

## ANEXO

### **Cambios genéticos de *Mycosphaerella graminicola* que condicionan la resistencia a los fungicidas en la mancha de la hoja del trigo**

En el transcurso del período 2012-2015 se hicieron dos pedidos de material: el primero de la campaña 2012-2013 se recibieron de los campos de algunas localidades de la región triguera Argentina como: Pergamino, Carlos Casares, Balcarce, Necochea, Tres Arroyos, San Cayetano, Coronel Dorrego, Bahía Blanca, Polvorines provincia de Córdoba (Marco Juárez)

En el año 2014 se pidió nuevamente material infectado y solo se recibió de los siguientes lugares: Miramar, Chaco Córdoba y Bahía Blanca. Solo se obtuvo muy poco de Bahía Blanca (ACA) y de Chaco y de Córdoba no se obtuvieron aislamientos. Esta última muestra estuvo muy infectada *Bipolaris sorokiniana*. Miramar fue la localidad más infectada por *S.tritici*.

Una vez que llegaron al CIDEFI fueron conservadas en la heladera en sobres de papel

#### **Aislamiento de patógeno**

La técnica utilizada para este tipo de aislamientos fue la de Libbo y Lee, (1999).

Las hojas se esterilizaron superficialmente con: alcohol 70, una solución doméstica de hipoclorito de sodio a una concentración de 0.5% y finalmente agua destilada estéril. En el año 2013 se comenzó a probar los distintos tiempos de desinfección y se respetó los siguientes tiempos 10, 90 y 50 segundos respectivamente para alcohol 70, hipoclorito de Na y agua destilada estéril, luego se secó con papel secante y se colocó 48 hs. en cámara húmeda. El cirro de conidios se tomó con una aguja fina de vidrio y luego se transfirió a una caja con medio YMA. Una vez crecido se refregó en forma de estría con ansa sobre la superficie del medio, la colonia mucosa se repicó a tubo y caja con medio agar extracto de malta y se conservó en heladera. De los tubos se destinó uno para conservar en vaselina.

Se formó una colección con dos repeticiones de cada cultivo obtenido a partir de un cirro.

La estandarización del trabajo consistió en desinfectar lunes-martes y miércoles-jueves pasaje de cirros a cajas de Petri de diámetro pequeño con medio YMA. Luego de unos días, la colonia se refregaba sobre la superficie del medio, con el ansa, en forma ondulada, para aumentar la superficie de desarrollo de la colonia mucosa. Pasados los 10 días la colonia se repicó a un tubo y a una caja con medio, conservándolos en la heladera.

#### **Cultivo de los aislamientos del patógeno**

Los tubos se prepararon con suficiente medio agar extracto de malta y formando una estría corta para que el cultivo perdure. Se conservaron los tubos en heladera parados dentro de cajas sin tapar y cubiertos con servilletas de papel absorbentes.

El primer repique R1 (primera generación de cultivo) se mantuvo viable desde el año 2013 (cuando se obtuvo la colonia) a fines del 2014. Se hizo un segundo repique R2 en el año 2014 y este es el que se está utilizando para los experimentos.

En la R1 se obtuvieron 130 cultivos pero en el repique se fueron perdiendo ejemplares por distintas razones, especialmente contaminación y el no haber respetado en algunos casos las tres repeticiones originales, para evitar un crecimiento desmedido de los tubos. Quedaron 100 cultivos.

Las colonias fueron en su mayoría mucosas al principio y luego se estromatizaron, dependiendo de la naturaleza de cada individuo de la población. Según la localidad de su procedencia cambió de color, la mayoría de las colonias rosadas se tornaron estromáticas.

### **Técnica de muestreo**

De cada hoja recolectada, (perteneciente a un sitio de la recolección) se consideró una sola lesión. De cada hoja con lesión se aislaron 3 cirros y las conidiosporas contenidas en el cirro se cultivaron en medio YMA.

Luego la colonia mucosa correspondiente a una conidiosporas se aisló y se cultivó en medio Agar extracto de malta.

La nomenclatura utilizada incluye los datos de: Residencia de la colección, año de aislamiento, Localidad de procedencia, Sitio o puesto de recolección de hoja, número de hoja y cirro.

Ejemplo: FALP, 013, La Dulce, Sobre 2, hoja 1, cirro 1= FALP013LDS2h1c1

### **Cultivo de aislamientos en medios específicos**

El cultivo del hongo se realiza en los siguientes medios:

1. YMA (4 gr. de extracto de levadura, 22 gr.de agar 1 l de agua destilada)
2. Agar extracto de malta (30 gr. de extracto de malta, 5 gr. de peptona 3 gr. de extracto de levadura, 22 gr.de agar y un litro de agua destilada).

