



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# TESIS DOCTORAL

## Caracterización y variación patogénica de *Pyrenophora* spp. y localización de la resistencia en trigo

Ing. Agr. Juan Pablo Uranga

Facultad de Ciencias Agrarias y  
Forestales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de  
Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata**

Tesista: **Ing. Agr. Juan Pablo Uranga**

Directora de tesis: **PhD. MSc. Ing. Agr. María Rosa Simón**

Co directora de tesis: **Dra. Analía Perelló**

Jurado de tesis:

**Dra. Ingrid Garbus**

**Dra. Josefina Racedo**

**Dr. Eduardo Tambussi**

## **Agradecimientos**

*Esta tesis está dedicada a Analía, por su amor, apoyo y empuje durante toda la carrera.*

*A mi familia, por su apoyo incondicional y porque permitieron que esto se haga posible.*

*A Frida, mi perra, por ser una fiel compañera.*

*Un especial agradecimiento a la Dra. María Rosa Simón y a la Dra. Analía Perelló por la constante dedicación y apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo.*

*A mis compañeros y amigos de la Cátedra de Cerealicultura, con quienes compartí horas entrañables a lo largo de este camino de formación profesional y personal.*

*A los tesisistas de grado y pasantes que colaboraron en la realización de los ensayos.*

*Al Ing. Agr Martín Pardi y personal no-docente de la Estación Experimental J.Hirschorn por su colaboración en la conducción de los ensayos a campo.*

*Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) que financió mis estudios.*

*A los jurados de tesis por su tiempo, dedicación y sus valiosos aportes para mejorar este trabajo.*

## Producción científica derivada exclusivamente de esta tesis doctoral

### Publicaciones

- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Börner, A., Perello, A., Simón, M.R. **2015. Variabilidad en la resistencia a mancha amarilla en genotipos de trigos primaverales provenientes de diversos orígenes.** Revista FAVE, **Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Agrarias** 14 (2):177-186. ISSN 1666-7719 versión impresa ISSN 2346-9129 versión on-line (Publicado)
- **Uranga, J.P.**, Ordoqui, A., Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Börner, A., Simón, M.R. **2017. Genome wide association mapping of genetic factors controlling *Pyrenophora* ssp. resistance in spring wheat genotypes from diverse origins.** **2017.** Ann. Wheat Newsl. 63: 8-15 Ed.Kansas State University (Publicado)
- **Uranga, J.P.**, Perelló, A.E., Simón, M.R. **2018. Characterization of the resistance to *Pyrenophora* sp. in Argentinian wheat cultivars.** Ann. Wheat Newsl. 64. Ed. Kansas State University (Publicado)
- Perelló, A.E., Couretot, L., Curti, A., **Uranga, J.P.**, Consolo, V.F. **2019. First report of spot lesion of wheat caused by *Pyrenophora teres* f. sp *maculata* observed in Argentina.** *Crop Protection* 122: 19-22. (Publicado)
- **Uranga, J.P.**, Perelló, A.E., Simón, M.R. **2019. Caracterización de la resistencia a *Pyrenophora* sp. en cultivares argentinos de trigo.** Revista Técnica de la Asociación Argentina de Productores de Siembra Directa. (En prensa).
- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Lohwasser, U., Börner, A., Simón, M.R. **2019. Mapping QTL for resistance to novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* in a spring wheat panel.** European Journal of Plant Pathology ISSN: 0929-1873 (Print) 1573-8469 (Online) (enviado).

### Congresos

- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Börner, A., Simón, M.R. **2015. Variability on tan spot resistance of spring wheat genotypes from diverse origins.** 9th International Wheat Conference 2015. 20-25 septiembre Sidney, Australia. Pag: 145
- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Börner, A., Simón, M.R. **2015. Variabilidad en la resistencia a mancha amarilla en genotipos de trigos primaverales de diversos orígenes.** XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 7-9 Octubre, Ciudad de Santa Fé, Argentina. Libro de resúmenes Pag. 138 (ISSN 2451 - 8069)

- **Uranga, J.P.**, Ordoqui, A., Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Börner, A., Simón, M.R. **2016. Variabilidad en la resistencia a *Pyrenophora spp.* en genotipos de trigos primaverales de diversos orígenes.** VIII Congreso Nacional de trigo. Pergamino, 14 al 16 de septiembre de 2016. Libro de resúmenes.
- **Uranga, J.P.**, Ordoqui, A., Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Börner, A., Simón, M.R. **2017. Genome wide association mapping of genetic factors controlling *Pyrenophora ssp.* resistance in spring wheat genotypes from diverse origins.** 8th International Triticeae Symposium 2017-13th Gatersleben Research Conference EUCARPIA Cereals Section; 12-16 June 2017, Wernigerode-Germany. Book of abstracts page 88.
- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Börner, A., Simón, M.R. **2017. Mapeo asociativo para resistencia a *Pyrenophora ssp.* en trigos primaverales de diversos orígenes.** III Workshop Internacional de Ecofisiología de Cultivos. Mar del Plata, 28 y 29 de septiembre de 2017.

#### Otras:

- **Uranga, J.P.**, Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Borner A., Simón M.R. **2016. Variabilidad en la resistencia a mancha amarilla en genotipos de trigos primaverales de diversos orígenes.** 5ta Entrega de las actividades de docencia, investigación y extensión de la Estación Experimental Julio Hirschhorn. Páginas 40-44 (Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53287>)
- **Uranga, J.P.**, Perelló, A.E., Simón, M.R. **2018. Caracterización de la resistencia a *Pyrenophora sp.* en cultivares argentinos de trigo.** 6<sup>ta</sup> Entrega de las actividades de docencia, investigación y extensión de la Estación Experimental Julio Hirschhorn. Pág 24-27 (Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67373>)

<b>Índice general</b>		<b>Pág.</b>
Jurado de tesis		i
Agradecimientos		ii
Producción científica derivada exclusivamente de esta tesis doctoral		iii
Índice general		1
Abreviaturas		3
Resumen		4
Summary		6
<b>CAPÍTULO 1. Introducción general</b>		
1. El cultivo de trigo		8
1.1. Origen, evolución y genética		8
1.2. Importancia del cultivo		10
1.3. Desafíos futuros en la producción		10
1.4. Enfermedades en el cultivo de trigo		13
2. Mancha amarilla		14
2.1. Importancia		14
2.2. El agente causal		15
2.3. Sintomatología		17
2.4. Ciclo del agente causal de la mancha amarilla		18
2.5. Variación patogénica		21
3. Manejo integrado de la enfermedad		24
3.1. Resistencia genética		25
4. Objetivos e hipótesis de la tesis		28
5. Diagrama de la tesis		29
<b>CAPÍTULO 2. Identificación y patogenicidad de una nueva especie de <i>Pyrenophora</i> integrante del complejo de manchas foliares del trigo</b>		
1. Introducción		30
2. Hipótesis		31
3. Objetivos		32
4. Materiales y métodos		32
5. Resultados		34
6. Discusión		37
<b>CAPÍTULO 3. Caracterización de la resistencia a <i>Pyrenophora sp</i> en cultivares argentinos de trigo.</b>		
1. Introducción		39
2. Hipótesis		40
3. Objetivos		40
4. Materiales y métodos		40
4.1. Aislamientos del hongo		40
4.2. Material vegetal		41
4.3. Diseño experimental		42
4.4. Preparación del inóculo		43
4.5. Inoculaciones y evaluaciones		43
4.5.1. Estado de plántula		43
4.5.2. Estado adulto		44

4.6.	Análisis de datos	44
4.7.	Condiciones climáticas	45
5.	Resultados	45
5.1.	Días a espigazón (DAE)	45
5.2.	Análisis estadístico	47
5.3.	Resistencia en estado de plántula	48
5.4.	Resistencia en estado adulto	50
5.5.	Relación entre PSP y PSA	52
6.	Discusión	54

#### **CAPÍTULO 4. Localización de la resistencia a *Pyrenophora spp.* en una colección de trigos primaverales.**

1.	Introducción	57
1.1.	Marcadores moleculares y selección asistida en el mejoramiento	57
1.2.	Mapeo de genes asociados a caracteres de importancia agronómica	58
1.3.	Mapeo clásico	59
1.4.	Mapeo por asociación	60
2.	Hipótesis	62
3.	Objetivos	62
4.	Materiales y métodos	62
4.1.	Aislamientos del hongo	62
4.2.	Material vegetal	63
4.3.	Diseño experimental	67
4.4.	Condiciones climáticas	67
4.5.	Evaluaciones fenotípicas	69
4.5.1.	Estado de plántula	69
4.5.2.	Estado adulto	69
4.6.	Análisis de datos fenotípicos	70
4.7.	Genotipado y estructura poblacional	70
4.8.	Análisis de la asociación marcador-carácter (AMC)	71
5.	Resultados	72
5.1.	Análisis de los datos fenotípicos	72
5.1.1.	Días a espigazón (DAE) y altura de planta (ADP)	72
5.1.2.	Porcentaje de severidad	72
5.1.2.1.	Estado de plántula	74
5.1.2.2.	Estado adulto	78
5.1.3.	Estructura poblacional	84
5.2.	Asociación marcador-carácter (AMC)	86
5.3.	Relación entre número de alelos favorables y la resistencia	89
6.	Discusión	93

#### **CAPÍTULO 5. Discusión general**

Discusión general	97
Principales conclusiones de la tesis	100
Futuras investigaciones	101
Referencias bibliográficas	102
Anexo	115

## Abreviaturas

**ADP:** altura de planta  
**ANVA:** análisis de la varianza  
**AMC:** asociación marcador – caracter  
**CIDEFI:** Centro de Investigaciones en Fitopatología (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales)  
**cm:** centímetro  
**cM:** centimorgan  
**C/N:** relación carbono nitrógeno  
**Cl:** clorosis  
**°C:** grados Celcius  
**DAE:** días a espigazón  
**DArT:** Diversity Arrays Technology  
**DL:** desequilibrio de ligamiento  
**FCAyF:** Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
**GL:** grados de libertad  
**ha:** hectáreas  
**h:** horas  
**HB:** Hoja bandera  
**HB-1:** Hoja inmediatamente inferior a la HB  
**HB-2:** Hoja inmediatamente inferior a la HB-1  
**Kcal:** kilocalorías  
**km:** kilometro  
**l:** litro  
**LOD:** logaritmo de las probabilidades  
**m:** metros  
**mm:** milímetro  
**m<sup>2</sup>:** metros cuadrado  
**Mha:** millones de hectáreas  
**Mt:** millones de toneladas  
**MLG:** modelo lineal general  
**MLM:** modelo lineal mixto  
**Mpb:** mega pares de bases  
**MR:** moderadamente resistente  
**MS:** moderadamente susceptible  
**ml:** mililitro  
**µm:** micrómetro  
**N:** necrosis  
**Nro.:** número  
**pb:** pares de bases  
**Pcia. :** provincia  
**PSP:** porcentaje de severidad en estado de plántula  
**PSA:** porcentaje de severidad en estado adulto  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**Prom:** promedio  
**QTL:** Locus de un carácter cuantitativo  
**R:** resistente  
**S:** susceptible  
**t:** tonelada  
**UDA:** umbral de acción  
**UNLP:** Universidad Nacional de La Plata



