinos que mostraban buenos niveles de resistencia, líneas con genes conocidos y diferenciales de *Triticum aestivum* L., con el fin de identificar resistencia parcial y específica. La resistencia aislamiento específica fue detectada en algunos materiales. En estadio adulto, Oasis, TE 9111, IAS 20, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario presentaron resistencia parcial. La resistencia específica frente a algunos aislamientos fue observada en Oasis.

Se sabe que otras especies de trigo también pueden ser importantes fuentes de resistencia en programas de mejoramiento. El trigo espelta (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell) presenta requerimientos de crecimiento poco exigentes, buena adaptabilidad y mejor comportamiento en grandes altitudes que el trigo pan. También es una fuente de resistencia genética a diversas enfermedades, incluida la roya del tallo, roya amarilla y mancha de la hoja y es fácilmente cruzable con el trigo pan. En esta tesis se se mapearon dos QTL's condicionando resistencia en estas especies: *QStb.ipk-7D1*, que determina la resistencia en plántula a *Septoria Tritici* y está localizado en la región centromérica del cromosoma 7D; y *QStb.ipk-7D2*, que determina la resistencia en estadio adulto y se encuentra ubicado sobre el brazo corto de este mismo cromosoma. Además, no se encontraron QTL's regulando la fecha de floración ligados en ese cromosoma, indicando que no existe asociación genética entre esos caracteres.

Esa falta de correlación es alentadora desde el punto de vista del mejoramiento, ya que permite la mejora de la resistencia a la mancha de la hoja independientemente del momento de floración.

Abstract

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most widely grown and consumed food crop in the world. In the year 2020, world population will reach 7500 million and will generate increased demand for food. To increase yield, the breeding is a major tool along with the adoption of new crop technologies. Wheat breeding is focused on obtaining widely-adapted cultivars with disease resistance, good baking quality and high yields that are stable across a wide range of environments. Incorporating resistance to major pathogens is a priority because it is not possible to achieve stable yields without adequate resistance to major diseases. Septoria tritici blotch (anamorph *Septoria tritici* Roberge in Desmaz. teleomorph *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroeter, in Cohn) is one of the major fungal diseases that affect the crop of wheat and causes global damage ranging from 31 to 54% yield reduction and in Argentina from 17 to 50% depending on the phenological stage and the rate of infection. Septoria tritici blotch and tan spot are the most important leaf spot diseases in Argentina. The integrated disease management is based on genetic resistance in conjunction with cultural measures (rotation, soil tillage, adjusting of seeding date, correct choice of genotypes, fertilizer management, seed quality, biological control and adequate management of fungicides). Genetic resistance is an alternative sustainable control, with a relatively low cost effectiveness and no impact on the environment. Also determines the success of other control strategies. Quantitative and qualitative resistance have been detected in the pathosystem *Triticum aestivum*-septoria tritici blotch, however few commercial varieties show acceptable resistance levels. Knowledge of the structure of pathogen populations and location of genes and QTL's in resistant germplasm through molecular tools will facilitate the incorporation of genetic resistance in commercial cultivars. The characterization of the population of this pathogen has been limited in our country and cultivars have not been tested with isolates grouped by molecular patterns. It is also important to know if some genotypes are predominant within specific wheat subregion in Argentina. In this regard, we studied the diversity of *Mycosphaerella graminicola* population using a high number of isolates from different locations of the Argentinean wheat region, subregion IV (SE of Buenos Aires Province) and II South (Central Part of Buenos Aires Province) through characterization with molecular markers. One hundred twenty seven isolates were tested with 10 ISSR primers: (GACA)₄, (AAC)₇, (ATC)₇, (AC)₉, (AAG)₇, (AG)₉, (AGC)₅, (CAG)₅, (GTG)₅ and

(GACAC)₃. Only 83 amplified and 81 different haplotypes were obtained (genotypic diversity= 98%). The size of the polymorphic bands ranged from 200 to 8000 bp and the highest number of polymorphic DNA fragments was produced using ISSR primers (ATC)₇ and (GTG)₅. Results revealed a high degree of genotypic variability in *M. graminicola* populations. Knowledge of this variability also allows test the resistance of argentine wheat germoplasm against isolates representing different genotypes of the pathogen. Therefore, from the molecular characterization of our isolates, we chose 16 of them (1, 2, 14, 20, 24, 52, 201, 205, 217, 226, 230, 243, 244, 247, 248 and 254) according to their different patterns. They were inoculated on a set of argentinean cultivars showing some level of resistance, lines with known genes and differentials of *Triticum aestivum* L., with the purpose of identifying specific resistance or partial resistance. Isolate specific resistance was also detected in several materials. In adult stage, Oasis, TE 9111, IAS 20, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario proved to carry partial resistance. Specific resistance to some isolates was observed in Oasis.

It is known that other species of wheat may also be important sources of resistance in breeding programs. Spelt wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell) presents undemanding growth requirements, good adaptability and better behavior to high altitudes than *Triticum aestivum*. It is also a source of genetic resistance to various diseases, including stem rust, yellow rust and septoria tritici blotch and it is readily crossable with bread wheat. In this thesis we mapped two QTL's conditioning resistance in this species: *QStb.ipk-7D1*, which determines the seedling stage resistance to septoria tritici blotch and is located in the centromeric region of chromosome 7D; and *QStb.ipk-7D2*, which determines the resistance in the adult stage and is located on the short arm of that chromosome were. In addition no QTL's regulating flowering date linked to resistance were found in that chromosome, indicating no genetic association among those traits. This lack of correlation is encouraging from the point of view of wheat breeding, allowing improved resistance to septoria tritici blotch regardless of the flowering date.

CAPITULO 1

Introducción general

1. Introducción General

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es el cultivo más extensamente sembrado y consumido como alimento en el mundo. La producción de trigo fue incrementándose en forma significativa, en base al aumento del rendimiento. En 1965 alcanzó un total de 275 millones de toneladas (SAGPyA), mientras que en 2008 llegó a 680 millones de toneladas (FAO, 2009).

La demanda de alimentos a escala mundial se incrementará en el futuro debido al aumento poblacional del planeta, estimado en base a las proyecciones realizadas por diversos investigadores. La población mundial alcanzará 7500 millones de habitantes en el año 2020, con una superficie de tierra arable por persona de 0,2 has.hab⁻¹ y existirá con un aumento importante en relación al año 2000, en que fue de 6 mil millones de habitantes y la tierra arable por persona de 0,3 has.hab⁻¹ (Calderini, 2006). Como consecuencia de ello, los sistemas productivos de cultivos de granos, y en especial aquellos como el trigo, se enfrentarán con un desafío en el futuro mediano (Evans, 1998; Dyson, 1999).

Muchas de las áreas no cultivadas son aquellas que se consideran marginales desde el punto de vista de la producción. Por otra parte, el avance del uso urbano de la tierra y las restricciones en el uso del agua, dificultarán aún más la disponibilidad de superficie con fines agrícolas (Cassman, 1999). El advenimiento de nuevas tecnologías permite una expansión en las fronteras agrícolas hacia zonas marginales y en 2008 hubo un incremento de 5% en la superficie mundial sembrada con trigo, estimulada por el incremento de los precios internacionales. Sin embargo, el promedio de superficie sembrada con este cereal en la última década ha sido similar a décadas anteriores (USDA, 2008).

La producción mundial de trigo durante la campaña 2007/08 fue de aproximadamente 624 millones de toneladas (USDA, 2007), y en 2008/09 de 689 millones de toneladas. En la actualidad, los rendimientos medios mundiales de trigo son de 2,8 tn.ha⁻¹ y en base a los requerimientos de la demanda futura se estima que deberían alcanzar 4,4 tn.ha⁻¹ hacia el año 2025 (Bynes & Bumb, 1998) para satisfacer los requerimientos de consumo de la población.

En Argentina, el trigo representa actualmente el cereal de siembra invernal más importante, ocupando anualmente alrededor de 6 millones de hectáreas con un

rendimiento promedio cercano a los 2500 kg.ha⁻¹ que determinan una producción aproximada de 14 millones de toneladas por año (Nisi *et al.*, 2006), aunque ha disminuido notoriamente en las últimas dos campañas debido a factores económicos y ambientales. La producción de trigo en nuestro país es afectada anualmente por diferentes factores limitantes abióticos y bióticos. Entre los factores bióticos, las enfermedades de origen fúngico se destacan por su incidencia en años húmedos.

Para incrementar el rendimiento, el mejoramiento es una herramienta fundamental junto con la adopción de nuevas tecnologías de cultivo (Simón, 2003). El mejoramiento del trigo está enfocado a la obtención de cultivares ampliamente adaptados, con resistencia a enfermedades, buena calidad panadera y altos rendimientos estables a través de un amplio rango de ambientes. Incorporar resistencia a los principales patógenos es una prioridad ya que no es posible lograr rendimientos estables sin adecuada resistencia a las principales enfermedades (Rajaram, 1999).

Las enfermedades que afectan anualmente a los cultivos de trigo ocasionan alrededor de 10% de daño en el rendimiento. Este porcentaje puede incrementarse sustancialmente en función del año, variedad utilizada, tipo de enfermedad y estrategia de control (Carmona, 2001). Entre los agentes fitopatógenos que afectan al cultivo de trigo encontramos bacterias, virus y hongos. A su vez estos agentes pueden ser clasificados en función de sus requerimientos nutricionales. El conocimiento del hábito nutricional del patógeno y su forma de supervivencia es de vital importancia ya que permite diseñar la mejor estrategia de control.

Los requerimientos nutricionales de los hongos patógenos determinan en que forma sobreviven de una estación de cultivo a otra. En base a ello, podemos clasificar a los mismos en dos grupos: los biotróficos y los necrotróficos (Grant & Long, 1989). Los biotróficos, son aquellos que tienen una sola fase en su ciclo de vida, la parasítica. Son parásitos obligados y dependen de la planta viva para nutrirse. Los necrotróficos matan los tejidos vivos y se alimentan del tejido muerto. Muchos de los hongos que son considerados dentro de uno de los dos grupos son en realidad hemibiotrófos, ya que el patógeno inicialmente se establece en tejidos vivos, sin síntomas aparentes, para posteriormente causar clorosis y necrosis (Kema & Silfhout, 1996).

Los biotróficos no son directamente afectados por la siembra directa dado que el rastrojo en superficie no los beneficia en nada, es el caso de la roya y los oidios. Estos pueden verse indirectamente afectados por el aumento del número de plantas

voluntarias o guachas de verano-otoño que se convierten en malezas en siembra directa (Martino, 1994), las que actúan como reservorios de estos patógenos entre cosechas.

En aquellas enfermedades producidas por patógenos necrotróficos o facultativos, el patógeno no depende del sistema generador de energía del hospedante, sino que posee su propio sistema generador de energía, utilizando los componentes de la planta (Horsfall & Cowling, 1971). Tanto hongos como bacterias de este grupo, pasan gran parte de su ciclo de vida en el rastrojo, son capaces de extraer nutrientes de los tejidos muertos del hospedante. Estos patógenos pueden dividirse en dos grupos: aquellos que dependen del rastrojo para sobrevivir entre cosechas, y aquéllos que forman estructuras de supervivencia y resistencia tales como esclerocios, clamidosporas, oosporas, y su supervivencia entonces va más allá de la descomposición del rastrojo (Cook *et al.*, 1978). La mayoría de los patógenos de la parte aérea son del tipo casi enteramente dependientes del rastrojo para sobrevivir entre cosechas. Este tipo de patógenos por regla general no sobrevive en el rastrojo enterrado por más de unos meses y son los más afectados por la siembra directa (Cook *et al.*, 1978).

Las principales enfermedades de origen fúngico que afectan al cultivo de trigo son: Septoriosis ó Mancha de la Hoja (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz. f. asexual; *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt, in Cohn f. sexual), mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker f. asexual; *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. f. sexual), roya amarilla (*Puccinia striiformis* West), roya anaranjada o de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks), roya negra o del tallo (*Puccinia graminis f. sp. tritici* Pers), fusariosis (*Fusarium graminearum* Schwabe.), caries o carbón hediondo (*Tilletia caries* (DC.) Tul. y C. Tul. y *T. foetida* (Wallr.) Liro.), carbón volador del trigo (*Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.; *U. nuda* (J.L.Jensen) Kellerm. y Swingle.), oidio (*Oidium moniloides* (Nees) Link f. asexual *Blumeria graminis tritici* (DC) Speer am. f. sexual) y pietín (*Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx y Oliv. var. *tritici* Walker) (Annone, 2004). Existe además un complejo de enfermedades emergentes como mancha de la hoja por *Ascochita* (*Ascochyta hordei* var. europea Punith), mancha de la hoja por *Phoma* (*Phoma sorghina* (Sacc.) Boerama *et al.*), listado por *Cephalosporium* (*Cephalosporium graminis* Nis. e Ika.), tizón de la hoja (*Alternaria triticina* Prasada y Amp f; Prahbu), el complejo de especies de manchado del grano (*Alternaria infectoria* (Fuckel) M. Barr. y Amp.) (Perelló, 2007) y un incremento en la importancia de la “mancha borrosa” causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Schoem. (anamorfo), *Cochliobolus sativus* (teleomorfo). La presencia de *Alternaria* spp., asociadas al “manchado del grano” y

“tizones foliares” del trigo, ha aumentado considerablemente en la última década. Algunas especies tales como *A. triticina* ocasionan tizones severos en las hojas, espigas y manchado del grano, siendo enfermedades cuarentenarias con pérdidas del rendimiento de hasta un 60 % bajo condiciones favorables a la infección y desarrollo de la enfermedad (Zillinsky, 1984).

En Argentina, en los últimos años ha disminuido la severidad de las royas por la obtención de cultivares resistentes especialmente para la roya negra, sin embargo, la roya anaranjada y la roya amarilla, en menor magnitud, siguen teniendo importancia económica. Para la “Roya anaranjada o de la hoja” se estimaron pérdidas de rendimiento desde un 13 a un 44 % (Annone *et al.*, 2001, Galich *et al.*, 1986) y de un 50 % (Galich *et al.*, 1986). Para la “Mancha amarilla” las pérdidas alcanzaron del 8 al 32 % (Annone *et al.*, 2001); del 10 al 20 % (Carmona *et al.*, 1999a) y entre un 6 a 13.5 % (Galich & Galich, 1994). Las pérdidas producidas por la fusariosis varían desde un 10 % (Galich, 1989) hasta un 17 a 47 % (Annone & Frutos, 1988). Considerando los valores medios de prevalencia, intensidad de síntomas y efecto potencial sobre los rendimientos, las enfermedades de mayor importancia relativa en el país son la “Roya de la hoja”, la “mancha amarilla”, la “fusariosis de la espiga” y la “septoriosis de la hoja” (Annone, 2006). Sin embargo, la mancha de la hoja y la mancha amarilla son las manchas foliares de mayor importancia y difusión en nuestro país. (Carmona *et al.*, 1999a).

Las enfermedades foliares afectan la generación del rendimiento por los siguientes motivos:

- 1- Los patógenos ejercen su parasitismo aprovechándose de la energía producida por el cultivo. De esta manera los parásitos colonizan, crecen y se reproducen exclusivamente a expensas de la planta, generándoles pérdidas de carbohidratos y nutrientes producidos o de reserva que podrían haber sido dirigidos hacia destinos reproductivos.
- 2- La mayoría de las enfermedades foliares producen clorosis, necrosis, afectando la fotosíntesis, disminuyendo la intercepción de radiación y aumentando la reflectancia.
- 3- Así también la mayoría de ellas generan senescencia y algunas defoliaciones afectando la intercepción lumínica. (Carmona, 2005).

En plantas sanas, los carbohidratos formados mediante la fotosíntesis se movilizan mediante un proceso de redistribución hacia tejidos en activo crecimiento (órganos en formación). De un modo similar, los tejidos enfermos también se constituyen en “destinos” de redistribución de carbohidratos solubles y minerales. Las

infecciones causadas por microorganismos fitopatógenos normalmente incrementan la translocación de compuestos desde los tejidos sanos hacia los enfermos, así como la respiración (Annone, 2000).

Probablemente el principal efecto que muchas de las enfermedades foliares causan es el de disminuir la eficiencia de intercepción de radiación a través de la reducción del índice de área foliar (IAF) y de su duración (Carmona, 2005).

1.1. La mancha de la hoja. Importancia

La mancha de la hoja del trigo produce, a nivel mundial, daños que oscilan entre 31 y 54 % de reducción en el rendimiento (Eyal *et al.*, 1987a) y en Argentina de entre 17 y 50 % (Annone *et al.*, 1991, 1993, Simón *et al.*, 2002) dependiendo del estado fenológico en el que ocurre y del índice de infección. A su vez, el momento de ataque e índice de infección dependen de características propias del ciclo del patógeno, de la susceptibilidad y características morfofisiológicas de los cultivares, composición y virulencia de la población de los patógenos, condiciones ambientales y culturales, etc.

Esta enfermedad representa el mayor problema en regiones caracterizadas por temperatura y altas lluvias durante la estación de crecimiento (Holmes & Cohloun, 1974; Eyal *et al.*, 1987b). Es altamente conocida en Europa, Asia, Australia y América, y está presente en casi todas las áreas templadas a subtropicales y húmedas donde crece el trigo. (Eyal *et al.*, 1987b).

1.2. El agente causal y su dispersión

El agente causal de la mancha de la hoja, *Mycosphaerella graminicola*, es un hongo que pertenece al Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Dothideomycetes, Orden Dothideales y Familia Dothideaceae. Este hongo es considerado como hemibiótrofo (Royle *et al.*, 1986, Kema & van Silfhout, 1996, Parbery, 1996), ya que inmediatamente después de la penetración, las hifas colonizan los espacios intercelulares sin causar la muerte de las células por un período de 3 a 5 semanas antes de que ocurra la necrosis y la esporulación. Además, está incluido dentro de los “casi enteramente dependientes” del rastrojo y por lo tanto es afectado por la siembra directa. Al no presentar estructuras de resistencia en el suelo, su supervivencia está casi condicionada a la colonización de los tejidos durante el ciclo del cultivo, antes de que

haya terminado el proceso de senescencia o muerte natural de la planta (Stewart *et al.*, 2002).

En la naturaleza se presenta en estado anamorfo o asexual (*Septoria tritici*), el más comunmente encontrado, y en el estado teleomorfo o sexual (*Mycosphaerella graminicola*) que ha sido descrito en varios países (Hunter *et al.*, 1999). El desarrollo y ciclo de la enfermedad están altamente influenciados por las condiciones ambientales (lluvias frecuentes y temperaturas moderadas). *Septoria tritici* produce picnidios con picnidiosporas unicelulares, septadas o no y las septadas pueden presentar de 3 a 5 septos cada una. (Fig 1.1). La forma sexual produce, sobre las lesiones necróticas de la lámina de la hoja, pseudotecios con ascosporas bicelulares en su interior (Eyal *et al.*, 1987a).

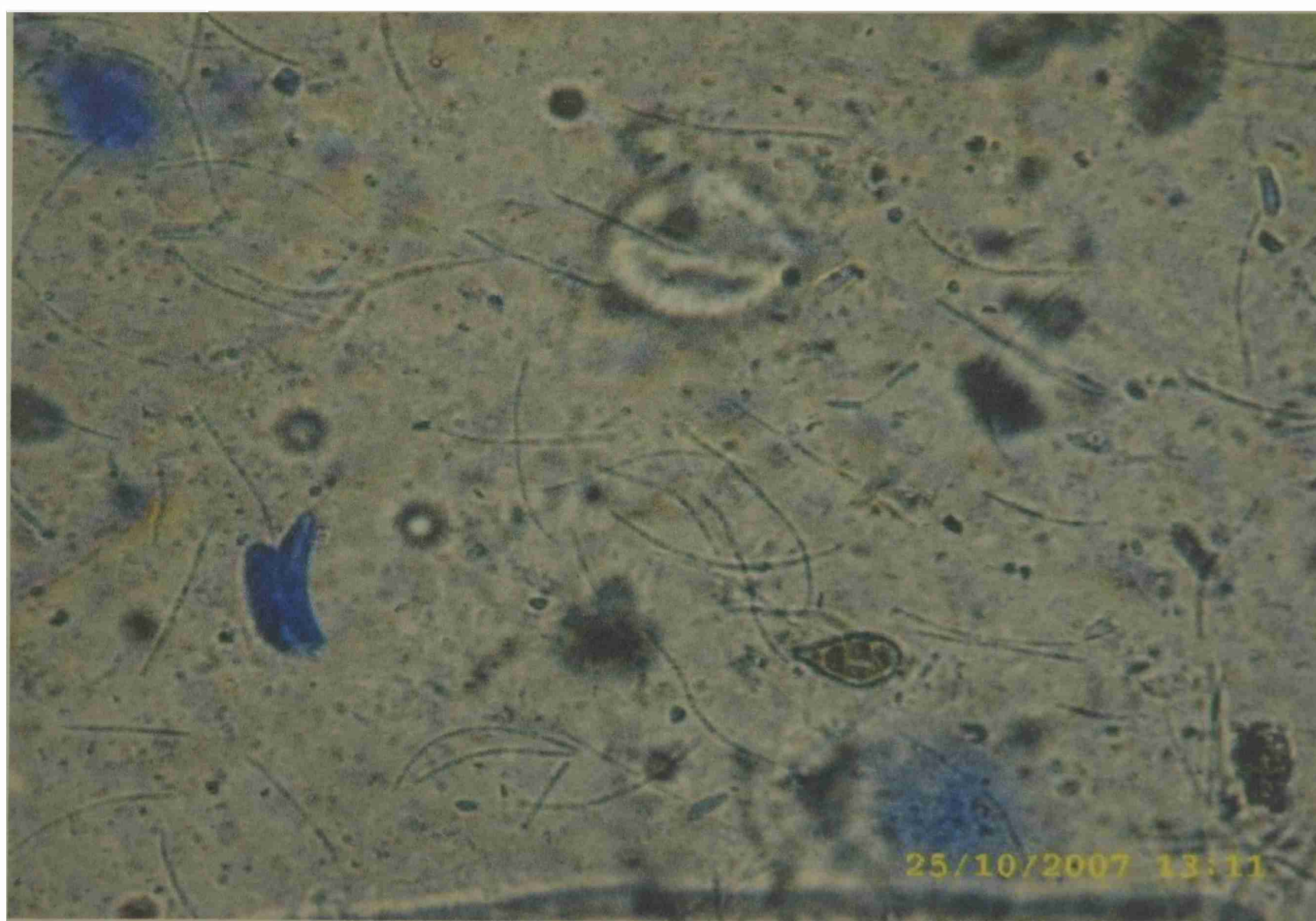


Fig. 1.1. Picnidiosporas (conidios) de *Septoria tritici* observadas al microscopio óptico (40X).

El principal mecanismo de dispersión de las picnidiosporas y ascosporas se da a través de la salpicadura producida por las gotas de lluvia, aunque en algunos países como Nueva Zelanda, Australia y Reino Unido, el inóculo primario que inicia las epifitias de esta enfermedad, está constituido por ascosporas, transportadas por el viento (Eyal *et al.*, 1987a). Sanderson (1972) comprobó la conexión entre los dos estados,

sexual y asexual, y la forma sexual (teleomorfo) ha sido encontrada en varios países (Hunter *et al.*, 1999). Es la mayor causa de infección de los cultivos de trigo invernales durante el otoño en UK (Shaw & Royle, 1989b), y en USA (Schuh, 1990).

El estado sexual en Argentina fue determinado por Cordo *et al.* (1990) y resulta importante en el ciclo de la enfermedad. En Argentina, fue detectado el incremento de ascosporas en cosecha, sugiriendo que el estado sexual puede ser importante en el inicio de la infección, en la próxima estación de cultivo (Cordo *et al.*, 1999). La presencia del estado sexual en Argentina y en varios países del mundo incorpora mayor variabilidad al patógeno. Hunter *et al.* (1999) y Cordo *et al.* (2005) demostraron que las ascosporas tienen una tendencia a ser liberadas durante todo el año. Chen & McDonald (1996) sugirieron que las ascosporas constituyen la fuente primaria de inóculo más importante para generar la enfermedad. Estas juegan un rol significativo en la biología poblacional y en la epidemiología de la septoriosis a escala regional (10-100 km); mientras que las picnidiosporas participan en la propagación epidémica a corta distancia del inóculo primario (1-2 m) y juegan un rol en la epidemiología de la enfermedad a pequeña escala (1-2 m).

A pesar de que la forma sexual se ha encontrado en varios países, es su forma asexual la que causa la mayoría de los síntomas de la enfermedad y las pérdidas de rendimiento en el cultivo de trigo (Eyal *et al.*, 1987a).

Después de que son liberadas del picnidio, las picnidiosporas germinan en un sustrato adecuado, cuando las plantas están mojadas. La germinación se produce mediante el alargamiento de la célula apical o por gemación. El hongo puede penetrar en la hoja por los estomas o, directamente, a través de las paredes celulares de la epidermis (Eyal *et al.*, 1987a).

La humedad es necesaria en todas las etapas del proceso de infección: germinación, penetración, desarrollo del micelio dentro del tejido de la planta y posterior formación de picnidios (Browning, 1979; Hookes, 1957; Shaner & Finney, 1976).

Los procesos de infección se producen mejor en días nublados y lluviosos, con temperaturas entre 20 y 25°C. Las picnidiosporas germinan en un medio húmedo, por lo general en agua libre, después de la exudación del picnidio en días lluviosos y/o con rocío abundante. Para la germinación y penetración se requieren temperaturas de 5 a 37°C, pero las temperaturas óptimas son de 15 a 25°C, y se necesitan por lo menos seis horas de humedad relativa para que se produzca una infección adecuada (Scharen &

Krupinsky, 1970). Los síntomas suelen aparecer después de 14 a 21 días (Eyal *et al.*, 1987a); sin embargo, el momento en que se manifiestan por primera vez depende en gran medida de la variedad y de las condiciones ambientales durante el proceso de infección (Eyal & Brown, 1976). Estos síntomas se desarrollan a través de toda la estación de crecimiento e inicialmente aparecen manchas foliares pequeñas, cloróticas, irregulares, usualmente en las hojas inferiores (Perelló *et al.*, 1988), a los 5 a 6 días después de la inoculación, con humedad relativa elevada y temperaturas entre los 18 y 24°C (Eyal & Brown, 1976). Luego, las manchas cloróticas se expanden y alcanzan 1-5 x 4-15 mm. Las lesiones, tienden a desarrollarse longitudinalmente y a estar restringidas a las nervaduras de la hoja. Conforme se desarrolla la enfermedad, los centros de las manchas adquieren un color ceniza (Perelló *et al.*, 1988), apareciendo las lesiones necróticas (tejido muerto) en las áreas cloróticas (Eyal & Brown, 1976). (Fig. 1.2). Estas lesiones se extienden y coalescen, expandiéndose por toda la hoja y con frecuencia resultan en una necrosis completa (Perelló *et al.*, 1988). (Fig.1.3). La producción de picnidiosporas puede estar relacionada con la respuesta de la variedad, pues hay menos producción en las variedades resistentes (Gough, 1978).



Fig. 1.2. Lesiones necróticas sobre las áreas cloróticas producidas por *Septoria tritici* en las hojas inferiores de *Triticum aestivum*.



Fig. 1.3. Lesiones necróticas que se extienden y coalescen producidas por *Septoria tritici* en las hojas inferiores de *Triticum aestivum*.



Fig. 1.4. Lesiones necróticas con picnidios (puntos negros) producidos por *Septoria tritici* en las hojas inferiores de *Triticum aestivum*.

Después de los 15 días de la inoculación, comienza la formación de picnidios que se desarrollan en las lesiones necróticas y pueden situarse tanto en el haz como en el envés de la hoja, extendiéndose por toda la lesión. (Fig. 1.4). Su tamaño varía según las variedades y depende también del número de picnidios, ya que a medida que aumenta su número suelen ser más pequeños (Eyal & Brown, 1976).

La infección sigue la elongación del tallo hacia las hojas superiores del cultivo y es cumplida enteramente por el estado asexual del hongo, en donde los picnidios, aumentan la dispersión de las picnidiosporas por salpicadura. Es decir, son dispersadas desde el tejido basal infectado hacia las hojas superiores por las gotas de lluvia. (Fig. 1.5). Sin embargo, los más recientes trabajos, mostraron que el movimiento ascendente del inóculo puede ocurrir en ausencia de salpicadura, aunque sí estaría influenciado por la posición del estrato de hojas en contacto con las hojas infectadas (Lovell *et al.*, 1997).



Fig. 1.5. Lesiones necróticas sobre las áreas cloróticas producidas por *Septoria tritici* en hoja bandera de *Triticum aestivum*.

1.3. El manejo integrado de la enfermedad

“Es un sistema de manejo de enfermedades que, en el contexto del medio ambiente asociado (agroecosistema) y de la dinámica de la población de los patógenos, utiliza

todas las técnicas disponibles para mantenerlas a niveles inferiores a aquellos que causan daño económico al cultivo” (INTA-FAO, 1979).

Desde hace algunos años los efectos negativos de las enfermedades sobre el rendimiento y la calidad del trigo se han incrementado debido, entre otras causas, a la expansión de la siembra directa sin rotación de cultivos, la difusión de genotipos susceptibles y el uso de semillas infectadas. De esta manera, el actual panorama sanitario de las enfermedades en la Argentina es muy diferente al de años atrás. En este contexto, nos encontramos frente al crecimiento de conocidas enfermedades foliares y a la amenaza de otras nuevas.

En este nuevo escenario, el manejo integrado de enfermedades del cultivo de trigo continúa siendo un importante desafío para usar los recursos y técnicas en forma racional, planificar las estrategias de acción y fundamentalmente, permitir la continuidad de la producción agrícola en el tiempo y en equilibrio.

El manejo integrado de enfermedades se basa en la resistencia genética conjuntamente con medidas culturales (rotaciones, laboreos de suelo, ajuste de la fecha y época de siembra, elección correcta de genotipos, manejo de la fertilización, aplicación de fungicidas, calidad de la semilla y control biológico) (Perelló, 2007; Simón, 2007).

El rastrojo en superficie no sólo funciona como reservorio de esporas, sino que además induce a ciertos hongos a reproducirse sexualmente (Ingold, 1964). Este tipo de reproducción no sólo representa una nueva fuente de inóculo primario y secundario bajo labranza cero, sino que, es a partir de ella que se crean nuevas recombinaciones genéticas del hongo, generándose así nuevos biotipos. Cuanto mayor sea la intensidad de las enfermedades causadas por patógenos necrotróficos en el cultivo previo, mayor será la probabilidad de que el rastrojo proveniente del mismo esté contaminado (Cook *et al.*, 1978). La rotación de cultivos disminuye el inóculo inicial y va a ser más efectiva dependiendo del patógeno en cuestión. Cuanto más específico sea el hongo y cuanto más limitada sea su capacidad de dispersión, mayor será la probabilidad de controlarlo por rotación.

La elección de variedades resulta de mucha importancia a la hora de tomar decisiones, por lo cual una estrategia muy útil y atractiva para la elección de los genotipos es la de consultar anualmente el perfil y riesgo sanitario de los cultivares, elaborado en base a la historia genética y al comportamiento a campo de cada variedad (Annone & García, 2005).

El efecto de la fertilización nitrogenada ha presentado resultados disímiles sobre este patógeno. Algunos trabajos han señalado que la fertilización nitrogenada incrementa la severidad de la mancha de la hoja (Prew *et al.*, 1983; Broschious *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1994; Leitch & Jenkins, 1995), en tanto que otros encontraron incrementos o reducciones en la severidad de la enfermedad dependiendo de las condiciones de los experimentos (Johnston *et al.*, 1979; Arama, 1996; Simón *et al.*, 2002; Simón, 2003). Por lo tanto, el efecto del N sobre la mancha de la hoja podría estar influenciado por el clima, el tipo de suelo, la dosis de N aplicada, la estructura del canopeo, los cultivos previos, el tiempo de aplicación, la resistencia del cultivar y el inóculo inicial (Johnston *et al.*, 1979; Prew *et al.*, 1983; Hayden *et al.*, 1994; Leitch & Jenkins, 1995; Arama, 1996; Simón, 2003).

Por otro lado, el movimiento de semilla infectada puede ser un vehículo para que esta enfermedad pueda ser dispersada a cortas y largas distancias (Banke & McDonald, 2005), suponiendo que hay dos mecanismos de transmisión a través de las semillas: mediante el micelio vegetativo dentro de los tejidos de las semillas, o en estado de latencia dentro del embrión (Mathur & Cunfer, 1993). Recientemente, se ha determinado a través de técnicas moleculares la presencia de *S. tritici* en la semilla de trigo (Consolo *et al.*, 2009), lo que indica la posibilidad de su transmisión a plántula. Aunque hay evidencias de la presencia de *S. tritici* en semilla, es dudosa la importancia de la semilla como fuente de inóculo en el ciclo de la enfermedad ya que es un parásito de baja capacidad competitiva, resultando eliminado o enmascarado por los microorganismos más competitivos en los actuales métodos de detección (Carmona *et al.*, 1999a).

En cuanto al control biológico de la mancha de la hoja, algunos trabajos han evaluado la eficacia de *Trichoderma* spp. sobre esta enfermedad arrojando resultados dispares sobre el control de la misma (Cordo *et al.*, 2004; Perelló *et al.*, 1997; 2004). Perelló *et al.* (2009) determinaron que el antagonismo fue eficaz solamente en una fase temprana de la enfermedad. En general, se ha encontrado un nivel de control similar con el uso de fungicidas o *Trichoderma* spp. (aplicado en semilla o al estadio de plántula) en los primeros estadios del cultivo de trigo, mientras que en etapas más avanzadas el control ejercido por el fungicida fue mayor (Perelló *et al.*, 2004; 2006; 2009). Cordo *et al.*, (2004) encontraron reducciones significativas del porcentaje de área foliar cubierta por necrosis y por picnidios, en estadio de plántula y bajo invernáculo, con varias cepas de *Trichoderma* spp., cuando se evaluó la enfermedad a los 21 días de haber inoculado a

las plantas con *S. tritici* y, principalmente, cuando las cepas se aplicaron en semilla, demostrando la habilidad biocontroladora de este antagonista para restringir el desarrollo de la lesión en estadios tempranos del cultivo de trigo.

La alternativa de usar fungicidas foliares puede resultar ventajosa cuando se realizan con un uso racional y dentro de un manejo integrado de la enfermedad (Cortese *et al.*, 1998). La toma de decisiones para la aplicación de fungicidas en trigo se basa en la consideración de una serie de factores (Annone, 2000). Una herramienta válida para no cometer errores es la aplicación de fungicidas en base a los conceptos de Umbral de Daño Económico (UDE) y de Umbral de Acción (UDA) (Carmona *et al.*, 1999b). Los grupos más utilizados de fungicidas son los triazoles y las estrobilurinas y sus mezclas. Los triazoles involucran moléculas de acción sistémica. Afectan las membranas de los hongos patógenos inhibiendo la síntesis de los esteroides (ISE), presentando efectividad de acción sobre patógenos foliares (manchas, oidios y royas) y algunos para fusariosis. Las estrobilurinas son de acción oligosistémica, alteran procesos respiratorios en mitocondrias, inhibiendo la respiración mitocondrial debido al bloqueo de la transferencia de electrones en el complejo del citocromo-bc 1 (Jones, 2000).

En cuanto al control de esta enfermedad, varios métodos pueden reducir el efecto de esta enfermedad, pero la resistencia genética es una alternativa de control sustentable, con una relación costo efectividad relativamente baja y sin impacto sobre el medio ambiente. Además determina el éxito de otras estrategias de control (Simón, 2003).

1.4. La resistencia genética

La resistencia es una reacción de defensa del hospedante, resultante de una suma de factores que tienden a disminuir la agresividad y/o la virulencia del patógeno, una vez establecido el contacto con el hospedante. El sistema genético de la planta actúa a través de mecanismos morfológicos y fisiológicos contra las razas fisiológicas de los patógenos.

Los cultivares resistentes siempre han sido un componente esencial del manejo integrado de las enfermedades de trigo. La incorporación de genes de resistencia ha sido muy exitosa para algunas enfermedades biotróficas como la roya negra o la roya anaranjada, pero para las enfermedades necrotróficas como la fusariosis o la septoriosis, el mejoramiento genético ha sido muy difícil. En esto han incidido diversos factores,

entre ellos la alta diversidad genética de los patógenos que las ocasionan, los escasos estudios de variabilidad genética, el hecho de que parte de la resistencia está condicionada por poligenes, la escasa identificación de los mismos que hacen mas dificultosa su incorporación (Simón, 2007).

Algunos factores fisiológicos y ambientales influyen la expresión de la resistencia a esta enfermedad, como la etapa de crecimiento del cultivo (Holmes & Cohloun, 1974; Tavella, 1978; Wainshilbaum & Lipps, 1991; Arama, 1996; Kema & van Silfhout, 1997; Simón & Cordo, 1999), la temperatura del aire (Holmes & Cohloun, 1974; Wainshilbaum & Lipps, 1991), la humedad relativa (Holmes & Cohloun, 1974) y la lluvia (Thomas *et al.*, 1989).

En general, la resistencia a la septoriosis de la hoja es escasa en las variedades comerciales que poseen buenas características agronómicas, sin embargo en diversos materiales se ha detectado resistencia cuantitativa y cualitativa (Jlibene *et al.*, 1994; Brading *et al.*, 2002; Simón & Cordo, 1998). Es conocido que ambas resistencias coexisten en el patosistema *Mycosphaerella graminicola*- *Triticum aestivum*. La resistencia cuantitativa está condicionada por poligenes, es parcial o incompleta, aislamiento no-específica y de alta durabilidad (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998; Chartrain *et al.*, 2004a). En cambio, la resistencia cualitativa, está condicionada por uno o pocos genes, es completa y en general de menor durabilidad (Somasco *et al.*, 1996; Arraiano *et al.*, 2001b; McCartney *et al.*, 2001; Brading *et al.*, 2002). Se encontró resistencia condicionada por uno o dos genes en algunos materiales (Narváez & Caldwell, 1957; Rillo & Caldwell, 1966; Rosielle & Brown, 1979; Lee & Gough, 1984; Brading *et al.*, 1999), mientras que en algunos otros se han confirmado al menos tres genes de resistencia (Rosielle & Brown, 1979). En los materiales de nuestro país la resistencia encontrada es parcial y no se han identificado aún los genes que la condicionan (Simón *et al.*, 2005a). La identificación de los mismos y la incorporación de genes de resistencia y QTL's ya localizados es un paso fundamental en los planes de mejoramiento (Simón, 2005).

La estructura natural de la población de *Septoria tritici* está determinada por las interacciones cultivar x aislamiento (Ezrati *et al.*, 2001). Se considera que los cultivares pueden desarrollar resistencia específica a la raza y que el patógeno es capaz de adaptarse rápidamente a la resistencia cualitativa del hospedante (Cowger *et al.*, 2001).

La resistencia genética es la técnica más apropiada ambientalmente y en cuanto a costo-efectividad para el manejo de enfermedades en cultivos (Simón *et al.*, 2002;

Simón, 2003). Si bien, en el caso de *Septoria tritici*, su incorporación en cultivares comerciales ha sido limitada, el conocimiento de la estructura de las poblaciones del patógeno y la utilización de herramientas moleculares facilitará la incorporación de la misma. El conocimiento acerca de la localización precisa de los genes y la identificación de marcadores moleculares ligados a los mismos, son importantes herramientas para la selección en programas de mejoramiento, sin la necesidad de inoculaciones con el patógeno (Simón, 2003). La caracterización de la población del patógeno ha sido limitada en nuestro país, de manera que se necesita un conocimiento más amplio de su estructura. Determinar su variabilidad genética resulta importante para conocer si algunos de los genotipos de este patógeno predominan en un área geográfica determinada. Esto también permitirá evaluar la resistencia del germoplasma argentino de trigo frente a aislamientos que representen distintos genotipos del patógeno.

Por otro lado, se sabe que otras especies de trigo también pueden ser importantes fuentes de resistencia. Una fuente importante de resistencia para realizar cruzamientos con *T. aestivum* L. en programas de mejoramiento lo constituye el trigo espelta (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell), estrechamente relacionado con el trigo pan. Este es un cultivo alternativo con requerimientos de crecimiento poco exigentes. Muestra una muy buena adaptabilidad (Laghetti *et al.*, 1999) y mejor comportamiento en altura que el trigo pan (Ruegger & Winzeler, 1993). Su bajo rendimiento está asociado con mayores niveles de proteína (Campbell, 1997). Representa una fuente de resistencia genética a diversas enfermedades, incluida la roya del tallo (McVey & Leonard 1990), la roya amarilla (Kema, 1992) y la mancha de la hoja (Simón *et al.*, 2005b). Además es fácilmente cruzable con el trigo pan, proporcionando los recursos genéticos de interés para el mejoramiento de éste.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Facilitar la incorporación de la resistencia a *M. graminicola* en planes de mejoramiento destinados a la obtención de cultivares comerciales, a través de la caracterización de la población del patógeno en nuestra zona triguera y de la identificación de nuevas fuentes de resistencia y marcadores moleculares asociados a la misma.

2.2. Objetivos particulares

- 1- Determinar la diversidad de la población de *Septoria tritici* en diferentes localidades de la región triguera argentina.
- 2- Evaluar su virulencia sobre líneas con genes conocidos, líneas diferenciales y cultivares argentinos de trigo que presentan moderada resistencia en condiciones de campo.
- 3- Localizar genes de resistencia en una población originada del cruzamiento de 7D *T. spelta*/Chinese Spring x *T. spelta*.

3. Hipótesis de trabajo

Objetivos 1 y 2

- Es posible detectar grupos de aislamientos que presenten diferente comportamiento cultural, molecular y patogénico en nuestros cultivares.
- La predominancia de algunos de estos aislamientos puede asociarse con determinadas áreas geográficas.
- Existen fuentes de resistencia parcial entre nuestros cultivares que presentan buen comportamiento en los estadios de plántula y adulto frente a numerosos aislamientos.

Objetivo 3

- Es posible localizar genes que condicionan resistencia monogénica completa y/o QTL's en estadio de plántula y/o adulto, en poblaciones de las que se dispone de un mapa molecular saturado en cruzamientos de materiales resistentes x susceptibles o con resistencia parcial.

Diagrama de la tesis

En el **capítulo 2**, se presenta la caracterización molecular de aislamientos monospóricos de *M. graminicola* provenientes de diferentes subregiones de la Región Triguera Argentina, utilizando la técnica de marcadores moleculares ISSR (Intersimple Sequences Repeat).

En el **capítulo 3**, se realiza la evaluación de necrosis y cobertura picnidial, en plántula y estadio adulto, de 23 líneas y cultivares de trigo representados por líneas extranjeras con genes conocidos, líneas diferenciales y cultivares nacionales, inoculados con 16 aislamientos monospóricos del patógeno en base a la caracterización molecular realizada en el capítulo 2.

En el **capítulo 4**, se indican los resultados de la localización de la resistencia en un set de líneas doble haploides provenientes de un cruzamiento entre Chinese Spring y Chinese Spring 'CS' (*T.aestivum* subsp. *spelta* 7D) en estadios de plántula y adulto.

En el **capítulo 5**, se presenta la discusión general de los principales resultados de los experimentos y el análisis sobre la importancia y los nuevos conocimientos que son aportados por esta tesis.

CAPITULO 2

Caracterización molecular del patógeno

Resumen

Se estudió la estructura genética y diversidad de la población de *Mycosphaerella graminicola* utilizando un elevado número de aislamientos de distintas localidades de la Región Triguera Argentina, subregión IV (SE de la Provincia de Buenos Aires) y II Sur (parte central de la Provincia de Buenos Aires), a través de su caracterización con marcadores moleculares ISSR. Las muestras de hojas enfermas fueron colectadas al azar desde distintos cultivares de trigo pan (*T. aestivum* L.), y los aislamientos se realizaron siguiendo las técnicas fitopatológicas de rutina, obteniéndose un total de 127 aislamientos monospóricos, los cuales fueron sometidos al análisis molecular para comparar la diversidad genotípica de las dos poblaciones. La técnica utilizada en el análisis molecular fue ISSR con MP-PCR y utilizando 10 primers: (GACA)₄; (AAC)₇; (ATC)₇; (AC)₉; (AAG)₇; (AG)₉; (AGC)₅; (CAG)₅, (GTG)₅ y (GACAC)₃. Se obtuvieron un total de 84 bandas polimórficas que variaron en un rango de 200 a 8000 pb. De los 83 aislamientos que amplificaron, 81 haplotipos fueron distintos (98% de diversidad genotípica) y cuatro genotipos idénticos, mientras que 44 aislamientos no generaron ningún producto de amplificación. El mayor número de fragmentos de ADN polimórfico fue determinado por los primers (ATC)₇ y (GTG)₅, que detectaron bandas en 38 aislamientos. Estos resultados revelan un alto grado de variabilidad genotípica en las poblaciones de *M. graminicola* de estas dos subregiones. La variación genotípica de las poblaciones de *M. graminicola* puede atribuirse a la variación en la recombinación regular, los diferentes patrones de migración, presencia e importancia de la forma sexual. A partir de esto, es posible seleccionar un conjunto de aislamientos completamente diferentes que se utilizarán para determinar su virulencia sobre un set de nuestros cultivares, líneas extranjeras y diferenciales con genes de resistencia conocidos.

Introducción

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) Schroeter in Cohn (anamorfo *Septoria tritici* Rob. ex Desm.) es uno de los hongos patógenos más destructivos del trigo (King *et al.*, 1983), causante de la mancha de la hoja en este cereal, que ocurre en todas las áreas de cultivo de trigo del mundo. Existen importantes pérdidas en el campo que pueden ser atribuidas a este patógeno, especialmente durante las estaciones con elevadas precipitaciones y humedad (Verreet, 1995, Schnieder *et al.*, 2001).

La diversidad genética del patógeno es una de las causas de la escasa resistencia que ha podido incorporarse en cultivares comerciales. En Argentina, la especialización fisiológica de este hongo ha sido ampliamente estudiada. Todos los resultados confirmaron que este hongo mostró variación en el grado de virulencia. Sin embargo, la variación genética entre las poblaciones de Argentina ha sido escasamente estudiada (Cordo *et al.*, 2006) y no se ha establecido la virulencia de los aislamientos caracterizados sobre líneas con genes conocidos o cultivares comerciales.

2.1. Marcadores Moleculares y su aplicación al control de la enfermedad

El primer marcador usado para *Septoria tritici* en Argentina fue la virulencia (Cordo *et al.*, 1990; Cordo & Arriaga, 1990; Perelló *et al.*, 1990a y b; Giecco *et al.*, 2004). Sin embargo, la virulencia en este hongo es un carácter muy sensible a las condiciones ambientales, originando dificultades en la evaluación (Cordo *et al.*, 2006).

El estudio de las poblaciones de patógenos de plantas y su evolución pudo ser ampliado gracias al uso de diferentes marcadores (McDonald & McDermott, 1993). A mediados de la década del 60, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento de plantas eran los morfológicos. La revolución en el campo se inició con el desarrollo de marcadores isoenzimáticos. Las isoenzimas son múltiples formas moleculares de la misma enzima que ocurren en una especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificando cada una de las enzimas (Moss, 1982). Han sido utilizadas para estudios de variabilidad genética de las poblaciones naturales, flujo genético entre poblaciones, procesos de hibridación natural y en el análisis de dispersión de especies y de filogenias. En el mejoramiento de plantas, se aplicaron para la detección de ligamiento genético con caracteres mono y poligénicos, identificación de

variedades, selección indirecta de caracteres agronómicos, introducción génica y evaluación de germoplasma (Tanksley & Orton, 1983). Los alelos isoenzimáticos son codominantes, por lo tanto, los genotipos heterocigotas y homocigotas de un determinado locus pueden ser identificados fácilmente (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Con el advenimiento de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético, directamente a nivel del ADN (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estas técnicas incluyen: “Polimorfismos para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)”, “ADN Polimórfico Amplificado al Azar” (RAPD), “Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados” (AFLP), y “Microsatélites” o “Secuencias Simples Repetidas” (SSRs) (Razavi & Hughes, 2004).

Los RFLP son fragmentos de ADN polimórficos obtenidos por corte de la doble hélice a través del uso de enzimas de restricción. Para que el polimorfismo sea detectado, es necesario que las secuencias de nucleótidos de las hebras de ADN de dos o más individuos comparados, sean diferentes (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Los RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) son generalmente dominantes y esto significa que los genotipos heterocigotas no pueden ser diferenciados de los homocigotas, pero la ventaja es que aumenta el número de marcadores, aliviando el problema (McDonald & McDermott, 1993).

El ensayo de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), combina la especificidad y poder de resolución de la muestra digerida por medio del uso de enzimas de restricción, con la velocidad y practicidad de la detección del polimorfismo vía PCR.

Los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat) son repeticiones en tándem compuestas de uno a seis nucleótidos, los cuales son ubicuos, abundantes y altamente polimórficos en la mayoría de los genomas eucarióticos (Tautz & Renz, 1984). Son marcadores codominantes, altamente reproducibles y heredables en el modelo de herencia mendeliano (Morgante & Olivieri, 1993) y pueden aparecer extendidos por todo el genoma (Tautz, 1989; Hamada *et al.*, 1982). Los microsatélites repetidos ocurren en las regiones codificantes y no codificantes de los genomas eucariotas (Tautz *et al.*, 1986). Las secuencias de ADN, que flanquean a los microsatélites, son conservadas y usadas para diseñar primers específicos para PCR, lo cual podría amplificar el locus del microsatélite y permitir la detección de diferentes alelos de un locus (Sun *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los marcadores microsatélites son los que poseen el más elevado

contenido de información de polimorfismo. Todas estas características hacen que los microsatélites sean ideales para el mapeo genético y físico de genomas, para la identificación y discriminación de genotipos, para estudios de genética de poblaciones, construcción de mapas genéticos de genomas eucariotas, y clonación de genes que pueden ser utilizados en el mejoramiento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Los ISSR (Intersimple Sequences Repeat) constituyen un tipo de marcadores microsatélites que consisten en la amplificación de secuencias de ADN repetidas entre SSR a través del anclaje o no anclaje de los primers homólogos SSR (Zietkiewicz *et al.* 1994). Los SSR e ISSR no requieren de un previo conocimiento de la secuencia y generan patrones específicos y reproducibles, debido a las estrictas condiciones de reacción (Bornet & Branchard 2001). Los primeros estudios que emplearon marcadores ISSR fueron publicados en 1994 (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994), se centraron en las especies cultivadas y demostraron la naturaleza hipervariable de estos marcadores moleculares (Wolfe & Liston, 1998a). Las técnicas que utilizan ISSR son casi idénticas a las técnicas de RAPD, excepto que los primers ISSR están diseñados a partir de secuencias de microsatélites y las temperaturas de annealing utilizadas son superiores a las empleadas para los marcadores RAPD. En base a los trabajos publicados queda claro que los marcadores ISSR tienen un gran potencial para los estudios de las poblaciones naturales (Wolfe *et al.*, 1998)

Los marcadores moleculares están siendo cada vez más utilizados para caracterizar las poblaciones de hongos patógenos de plantas (Schnieder *et al.*, 2001), ya que permiten evaluar los niveles de diversidad genética y relaciones cofenéticas dentro y entre las especies, y en particular pueden servir para identificar razas y patotipos (Brown, 1996). Las diversas aplicaciones de marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético pueden ser distribuidas en aplicaciones cuyos resultados presentan expectativas a corto, medio y largo plazo. Las aplicaciones de corto plazo incluyen la identificación y discriminación de genotipos. Las aplicaciones de medio y largo plazo permiten cuantificar la variabilidad genética existente en la secuencia de ADN y la correlación con la expresión fenotípica en procedimientos de mapeo genético. En aplicaciones a largo plazo, esta información molecular permite la selección y recombinación de genotipos para promover el avance genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

La estructura genética de las poblaciones de *M. graminicola* se ha estudiado durante más de una década (Schnieder *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2003). Varios métodos

moleculares se han utilizado para el análisis de diversidad de este hongo patógeno, tales como RAPD, AFLP, SSR y ISSR (Guzmán *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2000; Meng & Chen 2001; Menzies *et al.*, 2003; Sartorato, 2004; Wagara *et al.*, 2004). Muchos estudios demostraron que existe un alto nivel de variabilidad genética en las poblaciones de *M. graminicola* y que cada población se compone de diferentes genotipos. McDonald & Martínez (1990), encontraron que la mayoría de la variación genética se encuentra concentrada en áreas pequeñas y de pocos metros, y es mucho mayor que la variabilidad genética que existe a nivel de todo un lote. Así, en algunos casos, la sorpresiva cantidad de variación en el patógeno puede estar presente sobre una sola planta hospedante (McDonald & McDermott, 1993). Sin embargo, no existen antecedentes sobre la categorización de los aislamientos de este patógeno en razas fisiológicas, excepto Saadaoui (1987) que designó tres razas en Marruecos. Esto se ha debido fundamentalmente a los aspectos cuantitativos de la interacción *M. graminicola*-*T. aestivum*, a una alta variabilidad del patógeno y a las recombinaciones durante la ascosporigénesis. La agrupación de aislamientos con comportamientos moleculares y patogénicos similares puede ser posible y las herramientas moleculares son de suma utilidad para lograrlo.

Los marcadores RFLP permitieron diferenciar aislamientos de *M. graminicola* que no podían ser distinguidos en base a la virulencia y la morfología (McDonald & Martínez 1990) y la detección de clones en poblaciones de este patógeno (McDonald & McDermott, 1993). RFLP y ADN fingerprints fueron usados para mostrar que miles de genotipos diferentes de este hongo pueden aparecer en campos individuales de trigo. (Boeger & McDonald, 1991, McDonald & Martínez, 1991).

Extensas poblaciones de *M. graminicola* fueron evaluadas con marcadores RFLP (Linde *et al.*, 2002), y marcadores RAPD y AFLP se utilizaron para construir un mapa de ligamiento genético (Kema *et al.*, 2002). Schnieder *et al.* (2001) utilizaron marcadores AFLP para analizar poblaciones de *M. graminicola* de diferentes localidades de Alemania. Este grupo de trabajo observó una alta diversidad genética dentro de cada población y una importante migración entre las poblaciones, impidiendo el aislamiento y diferenciación genética de poblaciones geográficamente separadas.

Razavi & Hughes (2004) trabajaron con un total de 90 aislamientos de *M. graminicola* desde el oeste de Canadá (Universidad de Saskatchewan, Saskatoon) utilizando RAPD. Detectaron un alto grado de polimorfismo de ADN y gran número de diferentes fenotipos moleculares en esa población.

Otro trabajo evaluó la estructura genética de las poblaciones de *M. graminicola* de Kansas, a diferentes escalas espaciales, utilizando AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Las pruebas de subdivisión de población revelaron que el 98 % de la variabilidad genética se produjo dentro de las poblaciones (Kabbage *et al.*, 2008).