### **Evaluación del crecimiento y la virulencia de los aislamientos**

#### **Experimentación**

##### **A. Evaluación de la velocidad de crecimiento y morfología de los aislamientos nativos.**

El experimento se organizó en dos series de aislamientos. La primera, con 30 de ellos provenientes de diferentes localidades que estaban conservados en Agar extracto de Malta.

.Cada tubo de colección se repicó a dos cajas de 9 cm de diámetro con medio Agar extracto de malta.

.Se cortó una porción de (1x1) y se colocó en cajas con medio APG con antibiótico. La colonia estuvo en contacto con el medio directamente.

.De cada aislamiento se realizó 3 repeticiones

. Se colocó en cámara a temperatura y humedad constante.

.Las observaciones se realizaron a los 5, 7, 12 y 15 días de sembrado cuantificando los radios perpendiculares (direcciones N a S y E a O).

Tabla 1. Valores medios del radio de las colonias (promedios del primer grupo de aislamientos)

Fecha	16-Jun	18-jun	22-jun	26-jun
<b>Aislamiento</b>				
<b>San Mayol 1</b>	<b>0,6</b>	<b>0,83</b>	<b>1,05</b>	<b>1,2</b>
h1c2				
<b>San Mayol 1</b>	<b>0,46</b>	<b>1,16</b>	<b>1,15</b>	<b>1,55</b>
h2c1				
<b>San Mayol</b>	<b>0,4</b>	<b>0,53</b>	<b>0,85</b>	<b>0,96</b>
h1c1				
<b>ACA</b>	<b>0,4</b>	<b>0,65</b>	<b>1,01</b>	<b>1,68</b>
h1c1				
<b>ACA</b>	<b>0,46</b>	<b>0,61</b>	<b>0,81</b>	<b>0,95</b>
h2c1				
<b>Crist. Muerto</b>	<b>0,35</b>	<b>0,61</b>	<b>0,83</b>	<b>1,13</b>
h1c1				
<b>Aurora</b>	<b>0,46</b>	<b>0,71</b>	<b>1,35</b>	<b>1,46</b>
h2c1				
<b>Aurora</b>	<b>0,35</b>	<b>1,18</b>	<b>1,15</b>	<b>1,36</b>
h4c1				
<b>Aurora</b>	<b>0,43</b>	<b>1,18</b>	<b>0,95</b>	<b>1,1</b>
h1c1				
<b>Aurora</b>	<b>0,55</b>	<b>0,81</b>	<b>1,06</b>	<b>1,33</b>
h5c1				
<b>Aparicio</b>	<b>3</b>	<b>1,13</b>	<b>1,31</b>	<b>1,51</b>
h1c2				
<b>Aparicio</b>	<b>0,56</b>	<b>0,8</b>	<b>0,86</b>	<b>1,61</b>
h2c1				
<b>Aparicio</b>	<b>0,6</b>	<b>1,03</b>	<b>1,31</b>	<b>1,38</b>
h3c1				
<b>La Dulce</b>	<b>1,03</b>	<b>0,83</b>	<b>1,1</b>	<b>1,38</b>
s2h2c3				
<b>Pergamino</b>	<b>0,65</b>	<b>0,81</b>	<b>1,083</b>	<b>1,28</b>
h2c1				
<b>Copetonas</b>	<b>0,5</b>	<b>0,76</b>	<b>1,03</b>	<b>1,26</b>
h2c2				
<b>Copetonas</b>	<b>0,51</b>	<b>0,68</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>
h3c1				
<b>El carretero</b>	<b>0,61</b>	<b>0,9</b>	<b>0,95</b>	<b>1,1</b>
h2c3				
<b>MJ Linea A</b>	<b>0,48</b>	<b>0,71</b>	<b>0,88</b>	<b>0,96</b>
h1c1				
<b>MJ Linea A</b>	<b>0,65</b>	<b>0,71</b>	<b>0,93</b>	<b>1</b>
h2c2				
<b>MJ Linea A</b>	<b>0,63</b>	<b>1,38</b>	<b>1,03</b>	<b>1,15</b>
h3c1				
<b>MJ Linea A</b>	<b>0,66</b>	<b>1,13</b>	<b>1,4</b>	<b>1,8</b>
h4c1				

MJ Linea A	0,66	1,13	1,4	1,4
h5c1				
MJ.Lverbena	0,66	0,96	1,33	1,38
h4c1				
MJ.Lverbena	0,6	0,8	1,1	1,26
h5c1				
Pergamino	0,6	1,01	1,15	1,31
h3c3				
Miramar	0,5	0,63	0,88	0,93
s1h2c1				
Miramar	0,75	0,9	1,1	1,18
s2h3c1				
Orense	0,53	0,76	0,88	1,1
h2c1				
La Dulce	0,51	0,76	0,86	1,03
s4h3c1				

Tabla 2. Colores y estructura de las colonias de aislamientos nativos de *S. tritici*.