## Resumen

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre y a lo largo de la historia ha sido junto al arroz y el maíz el alimento básico de la mayoría de las civilizaciones. En la actualidad, es sembrado en una superficie de tierra mayor que la de cualquier otro cultivo comercial. El rendimiento aumentó a una tasa de 3,6 % anual durante el periodo 1966-1979, reduciendo de manera significativa el hambre y la pobreza en muchas partes de mundo. A partir de ese momento, el crecimiento de la productividad en el trigo ha disminuido de manera constante. Esto, sumado a que se prevé que la demanda mundial de trigo aumente a un ritmo más rápido que el de las ganancias genéticas actuales, pone de manifiesto la necesidad de aumentar la tasa de mejora del rendimiento. Además el efecto del cambio climático y las pérdidas ocasionadas por enfermedades y plagas, deja en claro la necesidad de incrementar las tasas de ganancia, y aun más considerando que la demanda de trigo aumenta a un ritmo más alto que el aumento de rendimiento. Para lograr esto es fundamental el estudio y explotación de la diversidad genética a niveles moleculares y su integración con métodos de mejora convencionales. Con esto se busca la incorporación de resistencia durable, ya que no es posible obtener genotipos de alto rendimiento estable sin adecuada resistencia a las principales enfermedades del cultivo, que se encuentran entre las principales limitantes bióticas que reducen la expresión de la potencialidad de los rendimientos. Éstas se han incrementado en los últimos años en Argentina y otros países, debido a factores culturales, tales como el incremento de la siembra directa, como así también la susceptibilidad de los cultivares y la alta variabilidad genética de los patógenos causales. La mancha amarilla ocasionada por el hongo necrotrófico *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs (anamorfo *Drechslera tritici-repentis*) (Died) Shoem), se encuentra entre las principales restricciones bióticas que limitan el rendimiento del cultivo de trigo pan en Argentina y otros países. El manejo frente a esta patología en gran medida se ha basado en el uso de fungicidas; sin embargo, el aumento de la resistencia o menor sensibilidad frente a los grupos químicos más utilizados, revela la necesidad e importancia de alcanzar adecuados niveles de resistencia genética. Esta medida de manejo presenta una baja relación costo-beneficio, evita la contaminación ambiental, determinando además el éxito de otras estrategias de manejo. A su vez, en los últimos años se ha detectado al hongo *Pyrenophora teres*, patógeno en cebada, causando síntomas en trigo similares a los ocasionados por *P. tritici-repentis*, por lo que es necesario investigar su patogenicidad, virulencia y/o agresividad sobre cultivares comerciales de Argentina y localización molecular de la resistencia en un set de genotipos previamente mapeados. El objetivo general de esta tesis es contribuir al mejoramiento de la resistencia a la mancha amarilla del trigo a través de la investigación de la estructura de especies del género *Pyrenophora* y la localización molecular de la resistencia en una población de genotipos de trigo previamente seleccionados. En el **Capítulo 1** se presenta una introducción general a la tesis, en la que se describen las características del cultivo de trigo y el contexto actual. Adicionalmente, se presentan las características de *P. tritici-repentis* y su implicancia sobre las medidas disponibles para su manejo. En el **Capítulo 2** se presenta la identificación y caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Pyrenophora spp.* recolectados de cultivos de trigo en distintas regiones de Argentina. Con estos aislamientos se realizaron pruebas de patogenicidad bajo invernáculo en cultivares de trigo y luego se procedió a la

caracterización morfológica de las colonias y de las estructuras reproductivas. Las características morfoculturales descritas fueron compatibles con *P. teres*. A su vez se realizó la identificación molecular la cual corroboró que la especie en cuestión era *P. teres f. maculata*. En el **Capítulo 3**, se presenta la caracterización fenotípica de la resistencia, en plántula y estado adulto, de un panel compuesto por 30 cultivares de trigo argentinos utilizados comercialmente, frente a tres aislamientos monospóricos de los patógenos caracterizados, dos de *P. teres* y uno de *P. tritici-repentis* que no se corresponde con las razas conocidas. Los ensayos se realizaron durante el 2016 en dos ambientes, en macetas y a campo. Las inoculaciones se realizaron en la etapa de dos hojas totalmente desplegadas (GS 12) y macollaje (GS23) y se evaluó la severidad en plántula y adulto como porcentaje de área afectada por clorosis y necrosis. Se destacaron por presentar una buena resistencia en ambos estados los cultivares Algarrobo de Don Mario, Buck SY 110 y ACA Cedro. Mientras que los cultivares con mayor susceptibilidad durante todo el ciclo fueron Sursem LE2330, Floripan 200 y ACA 602. Esto sugiere la necesidad de seguir mejorando genéticamente la sanidad de los cultivares locales, lo que implica la búsqueda de materiales que posean genes de resistencia para ser utilizados en futuros programas de mejoramiento. En el **Capítulo 4** se exponen los resultados del estudio de mapeo asociativo de todo el genoma en una colección de 110 genotipos de trigo de diverso origen. En esta población de mapeo se evaluó la resistencia a dos aislamientos de *P. tritici-repentis* y dos de *P. teres*, lográndose identificar numerosos marcadores y QTL asociados a cada uno de ellos. A su vez se evaluaron otros caracteres como días desde emergencia a espigazón y altura de planta, para determinar su relación con la resistencia. Los ensayos se realizaron a campo en los años 2014 y 2015 realizando inoculaciones artificiales y evaluando el porcentaje de severidad en plántula y adulto. La severidad en adulto se correlacionó positivamente con los días a espigazón. Se encontró una alta variabilidad fenotípica en la resistencia y muy pocos genotipos mostraron resistencia en ambas etapas. El mapeo asociativo arrojó como resultado un total de 187 asociaciones marcador – carácter (severidad) (AMC). Estas asociaciones involucraron 110 marcadores, los cuales se distribuyeron en 57 regiones cromosómicas en 19 de los 21 cromosomas, de los cuales aquellos presentes en el cromosoma 6D no se habían documentado hasta el momento. Se detectaron 41 regiones cromosómicas que se asociaron con resistencia a *P. tritici-repentis*, de las cuales 15 de ellas son novedosas; mientras que para *P. teres* se detectaron 43 regiones. Resulta relevante que 27 regiones cromosómicas presentaron asociación con aislamientos de ambos patógenos, ya que de esta manera se amplía el espectro de la resistencia. Por último, en el **Capítulo 5**, se presenta la discusión general de los principales resultados obtenidos en cada una de las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis. Adicionalmente, se analiza la importancia de los nuevos conocimientos generados, así como también la posibilidad de su utilización y los trabajos adicionales requeridos a fin de aplicarlos en programas de mejora del cultivo de trigo.

## Summary

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the earliest domesticated crops and throughout history has been the staple food of most civilizations. At present, it is sowed on a larger area than any other commercial crop. The yield increased at a rate of 3.6% per year during the period 1966-1979, significantly reducing hunger and poverty in many parts of the world. Since then, the growth wheat productivity has decreased steadily. This, in addition to the fact that world wheat demand is expected to increase at a faster rate than the current genetic gains, highlights the need to increase the yield improvement rate. This, added to the climate change effect and the losses caused by diseases and pests, makes clear the need to increase profit rates. Genetic diversity studies at molecular levels and their integration with conventional breeding methods is fundamental. This requires the incorporation, of durable resistance since it is not possible to obtain high yield and stable genotypes without adequate resistance to the main crop diseases, which are one of the main biotic limitations that reduce the expression of the yield potential. The yield potential has increased in recent years in Argentina and other countries, due to cultural factors, such as the direct sowing increase, as well as the cultivars susceptibility and the high genetic variability of the causal pathogens. Tan spot caused by the necrotrophic fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs (anamorph *Drechslera tritici-repentis* (Died) Shoem), is among the main biotic restrictions that limit the wheat yield in Argentina and other countries. Management has been based on the use of fungicides, however, the increase in resistance or lower sensitivity to the most used chemical groups, reveals the need and importance of achieving adequate levels of genetic resistance. This management has a low cost-benefit ratio, avoids environmental contamination, and also determines the success of other management strategies. In turn, the fungus *Pyrenophora teres*, pathogenic in barley, has been detected in recent years, causing symptoms in wheat similar to those caused by *P. tritici-repentis*, so it is necessary to investigate its pathogenicity, virulence and/or aggressiveness on commercial wheats in Argentina and the molecular location of the resistance in a set of previously mapped genotypes. The general objective of this thesis is to contribute to the improvement of resistance to tan spot in wheat by investigating the structure of *Pyrenophora* species and the molecular location of resistance in a population of previously selected wheat genotypes. In **Chapter 1**, a general introduction is presented, in which the characteristics of the wheat crop and the current context are described. Additionally, the characteristics of *P. tritici-repentis* and its implications on the available measures for its management are presented. **Chapter 2** presents the identification and morphological and molecular characterization of *Pyrenophora* spp. isolates collected from wheat crops in different regions of Argentina. With these isolates, pathogenicity tests were carried out under greenhouse in wheat cultivars and then proceeded to the morphological characterization of the colonies and reproductive structures. The morpho-cultural characteristics described were compatible with *P. teres*. At the same time, the molecular identification was made, which corroborated that the species in question was *P. teres*. **Chapter 3**, presents the phenotypic characterization of the resistance, at seedling and adult stage, of a panel composed of 30 Argentine commercial wheat cultivars, against three monosporic isolates of the characterized pathogens, two of *P. teres* and one of *P. tritici-repentis* that does not correspond to the known races. The experiments were carried out during 2016 in two environments (field and pots). The inoculations were carried out at the two leaves growth stage (GS 12) and tillering (GS23) and the severity at seedling and adult stage was evaluated as percentage of the area affected by chlorosis and necrosis. Algarrobo, Buck SY 110 and ACA Cedro cultivars stood out for being resistant at both growth stages. While the cultivars with greater susceptibility throughout the crop cycle were Sursem LE2330, Floripan 200 and ACA 602. This suggests the need to continue improving the local cultivars genetically, which implies the search for materials that have resistance genes to be used in future

improvement programs. In **Chapter 4**, the results of an associative mapping study in a collection of 110 wheat genotypes of different origin are presented. In this mapping population, resistance to two isolates of *P. tritici-repentis* and two isolates of *P. teres* was evaluated, identifying numerous markers and QTL associated to the isolates. In addition, the heading date and plant height were evaluated to determine their relationship with resistance. The trials were carried out in the field in 2014 and 2015, performing artificial inoculations and evaluating the percentage of severity at seedling and adult stages. The severity in the adult stage correlated positively with heading date. A high phenotypic variability in resistance was found and very few genotypes showed resistance in both stages. The associative mapping resulted in a total of 187 associations. These associations involved 110 markers, which were distributed in 57 chromosomal regions in 19 of the 21 chromosomes, of which those present on chromosome 6D had not been documented so far. This study found 41 chromosomal regions that were associated with resistance to *P. tritici-repentis*, of which 15 of them are novel; while for *P. teres*, 43 regions were detected. The interesting thing is that 27 chromosomal regions presented association with isolates of both pathogens, since these regions would extend the spectrum of resistance. Finally, in **Chapter 5**, the general discussion of the main results obtained in each of the investigations carried out in this thesis is presented. Additionally, the importance of the new knowledge generated is analyzed, as well as the possibility of its use and the additional work required in order to apply it in wheat breeding programs.

# CAPÍTULO 1

## Introducción general

### 1. El cultivo de trigo

#### 1.1. Origen, evolución y genética

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es una especie de la familia de las gramíneas, originario de Asia occidental (Cornell & Hoveling, 1998). Los trigos primitivos se cultivaban en el denominado creciente fértil ubicado en el suroeste de Irán, el noreste de Irak, y el sureste de Turquía; lugar donde todavía se pueden encontrar creciendo trigos de tipo silvestres. La domesticación comenzó hace aproximadamente 10.000 años en el creciente fértil, ayudando a la transición de la humanidad de la caza y la recolección nómada a la agricultura sedentaria. En un comienzo, las primeras formas cultivadas de trigos fueron especies de tipo diploide (genoma AA) (*einkorn*, *Triticum monococcum*) (Shewry, 2009). Posteriormente y a partir de un cruzamiento natural entre dos especies silvestres, *Triticum urartu* (genoma AA,  $2n=2x=14$ ) y una especie de *Aegilops*, estrechamente relacionada con *Aegilops speltoides* (genoma BB,  $2n=2x=14$ ), resultó en la generación de la forma *emmer* silvestre, *Triticum dicoccoides* con genoma tetraploide (AABB,  $2n=4x=28$ ) (Daud & Gustafson, 1996). La selección de las formas *emmer* silvestres por mayores tamaños de espigas, resultó en su subsecuente domesticación (*Triticum diccicum*) y en su evolución al moderno trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). Posteriormente, un segundo cruzamiento natural entre la especie *emmer* cultivada (genoma tetraploide AABB,  $2n=4x=28$ ) y la especie silvestre *Aegilops tauschii* (genoma DD,  $2n=2x=14$ ) resultó finalmente en la creación del trigo hexaploide *T. aestivum* actual (genoma AABBDD,  $2n=6x=42$ ) (Kihara, 1944; McFadden & Sears, 1946). El conocimiento *a priori* de la composición del genoma del trigo es esencial, ya que presenta implicancias en el mejoramiento genético del cultivo.