En cuanto a los estudios basados en marcadores microsatélites, Owen *et al.* (1998) publicó nueve microsatélites de locus simple para *Mycosphaerella graminicola*: (GGC)₇ (GGT)₂; (CGG)₇; (CCG)₈; (GGC)₅; (CGG)₅; (ACGG)₄; (TG)₉; (CGG)₅ y (AC)₂; para los locus: *ST1A2*; *ST1A4*; *ST1B3*; *ST2E4*; *ST1E3*; *ST2C10*; *ST1G7*; *ST1E7* y *ST1D7*, respectivamente, siendo los más importantes los tres primeros y los tres últimos microsatélites, ya que permitieron distinguir todos los aislamientos utilizados y diferenciar 12 genotipos diferentes.

Czembor & Arseniuk (1999) usaron una serie de primers específicos para PCR, estudiando diferentes especies de *Septoria* (*S. avenae* f. sp. *Triticea*, *S.* y *S. nodorum tritici*) y encontraron que los marcadores SSR y ISSR fueron las técnicas más sensibles para la detección de polimorfismos de ADN y el mayor porcentaje de fragmentos polimórficos de ADN fueron producidos por los primers (ATC)₄, (GACA)₇, (AC)₇ y (AAC)₉ de los 15 primers utilizados.

Recientemente, Goodwin *et al.* (2007) analizaron una base de datos de 30.137 secuencias EST (expressed sequence tag) (Kema *et al.*, 2003) de *M. graminicola* e identificó 38 dinucleótidos y 71 trinucleótidos microsatélites con número repetido de seis o más. Los microsatélites que mostraron polimorfismo entre los progenitores de la población de mapeo se integraron en el mapa genético existente (Kema *et al.*, 2002). La base de datos de EST provee una excelente fuente de nuevos y altamente polimórficos marcadores microsatélites, que pueden ser multiplicados para análisis genéticos de alto rendimiento de *M. graminicola* y especies afines (Goodwin *et al.*, 2007).

En Argentina, el estudio de *M. graminicola* se ha llevado a cabo con un conjunto limitado de aislamientos de algunas áreas, mediante RFLP. Estos estudios mostraron que el patógeno tiene un alto grado de variación en la virulencia (Cordo *et al.*, 2006) dentro de cada región. En otros trabajos (Jürgens *et al.*, 2006) se utilizaron aislamientos de lotes inoculados y otros de lotes no inoculados que dificultó la interpretación de los resultados. De ahí la importancia de realizar nuevos estudios de la población Argentina del patógeno en lotes de producción naturalmente infectados y de caracterizar los aislamientos agrupados por su virulencia en germoplasma de diferentes orígenes, trabajo que no ha sido realizado.

El conocimiento sobre la variabilidad genética de *M. graminicola* es muy importante porque nos podría permitir determinar los genotipos que predominan dentro de una determinada subregión triguera. También se puede utilizar para evaluar la resistencia del germoplasma de cultivares argentinos de trigo y germoplasma foráneo con genes conocidos o líneas diferenciales, con aislamientos que posean diferencias genéticas conocidas.

El objetivo de este estudio fue ampliar el conocimiento de la estructura genética y la diversidad de la población de *M. graminicola* utilizando un elevado número de aislamientos de distintas localidades de la Región Triguera Argentina, subregión IV (SE de la Provincia de Buenos Aires) y II Sur (parte central de la Provincia de Buenos Aires), a través de su caracterización con marcadores moleculares ISSR.

Hipótesis

- * Existe una amplia variabilidad genética en la población de *Septoria tritici*, siendo posible realizar una agrupación de aislamientos por patrones moleculares similares y asociar estos grupos a diferentes subregiones trigueras.
- * Es posible seleccionar dentro de ellos un set de aislamientos completamente diferentes para evaluar germoplasma de trigo.

Materiales y métodos

2.1. Caracterización de aislamientos del patógeno

2.1.1. Recolección de muestras y obtención de aislamientos de *M. graminicola*

Se recolectaron muestras y se aisló el patógeno desde hojas de trigo pan (*Triticum aestivum*) infectado, de distintos cultivares y diversas localidades trigueras, siguiendo las técnicas fitopatológicas de rutina para la obtención de aislamientos monospóricos.

El material fue colectado en campos de localidades distintas: Necochea y Tres Arroyos (Subregión Triguera IV) y 9 de Julio y Pla (Subregión Triguera II Sur). (Fig. 2.1).

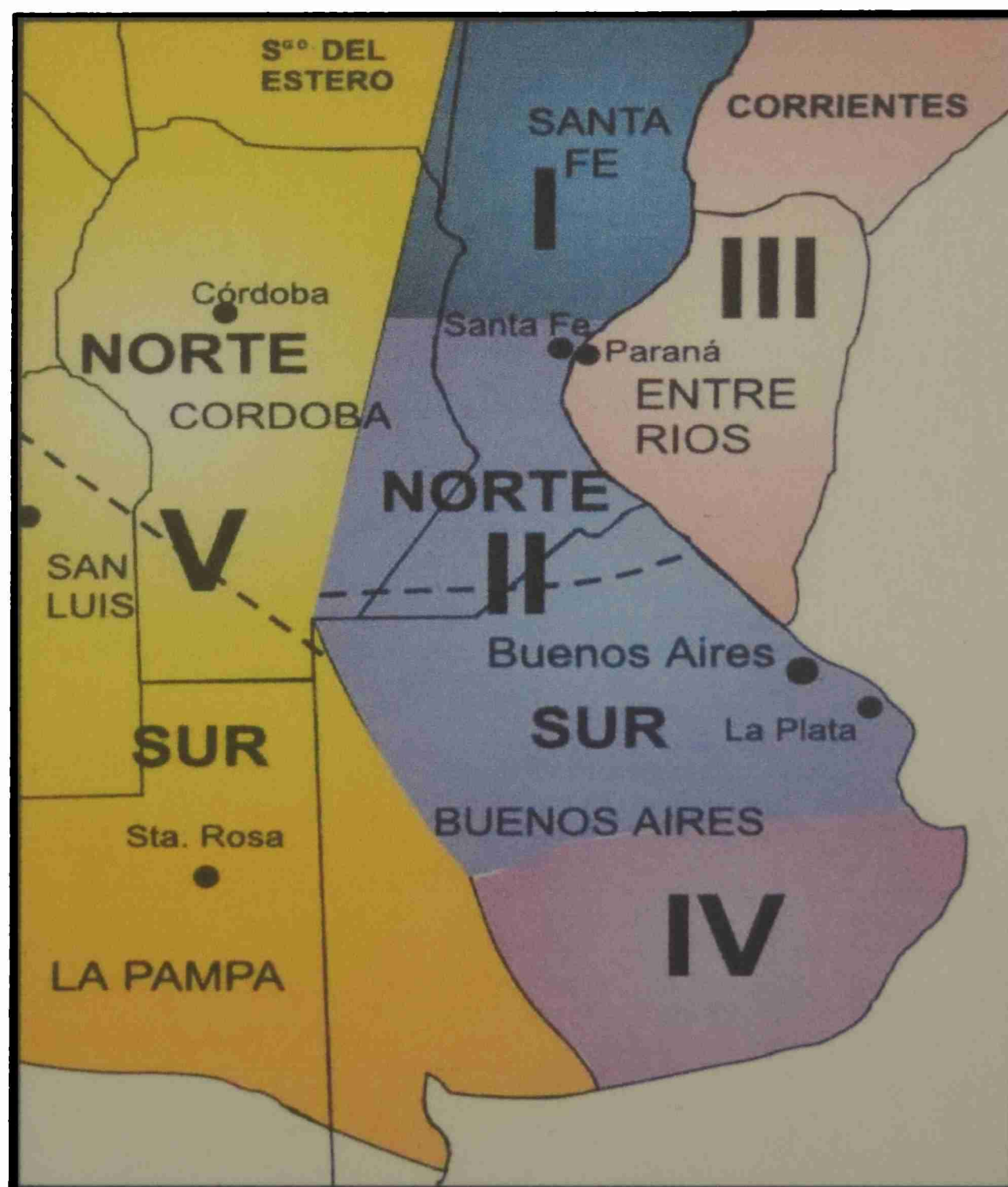


Fig. 2.1. Mapa de la Triguera Argentina mostrando las distintas subregiones

2.1.2. Método de muestreo

El muestreo fue realizado al azar en todas las localidades de las diferentes subregiones trigueras. Las hojas infectadas fueron obtenidas en cuatro campos en cada localidad, separados aproximadamente por 2 km uno de otro. En total se muestrearon ocho sitios (dos en cada campo) y se colectaron 10 a 15 hojas en cada sitio. El muestreo en Necochea y Tres Arroyos fue realizado en el año 2005, mientras que en Nueve de Julio y Pla en 2005 y 2007.

Las muestras fueron secadas durante 48 horas y colocadas dentro de sobres de papel. Estos sobres se conservaron en refrigerador a 4°C hasta el momento de su utilización.

2.1.3. Aislamientos del patógeno

De las 10-15 hojas tomadas de cada sitio, se eligieron tres al azar. Mediante una lupa se escogió de cada hoja una lesión, para obtener un aislamiento de cada hoja. Antes de realizar los aislamientos estas tres hojas fueron desinfectadas.

La técnica de desinfección de hojas se realizó seleccionando porciones de hojas que presentaban lesiones necróticas con picnidios, examinándolas bajo la lupa (Fig. 2.2). Luego estas porciones de hojas fueron tratadas con:

- 1°) alcohol 70 % durante 10 segundos.
- 2°) solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 90 segundos.
- 3°) agua destilada estéril durante 30 segundos (2 veces).



Fig. 2.2. Detalle de lesiones necróticas con picnidios en hoja de *Triticum aestivum* producida por *Septoria tritici*.

Posteriormente, las hojas fueron secadas con papel absorbente y colocadas de a dos en cámara húmeda, a temperatura ambiente (18-22°C), durante 24-48 horas antes de ser examinadas.

Las cámaras húmedas fueron realizadas tomando cajas de petri estériles, a las cuales se les colocó un disco de papel de filtro de 9 cm de diámetro en su interior. Por encima de él, se ubicaron 3 bandas elásticas y una malla de trama plástica. El papel de filtro se humedeció apenas con agua destilada para crear el ambiente de humedad.

Después de 1 a 2 días, cada lesión de las hojas, fue observada bajo la lupa extrayendo, mediante una aguja previamente flameada, el exudado de picnidiosporas y obteniéndose un picnidio por cada lesión. Este exudado de picnidiosporas se observó, la mayoría de las veces, como un pequeño almohadón acuoso de color rosa o blanquecino o como un cirro blanco emergiendo del picnidio oscuro (Fig. 2.3). El fundamento por el que se elige un solo picnidio por lesión se debe a que la variabilidad genética se evidencia más entre aislamientos de diferentes picnidios que entre aislamientos de un mismo picnidio.



Fig. 2.3. Cirros de picnidiosporas (blancos) vistos en lupa, emergiendo de los picnidios (negros) producidos por *Septoria tritici* sobre la superficie de la hoja enferma de *Triticum aestivum*.

Las picnidiosporas fueron sembradas en cajas de petri conteniendo medio de cultivo sólido agar-malta (22 gr de agar, 30 gr de extracto de malta, 5 gr de peptona y 3 gr de extracto de levadura en 1000 ml de agua destilada) (Cordo, 1978), colocando en cada caja, el exudado de cada hoja. Después de 6 a 10 días a temperatura ambiente, las colonias simples crecidas a partir del exudado, se resfregaron sobre el medio en forma de zig-zag, creando una estría, mediante el empleo de un ansa en anillo.

Nuevamente se dejó crecer la colonia unos 5-7 días a temperatura ambiente y con el empleo de la lupa, se pudo observar que en algún punto de la estría aparecieron esporas separadas o aisladas del resto. (Fig. 2.4).

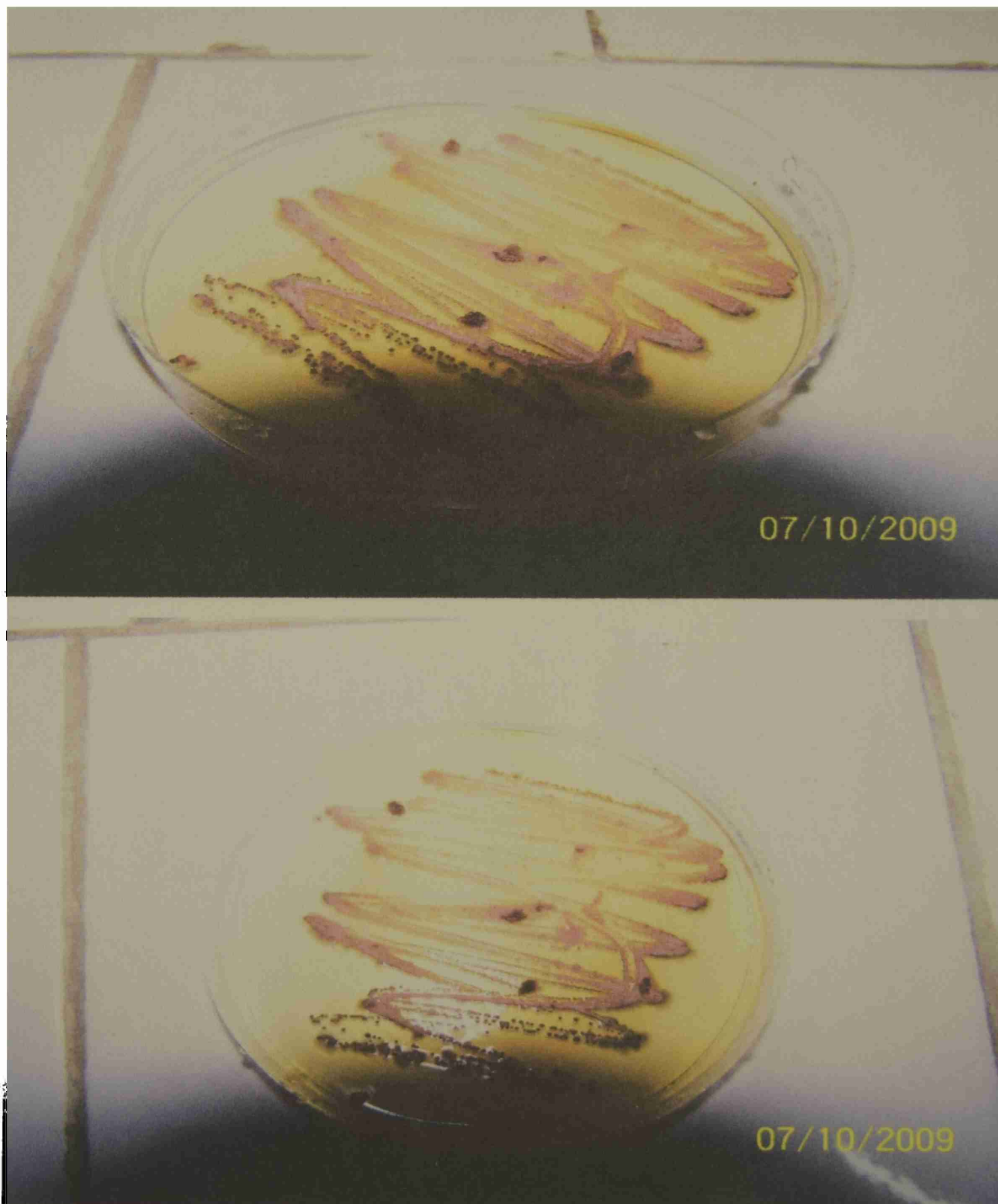


Fig. 2.4. Colonia de *Septoria Tritici* creciendo en estría en cajas de petri con medio de cultivo agar- malta. En algunos puntos de la estría se observan esporas aisladas del resto de la colonia.

Posteriormente, se tomaron tres de estas esporas aisladas y cada una se sembró por separado en estría, en un tubo de ensayo con 5 a 7 ml de medio sólido agar-malta (Cordo, 1978), previamente esterilizado en autoclave. Los tubos se colocaron a temperatura ambiente y a los pocos días se pudo observar una masa de conidios secundarios. De esta manera se lograron cultivos monospóricos que formarán parte del stock de la población de cada lugar. (Fig. 2.5). Los aislamientos fueron realizados en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo y posteriormente conservados en refrigerador a una temperatura de 4-5°C.

Se obtuvieron un total de 127 aislamientos monospóricos que constituyen la colección completa (59 de Necochea, 8 de Tres Arroyos, 54 de Nueve de Julio y 6 de Pla). El código, nombre y origen de cada aislamiento se indican en la Tabla 2.1. Cabe aclarar que con excepción de la Tabla 2.1, en donde se indica el nombre real de los aislamientos, en el resto de esta tesis serán nombrados de una manera reducida, la cual se corresponde con el código del aislamiento en el dendrograma, para facilitar la lectura e interpretación de tablas, figuras y del texto. Así por ejemplo FALP00105 será mencionado como 1; FALP05205 como 52; FALP23007 como 230, etc.

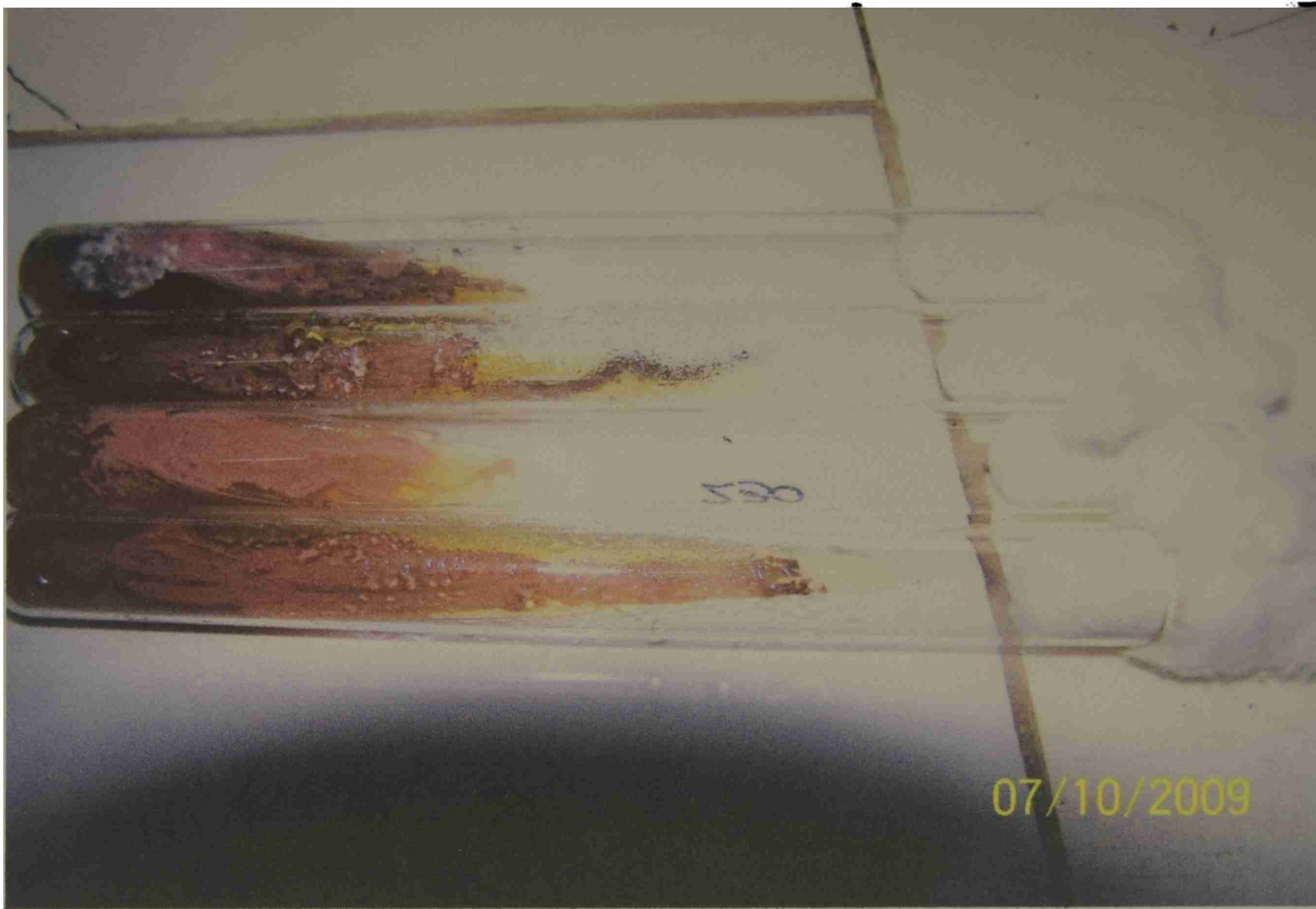


Fig. 2.5. Cultivos monospóricos de *Septoria tritici* en tubos de ensayo con medio de cultivo agar- malta.

Luego, los aislamientos monospóricos obtenidos, se sembraron en medio líquido sacarosa- levadura (10 gr. de sacarosa y 10 gr. de extracto de levadura en 1000 ml de agua destilada (Eyal *et al.*, 1987b) para poder realizar posteriormente la extracción de ADN. El cultivo en medio líquido se realizó tomando el volumen de un anza de la masa de conidios secundarios crecidos en cada tubo de ensayo (aislamiento monospórico) y colocándolos en 40 ml de este medio, ubicado en erlermeyers de 250 ml. Esto también fue hecho en condiciones asépticas, dentro de la cámara de flujo. Los erlermeyers sembrados, fueron colocados posteriormente en un agitador eléctrico Yulavo SW21C, a 150 rpm y a 22°C constantes, durante 10 días (McDonald & Martínez, 1990).

Luego de este período de crecimiento del hongo, se removió el micelio de los erlermeyers, utilizando una espátula. Este micelio fue llevado a una centrífuga a 3500 rpm y 5°C durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante, se volvió a colocar agua destilada estéril y se centrifugó otros 15 minutos en las mismas condiciones, para lavar el precipitado de conidios secundarios. Al retirar las muestras, los tubos se colocaron boca abajo sobre un papel absorbente durante unos 15 minutos para que pudiera ser absorbido todo el líquido. Utilizando una espátula, se retiró el pellet del fondo del tubo

de centrífuga y se lo introdujo en pequeños tubos de plástico cerrados, las cuales fueron a su vez, rotulados con el nombre del aislamiento.

Por último, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron bajo condiciones de vacío y baja temperatura, para lograr su deshidratación. Esto se realizó con el empleo de un liofilizador. Luego de 10-12 horas, las muestras presentaron un aspecto pulverulento (micelio deshidratado) y fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización para la extracción de ADN.

2.1.4. Medios de cultivo empleados

El medio sólido empleado fue agar-malta (Cordo, 1978). Se mezclaron todos sus ingredientes en frío y luego se calentó hasta ebullición. Se esterilizó 20 minutos en autoclave y luego fue volcado en cajas de petri, a razón de 5 ml por caja, en condiciones de esterilidad, dentro de la cámara de flujo.

Para realizar los repiques, se colocaron de 5 a 7 ml del medio en cada tubo de ensayo con su extremo protegido con un tapón de algodón y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos. Por último, los tubos se ubicaron inclinados para formar una estría sólida en la cual, posteriormente, se sembraron las esporas.

El medio líquido utilizado para hacer crecer las colonias fue sacarosa y levadura (Eyal *et al.*, 1987b). Fueron colocados 40 ml de este medio en erlenmeyers de 250 ml y esterilizados en autoclave durante 20 minutos. Por último, cuando el medio se encontraba tibio y antes de ser utilizado, fueron agregados en cada frasco, 80 ml del antibiótico kanamicyna con una concentración de 25 mg.ml⁻¹.

Tabla 2.1. Código, nombre, origen y año de colección de cada aislamiento obtenido

Código del aislamiento en el dendrograma	Nombre del Aislamiento	Origen (Localidad)	Año de Colección	Región Triguera Argentina
1	FALP00105	Necochea	2005	IV
2	FALP00205	Necochea	2005	IV
3	FALP00305	Necochea	2005	IV
14	FALP01405	Necochea	2005	IV
20	FALP02005	Necochea	2005	IV
24	FALP02405	Necochea	2005	IV
26	FALP02605	Necochea	2005	IV
29	FALP02905	Necochea	2005	IV
30	FALP03005	Necochea	2005	IV
32	FALP03205	Necochea	2005	IV
33	FALP03305	Necochea	2005	IV
35	FALP03505	Necochea	2005	IV
36	FALP03605	Necochea	2005	IV
38	FALP03805	Necochea	2005	IV
39	FALP03905	Necochea	2005	IV
40	FALP04005	Necochea	2005	IV
43	FALP04305	Necochea	2005	IV
44	FALP04405	Necochea	2005	IV
56	FALP05605	Necochea	2005	IV
68	FALP06805	Necochea	2005	IV
70	FALP07005	Necochea	2005	IV
72	FALP07205	Necochea	2005	IV
74	FALP07405	Necochea	2005	IV
75	FALP07505	Necochea	2005	IV
76	FALP07605	Necochea	2005	IV
77	FALP07705	Necochea	2005	IV
78	FALP07805	Necochea	2005	IV
79	FALP07905	Necochea	2005	IV
80	FALP08005	Necochea	2005	IV
81	FALP08105	Necochea	2005	IV
82	FALP08205	Necochea	2005	IV
83	FALP08305	Necochea	2005	IV
85	FALP08505	Necochea	2005	IV
87	FALP08705	Necochea	2005	IV
94	FALP09405	Necochea	2005	IV
95	FALP09505	Necochea	2005	IV
97	FALP09705	Necochea	2005	IV
98	FALP09805	Necochea	2005	IV
99	FALP09905	Necochea	2005	IV

100	FALP10005	Necochea	2005	IV
102	FALP10205	Necochea	2005	IV
103	FALP10305	Necochea	2005	IV
105	FALP10505	Necochea	2005	IV
106	FALP10605	Necochea	2005	IV
112	FALP11205	Necochea	2005	IV
113	FALP11305	Necochea	2005	IV
115	FALP11505	Necochea	2005	IV
120	FALP12005	Necochea	2005	IV
122	FALP12205	Necochea	2005	IV
129	FALP12905	Necochea	2005	IV
130	FALP13005	Necochea	2005	IV
133	FALP13305	Necochea	2005	IV
135	FALP13505	Necochea	2005	IV
137	FALP13705	Necochea	2005	IV
142	FALP14205	Necochea	2005	IV
149	FALP14905	Necochea	2005	IV
150	FALP15005	Necochea	2005	IV
151	FALP15105	Necochea	2005	IV
152	FALP15205	Necochea	2005	IV
46	FALP04605	Tres Arroyos	2005	IV
47	FALP04805	Tres Arroyos	2005	IV
49	FALP04905	Tres Arroyos	2005	IV
50	FALP05005	Tres Arroyos	2005	IV
52	FALP05205	Tres Arroyos	2005	IV
88	FALP08805	Tres Arroyos	2005	IV
89	FALP08905	Tres Arroyos	2005	IV
93	FALP09305	Tres Arroyos	2005	IV
203	FALP20307	Pla	2007	II Sur
205	FALP20507	Pla	2007	II Sur
206	FALP20607	Pla	2007	II Sur
211	FALP21107	Pla	2007	II Sur
224	FALP22407	Pla	2007	II Sur
233	FALP23307	Pla	2007	II Sur
201	FALP20107	Nueve de Julio	2007	II Sur
202	FALP20207	Nueve de Julio	2007	II Sur
204	FALP20407	Nueve de Julio	2007	II Sur
207	FALP20707	Nueve de Julio	2007	II Sur
208	FALP20807	Nueve de Julio	2007	II Sur
209	FALP20907	Nueve de Julio	2007	II Sur
210	FALP21007	Nueve de Julio	2007	II Sur
212	FALP21207	Nueve de Julio	2007	II Sur
213	FALP21307	Nueve de Julio	2007	II Sur
214	FALP21407	Nueve de Julio	2007	II Sur
215	FALP21507	Nueve de Julio	2007	II Sur
216	FALP21607	Nueve de Julio	2007	II Sur

217	FALP21707	Nueve de Julio	2007	II Sur
218	FALP21807	Nueve de Julio	2007	II Sur
219	FALP21907	Nueve de Julio	2007	II Sur
220	FALP22007	Nueve de Julio	2007	II Sur
221	FALP22107	Nueve de Julio	2007	II Sur
222	FALP22207	Nueve de Julio	2007	II Sur
223	FALP22307	Nueve de Julio	2007	II Sur
225	FALP22507	Nueve de Julio	2007	II Sur
226	FALP22607	Nueve de Julio	2007	II Sur
227	FALP22707	Nueve de Julio	2007	II Sur
228	FALP22807	Nueve de Julio	2007	II Sur
229	FALP22907	Nueve de Julio	2007	II Sur
230	FALP23007	Nueve de Julio	2007	II Sur
231	FALP23107	Nueve de Julio	2007	II Sur
232	FALP23207	Nueve de Julio	2007	II Sur
234	FALP23407	Nueve de Julio	2007	II Sur
235	FALP23507	Nueve de Julio	2007	II Sur
236	FALP23607	Nueve de Julio	2007	II Sur
237	FALP23707	Nueve de Julio	2007	II Sur
238	FALP23807	Nueve de Julio	2007	II Sur
239	FALP23907	Nueve de Julio	2007	II Sur
240	FALP24007	Nueve de Julio	2007	II Sur
241	FALP24107	Nueve de Julio	2007	II Sur
242	FALP24207	Nueve de Julio	2007	II Sur
243	FALP24307	Nueve de Julio	2007	II Sur
244	FALP24407	Nueve de Julio	2007	II Sur
245	FALP24507	Nueve de Julio	2007	II Sur
246	FALP24607	Nueve de Julio	2007	II Sur
247	FALP24707	Nueve de Julio	2007	II Sur
248	FALP24807	Nueve de Julio	2007	II Sur
249	FALP24907	Nueve de Julio	2007	II Sur
250	FALP25007	Nueve de Julio	2007	II Sur
251	FALP25107	Nueve de Julio	2007	II Sur
252	FALP25207	Nueve de Julio	2007	II Sur
253	FALP25307	Nueve de Julio	2007	II Sur
254	FALP25405	Nueve de Julio	2007	II Sur
255	FALP25505	Nueve de Julio	2007	II Sur
260	FALP26005	Nueve de Julio	2007	II Sur
265	FALP26505	Nueve de Julio	2007	II Sur
291	FALP29105	Nueve de Julio	2005	II Sur
292	FALP29205	Nueve de Julio	2005	II Sur
293	FALP29305	Nueve de Julio	2005	II Sur

2.1.5. Extracción de ADN y determinación de su calidad y concentración

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de CTAB para la realización de minipreparaciones de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Los reactivos empleados fueron: CTAB, Mercaptoetanol, Acetato de Potasio 3M pH 4.8, Fenol, Cloroformo isoamílico 24: 1, Etanol 70 %, Isopropanol y Buffer TE pH 8.

Procedimiento:

1. A cada tubo eppendorf se agregó: el micelio liofilizado del hongo (de manera que no excediera la marca de 0.5 ml) y 750 µl de buffer CTAB 2X sin precalentar. De este modo, el micelio con aspecto de polvo, quedó completamente resuspendido y con movilidad.
2. Se incorporaron a cada tubo, 15 µl de 2-mercaptoetanol y se mezcló suavemente mediante inversión.
3. Se calentó durante 30 minutos a 65 °C. Cada 8 minutos se debió homogeneizar la mezcla invirtiendo los tubos.
4. Se agregaron posteriormente, 300 µl de Acetato de Potasio 3M pH 4.8 y se mezcló suavemente por inversión.
5. Se incubaron los tubos durante 15 minutos en hielo.
6. Se realizó la centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm para separar las fases; o más tiempo, hasta que la fase superior quedó transparente.
7. Con mucho cuidado, se tomó la fase superior y se la depositó en un tubo nuevo de 1.5 ml., sin remover el precipitado.
8. Se agregaron 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo isoamílico 24: 1. Se agitó suavemente y se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm, o hasta que la fase superior quedó transparente.
9. Se tomó la fase superior y se agregaron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24: 1, se agitó suavemente y se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm o hasta que la fase superior quedó transparente.
10. Con mucho cuidado se tomaron 750 µl de la fase superior y se la depositó en un tubo nuevo de 1.5 ml, que contenía 750 µl de isopropanol frío.
11. Se almacenaron las muestras 10 minutos en hielo.

12. Se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 rpm para precipitar el DNA, confirmando que el pellet no se hubiera desprendido.
13. Se descartó el isopropanol y se lavaron los tubos 2 veces con 500 µl de etanol 70% frío. En cada lavado se desprendió el pellet de ADN utilizando el vortex.
14. Se descartó el etanol y se colocaron los tubos invertidos sobre una servilleta durante 5 minutos. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos en Speed Vacc.
15. Dependiendo del tamaño del botón de ADN obtenido, se agregaron de 30 a 50 µl de buffer TE estéril y se resuspendió muy suavemente.
16. Determinación de la calidad y concentración de ADN: Se estableció la calidad de las muestras de ADN obtenidas, a través de la realización de una corrida electroforética sobre un gel de agarosa al 2% (5 grs de azarosa en 250ml de TBE 1X) y con un marcador de masa High ADN Mass Ladder. Para esto se colocaron en las distintas fosas del gel: 2 µl de cada muestra de ADN combinados con 2 µl del colorante de corrida Blue Orange y 1 ul de Siver Green en dilución 1/100. En la primera fosa se ubicaron 4 µl del marcador de masa High ADN Mass Ladder con 1 µl del colorante de corrida Blue Orange y 1ul de Siver green en dilución 1/100. En la última fosa del gel se colocaron 4ul del marcador Mil Marker con 1ul de Buffer de siembra 10X y 1ul de Siver Green 1/100. La corrida se realizó durante 1 hora a 100 volts. El buffer de corrida usado en este caso fue TBE 0,5X. Para determinar la concentración de ADN de cada muestra se utilizó un fluorómetro (Invitrogen Qubit TM Fluorometer). La solución stock de ADN (5ng/ul) fue preparada para cada aislamiento y almacenada -20 °C.

2.1.6. Caracterización genética de los aislamientos de *Septoria tritici*

2.1.6.1. Determinación del patrón molecular de cada aislamiento (amplificación por marcadores moleculares ISSR y electroforesis)

Una vez conocida la calidad y concentración de cada muestra de ADN, se realizó la amplificación de cada una de ellas mediante la técnica molecular ISSR con MP-PCR. Para ésto se utilizaron tubos eppendorf de 200ul, previamente esterilizados en autoclave. En cada tubo se colocaron 20ul finales conteniendo: 4ul de 5X PCR Buffer minus Mg⁻²

(Invitrogen), 1,6 ul de 25 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1ul de 200 uM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, (Promega, Madison, WI, USA), 1ul de 5mM primer ISSR (Promega), 0.5U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 2,5ul de ADN 5ng (a temperatura ambiente) y 9,8ul de agua bidestilada estéril. Antes de ser amplificadas, las muestras fueron centrifugadas en una Centrífuga Eppendorf.

Las amplificaciones de las muestras fueron realizadas en un termociclador con gradiente (Thermo Electron Corporation, Milford, USA), programado previamente con la temperatura adecuada para cada primer ISSR empleado: 95 °C durante 120 segundos y luego 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, temperatura de annealing específica para cada primer ISSR durante 20 segundos y por último elongación a 72 °C durante 120 segundos. La última etapa de elongación se extendió por 12 minutos a 72 °C (Czembor & Arseniuk, 1999).

Los productos de MP-PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% en TBE 1X durante 4,30 hs. a 150V. Se incluyeron en cada gel, dos marcadores moleculares (100bp y 1Kb). Las muestras colocadas en cada pocillo del gel fueron teñidas con SyBr-Green (Invitrogen) (1:100) y los patrones de bandas de ADN fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador con luz UV.

Se utilizaron 10 primers ISSR , seleccionados de acuerdo con los datos de la literatura (Czembor & Arseniuk, 1999): (GACA)₄; (AAC)₇; (ATC)₇; (AC)₉; (AAG)₇; (AG)₉; (AGC)₅; (CAG)₅, (GTG)₅ y (GACAC)₃, con las temperaturas de annealing: 44°C; 48°C; 44°C; 54°C; 48°C; 44°C; 48°C; 48°C; 48°C y 44 °C, respectivamente.

2.1.6.2. Análisis de los datos

Todas las muestras de ADN fueron amplificadas y corridas en el gel al menos dos veces para minimizar errores. Los patrones de bandas obtenidos fueron transformados en datos de presencia (1) o ausencia de bandas (0) para cada combinación de aislamiento- primer ISSR. Estos datos fueron volcados en una matriz binaria (matriz de similitud). En esta matriz, el valor de 1 indica la máxima similitud (aislamientos idénticos), mientras que el valor 0 indica la mínima similitud entre aislamientos (aislamientos completamente diferentes).

Luego, todos los pares de aislamientos fueron comparados aplicando el coeficiente de Dice (Nei & Li, 1979). A partir de la matriz de similitud se construyó un

dendrograma via UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic average) con el uso del programa NTSyS-pc (Rohlf, 1998).

Resultados

La amplificación de cada muestra de ADN por MP-PCR resultó en patrones de bandas, en su mayoría diferentes al comparar los pares de aislamientos. Todos los primers generaron polimorfismos. Con los 10 primers ISSR utilizados se obtuvo un total de 84 bandas, todas ellas polimórficas. El tamaño de las bandas varió en un rango de 200 a 8000 pb. Un ejemplo de los patrones de bandas generados por el primer ISSR (GACA)₄ se muestra en la Fig. 2.4.

De los 127 aislamientos obtenidos, 83 de ellos amplificaron con al menos uno de los primers ISSR empleados y se identificaron 81 haplotipos distintos. Cuarenta y cuatro aislamientos no amplificaron con ninguno de los primers ISSR utilizados y por ésto no fueron incluidos en el análisis molecular. De estos 44 aislamientos, quince pertenecían a la localidad de Necochea: 14, 29, 32, 36, 40, 68, 80, 94, 112, 113, 115, 133, 135, 150 y 151; dos a Tres Arroyos: 46 y 88; tres procedían de Pla: 206, 211 y 233; y veinticuatro de Nueve de Julio: 204, 207, 209, 210, 212, 213, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 231, 234, 235, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 251 y 252.

Los aislamientos 74 y 250 y los aislamientos 205 y 208 mostraron patrones idénticos. Los primers ISSR que determinaron el mayor número de polimorfismos entre los aislamientos comparados fueron (ATC)₇ y (GTG)₅. Estos primers ISSR detectaron 84 bandas polimórficas en 38 aislamientos de los 127 analizados. En cambio el primer (CAG)₅ separó solo 10 aislamientos.

El dendrograma generado a partir de la matriz de similitud via UPGMA con el uso del programa NTSyS-pc, mostró, a un nivel de similitud del 0.20, 13 clusters distintos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII) (Fig. 2.5). En este dendrograma no fueron incluidos los 44 aislamientos que no generaron bandas con los primers ISSR utilizados.

El Cluster I incluyó los aislamientos 35, 26, 38, 3, 76, 102, 103, 106, 82, 292, 43, 24, 226, 77, 2, 50, 33, 202, 236, 142, 130, 224, 232, 122, 52, 249, 238, 237, 255, 260, 225, 95, 20, 30, 49, 97, 293, 70, 152, 253, 227, 239, 229, 228, 56, 87, 1, 44, 72 y 83. La mayoría de estos aislamientos fueron de Necochea, excepto los aislamientos 50

and 52 que pertenecieron a Tres Arroyos, los aislamientos 292, 226, 202, 236, 232, 249, 238, 237, 255, 260, 229 y 228 de Nueve de Julio y el 224 de Pla. Dentro de este grupo, los aislamientos 102 con 103 y 202 con 236 fueron los más relacionados (coeficiente de distancia 0.75).

El Cluster II estuvo compuesto por los aislamientos 74, 250, 129, 215, 47, 247, 291, 137, 149, 85, 265 y 89. Entre ellos, el 74, 137, 149 y 85 pertenecieron a Necochea; 250, 215 247, 291 y 265 a Nueve de Julio y 47 y 89 a Tres Arroyos. En este grupo los aislamientos 74 y 250 fueron idénticos, y 137 y 149, los más relacionados (coeficiente de distancia 0.75). El Cluster III incluyó solo dos aislamientos de Necochea: 100 y 98, separados por un coeficiente de distancia de 0.52.

El Cluster IV estuvo representado por los aislamientos 75 y 39 de Necochea; el 205, de Pla y el 208 de Nueve de Julio que se mantuvieron relacionados por una distancia genética de 0,50. Los aislamientos 205 y 208 fueron idénticos (distancia genética 1.00). El Cluster V estuvo compuesto por dos aislamientos de Necochea (78 y 120), relacionados entre sí por un coeficiente de distancia de 0.34, mientras que el cluster VI fue conformado sólo por el aislamiento 248 de Nueve de Julio.

El Cluster VII incluyó los aislamientos 81 y 105 de Necochea y el 244 de Nueve de Julio; y el Cluster VIII estuvo constituido por los aislamientos 201 y 214 de Nueve de Julio y 203 de Pla. 201 y 214 estuvieron separados por una distancia genética de 0.80, siendo los más parecidos entre sí. El Cluster IX estuvo formado por dos aislamientos: 93, de Tres Arroyos y 254, de Nueve de Julio, separados por un coeficiente de distancia de 0.23. Finalmente, los clusters X, XI, XII y XIII aparecieron constituidos por un solo aislamiento cada uno: 217, 230, 79 y 99 respectivamente. Estos aislamientos muestran la mayor distancia genética con el resto de los grupos. La mínima similitud observada dentro del dendrograma fue aproximadamente del 1 %, la cual separó los aislamientos 79 y 99 del resto de los grupos.

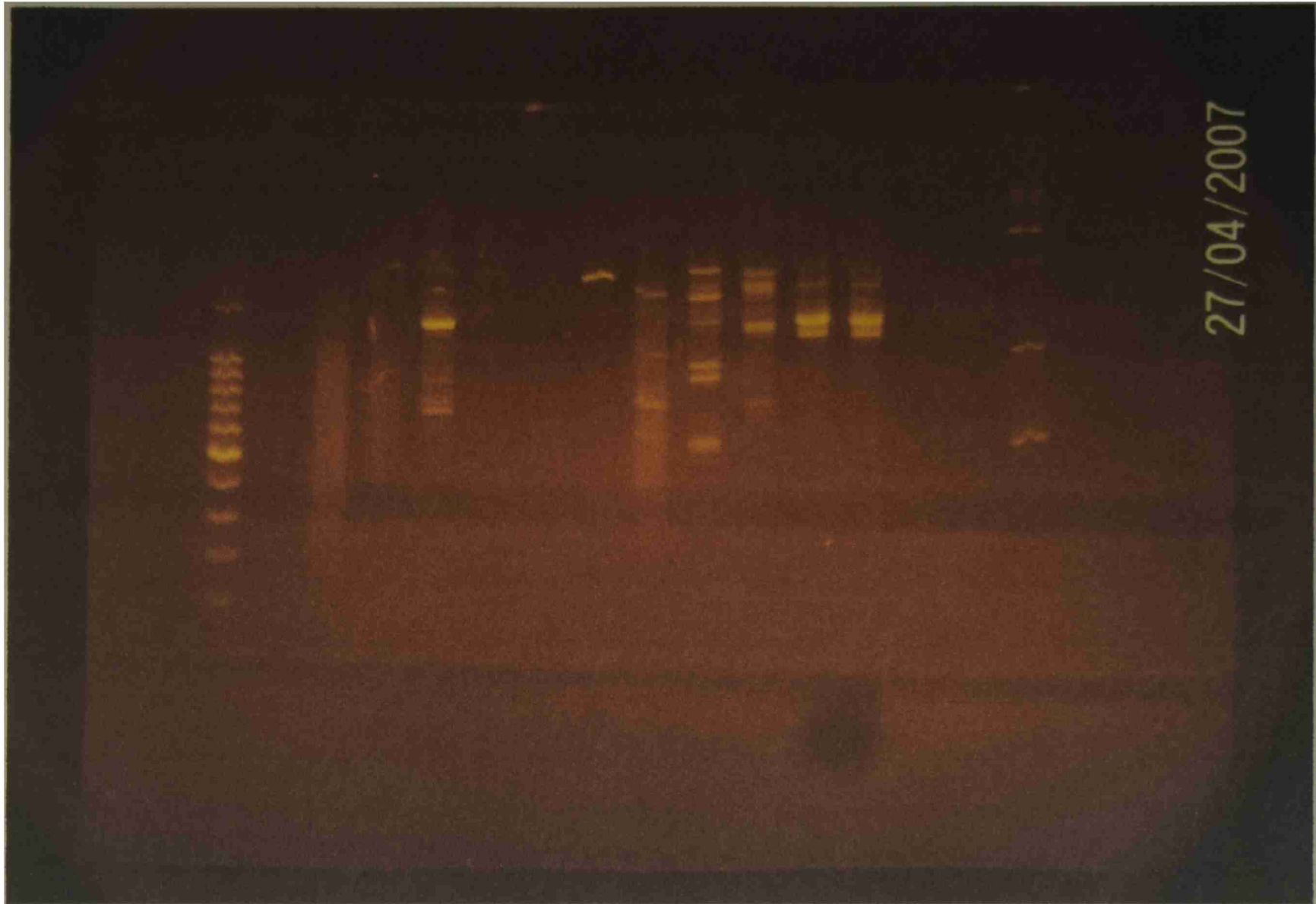


Fig. 2.4. Patrones de bandas producidos por aislamientos de *M. graminicola* utilizando el primer ISSR (GACA)₄ en un gel de agarosa 2%, empleando la técnica molecular MP-PCR.

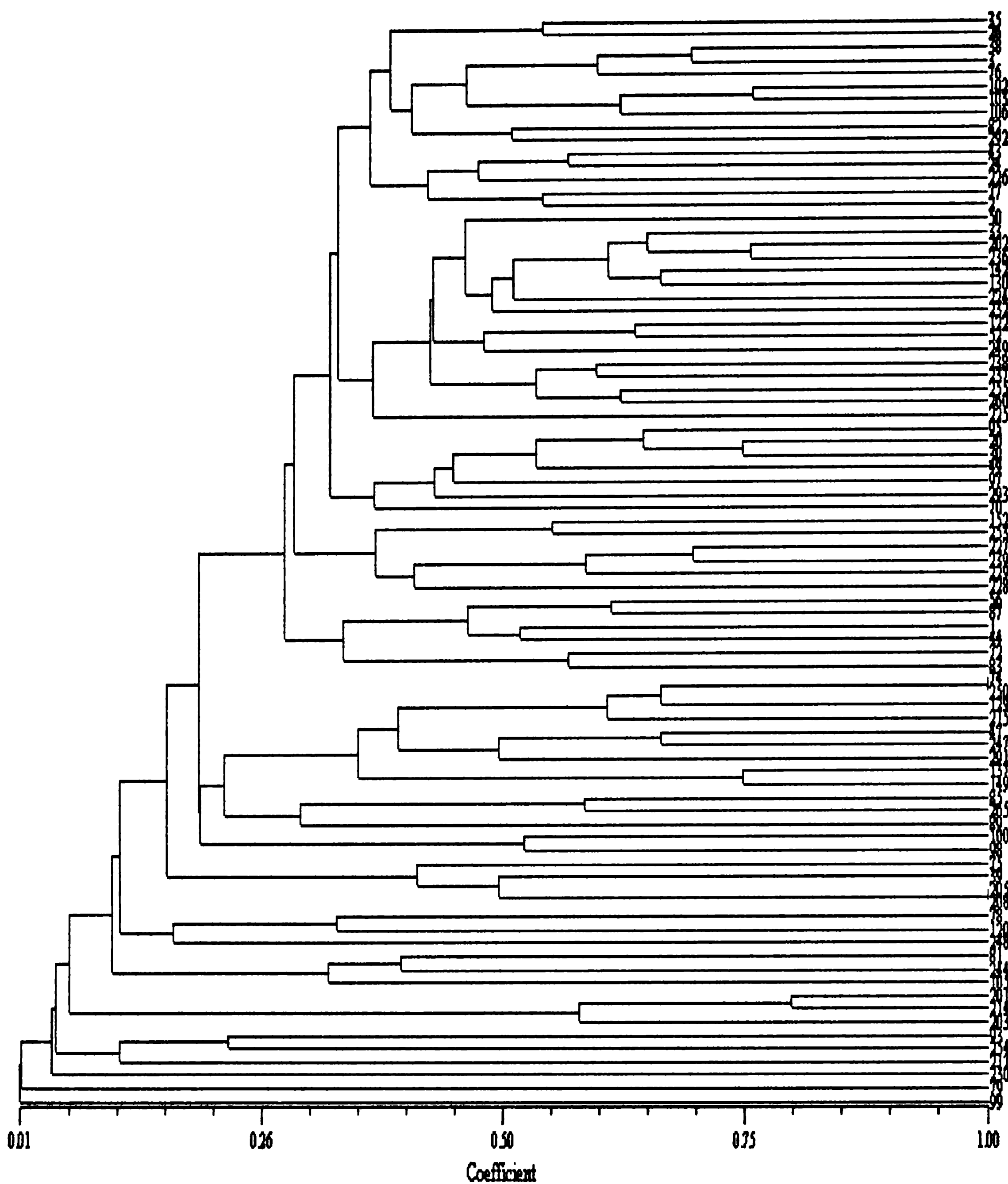


Fig. 2.5. Dendrograma basado en 10 primers ISSR incluyendo aislamientos de dos Subregiones Trigueras (IV y II Sur).

Discusión

Nuestros resultados revelaron un alto grado de variabilidad genotípica dentro de la población de *M. graminicola*. Los marcadores moleculares ISSR detectaron 81 genotipos diferentes, entre los 83 aislamientos amplificados (diversidad genotípica= 98%). El resultado del análisis de clusters mostró que la máxima similitud entre los aislamientos de *M. graminicola* fue del 100%, ya que existieron aislamientos idénticos. Por el contrario, la mínima similitud entre ellos fue del 1%, que separó los aislamientos 79 y 99 de todo el resto.

En otros países, algunos autores confirmaron distinto grado de variabilidad genotípica entre las poblaciones de *M. graminicola*, utilizando diferentes marcadores moleculares. Schnieder *et al.* (2001) utilizaron marcadores AFLP para analizar las diferentes poblaciones de Alemania. Identificaron 142 haplotipos diferentes, entre los 203 aislamientos analizados (69,95%). Asimismo, Razavi & Hughes (2004), utilizando marcadores moleculares RAPD para estudiar una población de *M. graminicola* del oeste de Canadá, encontraron el 100% de diversidad genotípica sobre un total de 87 aislamientos evaluados. Demostraron que la mayor similitud entre los aislamientos fue de aproximadamente el 81% y que no se detectaron aislamientos idénticos, lo que indica que cada uno de los aislamientos fue un único genotipo.

Linde *et al.* (2002) compararon las poblaciones de Suiza, Israel, Oregon y Texas y caracterizaron la estructura genética de *M. graminicola* a través de varias escalas espaciales. La diversidad genotípica de las poblaciones fue alta. Dentro de los tres campos suizos osciló entre 80,4 a 96% del valor máximo posible, mientras que ningún clon fue identificado en la población de Israel (diversidad genotípica = 100%). En las dos poblaciones de Texas fue del 79% y el 100% y en la población en Oregon 82,7%. Asimismo, Kabbage *et al.* (2008) también mostraron resultados similares utilizando RFLP, revelando que el 100% de la variabilidad genotípica se produjo dentro de las poblaciones de Kansas y que no se hallaron haplotipos idénticos en ninguna de las poblaciones estudiadas.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por distintas investigaciones en nuestro país, Jürgens *et al.* (2006), analizaron la estructura genética de las poblaciones de este hongo patógeno en cinco países, mediante el uso de marcadores RFLP. En Argentina estudió cinco poblaciones de tres localidades diferentes: Los

Hornos (ARG1 y ARG5), Balcarce (ARG2) y Barrow (ARG3 y ARG4) y encontró un 65% de genotipos diferentes. ARG1, ARG2 y ARG3 fueron obtenidas a partir de campos de trigo infectados naturalmente pero ARG4 y ARG5 procedieron de campos de trigo infectados artificialmente, por lo que estas dos poblaciones exhibieron un alto nivel de clonalidad y compartieron sólo dos haplotipos, debido a que en estos campos se introdujo la misma fuente de inóculo. Esto redujo el porcentaje de diversidad genotípica de este conjunto de poblaciones estudiadas.

Asimismo, Cordo *et al.* (2006) estudiaron dos poblaciones de Argentina, Balcarce y Los Hornos, mediante el uso de RFLP. La población de Los Hornos mostró 35 únicos genotipos entre un total de 58 aislamientos (60,34%) y en Balcarce encontraron 39 genotipos diferentes, entre 62 aislamientos del agente patógeno (62,9%). Las poblaciones de Los Hornos y Balcarce fueron muy similares a nivel regional pero la diversidad genotípica fue mayor en la población de Balcarce al ser comparada con la de Los Hornos. Los Hornos exhibió un alto nivel de clonalidad debido a que no representa una zona endémica para la mancha de la hoja del trigo y las variedades que son testeadas para resistencia en esos campos, están artificialmente inoculadas con el patógeno, por esto la diversidad de genes es más baja en estos lugares. En Balcarce la diversidad genotípica también fue baja debido a que la recolección del material fue realizada desde cultivares experimentales de la Estación Experimental INTA, inoculados artificialmente con el patógeno. Por el contrario, en nuestro estudio, los aislamientos fueron tomados de otras localidades de la región triguera y en campos en que nunca se habían realizado inoculaciones. Esto condujo a la obtención de un mayor número de genotipos diferentes, que podría explicarse porque todos nuestros aislamientos fueron obtenidos de campos de trigo infectados naturalmente. El nivel de clonalidad fue bajo en ambas poblaciones y sólo cuatro genotipos fueron idénticos.

Resultados de Jürgens *et al.* (2006) demostraron que la diversidad genotípica de ARG3 fue significativamente mayor que en ARG1 y ARG2 y a su vez, la de éstas fue significativamente más alta que para las poblaciones ARG4 y ARG5. Además, hubo bajo nivel de diferenciación entre la población ARG1 (Subregión triguera II Sur) y ARG2 (Subregión Triguera IV). Nuestros resultados indican que la mayoría de los aislamientos de Necochea se agruparon en el cluster I, en cambio la mayor parte de los aislamientos de Nueve de Julio no amplificaron con los primers utilizados. Por esto es que podemos considerar que existen diferencias entre las poblaciones de las dos subregiones comparadas. Debemos resaltar, que en los estudios anteriores realizados

sobre las poblaciones del patógeno en Argentina, no se determinó la virulencia del set de aislamientos sobre cultivares comerciales y líneas diferenciales, de manera que su caracterización fue sólo molecular.