Aislamientos	Color * (sup./envez)	Estructura
San Mayol 1	Olivaceous grey/	Estomático
h1c2	pale olivaceous grey	
San Mayol 1	Olivaceous grey/	Estromático
h2c1	pale olivaceous grey	
San Mayol	Olivaceous grey/	Estromático
h1c1	pale olivaceous grey	
ACA	Iron grey/	Estromatico
h1c1	olivaceous grey	
ACA	Olivaceous black/	Mucoso
h2c1	rosy fuff	
Crist. Muerto	Olivaceous grey/	Esstromatico
h1c1	pale olivaceous grey	Con pubescencia
Aurora	Olivaceous grey/	Estromatico
h2c1	pale olivaceous grey	
Aurora		Estromatico
h4c1	Pale olivaceous grey	
Aurora	Olivaceous grey/	Estromatico
h1c1	pale olivaceous grey	
Aurora		Estromatico
h5c1	Pale olivaceous grey	
Aparicio	Olivaceous grey/	Estromatico con
h1c2	pale olivaceous grey	pubescencia gris-rosada
Aparicio	Olivaceous grey/	Estromatico con
h2c1	pale olivaceous grey	pubescencia gris-rosada
Aparicio	Olivaceous grey/	Estromatico con
h3c1	pale olivaceous grey	pubescencia gris-rosada

Pergamino		
h3c3	Pale olivaceous grey	Estr.con pubescencia rosa
Pergamino	Olivaceous grey/	
h2c1	pale olivaceous grey	Estr.con pubescencia rosa
Copetonas	Olivaceous grey/	Estromatico con
h2c2	pale olivaceous grey	pubescencia
Copetonas	Olivaceous grey/	Estromatico con
h3c1	pale olivaceous grey	pubescencia
El carretero	Olivaceous grey	Estromatico con
h2c3		pubescencia
MJ Linea A	Olivaceous grey/	
h1c1	pale olivaceous grey	Estromático
MJ Linea A	Olivaceous grey/	
h2c2	pale olivaceous grey	
MJ Linea A	Olivaceous grey/	Estromático
h3c1	olivaceous rosy buff	
MJ Linea A	Grey olivaceous/	Estromático
h4c1	pale olivaceous	
MJ Linea A	Grey olivaceous/	Estromático
h5c1	pale olivaceous	
MJ.Lverbena	Grey olivaceous/	Estromático
h4c1	pale olivaceous	
MJ.Lverbena	Grey olivaceous/	Estromático
h5c1	pale olivaceous	
Miramar	Olivaceous grey	Estromático
s1h2c1		
Miramar	Olivaceous grey	Estromático
s2h3c1		
Orense	Olivaceous grey/	Estromático con
h2c1	pale olivaceous grey	pubescencia
La Dulce	Olivaceous grey/	Estromático con
s4h3c1	pale olivaceous grey	pubescencia
La Dulce	Pale olivaceous grey	Estromático con
s2h2c3	Olivaceous grey/	pubescencia

\* Colores extractados de la Tabla de colores de Rayner (1967).

## B. Evaluación de la virulencia de los aislamientos nativos

El experimento se diseñó en bloques al azar con 3 repeticiones. Cada repetición estuvo constituida por 10 plantúlas de trigo (primera hoja extendida) del cultivar BIOINTA 1005

Listado de aislamientos

Número del aislamiento	Aislamiento	Origen	Año
1	FALP013SM1h1c2R2	Tres Arroyos	2013
2	FALP013SM1h2c1R2	Tres Arroyos	2013