Durante el periodo de domesticación del cultivo, la presión de selección aplicada por el hombre, consciente o inconscientemente se ha traducido en adaptaciones del mismo a las necesidades humanas. Los cambios genéticos responsables de tales adaptaciones se conocen con el nombre de “síndrome de la domesticación” (Hammer, 1984) y un componente principal de este proceso fue la pérdida del quebranto de la espiga, previniendo la dispersión de los granos por el

viento y facilitando la cosecha (Dubcovsky & Dvorak, 2007). Otro rasgo importante en la domesticación del trigo fue el paso de glumas resistentes a aquéllas que presentan mayor facilidad de trilla. Los determinantes genéticos de este cambio han sido mutaciones recesivas en el locus *Tg* (gluma tenaz), acompañado de la modificación de efectos de la mutación dominante en el locus *Q* y las mutaciones en varios otros loci (Jantasuriyarat *et al.*, 2004). Otros cambios que acompañaron la domesticación fueron el aumento de tamaño de semilla, un número reducido de macollos, crecimiento más erecto y reducida latencia de las semillas entre otros (Uauy *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista genético, el trigo pan (*Triticum aestivum* L.) presenta un número haploide de cromosomas de  $n = 21$ . En función de su similitud, los 21 pares de cromosomas homeólogos (i.e. parcialmente homólogos, que indican alguna homología ancestral), (siete pares en cada genoma) se dividen en siete grupos homeólogos, conteniendo cada uno un par de cromosomas de los genomas A, B, y D, respectivamente (Sears, 1954). En cada grupo los cromosomas homeólogos, que se derivan de un cromosoma ancestral común, todavía comparten un alto grado de sintenia (i.e. similitud de secuencias cromosómicas de distintas especies que indican proximidad filogenética) y homología. Sin embargo, difieren uno de otro en secuencias de ADN no codificante y altamente repetitivas (Flavell, 1982), así como también en muchos complejos de genes funcionales (Wicker *et al.*, 2011). A pesar de esta relación genética, los homeólogos no se emparejan entre sí en la meiosis, como consecuencia del control genético regulado por el gen *Ph1* localizado en el cromosoma 5B, así como también por las divergencias físicas existentes (Feldman & Levy, 2011). Por las razones expuestas, la genética del trigo es más complicada que la de la mayoría de las otras especies de plantas domesticadas. Es una especie con un gran tamaño de genoma, de alrededor de  $1,8 \times 10^{10}$  pb, con un contenido promedio de 762 Mpb por cromosoma, lo que lo hace aproximadamente 35 veces y 110 veces mayor que el del arroz (*Oryza sativa* L.) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.), respectivamente (Hussain & Rivandi, 2007). Tres cromosomas del trigo transportan el mismo contenido de ADN del genoma del maíz haploide completo, y la mitad de un cromosoma promedio del trigo es equivalente al genoma del arroz haploide (Gill & Gill, 1994). El gran tamaño de su genoma se debe a extensas regiones de elementos de ADN repetitivos, que representan aproximadamente el 90 % del mismo (Wanjugi *et al.*, 2009). Por otra parte, como consecuencia de su poliploidía, el trigo es capaz de tolerar cambios en la estructura y el número de cromosomas. Esto ha llevado al desarrollo de poblaciones de complejos *stock* citogenéticos (líneas de delección, sustitución) (Endo & Gill, 1996). Estos materiales han sido de gran utilidad en el mapeo físico, en cromosomas específicos, de loci asociados a caracteres de importancia agronómica.

## **1.2. Importancia del cultivo**

En la actualidad, el trigo es sembrado en una superficie de tierra mayor que la de cualquier otro cultivo comercial (ocupa el 15% de la superficie cultivable a nivel mundial) y continúa siendo la fuente de grano alimenticio más importante de la humanidad (Joshi *et al.*, 2011). En este contexto, el grano de trigo proporciona 28 % del total de materia seca, cerca de 55 % de los carbohidratos y 20 % de las proteínas que se consumen como alimento en el mundo (Braun *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2011). La contribución media mundial de trigo a la energía de la dieta humana (2870 kcal.cápita<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) se estima en el 18,25 % (524 kcal.cápita<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>), aunque ésto varía según regiones y hábitos nutricionales (FAO, 2011).

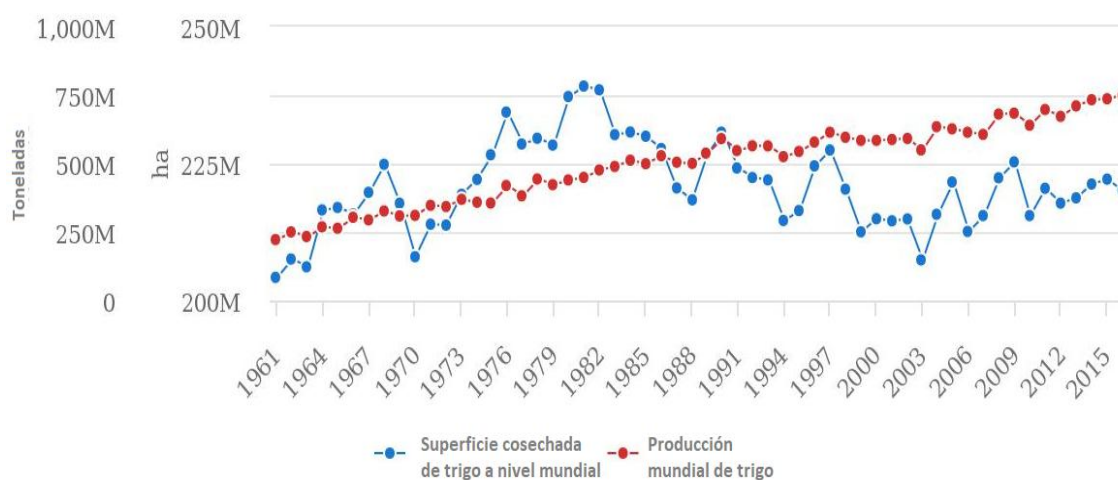
Además de ser una fuente importante de energía y proteína, el trigo también proporciona cantidades sustanciales de numerosos componentes que son beneficiosos para la salud, en particular vitaminas (principalmente del complejo B) y fibra dietética. Como consecuencia, el cultivo desempeña un papel crucial en la economía agrícola y en la seguridad alimentaria mundial, proveyendo más alimentos para las personas que cualquier otro cultivo en el mundo, con un impacto significativo en la salud humana (FAOSTAT, 2013). La gran demanda mundial de trigo se basa en la capacidad de hacer productos alimenticios únicos debido a las propiedades específicas de la fracción de proteína de gluten que permite la transformación del trigo en una gran cantidad de productos alimenticios desde pan, otros productos horneados, fideos y pastas, y una gama de ingredientes funcionales (Shewry & Hey, 2015).

Desde el punto de vista agronómico, el cultivo de trigo hace un importante aporte al balance de nutrientes en las rotaciones agrícolas. Al igual que otras gramíneas invernales, el trigo tiene una alta relación carbono-nitrógeno lo que le da a sus rastrojos una mayor resistencia a la descomposición, pero simultáneamente presenta una muy buena respuesta económica a la fertilización (Galarza *et al.*, 2011). Estas dos características hacen que su participación dentro de las rotaciones aporte tanto al balance de carbono como al de nitrógeno. El balance positivo de carbono, sumado a la alta relación C/N, le aporta estabilidad al sistema.

## **1.3. Desafíos futuros en la producción**

El rendimiento del cultivo se ha incrementado a través del tiempo en asociación con el incremento demográfico mundial. Así, a finales de la década de los 60 el uso de variedades semi-enanas de alto rendimiento, mejoradas durante la revolución verde, y las mejores prácticas de cultivo generaron un aumento drástico de la productividad. El

rendimiento aumentó a una tasa de 3,6 % anual durante el periodo 1966-1979, reduciendo de manera significativa el hambre y la pobreza en muchas partes de mundo. A partir de ese momento, el crecimiento de la productividad en el trigo ha disminuido de manera constante, cayendo a 2,8 % durante 1984-1994 y a 1,1 % en el periodo 1995-2006 (FAOSTAT, 2010). Como consecuencia, la producción de trigo se incrementó globalmente desde el año 1960 a la actualidad en un 337 %, alcanzando 749 millones de t en 2016, sobre una superficie relativamente estable entre 205 y 220 millones de hectáreas, por lo que este progreso ha sido alcanzado por incremento en el rendimiento más que por la expansión de tierra cultivable (FAO, 2016) (Fig.1.1.). Finalmente, en el año 2018 se alcanzaron las 758 millones de t (Statista, 2018). Tal aumento de los rendimientos durante este periodo estuvo asociado con mejoras genéticas en el potencial de rendimiento, resistencia a enfermedades, la adaptación al estrés abiótico, y los avances en las prácticas agronómicas (Reynolds & Borlaug, 2006). A pesar que resulta dificultoso cuantificar de manera individual los aportes genéticos y agronómicos responsables del aumento de rendimiento, se estima que cerca del 70 % del incremento en los rendimientos se debe específicamente al mejoramiento genético.



**Figura 1.1.** Producción y superficie cosechada de trigo a nivel mundial en los últimos 55 años. Adaptado de FAO, 2016.

La tasa de aumento de la productividad de trigo ha ido disminuyendo, existiendo proyecciones lineales realizadas a partir de las tasas actuales, que estarían indicando un crecimiento de solo el 0,8 % para 2050 (Fischer *et al.*, 2009), además de grandes variaciones de rendimiento entre países. Esto sumado a que se prevé que la demanda mundial de trigo aumente a un ritmo más rápido que el de las ganancias genéticas actuales (Miralles & Slafer, 2007), pone de manifiesto la necesidad de



aumentar la tasa de mejora del rendimiento. Para el año 2050, se estima que la población mundial alcanzará los 9.000 millones de personas, lo que generará un incremento del 60 % en la demanda de trigo comparado con 2010. Para satisfacer esta demanda, los aumentos globales de rendimiento anuales deben elevarse desde el nivel actual del 1 % por año (2001-2010) al 1,6 % por año (2011-2050) (*Wheat Initiative*, 2015).

Una posibilidad es incrementar la extensión de tierra cultivable, lo cual representa un problema, ya que liberar tierra para cultivo (*i.e.* correr la frontera agrícola) significa generar un mayor impacto en el ambiente (*v.g.* conservación de ecosistemas naturales) y acelerar el ritmo del cambio climático, que de por sí producirá cambios en la agricultura mundial. Se cree que la producción de trigo en países en desarrollo se verá disminuida entre un 20 y 30 % como consecuencia del aumento de la temperatura (particularmente la temperatura nocturna) generado por el cambio climático (Rosegrand & Agcaoili, 2010). Así, por cada grado Celsius que la temperatura aumenta durante el ciclo de cultivo, la producción de trigo puede llegar a disminuir hasta en un 6 %. El agua es también un problema: la agricultura consume ya un 85 % de este elemento en los países en desarrollo. En resumen, necesitamos producir más alimentos, en similar extensión de tierra y utilizando menos agua que nunca antes (CIMMYT, 2009).

Por otro lado, se estima que hasta un 20 % de la producción mundial de trigo se pierde cada año debido a enfermedades y plagas. Esto equivale aproximadamente a 150 millones de t (37.000 millones de dólares) de pérdida considerando el total de trigo producido en 2017 (FAOSTAT, 2018). A nivel mundial, los rendimientos de trigo actuales no serían alcanzables sin la aplicación de protectores químicos (biocidas); sin embargo, la preocupación por la salud y el llamado a la reducción en el uso de productos químicos, y su sustitución por cultivos resistentes a enfermedades y plagas, es un prerrequisito para alcanzar una producción amigable con el ambiente y los consumidores (*Wheat Initiative*, 2015). Como consecuencia, además de aumentos sostenidos en los rendimientos de trigo para satisfacer las demandas futuras, la notable capacidad de los patógenos de mutar, producir nuevas toxinas, y superar la resistencia del huésped, hace al logro de alcanzar resistencia duradera en el cultivo, un reto considerable. El desarrollo de resistencia durable a las enfermedades es la forma más eficaz y ecológicamente racional de manejo de las mismas. En definitiva, la brecha entre el rendimiento potencial, el rendimiento alcanzable y el logrado debe ser reducida para aumentar la producción mundial de alimentos. Por lo tanto, la generación de cultivares con mayor resistencia al estrés biótico y abiótico, junto con

las prácticas de gestión optimizadas se considera actualmente como la mejor estrategia para alcanzar este objetivo (Fischer & Edmeades, 2010).

Para incrementar el rendimiento potencial, el alcanzable y el logrado, el mejoramiento es una herramienta fundamental junto con la adopción de nuevas tecnologías de cultivo. Así, el futuro de la producción de trigo depende de la creación de nuevas variedades con mejoras en rasgos de importancia, como mayor resistencia al estrés biótico, tolerancia al estrés abiótico, una mejor calidad de uso final, 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).

#### **1.4. Enfermedades en el cultivo de trigo**

Una de las principales limitantes bióticas que reducen la expresión de la potencialidad de los rendimientos del cultivo de trigo en la Argentina son las enfermedades (Annone *et al.*, 1994). Los agentes causales de estas enfermedades, principalmente de origen micótico, parasitan los tejidos de la raíz, tallos, hojas, espigas y granos. Por la difusión, frecuencia de aparición y niveles de desarrollo epidémico que alcanzan, se considera que las enfermedades de mayor importancia relativa son aquellas que afectan a los tejidos foliares y a la espiga (y sus granos). En este sentido, muchos investigadores coinciden en que la “roya de la hoja” causada por *Puccinia triticina* Eriks, la “mancha amarilla” causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorfo *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.) y la “mancha de la hoja o septoriosis” ocasionada por *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter, in Cohn (anamorfo *Zymoseptoria tritici* Rob ex Desm.) son las enfermedades foliares más importantes; en tanto que la “fusariosis de la espiga” causada por *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schwein (Petch) es la enfermedad de la espiga más importante (Annone, 2006). El hongo *Pyrenophora teres* Drechs. (anamorfo *Drechslera teres* Sacc. Shoemaker) causa la mancha en red o reticulada de la hoja de la cebada, pero algunos trabajos concluyen que también puede atacar trigo causando síntomas similares a los producidos por *P. tritici-repentis* (Mikhailova *et al.*, 2010; Toth *et al.* 2008).