La variación genotípica de las poblaciones de *M. graminicola* es fundamental para entender la virulencia sobre los diferentes cultivares. La variabilidad puede atribuirse a la variación en la recombinación regular, los diferentes patrones de migración y presencia e importancia de la forma sexual. La reproducción sexual crea gran número de aislamientos genéticamente diferentes. La forma sexual de este hongo fue encontrada en Argentina (Cordo *et al.*, 1990) y en la mayoría de las zonas trigueras del mundo (Fuckel, 1870, Sanderson, 1976; Madariaga, 1986; Scott *et al.*, 1988; Metha, 1989; Shaw & Royle, 1989a; McDonald & Martinez, 1990; Boeger *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1997), donde se informó como una de las principales fuentes de inóculo. Las poblaciones de este patógeno se presentan en equilibrio genético, así como en equilibrio de migración (Chen & McDonald, 1996), lo cual se atribuye a una alta tasa de recombinación sexual (Cordo *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, la amplificación generó 84 bandas diferentes, las cuales se encontraron entre 8000 y 200 pb. Sin embargo, Czembor & Arseniuk (1999) obtuvieron bandas entre 2176 a 154 pb; y Boeger *et al.* (1993) y Chen *et al.* (1994) entre 2300 a 200 pb. Nuestros resultados mostraron que los primers ISSR (ATC)₇ y (GTG)₅ generaron el mayor polimorfismo entre los aislamientos y detectaron bandas polimórficas en 38 aislamientos entre los 127 analizados. Czembor & Arseniuk (1999) mostraron resultados similares con el primer (ATC)₇. Los resultados de este estudio coinciden con las conclusiones de Czembor & Arseniuk (1999) sobre la utilidad de los marcadores moleculares ISSR para la detección de polimorfismo entre aislamientos de *M. graminicola*.

Con respecto a los cuarenta y cuatro aislamientos que no amplificaron con este conjunto de primers, el fracaso en la amplificación podría haber sido un resultado de muchos factores, es decir, secuencias no repetidas, diferencias en la secuencia del sitio, etc, de manera que estos aislamientos deben ser probados con otro conjunto diferente de primers, para poder conocer si son idénticos o varían entre sí.

De cualquier manera, encontramos que la mayoría de los aislamientos de la Subregión Triguera IV, amplificaron con al menos un primer y se ubicaron en el grupo I, mientras que 24 de los 54 aislamientos de Nueve de Julio y tres de los seis aislamientos de Pla (región II Sur), no amplificaron con ninguno de los primers

utilizados en este estudio, lo cual indica que probablemente pertenezcan a diferentes grupos o clusters. Esto señala, que los aislamientos tomados de Nueve de Julio y Pla (Subregión Triguera II Sur) tendrían patrones moleculares que difieren de los de Necochea y Tres Arroyos (Subregión IV), lo que sugiere un bajo flujo genético entre las dos poblaciones analizadas. Además, cuatro de los aislamientos de nuestro estudio resultaron idénticos y pertenecieron a diferentes localidades de la misma subregión (205, de Pla y 208, de Nueve de Julio) y a diferentes subregiones trigueras (74, de Necochea-Subregión IV y 250, de Nueve de Julio-Subregión II Sur), lo que indicaría un cierto flujo de genes entre las localidades y entre las subregiones. Varios autores observaron este mismo flujo de genes entre poblaciones separadas (Banke *et al.*, 2004; Banke & McDonald, 2005; Boeger *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 2003; Cordo *et al.*, 2006).

En coincidencia con nuestros resultados, Jürgens *et al.* (2006), pese a que sugieren que el flujo regional tuvo un impacto significativo en la estructura genética de las poblaciones ARG1 (Los Hornos-Subregión II Sur) y ARG2 (Balcarce trigo-Subregión IV), mostraron que ARG3 tenía la mayor similitud con la población de Uruguay y su diversidad genotípica fue significativamente mayor que para ARG1 y ARG2, indicando que ARG3 era diferente del resto de las poblaciones estudiadas de Argentina. Este trabajo refuerza nuestra hipótesis, señalando que se pueden encontrar diferencias entre las localidades al analizar la población de *M. graminicola*. Sin embargo, otros autores como Razavi & Hughes (2004) y Schnieder *et al.* (2001) asumen un constante flujo de genes entre todas las poblaciones. Razavi & Hughes (2004), indicaron que la similitud entre los aislamientos de *M. graminicola* es independiente de su distribución geográfica. Schnieder *et al.* (2001), analizaron cinco poblaciones de Alemania e identificaron 142 diferentes haplotipos, pero la media de la diferenciación genética (F_{ST}) y las distancias genéticas (D) entre las poblaciones eran pequeñas.

Goodwin *et al.* (2007) publicaron el mapa genético de este hongo. Analizaron una base de datos de 30.137 secuencias EST de *Mycosphaerella graminicola*. Identificaron 109 loci SSR, y para 99 de ellos, se elaboraron primers que fueron sometidos a pruebas de amplificación y polimorfismo por PCR, sobre aislamientos de origen diverso, incluyendo los padres de la población standard mapeada de *M. graminicola*. Setenta y siete de los 99 pares de primers, generaron un patrón de bandas y 51 fueron polimórficos, con un máximo de cuatro alelos por locus entre los aislamientos probados. De estos 51 loci, 23 fueron polimórficos entre los padres de la población mapeada. Veintiuno de estos aislamientos, así como dos loci microsatélite publicados

anteriormente, se colocaron en el mapa genético de *M. graminicola*, en 13 de los 24 grupos de ligamiento. Cuando comenzó nuestro trabajo, este set de marcadores SSR no se había publicado aún. Aunque encontramos un aceptable nivel de amplificación con los marcadores ISSR, los loci SSR probablemente habrían encontrado mayor polimorfismo en nuestra población.

El presente trabajo sienta bases para futuros estudios, proporcionando valiosa información sobre la diversidad genética de la población argentina de *M. graminicola*. El conocimiento sobre la estructura genética de nuestra población se extendió a un mayor número de aislamientos provenientes de diferentes subregiones trigueras. Además, se demostraron diferencias en la estructura genética de la población en algunas localidades de las subregiones II Sur y IV, reforzando algunos trabajos anteriores. El alto grado de variabilidad genotípica entre los aislamientos comparados en este estudio, caracteriza una población diversa de *M. graminicola* en algunas localidades de las subregiones II Sur y IV. A partir de esto, es posible seleccionar un conjunto de aislamientos completamente diferentes que se utilizarán para determinar su virulencia sobre un set de nuestros cultivares, líneas extranjeras y diferenciales con genes de resistencia conocidos.

CAPITULO 3

Resistencia genética determinada en trigo

Resumen

El objetivo de este estudio fue identificar la resistencia de cultivares argentinos, líneas con genes conocidos y diferenciales de *Triticum aestivum* L. frente a aislamientos del patógeno *Mycosphaerella graminicola* caracterizados molecularmente. Se realizaron dos ensayos en diferentes ambientes, uno a campo y el otro en macetas al aire libre. Cada ensayo tuvo un diseño de parcela dividida y dos repeticiones, siendo la parcela principal los aislamientos y la subparcela 23 líneas y cultivares de trigo, 9 cultivares argentinos y 14 líneas de origen extranjero, con buen comportamiento al patógeno, excepto dos de ellas, Saratovskaja 19 y Janetzki Probat, que fueron consideradas como testigos susceptibles. Todos los materiales fueron inoculados con 16 aislamientos monospóricos del patógeno: 1, 2, 14, 20, 24, 52, 201, 205, 217, 226, 230, 243, 244, 247, 248 y 254, elegidos en base a que correspondían a genotipos distintos y se encontraron distanciados genéticamente en su caracterización molecular. Se evaluó la severidad (% de necrosis y % de cobertura picnidial) en las tres hojas inferiores de plántula (Z 23) y en las tres hojas superiores en estadio adulto (Z 82). Los datos se analizaron aplicando ANVA con el programa estadístico Statgraphics Centurion. En plántula, el ANVA se aplicó a los datos de la segunda hoja ya que fue la que determinó las mayores diferencias, mientras que en planta adulta se aplicó sobre HB; HB-1 y al promedio de ambas (HB+HB-1). Para necrosis de segunda hoja existieron diferencias significativas entre aislamientos, líneas/cultivares y en las interacciones ambiente x aislamiento y aislamiento x línea/cultivar. Para cobertura picnidial de esta hoja existieron diferencias significativas entre todos los factores, en todas las interacciones dobles y también en la triple. Tonic, Oasis, IAS 20, TE 9111, Klein Dragón y Klein Volcán mostraron valores de resistencia parcial para ambas variables evaluadas. La resistencia específica se manifestó en Capelle y Tonic frente a los aislamientos 1 y 230; Estanzuela Federal frente a 1 y 254; Flame frente a 1 y 2; Israel 493, Veranópolis y W 7984 S. H. al 226; Kavkaz al aislamiento 2; Oasis al 205 y TE 9111 al 247. Entre nuestros cultivares, Buck 75 Aniversario frente a 1 y 20; Klein Dragón frente al 2 y Klein Volcán frente al 20. En planta adulta existieron diferencias significativas entre todos los factores, todas las interacciones dobles y la triple, excepto para el factor ambiente de cobertura picnidial en HB-1. Los materiales de mejor comportamiento fueron Oasis, TE 9111, IAS 20, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario, los cuales presentaron resistencia parcial. En Oasis se

observó además resistencia específica frente a los aislamientos 247 y 254. La mayor susceptibilidad en las líneas fue observada en ambos ambientes en Saratovskaja 19 y Janetzki Probat para plántula, y en Capelle, Flame y Estanzuela Federal para estadio adulto. Entre los cultivares nacionales Don Ernesto INTA y ProINTA Puntal se mostraron con mayor susceptibilidad en ambos estadios. Los resultados de este trabajo aportan un importante conocimiento sobre el comportamiento de nuestros cultivares y sobre las interacciones entre cultivares y aislamientos genotípicamente diferentes. La localización de genes empleando marcadores moleculares será el próximo paso para facilitar la incorporación de resistencia en materiales nacionales.

Introducción

Las evaluaciones de resistencia a patógenos en plantas se basan generalmente en la cuantificación de síntomas. La mayoría de los trabajos han evaluado resistencia a la mancha de la hoja del trigo considerando el área de tejido foliar afectado o la cobertura de picnidios (González *et al.*, 2000). Flor (1956) elaboró la teoría gen a gen que establece que “para cada gen condicionando resistencia en el hospedante existe un gen específico condicionando virulencia en el parásito”, lo que significa que cualquier gen de resistencia puede actuar sólo si el locus correspondiente del patógeno lleva un alelo para avirulencia. Se ha hipotetizado que los alelos dominantes para resistencia y los alelos dominantes para avirulencia generan productos génicos que son capaces de reconocerse en cada par gen a gen (Ellingboe, 1976; Hadwiger, 1988).

Se sabe que la resistencia genética en trigo a *Septoria tritici* puede ser cuantitativa o cualitativa. La resistencia cuantitativa es incompleta, poligénica (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998; Zhang *et al.*, 2001), e inespecífica a la raza (Chartrain *et al.*, 2004); mientras que la resistencia específica es casi completa, aislamiento-específica, oligogénica (Arraiano *et al.*, 2001a) y sigue la relación gen por gen (Brading *et al.*, 2002). Ambas resistencias pueden resultar de utilidad en planes de mejoramiento. Aunque la resistencia completa es interesante debido a la ausencia casi completa de síntomas en el hospedante, la resistencia parcial es muy importante porque tiene mayor durabilidad y se expresa sobre un amplio espectro de aislamientos del patógeno (Dubin & Rajaram, 1996).

Existen cultivares que tienen resistencia completa, pero la efectividad de los genes de resistencia completa en el campo, suele no ser alta, dada la alta variabilidad del patógeno. Además es frecuente encontrar resistencia parcial, no específica, sin interacciones entre los genes del patógeno y el hospedante (Van Ginkel & Scharen, 1987).

La mayoría de las investigaciones se han concentrado en el análisis de la resistencia completa, ya que algunos autores revelaron interacciones específicas entre cultivares de trigo y aislamientos particulares del patógeno (Kema *et al.*, 1999; Kema & van Silfhout, 1997; Eriksen *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha encontrado resistencia cuantitativa en diferentes genotipos (Jlibene *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2001, Simón *et al.*, 2005a). Aunque la resistencia completa es interesante por la ausencia casi completa

de síntomas en el hospedante, la resistencia cuantitativa resulta muy importante porque generalmente es más durable (Parlevliet, 1993).

La resistencia controlada por un gen mayor fue señalada inicialmente en algunos materiales (Rillo & Caldwell, 1966; Rosielle & Brown, 1979; Wilson, 1979), sin identificar los genes condicionantes. Posteriormente, comenzó a investigarse la presencia de resistencia parcial en el patosistema trigo- *Septoria tritici*. Jlibene & El Bouami (1995) indicaron que varios componentes de la resistencia parcial a *Septoria tritici* pueden estar controlados por uno solo o pocos genes, que podrían ser combinados dentro de la misma base genética por cruzamiento. Varios estudios cuantitativos de componentes de la resistencia indicaron la presencia predominante de una capacidad combinatoria general, indicativos de resistencia parcial, que contribuyen más a la resistencia que el efecto dominante de los genes (Simón & Cordo 1997, Simón & Cordo, 1998).

Sin embargo, la capacidad combinatoria específica que indica el efecto no aditivo de los genes también ha sido señalada (Van Ginkel & Scharen, 1987; Bruno & Nelson, 1990; Danon & Eyal, 1990; Jonsson, 1991; Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1997, 1998; Simón *et al.*, 2005a). Además, podría ocurrir que los componentes de la resistencia parcial, que son genéticamente diferentes, pudieran combinarse por cruzamiento, dentro del background genético (Van Ginkel & Rajaram, 1999). Aunque la heredabilidad de la resistencia tiende a ser solo moderada (Simón *et al.*, 1998), es posible progresar en la resistencia del cultivo. Uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de los programas de mejoramiento es la alta variabilidad patogénica del hongo. Debido a esto, cultivares de trigo que resultan resistentes en ciertos países o regiones, pueden no tener el mismo comportamiento en otras condiciones o latitudes (Carmona *et al.*, 1999a).

Los marcadores moleculares como RAPD (amplificación polimórfica al azar de ADN) (Williams *et al.*, 1990); RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) (Nelson *et al.*, 1995a,b,c); microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetidas) (Röder *et al.*, 1998); AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) (Vos *et al.*, 1995), y EST (Secuencias Marcadas Expresadas) (Liu & Anderson, 2003), fueron usados para marcar genes de resistencia en trigo. La abundancia de estos marcadores de ADN en el genoma del trigo, ha facilitado el mapeo de otros genes de resistencia a *Septoria tritici* (Adhikari *et al.*, 2004a).

Usando algunos de estos marcadores moleculares, se han mapeado y localizado en sus respectivos cromosomas, 15 genes de resistencia a *Septoria tritici*: *Stb1* fue identificado en el cultivar Bulgaria 88 y mapeado sobre el brazo largo del cromosoma 5B (Adhikari *et al.*, 2004a). *Stb2* fue identificado en el cultivar Veranópolis y mapeado sobre el brazo corto del cromosoma 3B y *Stb3* hallado en Israel 493 sobre el brazo corto del cromosoma 6D (Adhikari *et al.* 2004b). *Stb4* fue hallado en Tadinia y mapeado cerca del centrómero del cromosoma 7D (Somasco *et al.*, 1996). *Stb5* fue encontrado en el trigo hexaploide ‘Synthetic 6x’ también cerca del centrómero del cromosoma 7D (Arraiano *et al.*, 2001b). *Stb6* fue identificado en los cultivares Flame, Hereward (Brading *et al.*, 2002); Kavkaz, Tadinia y Veranópolis (Chartrain *et al.*, 2005c) y en TE 9111 (Chartrain *et al.*, 2005b), y mapeado en el brazo corto del cromosoma 3A (Bradding *et al.*, 2002). *Stb7* fue hallado en Estanzuela Federal (McCartney *et al.*, 2003) y en TE 9111 (Chartrain *et al.*, 2005b) y mapeado sobre el brazo largo del cromosoma 4A. El gen *Stb8* fue identificado en el trigo sintético hexaploide W 7984 y mapeado en el brazo largo del cromosoma 7B con marcadores AFLP y SSR (Adhikari *et al.*, 2003). *Stb9* fue mapeado en el cromosoma 2B en los cultivares Courtot y Tonic (Chartrain *et al.*, 2009). *Stb 10* y *Stb 12* fueron mapeados en Kavkaz- K4500 sobre el cromosoma 1D y 4A respectivamente (Chartrain *et al.*, 2005a). *Stb11* fue encontrado en el brazo corto del cromosoma 1B de la línea portuguesa TE 9111 (Chartrain *et al.*, 2005b). El gen *Stb13* fue identificado en el brazo largo del cromosoma 7B, en el cultivar Salamouni (Cowling *et al.*, 2006) y el gen *Stb14*, en el brazo corto del cromosoma 3B en el mismo cultivar (Brule-Babel, 2007). Por último, el gen *Stb15* fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 6A en Arina (Arraiano *et al.*, 2007). También fueron identificados algunos QTL’s (Quantitative Trait Loci) en diferentes materiales (Eriksen *et al.*, 2001, 2003, Simón *et al.*, 2004, Simón *et al.*, 2009 no publicado). Eriksen *et al.* (2001, 2003) identificaron varios QTL’s para la resistencia sobre los cromosomas 2D, 3A, 6B, 2B y 7B en el cultivar resistente ‘Senat’. Recientemente, Simón *et al.* (2009, en prensa), encontraron dos QTL’s para la resistencia en el cromosoma 7D del trigo espelta (*Triticum aestivum* L. subsp *spelta* L.). En algunos cultivares la resistencia fue hallada en plántula y estadio adulto (Somasco *et al.*, 1996). Arama (1996) mostró que existían cultivares con buena resistencia en ambos estadios, plántula y adulto; otros que sólo mostraban resistencia en plántula, mientras otros sólo en estadio adulto. Kema & van Silfhout (1997) hallaron que no todos los aislamientos se comportan de manera similar

en plántula y adulto. La identificación de materiales con resistencia en ambos estadios serían importantes herramientas en programas de mejoramiento.

En Argentina, la mancha de la hoja comenzó a mencionarse en 1930, y cobró importancia a fines de la década del 70 (Annone, 1990). Van Beuningen & Kohli (1990) puntualizaron que en la región de la “pampa húmeda” argentina se observaron los niveles más altos de presión de la enfermedad del Cono Sur. La mancha de la hoja del trigo es una enfermedad con desarrollo policíclico, que ocurre por los sistemas de labranza adoptados sobre todo en los últimos años como la siembra directa (Shipton *et al.*, 1971; Ziv & Eyal, 1978; Forrer & Zadock, 1983; King *et al.*, 1983 y Eyal *et al.*, 1987b). Los cultivares comerciales argentinos se clasifican desde moderadamente resistentes a susceptibles, sugiriendo la presencia de resistencia cuantitativa condicionada por varios genes menores (Parlevliet, 1993). La incorporación de germoplasma de trigo resistente, como fue el germoplasma ruso invernal, ha proporcionado una mejor protección. Se han desarrollado variedades comerciales que poseen germoplasma ruso invernal como fuente progenitora tales como Bobwhite ‘S’, Kavkaz y Oasis Torin. Si bien en la mayoría de las zonas productoras del mundo, el germoplasma derivado de estos cultivares ha mostrado menor incidencia de *Septoria tritici*, en algunos casos, se han informado comportamientos variables, como por ejemplo en Argentina para el caso de los cultivares derivados de Bobwhite ‘S’ En nuestro país, las variedades comerciales de trigo obtenidas por cruzamiento de cultivares ruso-invernal x primaveral se han difundido ampliamente. Llevan en su genealogía algunos de los siguientes germoplasmas: Bobwhite “S”, Aurora, Bezostaya I, Kavkaz, Bulgaria 88 (Cordo *et al.*, 1994). Si bien se observa que algunos de los cultivares de nuestro país presentan resistencia parcial a *Mycosphaerella graminicola*, el germoplasma no se ha evaluado con aislamientos caracterizados molecularmente y que respondan a diferentes patrones moleculares. Tampoco está claro si la resistencia parcial puede presentar interacciones cultivar x aislamiento como sucede con la resistencia vertical. Sin embargo, la presencia de diferentes QTL’s en algunos genotipos de trigo frente a diferentes aislamientos, hace suponer la presencia de tales interacciones, aún cuando la resistencia sea poligénica (Börner *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2004).

Por lo tanto, para incrementar la resistencia genética en trigo y permitir la mejor adaptación de nuestros cultivares en el campo, resulta de particular importancia probar la patogenicidad de aislamientos caracterizados molecularmente sobre nuestro

germoplasma y en líneas con genes conocidos para determinar si también pueden ser utilizadas como fuente de resistencia en Argentina.

El objetivo de este trabajo fue identificar la resistencia de cultivares argentinos, líneas con genes conocidos y diferenciales de *Triticum aestivum* L. frente a aislamientos del patógeno *Mycosphaerella graminicola* caracterizados molecularmente.

Hipótesis

Existen fuentes de resistencia entre nuestros cultivares y en líneas diferenciales y con genes conocidos, que permiten un buen comportamiento en los estadios de plántula y adulto frente a algunos aislamientos del patógeno de la región triguera argentina caracterizados molecularmente.

Materiales y Métodos

3.1. Germoplasma utilizado

Se realizaron dos ensayos en diferentes ambientes, uno a campo y el otro en macetas al aire libre. Cada ensayo tuvo un diseño de parcela dividida y dos repeticiones, siendo la parcela principal los aislamientos y la subparcela 23 líneas y cultivares de trigo, 9 cultivares argentinos y 14 líneas de origen extranjero, con buen comportamiento al patógeno excepto dos de ellas, Saratovskaja 19 y Janetzki Probat, que fueron consideradas como testigos susceptibles. La mayoría de las líneas foráneas fueron elegidas en base a que portaban genes de resistencia conocidos o formaban parte de sets de diferenciales frente al patógeno (Tabla 3.1).

El experimento de campo se realizó en la Estación Experimental J. Hirschhorn, al cual denominamos ambiente ‘Los Hornos’ (LH) para este trabajo. El experimento en macetas, se realizó en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata y a este ambiente lo llamamos ‘Facultad’ (F). (Fig. 3.1 y 3.2).



Fig. 3.1. Fotografías del Ensayo realizado en la Estación Experimental J. Hirschhorn (ambiente LH), con 23 líneas y cultivares de *Triticum aestivum*.



Fig. 3.2. Fotografías del Ensayo realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP (ambiente F), con 23 líneas y cultivares de *Triticum aestivum*.

Se sembraron de ocho a diez semillas por línea en el campo y el mismo número se colocó en las macetas del ambiente F que contenían cada una de 10-15 kg de tierra. Posteriormente a la siembra se colocaron redes de nylon hasta la germinación y la emergencia de las plántulas, evitando la pérdida de semillas por aves granívoras. En el

ensayo en macetas, las plantas fueron regadas regularmente (cada 2-3 días) según las condiciones ambientales, y fertilizadas en la siembra con 50 kg.ha⁻¹ de N como urea y 50 kg.ha⁻¹ de P como fosfato diamónico. En macollaje se fertilizaron con 50 kg.ha⁻¹ de N como urea. En el ensayo a campo la provisión de agua para las plantas dependió de las condiciones ambientales y fueron fertilizadas de la misma manera que en el ensayo en macetas.

Las semillas de las líneas extranjeras fueron vernalizadas antes de su siembra durante 15 días a una temperatura de 4- 5 °C, debido a los requerimientos de frío de algunos genotipos. La siembra de las semillas se realizó el día 24 y 29 de julio de 2008 para el ensayo en macetas y a campo, respectivamente.

En la Tabla 3.1 se indican las líneas de trigo con genes de resistencia conocidos, líneas diferenciales y cultivares nacionales sembrados en ambos ensayos.

Saratovskaja 19 y Janetzki Probat no son líneas diferenciales pero fueron incluidas dentro de los materiales a evaluar para observar su comportamiento frente a los diferentes aislamientos, ya que son progenitores de un set de líneas recombinantes caracterizadas molecularmente por el IPK de Alemania y se intentaban probar con el fin de observar diferencias en cuanto a su resistencia. Ambas líneas se utilizaron como control susceptible, ya que en nuestros ensayos previos Saratovskaja 19 había resultado susceptible en pruebas de campo a numerosos aislamientos y Janetzki Probat frente a algunos de ellos.

Tabla 3.1. Líneas de *Triticum aestivum* con genes de resistencia conocidos, líneas diferenciales y cultivares nacionales de *Triticum aestivum*, utilizados para probar aislamientos argentinos de *Septoria tritici*.

Línea/ Cultivar	Orígen	Genes de resistencia mapeados
Estanzuela Federal	Uruguay	<i>Stb7</i>
Flame	Reino Unido	<i>Stb6</i>
Israel 493	Israel	<i>Stb3</i> y <i>Stb6</i>
Kavkaz -K4500 L.6 A.4	México (CIMMYT)	<i>Stb6</i> , <i>Stb7</i> , <i>Stb10</i> y <i>Stb12</i>
Oasis	Rusia	<i>Stb1</i>
Tadinia	Estados Unidos	<i>Stb4</i> , <i>Stb6</i>
TE 9111	Portugal	<i>Stb6</i> , <i>Stb7</i> y <i>Stb11</i>
Tonic	Reino Unido	<i>Stb9</i>
Veranópolis	Brasil	<i>Stb2</i> , <i>Stb6</i> y <i>Stb11</i>
W 7984 Synthetic Hexaploid	Estados Unidos	<i>Stb5</i> y <i>Stb8</i>
Capelle	Francia	
IAS 20	Brasil	
Saratovskaja 19	Rusia	control susceptible
Janetzki Probat	Austria	control susceptible
Buck 75 Aniversario	Argentina	
Buck Arriero	Argentina	
Buck Ranquel	Argentina	
Don Ernesto INTA	Argentina	
Klein Dragón	Argentina	
Klein Sagitario	Argentina	
Klein Volcán	Argentina	
Klein Zorro	Argentina	
Pro Inta Puntal	Argentina	

3.2. Datos climáticos

Durante el ciclo del cultivo de trigo se registraron las temperaturas y precipitaciones indicadas en la Tabla 3.2 para el año 2008, durante el cual se realizaron ambos ensayos. Estos datos fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometereológico Mensual de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales- Estacion Experimental Ing.agr. J.Hirschhorn.

Tabla 3.2. Datos meteorológicos durante el ciclo del cultivo de trigo en 2008.

MES	Temp. Media (°C)	Humedad (%)	Radiación (Wat/m2)	Precipitaciones (mm)
JULIO	11.9	82	1665.6	41.8
AGOSTO	10.3	73	2681.9	26.4
SETIEMBRE	12.0	77	3127.5	24.0
OCTUBRE	15.6	69	4824.6	44.0
NOVIEMBRE	22.1	61	5739.1	12.2
DICIEMBRE	21.9	61	5738.2	11.4

3.3. Inoculación

Se eligieron 16 aislamientos monospóricos del patógeno en base a su caracterización molecular: 1, 2, 14, 20, 24, 52, 201, 205, 217, 226, 230, 243, 244, 247, 248 y 254, aislados como monospóricos de cultivares de trigo pan. Los aislamientos 1, 2, 14, 20 y 24 fueron colectados en Nechochea, provincia de Buenos Aires y el 52 en Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires, en el año 2005. Los aislamientos 201, 217, 226, 230, 243, 244, 247, 248 y 254 fueron colectados en la localidad de Nueve de Julio, provincia de Buenos Aires, en los años 2005 y 2007; y el 205 de la localidad de Pla, provincia de Buenos Aires, en el 2007. Estos aislamientos correspondieron a diferentes grupos moleculares de acuerdo con el dendrograma obtenido en el Capítulo 2. Los aislamientos 1, 2, 24, 20, 52 y 226 pertenecieron al cluster I. 247, 205, 248, 244, 201, 254, 217 y 230 pertenecieron a los clusters II, IV, VI, VII, VIII, IX, X y XI, respectivamente. 14 y 243 no amplificaron con ninguno de los primers utilizados y por eso no aparecieron incluidos en el dendrograma, por lo que podrían pertenecer a otro cluster.

Para la preparación del inóculo, se tomaron varias cajas de petri con medio sólido agar-malta (Cordo, 1978), que contenían conidios secundarios crecidos del hongo. Para el ensayo en macetas, se prepararon 3000 ml de suspensión de conidios secundarios para cada una de las repeticiones de cada aislamiento. El ensayo a campo fue inoculado con 6000 ml de la misma solución para cada repetición. Las soluciones fueron ajustadas a una concentración de 1.0×10^6 esporas.ml⁻¹. Para conocer la cantidad de conidios secundarios por ml de solución de inóculo, se tomaron 2 gotas de cada solución y se realizó el recuento en la cámara de New Bauer, con un aumento de 40x del microscopio binocular. Finalmente, a las soluciones de conidios secundarios ya

preparadas, se les agregó 0,5 ml de Tween 20 (detergente) por cada litro de solución, el cual permite que el inóculo se adhiera mejor a la superficie de la hoja.

Las inoculaciones fueron realizadas mediante el uso de una mochila pulverizadora en ambos ensayos, aplicando la solución aproximadamente durante 30 segundos sobre cada variedad, de modo que todas las líneas de trigo quedaron inoculadas con los 16 aislamientos. En el ensayo en macetas, inmediatamente después de la inoculación y durante 48 hs., las macetas fueron cubiertas con armazones de alambre sobre el cual se colocó un plástico transparente, para mantener el nivel de humedad, actuando como cámara húmeda. (Fig. 3.3). Para el experimento en el campo, las plantas se mantuvieron húmedas por aspersión con agua durante 15 minutos, cada 2 horas y durante tres días.

Se realizaron dos inoculaciones en ambos ensayos. La primera inoculación fue realizada el 27 de agosto de 2008 en el estadio de plántula con dos hojas desplegadas (Z 12, Zadoks *et al.*, 1974), tanto en el ambiente Los Hornos como en Facultad. La segunda se realizó en pleno macollaje (Z 23, Zadoks *et al.*, 1974) el 9 de octubre para el ensayo de campo y el 15 del mismo mes para el ensayo en macetas.



Fig. 3.3. Fotografía del Ensayo de *T. aestivum* realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP después de la inoculación con aislamientos de *Septoria tritici*.

3.4. Evaluación de severidad

Se evaluó la severidad (% de la hoja necrosada y % de la hoja cubierta por picnidios) de cada línea extranjera y cultivar nacional. Las plantas fueron evaluadas en dos estadios: la primera evaluación se realizó en Z 23 (Zadoks *et al.*, 1974), aproximadamente a los 28 a 30 días de la primera inoculación, registrándose la severidad (porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial) de la primera y segunda hoja. La segunda evaluación se realizó en grano pastoso (Z 82, Zadoks *et al.*, 1974) aproximadamente a los 30 a 35 días de la fecha de espigazón de cada línea, la cual fue registrada cuando la mayoría de las plantas de cada línea presentaron toda la espiga fuera de la hoja bandera. En este caso se registraron también los valores de porcentaje de necrosis y cobertura picnidial pero en las tres hojas superiores.

3.5. Análisis de los datos

Se utilizaron los datos originales obtenidos de cada evaluación, debido a que la mayor parte presentaron una distribución muy cercana a la normal y varios test de transformación probados, no la mejoraron sustancialmente. A partir de estos datos se calcularon las medias. Los datos promedio de severidad fueron analizados mediante ANVA con el programa estadístico Statgraphics Centurion.

El ANVA se realizó sobre % de necrosis y % de cobertura picnidial de la segunda hoja en plántula, debido a que los datos de la primera hoja no permitían discriminar entre líneas y cultivares resistentes y susceptibles, o entre aislamientos más agresivos y menos agresivos, por ser valores en general elevados debido a la edad y senescencia de dicha hoja.

El ANVA para la segunda evaluación, se realizó sobre los datos promedio obtenidos de hoja bandera y hoja bandera-1, debido a que en la hoja bandera-2 también se observó senescencia.

Los factores fueron los ambientes, los aislamientos, las líneas y las repeticiones.

Las medias fueron comparadas mediante el test LSD ($\alpha=0,05$) para cada variable dependiente.

Resultados

Plántula

Los resultados del ANVA mostraron que para necrosis de segunda hoja existieron diferencias significativas entre aislamientos, líneas/cultivares y en las interacciones dobles: ambiente x aislamiento y aislamiento x línea/cultivar. Los ambientes no mostraron diferencias significativas entre ellos para el desarrollo de la enfermedad. Tampoco aparecieron diferencias significativas en la interacción doble ambiente x línea/cultivar ni en la interacción triple: ambiente x aislamiento x línea/cultivar. Para cobertura picnidal de esta hoja existieron diferencias significativas entre todos los factores, en todas las interacciones dobles y también en la triple (Tabla 3.2). En cuanto a cobertura picnidal, el ambiente F demostró ser más propicio que LH para el desarrollo de la enfermedad.

Tabla 3.2. Cuadrados Medios del ANVA para el promedio de porcentaje de necrosis y cobertura picnidal en Segunda Hoja, en estadio Z 23 sobre 23 líneas y cultivares de trigo inoculados con 16 aislamientos del patógeno *M. graminicola*, en dos ambientes.

Fuente de Variación	G.L.	Necrosis	Cob. Picnidal
Ambiente (A)	1	4128,51	55159,3*
Error A	1	1083,37	1553,25
Aislamiento (B)	15	12206,5***	808,56***
AxB	15	5241,66**	628,63***
Error B	30	2385,97	82,35
Líneas/Cultivares (C)	22	2115,6***	996,63***
AxC	22	485,1	615,81***
BxC	330	883,19**	116,41**
AxBxC	330	422,868	105,6**
Error C	704	371,95	62,11

*, ** y ***, significativo, test de F al nivel P=0.05; 0.01 y 0.001 respectivamente.

Se caracterizó a los aislamientos por su agresividad y a las líneas/cultivares por su resistencia (Tabla 3.3 y 3.4).

Analizando la necrosis, el aislamiento 2 fue el menos agresivo, mostrando valores similares a 1, 20 y 217. Mientras que el aislamiento más agresivo fue el 52 y se encontraron otros semejantes a éste como 201, 248 y 243.

Teniendo en cuenta la cobertura picnidial, se observó que 254 fue el menos agresivo. Otros aislamientos semejantes a éste fueron 248, 244 y 226, los dos últimos sin diferencias entre si. En cambio el 14 presentó la mayor agresividad, seguido por otros como 24, 2 y 217, similares entre sí (Tabla 3.3).

Considerando ambos componentes de la resistencia, puede señalarse que los cultivares que presentaron más resistentes fueron IAS 20 y Oasis. En cuanto a necrosis también aparecieron Tonic, Flame y Estanzuela Federal sin diferencias con Oasis, y los cultivares nacionales Klein Dragón y Klein Volcán y Don Ernesto INTA. En cobertura picnidial, también encontramos a TE 9111 (Tabla 3.4).

En cuanto a las que mostraron susceptibilidad tanto en necrosis como en cobertura picnidial, se presentaron Saratovskaja 19 y Janetzki Probat. Para necrosis también se observaron W 7984 Synthetic Hexaploid e Israel 493 y para cobertura picnidial Klein Sagitario y Buck Ranquel. La línea W 7984 Synthetic Hexaploid será nombrada en toda la tesis como W 7984 S.H. con el fin de facilitar la lectura del texto, las tablas y figuras.

Tabla 3.3. Medias de dos ambientes de los porcentajes de necrosis y cobertura picnidial de Segunda hoja, en estadio Z 23 para 16 aislamientos de *M graminicola* inoculados sobre 23 líneas y cultivares de trigo.

	Necrosis	Cobertura picnidial
Aislamiento		
1	28,68 ab	9,69 def
2	28,16 a	12,12 fg
14	52,09 defg	15,58 h
20	36,91 abc	8,24 cde
24	54,86 efg	13,20 gh
52	69,96 h	8,32 cde
201	62,66 gh	8,58 de
205	45,63 cdef	8,66 de
217	39,34 abcd	10,21 ef
226	44,37 cde	5,71 abc
230	49,34 cdefg	7,27 abcd
243	57,21 efgh	9,53 def
244	50,50 cdefg	5,67 abc
247	47,18 cdef	8,05 bcde
248	59,30 fgh	5,43 ab
254	43,10 bcde	4,55 a
LSD	14,71	2,73

Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente ($\alpha= 0,05$, LSD test).

Tabla 3.4. Medias de dos ambientes de los porcentajes de necrosis y cobertura picnidial de Segunda hoja, en estadio Z 23 para 23 líneas y cultivares de trigo inoculadas con 16 aislamientos de *M graminicola* sobre.

	Necrosis	Cob. Picnidial
Línea/Cultivar		
Extranjeros		
Capelle	49,94 defg	10,73 fg
Estanzuela Federal	45,45abcdef	10,98 g
Flame	43,03 abc	8,14 def
IAS 20	44,50 abcd	2,63 a
Israel 493	57,11 hi	4,28 abc
Kavkaz	51,73 fgh	6,23 bcd
Oasis	42,04 ab	4,07 abc
Saratovskaja 19	59,40 i	18,04 h
Tadinia	46,21 bcdef	7,65 de
TE 9111	46,67 bcdef	3,74 ab
Tonic	41,36 ab	5,79 bcd
Veranópolis	51,43efgh	6,48 cd
W 7984 S.H.	58,71 i	7,40 de
Janetzkis Probat	55,87 ghi	17,34 h
Argentinos		
Buck 75 Aniversario	45,71 bcdef	7,05 de
Buck Arriero	46,12 bcdef	11,16 g
Buck Ranquel	47,45 bcdef	11,24 g
Don Ernesto	44,97abcde	10,84 fg
Klein Dragón	38,87 a	10,92 g
Klein Sagitario	49,27 cdefg	11,72 g
Klein Volcán	41,69 ab	5,85 bcd
Klein Zorro	48,93 cdef	10,66 fg
ProINTA Puntaí	49,39 cdefg	9,44 efg
LSD	6,68	2,73

Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente ($\alpha= 0,05$, LSD test).

La interacción **ambiente x aislamiento**, tanto para necrosis como para cobertura picnidial, fue estadísticamente significativa, debido a que si bien tanto los aislamientos más agresivos como los menos agresivos tuvieron valores similares en ambos ambientes, presentaron diferente ordenamiento en cada ambiente de acuerdo con su nivel de agresividad (Figuras 3.4 y 3.5).

También se observó que para necrosis, la mayoría de los aislamientos mostraron mayores valores en el ambiente F, a diferencia de lo que ocurrió en cobertura picnidial

donde se apreciaron valores más bajos en el ambiente F. En este caso, el valor más alto en F fue 4,9, lo que también impide una buena discriminación entre aislamientos más agresivos y menos agresivos.

De acuerdo con el ANVA, la interacción doble **ambiente x línea/cultivar** sólo fue estadísticamente significativa para la variable cobertura picnidial. Si bien tanto los materiales más resistentes como los más susceptibles dieron valores similares en ambos ambientes, se observó que el orden de las líneas/cultivares según su resistencia fue diferente en LH y F.

El ambiente F mostró siempre los valores promedio más bajos, es decir fue el menos propicio para el desarrollo de la enfermedad. En este ambiente, el valor más alto fue 6,01, mientras que en LH fue 31,49 (Fig. 3.6).

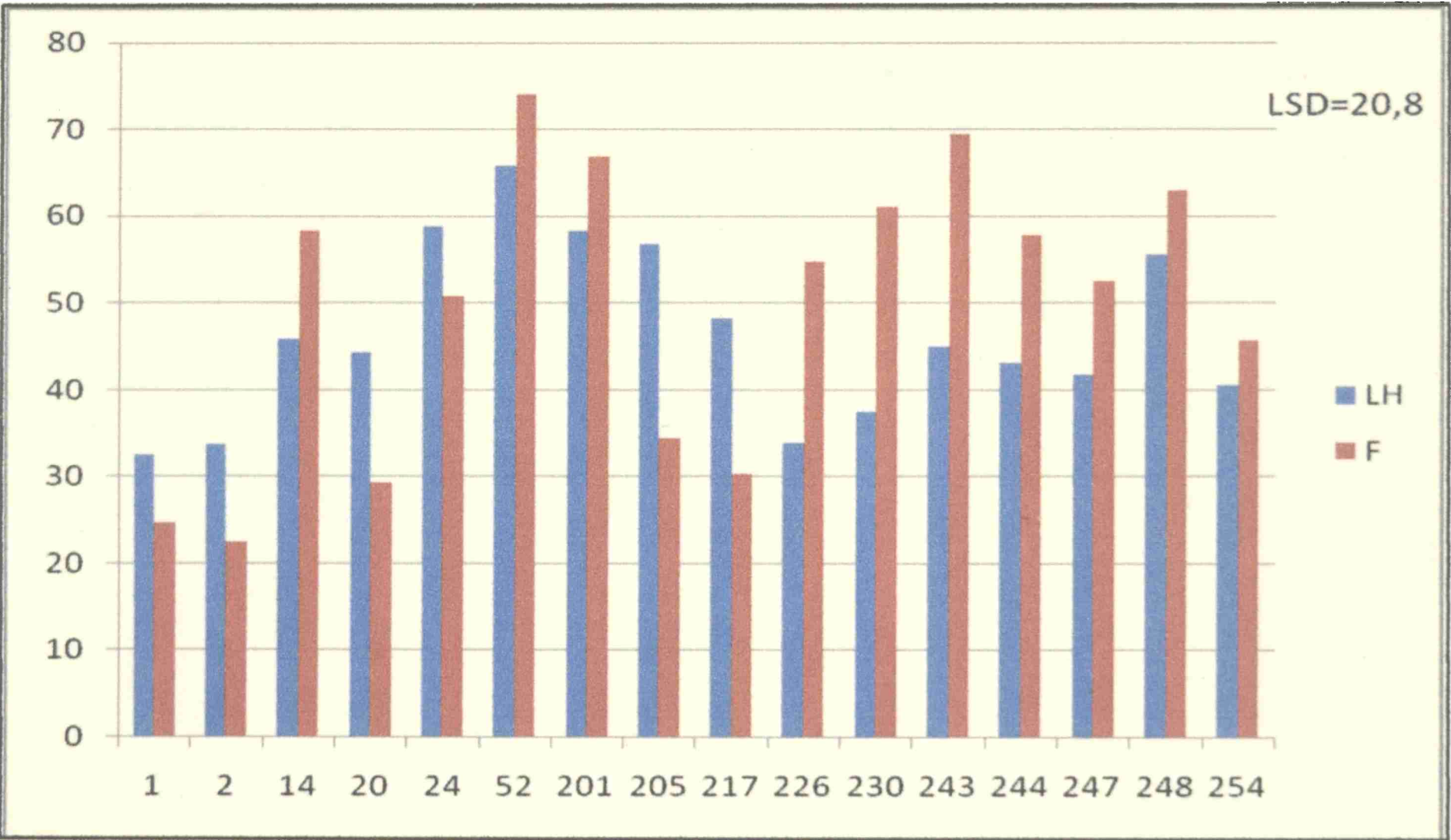


Fig. 3.4. Interacción ambiente x aislamiento del porcentaje de necrosis en segunda hoja, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 23, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

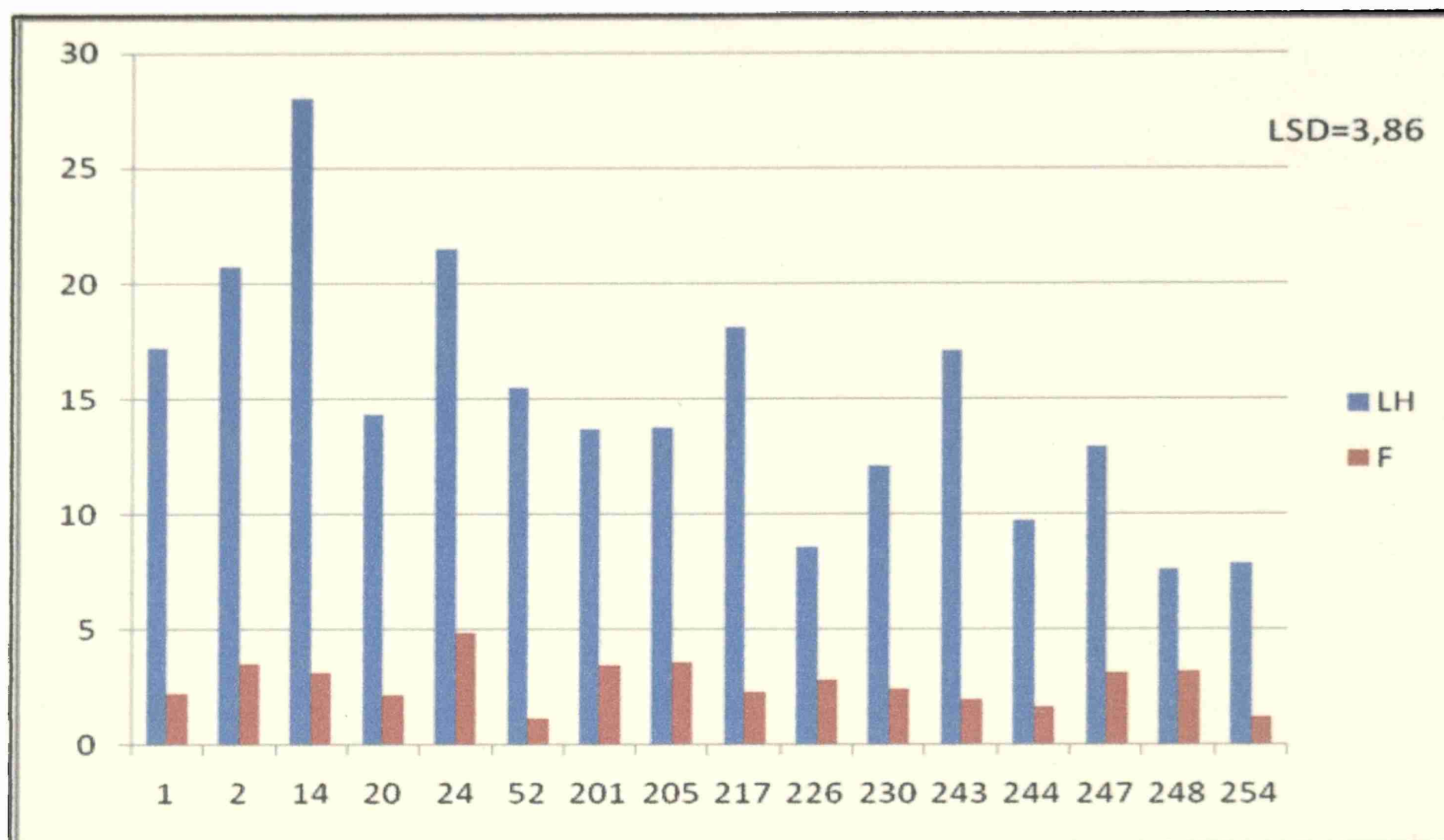


Fig. 3.5. Interacción ambiente x aislamiento del porcentaje de cobertura picnidial en segunda hoja, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 23, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

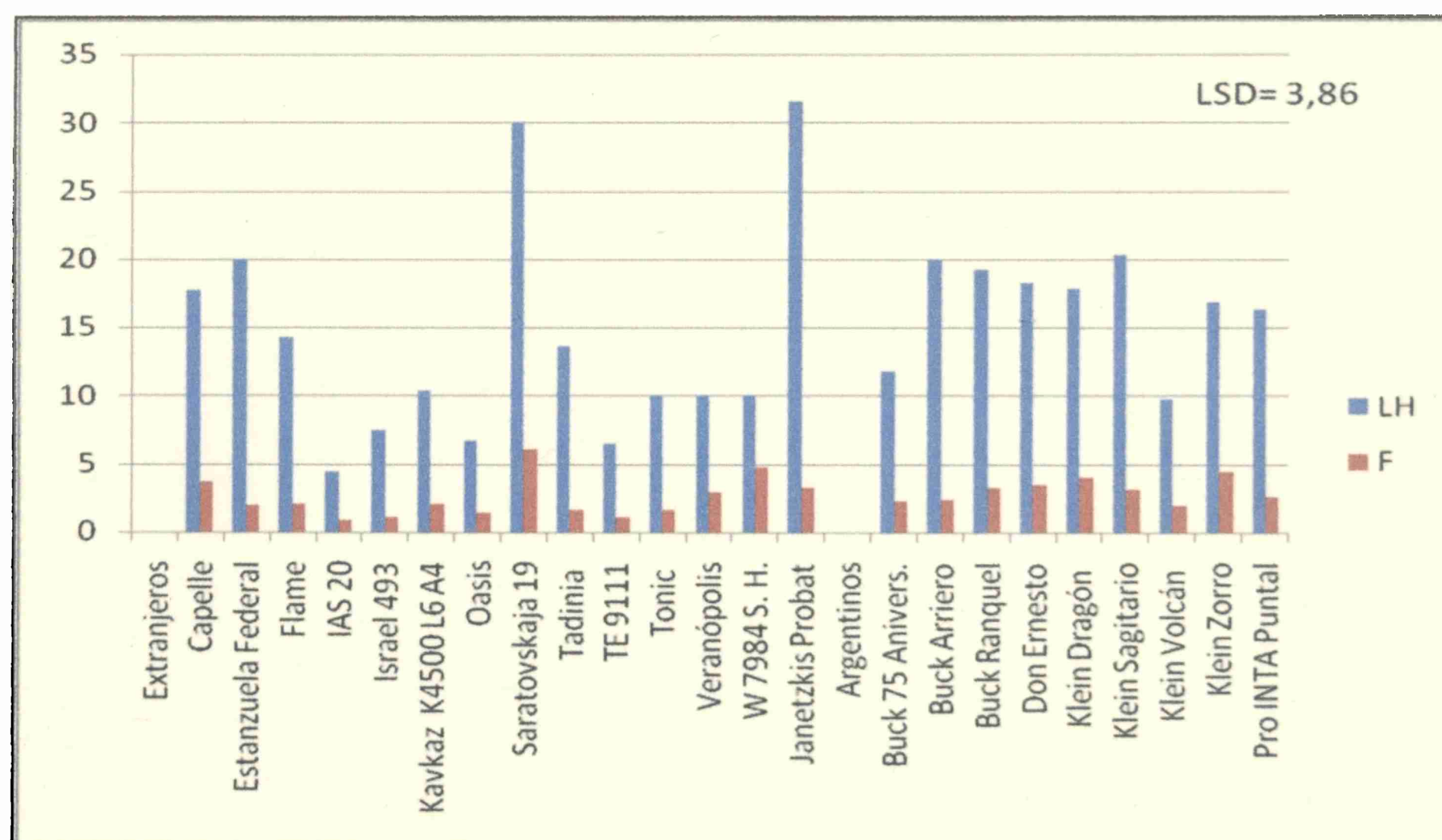


Fig 3.6. Interacción ambiente x línea/cultivar para porcentaje de cobertura picnidial en segunda hoja, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 23, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

Por otro lado, la interacción doble **aislamiento x línea/cultivar** también resultó estadísticamente significativa para las dos variables evaluadas, ya que algunas líneas y cultivares mostraron resistencia frente a algunos aislamientos y no lo hicieron frente a otros (Tablas 3.5 y 3.6). Tonic y Oasis presentaron altos niveles de resistencia por su bajo porcentaje de necrosis (inferior a 25%) frente a cinco de los 16 aislamientos probados. Para cobertura picnidial, Oasis fue resistente a 15 aislamientos y Tonic a 13 de ellos (se consideró como resistente aquellas líneas o cultivares con valores menores al 10 %, dado los bajos valores de cobertura picnidial, donde el mayor porcentaje fue de 39,90 % para Saratovskaja 19) y fueron moderadamente resistentes (por debajo del 50 % para necrosis y del 20% para cobertura picnidial) frente a otros aislamientos, lo que indicaría la presencia de resistencia parcial. En los materiales extranjeros fueron encontrados variados niveles de resistencia moderada. Así, Veranópolis, IAS 20 y Tadinia mostraron resistencia moderada para necrosis frente a un alto número de aislamientos. La mayoría de las demás líneas presentaron resistencia en necrosis sólo a dos de ellos. Aquellos aislamientos frente a los cuales los materiales considerados resistentes no mostraron resistencia, fueron aquellos que presentaron altos valores de agresividad para la mayoría de las líneas y cultivares.