3	FALP013SMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
4	FALP015ACAh1c1R1	Bahia Blanca	2015
5	FALP013CMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
6	FALP014AUh1c1R2	Polvorines	2014
7	FALP014AUh2c1R2	Polvorines	2014
8	FALP014AUh4c1R2	Polvorines	2014
9	FALP014AUh5c1R2	Polvorines	2014
10	FALP013APAh1c2R2	CoronelDorrego	2013
11	FALP013APAh2c1R2	CoronelDorrego	2013
12	FALP013APAh3c1R2	CoronelDorrego	2013
13	FALP013LDS2h2c3R2	San Cayetano	2013
14	FALP013PERh2c1R2	Pergamino	2013
16	FALP013COPh2c2R2	Tres Arroyos	2013
17	FALP013COPh3c1R2	Tres Arroyos	2013
18	FALP013CARh2c3R2	San Cayetano	2013
19	FALP013LIN Ah1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
20	FALP013LIN Ah2c2R2	Cordoba(MJ)	2013
21	FALP013LIN Ah4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
22	FALP013LIN Ah3c1R2	Cordoba(MJ)	2013
23	FALP013LAVERh4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
24	FALP013LAVERh5c2R2	Cordoba(MJ)	2013
25	FALP013PERh3c3R2	Pergamino	2013
26	FALP015MIRs1h2c1R1	Miramar	2015
27	FALP015MIRs2h3c1R1	Miramar	2015
28	FALP014OREh1c1R2	Tres Arroyos	2014
29	FALP014LDs4h3c1R2	SanCayetano	2014
30	FALP015ACAh2c1R1	Bahia Blanca	2015
31	FALP014AUh3c1R2	Polvorines	2014
32	FALP013KGUEh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
33	FALP013KGUEh6c1R2	Cordoba(MJ)	2013
34	FALP013KGUEh5c1R2	Cordoba(MJ)	2013
35	FALP013LDs1h1c1R2	SanCayetano	2013
36	FALP013LDs3h2c2R2	SanCayetano	2013
37	FALP013LDs3h1c2R2	SanCayetano	2013
38	FALP013LDs2h2c1R2	SanCayetano	2013
39	FALP013LDs4h1c2R2	SanCayetano	2013
40	FALP013LDs4h2c1R2	SanCayetano	2013
41	FALP013PERh1c1R2	Pergamino	2013
42	FALP013CMh3c1R2	Tres Arroyos	2013
43	FALP013BINTAh1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
44	FALP013BINTAh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
45	FALP015MIRs1h1c1R2	Miramar	2015
46	FALP015MIRs1h3c1R2	Miramar	2015
47	FALP015MIRs2h1c1R2	Miramar	2015
48	FALP013CARh1c1R2	SanCayetano	2013
49	FALP013COPh4c1R2	TresArroyos	2013
50	FALP013LVh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
51	FALP013LVh3c1R2	Cordoba(MJ)	2013
52	FALP013LVh7c1R2	Cordoba(MJ)	2013
53	FALP013LVh6c1R2	Cordoba(MJ)	2013
54	FALP013OREh3c1R2	TresArroyos	2013

Tabla 3. Porcentaje de necrosis y de picnidios desarrollados por los aislamientos nativos de *S. tritici* sobre el cultivar BIOINTA 1005.