Las enfermedades causadas por hongos se clasifican en función del hábito nutricional del patógeno de la siguiente manera: (i) biotróficos, definidos como los patógenos que obtienen nutrientes del tejido vivo del hospedante; (ii) necrotróficos, son hongos que causan la muerte de tejidos, obtienen su energía a partir de éstos y

frecuentemente producen toxinas; y (iii) situaciones intermedias, es decir patógenos hemibiotróficos, donde el organismo cumple una etapa asintomática, pero a medida que avanza la infección se establecen finalmente como necrotróficos (Koeck *et al.*, 2011). Por otro lado, dependiendo del número de ciclos que cumpla el patógeno, algunos hongos sólo cumplen un ciclo de infección por ciclo de cultivo, es decir son monocíclicos, en tanto que otros son policíclicos cumpliendo varios ciclos de infección durante el cultivo. Estos últimos, pueden causar epifitias que son rápidas y explosivas (Wiik, 2009).

Las enfermedades foliares del trigo se han incrementado en los últimos años en Argentina, debido a factores culturales, tales como el incremento de la siembra directa, como así también la susceptibilidad de los cultivares y la alta variabilidad genética de los patógenos causales. La siembra directa ha sido implementada para conservar la materia orgánica y restaurar la estructura del suelo en áreas cultivadas con secuencias de doble cultivo como trigo/soja o maíz-trigo/soja o monocultivo de trigo (Alvarez & Steinbach, 2009). En la región semiárida, las técnicas de manejo conservacionista también son necesarias para prevenir la erosión y utilizar eficientemente la reducida cantidad de precipitaciones (Méndez & Buschiazzi, 2010).

## **2. Mancha amarilla**

### **2.1. Importancia**

La mancha amarilla fue observada por primera vez en trigo a fines de la década del 20 en Japón (Hosford, 1981). A partir de ese momento fue determinada en varios lugares del mundo, aunque casi siempre como una enfermedad de poca importancia hasta principios de los años 50, cuando ocasionó una epifitia severa en Kenia causando pérdidas del orden del 75 % (Gilchrist *et al.*, 1984). A comienzos de la década del 70 adquirió relevancia en regiones productoras de trigo del norte y centro de los EEUU, Australia, Nepal, México (Gilchrist *et al.*, 1984), India, oeste de Canadá y Brasil (Hosford, 1981). En EEUU, Sharp *et al.* (1976) observaron que bajo condiciones de severo ataque de esta enfermedad el peso de mil granos de un grupo de cultivares se redujo en un 9-20%. En el mismo país Hosford & Busch (1974) informaron pérdidas del 12.9 %. En Australia, Rees *et al.* (1982) calcularon que el efecto de esta enfermedad sobre la pérdida de rendimiento de un cultivar susceptible fue del orden del 50 %. Otros autores han observado mermas de rendimiento entre el 18 al 31% (Bhathal *et al.* 2003), entre 20 y 70% (Lamari & Bernier, 1989; Simón *et al.*, 2011) y del 3 al 53% (Rees & Platz 1983) debidas a mancha amarilla. Las pérdidas de rendimiento se deben a que la enfermedad genera reducciones en el número de granos por espiga

(NGE) y peso de mil granos (PMG) (Schilder & Bergstrom 1990), biomasa total (Kremer & Hoffmann 1992; Schierenbeck *et al.* 2014a; Schierenbeck *et al.* 2016) y/o la calidad del grano por los síntomas de “*red-smudge*” (color rojizo) sobre los granos (Fernández *et al.* 1994).

Los trabajos más detallados sobre cuantificación de pérdidas debidas a esta enfermedad, fueron realizados en Australia (Rees & Platz, 1983). Los autores reportaron pérdidas de 13 a 48 %, siendo éstas, función de la severidad (% de área foliar necrosada). Existen antecedentes que indican que *P. tritici-repentis* una vez introducido en una determinada área triguera, donde existen otros hongos causantes de manchas foliares tales como *Stagonospora nodorum* y *Zymoseptoria tritici*, se convierte en el patógeno dominante a lo largo de los años (Wright & Sutton, 1990).

En las últimas décadas, la presencia de esta enfermedad ha comenzado a observarse en varios países de Sudamérica como Argentina, Brasil, Paraguay, Chile y Uruguay. El nivel de pérdidas ocasionados por la mancha amarilla en lotes de producción, a principios de la década del 90, en Paraguay y Argentina habría fluctuado entre el 20 y el 70 % (Kohli *et al.*, 1992).

En nuestro país las primeras citas son de mediados de la década del 80 y corresponden al área centro-norte de la región triguera (Annone, 1985). Annone *et al.* (1994) observaron pérdidas del 20 %, en el norte de la Provincia de Buenos Aires, a través de la comparación entre tratamientos testigos severamente afectados (70 % de severidad) y tratamientos protegidos con un fungicida sistémico (20 % de severidad). Otros trabajos han registrado pérdidas del 6 al 13,5 % (Galich & Galich, 1994) y del 8 al 32 % (Annone *et al.*, 2001). En los últimos años la mancha amarilla ha ganado predominancia entre las enfermedades foliares del trigo en las áreas productoras de nuestro país (Carmona *et al.*, 1999; Moreno & Perelló, 2010).

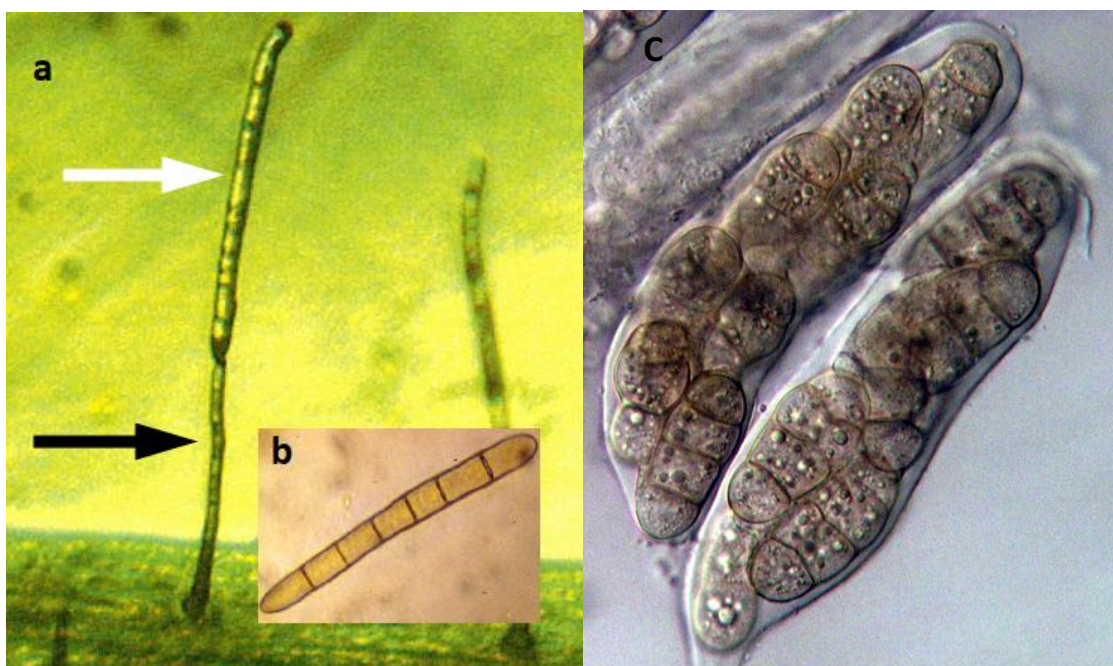
## **2.2. El agente causal**

*Pyrenophora tritici-repentis*, forma sexual del agente causal de la mancha amarilla de la hoja del trigo, es un hongo de hábito parásito facultativo de la División Ascomycota, Clase Loculoascomycetes, cuya forma asexual (anamorfo) se corresponde con *Drechslera tritici-repentis*, hongo imperfecto de la clase Hyphomycetes.

La forma asexual (*D. tritici-repentis*), imperfecta o anamorfo del parásito se desarrolla principalmente sobre las lesiones foliares originadas a partir de las infecciones primarias vía ascosporas y constituye el medio a través del cual la

enfermedad se dispersa a tejidos no afectados de la misma planta y de plantas vecinas. Las esporas asexuales o conidios son cilíndricos, multicelulares (7 a 10 células), alargados (70-200  $\mu\text{m}$  x 12-18  $\mu\text{m}$ ) de aspecto hialino bajo microscopio. Estas esporas tienen células basales con forma de “cabeza de serpiente” y pueden germinar a través de cualquiera de sus células (Annone *et al.*, 1994; Gilchrist *et al.*, 1984; Wiese, 1987; Zillinsky, 1984) (Figura 1.2.a.b).

La forma sexual o perfecta (*P. tritici-repentis*) constituye una de las más importantes formas de perpetuación del hongo de un año a otro y es el principal reservorio de inóculo para establecer las primeras infecciones en el campo. Puede observarse en residuos de trigo y corresponde a estructuras muy pequeñas (300 a 1200  $\mu\text{m}$ ), visibles a ojo desnudo, y denominadas pseudotecios (Figura 1.3). Estos cuerpos fructíferos presentes en la paja de trigo y dispuestos al azar son errumpentes (*i.e.* que emergen), de color castaño oscuro y tienen forma de volcán con abundantes setas en su parte apical donde se pueden incluso formar esporas de origen asexual (*i.e.* conidios) (Annone *et al.*, 1994; Gilchrist *et al.*, 1984; Wiese, 1987; Zillinsky, 1984). En su interior poseen abundantes ascos (bolsas microscópicas) de forma alargada dentro de las cuales se forman las ascosporas (esporas de origen sexual) que son la principal fuente de inóculo primario. Las ascosporas son ovales con 2-3 septos transversales, 1-2 longitudinales y dimensiones en el siguiente rango: 33-112  $\mu\text{m}$  x 15-44  $\mu\text{m}$  (Gilchrist *et al.*, 1984) (Figura 1.2.c).



**Figura 1.2.** a. Conidióforo (flecha negra) y conidio (flecha blanca) de *D. tritici-repentis*. b. Conidio de *D. tritici-repentis*. c. Ascosporas maduras de *P. tritici-repentis* con ascosporas (Adaptado de Wegulo, 2011).