Tabla 3.5. Porcentaje de necrosis para segunda hoja en la interacción aislamiento x línea/cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 23 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Líneas-Cultiv/ Aislamiento		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle		8,25	44,58	71,25	45,25	34,25	86,53	83,91	32,50	57,50	67,14	17,14	44,23	59,35	38,65	50,67	57,81
Estanzuela Federal		6,92	41,13	29,63	37,27	41,11	90,18	73,96	45,43	15,00	46,30	64,38	20,42	58,96	62,25	76,25	18,06
Flame		8,13	10,50	57,33	32,28	28,44	84,90	60,21	64,08	41,09	26,86	47,29	53,34	55,21	36,75	55,58	26,52
IAS 20		14,17	14,31	55,25	32,50	48,16	59,38	66,88	36,25	32,25	70,63	45,34	55,42	45,88	29,38	49,38	56,83
Israel 493		60,00	41,25	43,13	100,00	85,42	79,38	63,10	45,00	38,54	9,38	43,94	56,67	49,17	50,08	80,00	68,75
Kavkaz		18,75	10,00	46,55	40,60	58,54	75,18	69,38	85,93	31,67	41,46	74,17	68,50	51,04	47,88	67,42	40,59
Oasis		22,50	16,88	54,36	18,54	61,61	53,09	55,72	4,75	63,25	44,48	45,13	51,34	38,75	68,00	50,00	24,25
Saratovskaja 19		66,13	33,96	64,27	52,95	52,90	76,93	62,85	77,84	68,04	62,53	51,77	68,00	47,98	49,86	64,00	50,50
Tadinia		50,00	12,50	58,34	27,11	60,91	41,50	87,71	17,09	32,08	37,44	46,83	46,54	69,25	47,08	67,50	37,50
TE 9111		24,00	35,25	73,17	43,92	64,82	57,17	55,79	25,30	42,50	42,95	48,75	62,00	49,13	24,13	52,31	45,50
Tonic		17,13	26,25	58,77	19,21	56,01	89,83	53,28	24,17	17,50	33,41	21,10	45,00	63,57	29,69	63,00	43,88
Veranópolis		32,50	37,25	46,85	63,97	59,33	96,67	75,75	72,08	28,54	25,58	46,42	67,50	36,88	44,44	58,75	30,42
W 7984 S. H.		17,50	60,00	34,38	89,00	50,06	100,00	100,00	72,50	85,92	10,00	48,34	61,88	49,38	47,38	73,34	39,72
Janetzki Probat		50,00	47,25	64,08	43,07	65,14	82,34	59,17	64,60	46,67	41,88	51,88	69,38	52,71	68,33	29,58	57,92
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario		13,30	31,04	42,55	13,35	52,20	64,38	40,68	47,50	50,11	57,25	54,44	51,25	58,88	48,75	58,13	47,51
Buck Arriero		15,17	28,88	57,19	13,79	72,99	54,31	66,07	43,22	28,16	55,00	52,03	63,07	40,19	38,29	64,64	44,88
Buck Ranquel		40,00	23,75	50,34	48,17	40,21	88,44	53,72	48,08	21,37	42,61	54,88	44,17	46,67	54,79	62,56	39,46
Don Ernesto		37,25	21,04	32,74	15,52	51,14	59,19	61,08	33,71	34,50	80,92	42,75	62,88	55,83	34,63	41,92	54,50
Klein Dragón		53,88	10,88	52,78	17,76	48,83	17,28	42,47	26,77	27,38	40,83	50,00	65,63	32,46	56,54	51,28	27,19
Klein Sagitario		32,25	22,50	45,47	35,81	61,03	77,81	51,94	65,00	33,96	52,08	54,71	57,71	50,15	48,63	64,38	35,05
Klein Volcán		21,96	14,38	49,03	10,57	35,92	65,70	45,50	38,73	26,96	36,85	40,11	58,83	53,70	52,72	64,58	51,55
Klein Zorro		18,51	38,75	53,59	12,27	75,02	49,22	55,00	41,19	56,43	59,79	62,08	68,75	37,50	62,29	47,50	45,00
ProINTA Puntal		31,46	25,31	57,03	35,97	57,81	59,81	57,14	37,73	25,42	35,15	71,42	73,33	58,85	44,59	71,25	47,92
LSD= 26,73																	

Tabla 3.6. Porcentaje de cobertura picnidal para segunda hoja en la interacción aislamiento x línea/cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 23 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultiv/Aislamiento		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle		3,25	23,50	21,31	13,11	7,61	4,70	10,68	9,28	14,50	16,33	0,54	10,47	2,55	8,50	10,92	14,44
Estanzuela Federal		2,29	13,54	17,66	13,09	21,41	12,18	15,05	14,64	10,00	10,34	19,17	0,50	6,04	12,67	4,25	3,00
Flame		1,00	4,38	13,13	10,72	8,86	10,61	11,61	16,25	11,58	2,92	5,76	13,40	5,50	3,52	5,67	5,42
IAS 20		5,02	4,94	4,47	5,76	1,98	2,71	0,00	0,25	5,88	0,00	2,46	2,17	1,75	3,69	0,58	0,42
Israel 493		10,88	15,38	5,00	3,50	5,00	3,21	1,79	1,00	6,44	1,25	2,81	2,84	7,42	1,38	0,63	0,00
Kavkaz K4500 L6 A4		7,13	3,00	9,40	11,91	3,14	6,88	5,36	2,32	12,33	5,04	5,42	4,18	2,13	13,75	3,48	4,22
Oasis		1,75	8,25	8,78	7,19	3,04	2,84	2,97	1,58	5,94	0,72	2,09	3,34	1,58	1,88	12,50	0,63
Saratovskaja 19		24,75	15,92	39,90	13,32	8,55	25,61	16,00	23,74	22,38	27,38	3,06	24,41	15,77	16,08	4,50	7,35
Tadinia		6,25	6,00	20,83	15,09	11,51	10,58	8,75	7,17	4,58	6,81	1,48	1,96	2,75	8,44	6,88	3,38
TE 9111		4,13	0,63	8,13	5,00	2,58	2,12	9,67	0,42	12,50	3,94	2,04	3,54	3,42	0,50	0,38	0,92
Tonic		2,71	12,13	12,19	5,41	2,92	6,26	7,19	2,58	4,79	1,56	1,25	16,77	8,50	2,56	4,00	1,90
Veranópolis		8,25	14,63	10,66	6,95	2,06	3,08	10,00	15,42	1,08	0,63	4,96	7,09	0,50	7,06	9,96	1,38
W 7984 S. H.		15,50	23,13	10,83	7,40	8,30	2,00	3,50	13,13	11,88	0,00	9,88	3,35	0,31	7,50	0,84	0,86
Janetzkis Probat		15,56	18,00	33,86	20,64	19,22	17,24	10,05	13,09	19,38	8,58	7,39	19,79	17,09	38,97	8,13	10,54
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario		3,71	12,46	8,18	3,01	8,83	7,92	9,23	1,01	20,97	1,61	6,48	4,58	17,21	4,69	0,88	1,99
Buck Arriero		13,38	14,73	21,50	6,38	32,92	8,44	12,29	16,30	2,61	3,53	7,33	7,37	1,48	8,90	9,61	11,92
Buck Ranquel		14,65	11,75	12,31	5,00	12,66	23,41	8,97	14,55	2,78	5,66	12,41	18,67	6,65	8,31	10,49	11,62
Don Ernesto		11,38	9,42	16,83	6,23	27,33	9,92	7,83	11,88	14,43	1,97	12,92	15,46	6,25	8,63	5,73	7,19
Klein Dragón		17,69	2,08	17,13	5,81	27,97	5,21	9,78	3,96	7,38	7,79	15,61	19,63	7,11	12,79	6,68	8,13
Klein Sagitario		14,98	15,88	18,50	8,00	24,08	14,32	4,54	11,17	16,69	3,91	12,38	8,48	9,46	9,88	9,44	5,87
Klein Volcán		4,69	9,38	9,59	3,11	5,13	2,69	7,50	5,08	9,47	4,60	9,04	14,03	1,83	2,28	4,08	1,13
Klein Zorro		10,54	28,63	24,01	5,71	29,09	5,00	10,96	10,12	12,14	12,27	8,40	2,75	2,88	2,06	4,00	2,00
Pro INTA Puntal		23,54	11,00	14,11	7,31	29,35	4,41	13,66	4,19	5,04	4,59	14,42	14,50	2,29	1,04	1,30	0,38
LSD= 10,92																	

Entre los cultivares nacionales, los datos de necrosis determinaron que Klein Dragón y Klein Volcán fueron resistentes a tres aislamientos. Además Klein Dragón fue moderadamente resistente a ocho y Klein Volcán a siete. Para los valores de cobertura picnidial, en Klein Dragón se halló resistencia a 10 aislamientos y una resistencia moderada a cinco, mientras que el de mejor comportamiento fue Klein Volcán, mostrándose resistente a 15 aislamientos y con resistencia moderada al restante. Estos valores hacen suponer la presencia de resistencia parcial en estos dos cultivares argentinos. Los valores altos de necrosis también pueden haber estado algo afectados por la senescencia de la hoja.

La mayor parte de los demás cultivares argentinos mostraron buen comportamiento ya que fueron resistentes, en cuanto a necrosis, a dos de los 16 aislamientos probados pero moderadamente resistentes a varios aislamientos. Los resultados de la variable cobertura picnidial demostraron que también otros materiales se comportaron como resistentes o moderadamente resistentes como IAS 20, TE 9111, Israel 493, Kavkaz, Veranópolis, Buck 75 Aniversario y ProINTA Puntal. Algunos materiales nacionales mostraron valores muy bajos de necrosis y de cobertura picnidial frente a determinados aislamientos, lo cual hace suponer que podrían contener genes de resistencia específica frente a ellos. Es el caso de Buck 75 Aniversario frente a los aislamientos 1 y 20; Buck Ranquel frente al 217; Klein Dragón frente al 2 y Klein Volcán frente al 1 y al 20.

La mayor susceptibilidad para ambas variables fue encontrada en los materiales Saratovskaja 19 y Janetzki Probat, los cuales, de acuerdo a los datos de necrosis, no presentaron resistencia frente a ningún aislamiento, aunque fueron moderadamente resistentes frente a algunos de ellos. Para cobertura picnidial, Janetzki Probat sólo fue resistente frente a tres de los aislamientos pero moderadamente resistente frente a 10 de ellos. Saratovskaja 19 mostró el mayor valor promedio y fue resistente a cuatro aislamientos, aunque presentó resistencia moderada frente a otros 5.

Para cobertura picnidial, el resto de las líneas y los cultivares argentinos tuvieron un comportamiento variado pero aceptable.

Los aislamientos con mayor agresividad fueron 24, 52, 201 y 243, ya que mostraron valores promedio altos para las dos variables observadas. Entre los menos agresivos aparecieron 1, 217, 226, 244, 247 y 254, debido a que presentaron los valores promedio más bajos para necrosis y cobertura picnidial.

Por otro lado, la interacción **ambiente x aislamiento x línea/cultivar** fue estadísticamente significativa solo para la variable cobertura picnidial, ya que en cada ambiente existió una diferente secuencia de ordenamiento de los materiales de acuerdo con su resistencia frente a los aislamientos (Tabla 3.8). En este caso, se muestra también la tabla 3.7, que corresponde a los valores de necrosis para esta interacción, debido a que la resistencia en cuanto a cobertura picnidial de las líneas y cultivares quiso comprobarse con los valores de necrosis porque los valores de picnidios fueron muy bajos.

Si bien pudieron observarse algunos materiales con resistencia en ambos ambientes como IAS 20, Oasis, Tonic y Buck 75 Aniversario, en otros casos lo fueron en un solo ambiente. En cobertura picnidial, estos materiales junto a otros como Israel 493, Kavkaz, TE 9111, Veranópolis, W 7984 S.H. y Klein Volcán, evidenciaron resistencia en ambos ambientes para más de la mitad de los aislamientos.

El menor valor promedio de necrosis fue de 3,75 y lo presentó la línea extranjera Israel 493 en el ambiente de Los Hornos (LH). El mayor valor promedio fue de 100 y apareció en líneas como Capelle, Flame, W. 7984 S.H., Janetzki Probat, Veranópolis, Israel 493, Klein Sagitario y Buck Ranquel, generalmente en el ambiente Facultad (F), excepto en las líneas W 7984 S.H. e Israel 493 que también mostraron este promedio en el ambiente LH.

Para cobertura picnidial, el valor promedio más bajo fue 0 y apareció en la mayoría de los materiales en el ambiente F, en donde los valores generalmente fueron más bajos que en LH. El mayor valor promedio fue de 74,37 y apareció en la línea Saratovskaja 19 en el ambiente LH.

La mayor parte de las líneas y cultivares mostraron resistencia en el ambiente F.

El aislamiento 14 demostró no poseer factores de avirulencia para los genes de resistencia de la mayor parte de las variedades ya que sólo IAS 20 e Israel 493 presentaron resistencia expresada como cobertura picnidial, aunque no como necrosis, en ambos ambientes. También podemos mencionar al 2 sin factores de avirulencia para la mayoría de los materiales. En este caso solo Flame, IAS 20, Kavkaz, Tadinia, TE 9111 y Klein Dragón mostraron valores de resistencia en LH y F y solo para cobertura picnidial, que no puede tomarse como un valor preciso en este ensayo dado los bajos valores que presentó.

Tabla 3.7. Porcentaje de necrosis para segunda hoja en la interacción ambiente x aislamiento x línea/cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 23 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultiv/Aislam		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle	LH	10,00	70,00	75,94	67,50	18,50	73,05	70,31	45,00	55,00	70,00	6,77	40,12	45,83	29,79	40,00	50,00
	F	6,50	19,16	66,57	23,00	50,00	100,00	97,50	20,00	60,00	64,28	27,50	48,33	72,86	47,50	61,33	65,62
Estanzuela Federal	LH	8,33	41,25	38,75	37,54	70,21	82,85	71,25	70,85	27,50	31,77	60,41	29,58	29,58	62,00	77,50	32,12
	F	5,50	41,00	20,50	37,00	12,00	97,50	76,66	20,00	2,50	60,83	68,33	11,25	88,33	62,50	75,00	4,00
Flame	LH	10,00	15,00	60,00	46,43	27,29	69,79	71,25	64,16	48,00	12,06	29,58	38,33	33,75	30,00	53,16	28,74
	F	6,25	6,00	54,66	18,12	29,58	100,00	49,16	64,00	34,17	41,66	65,00	68,33	76,66	43,50	58,00	24,28
IAS 20	LH	17,50	13,62	55,00	47,50	34,90	51,25	43,75	36,50	32,50	52,50	52,33	43,33	45,00	30,00	35,00	53,66
	F	10,83	15,00	55,50	17,50	61,43	67,50	90,00	36,00	38,00	88,75	38,33	67,50	46,75	28,75	63,75	60,00
Israel 493	LH	60,00	57,50	30,00	100,00	100,00	58,75	67,85	45,00	75,83	3,75	43,87	33,33	33,33	47,66	100,00	60,00
	F	60,00	25,00	56,25	100,00	70,83	100,00	58,33	45,00	1,25	15,00	44,00	80,00	65,00	52,50	60,00	77,50
Kavkaz	LH	32,50	15,00	33,09	67,85	57,50	75,35	64,37	85,86	38,33	26,25	70,00	60,00	36,25	49,00	61,50	39,52
	F	5,00	5,00	60,00	13,33	59,57	75,00	74,37	86,00	25,00	56,66	78,33	77,00	65,83	46,75	73,33	41,66
Oasis	LH	32,50	22,50	35,62	25,83	58,21	49,52	46,43	4,75	78,75	28,12	26,25	26,67	22,50	90,00	40,00	27,50
	F	12,50	11,25	73,09	11,25	65,00	56,66	65,00	4,75	47,75	60,83	64,00	76,00	55,00	46,00	60,00	21,00
Saratovskaja 19	LH	66,25	27,91	84,37	62,14	60,31	82,19	63,19	77,68	87,50	64,64	38,75	64,00	41,66	46,37	64,00	48,50
	F	66,00	40,00	44,16	43,75	45,48	71,66	62,50	78,00	48,57	60,41	64,79	72,00	54,29	53,33	64,00	52,50
Tadínia	LH	50,00	20,00	56,67	42,19	87,81	60,00	80,41	28,33	35,00	21,44	27,50	13,33	69,00	40,41	65,00	45,83
	F	50,00	5,00	60,00	12,04	34,00	23,00	95,00	5,83	29,16	53,45	66,16	79,75	69,50	53,75	70,00	29,16
TE 9111	LH	42,00	35,50	67,50	43,83	67,14	44,33	61,66	36,43	52,50	41,25	30,00	50,00	31,25	28,87	42,12	34,33
	F	42,50	35,00	78,83	44,00	62,50	70,00	49,91	14,16	32,50	44,64	67,50	74,00	67,00	19,37	62,50	56,66
Tonic	LH	23,75	35,00	46,87	21,66	77,85	81,66	52,81	38,33	13,33	21,65	18,03	55,00	51,66	36,87	64,00	43,75
	F	10,50	17,50	70,66	16,75	34,17	98,00	53,75	10,00	21,67	45,18	24,16	35,00	75,48	22,50	62,00	44,00
Veranópolis	LH	45,00	37,50	37,85	63,93	62,00	93,33	72,50	89,16	42,50	27,00	49,50	59,16	21,25	62,62	55,83	34,16
	F	20,00	37,00	55,83	64,00	56,66	100,00	79,00	55,00	14,58	24,16	43,33	75,83	52,50	26,25	61,66	26,66
W 7984 S. H.	LH	30,00	60,00	30,00	89,00	50,00	100,00	100,00	100,00	87,33	10,00	30,00	46,00	49,37	43,50	73,33	41,43
	F	5,00	60,00	38,75	89,00	50,12	100,00	100,00	45,00	87,00	10,00	66,67	77,75	49,37	51,25	73,33	38,00

Janetzki's Probat	LH	50,00	47,50	63,75	66,56	85,94	64,69	50,00	97,85	62,50	29,25	21,25	55,00	52,92	83,33	32,50	51,66
	F	50,00	47,00	64,40	19,58	44,33	100,00	68,33	31,33	30,83	54,50	82,50	83,75	52,50	53,33	26,66	64,17
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario	LH	14,69	35,83	20,94	20,20	43,89	72,91	25,10	55,00	54,50	57,00	44,50	26,67	66,25	22,50	41,25	42,33
	F	11,91	26,25	64,16	6,50	60,50	55,83	56,25	40,00	45,71	57,50	64,37	75,83	51,50	75,00	75,00	52,68
Buck Arriero	LH	20,00	28,75	49,37	22,29	75,41	58,12	74,64	72,50	35,83	55,00	36,67	40,71	19,37	29,58	60,00	36,43
	F	10,33	8,50	65,00	5,29	70,57	50,50	57,50	13,93	20,48	55,00	67,38	85,41	61,00	47,00	69,28	53,33
Buck Ranquel	LH	40,00	37,50	27,19	48,33	26,25	76,87	53,69	48,16	21,37	19,06	33,09	40,00	51,66	30,83	71,78	34,62
	F	40,00	10,00	73,50	48,00	54,16	100,00	53,75	48,00	21,37	66,16	76,66	48,33	41,66	78,75	53,33	44,28
Don Ernesto	LH	37,50	22,08	35,89	23,75	61,78	65,00	32,16	45,42	38,00	81,00	41,00	52,00	53,75	33,55	18,50	55,25
	F	37,00	20,00	29,58	7,29	40,50	53,37	90,00	22,00	31,00	80,83	44,50	73,75	57,91	35,71	65,33	53,75
Klein Dragón	LH	53,75	9,50	36,56	27,19	47,50	25,81	32,44	37,08	33,33	27,50	39,16	58,75	32,16	42,08	62,08	34,37
	F	54,00	12,25	69,00	8,33	50,16	8,75	52,50	16,46	21,43	54,16	60,83	72,50	31,74	71,00	40,48	20,00
Klein Sagitario	LH	32,50	35,00	38,44	35,62	53,12	55,62	51,87	65,00	48,33	11,66	35,41	36,25	60,41	28,50	53,75	30,71
	F	32,00	10,00	52,50	36,00	68,93	100,00	52,00	65,00	19,58	92,50	74,00	79,16	39,88	68,75	75,00	39,37
Klein Volcán	LH	30,00	28,75	40,55	12,94	19,25	59,40	40,16	48,58	31,66	13,23	35,62	46,66	58,75	31,69	72,91	32,37
	F	13,91	29,00	57,50	8,21	52,58	72,00	50,83	28,86	22,25	60,48	44,58	71,00	48,64	73,75	56,25	70,71
Klein Zorro	LH	29,52	55,00	43,44	13,29	88,12	45,93	57,50	59,16	90,00	52,50	36,66	53,75	30,00	55,83	22,50	40,00
	F	7,50	22,50	63,75	11,25	61,90	52,50	52,50	23,21	22,86	67,08	87,50	83,75	45,00	68,75	72,50	50,00
Pro INTA Puntal	LH	51,66	27,50	46,25	35,94	80,63	67,50	59,28	55,83	22,50	23,21	58,33	66,66	56,19	6,67	72,50	35,00
	F	11,25	23,12	67,80	36,00	35,00	52,12	55,00	19,62	28,33	47,08	84,50	80,00	61,50	82,50	70,00	60,83
LSD= 37,8																	

Tabla 3.8. Porcentaje de cobertura picnidial para segunda hoja en la interacción Ambiente x Aislamiento x Línea/Cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 23 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultiv/Aislam.		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle	LH	5,00	42,50	27,19	20,06	8,13	8,55	21,35	15,71	25,00	28,00	0,66	20,09	5,09	10,41	20,83	25,50
	F	1,50	4,50	15,43	6,16	7,08	0,83	0,00	2,83	4,00	4,66	0,41	0,83	0,00	6,58	1,00	3,37
Estanzuela Federal	LH	4,33	23,75	35,31	25,94	42,81	24,10	22,60	26,78	20,00	18,60	25,83	1,00	10,42	24,50	8,50	6,00
	F	0,25	3,33	0,00	0,25	0,00	0,25	7,50	2,50	0,00	2,08	12,50	0,00	1,66	0,83	0,00	0,00
Flame	LH	1,50	6,25	22,50	21,43	15,21	19,69	21,46	25,83	23,16	3,75	8,44	21,67	9,33	6,66	11,33	10,12
	F	0,50	2,50	3,75	0,00	2,50	1,53	1,75	6,66	0,00	2,08	3,08	5,12	1,66	0,37	0,00	0,71
IAS 20	LH	7,50	5,87	8,93	8,39	3,96	2,58	0,00	0,50	11,75	0,00	4,66	4,33	3,00	7,04	1,16	0,83
	F	2,54	4,00	0,00	3,12	0,00	2,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,50	0,33	0,00	0,00
Israel 493	LH	20,00	22,50	10,00	6,00	10,00	6,41	3,57	2,00	12,00	0,00	5,62	5,67	12,33	2,75	1,25	0,00
	F	1,75	8,25	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	2,50	0,00	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00
Kavkaz	LH	11,25	5,00	17,97	22,85	3,50	13,75	7,08	2,14	24,16	7,87	10,00	7,16	3,00	19,00	4,45	6,76
	F	3,00	1,00	0,83	0,96	2,78	0,00	3,62	2,50	0,50	2,21	0,83	1,20	1,25	8,50	2,50	1,67
Oasis	LH	3,00	13,75	17,56	12,50	6,07	4,26	1,43	2,66	6,25	1,44	3,37	6,67	3,16	3,75	20,00	1,25
	F	0,50	2,75	0,00	1,87	0,00	1,41	4,50	0,50	5,62	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00
Saratovskaja 19	LH	48,75	23,33	74,37	22,05	16,26	49,62	25,25	40,80	40,83	43,93	4,87	41,15	25,83	13,00	0,00	11,12
	F	0,75	8,50	5,42	4,58	0,83	1,58	6,75	6,66	3,93	10,83	1,25	7,70	5,71	19,16	9,00	3,57
Tadinla	LH	12,50	10,00	40,00	25,94	22,52	14,16	15,83	12,08	6,66	11,06	2,50	3,67	5,50	15,25	13,75	6,75
	F	0,00	2,00	1,66	4,25	0,50	7,00	1,66	2,25	2,50	2,55	0,46	0,25	0,00	1,62	0,00	0,00
TE 9111	LH	0,50	1,25	16,25	8,33	5,16	4,23	18,75	0,00	25,00	6,87	3,50	7,08	2,83	1,00	0,75	1,83
	F	7,75	0,00	0,00	1,66	0,00	0,00	0,58	0,83	0,00	1,00	0,58	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
Tonic	LH	4,25	17,50	24,37	9,29	5,83	11,84	14,37	2,50	7,41	3,12	2,50	32,91	14,50	3,50	2,50	3,79
	F	1,17	6,75	0,00	1,52	0,00	0,66	0,00	2,66	2,17	0,00	0,00	0,62	2,50	1,62	5,50	0,00
Veranópolis	LH	10,00	27,50	21,31	12,14	4,12	3,66	0,00	29,58	1,75	0,00	9,50	14,17	1,00	13,50	9,91	2,75
	F	6,50	1,75	0,00	1,75	0,00	2,50	20,00	1,25	0,41	1,25	0,41	0,00	0,00	0,62	10,00	0,00
W 7984 S. H.	LH	30,00	46,25	15,00	4,80	5,00	2,00	7,00	0,00	24,25	0,00	17,50	2,00	0,00	7,50	0,00	0,71

Janetzki's Probat	F	1,00	0,00	6,66	10,00	11,60	2,00	0,00	26,26	0,00	0,00	2,25	4,70	0,62	7,50	1,67	1,00
	LH	28,12	33,75	64,37	40,94	33,44	34,23	14,10	24,02	37,50	9,50	13,94	33,33	31,67	70,83	16,25	17,91
	F	3,00	2,25	3,33	0,33	5,00	0,25	6,00	2,16	1,25	7,66	0,83	6,25	2,50	7,10	0,00	3,17

Argentinos

Buck 75 Aniversario	LH	6,25	16,16	14,69	4,72	16,66	15,00	9,71	0,41	39,00	2,81	9,62	6,66	34,41	8,96	1,75	1,83
	F	1,16	8,75	1,66	1,30	1,00	0,83	8,75	1,60	2,94	0,41	3,33	2,50	0,00	0,41	0,00	2,14
Buck Arriero	LH	26,25	26,25	42,50	11,87	54,69	16,87	22,00	30,62	4,25	5,81	13,33	13,57	1,96	17,50	12,50	19,16
	F	0,50	3,20	0,50	0,87	11,14	0,00	2,57	1,96	0,96	1,25	1,32	1,16	1,00	0,30	6,71	4,67
Buck Ranquel	LH	28,33	20,00	23,12	10,00	19,06	46,56	16,06	26,75	1,78	1,87	18,81	36,67	12,04	13,50	12,64	20,37
	F	0,96	3,50	1,50	0,00	6,25	0,25	1,87	2,35	3,75	9,45	6,00	0,66	1,25	3,12	8,33	2,86
Don Ernesto	LH	21,25	14,58	27,41	11,62	46,16	19,58	15,66	23,75	18,50	2,69	25,00	29,25	7,50	13,98	0,66	14,37
	F	1,50	4,25	6,25	0,83	8,50	0,25	0,00	0,00	10,35	1,25	0,83	1,66	5,00	3,27	10,80	0,00
Klein Dragón	LH	30,00	1,75	28,75	11,37	38,75	10,41	15,06	6,25	13,33	13,75	24,33	32,50	8,08	24,58	10,79	16,25
	F	5,37	2,40	5,50	0,25	17,18	0,00	4,50	1,66	1,43	1,83	6,87	6,75	6,12	1,00	2,57	0,00
Klein Sagitario	LH	28,12	30,00	32,50	13,87	37,81	28,44	8,75	20,83	31,50	6,62	17,50	14,21	18,08	11,62	13,87	11,10
	F	1,83	1,75	4,50	2,12	10,35	0,20	0,33	1,50	1,87	1,20	7,25	2,75	0,83	8,12	5,00	0,62
Klein Volcán	LH	8,75	18,75	19,17	5,62	8,00	2,88	12,00	2,00	16,39	2,19	17,50	26,66	3,66	4,39	6,16	2,25
	F	0,62	0,00	0,00	0,58	2,25	2,50	3,00	8,16	2,55	7,01	0,58	1,40	0,00	0,16	2,00	0,00
Klein Zorro	LH	18,57	51,25	35,94	5,41	44,37	9,50	20,91	16,78	20,00	20,00	10,62	4,62	5,33	2,50	4,25	0,00
	F	2,50	6,00	12,08	6,00	13,81	0,50	1,00	3,45	4,28	4,54	6,16	0,87	0,41	1,62	3,75	4,00
Pro INTA Puntal	LH	40,83	18,75	25,31	14,29	47,50	8,31	22,32	3,75	0,66	7,77	28,33	27,50	4,57	1,67	2,25	0,75
	F	6,25	3,25	2,91	0,33	11,19	0,50	5,00	4,62	3,40	1,41	0,50	1,50	0,00	0,41	0,35	0,00

LSD= 15,45

En varios materiales foráneos y como era de esperar, se pudo observar resistencia completa o específica según los datos de ambas variables: Capelle y Tonic frente a los aislamientos 1, 20 y 230; Estanzuela Federal frente a 1 y 254; Flame frente a 1 y 2; Israel 493, Veranópolis y W 7984 S. H. para 226; Kavkaz al aislamiento 2; Oasis a 205 y TE 9111 a 247. Saratovskaja 19 y Janetzki Probat mostraron valores promedio altos para todos los aislamientos en ambos ambientes, demostrando su comportamiento como testigos susceptibles.

Entre los cultivares nacionales los únicos que mostraron valores de una probable resistencia específica, tanto en necrosis como en cobertura picnidial, fueron Buck 75 Aniversario frente a 1 y 20; Klein Dragón frente a 2 y Klein Volcán frente a 20; aunque en estos dos últimos también presentaron valores de resistencia parcial.

Si bien los valores indicativos de resistencia completa no son suficientemente bajos, pueden ser considerados como tales si se tiene en cuenta que los valores promedio de necrosis fueron afectados por la senescencia de la segunda hoja.

Estadio Adulto

A pesar de que la hoja bandera-2 fue evaluada en planta adulta, sus datos no fueron considerados para el análisis de los resultados debido a que en los dos ambientes presentaba senescencia.

Los resultados del ANVA mostraron que tanto para necrosis como para cobertura picnidial de las otras dos hojas evaluadas en este estadio (hoja bandera (HB) y hoja bandera-1 (HB-1)), existieron diferencias significativas entre todos los factores, todas las interacciones dobles y la triple, excepto para el factor ambiente de cobertura picnidial HB-1, donde la enfermedad tuvo un desarrollo similar en ambos ambientes. También se analizó el promedio de HB+HB-1. (Tabla 3.9).

La tabla 3.10 muestra las medias para Los Hornos (LH) y Facultad (F), en las tres variables evaluadas. Cada ambiente se mostró diferente para el desarrollo de la enfermedad. Se puede ver que para ambas hojas consideradas por separado y para HB+HB-1, el ambiente LH presentó valores más bajos que F por esto se consideró como el menos propicio.

Los resultados obtenidos a partir de HB, HB-1 y el promedio de HB+HB-1 determinaron que tanto para necrosis como para cobertura picnidial, el aislamiento 230 fue el más agresivo, seguido por el 201. También, otros con alta agresividad fueron 205 y 14. Además, el 1 se mostró también con alta agresividad pero sólo para cobertura picnidial. Por el contrario, el aislamiento más agresivo para ambas variables evaluadas fue el 254, que generó valores bajos de necrosis y cobertura picnidial en todos los casos. En segundo lugar se encontraron 2 y 52 y sólo para los datos de cobertura picnidial apareció también 20 (Tabla 3.11).

Tabla 3.9. Cuadros Medios del ANVA para el promedio de porcentaje de necrosis y cobertura picnidial en Hoja Bandera (HB), Hoja Bandera-1 (HB-1) y el promedio de estas dos hojas (HB+HB-1), sobre 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 82 evaluados con 16 aislamientos del patógeno *M. graminicola* en dos ambientes.

Fuente de Variación	G.L.	HB		HB-1		HB+HB-1	
		Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial
Ambiente (A)	1	91826,8*	4474,38*	35571,6***	8222,73	60426,0*	6207,08
Error A	1	15442,3	1053,69	47,7108	2640,34	4301,67	1757,49
Aislamiento (B)	15	1015,73**	161,38**	2199,48**	245,79***	1216,15**	183,517***
AxB	15	2501,4***	134,87**	5898,7***	229,13***	3752,04***	153,416***
Error B	30	366,15	35,58	594,37	38,76	369,23	32,09
Líneas/Cultiv (C)	22	7767,83***	496,91***	12514,1***	923,29***	9160,1***	635,889***
AxC	22	6954,35***	224,51***	6747,77***	437,39***	6358,71***	249,26***
BxC	330	541,54**	53,27**	785,92**	85,44*	543,605**	53,6497**
AxBxC	330	530,21**	53,27**	617,78**	71,68**	453,931**	40,0149**
Error C	704	187,04	22,18	315,96	47,35	168,58	22,99

*, ** y ***, si*, ** y ***, significativo, test de F al nivel P=0.05; 0.01 y 0.001 respectivamente.

Tabla 3.10. Medias de porcentajes de necrosis y cobertura picnidial en Hoja Bandera (HB), Hoja Bandera-1 (HB-1) y el promedio de estas dos hojas (HB+HB-1) para 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola* en dos ambientes.

	HB		HB-1		HB+HB-1	
	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial
Ambiente						
Los Hornos	14,1884 a	0,775448 a	45,6951 a	3,1124 a	29,9417 a	1,94393 a
Facultad	29,9849 a	4,26237 a	55,5268 b	7,83939 a	42,7558 a	6,05088 a
LSD	82,31	21,5	4,57	34,03	43,44	27,77

Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente ($\alpha= 0,05$, LSD test).

Tabla 3.11. Medias de porcentajes de necrosis y cobertura picnidial en Hoja Bandera (HB), Hoja Bandera-1 (HB-1) y el promedio de estas dos hojas (HB+HB-1) para 16 aislamientos de *M. graminicola* evaluados sobre 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 82 en dos ambientes.

	HB		HB-1		HB+HB-1	
	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial
Aislamiento						
1	24,50 cde	3,41 d	48,24 bcd	6,53 def	36,37 b	4,97 c
2	19,92 abc	0,89 ab	39,22 a	5,45 cd	29,57 a	3,17 b
14	24,87 cde	2,01 abcd	53,71 def	6,33 de	39,29 bc	4,17 bc
20	22,60 abcde	1,24 abc	50,11 bcde	4,00 bc	36,36 b	2,62 ab
24	26,18 de	2,53 bcd	52,13 cde	5,37 cd	39,16 bc	3,95 bc
52	20,80 abcd	0,89 ab	48,13 bcd	1,90 a	34,47 ab	1,40 a
201	26,93 e	3,19 d	60,34 f	5,49 cd	43,63 c	4,34 bc
205	21,15 abcde	3,32 d	55,94 ef	7,62 ef	38,55 bc	5,47 c
217	19,51 abc	3,19 d	49,66 bcde	5,73 cd	34,59 ab	4,46 bc
226	17,40 a	2,47 bcd	51,67 bcde	5,71 cd	34,54 ab	4,09 bc
230	26,73 e	6,10 e	53,40 def	8,38 f	40,06 bc	7,24 d
243	17,57 ab	2,24 abcd	50,32 bcde	5,77 cde	33,94 ab	4,00 bc
244	24,23 cde	2,98 cd	52,15 de	5,91 de	38,19 bc	4,45 bc
247	23,23 bcde	2,78 cd	54,15 def	5,95 de	38,69 bc	4,37 bc
248	20,78 abcd	2,44 bcd	45,90 abc	5,05 cd	33,34 ab	3,75 bc
254	16,98 a	0,62 a	44,68 ab	2,40 ab	30,83 ab	1,51 ab
LSD	5,76	1,8	7,34	1,87	5,78	5,72

Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente ($\alpha= 0,05$, LSD test).

Tabla 3.12. Medias de porcentajes de necrosis y cobertura picnidial en Hoja Bandera (HB), Hoja Bandera-1 (HB-1) y el promedio de estas dos hojas (HB+HB-1), para 23 líneas y cultivares de trigo en estadio Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola* en dos ambientes.

	HB		HB-1		HB+HB-1	
	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial	Necrosis	Cob. Picnidial
Línea/Cultivar Extranjeros						
Capelle	40,85 m	7,11 ij	65,42 j	14,23 j	53,14 g	10,67 e
Estan. Federal	32,75 l	10,04 k	60,98 hij	12,39 ij	46,86 fg	11,21 e
Flame	50,57 n	0,05 a	81,14 l	0,90 a	65,86 h	0,48 a
IAS 20	17,03 cdef	0,11 ab	39,99 cd	0,85 a	28,51 c	0,48 a
Israel 493	29,14 jkl	5,28 h	72,80 k	4,04 bcd	50,97 g	4,66 cd
Kavkaz	24,70 hij	8,58 jk	62,20 ij	11,12 hi	43,45 ef	9,85 e
Oasis	9,32 a	0,34 abc	28,76 a	1,89 ab	19,04 a	1,11 ab
Saratovskaja 19	30,81 kl	0,78 abc	56,75 ghi	2,15 ab	43,78 ef	1,46 ab
Tadinia	15,72 cde	3,60 g	58,97 ghi	5,77 def	37,34 de	4,68 cd
TE 9111	10,27 ab	0,39 abc	34,42 abc	0,80 a	22,35 ab	0,60 a
Tonic	33,33 l	1,70 bcd	59,13 ghi	7,52 fg	46,23 f	4,61 cd
Veranópolis	23,74 ghi	1,23 abcd	59,76 ghij	2,34 abc	41,75 ef	1,78 ab
W 7984 S.H.	27,41 ijk	3,53 fg	55,71 gh	7,65 fg	41,56 e	5,59 cd
Janetzkis Probat	31,59 kl	0,04 a	54,07 fg	0,62 a	42,84 ef	0,33 a
Argentinos						
Buck 75 Aniver.	12,40 abc	0,93 abc	35,58 bc	4,01 bcd	23,99 b	2,47 b
Buck Arriero	13,74 abcd	0,84 abc	57,03 ghi	5,87 def	27,13 bc	3,36 bc
Buck Ranquel	17,46def	0,20 ab	36,80 cd	3,36 bc	35,39 d	1,78 ab
Don Ernesto	21,13 fgh	1,90 cde	42,86 de	6,00 def	32,00 cd	3,95 bc
Klein Dragón	19,11 efg	2,77 defg	38,96 cd	9,44 gh	29,04 c	6,10 d
Klein Sagitario	12,36 abc	1,94 cdef	46,20 e	6,62 ef	29,28 c	4,28 c
Klein Volcán	9,04 a	1,41 abcd	30,63 ab	4,70 cde	19,83 ab	3,05 bc
Klein Zorro	14,99 bcde	1,84 cde	48,92 ef	6,80 ef	31,95 cd	4,32 c
ProINTA Puntal	10,53 ab	3,34 efg	36,96 cd	6,86 ef	23,75 b	5,10 cd
LSD	4,74	1,63	6,16	2,38	4,5	1,66

Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente ($\alpha= 0,05$, LSD test).

El ANVA para necrosis de HB, HB-1 y el promedio de las dos hojas (HB+HB-1) mostró que las líneas extranjeras Oasis y TE 9111 y los cultivares nacionales Klein Volcán, ProINTA Puntal y Buck 75 Aniversario fueron las más resistentes. Por el contrario, entre las más susceptibles se encontraron Flame, Capelle y Estanzuela Federal (Tabla 3.12).

La cobertura picnidial fue en general baja, observándose valores algo mayores para la HB-1 que es la que permitió una mejor discriminación del germoplasma. Los materiales foráneos que habían presentado el mejor comportamiento para necrosis (Oasis, TE 9111) también tuvieron valores bajos de cobertura picnidial. Sin embargo se agregaron otros como Janetzki Probat, Flame, IAS 20, Saratovskaja 19 y Veranópolis. Los mayores porcentajes de cobertura picnidial se produjeron en Cappelle, Estanzuela Federal y Kavkaz, aunque siempre inferiores al 15%. Para los cultivares argentinos, Buck Ranquel, Buck 75 Aniversario y Klein Volcán fueron los de mejor comportamiento, aunque debe destacarse que el valor más alto, que correspondió a Klein Dragón, sólo fue de 9,44 %. Esto indicó que Buck 75 Aniversario y Klein Volcán se destacaron por ambos componentes de la resistencia (Tabla 3.12).

Analizando la **interacción ambiente x aislamiento**, ocurrió lo mismo que para el análisis en Z 23, ya que resultó ser estadísticamente significativa para todas las variables. Si bien los aislamientos con mayor agresividad mostraron valores altos en ambos ambientes, mientras que los menos agresivos presentaron valores bajos también en LH y F, el orden de los aislamientos según su agresividad fue diferente para cada uno de los ambientes, lo que pone de manifiesto la interacción.

Tanto para necrosis como para cobertura picnidial de HB, HB-1 y el promedio de ambas hojas, se pudo observar que todos los aislamientos mostraron valores más bajos en LH que en F. Para las dos variables, sólo el aislamiento 254 mostró valores similares en ambos ambientes. Los valores más altos de necrosis para LH fueron 19,12 (para HB), 58,33 (para HB-1) y 38,72 (para HB+HB-1) siempre frente al aislamiento 217; mientras que para F fueron 39,2 frente al 230 (para HB), 67,84 frente al 1 (para HB-1) y 54,07 frente al 24 (para HB+HB-1) (Fig. 3.7, 3.8 y 3.9). En cobertura picnidial el valor más alto registrado para LH fue 2,10 (para HB), 5,66 (para HB-1) y 3,88 (para HB+HB-1) siempre para el aislamiento 205; mientras que para F fueron 11,46 (para HB), 13,86 (para HB-1) y 12,66 (para HB+HB-1) siempre frente al 230 (Fig. 3.10, 3.11 y 3.12).

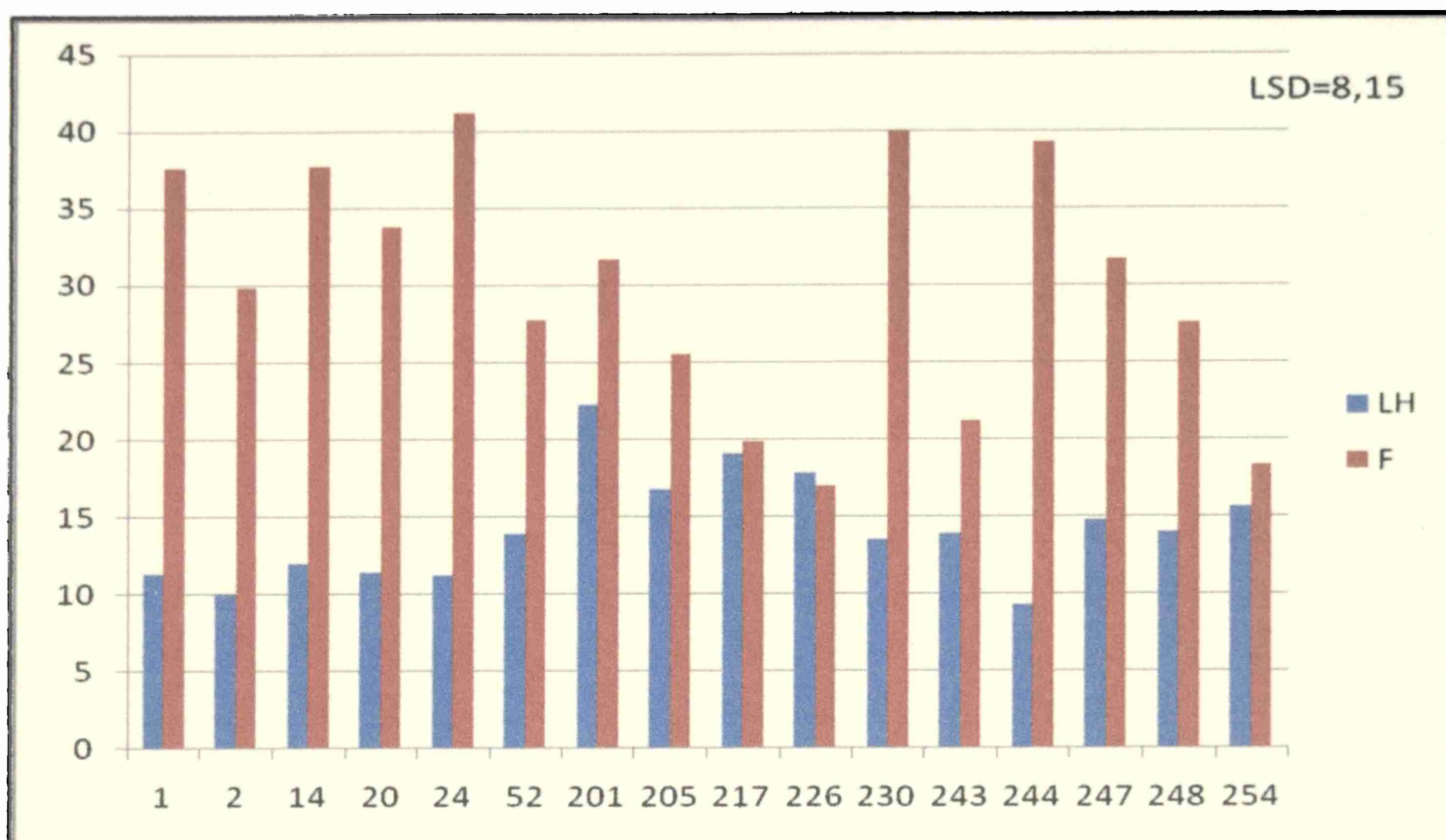


Fig. 3.7. Interacción ambiente x aislamiento para porcentaje de necrosis en hoja bandera (HB), causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

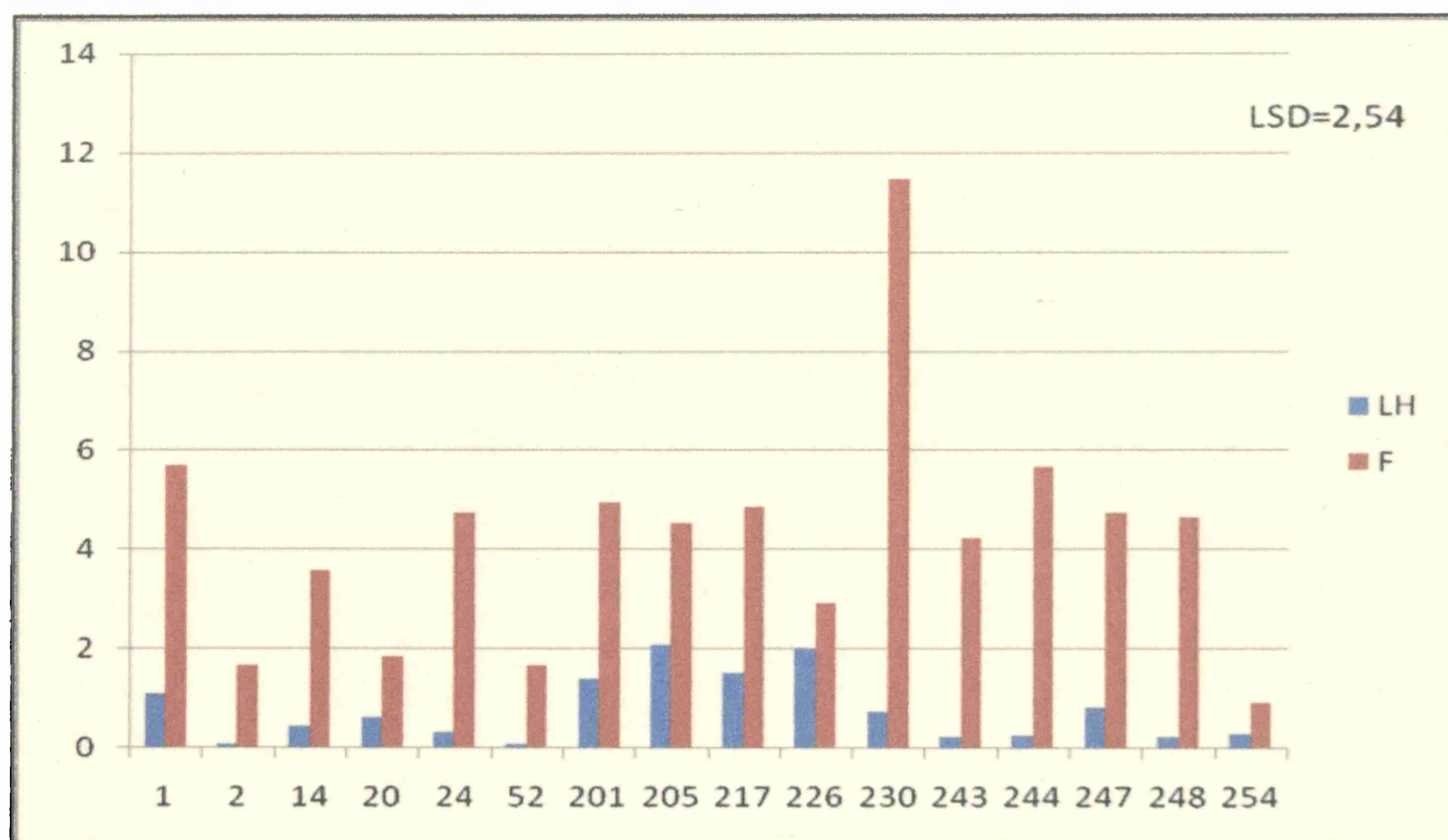


Fig. 3.8. Interacción ambiente x aislamiento para porcentaje de cobertura picnidial en hoja bandera (HB), causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F=Facultad).

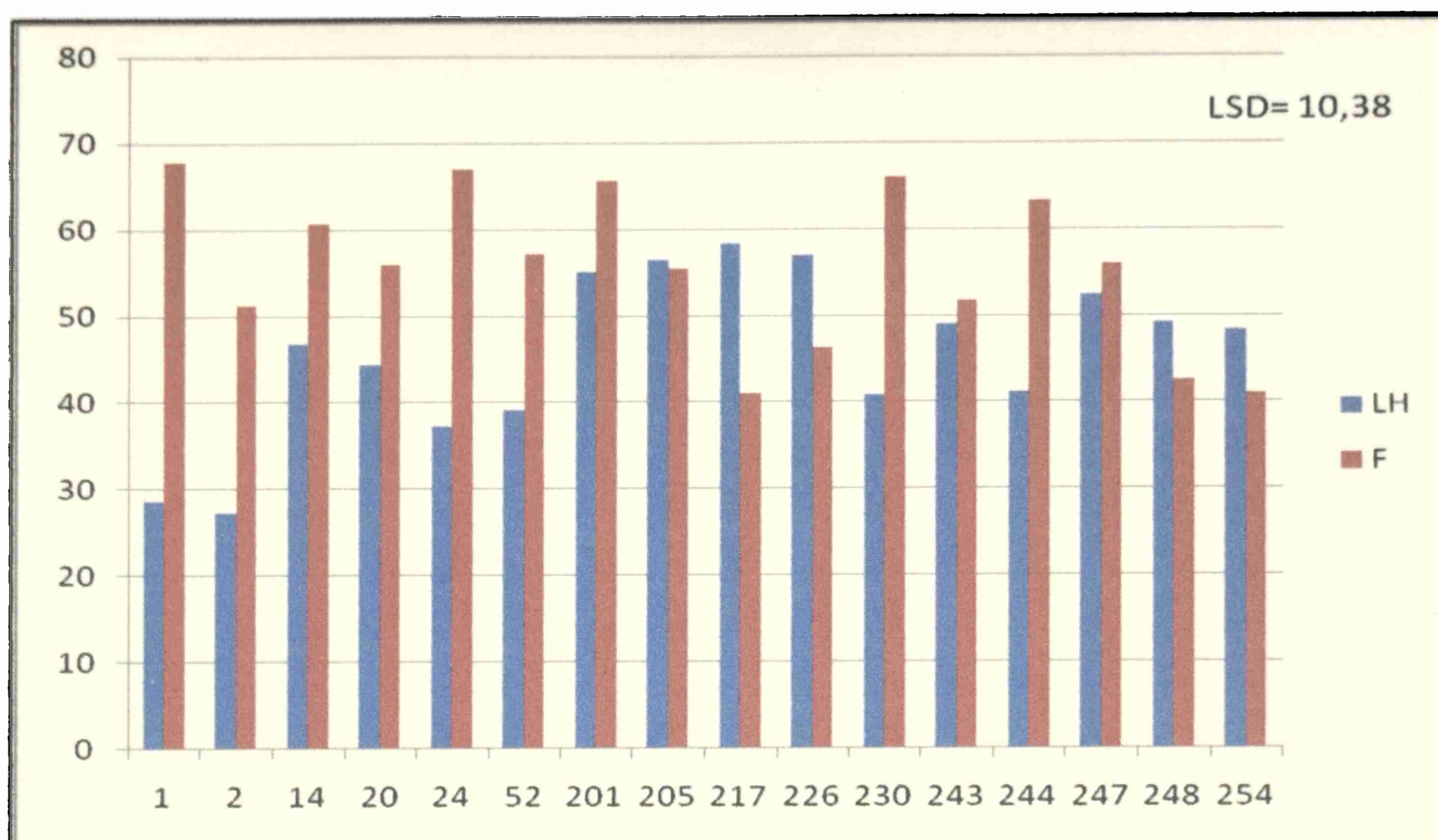


Fig. 3.9. Interacción ambiente x aislamiento para porcentaje de necrosis en hoja bandera-1 (HB-1), causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

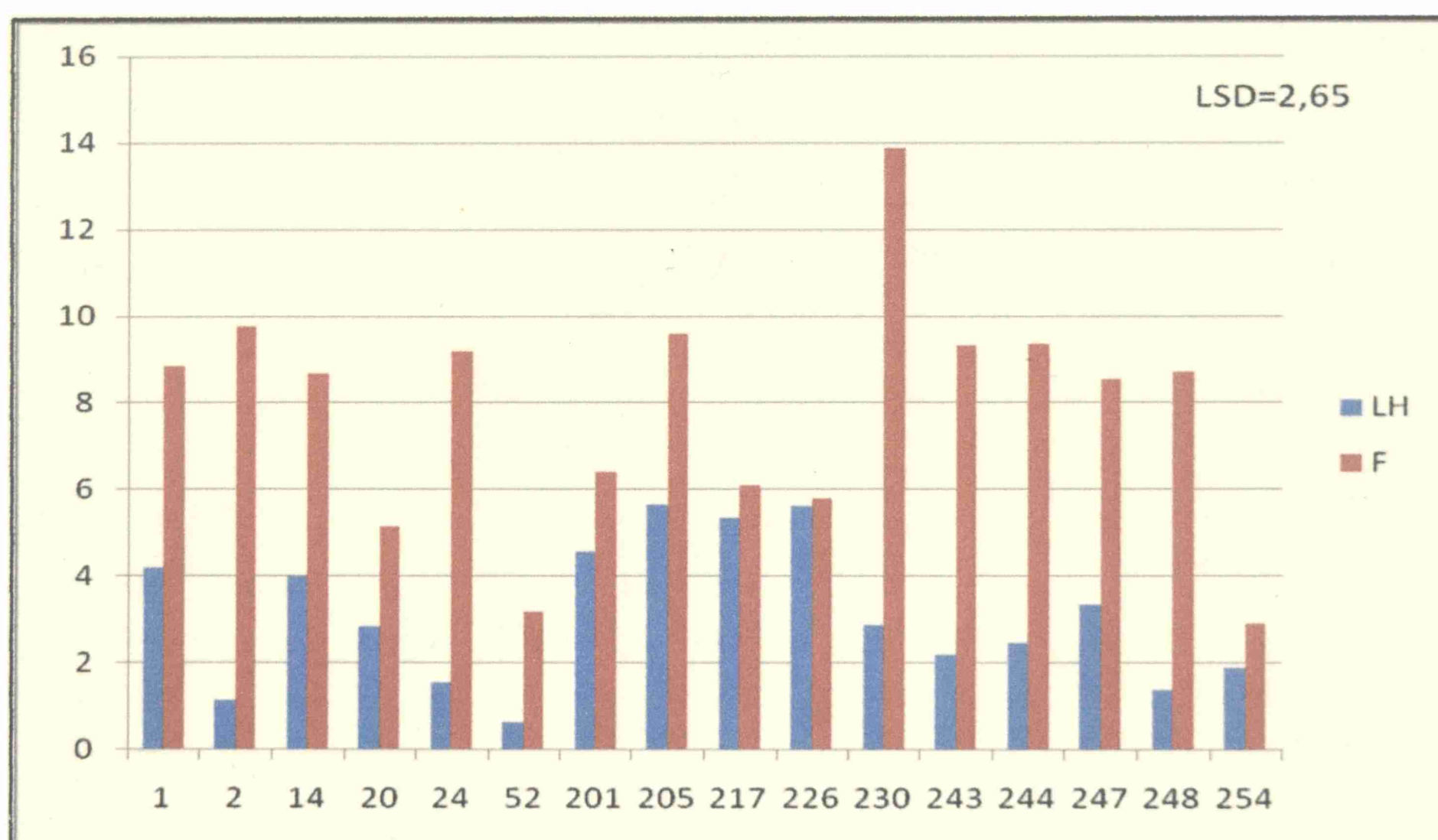


Fig. 3.10. Interacción ambiente x aislamiento para porcentaje de cobertura picnidial en hoja bandera-1 (HB-1), causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

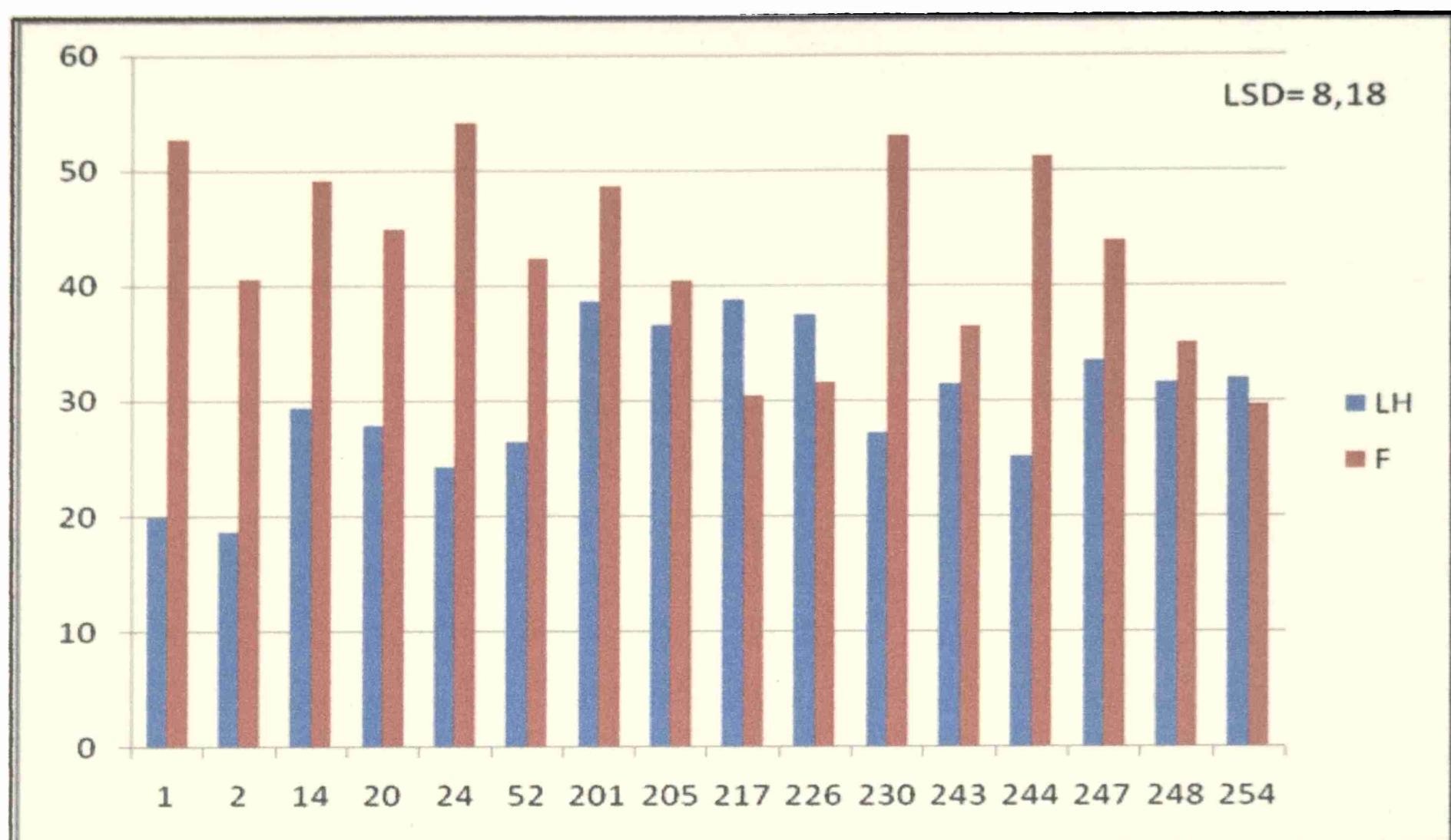


Fig. 3.11. Interacción ambiente x aislamiento para porcentaje de necrosis en HB+HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

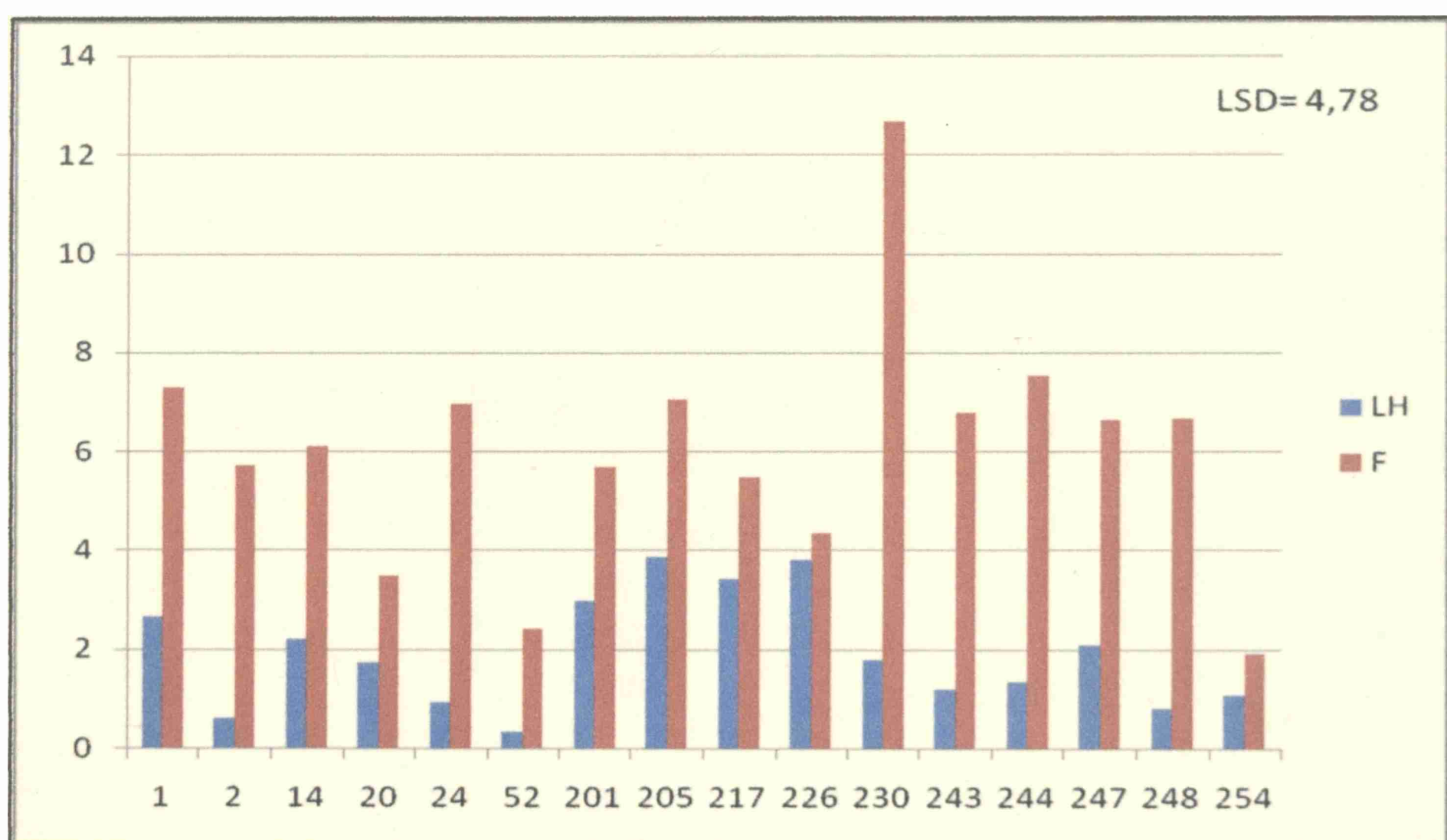


Fig. 3.12. Interacción significativa ambiente x aislamiento para porcentaje de cobertura picnidial en HB+HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

La interacción **ambiente x línea/cultivar** también fue estadísticamente significativa para necrosis y cobertura picnidial de ambas hojas superiores y para el promedio de las mismas. Si bien las líneas y cultivares de mejor comportamiento mostraron valores bajos en ambos ambientes, así como los materiales más susceptibles presentaron altos valores en LH y en F, el orden de los materiales según su resistencia fue diferente en ambos ambientes.