<b>Promedio</b>	<b>h1/nec</b>	<b>h1/pic</b>	<b>h2/nec</b>	<b>h2/pic</b>
<b>R!R2R3</b>				
<b>Aurorah1c1</b>	<b>2,42</b>	<b>0,42</b>	<b>1,6</b>	<b>0,85</b>
<b>Aurora h4c1</b>	<b>17,92</b>	<b>3,22</b>	<b>4,58</b>	<b>3,3</b>
<b>Aurorah2c1</b>	<b>1,39</b>	<b>0,26</b>	<b>0,71</b>	<b>0,5</b>
<b>Aurorah5c1</b>	<b>1,08</b>	<b>0,45</b>	<b>2,26</b>	<b>0,35</b>
<b>ACAh1c1</b>	<b>36,94</b>	<b>26,05</b>	<b>8,83</b>	<b>6,63</b>
<b>ACAh2c1</b>	<b>44,1</b>	<b>20</b>	<b>10,83</b>	<b>6,91</b>
<b>Miramar</b>	<b>15,89</b>	<b>26,04</b>	<b>7</b>	<b>3,12</b>
<b>s2h3c1</b>				
<b>Orenseh2c1</b>	<b>14,58</b>	<b>7,43</b>	<b>8,32</b>	<b>1,86</b>
<b>SM1h2c1</b>	<b>1,17</b>	<b>0,46</b>	<b>0,89</b>	<b>0,3</b>
<b>SM1h1c2</b>	<b>1,27</b>	<b>0,13</b>	<b>0,41</b>	<b>0,053</b>
<b>Aparicioh2c1</b>	<b>2,11</b>	<b>0,06</b>	<b>0,33</b>	<b>0</b>
<b>Aparicioh3c1</b>	<b>29,46</b>	<b>18,09</b>	<b>7,74</b>	<b>4,58</b>
<b>Aparicioh1c2</b>	<b>1,053</b>	<b>0</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>
<b>Aparicioh4c2</b>	<b>23,22</b>	<b>13,11</b>	<b>3,83</b>	<b>0,75</b>
<b>Cristiano</b>	<b>0,88</b>	<b>0</b>	<b>0,34</b>	<b>0</b>
<b>muerto</b>				
<b>Copetonas</b>	<b>1,26</b>	<b>0,09</b>	<b>0,84</b>	<b>0</b>
<b>h3c1</b>				
<b>Copetonas</b>	<b>5,41</b>	<b>1,33</b>	<b>2,63</b>	<b>0,27</b>
<b>h2c1</b>				
<b>Copetonas</b>	<b>0,36</b>	<b>0</b>	<b>0,16</b>	<b>0</b>
<b>h1c1</b>				
<b>MJLVh4c1</b>	<b>2,32</b>	<b>0</b>	<b>1,16</b>	<b>0,13</b>
<b>MJLVh5c1</b>	<b>1,81</b>	<b>0,56</b>	<b>0,85</b>	<b>0,11</b>
<b>Carretero</b>	<b>1,77</b>	<b>0,08</b>	<b>1,78</b>	<b>0</b>
<b>h5c3</b>				

Esta próxima la evaluación del segundo grupo (34 aislamientos).

## **Resultados preliminares**

### **A. Evaluación de la velocidad de crecimiento y morfología de los aislamientos nativos.**

El 10% de los aislamientos registraron el mayor crecimiento de sus colonias a los 15 días de cultivo, estando representados por las localidades de San Mayol, Bahía Blanca y Coronel Dorrego. Otro 10% registro el valor más bajo de crecimiento en las localidades de Miramar, Marco Juárez y Bahía Blanca. El 80% de los aislamientos de la población, restantes, desarrollaron un crecimiento que varió entre 0.93cm y 1.68 cm (Tabla 1).

En relación a los colores de las colonias (Tabla 2), el 83% de los aislamientos, sin relacionarse con la localidad de procedencia, resultaron de color olivaceous grey en tanto que un 3% fue Iron grey y otro 4% de color olivaceous black.

Con respecto a la estructura de las colonias (Tabla 2), el 53% correspondió al tipo estromático que es la morfología de colonias características de *S.tritici*; un 3% es de estructura mucosa, rosada, constituida por blastosporas y que condujo a la



diferenciación entre *S.tritici* y *Zymoseptoria tritici* (Quadevilage et.al., 2011) y por último el 44% restante que fueron de tipo miceliar. Para estos caracteres tampoco existió relación con la localidad de origen.

## **B. Evaluación de la virulencia de los aislamientos nativos**

Los resultados de la inoculación de la primera serie de aislamientos (21 aislamientos) demostró que el 38% generó lesiones entre el 1-1.5% de necrosis, el 14% fueron los más virulentos ya que las lesiones alcanzaron entre un 29-44% de necrosis mientras que el 48% restante desarrollaron lesiones entre 1.7 y 23% de necrosis. Los valores de porcentaje de cobertura picnidial siguieron las mismas proporciones que los de necrosis (Tabla 3).

Los aislamientos más virulentos pertenecían a las localidades de Miramar (FALP015MIRs1h3c1R2), Coronel Dorrego (FALP013APAh3c1R2) y Bahía Blanca (FALP015ACAh1c1R1, FALP015ACAh2c1R1). Estos mismos desarrollaron colonias con los mayores radios de crecimiento, demostrando una posible asociación entre la virulencia y la velocidad de crecimiento.

A partir de los resultados preliminares y sobre la base de la hipótesis planteada se observa que los aislamientos nativos, provenientes de cultivos de trigo con aplicaciones de fungicida, habrían perdido sensibilidad al agroquímico. Este efecto se confirmara con el análisis molecular de los amplificadores y secuenciación del genoma de los mismos aislamientos. No obstante, se señala la importancia de relacionar la virulencia y la velocidad de crecimiento como indicio de una ganancia de resistencia a los grupos químicos azoles y estrobilurinas frecuentes en el tratamiento de la “Mancha de la hoja del trigo”.