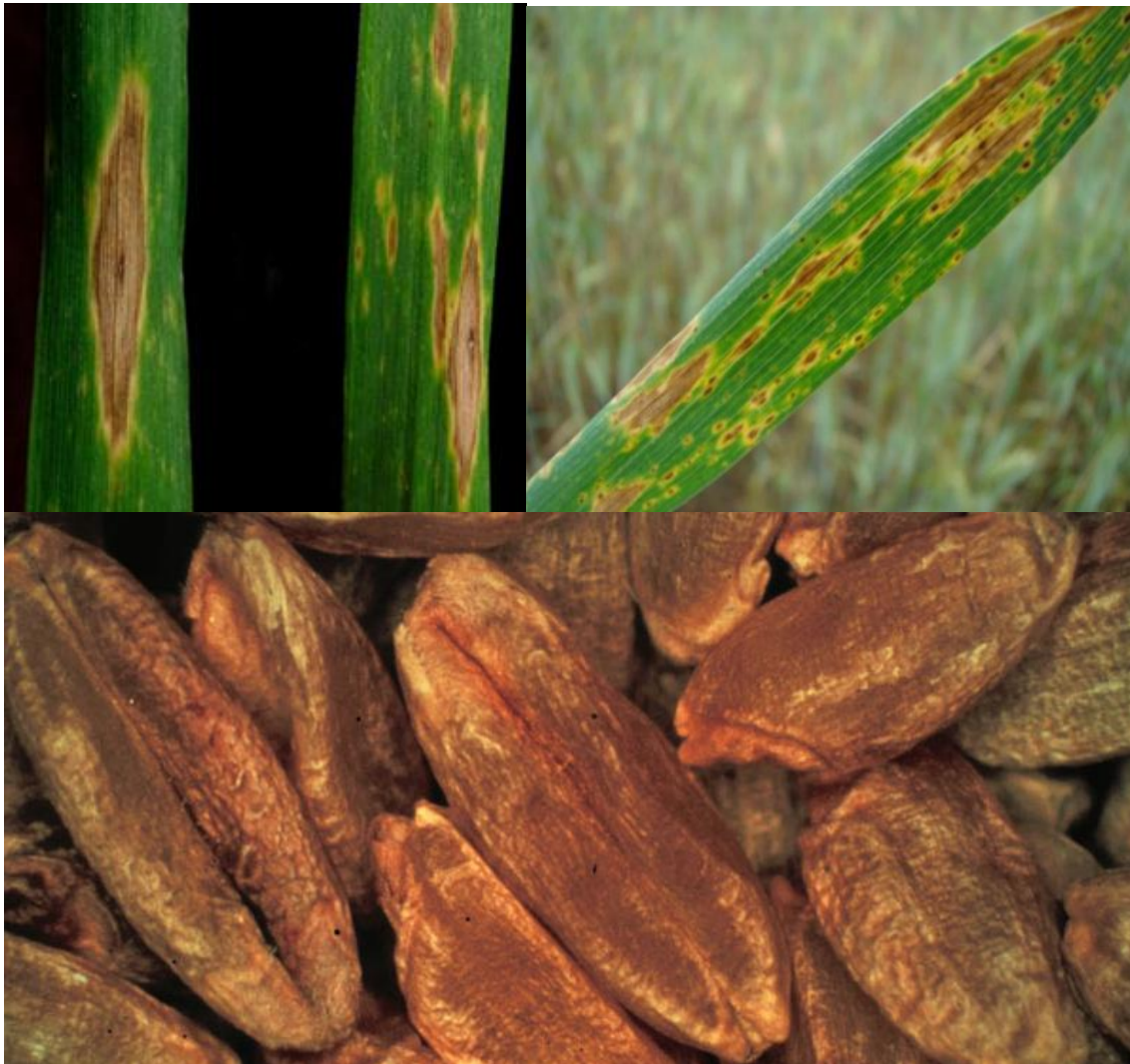


**Figura 1.3.** Pseudotecios de *P. tritici-repentis* en rastrojo de trigo (Adaptado de Wegulo, 2011).

### **2.3. Sintomatología**

Los síntomas más comunes de esta enfermedad se observan sobre hojas y vainas y aparecen después de la emergencia del trigo cuando se produce la expansión de la plúmula. Lamari & Bernier (1989a) identificaron dos tipos de síntomas producidos por el patógeno: manchas necróticas y clorosis. Sobre cultivares susceptibles se observan en las hojas características lesiones ovales en forma de ojo. Luego éstas se alargan y se rodean de un halo clorótico con una pequeña mancha marrón más oscura en el sitio de infección. Las áreas cloróticas tienden a elongarse y coalescer sobre hojas altamente infectadas (Figura 1.4). El desarrollo de los síntomas sigue un patrón vertical en sentido acrópeto (*i.e.* desde las hojas inferiores a las superiores). El borde o halo amarillento es atribuido a la producción de toxinas específicas del agente causal (Lamari & Bernier, 1989a). En cultivares parcialmente resistentes a la enfermedad, el tamaño de la lesión es menor y la clorosis y/o necrosis pueden estar ausentes (Lamari & Bernier, 1989a; 1989b). El área foliar enferma resta a la hoja capacidad fotosintética pudiéndose ver afectado de manera importante el rendimiento en grano cuando existe alta susceptibilidad del cultivar a la enfermedad. *P. tritici-repentis* puede también infectar a las semillas durante el periodo de llenado de granos (Schilder & Bergstrom, 1994). Este desorden provoca un oscurecimiento o manchado que se manifiesta con una coloración rosada violácea del grano, producto de las antocianinas (Rees & Platz, 1979) (Figura 1.4).





**Figura 1.4.** Arriba: síntomas típicos de mancha amarilla en las hojas. Abajo: manchado rosado de granos producido por la infección de *D. tritici-repentis*.

#### **2.4. Ciclo del agente causal de la mancha amarilla**

Las principales fuentes de inóculo son las semillas, los restos culturales (*i.e.* rastrojo) del trigo y otros hospedantes secundarios o alternativos. Es a través de la semilla que el patógeno es transportado a largas distancias e introducido en lugares donde la enfermedad no existía.

Estudios conducidos en los EE.UU. a principios de la década del 90 pusieron de manifiesto que en semillas severamente infectadas por *P. tritici-repentis* la transmisión del patógeno al futuro cultivo era considerable. Estos investigadores enfatizaron la importancia de la severidad de la enfermedad en hoja bandera sobre la infección de la semilla. En experiencias conducidas en Brasil y la Argentina se determinaron niveles importantes de transmisión de la infección desde la semilla al

coleoptilo (Annone *et al.*, 2004). El patógeno se aloja en el pericarpio como micelio y la transmisión a la plántula no es sistémica (Schilder & Bergstrom, 1994).

Muchos investigadores consideran a los restos culturales del trigo como la principal fuente de inóculo (Rees & Platz, 1980). El tipo de inóculo presente en los restos culturales es la forma perfecta (*i.e.* sexual) del hongo. Bajo condiciones de labranza conservacionista (rastreo en superficie) la aparición de esta enfermedad ocurre más tempranamente en el ciclo del cultivo y con mayores niveles de severidad en comparación con labranza convencional (Kohli *et al.*, 1992; Mehta & Gaudencio, 1991). En las secuencias trigo/soja como en el monocultivo de trigo los patógenos necrotróficos usualmente sobreviven hasta el cultivo siguiente y se requieren entre 18 a 32 meses en países templados para lograr la descomposición del residuo (Utermark, 1995, Cordo *et al.*, 2005). En particular, la enfermedad se incrementa en siembra directa de trigo en monocultivo (Krupinsky *et al.*, 2007; Simón *et al.*, 2011).

El agente causal de la mancha amarilla se propaga principalmente por medio de esporas (ascosporas y conidios) que se originan en lesiones de plantas de trigo establecidas naturalmente, y en lesiones de algunas malezas y pastos naturales que funcionan como hospedantes. Dentro del género *Pyrenophora*, *P. tritici-repentis* es la especie que posee el mayor rango de hospedantes. Ha sido reportado naturalmente en unas 25 especies, además del trigo. Estas sirven como hospedantes secundarios o alternativos y entre las mismas puede citarse a: *Agropyron* sp., *Alopecurus arundinaceus*, *Andropogon gerardi*, *Avena fatua*, *A. sativa*, *Bromus inermis*, *Dactylis glomerata*, *Echinochloa* sp., *Elymus innovatus*, *Lolium perenne*, *Phalaris arundinaceae*, *Poa* sp. y *Secale cereale* (Ali & Francl, 2002b; Hosford, 1971, Krupinsky, 1992). Los pseudotecios tienen un papel crítico en la epidemiología de la enfermedad ya que maduran en el rastreo de trigo durante el otoño e invierno y al comienzo de la primavera liberan las ascosporas, que son el inóculo primario de la enfermedad. Tanto las ascosporas como los conidios que se producen desde la primavera hasta avanzado el verano son dispersados por el viento (Wegulo, 2011) (Figura 1.5).

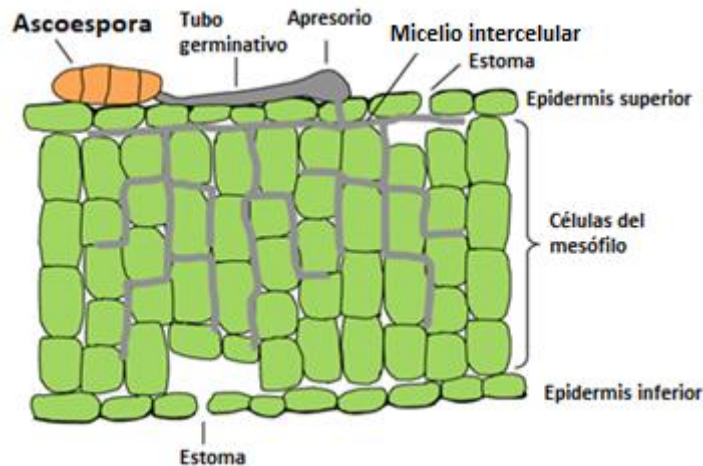
Una vez depositados en la superficie de los órganos verdes, necesitan de agua libre para iniciar el proceso de germinación (Mihtra, 1934). El proceso de infección se inicia con la germinación de la espora, seguido por el alargamiento del tubo germinativo y la formación del apresorio (Figura 1.6). Una vez producida la necrosis en las células de la parte central de la mancha, el patógeno empieza a esporular. En consecuencia, la cantidad de inóculo producida aumenta en función del incremento del área infectada (ciclos secundarios de la enfermedad). Este hongo puede crecer en un



rango considerablemente amplio de condiciones ambientales con temperaturas de 10 a 30 °C y periodos de 6 a 48 h de alta humedad relativa (Wiese, 1987). La mayoría de los cultivares de trigo son severamente afectados después de ser expuestos a alta humedad relativa por 48-54 h después de inoculados. El desarrollo intenso de lesiones severas de la enfermedad es más favorecido por períodos prolongados con formación de rocío sobre los tejidos foliares que por precipitaciones (Annone *et al.*, 2004).



**Figura 1.5.** Ciclo de la enfermedad mancha amarilla de trigo (Adaptado de Wegulo, 2011).



**Figura 1.6.** Diagrama esquemático de una sección transversal de una porción de una hoja de trigo que muestra la germinación de una ascospora (Adaptado de Wegulo, 2011).

## 2.5. Variación Patogénica

La capacidad de un patógeno para producir enfermedad puede ser evaluada como patogenicidad o virulencia. El primer término es un atributo general de la especie, mientras que virulencia es un atributo de un aislamiento particular de la especie en relación con un hospedante particular (Day, 1960). Según Vanderplank (1963; 1978) la presencia de interacciones significativas entre aislamientos y cultivares es indicativa de diferencias en la especificidad o virulencia de los aislamientos. La ausencia de dicha interacción indica que no hay especificidad.

Varios trabajos muestran diferencias de virulencia entre aislamientos de *P. tritici-repentis*. Hosford (1971) observó diferencias en los síntomas del hongo sobre cultivares de trigo, estos síntomas diferentes fueron producidos por distintos aislamientos del patógeno. Misra & Singh (1972) también reportaron diferencias en la virulencia de tres aislamientos del hongo frente a 50 cultivares de trigo. Similares resultados fueron encontrados por Gilchrist *et al.* (1984) cuando evaluaron diferentes aislamientos obtenidos de México. Luz & Hosford (1980) agruparon los aislamientos de *P. tritici-repentis*, obtenidos desde diferentes áreas de las grandes llanuras de América del Norte, en 12 razas de acuerdo a su comportamiento frente a seis cultivares de trigo. Hunger & Brown (1987) encontraron que nueve aislamientos provenientes de Oklahoma y Texas presentaban diferencias de virulencia. Krupinsky (1987) determinó diferencias en el tamaño de la lesión y el porcentaje de severidad entre aislamientos de este patógeno obtenidos de *Bromus inermis*.

Actualmente, se conocen en el mundo 8 razas de *P. tritici-repentis* determinadas sobre un set internacional de variedades de trigo (Ali & Francl, 2001a; 2001b; Lamari & Bernier, 1989a; 1989b; Lamari & Gilbert, 1998; Lamari *et al.*, 1995; 1998; 2003; 2005) (Tabla 1.1).

Inicialmente los aislamientos de este patógeno eran clasificados en 4 patotipos de acuerdo a su capacidad de producir necrosis o clorosis en los cultivares diferenciales Glenlea, Salomuni y 6B-365 (Lamari & Bernier, 1989b). El patotipo 1 causaba clorosis y necrosis, el 2 causaba solo necrosis, el 3 solo clorosis y el 4 era no-patogénico. Posteriormente se encontraron aislamientos del norte de África que causaban clorosis en el cultivar 6B-662 previamente considerado resistente a la clorosis. Por razones prácticas los patotipos del 1 al 4 fueron renombrados como raza 1 al 4 y fue introducida la raza 5 (Lamari *et al.*, 1995).

**Tabla 1.1.** Estructura de razas de *P. tritici-repentis* de acuerdo a Andrie *et al.* (2007) en un set de genotipos diferenciales.

Razas	Cultivares de trigo					
	Glenlea	Katepwa	6B662	6B365	Salamouni	M3
1	N (ToxA)	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	R	R
2	N (ToxA)	N (ToxA)	R	R	R	R
3	R	R	R	Cl (ToxC)	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	R	Cl (ToxB)	Cl (ToxB)	R	R	R
6	R	Cl (ToxB)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	R	R
7	N (ToxA)	N Cl (ToxA) (ToxB)	Cl (ToxB)	R	R	R
8	N (ToxA)	N Cl (ToxA) (ToxB)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	R	R

Referencias: N= Necrosis; Cl= Clorosis; R= Resistente. ToxA= Presencia de toxina A; ToxB= Presencia de toxina B; ToxC= Presencia de toxina C.