En general, tanto para HB como para el promedio de HB+HB-1, los valores más altos de las dos variables fueron encontrados en el ambiente F para la mayoría de los materiales (Fig. 3.13, 3.14, 3.17 y 3.18). Los valores de HB-1 fueron altos especialmente en el ambiente F debido al envejecimiento de la hoja, de manera que no permitieron discriminar adecuadamente por lo que no se presentaron (Fig. 3.15 y 3.16). Los datos de HB y del promedio de HB+HB-1 expresaron mejores resultados y por lo tanto permitieron una mejor discriminación entre materiales más resistentes y más susceptibles.

Considerando necrosis, varias líneas y cultivares mostraron valores promedio inferiores al 30 % en HB, o inferiores al 40 % para el promedio de ambas hojas, que pueden considerarse de resistencia o moderada resistencia en los dos ambientes, ya que el valor más alto fue de 74,74 para HB y 82,03 para el promedio de las dos hojas. Estos materiales más resistentes fueron Oasis, TE 9111 y Klein Volcán, que además mostraron valores bajos de cobertura picnidial. Además de los materiales mencionados, otras líneas (Flame, IAS 20 y Janetzki Probat) también presentaron bajos valores de cobertura picnidial. Los valores de esta variable fueron muy bajos en la HB en el ambiente LH. Estanzuela Federal y Capelle presentaron la mayor susceptibilidad para las dos variables evaluadas.

La interacción **ambiente x línea/cultivar** fue de tipo cualitativa y cuantitativa, ya que si bien el ambiente F presentó mayores niveles de necrosis para la mayoría de los materiales, cuando se consideró esta variable tanto de la HB como del promedio de ambas hojas superiores, algunos cultivares como Buck Ranquel, W 9784 S.H. y Flame presentaron mayor porcentaje de necrosis en LH que en F. Otros materiales como Janetzki Probat, Tonic, Capelle y Saratovskaja 19, resultaron ser mucho más resistentes que el resto en el ambiente LH para esta misma variable y considerando HB y HB+HB-1. Según los resultados de estas hojas, se observó que los cultivares nacionales presentaron mejor comportamiento que las líneas extranjeras, para las dos variables evaluadas.

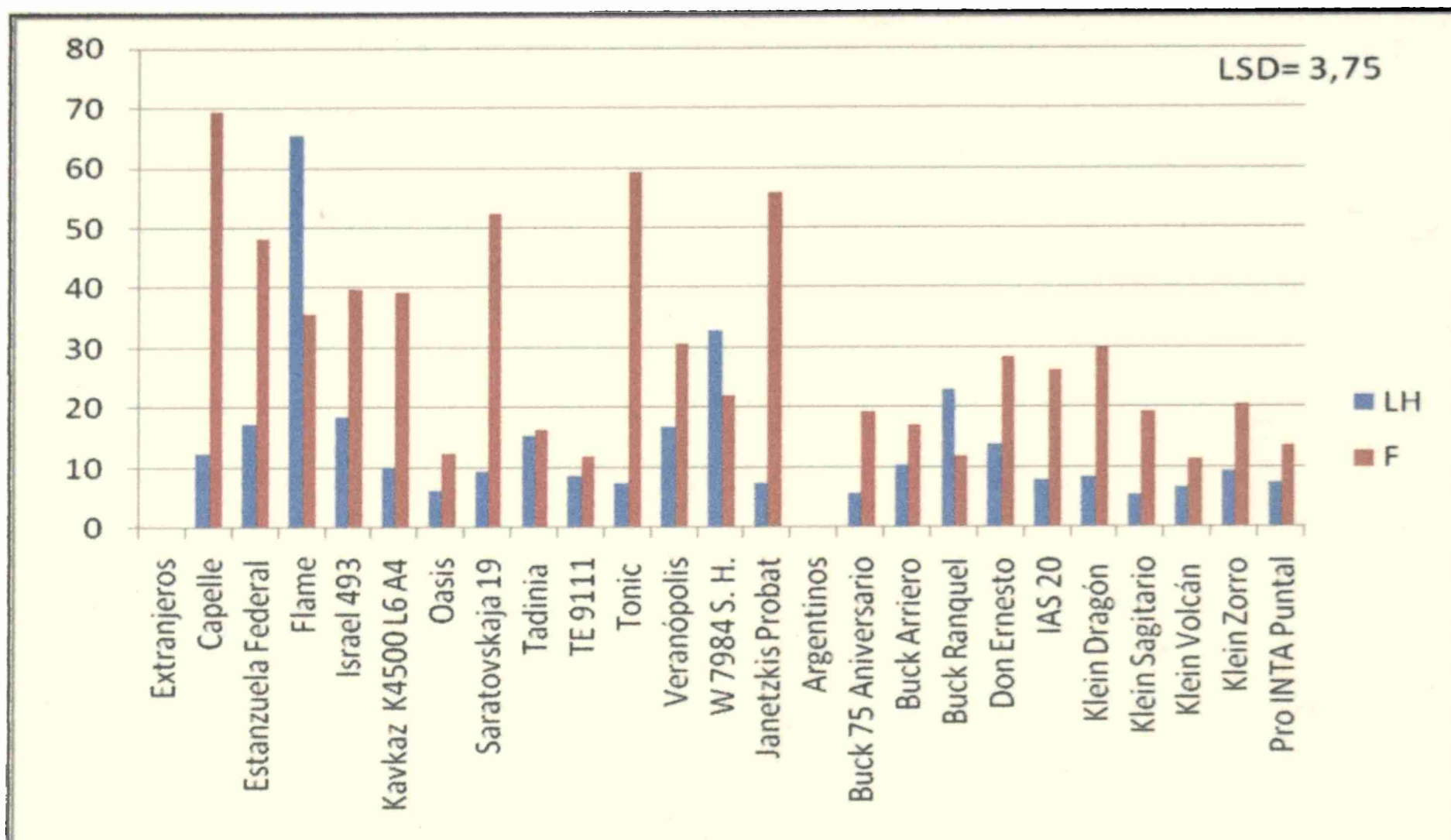


Fig. 3.13. Interacción ambiente x línea/cultivar para porcentaje de necrosis en HB, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

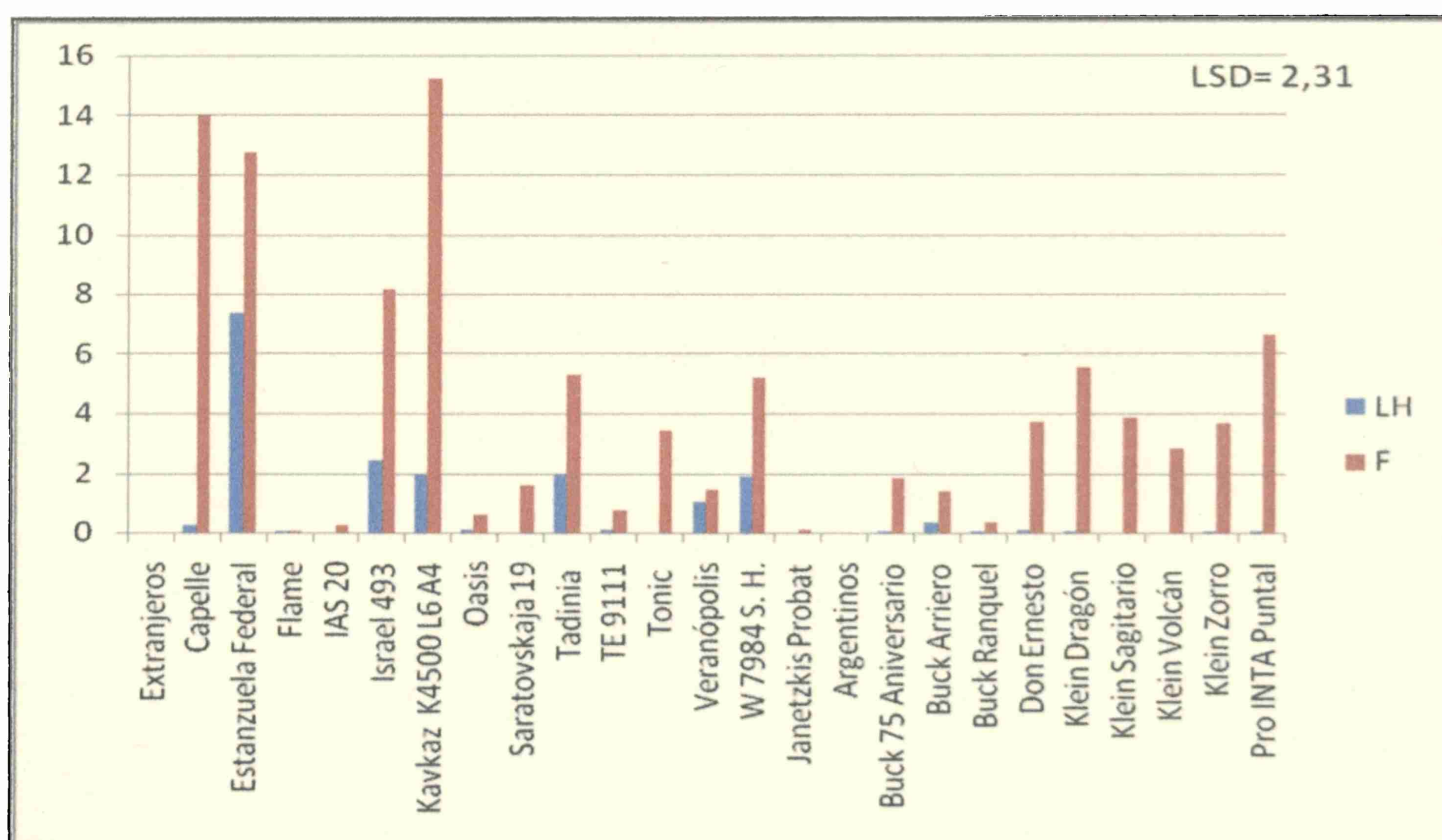


Fig. 3.14. Interacción ambiente x línea/cultivar para porcentaje de cobertura picnidial en HB, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

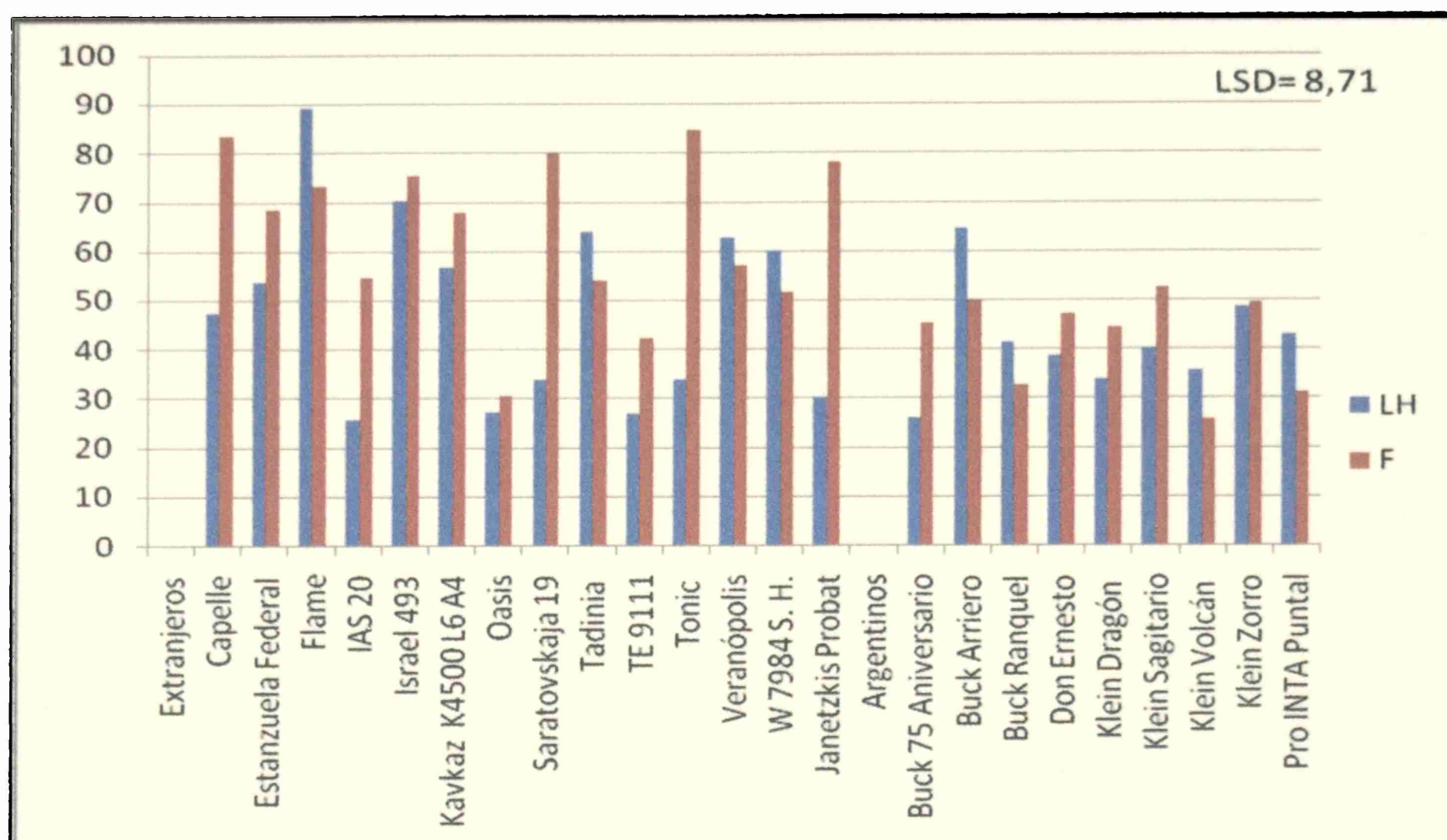


Fig. 3.15. Interacción ambiente x línea/cultivar para porcentaje de necrosis en HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

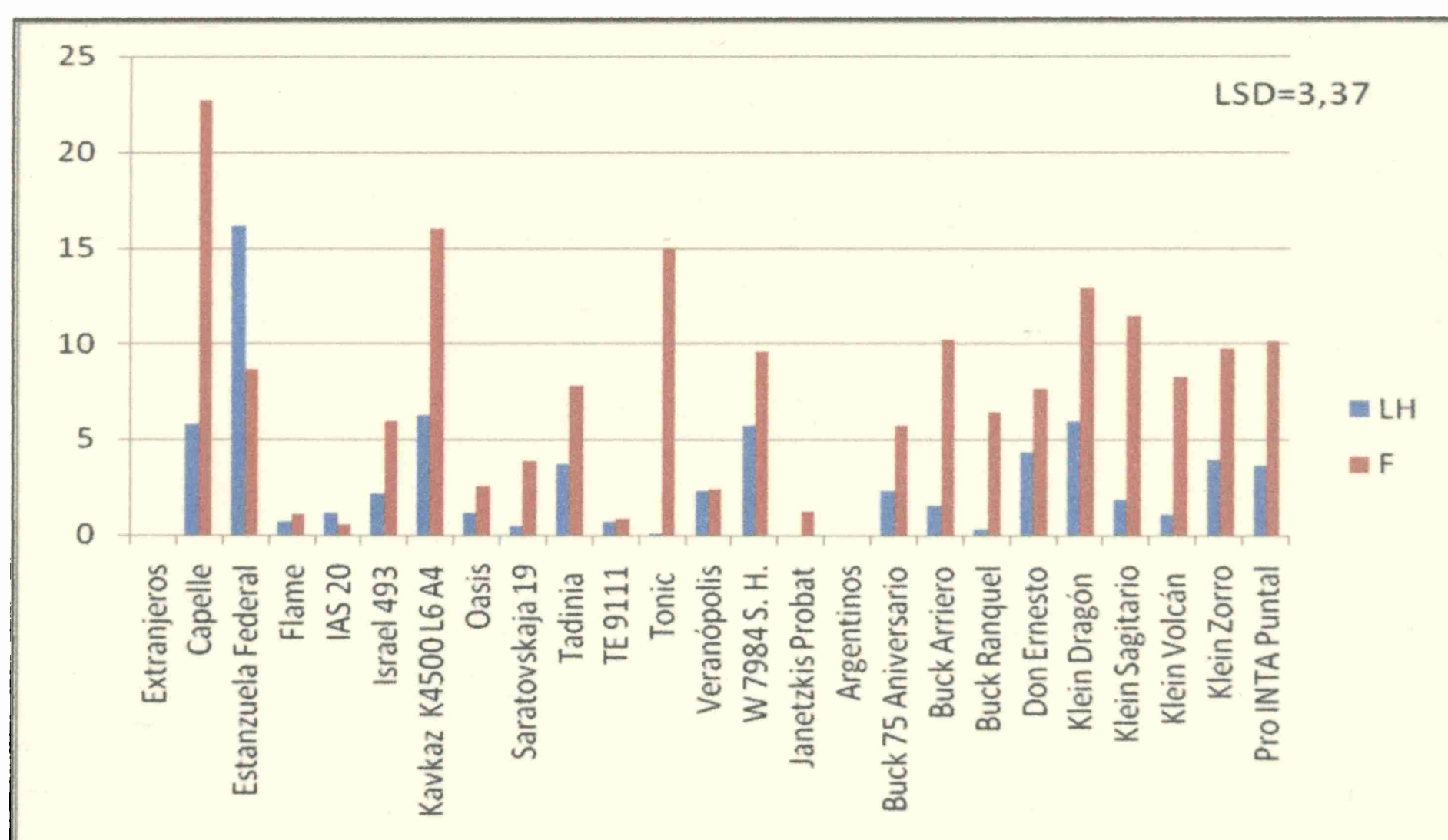


Fig. 3.16. Interacción ambiente x línea/cultivar para porcentaje de cobertura picnidial en HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

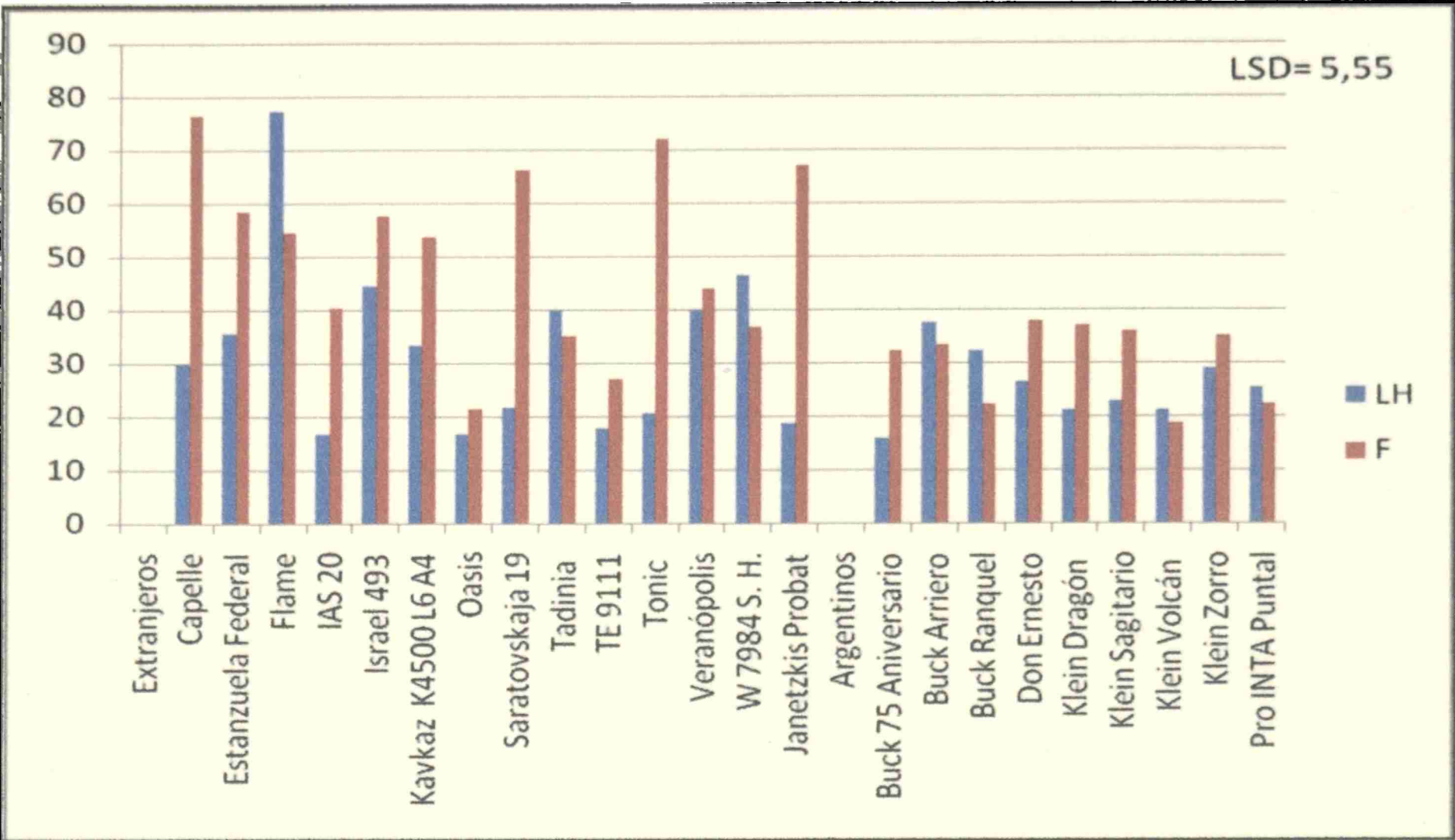


Fig. 3.17. Interacción significativa ambiente x línea/cultivar para porcentaje de necrosis en HB+HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

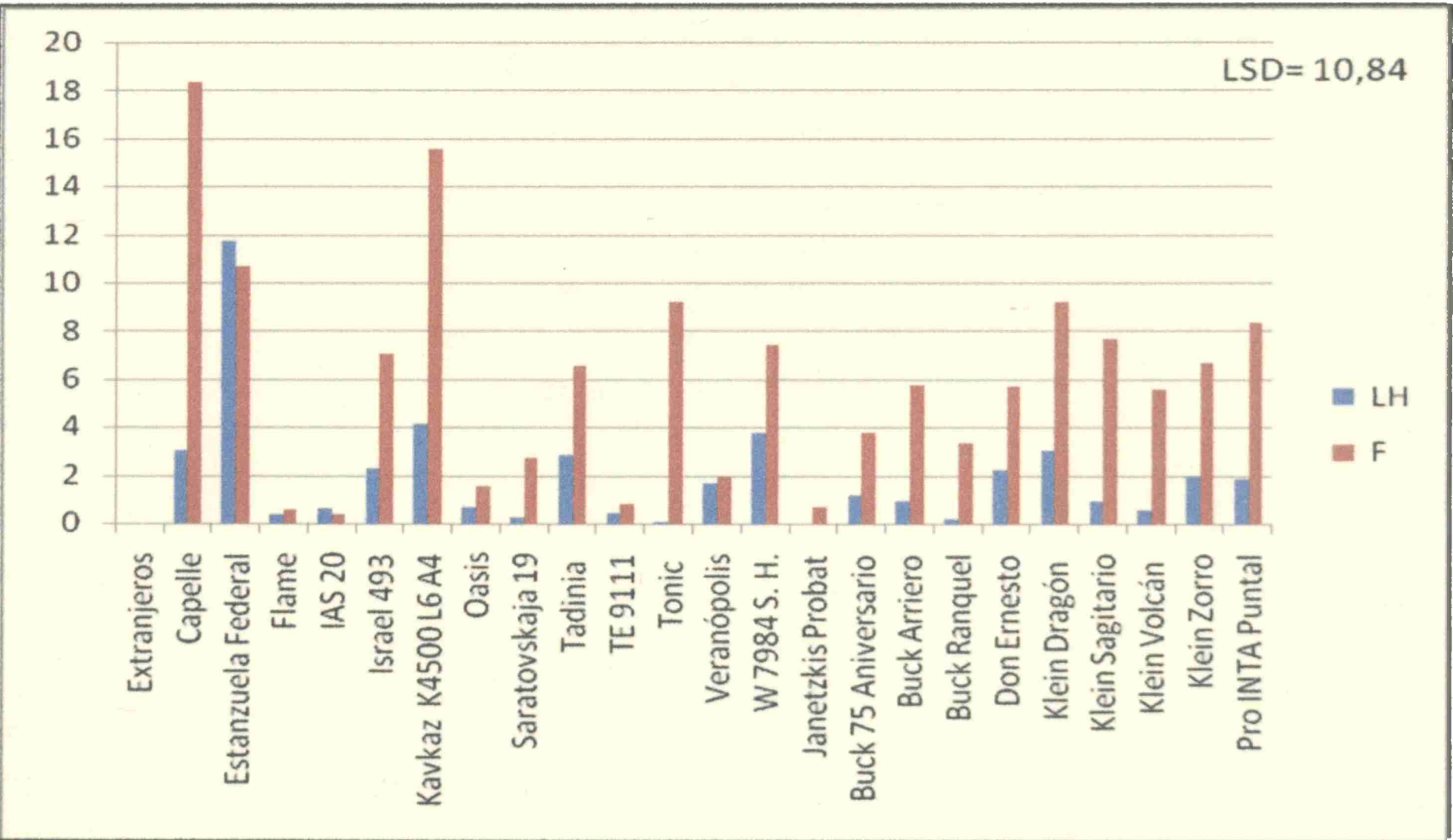


Fig. 3.18. Interacción significativa ambiente x línea/cultivar para porcentaje de cobertura picnidial en HB+HB-1, causada por 16 aislamientos de *M. graminicola* sobre 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82, en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

En cuanto a la interacción **doble aislamiento x línea/cultivar**, el análisis de ANVA demostró que esta interacción fue significativa para HB y HB+HB-1 y en las dos variables analizadas, ya que en algunas líneas y cultivares la resistencia fue evidente frente a algunos aislamientos pero no lo fue frente a otros. (Tablas 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16), indicando la presencia de resistencia específica al aislamiento.

Considerando la HB y el promedio de las dos hojas, las líneas de mejor comportamiento fueron Oasis, IAS 20 y TE 9111 y entre los cultivares argentinos Klein Volcán y Buck 75 Aniversario, ya que estos materiales se mostraron resistentes (valores menores al 25 % de necrosis y al 3 % de cobertura picnidial) a todos o casi todos los aislamientos evaluados para las dos variables, identificándose en ellos resistencia parcial.

La mayor susceptibilidad fue encontrada en Capelle y Don Ernesto.

En general, la mayoría de los cultivares nacionales mostraron buen comportamiento para las dos variables evaluadas y tanto para HB como para HB+HB-1 Don Ernesto se halló entre los más susceptibles, siendo resistente a seis aislamientos cuando se consideraron ambas variables.

Según los resultados obtenidos para los aislamientos, 52 presentarían factores de avirulencia para una buena parte de las líneas extranjeras o dichas líneas portan genes de resistencia para este aislamientos, ya que la mayoría de ellas mostraron resistencia cuando fueron inoculadas con él. Por el contrario el aislamiento 24 no contiene genes de avirulencia frente a los genes de resistencia de la mayoría de las líneas/cultivares evaluados.

La interacción triple **ambiente x aislamiento x línea/cultivar** para HB y para HB+HB-1, fue estadísticamente significativa para ambas variables, ya que en cada ambiente existió una diferente secuencia de ordenamiento de los materiales de acuerdo con su resistencia frente a los aislamientos (Tablas 3.17, 3.18, 3.19 y 3.20).

Entre los materiales más resistentes se encontraron TE 9111, IAS 20, Oasis, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario ya que evidenciaron valores de resistencia frente a la mayoría de los aislamientos en ambos ambientes y para ambas variables evaluadas de HB y HB+HB-1. Además, se observó que para cobertura picnidial, ningún cultivar nacional se presentó susceptible en ambos ambientes. La mayor parte de las líneas y cultivares mostraron valores más bajos en el ambiente LH para las dos variables evaluadas. Según los datos de necrosis y cobertura picnidial de HB y HB+HB-1, la resistencia específica se manifestó en Oasis, frente a los aislamientos 247 y 254 y en W

7984 S.H. frente al 248. Además, teniendo en cuenta solo los datos de cobertura picnidial de HB y del promedio de ambas hojas superiores, TE 9111 mostró valores de resistencia específica frente a los aislamientos 2, 205 y 230; Tonic frente al 254; Veranópolis al 52; W 7984 S.H. al 226; Janetzkis Probat al 2, 24, 243, 248 y 254; Buck 75 Aniversario al 254 y Klein Volcán frente al 24. Debemos destacar que entre los cultivares nacionales, Klein Volcán fue el que mostró el mejor comportamiento, manteniendo valores promedio bajos para las dos variables en las tres hojas evaluadas y para el promedio de las dos superiores.

Si bien los valores indicativos de resistencia completa no son suficientemente bajos, pueden ser considerados como tales si se tiene en cuenta que los valores promedio de necrosis fueron afectados por la senescencia de la HB-1 en algunos materiales.

Saratovskaja 19 y Janetzkis Probat mostraron valores promedio altos de necrosis frente a todos los aislamientos en ambos ambientes, demostrando su comportamiento como testigo susceptible pero evidenciaron valores bajos para cobertura picnidial.

Tabla 3.13. Medias de porcentaje de necrosis para HB en la interacción Aislamiento x Línea/Cultivar para 23 líneas y cultivos de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultivar/Aislam.	1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																
Capelle	40,54	41,53	34,08	38,57	47,88	35,75	35,45	25,00	17,56	32,27	53,21	38,70	57,67	57,00	56,54	41,92
Estanzuela Federal	14,13	27,73	51,49	7,99	37,25	31,68	57,41	32,29	61,29	29,53	56,14	19,50	42,57	39,28	9,46	6,26
Flame	61,84	57,95	43,52	28,88	52,50	72,50	60,15	30,51	58,41	60,30	47,54	60,42	23,21	50,52	47,15	53,75
IAS 20	16,56	22,15	6,34	45,98	46,78	8,57	23,74	15,10	7,06	0,88	11,73	10,42	14,27	17,30	10,17	15,51
Israel 493	40,81	14,11	35,77	26,00	54,17	54,43	33,58	22,34	24,61	34,06	29,50	21,25	20,21	21,17	7,88	26,39
Kavkaz	25,08	18,10	32,71	26,34	42,42	13,47	9,17	17,08	16,00	18,09	50,13	26,63	23,25	31,93	30,97	13,86
Oasis	9,58	11,27	30,48	18,63	5,01	6,21	3,23	6,50	11,02	5,27	6,94	5,72	8,11	2,00	16,75	2,38
Saratovskaja 19	36,67	49,47	32,24	34,05	8,32	9,83	22,20	36,45	21,37	9,15	51,36	25,41	55,18	35,81	24,13	41,30
Tadinia	16,72	5,92	14,00	17,89	25,70	5,50	39,51	16,04	15,31	17,37	13,47	5,17	22,63	9,36	16,56	10,37
TE 9111	17,38	2,44	7,31	6,41	12,50	6,89	16,92	33,41	7,04	5,38	7,70	5,89	9,66	7,50	12,61	5,36
Tonic	34,61	30,33	29,31	33,33	41,85	37,49	59,58	50,12	9,11	29,03	31,28	35,40	28,58	39,74	23,70	19,86
Veranópolis	21,08	22,65	55,72	32,92	10,14	41,50	42,23	19,29	12,80	17,63	24,11	10,21	22,42	19,41	17,22	10,46
W 7984 S. H.	30,36	4,48	14,48	20,32	74,75	32,42	55,98	19,25	45,83	14,80	15,21	16,25	20,90	40,63	1,00	32,00
Janetzki Probat	21,70	33,73	25,89	41,03	14,11	19,86	34,61	30,15	44,23	34,86	28,93	44,00	41,06	21,16	36,29	33,93
Argentinos																
Buck 75 Aniversario	29,07	8,56	7,10	19,02	12,68	5,00	12,74	16,23	9,50	5,08	15,80	3,54	40,49	3,32	5,83	4,38
Buck Arriero	33,41	8,31	56,17	8,66	6,25	3,42	7,92	9,88	7,50	12,70	20,31	5,09	8,78	5,71	18,77	6,92
Buck Ranquel	24,25	22,05	8,69	7,88	8,09	8,43	11,85	27,03	22,79	29,63	12,59	7,67	9,89	43,33	19,71	15,45
Don Ernesto	11,32	7,11	8,22	23,42	33,50	24,01	5,27	13,13	7,84	14,70	40,30	19,16	37,58	35,55	49,58	7,38
Klein Dragón	30,47	4,38	35,25	19,14	24,70	11,76	47,69	18,17	11,41	5,75	23,47	5,90	39,66	12,24	3,68	12,10
Klein Sagitario	5,96	13,24	10,69	8,11	16,06	3,81	18,93	21,68	14,38	5,90	27,05	4,22	6,10	15,73	21,35	4,50
Klein Volcán	4,11	8,19	8,05	16,45	7,55	23,38	5,74	11,43	6,43	3,81	7,94	7,33	6,18	8,64	12,32	7,12
Klein Zorro	20,01	40,36	12,89	12,08	6,84	13,36	8,53	9,36	11,25	8,28	24,73	10,19	8,13	7,23	31,59	14,96
Pro INTA Puntal	17,76	4,08	11,69	26,70	13,19	9,16	7,05	6,07	6,01	5,75	15,34	16,10	10,79	9,85	4,67	4,34
LSD= 19,85																

Tabla 3.14. Medias de porcentaje de cobertura picnidial para HB en la interacción Aislamiento x Línea/Cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultivar/Aislam.	1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																
Capelle	13,70	5,10	5,50	10,94	8,10	4,63	11,82	1,78	0,25	2,63	11,46	6,97	10,00	9,14	6,99	4,79
Estanzuela Federal	4,50	0,24	2,83	3,04	2,68	0,47	27,59	11,13	46,63	15,72	16,45	9,54	7,48	8,11	3,00	1,26
Flame	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
IAS 20	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00	0,00	0,25	0,00	0,47	0,00	0,00
Israel 493	3,66	0,79	6,25	0,40	1,38	0,88	11,31	10,20	2,63	16,56	17,50	6,25	2,04	1,96	2,38	0,33
Kavkaz	13,53	4,44	3,18	2,89	10,53	3,81	4,75	3,71	7,01	8,61	14,75	7,36	12,48	15,21	21,45	3,57
Oasis	0,70	0,08	0,18	0,00	0,35	0,00	0,50	1,25	0,88	0,83	0,29	0,25	0,00	0,00	0,13	0,00
Saratovskaja 19	0,06	0,00	0,00	0,21	0,00	0,16	0,00	3,75	0,17	0,00	5,83	0,10	1,67	0,00	0,00	0,50
Tadinia	5,72	0,08	5,28	5,26	10,94	0,19	0,19	2,49	7,04	5,37	7,64	0,71	3,79	0,64	0,75	1,52
TE 9111	0,38	0,00	0,03	0,25	2,10	0,10	0,63	0,00	0,08	0,50	0,00	0,19	0,25	1,79	0,00	0,00
Tonic	3,57	0,00	0,00	0,00	0,63	1,25	1,33	12,92	0,00	0,00	0,00	0,00	1,42	5,94	0,17	0,00
Veranópolis	1,25	0,00	0,75	0,00	0,19	0,00	0,31	4,33	3,33	0,45	0,71	0,00	0,08	0,09	7,66	0,50
W 7984 S. H	10,48	1,50	10,75	1,86	7,92	1,25	2,50	4,00	0,00	0,00	2,25	1,50	3,68	8,75	0,00	0,00
Janetzki Probat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Argentinos																
Buck 75 Aniversario	1,60	1,88	0,35	0,25	4,45	0,64	0,05	1,25	0,69	0,05	2,56	0,67	0,00	0,00	0,40	0,00
Buck Arriero	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,08	0,63	0,40	0,13	1,75	8,45	0,58	0,59	0,00	0,49	0,10
Buck Ranquel	1,00	1,04	0,00	0,00	0,18	0,04	0,00	0,06	0,29	0,16	0,06	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
Don Ernesto	2,55	0,44	6,61	0,13	0,50	0,15	0,73	2,79	0,10	0,88	3,25	2,16	4,60	2,69	2,15	0,67
Klein Dragón	5,42	0,95	1,13	1,85	0,58	5,00	1,34	4,25	0,25	0,44	8,96	0,71	9,34	3,25	0,38	0,50
Klein Sagitario	2,06	1,31	0,50	0,00	0,25	0,00	1,68	8,75	1,03	0,25	10,38	0,13	0,79	1,68	2,05	0,13
Klein Volcán	0,75	0,05	0,40	0,06	0,00	0,00	0,44	0,13	1,38	0,13	5,25	8,88	0,20	0,00	4,69	0,17
Klein Zorro	4,94	2,21	0,46	1,00	1,99	1,40	0,00	2,14	0,31	0,82	4,33	0,50	4,94	1,69	2,56	0,13
Pro INTA Puntal	2,56	0,13	2,16	0,50	5,15	0,33	6,95	0,96	0,17	1,25	20,13	4,76	5,26	2,10	1,00	0,06
LSD= 6,53																

Tabla 3.15. Medias de porcentaje de necrosis para HB+HB-1 en la interacción Aislamiento x Línea/Cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultivar/Aislam.	1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																
Capelle	49,52	50,41	46,75	48,78	57,66	50,38	46,64	50,63	35,34	46,61	57,15	55,65	66,87	62,88	67,36	57,62
Estanzuela Federal	26,84	41,95	62,76	18,05	53,71	36,98	70,13	53,02	76,11	57,11	63,70	35,29	57,29	52,95	26,71	17,23
Flame	77,13	75,42	55,06	49,38	70,27	82,03	71,36	46,38	74,89	75,90	63,14	72,13	36,10	66,51	63,22	74,79
IAS 20	28,67	28,97	19,14	50,91	50,42	23,09	40,29	26,10	21,00	12,49	27,56	21,20	27,20	25,10	24,48	29,55
Israel 493	55,33	42,70	60,60	37,25	67,08	70,81	55,92	47,11	45,79	59,06	62,83	51,88	46,56	45,22	21,65	45,76
Kavkaz K4500 L6 A4	49,88	27,96	49,35	38,30	40,85	45,48	29,21	37,71	38,28	44,42	60,70	50,25	45,93	52,31	46,73	37,88
Oasis	16,21	17,26	48,84	22,50	14,51	15,29	8,84	17,31	24,13	20,04	16,91	15,02	22,49	7,25	33,28	4,72
Saratovskaja 19	46,00	52,05	40,29	44,76	31,97	21,96	38,47	46,58	43,01	23,26	56,51	46,16	63,57	50,73	40,50	54,63
Tadinia	37,89	22,67	33,39	37,67	49,21	27,91	64,60	35,87	31,13	40,93	24,67	27,56	53,06	44,32	36,74	29,90
TE 9111	22,07	10,04	23,75	21,80	28,16	16,78	37,44	53,67	20,93	11,71	24,00	12,43	19,89	16,69	27,13	11,11
Tonic	42,75	42,23	51,43	40,46	51,55	47,97	71,20	65,82	27,89	40,26	48,67	47,15	45,84	48,98	33,38	34,09
Veranópolis	31,10	27,29	70,72	55,72	35,40	59,75	67,05	36,29	23,74	41,02	41,67	31,77	37,15	34,64	34,39	40,25
W 7984 S. H.	37,75	18,20	35,27	47,17	81,60	37,38	68,62	38,06	53,75	38,15	24,17	38,79	35,94	56,98	4,67	48,50
Janetzki Probat	30,65	41,89	34,98	44,80	25,50	33,00	49,54	32,77	56,47	49,76	43,93	52,72	49,67	44,97	51,95	42,72
Argentinos																
Buck 75 Aniversario	35,70	12,23	12,34	35,55	21,39	13,58	27,72	33,62	27,04	21,54	24,32	22,98	49,63	7,63	16,77	21,73
Buck Arriero	55,04	32,63	68,49	25,96	29,93	14,92	32,13	44,61	36,02	42,58	50,47	32,74	14,35	34,22	36,64	15,46
Buck Marquel	38,70	33,07	15,13	17,66	12,99	13,48	33,53	42,16	32,63	29,75	29,27	10,08	15,19	60,42	29,15	20,87
Don Ernesto	22,29	9,40	10,72	39,48	44,92	36,73	23,46	34,16	18,74	34,22	50,28	31,67	50,35	37,91	49,53	18,07
Klein Dragón	36,22	8,34	45,11	31,25	29,60	31,76	58,90	37,42	19,02	16,33	33,16	15,71	46,88	24,79	13,62	16,46
Klein Sagitario	22,55	22,23	34,67	26,10	40,69	18,50	45,67	36,59	24,01	22,54	42,71	24,96	23,69	35,41	33,42	14,70
Klein Volcán	9,51	10,27	22,89	29,03	23,19	37,58	10,00	24,21	24,72	14,73	13,31	21,99	16,39	20,53	16,42	22,58
Klein Zorro	34,97	43,85	34,55	32,29	16,71	31,93	25,08	25,93	26,88	35,81	33,11	36,09	31,34	23,23	47,20	32,31
Pro INTA Puntal	29,71	9,07	27,45	41,36	23,34	25,42	27,81	20,59	14,02	16,13	29,21	26,52	23,04	36,24	11,92	18,18
LSD= 3,22																

Tabla 3.16. Medias de porcentaje de cobertura picnicial para HB+HB-1 en la interacción Aislamiento x Línea/Cultivar para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola*.

Línea-Cultiv/Aislam.	1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																
Capelle	8,16	7,67	9,56	16,39	15,34	6,96	13,00	6,59	5,44	7,50	16,16	13,68	13,60	11,92	11,90	6,91
Estanzuela Federal	7,06	0,46	5,90	7,01	3,81	0,58	23,97	13,56	40,79	20,98	17,14	10,12	8,02	13,35	4,04	2,65
Flame	0,96	0,15	0,48	0,23	0,52	0,08	0,11	0,06	0,12	0,38	0,73	0,06	1,75	1,65	0,06	0,29
IAS 20	0,05	0,13	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	3,64	0,04	2,58	0,04	0,43	0,00	0,00
Israel 493	4,64	1,66	8,96	0,33	0,77	1,38	9,31	7,05	2,93	13,66	9,50	5,31	1,44	3,54	3,69	0,42
Kavkaz	11,81	11,11	6,72	4,38	9,49	3,41	7,21	5,71	8,07	10,47	13,49	8,94	13,36	19,04	20,24	4,19
Oasis	0,69	0,58	1,79	1,25	0,59	0,00	0,45	3,50	3,43	4,61	0,55	0,13	0,05	0,00	0,19	0,00
Saratovskaja 19	0,76	0,23	1,57	1,48	0,13	0,98	0,95	2,73	2,86	0,28	4,37	2,44	2,75	0,00	0,35	1,53
Tadinia	3,95	7,13	9,11	5,36	8,61	1,47	0,28	3,34	8,77	7,31	8,47	2,47	3,53	0,90	2,08	2,14
TE 9111	1,28	0,00	0,04	0,50	2,10	1,28	0,38	0,00	0,04	0,31	0,00	0,16	0,15	2,99	0,08	0,28
Tonic	4,66	0,95	4,40	1,32	3,72	3,96	6,92	18,94	0,00	4,13	4,01	0,18	7,27	6,16	7,17	0,00
Veranópolis	3,20	0,63	0,38	0,63	0,16	0,00	0,31	5,19	5,04	1,58	0,98	0,08	0,04	1,02	9,06	0,25
W 7984 S.H.	13,43	2,69	10,89	3,30	11,43	0,67	3,40	5,00	1,67	0,00	4,17	6,88	12,76	10,00	0,92	2,25
Janetzki's Probat	0,47	0,00	0,36	0,71	0,00	0,42	2,08	0,05	0,09	0,35	0,63	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
Argentinos																
Buck 75 Aniversario	3,70	5,67	2,06	0,65	10,11	0,79	0,99	2,96	3,06	0,69	4,27	1,13	0,14	0,58	2,09	0,63
Buck Arriero	7,06	1,02	2,00	1,06	1,65	0,33	2,66	3,15	2,55	3,78	13,41	3,78	5,28	1,63	3,06	1,26
Buck Ranquel	5,00	8,10	1,16	0,72	0,09	0,73	1,25	0,78	2,71	0,19	2,53	0,00	0,27	0,40	4,45	0,06
Don Ernesto	4,63	0,40	6,85	3,53	2,29	0,63	3,54	8,15	0,82	4,36	5,39	8,01	5,53	5,02	2,14	1,93
Klein Dragón	8,59	13,64	6,55	2,55	6,84	3,50	4,66	11,10	3,19	3,16	13,73	3,03	8,82	6,03	1,41	0,85
Klein Sagitario	5,42	5,70	6,29	1,38	4,68	0,80	1,93	17,42	2,94	2,43	8,58	1,17	1,51	4,90	2,92	0,41
Klein Volcán	2,02	0,13	1,10	2,30	0,00	0,16	4,06	0,34	4,53	1,09	11,75	9,09	4,21	0,20	4,25	3,63
Klein Zorro	11,88	4,24	5,23	3,80	2,45	3,69	1,58	7,41	2,44	1,73	5,91	1,73	5,12	2,67	5,19	4,05
ProINTa Puntal	4,91	0,62	4,62	1,41	6,09	0,29	10,76	2,79	0,31	1,45	20,67	11,12	6,56	8,07	0,94	1,01
LSD= 2,33																

Tabla 3.17. Medias de porcentaje de necrosis para HB en la interacción Ambiente x Aislamiento x Línea/Cultivar, para 23 líneas y cultivos de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola* (LH= Los Hornos y F= Facultad).

Línea-Cultivar/Aislam.		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle	LH	7,75	8,05	8,66	14,64	9,25	9,00	10,90	16,25	17,56	11,83	15,58	12,81	15,33	14,00	18,07	9,25
	F	73,33	75,00	59,50	62,50	86,50	62,50	60,00	33,75	17,56	52,71	90,83	64,58	100,00	100,00	95,00	74,58
Estanzuela Federal	LH	16,00	10,45	11,98	15,47	14,50	5,86	41,07	33,33	22,58	21,56	17,28	9,00	15,14	26,06	7,08	8,85
	F	12,25	45,00	91,00	0,50	60,00	57,50	73,75	31,25	100,00	37,50	95,00	30,00	70,00	52,50	11,83	3,66
Flame	LH	65,28	84,00	62,00	43,18	42,50	100,00	84,28	48,89	40,25	96,67	78,57	90,00	12,41	72,50	47,14	80,00
	F	58,39	31,90	25,04	14,57	62,50	45,00	36,02	12,12	76,56	23,94	16,50	30,83	34,00	28,54	47,14	27,50
IAS 20	LH	6,84	11,75	7,87	88,75	2,30	6,15	11,23	8,50	5,75	0,00	8,12	17,08	7,87	7,06	9,83	11,94
	F	26,27	32,54	4,80	8,21	91,25	11,00	36,25	21,70	8,37	1,75	15,33	3,75	20,66	27,53	10,50	19,08
Israel 493	LH	12,62	12,72	35,71	12,00	8,33	9,69	15,62	22,33	43,25	33,75	12,33	20,00	11,67	23,54	4,91	18,40
	F	69,00	15,50	35,83	40,00	100,00	99,16	51,53	22,33	5,96	34,37	46,67	22,50	28,75	18,79	10,83	34,37
Kavkaz	LH	20,66	4,69	9,42	3,94	3,83	4,44	2,84	6,04	12,84	18,21	19,31	29,50	9,00	8,44	5,43	4,97
	F	29,50	31,50	56,00	48,75	81,00	22,50	15,50	28,12	19,16	17,96	80,94	23,75	37,50	55,41	56,50	22,75
Oasis	LH	3,90	2,37	9,28	2,00	2,41	3,25	2,50	6,50	8,78	5,87	8,12	4,57	4,54	2,00	30,00	3,50
	F	15,25	20,16	51,66	35,25	7,60	9,16	3,95	6,50	13,25	4,66	5,75	6,86	11,67	2,00	3,50	1,25
Saratovskaja 19	LH	3,33	3,94	2,16	6,44	6,64	5,12	12,70	9,91	14,41	12,29	13,55	7,12	17,85	12,68	16,25	5,77
	F	70,00	95,00	62,32	61,66	10,00	14,53	31,69	63,00	28,33	6,00	89,16	43,70	92,50	58,93	32,00	76,83
Tadinia	LH	4,06	4,33	5,80	14,66	10,77	7,00	47,14	23,93	19,37	27,73	6,94	4,50	14,00	6,44	29,37	18,01
	F	29,37	7,50	22,20	21,12	40,62	4,00	31,87	8,15	11,25	7,00	20,00	5,83	31,25	12,29	3,75	2,73
TE 9111	LH	32,50	4,38	4,61	6,12	5,65	3,08	4,67	9,31	9,41	7,50	7,40	7,83	6,90	9,00	14,10	7,33
	F	2,25	0,50	10,00	6,70	19,33	10,70	29,16	57,50	4,66	3,25	8,00	3,95	12,41	6,00	11,12	3,37
Tonic	LH	2,97	3,84	4,56	5,55	5,50	8,30	22,50	12,74	9,11	6,30	7,56	9,12	4,82	6,41	6,55	3,71
	F	66,25	56,80	54,05	61,11	78,19	66,66	96,66	87,50	9,11	51,75	55,00	61,66	52,33	73,05	40,83	36,00
Veranópolis	LH	11,12	5,30	11,43	14,17	6,27	22,50	65,71	24,83	20,73	13,75	15,31	11,00	4,00	20,06	5,69	16,25
	F	31,04	40,00	100,00	51,66	14,00	60,50	18,75	13,75	4,87	21,50	32,91	9,41	40,83	18,75	28,75	4,66
W 7984 S. H.	LH	8,00	2,96	5,20	17,57	62,50	45,00	100,00	30,75	86,66	23,94	1,25	16,25	20,90	40,62	1,00	63,00

Janetzkis Probat	F	52,71	6,00	23,75	23,06	87,00	19,83	11,96	7,75	5,00	5,67	29,16	16,25	20,90	40,62	1,00	1,00
	LH	8,40	4,85	6,30	7,05	7,50	10,12	6,05	4,22	6,96	8,05	5,98	7,11	7,02	14,44	10,28	5,20
	F	35,00	62,60	45,48	75,00	20,71	29,58	63,16	56,07	81,50	61,66	51,87	80,89	75,09	27,87	62,29	62,66
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario	LH	5,64	3,62	9,75	27,08	4,36	5,15	5,47	8,09	6,37	7,41	5,19	3,38	3,47	3,01	3,66	4,85
	F	52,50	13,50	4,45	3,21	21,00	4,84	20,00	24,37	12,62	2,75	26,41	3,70	77,50	3,62	8,00	3,91
Buck Arriero	LH	12,45	5,27	12,34	11,94	9,75	5,00	12,34	16,55	13,20	12,91	22,00	5,52	3,80	7,07	7,83	9,39
	F	54,37	11,35	100,00	5,37	2,75	1,83	3,50	3,20	1,80	12,50	18,62	4,66	13,75	4,35	29,7	4,43
Buck Ranquel	LH	11,50	15,09	12,37	13,87	11,43	16,44	15,37	52,25	35,00	54,37	22,19	11,33	16,82	20,66	29,86	30,27
	F	37,00	29,00	5,00	13,66	4,75	0,41	8,33	1,80	10,58	4,87	3,00	4,00	2,96	66,00	9,55	0,62
Don Ernesto	LH	6,94	10,95	14,07	38,62	16,16	16,12	9,19	10,64	9,51	14,64	14,10	18,12	7,16	15,35	46,32	5,66
	F	15,70	3,27	2,37	9,25	50,83	31,90	1,35	15,62	6,16	14,75	66,50	20,20	68,00	55,75	52,83	9,08
Klein Dragón	LH	3,86	5,25	5,87	12,58	7,14	7,28	5,37	14,96	14,07	6,00	6,44	3,66	9,31	5,31	6,11	19,94
	F	57,08	3,50	64,62	25,70	42,25	16,25	90,00	21,37	8,75	5,50	40,50	8,12	70,00	19,16	1,25	4,25
Klein Sagitario	LH	4,91	5,22	8,06	4,97	4,61	4,81	3,69	3,16	7,45	7,05	7,98	4,45	4,40	5,46	4,69	6,00
	F	7,00	21,25	13,32	11,25	27,50	2,80	34,16	40,20	21,30	4,75	46,42	4,00	7,79	26,00	38,00	3,00
Klein Volcán	LH	3,70	8,89	9,60	3,43	5,14	5,81	9,35	3,97	7,61	6,12	5,12	12,27	5,36	6,27	6,05	7,64
	F	4,52	7,50	6,50	29,46	9,96	40,95	2,12	18,87	5,25	1,50	10,75	2,37	7,00	11,00	18,58	6,58
Klein Zorro	LH	3,89	5,31	10,16	10,50	5,08	12,60	14,06	11,94	18,25	7,56	6,83	10,47	5,43	5,95	6,94	12,16
	F	36,12	75,41	15,62	10,95	8,60	14,12	3,00	6,77	4,25	9,00	42,62	9,90	10,83	8,50	56,25	17,75
Pro INTA Puntal	LH	4,40	6,16	8,71	16,89	6,28	7,26	9,00	6,94	10,61	7,12	3,93	5,20	5,77	8,33	5,34	7,25
	F	31,12	2,00	14,66	36,50	20,10	11,05	5,10	5,20	1,41	4,37	26,75	27,00	15,80	11,37	4,00	1,42
LSD = 26,80																	

Tabla 3.18. Medias de porcentaje de cobertura picnidial para HB en la interacción Ambiente x Aislamiento x Línea/Cultivar, para 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos de *M. graminicola* en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

Línea-Cultivar/Aislam.		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Capelle	LH	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,19	0,25	0,66	0,00	0,19	0,00	0,40	0,85	0,00
	F	27,08	10,20	11,00	21,87	16,20	9,25	22,71	3,37	0,25	4,58	22,92	13,75	20,00	17,87	13,12	9,58
Estanzuela Federal	LH	9,00	0,35	5,65	6,07	5,36	0,31	23,93	16,67	13,25	13,44	9,57	1,83	1,20	6,21	2,25	2,35
	F	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,62	31,25	5,58	80,00	18,00	23,33	17,25	13,75	10,00	3,75	0,16
Flame	LH	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
IAS 20	LH	0,00	3,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	0,00	0,00	0,50	0,00	0,83	0,00	0,00
Israel 493	LH	0,00	0,46	0,00	0,80	0,00	1,75	5,62	10,20	5,00	15,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	7,32	1,12	12,50	0,00	2,75	0,00	17,00	10,20	0,25	18,12	35,00	12,50	4,08	3,91	4,75	0,66
Kavkaz	LH	5,90	0,12	1,70	0,29	0,66	0,12	1,50	0,16	4,55	7,14	1,48	0,71	1,21	1,66	1,65	1,88
	F	21,16	0,62	4,66	5,50	20,40	7,50	8,00	7,25	9,46	10,08	28,02	14,00	23,75	28,75	41,25	5,25
Oasis	LH	0,40	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	1,00	0,16	0,00	0,00	0,70	0,00	1,00	1,25	1,75	1,66	0,58	0,50	0,00	0,00	0,25	0,00
Saratovskaja 19	LH	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	0,32	0,00	7,50	0,33	0,00	11,66	0,20	3,33	0,00	0,00	1,00
Tadinia	LH	0,19	8,25	1,20	7,02	0,62	0,00	0,00	4,07	5,00	8,33	0,28	0,75	0,20	0,45	0,00	2,44
	F	11,25	0,16	9,35	3,50	21,25	0,37	0,37	0,90	9,07	2,40	15,00	0,66	7,37	0,83	1,50	0,60
TE 9111	LH	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00
	F	0,75	0,00	0,00	0,50	4,20	0,20	1,25	0,00	0,16	1,00	0,00	0,37	0,50	2,25	0,00	0,00
Tonic	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	7,14	0,00	0,00	0,00	1,25	2,50	2,66	25,83	0,00	0,00	0,00	0,00	2,83	11,87	0,33	0,00
Veranópolis	LH	1,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,91	6,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,31	0,00
	F	1,25	0,00	1,50	0,00	0,37	0,00	0,62	0,75	0,00	0,90	1,41	0,00	0,16	0,00	15,00	1,00
W 7984 S. H.	LH	7,50	0,00	1,00	0,35	0,00	0,00	0,00	7,00	0,00	0,00	0,00	1,50	3,68	8,75	0,00	0,00

Janetzki's Probat	F	13,46	3,00	20,50	3,36	15,83	2,50	5,00	1,00	0,00	0,00	4,50	1,50	3,68	8,75	0,00	0,00
	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario	LH	0,00	4,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,55	0,00
	F	3,20	0,00	0,70	0,50	8,90	1,28	0,00	2,50	1,37	0,00	5,11	1,16	0,00	0,00	0,25	0,00
Buck Arriero	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,16	1,25	0,80	0,25	3,50	11,50	1,16	1,17	0,00	0,97	0,20
Buck Ranquel	LH	0,25	2,50	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,12	0,00	0,19	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	1,75	0,22	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,58	0,12	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00
Don Ernesto	LH	0,35	0,25	0,05	0,00	0,00	0,00	0,50	0,65	0,20	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	4,75	0,00	13,16	0,25	1,00	0,30	0,95	4,91	0,00	1,75	6,50	4,10	9,20	5,37	4,29	1,33
Klein Dragón	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
	F	10,83	0,00	2,25	3,70	1,16	10,00	2,67	8,50	0,50	0,87	17,91	1,41	18,67	6,50	0,75	0,50
Klein Sagitario	LH	0,11	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	4,00	0,12	1,00	0,00	0,50	0,00	3,36	17,50	2,05	0,50	20,75	0,25	1,58	3,35	4,10	0,25
Klein Volcán	LH	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	1,50	0,10	0,80	0,12	0,00	0,00	0,87	0,25	2,75	0,25	10,50	17,75	0,40	0,00	9,37	0,33
Klein Zorro	LH	0,00	1,86	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	9,87	0,00	0,91	2,00	3,66	2,80	0,00	4,27	0,62	1,33	8,65	1,00	9,87	3,37	5,12	0,25
Pro INTA Puntal	LH	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,35	0,12	0,00	0,00	0,00
	F	5,12	0,00	3,75	1,00	10,30	0,65	13,90	1,75	0,33	2,50	40,25	9,16	10,40	4,20	2,00	0,12
LSD= 9,23																	

Tabla 3.19. Medias de porcentaje de necrosis para HB+HB-1 para la interacción Ambiente x Aislamiento x Línea/ Cultivar, de 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos del patógeno *M. graminicola* en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

Línea-Cultivar/Aislam.		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle	LH	17,36	13,33	30,43	30,06	22,06	22,00	30,19	51,88	35,34	35,5	20,54	39,84	33,74	25,75	37,21	32,44
	F	81,67	87,50	63,08	67,5	93,25	78,75	63,08	49,38	35,34	57,71	93,75	71,46	100,00	100,00	97,50	82,79
Estanzuela Federal	LH	32,97	16,41	30,03	35,17	32,43	15,21	53,39	50,00	52,21	48,59	30,73	31,58	29,57	50,91	34,79	23,00
	F	20,71	67,50	95,50	0,94	75,00	58,75	86,88	56,04	100,00	65,63	96,67	39,00	85,00	55,00	18,63	11,46
Flame	LH	76,93	89,00	77,00	58,26	67,50	100,00	90,14	61,11	62,13	98,34	89,29	95,00	30,71	86,25	66,07	90,00
	F	77,32	61,85	33,13	40,50	73,04	64,06	52,59	31,66	87,66	53,47	37,00	49,25	41,50	46,77	60,36	59,59
IAS 20	LH	8,52	17,81	14,68	7,45	5,84	19,12	17,45	12,84	24,25	17,86	14,71	28,34	19,07	15,84	16,34	26,65
	F	48,83	40,13	23,60	94,38	95,00	27,06	63,13	39,35	17,75	7,13	40,42	14,06	35,33	34,35	32,63	32,46
Israel 493	LH	29,91	41,72	67,86	22,00	34,17	42,03	45,58	39,29	69,13	63,13	55,67	60,00	37,50	43,96	25,79	32,33
	F	80,75	43,69	53,34	52,50	100,00	99,58	66,27	54,92	22,46	55,00	70,00	43,75	55,63	46,48	17,50	59,19
Kavkaz	LH	35,02	16,25	29,19	16,91	14,70	30,97	24,41	41,67	39,48	57,14	32,66	51,93	31,86	36,70	41,58	34,07
	F	64,75	39,67	69,50	59,69	67,00	60,00	34,00	33,75	37,08	31,69	88,75	48,56	60,00	67,92	51,88	41,69
Oasis	LH	11,25	11,94	30,18	20,38	7,98	7,35	10,82	17,31	27,07	17,16	16,36	22,18	19,15	7,25	48,00	5,81
	F	21,16	22,58	67,50	24,63	21,05	23,23	6,85	17,31	21,19	22,92	17,46	22,18	25,84	7,25	18,56	3,63
Saratovskaja 19	LH	7,83	6,59	8,47	20,19	18,95	12,25	27,91	25,16	38,31	24,97	19,28	22,53	32,14	27,52	30,00	22,68
	F	84,17	97,50	72,11	69,33	45,00	31,67	49,03	68,00	47,71	21,56	93,75	69,79	95,00	73,93	51,00	86,59
Tadinia	LH	16,72	15,34	28,90	38,22	33,11	22,25	70,76	51,61	43,13	63,87	21,85	25,38	50,50	41,34	59,06	51,51
	F	59,06	30,00	37,89	37,13	65,31	33,56	58,44	20,14	19,13	18,00	27,50	29,75	55,63	47,29	14,42	8,29
TE 9111	LH	23,75	7,07	13,76	18,06	17,14	5,22	15,08	32,75	21,94	17,17	14,00	15,20	16,16	25,39	27,45	14,40
	F	20,39	13,00	33,75	25,53	39,17	28,35	59,79	74,58	19,92	6,25	34,00	9,66	23,63	8,00	26,81	7,81
Tonic	LH	6,75	6,06	32,44	12,70	17,75	24,06	44,06	37,90	27,89	17,15	19,84	27,22	16,46	11,72	12,39	15,19
	F	78,75	78,40	70,42	68,22	85,35	71,88	98,33	93,75	27,89	63,38	77,50	67,08	75,23	86,25	54,38	53,00
Veranópolis	LH	24,50	14,59	41,43	48,93	33,49	41,25	82,86	37,59	39,84	43,96	39,69	32,17	23,88	43,66	28,78	58,13
	F	37,71	40,00	100,00	62,50	37,31	78,25	51,25	35,00	7,65	38,08	43,65	31,38	50,42	25,63	40,00	22,38
W 7984 S. H.	LH	18,00	19,40	29,60	50,22	73,04	43,67	100,00	52,88	90,00	53,47	7,50	41,96	35,94	56,98	4,67	65,88

Janetzki's Probat	F	57,50	17,00	40,94	44,13	90,17	31,09	37,23	23,25	17,50	22,84	40,83	35,63	35,94	56,98	4,67	31,13
	LH	15,98	9,23	17,39	15,32	16,33	26,63	21,08	14,34	23,90	19,51	18,25	16,67	15,24	34,44	23,58	12,10
	F	45,31	74,55	52,56	74,29	34,67	39,38	78,00	51,20	89,04	80,00	69,61	88,78	84,11	55,50	80,31	73,33
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario	LH	9,91	8,39	16,95	18,18	11,49	13,02	16,70	26,92	27,77	22,96	14,25	16,36	11,77	6,95	7,88	23,18
	F	61,50	16,06	7,73	52,92	31,29	14,14	38,75	40,31	26,31	20,13	34,39	29,60	87,50	8,31	25,67	20,29
	LH	32,90	27,01	36,97	39,41	31,68	20,00	52,00	56,61	50,98	40,17	61,00	39,64	8,90	36,89	45,30	19,96
Buck Arriero	F	77,19	38,24	100,00	12,50	28,19	9,84	12,25	32,60	21,06	45,00	39,94	25,85	19,79	31,55	27,98	10,97
	LH	17,34	24,14	20,25	25,38	17,47	25,09	27,06	64,88	46,50	55,00	30,78	15,67	25,52	40,33	43,26	34,81
	F	60,06	42,00	10,00	9,94	8,52	1,88	40,00	19,44	18,75	4,50	27,75	4,50	4,86	80,50	15,04	6,94
Don Ernesto	LH	11,92	12,52	18,00	20,89	26,92	28,41	14,99	28,43	16,57	39,82	30,31	41,30	26,71	31,79	50,66	22,42
	F	32,66	6,28	3,88	58,06	62,92	45,05	31,93	39,90	20,92	28,63	70,33	22,05	74,00	44,04	48,40	13,73
	LH	13,07	12,69	19,34	27,92	13,49	14,15	24,47	40,83	29,66	21,59	14,41	10,06	23,34	16,88	26,11	27,86
Klein Dragón	F	59,38	3,99	70,88	34,58	45,71	49,38	93,34	34,02	8,38	11,06	51,92	21,36	70,42	32,71	1,13	5,06
	LH	14,40	16,03	23,30	17,83	17,63	23,19	27,27	19,08	29,89	31,70	24,23	27,22	22,65	27,63	24,85	16,34
	F	30,69	28,44	46,04	34,38	63,75	13,82	64,08	54,10	18,13	13,38	61,19	22,69	24,73	43,19	42,00	13,06
Klein Volcán	LH	10,85	16,19	28,53	20,41	9,43	18,94	16,12	21,49	30,31	19,95	10,50	33,92	21,97	25,12	14,72	39,82
	F	8,18	4,35	17,25	37,65	36,96	56,23	3,88	26,94	19,13	9,50	16,13	10,06	10,81	15,94	18,13	5,34
	LH	10,94	12,50	31,38	36,83	18,95	33,30	37,66	32,78	39,75	28,78	19,09	31,49	25,18	24,29	40,97	38,25
Klein Zorro	F	59,00	75,21	37,71	27,75	14,47	30,56	12,50	19,08	14,00	42,84	47,13	40,70	37,50	22,17	53,44	26,38
	LH	12,92	13,97	30,61	40,29	16,13	21,94	39,50	25,14	24,61	23,00	20,54	12,46	21,68	54,17	17,48	28,11
	F	46,50	4,16	24,29	42,44	30,55	28,90	16,11	16,04	3,44	9,25	37,88	40,58	24,40	18,31	6,38	8,25
LSD= 2,69																	

Tabla 3.20. Medias de porcentaje de cobertura picnidial para HB+HB-1 para la interacción Ambiente x Aislamiento x Línea/ Cultivar, de 23 líneas y cultivares de trigo en Z 82 evaluados con 16 aislamientos del patógeno *M. graminicola* en dos ambientes (LH= Los Hornos y F= Facultad).

Línea-Cultiv/Aislam		1	2	14	20	24	52	201	205	217	226	230	243	244	247	248	254
Extranjeros																	
Capelle	LH	1,52	0,14	3,21	1,23	0,25	0,75	5,11	7,13	5,44	7,21	2,10	1,31	2,20	2,41	4,56	3,77
	F	14,79	15,20	15,92	31,56	30,43	13,17	20,90	6,06	5,44	7,79	30,21	26,04	25,00	21,44	19,23	10,04
Estanzuela Federal	LH	14,00	0,86	11,79	12,14	7,61	0,84	26,07	20,84	21,58	22,66	17,45	5,37	5,41	12,95	3,08	5,22
	F	0,13	0,06	0,00	1,88	0,00	0,31	21,88	6,29	60,00	19,31	16,84	14,88	10,63	13,75	5,00	0,08
Flame	LH	1,75	0,30	0,40	0,10	0,25	0,17	0,12	0,11	0,24	0,75	0,22	0,00	1,75	0,13	0,13	0,00
	F	0,18	0,00	0,56	0,36	0,79	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	1,25	0,13	1,75	3,17	0,00	0,59
IAS 20	LH	0,00	0,13	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	7,29	0,00	1,67	0,07	0,10	0,00	0,00
	F	0,10	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,19	0,00	0,08	3,50	0,00	0,75	0,00	0,00
Israel 493	LH	1,25	0,44	2,50	0,40	0,17	2,75	8,13	7,05	5,40	7,50	0,00	0,00	0,84	0,00	0,25	0,00
	F	8,04	2,88	15,42	0,25	1,38	0,00	10,50	7,05	0,46	19,81	19,00	10,63	2,04	7,08	7,13	0,83
Kavkaz	LH	7,45	2,09	4,44	1,95	3,45	1,94	5,43	2,17	8,99	10,89	2,33	1,82	2,54	4,95	2,35	3,14
	F	16,17	20,13	9,00	6,81	15,53	4,88	9,00	9,25	7,15	10,04	24,65	16,06	24,19	33,13	38,13	5,25
Oasis	LH	0,20	0,00	3,57	0,31	0,00	0,00	0,00	3,50	1,73	0,81	0,31	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
	F	1,19	1,17	0,00	2,19	1,18	0,00	0,90	3,50	5,13	8,42	0,79	0,25	0,00	0,00	0,38	0,00
Saratovskaja 19	LH	0,06	0,47	1,42	0,00	0,00	0,44	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00	0,06
	F	1,46	0,00	1,72	2,96	0,25	1,53	1,91	5,45	5,17	0,56	8,75	4,88	4,79	0,00	0,70	3,00
Tadlinia	LH	1,34	0,50	2,00	7,73	2,34	0,00	0,00	4,54	7,50	9,59	1,44	3,06	0,75	1,38	0,00	2,97
	F	6,56	13,75	16,21	3,00	14,88	2,94	0,56	2,14	10,04	5,03	15,50	1,88	6,31	0,42	4,17	1,32
TE 9111	LH	2,18	0,00	0,08	0,75	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,97	0,17	0,31
	F	0,38	0,00	0,00	0,25	4,20	2,45	0,75	0,00	0,08	0,63	0,00	0,31	0,29	3,00	0,00	0,25
Tonic	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	9,32	1,90	8,79	2,64	7,43	7,92	13,83	37,42	0,00	8,25	8,02	0,00	14,54	12,33	14,33	0,00
Veranópolis	LH	5,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,38	7,97	1,25	0,00	0,17	0,00	0,79	1,63	0,00
	F	0,94	1,25	0,75	1,25	0,31	0,00	0,63	1,00	2,11	1,90	1,96	0,00	0,08	1,25	16,50	0,50
W. 7894 S.H.	LH	8,00	3,25	3,60	1,39	0,79	0,00	0,00	8,50	3,34	0,00	0,25	6,88	12,76	10,00	0,00	2,00
	F																

Janetzki's Probat	F	18,86	2,13	18,19	5,22	22,08	1,33	6,79	1,50	0,00	0,00	8,08	6,88	12,76	10,00	1,83	2,50
	LH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	F	0,94	0,00	0,72	1,43	0,00	0,83	4,17	0,11	0,11	0,71	1,25	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00
Argentinos																	
Buck 75 Aniversario	LH	1,04	0,65	1,94	0,80	1,13	0,05	1,48	2,67	3,67	1,38	1,13	0,56	0,28	0,40	0,89	1,13
	F	6,35	10,69	2,19	0,50	19,09	1,54	0,50	3,25	2,45	0,00	7,41	1,70	0,00	0,75	3,29	0,13
Buck Arriero	LH	1,63	0,08	0,84	0,00	0,56	0,00	0,82	0,71	0,08	2,81	7,20	0,21	0,00	0,07	0,00	0,18
	F	12,50	1,95	3,17	2,13	2,75	0,67	4,50	5,60	5,01	4,75	19,63	7,35	10,57	3,19	6,11	2,35
Buck Ranquel	LH	1,00	0,44	0,06	0,06	0,18	0,00	0,00	0,47	0,00	0,26	0,06	0,00	0,00	0,25	0,39	0,00
	F	9,00	15,77	2,25	1,38	0,00	1,46	2,50	1,09	5,42	0,13	5,00	0,00	0,54	0,55	8,52	0,13
Don Ernesto	LH	2,88	0,05	3,14	2,07	2,83	0,90	3,61	5,34	0,73	5,72	3,57	2,47	0,25	0,36	0,22	1,50
	F	6,38	0,75	10,56	5,00	1,75	0,35	3,48	10,96	0,92	3,00	7,20	13,55	10,80	9,69	4,06	2,36
Klein Dragón	LH	4,26	1,44	3,91	1,64	0,81	0,00	5,99	6,60	6,13	4,31	2,66	1,81	2,06	2,91	2,20	1,33
	F	12,92	25,85	9,19	3,45	12,88	7,00	3,34	15,61	0,25	2,00	24,79	4,25	15,59	9,15	0,63	0,38
Klein Sagitario	LH	2,63	0,16	1,33	2,14	0,30	0,00	1,83	2,08	1,63	1,17	0,25	0,22	0,16	0,38	0,61	0,00
	F	8,21	11,25	11,25	0,63	9,06	1,60	2,03	32,75	4,25	3,69	16,92	2,13	2,86	9,43	5,23	0,81
Klein Volcán	LH	0,69	0,25	0,30	4,54	0,00	0,32	0,30	0,00	1,31	0,63	0,00	0,00	0,00	0,28	0,39	0,00
	F	3,35	0,00	1,90	0,06	0,00	0,00	7,81	0,69	7,75	1,56	23,50	18,19	8,43	0,13	8,11	7,25
Klein Zorro	LH	2,89	2,53	4,48	2,29	0,55	0,10	2,47	4,65	2,31	2,13	0,58	0,50	1,56	0,41	1,88	2,22
	F	20,88	5,96	5,98	5,31	4,35	7,28	0,70	10,18	2,56	1,33	11,24	2,97	8,69	4,94	8,50	5,88
ProINTA Puntal	LH	0,89	0,42	2,32	0,31	0,54	0,00	7,50	3,08	0,00	1,41	2,21	1,82	0,06	7,50	0,13	1,46
	F	8,94	0,81	6,92	2,50	11,65	0,58	14,03	2,50	0,63	1,50	39,13	20,42	13,05	8,64	1,75	0,56
LSD= 1,74																	

Discusión

Es conocido que en el patosistema *Mycosphaerella graminicola*- *Triticum aestivum* coexisten dos tipos de resistencia. La resistencia cuantitativa está condicionada por poligenes, es parcial o incompleta, aislamiento no-específica y de alta durabilidad (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998; Chartrain *et al.*, 2004a). En cambio, la resistencia cualitativa, está condicionada por uno o pocos genes, es completa y en general de menor durabilidad (Somasco *et al.*, 1996; Arraiano *et al.*, 2001b; McCartney *et al.*, 2001; Brading *et al.*, 2002). En los materiales de nuestro país la resistencia encontrada es parcial y no se han identificado aún los genes que la condicionan (Simón *et al.*, 2005a). La identificación de los mismos y la incorporación de genes de resistencia y QTL's ya localizados, es un paso fundamental en los planes de mejoramiento (Simón, 2005).

En experimentos previos de campo el porcentaje de necrosis fue correlacionado con el porcentaje de cobertura picnidial (Arama, 1996; Brown *et al.*, 2001), sin embargo, para nuestros resultados, en algunas interacciones aislamiento x línea/cultivar se encontraron altos porcentajes de necrosis con bajos valores de cobertura picnidial, lo cual también fue hallado por Simón (2003). Aunque la cobertura picnidial es considerada como más apropiada, debido a que la senescencia y otras enfermedades no intervienen en los resultados, ésta y previas investigaciones indican que especialmente en el campo, el porcentaje de necrosis puede ser un buen indicador de la resistencia y resulta más fácil para ser evaluada (Brown *et al.*, 2001). Debemos considerar que, según los datos meteorológicos del año 2008, en el cual fueron realizados ambos ensayos, no hubiera sido factible encontrar porcentajes altos de cobertura picnidial debido a la escasez de precipitaciones durante los meses del ciclo del cultivo. La cobertura picnidial en estadio adulto fue generalmente baja por la escasez de lluvias, observándose valores algo mayores para la HB-1, la que permitió una mejor discriminación del germoplasma. La humedad es necesaria en todas las etapas del proceso de infección: germinación, penetración, desarrollo del micelio dentro del tejido de la planta y posterior formación de picnidios (Browning, 1979; Hookes, 1957; Shaner & Finney, 1976).

En nuestro estudio, se observaron diferencias significativas entre los dos ambientes en el estadio adulto de las plantas. En el ambiente F siempre aparecieron los valores más altos de las dos variables, sobre todo de necrosis, y algo similar ocurrió

para la interacción ambiente x línea/cultivar de HB. Estas diferencias pueden ser explicadas porque en el ambiente F, el ensayo fue realizado en macetas, mientras que en LH, a campo. A pesar de que el ensayo en F recibió riego artificial adecuado, las precipitaciones fueron escasas durante el año de ensayos, conservándose mucho más la humedad en el suelo que en la tierra de macetas. Con esto suponemos que las plantas en F alcanzaron más rápidamente la senescencia que en LH, acrecentando la necrosis en las hojas. De hecho en F, el análisis de la HB-1 resultó dificultoso debido a la edad de la hoja y a que presentaba senescencia.

Entre nuestros materiales evaluados existieron algunos con una resistencia combinada en plántula y estadio adulto, mientras que otros mostraron mejores niveles de resistencia en uno de los dos estadios. Arama (1996) y Simón (2003) encontraron resultados similares. Kema & van Silfhout (1997) observaron que en general las plantas adultas fueron más susceptibles que las plántulas, aunque no todos los aislamientos respondieron de modo similar para la infección en los dos momentos de la planta.

La mayor susceptibilidad en las líneas fue observada en ambos ambientes en Saratovskaja 19 y Janetzki Probat para plántula, y en Capelle, Flame y Estanduela Federal para estado adulto. Para Saratovskaja 19 y Janetzki Probat no existen trabajos previos de otros autores porque no representan líneas diferenciales. Estas dos líneas fueron consideradas como controles susceptibles, ya que en nuestros ensayos previos de campo Saratovskaja 19 había resultado susceptible frente a varios aislamientos y Janetzki Probat frente a algunos de ellos. Sin embargo, para los datos de cobertura picnidial en planta adulta, estas dos líneas mostraron valores bajos para la mayor parte de los aislamientos, lo cual pudo haber ocurrido porque en general existió un bajo porcentaje de esta variable para la mayoría de los materiales.

Nuestros resultados obtenidos de Capelle son coincidentes con los de Simón *et al.*, (2004) en el cual se evaluaron un set de líneas Capelle-Desprez frente a tres aislamientos argentinos, FALP 3096, FALP 4396 y FALP 3398. Todas las líneas del set mostraron valores altos de necrosis en los estadios de grano lechoso (Z 73) y sobre todo en grano pastoso (Z 85). Para Simón (2003), la resistencia de Capelle en plántula parece estar conferida por genes menores, lo cual no se pudo comprobar en el presente trabajo, donde Capelle manifestó solamente valores de resistencia completa en plántula frente a los aislamientos 1 y 230, según los datos de necrosis y cobertura picnidial de segunda hoja.

A diferencia de Capelle, Flame y Estanduela Federal presentan genes de resistencia conocidos. En Flame fue identificado el gen *Stb6* (Brading *et al.*, 2002), mientras que en Estanduela Federal el *Stb7*.

En el caso de Flame pudimos observar que mostró valores altos de necrosis pero muy bajos de cobertura picnidial. La mayoría de los trabajos realizados con esta línea en estadio de plántula, demostraron que Flame fue resistente (Brading *et al.*, 1999; Chartrain *et al.*, 2005c). Además, se sabe que *Stb6* se expresa en plántula y en estadio adulto (Arraiano *et al.*, 2001a; Kema & van Silfhout, 1997), lo cual indicaría que nuestros aislamientos no poseen un gen de avirulencia para *Stb6*.

En Estanduela Federal, se observaron valores altos tanto de necrosis como de cobertura picnidial en estadio adulto, lo cual puede ser atribuido a que *Stb7* es un gen de resistencia específica, eficaz sólo frente a algunos aislamientos como ISR398, IPO87019 y ISR8036 (Chartrain *et al.*, 2005a), los cuales no fueron probados en este estudio. Podría ocurrir entonces que nuestros aislamientos no tengan factores de avirulencia para el gen *Stb7*. Germán *et al.* (1987), observó que en Uruguay, esta línea mostró un comportamiento claramente superior con respecto a otras, aún cuando la infección por *Septoria tritici* fue realmente importante. Sin embargo debido a la alta variabilidad que presenta este patógeno, suponemos que Estanduela Federal no resulta resistente a nuestros aislamientos porque estos presentan diferentes genotipos a los de Uruguay.

Entre los cultivares nacionales la mayoría mostró un buen comportamiento en ambos ambientes tanto en plántula como en estadio adulto. Algunos, como Don Ernesto INTA, se mostró resistente frente a una menor cantidad de aislamientos que el resto de los cultivares nacionales, tanto en plántula como en planta adulta, indicando la presencia de genes de resistencia específica frente a los genes de avirulencia de esos aislamientos y en concordancia con la teoría gen a gen de Flor (1956). Este cultivar ha mostrado variados niveles de resistencia en diferentes investigaciones realizadas en nuestro país. Kolhi *et al.* (1995) observó bajos niveles de susceptibilidad en este material en diferentes localidades y consideró que podía ser usado como fuente de resistencia en programas de selección. Simón *et al.* (2002) estudiaron el comportamiento de diferentes cultivares nacionales y observaron que Don Ernesto presentó valores bajos en el campo al ser inoculado con *Septoria tritici* en dos años distintos (1996 y 1997). Nuestros resultados obtenidos para el cultivar Don Ernesto INTA difieren con los dos autores anteriores pero están en concordancia con el estudio de González *et al.* (2000), quien

evaluó los componentes de la resistencia en plántula en cultivares de trigo con diferentes fuentes de resistencia. En este trabajo Don Ernesto INTA, a pesar de haber sido seleccionado como resistente por incluir en su genealogía germoplasma de Aurora, mostró valores altos de necrosis, cobertura picnidial y producción de picnidiosporas y no se diferenció significativamente del cultivar susceptible Chaqueño INTA. Probablemente el cultivar haya perdido su resistencia específica frente a algunos aislamientos que modificaron sus patrones de virulencia.

Para otros cultivares nacionales como ProINTA Puntal, los resultados de nuestro estudio mostraron que fue resistente a varios aislamientos tanto en plántula como en adulto, pero sin embargo no se halló entre los cultivares nacionales más resistentes. Estos resultados podrían coincidir con los de Formento (2002) quien estableció que el comportamiento de los cultivares comerciales puede variar en las diferentes subregiones trigueras de nuestro país. Así, en una investigación realizada por el INTA en EEA Paraná, ProINTA Puntal mostró resistencia a *Septoria tritici* tanto en plántula como en estadio adulto. Simón *et al.*, (2005a) observó niveles de resistencia moderados para ProINTA Puntal en plántula, al ser probada con el aislamiento IPO99013.

Por otro lado, las líneas foráneas que mostraron resistencia tanto en plántula como en adulto, fueron TE 9111, Oasis y IAS 20, las cuales manifestaron también valores de resistencia parcial. Además, TE 9111 y Oasis presentaron resistencia completa frente a algunos aislamientos. En plántula también se evidenció Tonic que mostró resistencia parcial y resistencia específica frente a los aislamientos 1 y 230.

La línea portuguesa TE 9111 (*Stb6*, *Stb11* y posiblemente *Stb7*) (Chartrain *et al.* 2005a), es considerada la línea más resistente a STB conocida en Europa (Chartrain *et al.* 2005b). En cuanto a nuestros resultados obtenidos en plántula, TE 9111 manifestó una resistencia específica frente al aislamiento 247, además de resistencia parcial. Solamente los aislamientos 14 y 24, mostraron valores altos de necrosis para este material en los dos ambientes. Por esto nuestros resultados son concordantes con los de Chartrain *et al.* (2004b), que realizando ensayos en plántula, encontró que esta línea, además de poseer una resistencia específica a los aislamientos de *M. graminicola* IPO323, IPO90012, IPO87019 e ISR398, también mostró altos niveles de resistencia parcial frente a todos los aislamientos probados.

Nuestros resultados en estadio adulto determinaron que TE 9111 fue resistente a todos los aislamientos en ambos ambientes, indicando resistencia parcial, y que presentó además resistencia completa a los aislamientos 2, 205 y 230. Por lo tanto, nuestros

resultados coinciden con el trabajo de Brown *et al.* (2001), quien realizó evaluaciones sobre plantas adultas con aislamientos de *M. graminicola* y observó que esta línea representó la segunda más resistente de todas las testeadas, después del cultivar brasileiro Veranópolis, lo que la convierte en una importante fuente de resistencia. Entonces, TE 9111 presenta buenos niveles de resistencia aislamiento-específica, y de resistencia parcial también frente a los aislamientos argentinos, lo que la hace muy útil en programas de mejoramiento (Chartrain *et al.*, 2005b).

Por otro lado, la línea Oasis mostró resistencia completa frente al aislamiento 205, en plántula y frente al 247 y 254, en estadio adulto, además de presentar resistencia parcial en ambos estadios de la planta. Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas por otros autores, en las cuales se demostró que Oasis contiene el gen de resistencia *Stb1* (identificado en Bulgaria 88) ya que durante los años 70 esta línea incorpora en su genealogía el germoplasma de Bulgaria 88, heredándolo de él (Patterson *et al.*, 1975; Adhikari *et al.*, 2004a). Además, Oasis ha mostrado altos niveles de resistencia a un amplio espectro de patrones de patogenicidad en todo el mundo.

Por el contrario, la línea IAS 20 no presenta genes de resistencia conocidos, pero es una línea diferencial. Se mostró resistente a la mayoría de los aislamientos a los que también mostró resistencia TE 9111. Debido a esto se infiere que este material podría presentar alguno o todos los genes conocidos en TE 9111. En un estudio realizado por Rosielle y Brown (1979), se observó que la resistencia en IAS 20 y Veranópolis (*Stb2*, *Stb6* y *Stb11*) podría estar dada por los mismos genes, ya que la similitud de los patrones de herencia, el ancestro común y el comportamiento en cuanto a resistencia de estas dos líneas brasileras, sugieren que podrían portar los mismos genes. Gilchrist (1999) estableció que desde 1971, la alta resistencia de IAS 20 fue confirmada en diferentes países a través del International Septoria Nursery (ISEPTON). Para IAS 20, únicamente el análisis del porcentaje de necrosis determinó algunos aislamientos virulentos en ambos ambientes como 14, 52, 226 y 254.

Debemos mencionar que en estadio de plántula únicamente los genes presentes en IAS 20 y en Israel 493 (*Stb3* y *Stb6*) determinaron resistencia, expresada como cobertura picnidial y en ambos ambientes, frente a los genes de avirulencia del aislamiento 14, el cual demostró poseer factores de avirulencia para los genes de resistencia de la mayor parte de los materiales. El aislamiento 2 también parece contener factores de avirulencia para la mayor parte de las líneas y cultivares probadas en este estudio. Los genes de resistencia efectivos frente a este aislamiento fueron

probablemente *Stb4*, *Stb6*, *Stb7*, *Stb10*, *Stb11* y *Stb12*, ya que están presentes en las líneas que resultaron resistentes a este aislamiento (Flame, Kavkaz, Tadinia y TE 9111). Otros materiales como IAS 20 y Klein Dragón también mostraron resistencia a este aislamiento por eso podemos deducir que quizás presentan alguno o todos estos genes de resistencia.

Según los resultados obtenidos a partir de las evaluaciones en plántula, Tonic, que posee el gen *Stb9*, el cual le confiere resistencia a IPO89011 (Chartrain *et al.*, 2009), se halló resistente a todos los aislamientos excepto al 52, 201, 244 y 248 que produjeron valores altos de necrosis en ambos ambientes. En otros materiales foráneos, también se pudo observar resistencia completa en plántula, según los datos de ambas variables. En base a los genes de resistencia que presentan estos materiales podemos deducir que *Stb9* (Tonic), *Stb7* (Estanzuela Federal) y *Stb6* (Flame) podrían ser efectivos frente a los genes de avirulencia del aislamiento 1. Además *Stb9* también demostró ser efectivo frente al 230 y *Stb7* al 254. *Stb6* (Israel 493 y Veranópolis) junto con *Stb2* y *Stb11* (Veranópolis), *Stb3* (Israel 493), *Stb5* y *Stb8* (W 7984 S.H.) mostraron efectividad frente al aislamiento 226. Para 205 resultó efectivo el gen *Stb1* presente en Oasis y para 247 los genes *Stb6*, *Stb7* y *Stb11* presentes en TE 9111.

Por otra parte, los cultivares nacionales que manifestaron el mejor comportamiento en plántula y estadio adulto fueron Klein Volcán, Buck 75 Aniversario y Klein Dragón. Klein Volcán y Klein Dragón presentaron resistencia completa frente a algunos aislamientos en plántula y adulto. Simón (2003) encontró altos niveles de resistencia en estos materiales frente al aislamiento IPO99103 en plántula, lo cual demuestra también una resistencia específica. Además, nuestros resultados evidenciaron en ellos una resistencia parcial en plántula. Simón (2003) también encontró resultados similares para estos dos cultivares, que al ser probados con siete aislamientos diferentes de *M. graminicola*, mostraron buenos niveles de resistencia frente a todos ellos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio para plántula, se deduce que Klein Volcán, Buck 75 Aniversario y Klein Dragón, podrían presentar el gen *Stb9* que se encuentra en la línea Tonic, debido a que los tres materiales se manifestaron susceptibles en estadio de plántula frente a los mismos aislamientos que Tonic (14, 52, 201, 243, 244 y 248), ya sea solo en LH, solo en F, o en ambos ambientes.

En estadio adulto, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario se presentaron resistentes a la mayoría de los aislamientos, evidenciando resistencia parcial y fueron

susceptibles frente a los mismos aislamientos que en plántula, indicando que los mismos genes específicos podrían estar condicionando la resistencia en plántula y adulto. Por comparación con los genes de resistencia presentes en las líneas con genes conocidos, que resultaron efectivos en estadio de plántula, podemos suponer también que Buck 75 Aniversario y Klein Volcán pueden contener a *Stb6*, *Stb7* y *Stb9*, ya que fueron resistentes al aislamiento 1, y además Buck 75 Aniversario y Klein Dragón pueden llevar a *Stb6*, *Stb7*, *Stb10* y *Stb12*, por mostrarse resistentes al 2.

Nuestros resultados sugirieron que en Klein Volcán podría existir una resistencia no específica o parcial en plántula y adulto. Para Klein Volcán, Simón (2003) obtuvo similares resultados en planta adulta. Cabe aclarar que en estos cultivares y en las líneas extranjeras donde se evidenció una resistencia parcial, los materiales no se muestran parcialmente resistentes a todos los aislamientos como debería ocurrir en este tipo de resistencia, aunque si a un número importante de ellos y en los restantes presentan una moderada susceptibilidad. Esto podría deberse a diferencias en la agresividad de los aislamientos, ya que aquéllos frente a los cuales no presentaron resistencia, tuvieron valores altos de agresividad para la mayoría de los materiales. Además también puede haber en las hojas un porcentaje de senescencia que aumente los valores. Con el fin de lograr mayor información, se realizarán cruzamientos en algunos de esos materiales para determinar si alguno de los genes que se encuentran en otras líneas, o QTL's condicionando resistencia parcial, están presentes en nuestros cultivares.

Por lo tanto y como conclusión, se infiere que los genes *Stb* de las líneas extranjeras son efectivos a muchos de nuestros aislamientos y que los cultivares argentinos podrían contener algunos de estos genes.

En Argentina, no existe información sobre los niveles de resistencia y susceptibilidad de nuestros cultivares frente a aislamientos de *M. graminicola* caracterizados molecularmente. Los resultados de este trabajo aportan un importante conocimiento acerca del comportamiento de estos cultivares y de las interacciones entre cultivares y aislamientos. La localización de genes empleando marcadores moleculares podría ser el próximo paso para incorporar mayor resistencia en materiales nacionales a través de cruza entre materiales locales adaptados, piramidizando genes de resistencia al patógeno.

CAPITULO 4

Mapeo de la resistencia cuantitativa a la mancha de la hoja en el trigo espelta

Resumen

El objetivo de esta investigación fue mapear la posición genética del factor de resistencia localizado previamente en el cromosoma 7D del trigo spelta (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell) y determinar si existen ligamientos con genes que condicionan la fecha de floración. El microsatélite basado en el mapa genético fue construido a partir de un conjunto de 87 líneas doble-haploides obtenidas del cruzamiento entre la línea ‘Chinese Spring’ (‘CS’) y la línea ‘CS’ (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) que lleva en su base genética el cromosoma 7D del trigo espelta. Dos regiones del cromosoma 7D estuvieron asociadas con QTL’s aislamiento- específicos, expresados uno en plántula y el otro en estadio adulto. El locus de resistencia en plántula *QStb.ipk-7D1* se encontró en la región del centrómero del cromosoma 7D, que corresponde a la ubicación del gen de resistencia *Stb4*, procedente de la variedad de trigo pan ‘Tadinia’, y *Stb5* procedente de *Aegilops tauschii*. El locus de resistencia en adulto *QStb.ipk-7D2* se encontró sobre el brazo corto del cromosoma 7D, de manera similar al locus Lr34/Yr18 conocido por ser efectivo contra múltiples patógenos. El mapeo de intervalo compuesto confirmó que *QStb.ipk-7D1* y *QStb.ipk-7D2* son dos loci distintos. No se observó una correlación apreciable entre la fecha de floración y los QTL’s de resistencia de plántula o adulto, sugiriendo que los QTL’s observados para la resistencia no están asociados con la variación en la fecha de floración. Esa falta de correlación es alentadora desde el punto de vista del mejoramiento, ya que permite la mejora de la resistencia a la mancha de la hoja independientemente de la fecha de floración.

Introducción

La mancha de la hoja del trigo causada por *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) Schröter in Cohn (anamorfo *Septoria tritici* Rob ex Desm.) puede conducir a importantes pérdidas de rendimiento (Hardwick *et al.*, 2001). El uso de fungicidas para el control de la enfermedad resulta costoso y no es totalmente confiable. En los últimos años, aislamientos de *M. graminicola* resistentes a estrobilurinas se han convertido en algo común en Europa y algunos estudios de campo confirman la tendencia de aumento de la resistencia del patógeno a estos fungicidas (McCartney *et al.*, 2007).

Los cultivares resistentes proporcionaron una solución eficaz, económica y ambientalmente amigable para el control de epidemias de *Septoria tritici*, pero hasta hace poco el conocimiento sobre la genética de la resistencia a la enfermedad era escaso. En el germoplasma de trigo se han encontrado tanto resistencia cualitativa como cuantitativa. La primera es una resistencia completa, aislamiento-específica y heredada (Brading *et al.*, 2002), mientras que la segunda es parcial, aunque a menudo más duradera, generalmente no es aislamiento-específica y tiene un control poligénico (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998).

Hasta el momento, los 15 principales genes de resistencia en el trigo hexaploide son *Stb1*, *Stb2*, *Stb3*, *Stb4*, *Stb5*, *Stb6*, *Stb7*, *Stb8*, *Stb9*, *Stb10*, *Stb11*, *Stb12*, *Stb13*, *Sb14* y *Stb15* (McIntosh, 2008). También fueron identificados un cierto número de QTL's (Quantitative Trait Loci) (Eriksen *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2004, 2007). Raman *et al.* (2009) identificó un gen mayor confiriendo resistencia en plántula sobre el brazo corto del cromosoma de trigo 1B que es probablemente un alelo de *Stb11*.

Se sabe que la población del patógeno es altamente variable y el hongo es capaz de completar un ciclo sexual en cinco semanas bajo condiciones favorables (Kema *et al.*, 1996c). Esto aumenta el riesgo de variación en los genes de virulencia del patógeno, quebrando la resistencia del hospedante. Un ejemplo es la distribución de los genes de resistencia en Oregon, cinco años después de su liberación, debido a la evolución de la virulencia de genotipos patógenos (Cowger *et al.*, 2000). Algunas líneas y cultivares, como Kavkaz-K 4500, Veranópolis, Bulgaria 88 (Dubin & Rajaram, 1996), Apollo (Arraiano *et al.*, 2006) y Senat (Eriksen *et al.*, 2003) han mantenido su resistencia durante muchos años. Sin embargo, el actual inventario de los genes *Stb* en trigo

hexaploide ha fracasado hasta el momento, en cuanto a proporcionar la protección adecuada y duradera, debido a que la eficacia de cada gen de resistencia es baja por la alta variabilidad en la población del patógeno. Por lo tanto, es necesario identificar nuevas fuentes para aumentar la resistencia genética del cultivo. La incorporación de la selección asistida por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento podría permitir piramidizar los genes de resistencia en un único cultivar de trigo, para lograr una resistencia amplia y duradera.

Algunas otras especies de *Triticum* también han sido identificadas como portadoras de resistencia. *Triticum monoccocum*, *T. pyramidale*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum* y *Triticum macha* fueron hallados portando resistencia (Arraiano *et al.*, 2001a; Rosielle, 1972; Simón *et al.*, 2005b; Singh *et al.*, 2008). Arraiano *et al.* (2001b) identificó el gen *Stb5* en el brazo corto del cromosoma 7D del trigo sintético hexaploide. Además se encontró resistencia en 24 líneas de *T. monoccocum* y se halló un solo locus genético, *TmStb1*, ligado al locus microsatélite *Xbarc174*, en el cromosoma 7A. (Jing *et al.*, 2008).

El trigo espelta (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell) está estrechamente relacionado con el trigo pan (*T. aestivum* L.). Históricamente, fue ampliamente utilizado para la cosecha de grano a lo largo del norte de Europa y siguió siendo común hasta comienzos del siglo 20 en el sudoeste de Alemania y regiones de Austria y Suiza. Su bajo potencial de rendimiento y su susceptibilidad al vuelco llevaron a su sustitución casi completa por *T. aestivum* L. Además, a diferencia del grano de *T. aestivum* L., requiere un descascarado como paso previo a la molienda (Campbell, 1997). Sin embargo, en los últimos años, la especie experimentó un auge en popularidad, posiblemente derivado de la percepción de que representa un producto más natural y saludable que *T. aestivum* L. Su bajo rendimiento está asociado con mayores niveles de proteína en el grano, aunque su gluten tiende a ser más extensible, pero menos elástico, resultando en una masa débil. También tiene mejor adaptación que el trigo pan a condiciones de suelos húmedos y fríos y a las grandes altitudes (Campbell, 1997).

El trigo espelta representa una fuente de resistencia genética a diversas enfermedades, incluida la roya del tallo (McVey & Leonard, 1990), la roya amarilla (Macer, 1966; Kema, 1992) y la mancha de la hoja (Simón *et al.*, 2005b; Singh *et al.*, 2008). Además es fácilmente cruzable con *T. aestivum*, proporcionando los recursos genéticos de interés para el mejoramiento de éste. Simón *et al.* (2005b) identificó en

líneas de sustitución, que el cromosoma 7D de *T. aestivum* subsp. *spelta* portaba resistencia a *Septoria tritici*. Sin embargo, el factor de resistencia no fue identificado aún. Los cromosomas 7B y 7D también llevan factores de resistencia sobre sus brazos cortos, los cuales interactúan para influir en la resistencia a *Puccinia striiformis* (Pink & Law, 2009).

Una complicación en la identificación de la resistencia genética a *Septoria tritici* es la conocida interacción entre la resistencia y el momento de floración, con un aumento de la severidad de la enfermedad asociada a la floración temprana de los cultivares. Si bien se acepta en general que dichos caracteres no están genéticamente relacionados y que la asociación se debe a factores epidemiológicos (Simón *et al.*, 2005a, Van Beuningen & Kohli, 1990), se carece de información sobre la posición de los genes de resistencia y de los genes que condicionan la fecha de floración en el mismo germoplasma, utilizando marcadores moleculares para confirmar la ausencia de esas asociaciones genéticas. La ubicación de la resistencia a *Septoria tritici* en el cromosoma 7D de *T. aestivum* subsp. *spelta* (Simón *et al.*, 2005b) puede sugerir posibles vinculaciones con algún locus que controla el momento de floración, porque se conoce que el grupo 7 de cromosomas homeólogos lleva varios loci que controlan la floración (McIntosh *et al.*, 2008).

El objetivo de esta investigación fue utilizar marcadores moleculares para mapear la posición genética del factor de resistencia localizado en el cromosoma 7D y determinar si este factor se encuentra asociado con la variación del período de floración.

Hipótesis

- * Existen genes condicionando resistencia a *Septoria tritici* en el cromosoma 7D de *T. aestivum* subsp. *spelta*.
- * Los mismos se encuentran ligados a genes que condicionan el ciclo a floración.

Materiales y Métodos

4.1. Screening preliminar de los aislamientos a utilizarse

4.1.1. Material vegetal utilizado

La ‘landrace’ ‘Chinese Spring’ (‘CS’) y la línea de sustitución cromosómica del cromosoma 7D de *T. spelta* en Chinese Spring ‘CS’ (*T.aestivum* subsp. *spelta* 7D) (en la que el cromosoma 7D de ‘CS’ fue sustituido por el 7D de *T. aestivum* subsp. *spelta* en la base genética de ‘CS’), difieren en su reacción a la infección con un aislamiento de *M. graminicola* (Simón *et al.*, 2005b). Las dos líneas se testearon nuevamente en 2004, con un conjunto de aislamientos argentinos del patógeno, en dos ambientes (un ensayo a campo y el otro en macetas al aire libre), utilizando un diseño factorial de bloques al azar con tres repeticiones. El ensayo de campo se realizó en la Estación Experimental J. Hirschhorn, y el ensayo en macetas, en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Se sembraron de ocho a diez semillas por línea, en macetas de 10-15 kg de tierra cada una, y también la misma cantidad de semillas se colocó en cada hilera del campo. Posteriormente todos los bloques fueron cubiertos por redes de nylon hasta la germinación y la emergencia de las plántulas, evitando la pérdida de semillas por aves granívoras. Las plantas en macetas fueron regadas regularmente (cada 2-3 días) según las condiciones ambientales, y fertilizadas en la siembra con 50kg.ha⁻¹ de N como urea y 50kg.ha⁻¹ de N como fosfato diamónico, y en macollaje con 50kg.ha⁻¹ de N como urea.