Luego Strelkov *et al.* (2002) encontraron aislamientos provenientes de Argelia que poseían los patrones de virulencia de la raza 3 y 5 conjuntamente y se designó a éstos como raza 6. Lamari *et al.* (2003) encontraron aislamientos con patrones de virulencia de la raza 2 y 5 combinados (designados como raza 7); y otros con patrones de virulencia de la raza 2, 3 y 5 (designados como raza 8). Recientemente se han identificado dos razas más (tentativamente llamadas razas 9 y 10) provenientes de América del Sur, con un patrón de virulencia distinto al de América del Norte, lo que indicaría que la población de este patógeno es diversa en esta región (Ali & Francl, 2002a; 2002b).

La determinación de razas basada solamente en la caracterización fenotípica puede conducir a algunos errores, ya que los síntomas pueden ser causados por otras toxinas tal como se describe en el siguiente párrafo. Por ello Andrie *et al.* (2007) propusieron minimizar estos posibles errores, añadiendo a la caracterización fenotípica, la confirmación molecular a través de la determinación de la ausencia o presencia de genes asociados a la presencia de síntomas de necrosis y clorosis.

El gen *Tox A* es responsable de la producción de la toxina ToxA y debería estar presente en las razas 1, 2, 7 y 8. Esta toxina es una proteína de bajo peso molecular y

es responsable de los típicos síntomas de necrosis en trigo (Ballance *et al.*, 1989; Ciuffetti *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). El gen *Tox B* es responsable de la producción de la toxina ToxB y debería estar presente en las razas 5, 6, 7 y 8. Esta toxina es una proteína de bajo peso molecular (Strelkov *et al.*, 1999) y es responsable de los síntomas de clorosis en líneas susceptibles (Ciuffetti *et al.*, 1998). La misma está codificada por múltiples copias del gen *Tox B* (Martínez *et al.*, 2001; 2004; Strelkov *et al.*, 2006) y debido a ello se han encontrado distintos genes homólogos *Tox B* en aislamientos de la raza 3 (Strelkov & Lamari, 2003; Strelkov *et al.*, 2006) y raza 4 (de Wolf *et al.*, 1998; Strelkov *et al.*, 2006) aunque éstos no producían la toxina ToxB (Ciuffetti *et al.*, 2003; Strelkov & Lamari, 2003) o eran patogénicos en las líneas de trigo susceptibles a esta toxina (Lamari & Bernier, 1989a). Se han hallado aislamientos de *P. tritici-repentis* que portan el gen *Tox B* pero sin la producción de ToxB (Andrie *et al.*, 2007; Lamari *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2004; Strelkov *et al.*, 2006). El gen responsable de la producción de la toxina ToxC aún no está caracterizado y debería estar presente en las razas 1, 3, 6 y 8. Esta toxina también produce clorosis pero en diferentes líneas que la ToxB. La misma aún no está bien caracterizada y estudios genéticos sugieren que juega un importante rol en los factores de patogenicidad de *P. tritici-repentis* (Gamba & Lamari, 1998; Gamba *et al.*, 1998; Lamari & Bernier, 1991).

Varios trabajos encuentran discrepancias entre la caracterización fenotípica y la genotípica. Andrie *et al.* (2007), Ali *et al.* (2010) y Lepoint *et al.* (2010) encontraron aislamientos donde los patrones fenotípicos no coinciden con los genéticos y proponen que estos aislamientos pueden estar produciendo toxinas nuevas. Varios autores han encontrado aislamientos que poseían el gen *Tox B* y sus homólogos aunque sin la producción de su toxina asociada, o aislamientos que causaban clorosis en líneas sensibles a ToxB y que no amplificaban para este gen. Strelkov *et al.* (2006) han encontrado aislamientos provenientes de Canadá que poseían genes homólogos *Tox B* con una producción reducida o nula de ToxB. Andrie *et al.* (2007) identificaron un aislamiento (PT82) que posee los patrones de virulencia de la raza 8 aunque no amplificaba para el gen *Tox B*. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores quienes sugieren la presencia de nuevas razas de *P. tritici-repentis* además de las ocho conocidas mundialmente (Ali & Francl, 2002a; 2002b; Ali *et al.*, 2002; Ciuffetti *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2002; Meinhardt *et al.*, 2003).

Diferentes trabajos han estudiado la variabilidad de este patógeno a nivel cultural, patogénico, bioquímico y molecular, utilizando diferentes técnicas, y han encontrado gran variabilidad entre los aislamientos del mismo a nivel genético y patogénico (Ali *et al.*, 2010; Andrie *et al.*, 2007; de Wolf *et al.*, 1998; Diaz de

Ackermann, 1987; Friesen *et al.*, 2005; Gilchrist *et al.*, 1984; Hosford, 1971; Hunger & Brown, 1987; Leisová *et al.*, 2008; Lepoint *et al.*, 2010; Mehta *et al.*, 2004; Moreno, 2007; Moreno *et al.*, 2008; Pujol Vieira dos Santos *et al.*, 2002). Varios métodos moleculares se han usado para analizar la diversidad de este patógeno a nivel genético como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*), ERIC (*Enterobacterial Intergenic Consensus*), REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Mehta *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2008; 2012; Pujol Vieira dos Santos *et al.*, 2002). Estos trabajos muestran que existe una alta variabilidad intraespecífica entre aislamientos de *P. tritici-repentis* y que no es posible establecer un agrupamiento genético por patotipos o por región geográfica (Friesen *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008; Pujol Vieira dos Santos *et al.*, 2002). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la población de este patógeno es compleja en sus características.

En nuestro país la situación es similar y se ha encontrado gran variabilidad entre diferentes aislamientos de *P. tritici-repentis* a nivel cultural, patogénico, enzimático y molecular (Moreno, 2007; Moreno *et al.*, 2008; 2011; Perelló *et al.*, 2012). Moreno *et al.* (2014) también han encontrado discrepancias entre la caracterización fenotípica y genotípica de diferentes aislamientos tomados de diversos puntos del país y falta de correspondencia con las razas conocidas. Estos resultados nuevamente sugieren que la estructura del patógeno no está bien determinada tampoco en Argentina.

Algunas investigaciones de la estructura de poblaciones de *P. tritici-repentis* realizadas en varias zonas de Argentina, han observado otro hongo similar no previamente hallado en trigo (Perelló, A. comunicación personal 2016). Dicho hongo, difiere en la morfología conidial y fue designado inicialmente como *Pyrenophora* sp., siendo necesaria la identificación de especies de esos nuevos aislamientos, y una investigación comparativa de los dos hongos similares, incluyendo la morfología de esporas, patogenicidad sobre trigo y marcadores moleculares.

### **3. Manejo integrado de la enfermedad**

El manejo de una enfermedad consiste en limitar su desarrollo epidémico a niveles compatibles con la rentabilidad del cultivo y la seguridad ambiental. De tal modo, al integrar acciones o estrategias de protección del cultivo se intenta complementar su efecto “supresivo” con el fin de lograr una mayor reducción en la

intensidad de síntomas, con la menor inversión y efectos colaterales indeseables posibles. Ninguna de las estrategias disponibles provee una protección total, por lo que su integración es crucial para reducir los efectos de estas enfermedades sobre la producción (Annone *et al.*, 2004). Por lo tanto, el control de esta enfermedad en el contexto del manejo integrado implica la combinación de resistencia genética, prácticas culturales (rotaciones, densidad, fecha de siembra, fertilización) control biológico y químico (Bockus *et al.*, 1992; Carmona, 2003; Perelló *et al.*, 2003; Annone, 2006; Simón *et al.*, 2011). En este contexto y tal como se describirá en la sección siguiente, el estudio de la resistencia genética de los cultivares juega un rol importante para el manejo integrado de la enfermedad.

### **3.1. Resistencia genética**

La resistencia genética es la base del manejo integrado, ya que tiene una baja relación costo/beneficio a nivel producción y preserva el medio ambiente. 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 (Carmona, 2008). El sistema genético de la planta actúa a través de mecanismos morfológicos y fisiológicos contra las razas fisiológicas de los patógenos. Así, los vegetales tienen la capacidad para inhibir o limitar el establecimiento de una relación de parasitismo, variando desde la inmunidad o resistencia completa (ausencia total o muy limitada infección) hasta la resistencia parcial o incompleta (limitado y/o lento desarrollo de síntomas) (Annone, 2003). En algunos casos, la resistencia es controlada por uno o pocos genes (genes “mayores”), denominándose cualitativa, completa, específica, monogénica u oligogénica (Van Ginkel & Rajaram 1993; Singh & Rajaram 1995), o como en muchos casos, por múltiples genes (Bai & Shaner 1994) denominándose cuantitativa, parcial o no específica o poligénica.

La pérdida de resistencia genética en variedades comerciales de trigo debido a la aparición de nuevos patotipos del hongo ha sido bien documentada (Araya & Cárdenas, 1999; Young & Kelly, 1997). Es importante conocer la existencia de las diferentes razas del patógeno y la relación de éstas con su hospedante para poder detectar genes de resistencia, que se puedan apilar (piramidizarlos) y así obtener cultivares con resistencia durable (Ali & Francl, 2002b) o incorporar resistencia parcial. *P. tritici-repentis* produce la fase sexual de su ciclo en rastrojos de trigo, lo que aumenta las posibilidades de recombinación sexual y ello podría explicar el gran nivel de variabilidad patogénica del hongo. Esto ayudaría a que ciertos patotipos que están

en baja frecuencia rápidamente puedan convertirse en predominantes si los cultivares susceptibles se utilizan cada vez más.

El hecho de que hayan ocurrido epifitias de mancha amarilla en las grandes zonas productoras de trigo a nivel mundial y la alta variabilidad de la población de este patógeno hacen necesario incorporar y ampliar la base de la resistencia genética actual en los cultivares de alto rendimiento. El mejoramiento para la resistencia a *P. tritici-repentis* es más eficaz a través de la identificación, caracterización e incorporación de nuevas fuentes de resistencia, eficaces frente a varias razas del patógeno, en cultivares de alto potencial. El uso de materiales (*i.e.* germoplasma) con buen comportamiento frente a la enfermedad, en combinación con la rotación de cultivos, es la forma más económica y amigable con el medio ambiente para controlar las pérdidas causadas por ésta (Singh *et al.*, 2010; Strelkov & Lamari, 2003).

La escasa disponibilidad de resistencia a la mancha amarilla fue puntualizada por Rees & Platz. (1992) quienes reportaron que sólo unos pocos materiales, entre más de 60 evaluados, demostraron poseer resistencia detectable frente a esta enfermedad. Los mismos autores no han encontrado reacción de inmunidad en 1.400 materiales de trigo evaluados; aunque se han hallado varios niveles de resistencia en variedades de hábito primaveral o invernal y sobre todo en aquellas de origen brasilero (Rees & Platz, 1990). Kohli *et al.* (1992) también informaron la escasez de altos niveles de resistencia en cultivares y líneas avanzadas de trigo en el Cono Sur. Gilchrist (1992) ha encontrado materiales con buen nivel de resistencia en líneas de trigo chinas, mexicanas y brasileras y en la progenie de un cruzamiento interespecífico con *Agropyrum curvifolium*. Altos niveles de resistencia han sido encontrados en trigo pan y trigo sintético hexaploide (*i.e.*, cruzamientos entre trigo tetraploide y especies silvestres) por otros investigadores (Tadesse *et al.*, 2006a; 2006b; Riede *et al.*, 1996) y también en trigos de distinto nivel de ploidia, aunque ningún genotipo fue hallado inmune (Lamari & Bernier, 1989a; Singh *et al.*, 2006). Se han detectado buenos niveles de resistencia en especies silvestres relacionadas con el trigo especialmente en *T. monococum* (AA), *Aegilops tauschii* (DD), *T. dicoccoides* (AABB), *T. dicoccum* (AABB), *T. turgidum* (AABB), *T. persicum* (CCUU), *T. timopheevii* (AAGG), *T. spelta* (AABBDD), *T. zukhovskii* (AAAAGG) (Lamari & Bernier, 1989a; Singh *et al.*, 2006; Zhang & Jin, 1998). Similares observaciones fueron halladas por Alam & Gustafson (1988) en *Ae. speltoides* (SS), *Ae. triaristata* (UUMM), *Ae. cylindrica* (CCDD), y *Ae. ovata* (UUMM). Materiales con resistencia también han sido identificados en especies relacionadas genéticamente con el trigo como *Ae. tauschii* (DD), *Leymus racemosus* (NsNsXmXm), *Elymus rectisetus* (StStYYWW), *Thinopyrum elongatum* (EE), *Th. junceum* (EEEEEE), *Th. Ponticum* (EEEEEEEEEE), *Th. Intermedium* (EEEEStSt o

JJEESTSt), *Dasypyrum villosa* (VV), *Avena sativa* (AACCCDD), y *Secale cereal* (RR) (Oliver *et al.*, 2008). Otra evaluación de 126 materiales de Norte América ha encontrado altos niveles de resistencia frente a varias razas de *P. tritici-repentis* y sus toxinas en 10 de estos cultivares (Singh *et al.*, 2006).