4.1.2. Aislamientos del hongo

Diez aislamientos del hongo patógeno (FALP 6792, 1493, 0103, 0203, 0303, 0403, 0503, 0603, 0703 y 0803), fueron seleccionados de acuerdo a sus diferentes orígenes en la región triguera Argentina. Los aislamientos se mantuvieron en silica-gel y antes de ser utilizados para este estudio, se trasladaron a medio agar-papa-dextrosa durante 5-6 días, para luego ser transferidos a medio agar-extracto de malta por otros 5 a 6 días, con el propósito de promover la esporulación. El inóculo fue preparado a partir de una suspensión de conidios secundarios, obtenida a partir del raspado de las colonias en agua destilada, alcanzándose una concentración de 5×10^6 esporas.ml⁻¹. Para conocer la

cantidad de conidios secundarios por ml de solución de inóculo, se tomaron dos gotas de cada solución y se realizó el recuento de esporas en la cámara de New Bauer, con un aumento de 40x del microscopio binocular. Por último, a las soluciones ya preparadas, se le añadió Tween 20 (0,5 ml por litro) como tensioactivo, el cual permite que el inóculo permanezca adherido a las hojas, facilitando la penetración del hongo.

Las inoculaciones fueron realizadas mediante el uso de pulverizadores DEA 2000-VOLPE, aplicando la solución aproximadamente durante 30 segundos sobre cada maceta. Las plantas fueron inoculadas en estadio de plántula (dos hojas, Z 12, Zadoks *et al.*, 1974) y en estadio adulto (en macollaje, Z 23, Zadoks *et al.*, 1974). Para el ensayo en macetas, las plantas fueron cubiertas por un plástico transparente inmediatamente después de la inoculación y durante 48 hs., lo que permitió mantener el nivel de humedad, actuando como cámara húmeda. Para el experimento en el campo, las plantas se mantuvieron húmedas por aspersión con agua durante 15 minutos, cada 2 horas y durante tres días.

4.1.3. Evaluación de la enfermedad

Para estimar la resistencia en plántula, se evaluó necrosis y cobertura picnidial a los 28-30 días de la inoculación en la primera y segunda hoja de todas las plantas. La evaluación en estado adulto se realizó a los 30-35 días de floración (Z 82) por observación de los mismos parámetros, en las tres hojas superiores.

Se utilizaron los datos sin transformar para el análisis, debido a que su distribución se acercó a la normalidad y varios test de transformación aplicados no la mejoraron sustancialmente. El análisis de varianza (ANVA) fue realizado sobre necrosis y cobertura picnidial de la primera hoja en plántula y sobre la hoja bandera en Z 82. Los factores fueron los ambientes (años), los aislamientos y las líneas.

4.2. Mapeo de la población

4.2.1. Germoplasma utilizado

Se seleccionó al azar una serie de 87 líneas doble-haploides recombinantes cromosómicas (SCRDH), las cuales se obtuvieron del cruzamiento de la F1 de 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) / 'CS' con maíz, y tratando la progenie con colchicina,

siguiendo los métodos establecidos (Laurie & Bennett 1988). Las líneas SCRDH fueron sembradas en macetas al aire libre en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, junto con las dos líneas parentales, en los años 2005, 2006 y 2007. En cada año, se realizaron dos ensayos al mismo tiempo, uno de ellos para la inoculación y la evaluación en plántula y el otro para la inoculación y la evaluación en estadio adulto. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con dos repeticiones en cada una de las tres estaciones de crecimiento. La siembra de las semillas durante el primer año se realizó entre los días 4 y 5 de julio de 2005, en el segundo año el 14 de agosto del 2006, y el 25 de mayo en 2007. Los ensayos fueron sembrados, fertilizados e inoculados de la misma manera que se realizaron los ensayos para el screening preliminar de los aislamientos.

Para inocular la población de mapeo y las líneas parentales en estadio de plántula, se seleccionó, en el screening previo, el aislamiento FALP0103 (obtenido como monospórico desde el cultivar Klein Volcán, de la localidad de Necochea, provincia de Buenos Aires, en el año 2003) en base a la mayor diferencia entre la reacción de las líneas parentales. Se utilizó la misma concentración de esporas que se había usado para los ensayos del screening preliminar.

Para la evaluación de la resistencia en estadio adulto, el material fue sembrado de la misma forma en macetas de 10 a 15 kg de tierra cada una, pero la inoculación se llevó a cabo en la etapa de macollaje (Z 23, Zadoks *et al.*, 1974) con el mismo aislamiento y concentración de esporas que en el ensayo de plántula. Después de la inoculación, las plantas fueron regadas y tratadas de la misma manera que en el ensayo de plántula. En 2005, la inoculación en plántula fue realizada el día 28 de julio y la inoculación en macollaje el 30 de agosto. En 2006, la inoculación en plántula se realizó el 5 de septiembre y en macollaje el 6 de octubre. En 2007, la inoculación en plántula fue realizada el 25 de junio y en macollaje el 15 de agosto.

4.2.2. Evaluación de la enfermedad

En plántula, las evaluaciones se realizaron de la misma manera y sobre las mismas hojas que para los ensayos del screening preliminar. Durante el período comprendido entre la inoculación y la evaluación de la enfermedad en plántula, la temperatura media en cada una de las estaciones de crecimiento fue de 11,7 °C, 12,7 °C y 7,3 °C, y la humedad relativa fue 90,0 %, 78,0 % y 74,4 %.

Para estimar la resistencia en planta adulta, el porcentaje de necrosis y cobertura picnidial sobre la hoja bandera se registró a los 30-35 días después de la floración (Z 82), excepto en 2005 donde se tomaron sólo los datos de necrosis. Las medias de temperatura y humedad relativa entre la inoculación y la evaluación fueron 15,3 °C, 16,5 °C y 13,3 °C y 66 %, 67,0 % y 70,3 %, respectivamente para 2005, 2006 y 2007. Las fechas de floración de todas las líneas fueron registradas cuando el 50 % de espigas dentro de una línea llegó a la antesis. La cantidad de lluvia en los tres años fue de 153, 247 y 272 mm, respectivamente para todo el período de crecimiento. La regresión lineal del número de días a floración y el porcentaje de necrosis o cobertura picnidial no fue significativa, por lo que los datos no se corrigieron en base a su fecha de floración.

El ANVA se aplicó sobre los datos de necrosis y cobertura picnidial de la primera hoja en plántula y de la hoja bandera en Z 82. Para este análisis de varianza se utilizaron los datos originales sin transformaciones por estar muy próximos a una distribución normal. Los factores fueron los ambientes (años) y las líneas. Las medias se compararon por el test LSD ($P=0,05$). También se realizó la correlación entre necrosis y cobertura picnidial. Se observó una correlación significativa entre el porcentaje de necrosis y cobertura picnidial, por lo tanto, sólo se utilizó el porcentaje de necrosis para proceder al análisis de QTL. Los resultados obtenidos durante los diferentes años y repeticiones se combinaron para tener una media de porcentaje de necrosis por línea. Sólo se presentan los datos de la hoja 1 en plántula que resultaron más discriminantes, ya que hubo más severidad de la enfermedad por mayor edad de la misma. Esto se realizó por separado para los valores de resistencia en plántula y estadio adulto. A continuación, los dos conjuntos de datos fueron sometidos al análisis de QTL.

4.2.3. Análisis de microsatélites y QTL's

El ADN genómico fue extraído de un grano de cada línea SCRDH, siguiendo el procedimiento de Plaschke *et al.* (1995), y se utilizó para asignar el status alélico a un set de 49 loci GWM (Gatersleben Wheat Microsatellite) mapeados en el cromosoma 7D. La metodología utilizada fue la descrita por Röder *et al.* (1998). Se construyó un mapa genético del cromosoma 7D con el software MAPMAKER v2.0 (Lander *et al.*, 1987). El análisis de QTL se llevó a cabo utilizando el programa QTX (Manly *et al.*, 2001). QTX expresa la calidad de la asignación de un QTL en forma de "likelihood ratio statistic" (LRS). Se calcularon los valores críticos mediante la realización de 1000

permutaciones de los datos fenotípicos y se realizó un ‘bootstrap’ para estimar el intervalo de confianza para los principales QTL’s. Se utilizó un mapeo de intervalos compuestos para controlar el ligamiento entre QTL’s, el cual reduce los efectos de QTL’s del fondo genético.

Resultados

4.1. Screening de los progenitores

Los resultados obtenidos a partir de las dos evaluaciones realizadas durante los tres años de ensayos y en diferentes momentos del ciclo del cultivo, se volcaron en planillas de datos.

Se observaron diferencias significativas para necrosis y cobertura picnidial entre los aislamientos, las líneas y para la interacción aislamientos $\times$ líneas. El aislamiento FALP0103 fue seleccionado en base a la mayor diferencia de severidad entre las líneas parentales en plántula y estadio adulto. ‘CS’ *T. aestivum* subsp. *spelta* 7D mostró además un cierto nivel de resistencia en plántula frente a los aislamientos FALP06792 y FALP0403, mientras que ambos padres mostraron valores similares de resistencia frente a otros aislamientos (Tablas 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1. Promedios de necrosis y cobertura picnidial causados por *Mycosphaerella graminicola* en plántula de Chinese Spring (CS) y CS (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D), testeados con 10 aislamientos.

	6792	1493	0103	0203	0303	0403	0503	0603	0703	0803
Isolates										
Líneas										
CS	40,6*	40,0	58,3	57,5	70,8	62,9	25,0	35,0	51,2	77,5
	10,0+	12,5	33,3	35,0	42,5	47,1	24,2	25,0	36,2	35,0
CS										
(<i>T.aestivum</i>	28,6	32,1	20,7	67,9	67,5	37,5	19,0	40,0	61,2	78,0
subsp.										
<i>spelta</i> 7D)	8,9	13,5	13,2	37,5	43,6	20,0	19,2	30,0	40,0	40,0

* necrosis; +cobertura picnidial. LSD para necrosis de la interacción aislamiento $\times$ línea = 10.1; LSD para cobertura picnidial =8.3

Tabla 4.2. Promedios de necrosis y cobertura picnidial causados por *Mycosphaerella graminicola* en estadio adulto Z 82) de Chinese Spring (CS) y CS (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D), testeados con 10 aislamientos.

	6792	1493	0103	0203	0303	0403	0503	0603	0703	0803
Isolates										
Líneas										
CS	38,6*	40,2	35,7	54,8	48,6	62,0	46,2	38,3	57,7	52,5
	25,1+	31,0	30,2	35,3	37,8	46,6	46,6	32,3	40,8	39,6
CS (<i>T.aestivum</i> subsp. <i>spelta</i> 7D)	27,5	35,1	15,0	45,4	50,5	55,1	55,1	36,0	52,4	60,2
	22,1	23,7	10,2	29,9	31,8	40,9	40,9	27,6	34,5	34,2

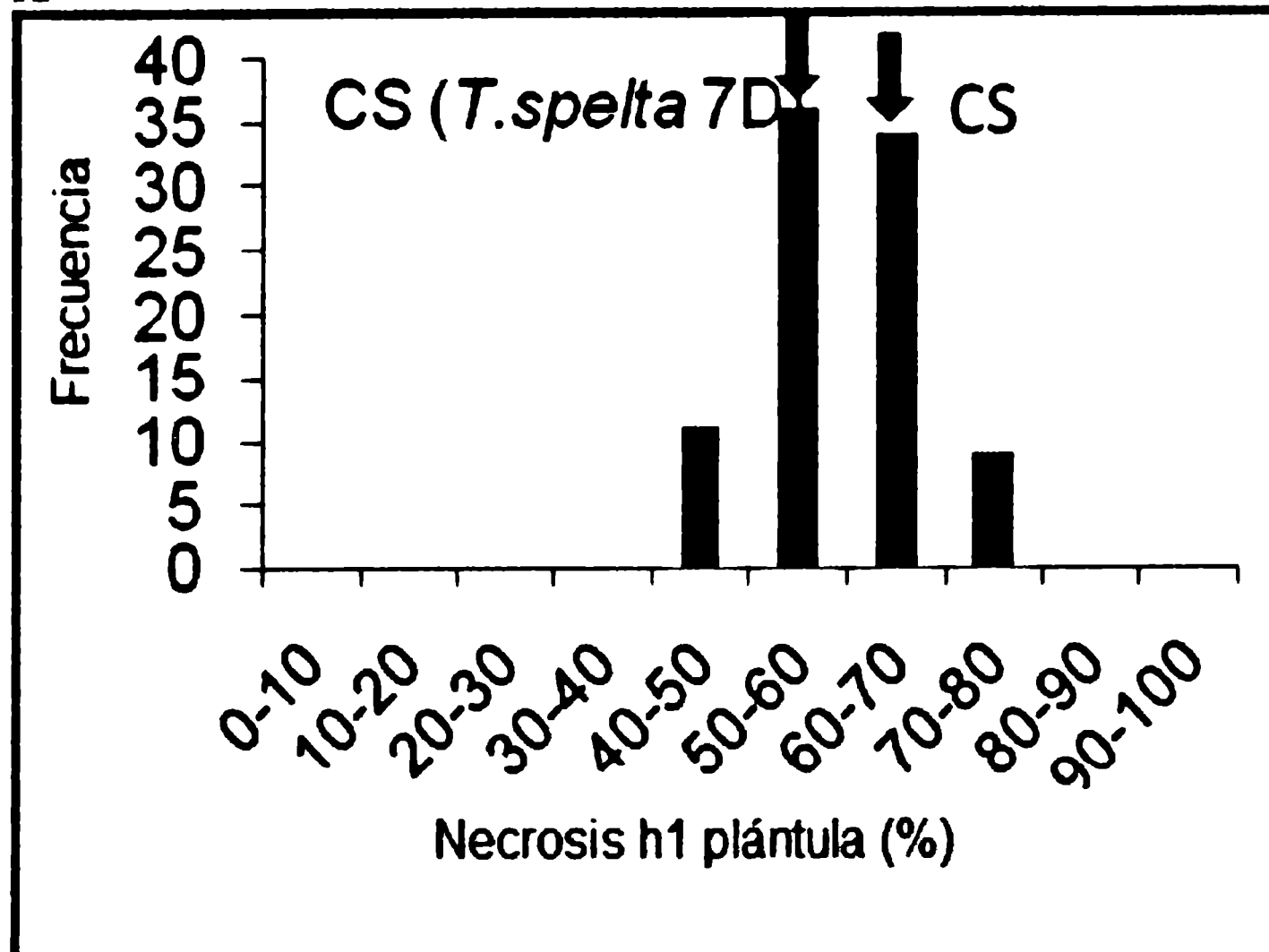
* necrosis; +cobertura picnidial. LSD para necrosis de la interacción × línea =12.2; LSD para cobertura picnidial =7.5

4.2. Mapeo de la población

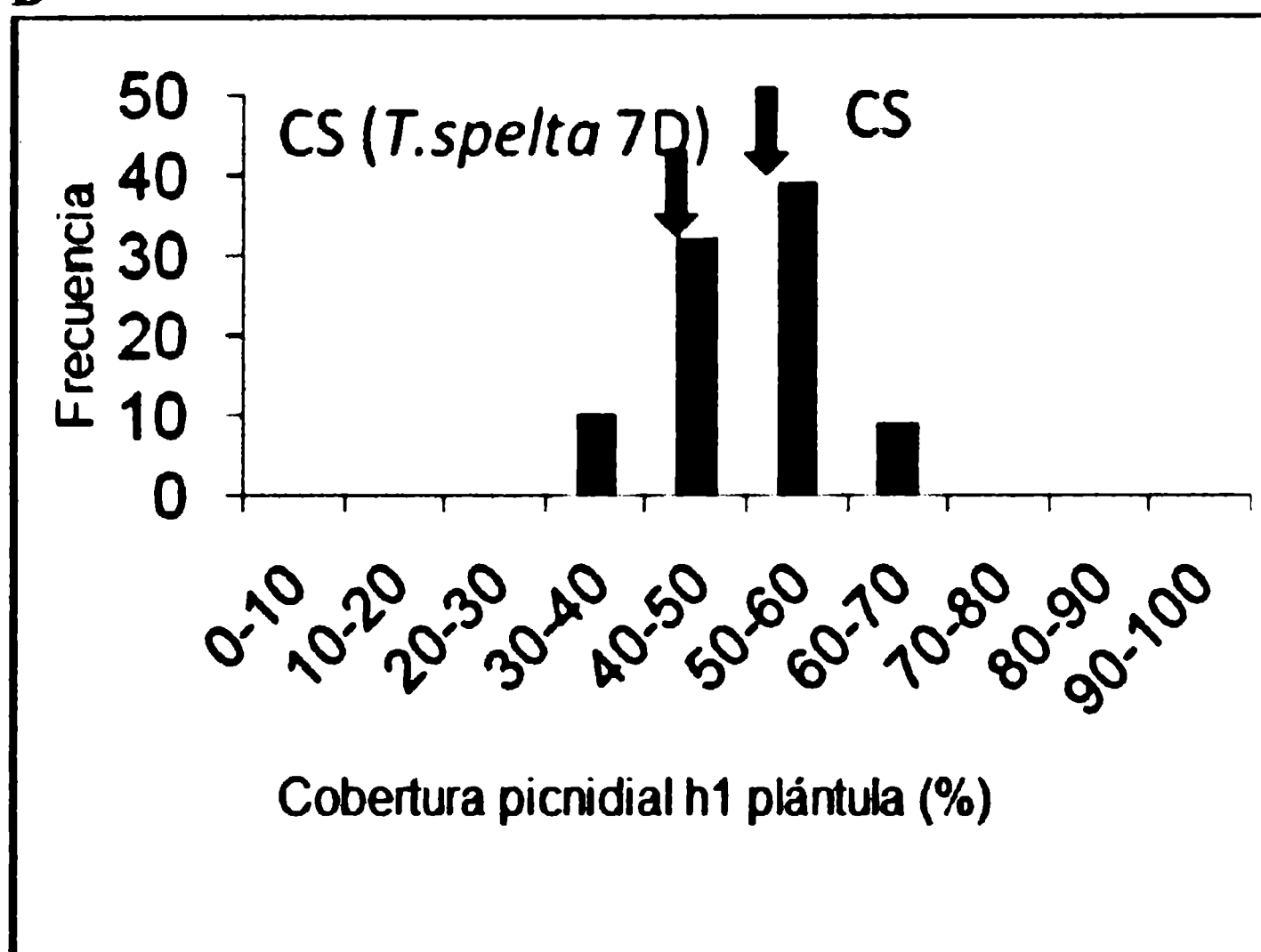
4.2.1. Test de patogenicidad

El ANVA mostró diferencias significativas para necrosis y cobertura picnidial entre ambientes y líneas, en plántula y estadio adulto. La interacción ambiente × línea no fue significativa en ningún caso. El promedio de distribución de datos sobre tres años se muestra en la Fig. 4.1. No hubo una clara segregación para ninguno de los caracteres. Para necrosis de hoja bandera hubo una segregación transgresiva: tres líneas fueron significativamente más resistentes que el padre más resistente y 22 resultaron más susceptibles que el padre más susceptible.

A



B



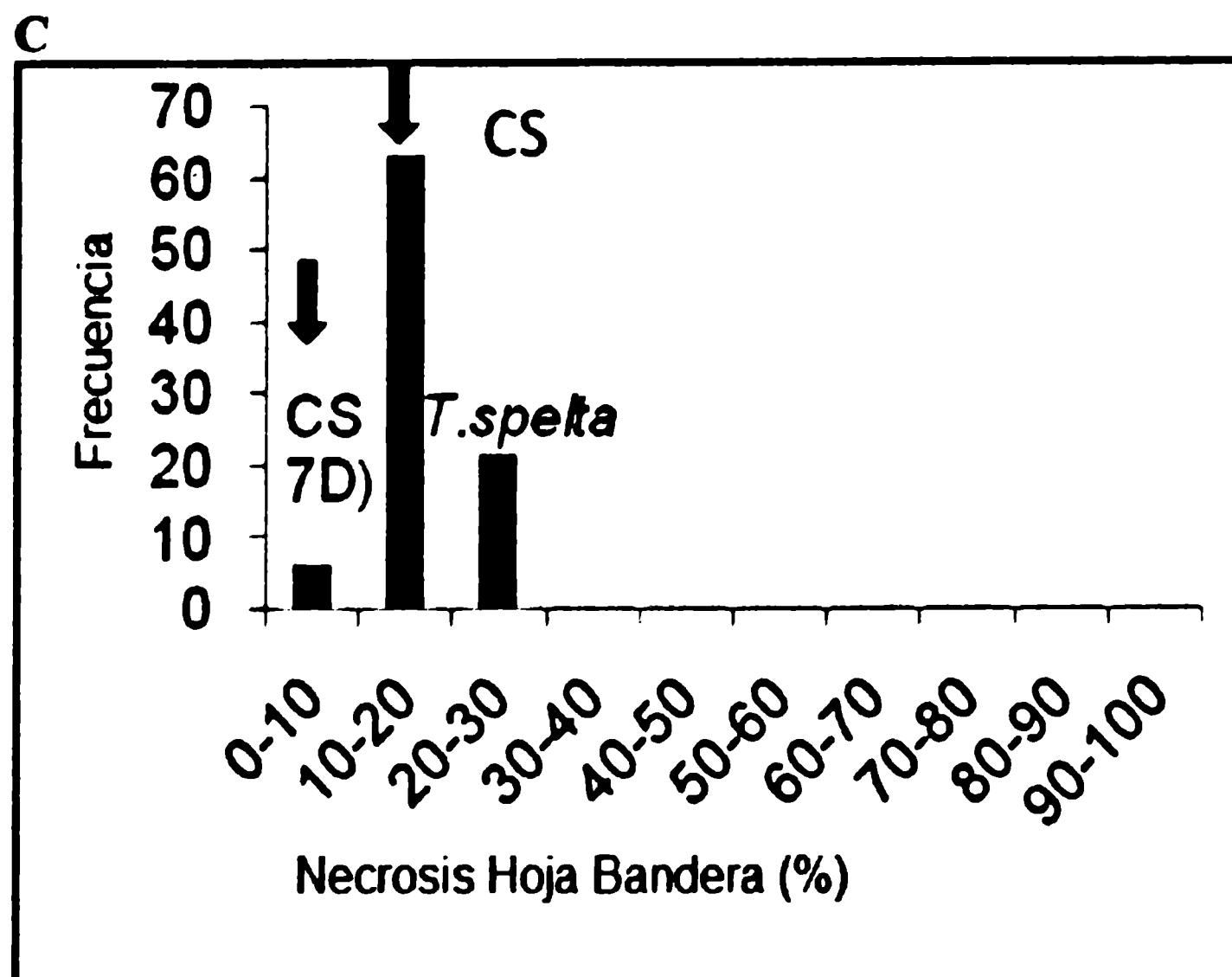


Fig. 4.1. Histogramas de promedio de severidad en tres años sobre 87 líneas doble haploides derivadas del cruzamiento de CS (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) / CS, inoculadas con *Mycosphaerella graminicola* A. Necrosis en plántula. B. Cobertura picnidial en plántula. C. Necrosis en hoja bandera.

4.2.2. Análisis de genotipos y QTL's

De los 49 loci microsatélite testeados, 16 fueron informativos para la comparación entre 'CS' y 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) y el status alélico de las líneas SCRDH en estos loci suministraron la base del mapa genético del cromosoma 7D, ilustrado en la Fig. 4.2. El análisis del mapeo de intervalos, realizado utilizando los valores de porcentaje de necrosis en plántula y adulto (Fig. 4.3), sugiere la presencia del locus de resistencia a la enfermedad en plántula, en la región centromérica ligada a *Xgwm0111* (Fig. 4.2 y 4.3a), mientras que en planta adulta, el locus de resistencia fue detectado sobre el brazo corto en la región de *Xgwm1220* (Fig. 4.2 y 4.3b). Estos loci fueron designados *QStb.ipk-7D1* y *QStb.ipk-7D2*, respectivamente. Aunque entre las dos líneas parentales de la población de mapeo, 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) mostró mayor resistencia en comparación con 'CS', en plántula y adulto, el coeficiente de regresión aditivo sugirió que 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) otorgó el alelo susceptible de la

resistencia en plántula del locus *QStb.ipk-7D1* (Fig. 4.3a), y el alelo resistente del locus *QStb.ipk-7D2* de resistencia para estado adulto (Fig. 4.3b).

Debido a que fueron detectados dos QTL's ligados, se aplicó el mapeo de intervalos compuestos para reducir los efectos de los QTL's entre ellos. Se realizó el mapeo compuesto para el carácter de resistencia en plántula, utilizando la resistencia de planta adulta como covariante (Fig. 4.4a). Lo mismo se hizo para la resistencia en estadio adulto, utilizando en forma inversa la resistencia en plántula como covariante (Fig. 4.4b). Los resultados obtenidos para el mapeo de intervalos compuestos (Fig. 4.4) fueron muy similares a los derivados del análisis de mapeo del intervalo, lo que confirma la existencia de dos QTL's de resistencia ligados en el cromosoma 7D. Así, los dos loci *QStb.ipk-7D1* y *QStb.ipk-7D2* confieren la resistencia en plántula y adulto. El primero está ubicado en la región centromérica del cromosoma 7D (Fig. 4.2 y 4.3a), donde se agrupan una serie de genes de resistencia mayores, entre ellos *Stb4* procedente de la variedad de trigo pan 'Tadinia' (Adhikari *et al.* 2004c) y *Stb5* procedente de *Aegilops tauschii* (Arraiano *et al.*, 2001b).

El análisis de intervalos compuestos de la fecha de floración no reveló valores significativos de LRS; y no se observó una correlación apreciable entre la fecha de floración y la resistencia de plántula o adulto, sugiriendo que los QTL's observados para la resistencia no están asociados con la variación en el momento de floración. Esto también fue confirmado por el mapeo de intervalos compuestos para la resistencia en plántula y adulto, utilizando la fecha de floración como covariante (Fig. 4.5).

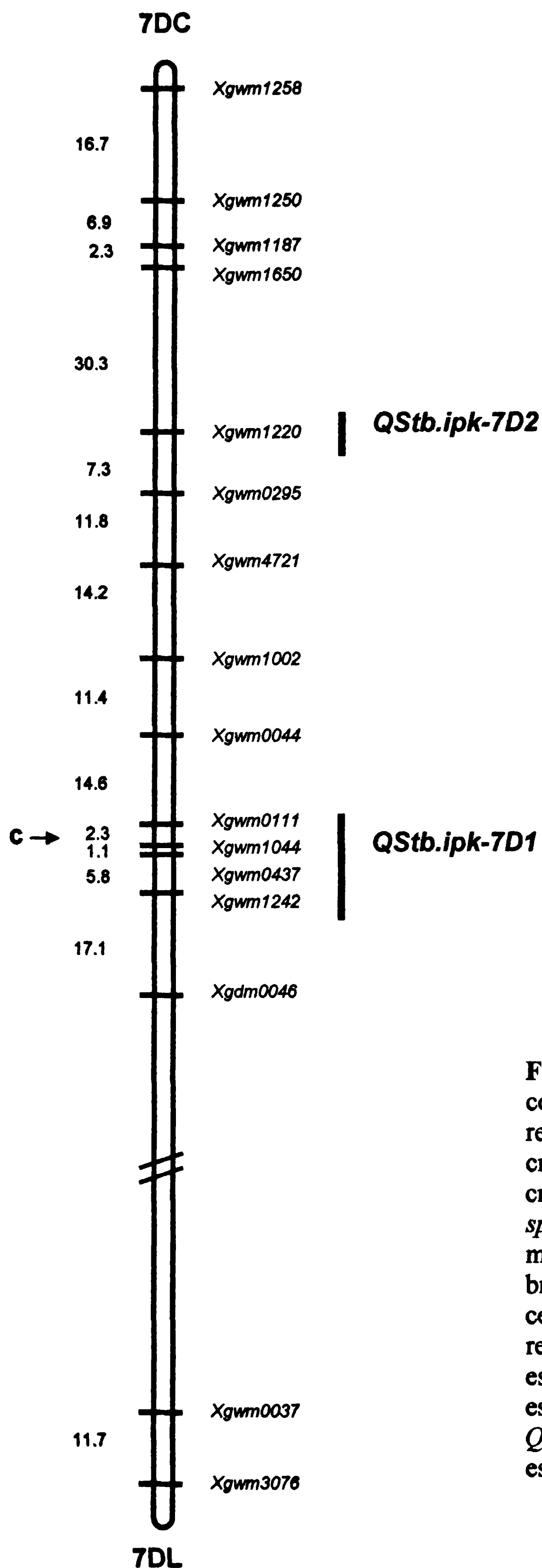


Fig. 4.2. Mapa genético del cromosoma 7D construido con un set de líneas de trigo recombinantes doble-haploides de un solo cromosoma, obtenidas a partir del cruzamiento de CS (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) / CS. Las distancias genéticas se muestran en centimorgans (cM). 7DC = brazo corto. 7DL = brazo largo. c= región centromérica. La posición de los QTLs de resistencia a *Mycosphaerella graminicola* están indicados a la derecha. *QStb.ipk-7D1* es el locus de resistencia para plántula y *QStb.ipk-7D2* es el locus de resistencia en estadio adulto.

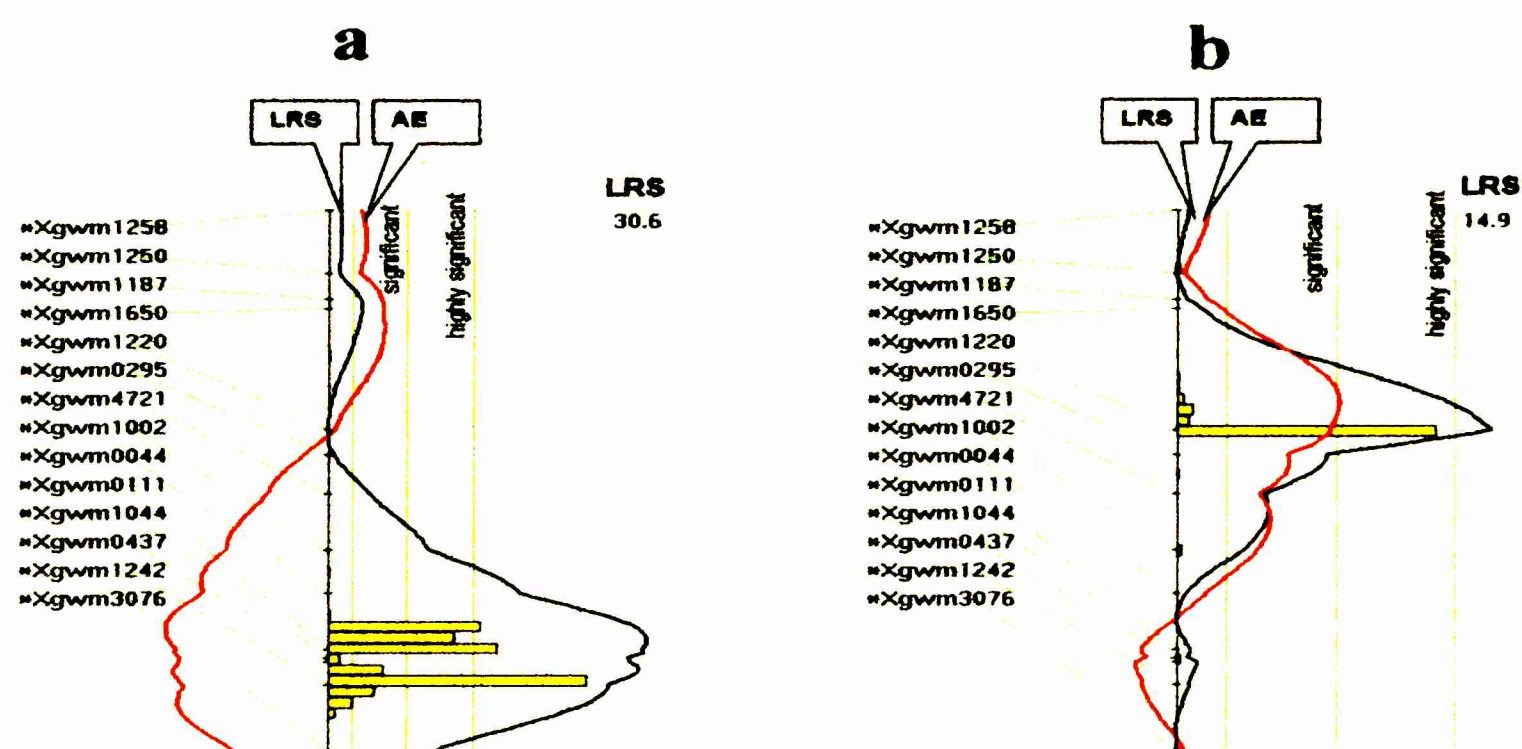


Fig. 4.3. Mapeo del intervalo de la resistencia en plántula (a) y estadio adulto a *Mycosphaerella graminicola* (b). LRS (likelihood ratio statistic). AE – Efecto aditivo “Significativo” y “altamente significativo” –LRS líneas de valores críticos. Los histogramas muestran el intervalo de confianza para los QTL’s.

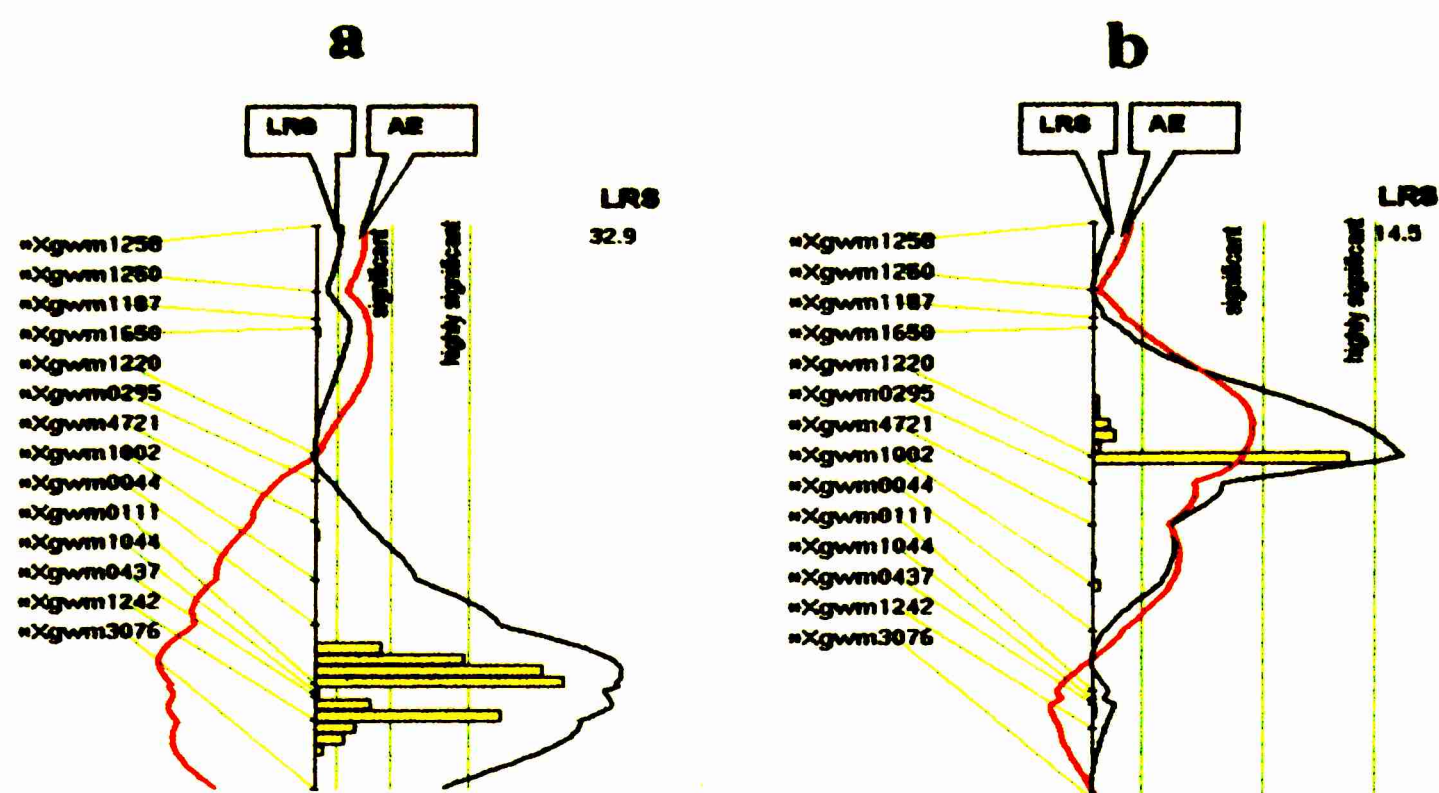


Fig. 4.4. Mapeo de intervalos compuestos en plántula (a) y estadio adulto (b), realizado utilizando la resistencia en plantas adultas y plántulas como covariantes. LRS (likelihood ratio statistic). AE– Efecto aditivo “Significativo” y “altamente significativo” –LRS líneas de valores críticos. Los histogramas muestran el intervalo de confianza para los QTL’s.

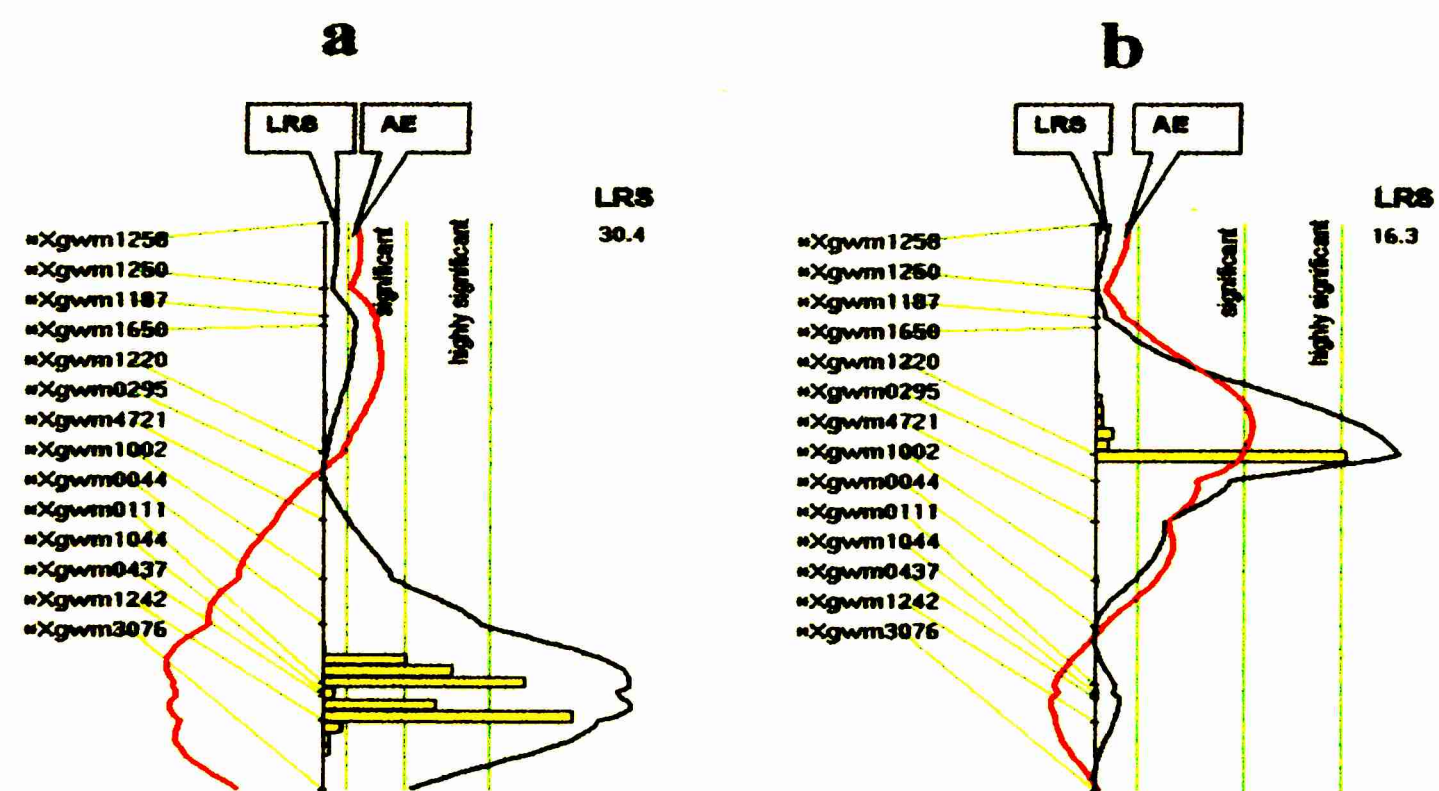


Fig. 4.5. Mapeo de intervalos compuestos de la resistencia en plántula (a) y estadio adulto (b), realizado utilizando el momento de floración para los caracteres. LRS – (likelihood ratio statistic). AE – Efecto aditivo “Significativo” y “altamente significativo” –LRS línea de valores críticos. Los histogramas muestran el intervalo de confianza para los QTL’s.

Discusión

En este capítulo se describen dos loci en el cromosoma 7D del trigo espelta que confieren resistencia a la mancha de la hoja. Curiosamente, el locus *QStb.ipk-7D2*, que confiere la resistencia en estadio adulto, mapea en la región del microsatélite *Xgwm1220*, en que se encuentra el locus de resistencia en estadio adulto *Lr34/Yr18*, efectivo a múltiples patógenos locales como la roya de la hoja, roya amarilla y mildiú pulverulento (Spielmeyer *et al.*, 2008; Krattinger *et al.*, 2009). ‘CS’ lleva el alelo de resistencia *Lr34* (Dyck, 1991). Sin embargo, en nuestro estudio, la línea parental ‘CS’ confiere el alelo susceptible para la resistencia a la mancha de la hoja. Algo similar se observó para *Lr34* y la roya del tallo: *Lr34* en ‘CS’ no confiere resistencia a la roya del tallo, mientras que si lo hace en el cultivar ‘Thatcher’ Spielmeyer *et al.* (2008) propuso que *Lr34* interactúa con genes no ligados en la base genética de ‘Thatcher’, resultando en una mayor resistencia en planta adulta a la roya del tallo.

Aunque el trigo espelta hoy es considerado como un cultivo menor, ha encontrado recientemente un nicho de mercado como un alimento saludable. Es un trigo útil como fuente de variación genética, incluyendo la resistencia a la mancha del nudo y la gluma, la roya amarilla, roya del tallo, roya de la hoja, virus del mosaico enanizante de la cebada y carbón duro o hediondo. Su harina presenta un alto contenido de vitaminas y un mejor valor nutricional que la de *T. aestivum* (Campbell, 1997). Debido a que el trigo espelta es hexaploide, puede cruzarse libremente con *Triticum aestivum* y además usarse fácilmente como donante para mejorar la resistencia a las enfermedades y otros caracteres valiosos.

La resistencia a la mancha de la hoja, mapeada en el cromosoma 7D, parece ser aislamiento-específica ya que *T. aestivum* subsp. *spelta*, utilizado para crear la línea ‘CS’ (*T.aestivum* subsp. *spelta* 7D), tiene un buen nivel de resistencia para el aislamiento FALP0103, en plántula y estadio adulto, cierta resistencia a FALP9267 y FALP0403 en plántula, pero no presenta resistencia a los otros siete aislamientos probados. *Stb4* fue efectivo en California por más de 15 años y hasta el final de la década de 1990 (Jackson *et al.*, 2000). La reproducción sexual de *M. graminicola* es conocida en California, junto con altos niveles de diversidad genética detectada entre las poblaciones por marcadores moleculares (Chen & McDonald, 1996). A pesar de esto,

Stb4 todavía puede ser útil en combinación con otros genes de resistencia a la mancha de la hoja en USA, o en zonas donde las poblaciones del patógeno tienen una diferente composición. Además *Stb5*, fue identificado usando el aislamiento de *M. graminicola* IPO94269 y mapeado en el brazo corto del cromosoma 7D, cerca del centrómero, en una población de líneas homocigotas recombinantes del cromosoma 7D del trigo hexaploide 'synthetic 6x' (Arraiano, 2001b). Además, Simón *et al.* (2007) encontró que este gen fue también efectivo a dos aislamientos argentinos del patógeno.

Bajo condiciones de invernáculo, temperaturas de 17 a 25°C son óptimas para el desarrollo de la enfermedad (Hess & Shaner, 1987). Sin embargo, en el campo, en muchas áreas de cultivo del trigo donde la mancha de la hoja del trigo es una enfermedad importante, las temperaturas se encuentran bajo esos valores especialmente en la fase de plántula. Durante las estaciones de crecimiento, cuando este trabajo fue llevado a cabo, las temperaturas estaban por debajo del rango óptimo. Aunque el tiempo para la evaluación se retrasó, el nivel de infección fue bueno, principalmente debido al nivel de humedad aceptable.

El inesperado resultado del análisis de QTL's, que determinó que 'CS' (*T.aestivum* subsp. *spelta* 7D) confiere el alelo susceptible del locus *QStb.ipk-7D1* (Figura 4.3), sugiere un efecto del fondo genético. Un efecto similar se observó durante el análisis de QTL's realizado para otros caracteres (Pshenichnikova *et al.*, 2008). Aunque una línea de sustitución cromosómica suele tener ocho retrocruzas en el curso de su desarrollo, se ha demostrado que ésto puede no ser suficiente para reconstituir completamente la base genética (Khlestkina *et al.*, datos no publicados). Así, el uso de una línea de sustitución cromosómica en el actual análisis, no puede excluir completamente la posibilidad del efecto del fondo genético de otros cromosomas originarios del padre donante (*T. aestivum* subsp. *spelta*). Otros cromosomas que contribuyen a la resistencia de *T. aestivum* subsp. *spelta* son 6D, 2D, 5A, 6B y 5D (Simón *et al.*, 2005b). Así, el uso del alelo *QStb.ipk-7D1* de *T. aestivum* subsp. *spelta*, como una nueva fuente de resistencia en plántula, está limitado a la combinación con otros loci de resistencia de *T. aestivum* subsp. *spelta*. A diferencia de ésto, el alelo resistente del locus *QStb.ipk-7D2* es conferido por la línea parental 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) (Fig. 4.3b), sugiriendo que este alelo de resistencia confiere resistencia en estadio adulto y puede ser usado como una nueva fuente de resistencia de planta adulta frente a la mancha de la hoja.

La resistencia a *M. graminicola* se puede expresar en plántula o adulto, o en ambos. Existen cultivares con resistencia específica a aislamientos en ambos estadios de la planta, mientras que otros sólo muestran resistencia en uno de los dos estadios (Kema & van Silfhout, 1997). Además, existen cultivares que tienen un nivel razonable de resistencia cuantitativa en ambos estadios de la planta, mientras que otros muestran resistencia en plántula pero son totalmente susceptibles en estadio adulto, o viceversa (Simón *et al.*, 2005a). Del mismo modo, se han identificado algunos QTL's que son específicos para uno de los estadios (McIntosh, 2008). La ventaja particular de ambos QTL's en el cromosoma 7D que se describe aquí es que son eficaces en ambos estadios de desarrollo de la planta.

Se encontró que la asociación entre la resistencia y la floración tardía, en general, es causada por factores epidemiológicos (Simón *et al.*, 2005a, Van Beuningen & Kohli, 1990). Sin embargo, no se había investigado el ligamiento genético entre estos caracteres a través de marcadores moleculares. En este trabajo hubo variación de la fecha de floración dentro de la población mapeada, pero no estuvo asociada con los QTL's condicionando resistencia en el cromosoma 7D, lo que demuestra que no existen ligamientos entre esta particular resistencia y la fecha de floración. Esa falta de correlación es alentadora desde el punto de vista del mejoramiento, ya que permite la mejora de la resistencia a la mancha de la hoja independientemente del momento de floración.

CAPITULO 5

Discusión general y recomendaciones

La importancia económica de la mancha de la hoja del trigo se puede atribuir principalmente a la predominancia de cultivares moderadamente susceptibles o susceptibles en los sistemas de cultivo, al aumento de la siembra directa en las últimas décadas y al escaso o inadecuado manejo de la enfermedad. El mejoramiento del trigo está enfocado a la obtención de cultivares ampliamente adaptados, con resistencia a enfermedades, buena calidad panadera y altos rendimientos estables a través de un amplio rango de ambientes. Incorporar resistencia a los principales patógenos es una prioridad ya que no es posible lograr rendimientos estables sin adecuada resistencia a las principales enfermedades (Rajaram, 1999).

La resistencia genética es una alternativa de control sustentable, con bajo costo y sin impacto sobre el medio ambiente. Además determina el éxito de otras estrategias de control. Para incrementar la resistencia genética es de fundamental importancia la caracterización de aislamientos del patógeno que interactúan diferencialmente con genotipos hospedantes, así como también la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia en el trigo y la identificación de marcadores moleculares que faciliten la incorporación a los mejoradores de dicha resistencia. La discusión general de esta tesis brinda una descripción general sobre la genética de la resistencia a la mancha de la hoja del trigo y la oportunidad de la aplicación de los resultados obtenidos en futuros programas de mejoramiento de este cereal.

Existe una alta variabilidad genética del patógeno que es diferente en cada lugar del mundo y que además cambia constantemente debido a la aparición rápida de nuevos genotipos. Las diferencias en todo el mundo pueden atribuirse a la variación en la recombinación regular, los diferentes patrones de migración, presencia e importancia de la forma sexual. La reproducción sexual, aumenta la recombinación genética en las poblaciones de este hongo, creando un gran número de aislamientos genéticamente diferentes. La forma sexual de *M. graminicola* fue hallada en la mayoría de las zonas trigueras del mundo y también en Argentina (Cordo *et al.*, 1990). Cordo *et al.* (2006) estableció que en las poblaciones de este patógeno existe una alta tasa de recombinación sexual.

Hasta el momento los estudios sobre la variabilidad genética del patógeno en Argentina habían sido escasos, con resultados parciales o realizados sobre áreas más restringidas del país. Se habían realizado pruebas de virulencia con diferentes aislamientos y cultivares (Cordo & Arriaga, 1990; Perelló *et al.*, 1990b; Simón & Cordo, 1997; Cordo *et al.*, 1998; Simón 2003; Simón *et al.*, 2005a), o caracterizaciones

moleculares parciales de aislamientos (Cordo *et al.*, 2006; Jürgens *et al.*, 2006), pero no se había realizado la caracterización molecular y de virulencia para el mismo set de aislamientos. En este trabajo se conoce que cada aislamiento es genotípicamente diferente y corresponde a un agrupamiento diferente en el cluster, de manera que también están distanciados genéticamente. De esta manera el comportamiento de los cultivares argentinos y materiales con genes conocidos y líneas diferenciales, es probado con un set de aislamientos muy diferentes entre sí.

Esta tesis, permitió ampliar el conocimiento acerca de la diversidad genética del patógeno en nuestro país, ya que se trabajó con aislamientos de distintas subregiones de la Región Triguera Argentina. Mediante el uso de marcadores moleculares ISSR, pudimos detectar un alto grado de variabilidad genotípica dentro de la población de *M. graminicola* (capítulo 2), ya que encontramos un 98% de genotipos diferentes en el total de aislamientos sometidos al análisis molecular. Además se observó una tendencia a que los aislamientos con patrones moleculares similares se agruparan en la misma subregión triguera, diferenciándose de los de otras subregiones. Si bien es necesario seguir investigando en este sentido para saber si realmente existen diferencias entre los aislamientos de las diferentes zonas, esto resultaría de particular importancia para conocer si los cultivares difieren en su comportamiento con los aislamientos de las diferentes regiones trigueras. En las pruebas de virulencia, se observó que en general los aislamientos de la Subregión IV, los cuales se agruparon por las pruebas moleculares en el cluster I, mostraron similares patrones de virulencia, a diferencia de lo que ocurrió con los de la Subregión II Sur, algunos de los cuales fueron similares en cuanto a virulencia pero se presentaron muy diferentes molecularmente, perteneciendo a diferentes clusters. Así, por ejemplo los aislamientos 201 (cluster VIII), 205 (cluster IV) y 230 (cluster XI) presentaron similares patrones de virulencia. Dichos resultados podrían emplearse con fines futuros de mejorar el germoplasma de trigo en nuestro país.

La resistencia a *M. graminicola* se puede expresar en plántula o adulto, o en ambos. Existen cultivares con resistencia específica a aislamientos en ambos estadios, mientras que otros sólo muestran resistencia en uno de los dos estadios (Kema & van Silfhout, 1997). Además, existen cultivares que tienen un nivel razonable de resistencia cuantitativa en ambos estadios de la planta, mientras que otros muestran resistencia en plántula pero son totalmente susceptibles en estadio adulto, o viceversa (Simón *et al.*, 2005a).

Sobre los ensayos realizados, algunos materiales foráneos que evidenciaron buen comportamiento en otros lugares del mundo como TE 9111 (Brown *et al.*, 2001; Chartrain *et al.*, 2004a; 2005b); Oasis (Patterson *et al.*, 1975; Adhikari *et al.*, 2004a;) y IAS 20 (Rosielle & Brown 1979; Gilchrist, 1999), mostraron también altos niveles de resistencia en plántula y estadio adulto, al ser probados con nuestros aislamientos, indicando que nuestros aislamientos poseen genes de avirulencia para los genes *Stb1*, *Stb6*, *Stb7* y *Stb11*. Otros como Tonic sólo presentaron resistencia en plántula, de manera similar a lo encontrado por Chartrain *et al.* (2009).

Algunos materiales como Saratovskaja 19 y Janetzki Probat que fueron susceptibles, se habían incluido entre los materiales para determinar si diferían en cuanto a resistencia, porque son progenitores de un set de líneas recombinantes ya caracterizadas molecularmente. No se obtuvieron diferencias notorias entre ellos en las pruebas de virulencia, mostrándose como susceptibles sobre todo en plántula. Para el caso de Capelle, que resultó susceptible en planta adulta en nuestro trabajo, otras investigaciones demostraron que mostró valores de susceptibilidad en estado adulto (Simón *et al.*, 2004). En Estanzuela Federal (*Stb7*) (Chartrain *et al.*, 2005a), algunos trabajos realizados con anterioridad (Germán *et al.*, 1987) determinaron que esta línea diferencial presentaba un buen comportamiento. En nuestro estudio fue resistente frente a algunos aislamientos en plántula y adulto.

Por lo tanto es importante resaltar que las líneas que se mostraron resistentes en ambos estadios de la planta frente a la mayoría o todos los aislamientos probados, presentan genes de resistencia específica y es probable que contengan también resistencia parcial frente a nuestros aislamientos. Otras líneas como Estanzuela Federal, evidenciaron que sólo contienen genes de resistencia específica ya que sólo se mostraron resistentes frente a algunos aislamientos en ambos estadios.

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 para Flame (*Stb6*), no se correspondieron con los de otros autores, ya que la mayoría de los trabajos realizados con esta línea demostraron que Flame fue siempre resistente (Brading *et al.*, 1999; Chartrain *et al.* 2005c). Si bien para cobertura picnidial tuvo valores bajos, la necrosis fue alta para todos los aislamientos excepto frente al 20, 205, 244 y 248. Ya que es conocido que en estos ensayos la baja humedad ambiental condujo a una baja cantidad de picnidios, puede considerarse que el comportamiento de Flame frente a nuestros aislamientos es diferente que en otras regiones del mundo. La importancia de que las líneas diferenciales de todos los lugares del mundo sean probadas con aislamientos de

distintos orígenes radica en que estas líneas puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento del trigo a nivel internacional.

Por otro lado, entre los cultivares nacionales testeados con los 16 aislamientos elegidos, Klein Volcán fue el que mostró los valores más bajos de necrosis y cobertura picnidial en plántula y estadio adulto, evidenciando aceptables niveles de resistencia para todos los aislamientos probados, lo que asumimos como resistencia parcial. Además mostró resistencia específica frente a algunos aislamientos. La resistencia parcial también se observó para Klein Dragón en plántula y para Buck 75 Aniversario en planta adulta. Estos dos últimos cultivares también presentaron resistencia completa a ciertos aislamientos. Sin embargo, el resto de los cultivares de nuestro país, seleccionados por su nivel de resistencia, en general presentaron aceptables niveles de resistencia para las dos variables evaluadas y para los dos estadios de la planta. Arama (1996) y Simón (2003) también encontraron cultivares con resistencia combinada en los estadios de plántula y adulto. Kema & van Silfhout (1997) indicaron que no todos los aislamientos responden de manera similar a la infección en diferentes momentos del ciclo de la planta. Al igual que lo obtenido por Simón (2003), se observaron interacciones específicas cultivar x aislamiento al probar los 16 aislamientos sobre las 23 líneas y cultivares de trigo. Aunque la mayoría de los estudios previos se han concentrado sobre las interacciones cultivar x aislamiento en estadio de plántula (Eyal *et al.*, 1985; Perelló *et al.*, 1991; Ahmed *et al.*, 1995; Ballantyne & Thomson, 1995; Kema *et al.*, 1996a, b), algunos de ellos también indicaron interacciones en adulto (Kema & van Silfhout, 1997; Brown *et al.*, 2001).

En base a nuestros resultados obtenidos en el capítulo 3, podemos inferir que Klein Volcán, Buck 75 Aniversario y Klein Dragón presentan factores de resistencia cuantitativa o parcial para nuestros aislamientos y quizás también podrían contener genes de resistencia específicos, por similitud con los patrones obtenidos en la línea extranjera TE 9111. Determinar la localización de los QTL's que condicionan esta resistencia parcial y la localización de los genes de resistencia específicos empleando marcadores moleculares, será tema de futuras investigaciones realizando cruzamientos entre cultivares locales susceptibles y resistentes. En este sentido, esta tesis permitirá emprender nuevos estudios que permitan el conocimiento de la base genética de la resistencia en nuestros cultivares, el cual no es conocido, y el planeamiento de cruzamientos determinados para incorporar mayor resistencia.

En el contexto de lograr mayor resistencia en los materiales extranjeros y locales del trigo pan (*T. aestivum* L.), se plantea la posibilidad de buscar nuevas fuentes de resistencia en materiales que no hayan sido estudiados hasta el momento. En este camino, el trigo espelta (*T. aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell) está estrechamente relacionado con el trigo pan (*T. aestivum* L.), es hexaploide y puede cruzarse libremente con él. Este trigo fue ampliamente utilizado en Europa hasta comienzos del siglo 20, sin embargo, debido a que presenta un bajo potencial de rendimiento y alta susceptibilidad, fue reemplazado casi por completo por *T. aestivum* L. Este bajo rendimiento se asoció con altos niveles de proteína en el grano de trigo, lo cual hace que tenga una menor calidad panadera (Campbell, 1997). Además presenta algunas características ventajosas como el mayor valor nutricional en sus productos derivados y constituye una fuente importante de resistencia genética a varias enfermedades como la roya del tallo (McVey & Leonard, 1990), la roya amarilla (Kema, 1992) y la mancha de la hoja (Simón *et al.*, 2005b). Asimismo presenta mejor adaptación que el trigo pan a condiciones de suelos húmedos y fríos y a las grandes altitudes (Campbell, 1997). Por estas características el trigo espelta podría usarse fácilmente como donante para mejorar la resistencia a las enfermedades y otros rasgos valiosos de *T. aestivum*. La información sobre la resistencia a *Septoria tritici* en esta subespecie es escasa. Simón *et al.* (2005b) identificó en líneas de sustitución, que el cromosoma 7D del trigo espelta portaba resistencia a *Septoria tritici*.

En este trabajo y trabajando en colaboración con el Dr. Andreas Börner del IPK (Alemania), se pudo realizar la localización de la resistencia en el cromosoma 7D de *Triticum aestivum* subsp. *spelta* sobre un set de líneas de trigo doble-haploides recombinantes cromosómicas (SCRDH), las que se obtuvieron del cruzamiento de la F1 de 'CS' (*T. aestivum* subsp. *spelta* 7D) / 'CS' con maíz. Se identificaron dos locus de resistencia para *M. graminicola*, *QStb.ipk-7D1* en plántula, ubicado en la región del centrómero del cromosoma 7D; y *QStb.ipk-7D2* en estadio adulto, localizado en el brazo corto de este mismo cromosoma.

Además, se sabe que los brazos cortos de los cromosomas 7B y 7D del trigo espelta llevan factores que interactúan para influir en la resistencia a *Puccinia striiformis* (Pink & Law, 2009). Por lo tanto, esta subespecie representa una fuente importante para la incorporación de la resistencia en trigo a otras enfermedades, además de la mancha de la hoja. Consideramos que debido a la escasa información que se tiene, aún quedan muchas investigaciones por realizar en *T. aestivum* L. subsp. *spelta*.

Nuestros resultados determinaron también que la fecha de floración dentro de la población mapeada, no estuvo asociada con los QTL's condicionando resistencia sobre el cromosoma 7D, lo que demuestra que no existen ligamientos entre esta particular resistencia y la fecha de floración. Esa falta de correlación es alentadora desde el punto de vista del mejoramiento, ya que permite la mejora de la resistencia a la mancha de la hoja independientemente del momento de floración.

El conocimiento acerca de la localización precisa de los genes de resistencia y de los locus donde se ubican esos genes en *T. aestivum* L. subsp. *spelta*, son importantes herramientas en programas de selección y mejoramiento del trigo. Si bien el trigo espelta es considerado como un cultivo menor, puede ser de gran utilidad en el mejoramiento del trigo pan, cruzándose fácilmente con él y utilizándose como fuente de variación genética en la resistencia a enfermedades.

A partir del mejoramiento genético del trigo, podemos contribuir al sistema de manejo integrado de las enfermedades, evitando o disminuyendo el uso de productos químicos que producen un deterioro en el medio ambiente.

Futuras investigaciones

A partir de esta tesis se plantean futuros estudios en el tema:

- Continuar con la caracterización molecular de aislamientos de *M. graminicola* en otras subregiones trigueras de nuestro país que no fueron incluidas en esta tesis (Ej: Subregión II Norte, III, V Norte y V Sur), ampliando aun más el conocimiento sobre los genotipos del patógeno, mediante el uso de marcadores moleculares.
- Localizar resistencia (identificación de genes y QTL's) en otros materiales foráneos y especialmente en cultivares de nuestro país en los cuales se ha detectado un buen nivel de resistencia (Klein Volcán, Buck 75 Aniversario, Klein Dragón), de manera de lograr una mejor adaptación de nuestros materiales en el campo.
- Evaluar el complemento de la resistencia parcial con la presencia de tolerancia en algunos cultivares.

Bibliografía

- Adhikari, T.B., Anderson, J.M. & Goodwin, S.B. 2003. Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 93: 1158- 1164.
- Adhikari, T.B., Yang, X., Cavaletto, J.R., Hu, X., Buechley, G., Ohm, H.W., Shaner, G. & Goodwin, S.B. 2004a. Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 944-953.
- Adhikari, T.B., Wallwork, H. & Goodwin S.B. 2004b. Microsatellite markers linked to the *Stb2* and *Stb3* genes for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Crop Science* 44: 1403-1411.
- Adhikari, T.B., Cavaletto, J., Dubcovsky, J., Gieco, J.O., Schlatter, A.R. & Goodwin, S. 2004c. Molecular mapping of the *Stb4* gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Phytopathology* 94: 1198-1206.
- Ahmed, H.U., Mundt, C.C. & Coakley, S.M. 1995. Host-pathogen relationship of geographically diverse isolates of *Septoria tritici* and wheat cultivars. *Plant Pathology* 44: 838-847.
- Annone, J.G. 1990. Importancia y distribución de *Septoria* spp. En: Kohli, M.M. y van Beuningen, T. (eds.). Conferencia Regional sobre Septorios. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Institut voor Planten-ziektenkunding Onderzoek. Asunción. Paraguay. En Argentina pp. 9-14.
- Annone, J.G. 2000. Guía práctica para la toma de decisiones en el uso de fungicidas en trigo. EEA INTA Pergamino. Buenos Aires. 32 pp.
- Annone, J.G. 2004. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: Su importancia relativa en las regiones productoras Norte y Sur. Actas Congreso “A Todo Trigo”. Mar del Plata. Argentina. pp. 53-58.
- Annone, J.G. 2006. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: su importancia relativa en las regiones productoras Norte y Sur. Actas Congreso “A Todo Trigo”. Mar del Plata. Argentina. pp. 53-58.
- Annone, J.G. & Frutos, E. 1988. Estimación del efecto del “golpe blanco” del trigo (*Fusarium graminearum*) sobre la producción de granos de un grupo de variedades comerciales. EEA INTA. Pergamino, Buenos Aires. Información Técnica N° 218.

- Annone, J. & García, R. 2005. Trigo. Panorama sanitario de la campaña 2004/2005 y perfil sanitario de cultivares de trigo en la región norte de Buenos Aires. Informe EEA INTA Pergamino. 3 pp.
- Annone, J., Calzolari, A., Polidoro, O. & Conta, H. 1991. Efecto de la mancha de la hoja causada por *Septoria tritici* sobre el rendimiento. INTA EEA Pergamino. Informe N° 122. 4 pp.
- Annone, J., Conta, H., Polidoro, O. & Calzolari, A. 1993. Información adicional sobre el efecto de ‘mancha de la hoja’ causada por *Septoria tritici* sobre los rendimientos. INTA EEA Pergamino. Informe N° 146. 5 pp.
- Annone, J.G., Garcia, R., Botta G. & Ivancovich, A. 2001. Pérdidas de rendimientos ocasionadas por la “roya de la hoja” y la “mancha amarilla” del trigo: estimaciones en el norte de la provincia de Buenos Aires. Revista de tecnología Agropecuaria, Vol. VI. N° 16: 21-23.
- Arama, P.F. 1996. Effects of cultivar, isolate and enviroment on resistance of wheat to septoria tritici blotch in Kenya. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 115 pp.
- Arraiano, L.S., Brading, P.A. & Brown, J.K.M. 2001a. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. Plant Pathology 50: 339-346.
- Arraiano, L.S., Worland, A.J., Ellerbrook, C. & Brown, J.K.M. 2001b. Chromosomal location of a gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat ‘Synthetic 6x’. Theor. Appl. Genet. 103: 758–764.
- Arraiano, L. S., Brading, P. A., Dedryver, F. & Brown, J. K. M. 2006. Resistance of wheat to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) and associations with plant ideotype and the 1BL–1RS translocation. Plant Pathology 55: 54–61.
- Arraiano, L.S., Brading, P.A., Dedryver, F. & Brown, J.K.M. 2007. Resistance of wheat to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) and associations with plant ideatype and the 1BL-1RS translocation. Plant Pathology 55: 52-61.
- Ballantyne, B. & Thomson, F. 1995. Pathogenic variation in Australian isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Austral. J. Agric. Res. 46: 921-934.
- Banke, S. & McDonald, B.A. 2005. Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Ecology 14: 1881-1896.

- Banke, S., Peschon, A. & McDonald, B.A. 2004. Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. *Fungal Genet. Biol.* 41: 226-238.
- Bradding, P.A., Kema, G.H.J. & Brown, J.K.M. 1999. A possible gene-for-gene relationship for *Septoria tritici* leaf blotch resistance in wheat. In: van Ginkel, M., McNab, A., Krupinsky, J. (eds.): *Septoria and Stagonospora diseases of cereals. A compilation of global research*. CYMMYT, México. pp. 54-55.
- Brading, P.A., Verstappen, E.C.P., Kema, G.H.J. & Brown, J.K.M. 2002. A gene for gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92: 439-445.
- Boeger, J.M. & McDonald, B.A., 1991. Genetic diversity at RFLP loci in an Oregon *Septoria tritici* population. *Phytopathology* 74: 1161-1166.
- Boeger, J.M., Chen, R.S. & McDonald, B.A. 1993. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology* 83: 1147-1154.
- Börner, A., Simón, M.R., Röder, M.S., Ayala, F.M. & Cordo, C.A. 2003. Molecular mapping of QTLs determining resistance/ tolerance to biotic and abiotic stress in hexaploid wheat. *Proceedings Xth International Wheat Genetic Symposium* pp. 331-333.
- Bornet, B. & Branchard, M. 2001. Nonanchored inter sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Rep.* 19: 209-215.
- Brosius, S.C., Frank, J.A. & Frederik, J.R. 1985. Influence of winter wheat management practices on the severity of powery mildew and *Septoria tritici* blotch in Pennsylvania. *Phytopathology* 75: 538-542.
- Brown, J.K.M. 1996. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist* 133: 183-195.
- Brown, J.K.M., Kema, G.H.J., Forrer, H.R., Verstappen, E.C.P., Arraiano, L.S., Brading, P.A., Foster, E.M., Fried, P.M. & Jenny, E. 2001. Resistance of wheat cultivars and breeding lines to *Septoria tritici* blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials. *Plant Pathol.* 50: 325-338.
- Browning, J.A. 1979. Genetic protective mechanisms of plant pathogen populations: Their coevolution and use in breeding for resistance. In: Harris, M.K. (ed.): *Biology and Breeding for resistance*. Texas A y M University Press, College Station, Texas. Publ. MP-1451. pp. 52-57.

- Brule-Babel, A.L. 2007. Personal Communications. Integrated Wheat Science Database Komugi.
- Bruno, H.H. & Nelson, L.R. 1990. Partial resistance to septoria glume blotch resistance in wheats. *Crop Sci.* 30: 54-59.
- Bynes, B.H. & Bumb, B.L. 1998. Population growth, food production and nutrient requirements. *J. Crop.* 2: 1-27.
- Calderini, D.F. 2006. El rendimiento de trigo en el mundo y la brecha entre el rendimiento potencial y el alcanzado: ¿Como aumentar el rendimiento alcanzable? Universidad Austral de Chile. Actas Congreso: A Todo Trigo, Conocimiento y Producción. Federación de Centros y Entidades Gremiales de Acopiadores de Cereales. Mar del Plata, Argentina. pp. 1-6.
- Campbell, K.G. 1997. *Spelt: Agronomy, Genetics and Breeding*. Janick, J., Wiley y Sons. J. (ed.): *Plant Breeding Reviews*. 15: 187–213.
- Carmona, M.A. 2001. Manual para el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de trigo. Carmona, M. (ed.). Argentina. 32 pp.
- Carmona, M.A. 2005. Estrategias para el manejo de fungicidas: su relación con la generación del rendimiento del cultivo de trigo. Acta Primera Jornada Regional de Fungicidas y Tecnología de Aplicación del Cono Sur. “Porque sobre Fungicidas y su Aplicación queda mucho por aprender y aún más por venir”. Rosario. pp. 25.
- Carmona, M., Reis, E.M. & Cortese, P. 1999a. Manchas foliares del trigo: Mancha amarilla y Septorios de la hoja- diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo. BASF Argentina S.A. pp. 32.
- Carmona, M.A., Cortese, P., Moschini, R., Pioli, R., Ferrazzini, M. & Reis, E. 1999b. Economical damage Threshold for fungicide control of leaf blotch and tan spot of wheat in Argentina. XIVth International Plant Protection Congress. Jerusalem, Israel. 119 pp.
- Cassman, K.G. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings National Academy of Science (USA)* 96: 5952-5959.
- Chartrain, L. 2004. Genes for isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in wheat. PhD thesis, John Innes Centre, University of East Anglia, Norwich, UK, 151 pp.
- Chartrain, L., Brading, P.A., Widdowson, J.P. & Brown, J.K.M., 2004a. Partial resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* 94: 497-504.

- Chartrain, L., Brading, P.A., Makepeace, J.C. & Brown, J.K.M. 2004b. Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathol.* 53: 454–460.
- Chartrain, L., Berry, S.T. & Brown, J.K.M. 2005a. Resistance of the wheat line Kavkaz-K4500 L.6.A.4. to septoria tritici blotch controlled by isolate-specific resistance genes. *Phytopathology* 95: 664-671.
- Chartrain, L., Joaquin, P., Berry, S.T., Arraiano, L.S., Azanza, F. & Brown, J.K.M. 2005b. Genetics of resistance to septoria tritici blotch in the Portuguese line TE 9111. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1138-1144.
- Chartrain, L., Brading, P.A. & Brown, J.K.M. 2005c. Presence of the *Stb6* gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in cultivars used in wheat-breeding programmes worldwide. *Plant Pathology* 54: 134–143.
- Chartrain, L., Sourdille, P., Bernard, M. & Brown, J.K.M. 2009. Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology* 58: 547-555.
- Chen, R.S. & McDonald, B.A. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics* 142: 1119-1127.
- Chen, R.S., Boeger, M. & McDonald, B.A. 1994. Genetic stability in a population of a pathogen in fungus over time. *Molecular Ecology* 3: 209-218.
- Consolo, V.F., Albani, C.M., Berón, C.M., Salerno, G.L. & Cordo, C.A. 2009. A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology* 38: 222-227.
- Cook, R.J., Boosalis, M.G. & Doupnik, B. 1978. Influence of crop residue on plant disease. In: *Crop residue management systems*. ASA, CSSA, SSSA. Madison, USA. pp. 147-163.
- Cordo, C.A. 1978. Estudio sobre la septoriosiis del trigo en la República Argentina. *Actas III Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. San Miguel del Tucumán. Tomo II. Mesa de Fitopatología: 669-690.
- Cordo, C.A. & Arriaga, H.O. 1990. Variación en patogenicidad entre cepas argentinas de *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Septoria tritici*). In: Kohli, M.M., van Beuningen, L.T. (ed.), *Conferencia Regional sobre Septoriosiis del Trigo*. CIMMYT, México, D.F. pp. 88-100.
- Cordo, C.A., Perelló, A.E., Alippi, H.E. & Arriaga, H.O. 1990. Presencia de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter teleomorfo de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. en trigos maduros de la Argentina. *Revista Facultad Agronomía* 66/67: 49-55.

- Cordo, C., Perelló, A., Arriaga, H., Benedicto, G., Avila, V. & Zigilino, I. 1994. Resistencia a la “mancha foliar” causada por *Septoria tritici* en el trigo pan (*Triticum aestivum* L.). Rev. Fac. Agron. La Plata 70: 23-36.
- Cordo, C., Perelló, A. & Arriaga, H. 1998. Cambio en la virulencia de las poblaciones de *Mycosphaerella graminicola* Fuck Schroether sobre Trigo. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 13: 77-86.
- Cordo, C.A., Simón, M.R., Perelló, A.E. & Alippi, H.E. 1999. Spore dispersal of leaf blotch pathogens of wheat (*Mycosphaerella graminicola* and *Septoria tritici*). In: van Ginkel, M., McNab, A., Krupinsky, J. (eds.), *Septoria and Stagonospora diseases of cereals. A compilation of global research*. CYMMYT, México. pp. 98-101.
- Cordo, C., Mónaco, C., Simón, M.R., Perelló, A., Kripelz, N., Bayo, D. & Segarra, C. 2004. Biocontrol de la mancha de la hoja del trigo con aislamientos de *Trichoderma* spp. Actas Congreso Nacional de Trigo, VI Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal. Bahía Blanca, 2004. Universidad Nacional del Sur/Dep de Agronomía. pp. 205-206.
- Cordo, C.A., Simón, M.R., Perelló, A.E., Bayo, D., Kripelz, N. & Larrán, S. 2005. Enviromental factors affecting the release and dispersal of pycnidiospores and ascospores of *Mycosphaerella graminicola*. Abstracts of the 7th International Wheat Conference. Mar del Plata. Argentina. 131 pp.
- Cordo, C.A., Linde, C.C., Zhan, J. & McDonald, B. 2006. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen (*Septoria tritici*) in Buenos Aires province. Sociedad Argentina Botánica. 41: 293-305.
- Cortese, P., Carmona, M.A., Pioli, R., Moschini, R. & Reis, E.M. 1998. Nuevo enfoque para el control químico de la mancha de la hoja (*S. tritici*), determinación de umbrales de daño económico y de acción. Actas del IV Congreso Nacional de trigo y II Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño-Invernal. Unidad Integrada Balcarce. Mar del Plata, Buenos Aires. Protección de cultivos. 4-04. 2 pp.
- Cowger, C., Hoffer, M.E. & Mundt, C.C. 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. Plant Pathol. 49: 445-451.
- Cowger, C., Mundt, C.C. & Hoffer, M.E. 2001. A Vertically Resistant Wheat Selects for Specifically Adapted *Mycosphaerella graminicola* Strains. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: a Compilation of Global Research*. CIMMYT. pp. 85-86.
- Cowling, S.G., Brule-Babel, A.L., Somers, D.J. & Lamari, L. 2006. Identification and mapping of *Stb13*, an isolate-specific wheat resistance gene to isolate MG96-36 (group 1) of

Mycosphaerella graminicola. Manuscript. V Catalogue of Gene Symbols for wheat: 2007 Supplement. Integrated Wheat Science Database Komugi.

Czembor, P.C. & Arseniuk, E. 1999. Study of genetic variability among monopycnidial and monopycnidiospore isolates derived from single pycnidia of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR Techniques. *Phytopathology* 147: 539-546.

Danon, T. & Eyal, Z. 1990. Inheritance of resistance to two *Septoria tritici* isolates in spring and winter wheat cultivars. *Euphytica* 47: 203-214.

Dubin, H.J. & Rajaram S. 1996. Breeding disease-resistant wheats for tropical highlands and lowlands. *Annual Review of Phytopathology* 34: 503–526.

Dyck, P.L. 1991. Genetics of adult plant leaf rust resistance in ‘Chinese Spring’ and ‘Sturdy’ wheats. *Crop Sci.* 24: 309-311.

Dyson, T. 1999. World food trends and prospects to 2025. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* 96: 5929-5936.

Ellingboe, A.H. 1976. Genetics of host-parasite interactions. In: *Physiological plant pathology encyclopedia of plant physiology. New series. Vol. 4.* (ed.) Heitefuss, R. and Williams, P.H. Springer- Verlag. pp. 761-768.

Eriksen, L., Borum, F. & Jahoor, A. 2001. *Septoria tritici* blotch resistance in wheat. Identification and localization whit DNA markers. Beritch über die 52. Tagung 2001 der Pflasensüchter und Saatgukaufleute Österreichs BAL. Gumpenstein, 20-22 November 2001. pp 95-100.

Eriksen, L., Borum, F. & Jahoor, A. 2003. Inheritance and localization of resistance to *Mycosphaerella graminicola* causing septoria tritici blotch and plant height in the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome with DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 515-527.

Evans, L.T. 1998. *Feeding Ten Billion: Plants and Population Growth.* University Press Cambridge. Cambridge. UK. pp. 264.

Eyal, Z. & Brown, M.B. 1976. A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology* 66: 11-14.

Eyal, Z. Scharen, A, Huffman, M.D. & Prescott, J.M. 1985. Global insights into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 75: 1456-1462.

Eyal, Z., Scharen, A.L., Prescott, J.M. & van Ginkel, M. 1987a. The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. *International Maize and Wheat Improvement. CIMMYT, México, D.F.* pp. 52.

- Eyal, Z. Scharen, A. Prescott, J.M. & van Ginkel, M. 1987b. The *Septoria* diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, México, D.F. pp. 46.
- Ezrati, S., Schuster, S., Eshel, A. & Eyal, Z. 2001. Interrelations among *Septoria tritici* Isolates of Varying Virulence. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: a Compilation of Global Research*. CIMMYT, México, D.F. pp. 39.
- FAO, 2009. <http://www.fao.org/docrep/010/ah876s/ah876s00.htm>.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3ª edição. M.A. Embrapa. Brasília, D.F. pp. 220.
- Flor, H.H. 1956. The complementary genetic systems in flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54.
- Formento, N. 2002. "Septoriososis de la Hoja" (*Septoria tritici*). Expresión de la resistencia en Cultivares de Trigo (Año 2001). INTA EE Paraná. 5pp. [http:// www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/trigo/enfermedad](http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/trigo/enfermedad).
- Forrer, R. & Zadoks, J.C. 1983. Yield reduction in wheat in relation to leaf necrosis caused by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 87-98.
- Fuckel. 1870. *Sphaerella graminicola* Fuckel Jahrb. Nassau Ver Naturk 23-24: 101.
- Galich, M.T.V. 1989. Importancia y difusión de la "fusariosis" del trigo en Argentina. In: Kohli, M.M. (ed.). Taller sobre la "fusariosis" de la espiga en América del Sur. México, D.F. CIMMYT. pp. 7-26.
- Galich, M.T.V. de. & Galich, A. 1994. Enfermedades del trigo en el área sur de Santa Fé y Córdoba correspondientes a la subregión II Norte. Año 1993/94. Información para extensión N° 5. EEA INTA Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. 7 pp.
- Galich, A., Galich, M.T.V. de, Legasa, A. & Musso, G. 1986. Estimación de pérdidas por enfermedades foliares en cultivares de trigo. Capítulo IV. Actas Congreso Nacional de Trigo. AIANBA. Pergamino, Bs. As. pp. 41-50.
- Germán, S., Perea, C. & Díaz, M. 1987. Importancia de *Septoria tritici* en Uruguay y avance en los trabajo realizados. Conferencia Regional sobre Septoriososis del Trigo. Montevideo, Uruguay. pp. 64-79.
- Giecco, J.O., Dubcovsky, J. & Aranha Camargo, L.E. 2004. Aggressiveness and physiological specialization of *Septoria tritici* isolates. *Scientia Agricola* 61: 414-421.
- Gilchrist, L., Gómez, B., González, S., Fuentes, A., Mujeeb-Kazi, W., Pfeiffer, S., Rajaram, R. & Rodriguez, B. 1999. *Septoria tritici* resistance sources and breeding progress at CIMMYT, 1970-99. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals. A compilation of global research*. In: van Ginkel, M., Mc. Nab, A. and Krupinsky, J. (eds.) CIMMYT, México, D.F. pp. 134-139.

- González, M., Annone, J., Frutos, E. & Polidoro, O. 2000. Componentes de la resistencia a *Septoria tritici* en cinco cultivares de trigo. FAVE 14: 31-37.
- Goodwin, S., van der Lee, T., Cavaletto, J., Hekkert, B., Crane, C. & Kema, G. 2007. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Fungal Genetics and Biology 44: 398-414.
- Gough, F.J. 1978. Effect of wheat host cultivars on pycnidiospore production by *Septoria tritici*. Phytopathology 68: 1343-1345.
- Grant, W.D. & Long, P.E. 1989. Microbiología ambiental. (ed.) Acribia. 222 pp.
- Gupta, M., Chyi, Y-S., Romero-Severson, J. & Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 89: 998-1006.
- Guzmán, P., Gilberston, R.L., Nodari, R., Johnson, W.C., Temple, S.R. & Mandala, D. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 85: 600-607.
- Hamada, H.J., Petrino, M.G. & Kakanuga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potencial is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 6465-6469.
- Hardwick, N.V., Jones, D.R. & Slough, J.E. 2001. Factors affecting diseases of winter 15 wheat in England and Wales, 1989-98. Plant Pathology 50: 453-462.
- Hardwiger, L.A. 1988. Possible role of nuclear structure in disease resistance of plants. Phytopathology 78: 1009-1014.
- Hayden, N.J., Jones, D.J. & Gillison, L.J. 1994. The role of legume-fixed nitrogen and mixed cropping systems in the management of *Septoria tritici*. In: Arseniuk, E., Goral, T., Czembor, P. (eds.): Proceeding of the 4th International Workshop on: *Septoria* of Cereals. IHAR Radzikow, Poland, pp. 243-245.
- Hess, D.E. & Shaner, G. 1987. Effect of moisture and temperature on development of septoria tritici blotch in wheat. Phytopathology 77: 215-219.
- Holmes, S.J.I. & Cohloun, J. 1974. Infection of wheat by *Septoria nodorum* and *S. tritici* in relation to plant age, air temperature and relative humidity. Trans. Br. Mycol. Soc. 63: 329-338.
- Hookes, A.L. 1957. Methods of inoculation and determining varietal reactions in the *Septoria* disease of oats. Plant Dis. Rep. 41: 592-597.

- Horsfall, J.C. & Cowling, E.B. 1971. Plant Disease An Advance Treatise. Volume III. How Plants Suffer from Disease, (ed.) Horsfall, J.C. and Cowling, E.B. 487 pp.
- Howard, D.D., Chambers, A.Y. & Logan, J. 1994. Nitrogen and fungicide effects on yield components and disease severity in wheat. J. Prod. Agric. 7: 448-454.
- Hunter, T., Coker, R.R. & Royle, D.J. 1999. Studies on the sexual phase of leaf blotch in UK winter wheat. In: Lucas, J.A., Bowyer, P., Anderson, H.M. (eds.): *Septoria* of cereals: A study of pathosystems. IACR, Long Aston, University of Bristol, UK, pp. 108-114.
- Ingold, C.T. 1964. Dispersal in Fungi. Clarendon Press, Oxford. 208 pp.
- INTA – FAO. 1979. Curso de perfeccionamiento en control integrado de plagas. EEA Pergamino INTA. Tomos I y II. 30 pp.
- Jackson, L.F., Dubcovsky, J. Gallagher, L.W., Wennig, R.L., Heaton, J., Vogt, H. Gibbs, L.K., Kirby, D., Canevari, M., Carlson, H., Kearney, T., Marsh, B., Munier, D., Mutters, C. Orloff, S. Schmierer, J., Vargas, R., Williams, J. & Wright, S. 2000. Regional barley and common and durum wheat performance tests in California. Agron. Progress Rep. 272: 1-56.
- Jing, H.C., Lovell, D., Gutteridge, R., Jenk, D., Korniyukhin, D., Mitrofanova, O.P., Kema, G.H.J., Hammond-Kosack & K.E. 2008. Phenotypic and genetic analysis of the *Triticum monococcum*–*Mycosphaerella graminicola* interaction. New Phytologist 179: 1121-1132.
- Jlibene, M., Gustafson, J.P. & Rajaram, S. 1994. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in hexaploid wheat. Plant Breed. 112: 301–310.
- Jlibene, M., & El Bouami, F. 1995. Inheritance of partial resistance to *Septoria tritici* in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Gilchrist, L., van Ginkel, M., McNab, A., Kema, G.H.J. (eds.): Proceedings of the *Septoria tritici* Workshop, CIMMYT, México, D.F. pp. 117-125.
- Johnston, H.W., MacLeod, J.A. & Clough, K.S. 1979. Effects of cycocel (CCC) and fungicide sprays on spring wheat grown at three nitrogen levels. Canadian Journal of Plant Science 59: 917-929.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sale, F. & van de Wiel, C. 1997. Reproducibility of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by network of European laboratories. Molecular Breed 3: 381-390.
- Jones, D. 2000. Strobilurin fungicides on winter wheat. "Crop management into the millennium". HGCA R&D Conference 6th and 7th January 2000 ADAS. pp. 14.1-14.10.

- Jonsson, J.O. 1991. Wheat breeding against facultative pathogens. *Sveriges utsadesforenings Tidskrift* 101: 89-93.
- Jürgens, T., Linde, C. & McDonald, B. 2006. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina, and Australia. *European Journal of Plant Pathology*. 115: 223-233.
- Kabbage, M., Leslie, J.F., Zeller, K.A., Hulbert, S.H. & Bockus, W.W. 2008. Genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of Septoria tritici blotch, in Kansas winter. *Journal of Agricultural, Food, and Environmental*. Volume 2. Issue 1.
- Keller, S.M., Wolfe, M.S., McDermott, J.M. & McDonald, B.A. 1997. High genetic similarity among populations of *Phaeosphaeria nodorum* across wheat cultivars and regions in Switzerland. *Phytopathology* 87: 1134-1139.
- Kema, G.H.J. 1992. Resistance in spelt wheat to yellow rust. I. Formal analysis and variation for gliadins patterns. *Euphytica* 63: 207-217.
- Kema, G.H.J. & van Silfhout, C.H. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86: 777-786.
- Kema, G.H.J. & van Silfhout, C.H. 1997. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* 87: 266-272.
- Kema, G.H.J., Annone, J.H., Sayoud, R.S., van Silfhout, C.H. & van Ginkel, M. 1996a. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86: 200-212.
- Kema, G.H.J., Sayoud, R.S., Annone, J.H. & van Silfhout, C.H. 1996b. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. II. Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86: 213-220.
- Kema, G.H.J., Verstappen, E.C.P., Todorova, M. & Waalwijk, C. 1996c. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 30: 251-258.
- Kema, G.H.J., Verstappen, E.C.P., Waalwijk, P.J.M., Bonants, J.R.A. & De Koning *et al.*, 1999. Genetics of biological and molecular markers in *Mycosphaerella graminicola*, the cause of septoria tritici leaf blotch of wheat. In: Lucas, J.A., Bowyer, P. and Anderson, H.M. (eds.): *Septoria of Cereals: A study of Pathosystems*. CAB International Wallingford, UK/ New York. pp. 161-180.

- Kema, G.H.J., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C.P., Cavaletto, J.R., van der Lee, T.A.J., Hagenaar-de Weerd, M., Bonant, P.J.M. & Waalwijk, C. 2002. A combined AFLP and RAPD genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics* 161: 1497-1505.
- Kema, G.H.J., Verstappen, E., van der Lee, T., Mendes, O., Sandbrink, H., Klein-Lankhorst, R., Zwiers, L., Csukai, M., Baker, K. & Waalwijk, C. 2003. Gene hunting in *Mycosphaerella graminicola*. *Proc. 22nd Fungal Genet. Conf., Asilomar, California, USA*. 252 pp..
- King, J.E., Cook, R.J. & Melville, S.C. 1983. A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. *Annals of Applied Biology* 103: 345–373.
- Kohli, M., Annone, J. & García, R. 1995. Las enfermedades del trigo en el Cono Sur. *Curso de manejo de enfermedades del trigo*. Pergamino. Argentina. 235 pp.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L. & Keller, B. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360-1363.
- Laghetta, G., Piergiovanni, A.R., Volpe, N. & Perrino, P. 1999. Agronomic performance of *Triticum diccocon* Schrank and *T. spelta* L. accessions under southern Italian conditions. *Agric. Mediterr.* 129: 199-214.
- Lander, E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. & Newburg, I. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Laurie, D.A. & Bennett, M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76: 393–397.
- Lee, S. & Gough, F.J. 1984. Inheritance of Septoria leaf blotch (*S. tritici*) and *Pyrenophora* tan spot (*P. tritici repentis*) resistance in *Triticum aestivum* cv. Carifan 12. *Plant Dis.* 68: 848-851.
- Leitch, M.H. & Jenkins, P.D. 1995. Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 124: 361-368.
- Liu, S. & Anderson, J.A. 2003. Marker-assisted evaluation of fusarium head blight resistant wheat germplasm. *Crop Sci.* 43: 760-766.
- Linde, C.C., Zhan, J. & Mc Donald, B.A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* 92: 946-955.

- Lovell, D.J., Parker, S.R., Hunter, T., Royle, D.J. & Coker, R.R. 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathol.* 46: 126-138.
- Macer, R.C. 1966. The formal and monosomic genetic analysis of stripe rust (*Puccinia striiformis*) resistance in wheat. 2ⁿ International Wheat Gent. Symp., Sweeden 63. *Heredity. Suppl* 66: 127-142.
- Madariaga, R. 1986. Presencia en Chile de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter estado sexual de *Septoria tritici* Rob. et Desm. *Agricultura Técnica (Chile)* 46: 209-211.
- Manly, K.F., Cudmore, Jr, R.H. & Meer, J.M. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930-932.
- Martino, D. 1994. Agricultura sostenible y siembra directa. Serie Técnica N° 50. INIA, La Estanzuela. 31 pp.
- Mathur S.B. & Cunfer B.M. 1993. Seedborne diseases and seed health testing of wheat. (Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen. 35 pp.
- McIntosh, R.A., Yamazak, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Somers, D.J., Appels, R. & Devos, K.M. 2008. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
- McCartney, C.A., Brule-Babel, A.L., Lamari, L. & Somers, D.J. 2001. Chromosomal location of a race specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring cultivar ST6. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1181-1186.
- McCartney, C.A., Brûlé-Babel, A.L., Lamari, L. & Somers, D.J. 2003. Chromosomal location of a race-specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring cultivar ST6. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1181–6.
- McCartney, C., Mercer, P.C., Cooke, L.R. & Fraaije, B.A. 2007. Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. *Crop Protection* 26: 1272-1280.
- McDonald, B.A. & Martínez, J.P., 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopatology* 80: 1368-1373.
- McDonald, B.A. & Martínez, J.P. 1991. DNA fingerprinting of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Exper. Mycol.* 15: 146-158.

- McDonald, B.A. & McDermott, J.M. 1993. Population Genetics of Plant Pathogenic Fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *BioScience* vol. 43 N°5: 311-319.
- McVey, D.V. & Leonard, K.J. 1990. Resistance to wheat stem rust in spring spelts. *Plant Dis.* 74: 966-969.
- Meng, X. & Chen, W. 2001. Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gragata*. *Mycology Research*. 105: 936-940.
- Menzies, J.G., Bakkeren, G., Matheson, F., Procunier, J.D. & Woods, S. 2003. Use of inter-simple sequence repeats and amplified length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology* 93: 167-175.
- Metha, Y.R. 1989. Occurrence of *Septoria tritici* and its perfect state in Brazil. Third International Workshop of *Septoria* Diseases of Cereals, Zurich Switzerland July 4-7: 34-35.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Morris, P.F., Connolly, M.S. & St Clair, D.A. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycology Research*. 104: 286-292.
- Moss, D.W. 1982. Isoenzymes. Capman y Hall, London y New York.
- Narváez, I. & Caldwell, R.M. 1957. Inheritance of resistance to leaf blotch of wheat caused by *Septoria tritici*. *Phytopathology* 47: 529-530.
- Nei, M. & Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Nelson, J.C., Sorrell, M.E., van Deynze, A.E., Lu, Y.H., Atkinson, M., Bernard, M., Leroy, P., Faris, J.D. & Anderson, J.A. 1995a. Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangement in homoeologous groups 4, 5 and 7. *Genetics* 141: 1721-1731.
- Nelson, J.C., van Deynze, A.E., Autrique, E., Sorrells, M.E., Lu, Y.H., Negre, S., Bernard, M. & Leroy, P. 1995b. Molecular mapping of wheat: homoeologous groups 2. *Genome* 38: 516-524.
- Nelson, J.C., van Deynze, A.E., Autrique, E., Sorrells, M.E., Lu, Y.H., Negre, S., Bernard, M. & Leroy, P. 1995c. Molecular mapping of wheat: homoeologous groups 3. *Genome* 38: 525-533.

- Nisi, J., Helguera, M., Bainotti, C., Donaire, G., Salines, J. & Fraschina, J. 2006. Programa de mejoramiento genético de trigo del INTA. V Congreso Nacional de Trigo. pp. 77-82.
- Owen, P.G., Pei, M., Karp, A., Royle, D.J. & Edwards, K.J. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Mol. Ecol. 7: 1611-1612.
- Parbery, D.G. 1996. Trophism and the ecology of fungi associated with plants. Biol. Rev. 71: 473-527.
- Parlevliet, J.E. 1993. What is durable resistance, a general outline. In: Jacobs, Th., Parlevliet, J.E. (eds.): Durability of disease resistance. Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 23-29.
- Patterson, F.L., Roberts, J.J., Finney, R.E., Shaner, G.E., Gallun, R.L. & Ohm, H.W. 1975. Registration of Oasis wheat. Crop Sci. 15: 736-737.
- Perelló, A. 2007. Enfermedades nuevas y emergentes en trigo. Manejo de bajo impacto ambiental con microorganismos antagonistas. Actas Jornadas de actualización en enfermedades de trigo. Lavallol, Buenos Aires. pp. 30-34.
- Perelló, A.E., Babinec, F.J. & Cordo, C.A. 1990a. Especialización fisiológica en cepas argentinas de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (Anamorfo *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. In: Kohli, M.M., van Beuningen, L.T. (ed.). Conferencia Regional sobre Septorios del trigo, CIMMYT, México, D.F. pp. 101-107.
- Perelló, A.E., Cordo, C.A. & Alippi, H.E. 1990b. Características morfológicas y patogénicas de aislamientos de *Septoria tritici* Rob ex Desm. Agronomie 10: 641-648.
- Perelló, A.E., Cordo, C.A., Arriaga, H.O. & Alippi, H.E. 1991. Variation in virulence of *Septoria tritici* Rob. ex Desm. Isolates in wheat. Agronomie 11: 571-579.
- Perelló, A., Mónaco, C. & Cordo, C. 1997. Evaluation of *Trichoderma harziarum* and *Gliocladium roseum* in controlling leaf blotch of wheat (*S. tritici*) under in vitro and greenhouse conditions. Zeitschrift fur Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz 140: 588-589.
- Perelló, A.E., Cordo C.A, Wolcan S. & Sarandon S. 1988. Método simple para la obtención de inóculo de *Septoria tritici*. Rob. ex Desm. Nota en Revista de la Facultad de Agronomía La Plata 63: 91-94.
- Perelló, A.E., Mónaco, C., Moreno, M.V., Simón, M.R. & Cordo, C.A. 2004. Biocontrol de la mancha amarilla y mancha de la hoja del trigo con *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo. Actas Congreso Nacional de trigo, VI Simposio Nacional de Cultivos de

- Siembra Otoño-Invernal. Bahía Blanca, 2004. Universidad Nacional del Sur/Dep de Agronomía. pp. 255-256.
- Perelló, A., Mónaco, C., Moreno, M.V., Cordo, C. & Simón, M.R. 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 16: 803-813.
- Perelló, A., Moreno, M.V., Mónaco, C. I., Simón, M.R. & Cordo, C. 2009. Biological control of *S. tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl* 54: 113-122.
- Pink, D.A.C. & Law, C.N. 2009. The effect of homoeologous group 7 chromosomes upon adult plant resistance of wheat to yellow rust (*Puccinia striiformis*). *Plant Pathology* 34: 255-262.
- Plaschke, J., Ganai, M.W. & Röder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
- Prew, R.D., Church, B.M., Dewar, A.M., Lacey, J., Penny, A., Plumb, R.T., Thorne, G.N., Todd, A.D. & Williams, T.D. 1983. Effects of eight factors on the growth and nutrient uptake of winter wheat and on the incidence of pests and diseases. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 100: 363-382.
- Pshenichnikova, T.A., Osipova, S.V., Permiakova, M.D., Mitrofanova, T.N., Trufanov, V.A., Lohwasser, U., Röder, M. & Börner, A. 2008. Mapping of quantitative trait loci (QTL) associated with activity of disulfide reductase and lipoxygenase in grains of bread wheat *Triticum aestivum* L. seeds. *Rus. J. Genet.* 44: 654-662.
- Rajaram, S. 1999. Historical aspects and future challenges of an international wheat program. In: van Ginkel, M., Mc Nab, A., Krupinsky J. (eds.), *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals. A compilation of global research*. CIMMYT, México, pp.1-17.
- Raman, R., Milgate, A. W., Imtiaz, M., Tan, M.-K., Raman, H., Lisle, C., Coombes, N. & Martin, P. 2009. Molecular mapping and physical location of major gene conferring seedling resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Mol. Breeding* 24: 153–164.
- Razavi, M. & Hughes, G.R. 2004. Molecular variability of *Mycosphaerella graminicola* as detected by RAPD markers. *J. Phytopathology* 152: 543-548.
- Rillo, A.O. & Caldwell, R.M. 1966. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in *Triticum aestivum* subsp. vulgare, Bulgaria 88 (Abstr.). *Phytopathology* 56: 897.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. & Ganai, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.

- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket, NY: Exeter Software.
- Rosielle, A.A. 1972. Sources of resistance in wheat to sepckled leaf blotch caused by *Septoria tritici*. Euphytica 21: 152-161
- Rosielle, A.A. & Brown, A.G.P. 1979. Inheritance, heritability and breeding behavior of three sources of resistance to *Septoria tritici* in wheat. Euphytica 28: 385-392.
- Royle, D.J., Shaw, M.W. & Cook, R.J. 1986. Patterns of development of *Septoria nodorum* and *S. tritici* in some winter wheat crops in Western Europe, 1981-83. Plant Pathology 35: 466-476.
- Ruegger, A. & Winzeler, H. 1993. Performance of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) at two different seeding rates and nitrogen levels under contrasting environmental conditions. J. Agron. Crop Science 170: 289-295.
- Saadaoui, E.M. 1987. Physiologic specialization of *Septoria tritici* in Morocco. Plant Disease 71: 153-155.
- SAGPyA. www.sagpya.mecon.gov.ar. Estimaciones agrícolas agosto 2008.
- Sanderson, F.R. 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. New. Zealand. J. Agric. Res. 21: 277-281.
- Sanderson, F.R. 1976. *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Sanderson comb. Nov., the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. apud Desm. N.Z.J. Botany 14: 359-360.
- Sartorato, A. 2004. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the state of Goias, Brazil. J. Phytopathology 152: 385-390.
- Scharen, A.L. & Krupinsky, J.M. 1970. Cultural and inoculation studies of *Septoria nodorum*, cause of glume blotch of wheat. Phytopatology 60: 1480-1485.
- Schnieder, F., Koch, G., Jung, C. & Verreet, J.A. 2001. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. European Journal of Plant Pathology 107: 285-290.
- Schuh, W. 1990. Influence of tillage systems on disease and spatial pattern of septoria leaf blotch. Phytopathology 80: 1337- 1340.
- Scott, P.R., Sanderson, F.R. & Benedikz, P.N. 1988. Ocurrence of *Mycosphaerella graminicola* teleomorph of *Septoria tritici* on wheat debris in the UK. Plant Pathology 37: 285-290.
- Shaner, G. & Finney, R.E. 1976. Weather and epidemics of septoria leaf blotch of wheat. Phytopathology 66: 781-785.

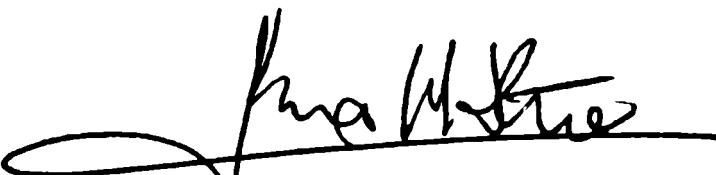
- Shaw, M.W. & D.J Royle. 1989a. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in Winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* 38: 35-43.
- Shaw, M.W. & D.J Royle. 1989b. An epidemiologically based forecasting scheme for *Septoria tritici*. In: Friend, P.M. (ed.), *Proc. Third Int. Workshop Sept. Dis. Cereales*, Zurich, Switzerland. 189 pp.
- Shipton, W.A., Boyd, W.J.R., Rosielle, A.A. & Shearer, B.L. 1971. The common *Septoria* diseases of wheat. *Botanical Review* 27: 231.
- Simón, M.R., 2003. Genetic, environmental and cultural factors influencing the resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat. PhD thesis Wageningen University. ISBN 90- 5808-912-6. 137 pp.
- Simón, M.R. 2005. Factores que modifican la expresión de la resistencia a manchas foliares. *Actas del Congreso A todo trigo y Agrotendencias*. Sheraton Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, pp. 167-170.
- Simón, M.R. 2007. Manejo integrado de enfermedades foliares fúngicas en trigo. *Actas Jornadas de actualización en enfermedades de trigo*. Instituto Fitotécnico Santa Catalina. UNLP. pp. 40-45.
- Simón, M.R. & Cordo, C.A. 1997. Inheritance of partial resistance to *Septoria tritici* in wheat (*Triticum aestivum* L.): Limitation of pycnidia number and spore production. *Agronomie* 17: 343-347.
- Simón, M.R., & Cordo, C.A. 1998. Diallel analysis of four resistance components to *Septoria tritici* in six crosses of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Breeding* 117: 123-126.
- Simón, M.R., & Cordo, C.A. 1999. Diallel analysis of incubation and latent period of *Septoria tritici* at two growth stages of wheat. *J. Genet. and Breed.* 53: 73-78.
- Simón, M.R., Perelló A.E. & Cordo, C.A. 1998. Response to selection in F₂ populations of wheat crosses for resistance to *Septoria tritici*. *Cereal Research Communications* 26: 275-279.
- Simón, M.R., Perelló, A.E., Cordo, C.A. & Struik, P.C. 2002. Influence of septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) on yield, yield components and test weight of wheat under two nitrogen fertilisation conditions. *Crop Science* 42: 1974-1981.
- Simón, M.R., Ayala, F.M., Cordo, C.A., Röder, M.S. & Börner, A. 2004. Molecular mapping of quantitative trait loci determining resistance to septoria tritici blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Euphytica* 138: 41-48.

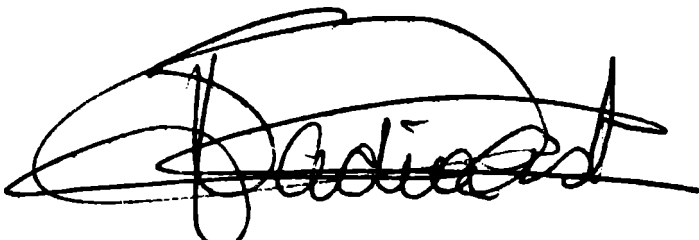
- Simón, M.R., Perelló, A.E, Cordo, C.A., Larrán, S., van der Putten, P. & Struik, P.C. 2005a. Association between septoria tritici blotch, plant height, and heading date in wheat. *Agron. J.* 97: 1037-1278.
- Simón, M.R., Worland, C.A. & Struik, P.C. 2005b. Chromosomal location of two genes encoding for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in seedlings and in the adult stage of wheat. *Neth. J. of Agr. Sci.* 53: 113-129.
- Simón, M.R., Ayala, F.M., Cordo, C.A., Röder, M.S. & Börner, A. 2007. The exploitation of wheat (*Triticum aestivum*)/*Aegilops tauschii* introgression lines for the detection of gene(s) determining resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*). *Euphytica* 154: 249-254.
- Simón, M.R., Khlestkina, E.K., Castillo, N.S. & Börner, A. 2009. Mapping quantitative resistance to septoria tritici blotch in spelt wheat. *European Journal of Plant Pathology*. 25 pp. (en prensa).
- Singh, P.K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T.B., Elias, E.M. & Hughes, G.R. 2008. Identification of new sources of resistance to tan spot, stagonospora nodorum blotch and septoria tritici blotch of wheat. (2006). *Crop Sci.* 46: 2047-2053.
- Somasco, O.A., Qualset, C.O. & Gilchrist, D.G. 1996. Single-gene resistance to septoria tritici blotch in the spring wheat cultivar 'Tadinia'. *Plant Breed* 115: 261-267.
- Spielmeyer, W., Singh, R.P., McFadden, H., Wellings, C.R., Huerta-Espino J., Kong X, Appels R & Lagudah E.S. 2008. Fine scale genetic and physical mapping using interstitial deletion mutants of *Lr34/Yr18*: a disease resistance locus effective against multiple pathogens in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 116: 481–490.
- Stewart, S., Pereyra, S. & Diaz de Ackermann, M. 2002. Manchas foliares de trigo y cebada bajo siembra directa: conceptos y estrategia de control. Informe 32 INIA. 30 pp.
- Sun, G.L., Salomon, B. & Bothmer, R.V. 1998. Characterization and analysis of microsatellite loci in *Elymus caninus* (Triticeae: Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 96: 676-682.
- Tanksley, S.D. & Orton, T.J. 1983. Isoenzymes in plant genetics and breeding (parts A y B). Elsevier Science Publishers (eds.). Amsterdam.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Tautz, D. & Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucleic Acids Research* 23: 249-255.
- Tautz, D., Trick, M. & Dover, G.A. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature (London)* 322: 652-656.

- Tavella, C.M. 1978. Date of heading and plant height of wheat varieties, as related to *Septoria* leaf blotch damage. *Euphytica* 27: 557-580.
- Thomas, M.R., Cook, R.J. & Kings, J.E., 1989. Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield. *Plant pathol.* 38: 246-257.
- USDA, 2007/2008. www.usda.gov.2007/2008.
- Van Beuningen, L.T. & Kohli, M.M. 1990. Deviation from the regresión of infection on heading and height as a measure of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Plant Disease* 74: 488-493.
- Van Ginkel, M. & Scharen, A.L. 1987. Generation mean analysis and heritabilities of resistance to *Septoria tritici* in durum wheat. *Phytopathology* 77: 1629-1633.
- Van Ginkel, M. & Rajaram, S. 1999. Breeding for resistance to the *Septoria/ Stagonospora* Blights of wheat. In: van Ginkel, M., McNab, A., Krupinsky, J. (eds.), *Septoria and Stagonospora* diseases of cereals. A compilation of global research. CIMMYT, México, pp. 117-126.
- Verreet, J.A., 1995. Principles of integrated pest management. The IPM wheat model. *Pflanzenschutznachrichten Bayer* 48 Germany.
- Vos, P., Hogers, R., Blecker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wagara, I.N., Mwang'ombe, A.W., Kimenju, J.W., Buruchara, R.A., Jamnadass, R. & Majiwa, P.A.O. 2004. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as revealed by AFLP and group-specific primers. *Journal Phytopatology* 152: 235-242.
- Wainshilbaum, S.J. & Lipps, P.E. 1991. Effect of temperature and growth stage of wheat on development of leaf and glume blotch caused by *Septoria tritici* and *S. nodorum*. *Plant Dis.* 75: 993-998.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wilson, R.E. 1979. Resistance to *Septoria tritici* in two wheat cultivars, determined by independent, single dominant genes. *Australasian Plant Pathology* 8: 16-18.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. 1998a. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics II* (ed.) Soltis, D.E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J. Kluwer. pp. 43-86.

- Wolfe, A.D., Xiang, Q-Y. & Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.* 14: 415-421.
- Zhan, J., Pettway, R.E. & McDonald, B.A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38: 286-297.
- Zhang, X., Haley, S.D. & Jin, Y. 2001. Inheritance of septoria tritici blotch resistance in winter wheat. *Crop Sci.* 41: 323-326.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome* 20: 176-183.
- Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, El Batán, México.
- Ziv, O. & Eyal, Z. 1978. Assessment of yield component losses caused in plants of spring wheat cultivars by selected isolates of *Septoria tritici*. *Phytopathology* 68: 791-794.


Firma del Director


Firma del Codirector


Firma del Tesista