Estudios más recientes han reportado resistencia cuantitativa a *P. tritici-repentis*, que es eficaz contra múltiples razas del patógeno, por lo tanto considerada forma de resistencia no específicas de la raza (Singh *et al.*, 2010; Faris *et al.*, 2013; Kariyawasam *et al.*, 2016). Así, una parte importante de la resistencia disponible frente a *P. tritici-repentis* es de tipo parcial o incompleta (Rees & Platz, 1992) caracterizada por la ausencia de inmunidad frente a la enfermedad. Esto quiere decir que aquéllos materiales de buen comportamiento tendrán una menor intensidad de lesiones que aquéllos que son altamente susceptibles. Estos estudios resaltan la complejidad de la resistencia del huésped a *P. tritici-repentis*. Los sistemas de labranza, el monocultivo y la pérdida de diversidad genética en los programas de mejoramiento probablemente han contribuido a la evolución de la mancha amarilla y a la mayor susceptibilidad en cultivares modernos (Lamari *et al.*, 2005). Esto resalta la importancia de ampliar la diversidad de los factores de resistencia en las poblaciones de mejoramiento. Las colecciones históricas de germoplasma presentan fuentes útiles de diversidad genética para los fitomejoradores.

La resistencia genética a mancha amarilla puede estar influenciada por la altura de la planta y por el ciclo a espigazón de cada genotipo. Kollers *et al.* (2014) encontraron que las plantas con menor altura poseen una tendencia a ser más susceptibles. Otros autores encontraron una tendencia similar frente a fusariosis de la espiga (Kollers *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2010) y mancha de la hoja (Simón *et al.*, 2004). Con respecto a la influencia del ciclo a espigazón en la resistencia a mancha amarilla los autores no encontraron correlaciones significativas (Kollers *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011) mientras que frente a mancha de la hoja han encontrado que los genotipos con más días a espigazón presentan mayores niveles de severidad (Simón *et al.*, 2004), lo cual fue atribuido a factores ambientales que predispusieron el desarrollo de la enfermedad en genotipos tardíos, como así también la presencia de más inóculo. Sin embargo Gerard *et al.*, 2017 encontraron una relación negativa entre la severidad y el ciclo a espigazón, que fue atribuido a asociaciones genéticas, detectada por la localización próxima de diversos marcadores para ambos caracteres. Profundizar el conocimiento de la influencia de estas variables sobre la resistencia es de fundamental importancia en el proceso de mejora genética para este patógeno, para conocer si es



posible seleccionar cultivares con altura reducida y un determinado ciclo a espigazón sin afectar la resistencia.

#### **4. Objetivos e hipótesis de la tesis**

##### **4.1. Objetivo general**

A partir de todo lo expuesto, el objetivo general de esta tesis es contribuir al mejoramiento de la resistencia a la mancha amarilla del trigo a través de la investigación de la estructura de especies del género *Pyrenophora* y la localización molecular de la resistencia en una población de genotipos de trigo previamente seleccionados.

##### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar si existe otra especie del género *Pyrenophora* diferente a *P. tritici-repentis* que causa síntomas similares a mancha amarilla en trigo.
- Esclarecer la identidad de la nueva especie del género *Pyrenophora* asociada a los síntomas de la mancha amarilla, identificándola morfológica y molecularmente.
- Caracterizar la resistencia a dos aislamientos de *P. teres* y uno de *P. tritici-repentis* en un set de cultivares argentinos de trigo utilizados comercialmente.
- Evaluar la severidad de la enfermedad en estado de plántula y estado adulto.
- Caracterizar la resistencia a dos aislamientos de *P. teres* y dos de *P. tritici-repentis* en una población internacional de 110 genotipos de trigo y localizar QTL que otorguen resistencia a dichos aislamientos.
- Detectar genotipos de trigo que posean QTL con efecto aditivo que otorguen resistencia a los patógenos investigados, para luego ser utilizados en futuros planes de mejoramiento.

##### **4.3. Hipótesis**

- Además de *P. tritici-repentis* existen otras especies del género *Pyrenophora* que pueden infectar al trigo causando síntomas similares a la mancha amarilla.
- Es posible realizar una identificación morfológica y molecular del patógeno en cuestión

- Los cultivares argentinos de trigo actualmente sembrados poseen una alta variabilidad en la resistencia a los patógenos *P. teres* y *P. tritici-repentis*, existiendo algunos cultivares resistentes.
- El nivel de resistencia de los cultivares de trigo a estos patógenos se mantiene durante todo el ciclo de cultivo.
- La existencia de variabilidad fenotípica en la resistencia a los patógenos *P. tritici-repentis* y *P. teres*, en una población internacional de 110 genotipos de trigo, presenta un componente genético, por lo que es posible localizar QTL que los determinan a través de mapeo por asociación.
- La acumulación de dos a más alelos significativamente asociados con la resistencia a enfermedades fúngicas en un mismo genotipo, presenta efectos aditivos y significativos sobre la misma.

## 5. Diagrama de la tesis

En el capítulo 2 se presenta la identificación y caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Pyrenophora spp.* recolectados de cultivos de trigo en distintas regiones de Argentina.

En el Capítulo 3, se presenta la caracterización fenotípica de la resistencia, en plántula y estado adulto, de un panel compuesto por 30 cultivares de trigo argentinos utilizados comercialmente, frente a tres aislamientos monospóricos de los patógenos caracterizados, dos de *P. teres* y uno de *P. tritici-repentis*.

En el Capítulo 4, se exponen los resultados del estudio de mapeo asociativo de todo el genoma en una colección de 110 genotipos de trigo de diverso origen. En esta población de mapeo se evaluó la resistencia a dos aislamientos de *P. tritici-repentis* y dos de *P. teres*, lográndose identificar numerosos marcadores y QTL asociados a cada uno de ellos. A su vez se evaluaron otros caracteres como días desde emergencia a espigazón y altura de planta, para determinar su relación con la resistencia.

Por último, en el Capítulo 5, se presenta la discusión general de los principales resultados obtenidos en cada una de las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis. Adicionalmente, se analiza la importancia de los nuevos conocimientos generados, así como también la posibilidad de su utilización y los trabajos adicionales requeridos a fin de aplicarlos en programas de mejora del cultivo de trigo.

## CAPÍTULO 2

### Identificación y patogenicidad de una nueva especie de *Pyrenophora* integrante del complejo de manchas foliares del trigo.

#### 1. Introducción

*Pyrenophora* (anamorfo = *Drechslera*) es un género monofilético ubicado dentro de la familia Pleosporaceae, que involucra hongos saprófitos y patógenos de distribución mundial, comúnmente asociados a hojas de cereales y pastos (Zhang y Berbee, 2001). Actualmente se sinonimiza *Drechslera* bajo *Pyrenophora*, su nomenclatura más recomendada, en virtud del uso de un solo nombre para cada hongo, si bien se observa comúnmente el estado asexual (Ariyawansa *et al.*, 2014).

Algunas especies de *Pyrenophora* son patógenos de reconocida importancia. Por ejemplo *P. teres* (= *D. teres*) es un patógeno necrótrofo de cultivos de importancia agronómica tales como la cebada (Grupta y Loughman, 2001). *P. graminea* (= *D. graminea*) causa el estriado de la cebada que resulta en significativas pérdidas económicas (Tekauz, 1983). *P. graminea* vive dentro de los granos como micelio y cuando los granos germinan, las hifas penetran las plántulas a través de la coleorriza causando una infección sistémica (Pecchia *et al.*, 1998). *P. avenae* causa tizón de las plántulas de avena en diferentes zonas climáticas (Motovilín 2000). Tal como fue descrito en la introducción general, *P. tritici-repentis* causa la mancha amarilla del trigo (Lamari y Benier, 1989a; Ballance *et al.*, 1996), enfermedad de ocurrencia en todas las áreas trigueras de importancia global cuya prevalencia se ha incrementado recientemente y que produce pérdidas de rendimiento del 3-50% (Lamari y Benier 1989a).

Referencias bibliográficas indican que otros miembros taxonómicos pertenecientes al género *Pyrenophora* pero no compatibles con la especie *tritici-repentis* son aislados desde plantas de trigo infectadas con síntomas de manchado foliar (Sheridan, 1977; Toth *et al.*, 2008; Tonin *et al.*, 2015). De acuerdo a las referencias citadas, *D. teres*, *D. graminea* y *D. siccans* son especies que se reportan asociadas a trigo en otros países (Tóth *et al.* 2008; Mikhailova *et al.* 2010).

El hongo *P. teres* es un patógeno común de la cebada causando la mancha en red y encontrado prácticamente en todas las regiones donde este cereal es cultivado. Las lesiones que produce son manchas pequeñas, pardas, casi cuadradas y en forma de red cerca de la punta de las hojas de la plántula. Dichas manchas se extienden conforme se desarrolla la hoja y avanzan sobre toda la lámina de esta última y en caso de que se extienda aún más, la hoja adquiere un aspecto reticulado (Agrios, 2005). Este patógeno posee dos formas genéticamente diferentes, *P. teres* f. *teres* y *P. teres* f. *maculata*, las cuales producen pérdidas de rendimiento del 10 al 40% y hasta el 44%, respectivamente (Akhavan *et al.*, 2015). Es una enfermedad endémica en Argentina, la de mayor prevalencia (76,0% sobre 117 campos examinados en 1990/93) e incidencia (100 % en 12 campos sobre 25 examinados en 1991) presentándose desde el estado de plántula a cosecha (Carmona *et al.*, 1992; Carmona, 1994; Barreto & Carmona, 1993, 1994, 1996). En la Argentina la mancha en red es la enfermedad más importante del cultivo de cebada, con un promedio de pérdidas del 20%, afectando el peso y número de granos y la calidad de malta para la elaboración de cerveza (Moya, 2017).

Durante muestreos de rutina llevados a cabo desde cultivos de trigo en diferentes áreas agroecológicas de Argentina, las muestras de hojas enfermas recolectadas en las últimas campañas de diferentes cultivares analizados, exhibieron lesiones necróticas de color marrón oscuro con o sin márgenes cloróticos típicas de mancha amarilla ocasionada por *P. tritici-repensis*. Sin embargo, los conidios individuales del patógeno aislado desde el tejido foliar necrótico y observados bajo un microscopio, resultaron mucho más cortos que los descriptos para dicha especie. Por lo tanto se requieren estudios para dilucidar la identidad taxonómica de esta especie y su posible relación con la aparición de mancha amarilla en trigo.

## 2. Hipótesis

En base a los antecedentes mencionados, se plantearon las siguientes hipótesis:

- Además de *P. tritici-repensis* existen otras especies del género *Pyrenophora* que pueden infectar al trigo causando síntomas similares a la mancha amarilla.
- Es posible realizar una identificación morfológica y molecular del patógeno en cuestión.

### 3. Objetivos

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar si existe otra especie del género *Pyrenophora* diferente a *P. tritici-repentis* que causa síntomas similares a mancha amarilla en trigo.
- Esclarecer la identidad de la nueva especie del género *Pyrenophora* asociada a los síntomas de la mancha amarilla, identificándola morfológica y molecularmente.

### 4. Materiales y métodos

La procedencia de las muestras de plantas de trigo fue de la Estación Experimental Julio Hirshchorn, en la localidad de Los Hornos, partido de La Plata y de ensayos a campo de las localidades de Pergamino (Pcia. de Buenos Aires) y Paraná (Pcia. de Entre Ríos). En cada localidad se procedió a la recolección de 10 a 15 hojas de trigo con síntomas típicos de mancha amarilla. De las mismas se cortaron de 5 a 7 trozos de 6-7 cm por tratamiento y repetición. Las mismas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1,5 % del producto comercial y alcohol al 70%. Para ésto se colocaron las porciones de hojas durante un minuto y medio primero en la dilución de hipoclorito, luego por 30 segundos en alcohol y finalmente en agua estéril dos veces durante dos minutos cada vez. Se trabajó en cámara de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia. Luego, se dispusieron de 5 a 7 trozos de cada hoja enferma sobre una malla dentro de una caja de Petri (10 cajas por cada localidad) con agua destilada, manteniendo el recipiente cerrado a temperatura ambiente, hasta visualizarse el signo del hongo. Las mismas se mantuvieron con 10 h de luz y 14 h de oscuridad para favorecer la esporulación. Mediante esta técnica se buscó inducir la aparición de las estructuras somáticas y reproductivas de los hongos fitopatógenos para su posterior identificación a través de la observación de las mencionadas estructuras en microscopio. En las cajas donde se visualizó el signo de la enfermedad se procedió a la observación de esporas, colocando una cinta adhesiva transparente sobre cada trozo de hoja que se montó en un portaobjeto con lactofenol azul. Luego se procedió a la observación en microscopio para determinar el tipo de esporas. A continuación se efectuaron de cinco a siete aislamientos por cada localidad (cada uno proveniente de una hoja diferente) desde trozos de tejido enfermo que presentaban esporas pertenecientes al género *Pyrenophora* pero no compatibles con *P. tritici-repentis*, que se incubaron y multiplicaron para luego determinar su identidad

observando las características morfo-culturales de las colonias y conidios desarrollados.

Por último se procedió a someter al hongo a pruebas de patogenicidad bajo invernáculo en diferentes genotipos de trigo. Con el fin de corroborar que estos aislamientos del género *Pyrenophora* efectivamente tienen la capacidad de infectar al cultivo de trigo se procedió a realizar un ensayo en macetas en donde se inocularon tres cultivares de trigo argentinos, Floripan 200, Klein Gladiador y LE2330. Estos cultivares fueron elegidos teniendo en cuenta la susceptibilidad que presentaron frente al patógeno en estado de plántula (en maceta) en otro ensayo realizado en este estudio (ver capítulo 3). El medio de cultivo utilizado para la multiplicación del inóculo fue caldo V8, que se vertió en placas de Petri en cámara de flujo laminar. Los cultivos se incubaron durante 15-21 días a 23 ° C +/- 2 ° C en alternancia de luz y oscuridad para favorecer la esporulación del hongo siguiendo el protocolo sugerido por Raymond y Bockus (1982). El inóculo se preparó raspando asépticamente las colonias de esporulación con un bisturí y suspendiendo los conidios en agua desionizada. La suspensión conidial se ajustó a  $3 \times 10^3$  esporas / ml usando una cámara de recuento Newbauer. Como surfactante se añadió Tween 20 (polisorbato 20) a 0,5 ml / l. El material usado como maceta fueron vasos descartables de 400 ml, en los cuales se sembraron cinco semillas de cada cultivar de trigo con dos repeticiones. Se inoculó con los dos aislamientos que presentaron mejor crecimiento en la etapa anterior, uno fue denominado Dt1 (proveniente de Los Hornos) y el otro Dt2 (proveniente de Paraná), mientras que los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de Pergamino no se utilizaron debido a que se contaminaron. La inoculación se realizó en la etapa de 2 hojas totalmente desplegadas (GS 12) (Zadoks *et al.*, 1974) con pulverizador manual marca Giber de 1,5 litros hasta mojado total de las plántulas. Después de la inoculación cada grupo de macetas inoculadas con el mismo aislamiento se cubrieron con una bolsa plástica y se pulverizó con agua varias veces al día durante 3 días, de manera de alcanzar la humedad necesaria para el desarrollo del proceso de infección. A los 10 a 15 días (cuando se empezaron a visualizar los primeros síntomas de la enfermedad) se procedió a la extracción de hojas con dichos síntomas y se realizó el mismo proceso de desinfección y cámara húmeda descrito anteriormente para visualizar las esporas en microscopio. Luego se repicaron en medio de cultivo APG para observar las características de la colonia y se procedió a la caracterización morfológica de las colonias y de las estructuras reproductivas.

Además de la identificación morfológica se procedió a realizar una caracterización molecular a partir de los aislamientos Dt1 y Dt2, con el fin de determinar a qué especie de *Pyrenophora* pertenecen. Este estudio fue realizado por

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC) de Mar del Plata. A partir de micelio, se realizó la extracción del ADN genómico por el método convencional de extracción con el *buffer* CTAB. La identificación molecular de los dos aislamientos se verificó por duplicado mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) siguiendo el protocolo propuesto por Akhavan *et al.* (2015). Primero, la amplificación y secuenciación de la región ITS (*internal transcribed spacer*) (White *et al.*, 1990) con los primers ITS4 e ITS5 y luego una PCR específica utilizando los cebadores PTM-F (5'-TGCTGAAGCGTAAGTTTC-3') y PTM-R (5'-ATGATGGAAAAGTAATTTGTG-3') para diferenciar la forma especial dentro de la especie (Williams *et al.*, 2001). Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5%.

## 5. Resultados

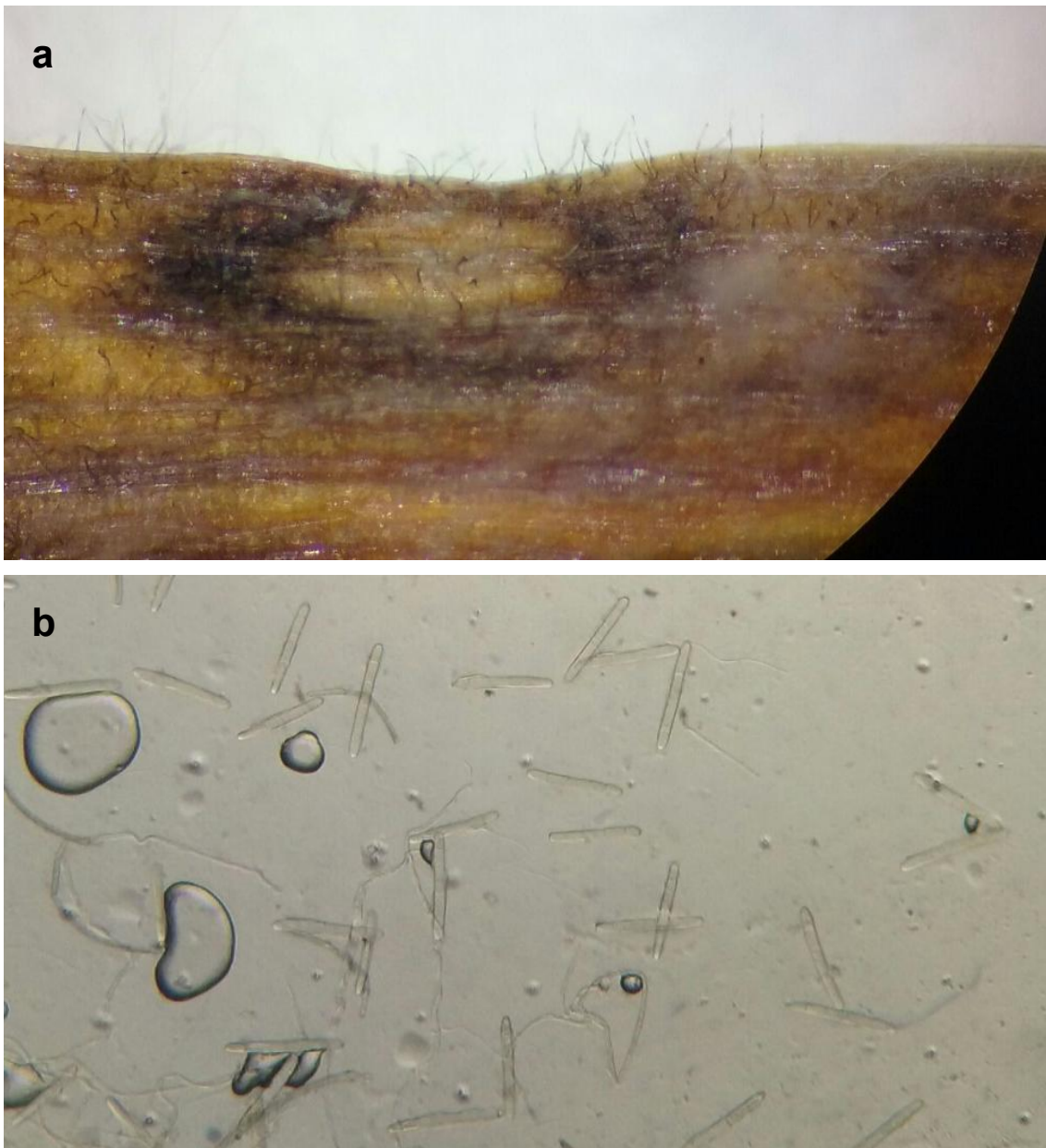
En las muestras recolectadas de las tres localidades, las hojas de trigo con síntomas de mancha amarilla sometidas a cámara húmeda se pudo observar el signo de la enfermedad (Figura 2.1.a). En la observación a microscopio, aproximadamente la mitad de las cajas de Petri de cada localidad, en las que se habían hecho aislamientos de distintas hojas, presentaban esporas pertenecientes al género *Pyrenophora* pero no compatibles con *P. tritici-repentis*. La forma de los conidios era cilíndrica ligeramente contraídos en los septos, con bordes rectos y redondeados en los extremos y con una célula basal inflada (Shoemaker, 1962; Talbot, 1973). Los conidios eran subhialinos, color café amarillento, midiendo 80-95 x 19-21  $\mu\text{m}$  y con 4-6 septos (Shoemaker, 1962) (Figura 2.1.b).

Luego de la replicación de estos aislamientos, las colonias en el medio V8, cubrieron la superficie de las placas de Petri a los 7 días de incubación. Las características culturales más relevantes que se observaron fueron un micelio gris oscuro "Mouse Grey" y gris claro "Pale Mouse Grey" desarrollado cerca del borde formaciones blancas similares a penachos (*tufts*), en concordancia con descripciones previas (Shoemaker, 1962; Chidambaram *et al.*, 1973). En algunos casos se observaron sectores de pigmentación de color rojizo-anaranjado desde el centro hacia la periferia característicos del género *Pyrenophora* (Figura 2.2).

Como se observa en la figura 2.3, las plántulas de trigo inoculadas con los aislamientos Dt1 y Dt2 presentaron síntomas similares a los descritos para mancha amarilla.

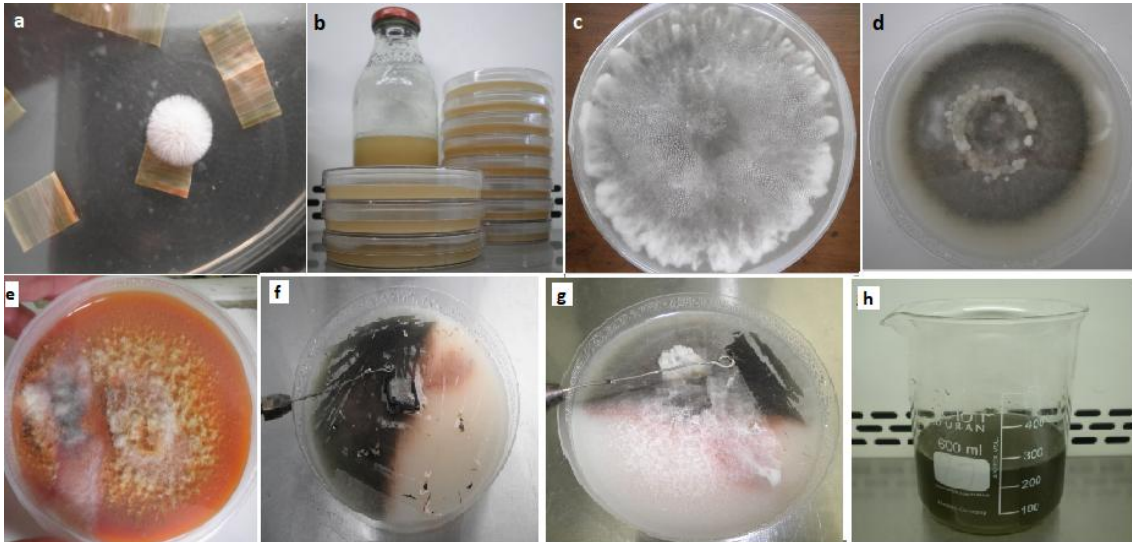
El análisis molécular arrojó como resultados que después de la electroforesis de los productos de la PCR, se observó que ambos aislamientos designados como Dt1

y Dt2 generaron un fragmento de 410 pb con los cebadores específicos PTM-F y PTM-R (Fig. 2.4.a). Además, se amplificaron 600 pb de la región ITS de los aislamientos utilizando los cebadores ITS5 e ITS4 (Fig. 2.4.b). Las secuencias de ITS se asignaron con el número de acceso MK300049 para el aislamiento Dt1 y MK332520 para el aislamiento Dt2. De esta manera, basándose en las características culturales morfológicas y corroboradas por la identificación molecular, los dos aislamientos correspondieron al hongo *P. teres f maculata*, con un porcentaje de identidad de 99,9%. Estos aislamientos luego fueron incluidos en una colección mayor y se renombraron como PT2407 (Dt1) y PT2050 (Dt2) (Perelló *et al.*, 2019).

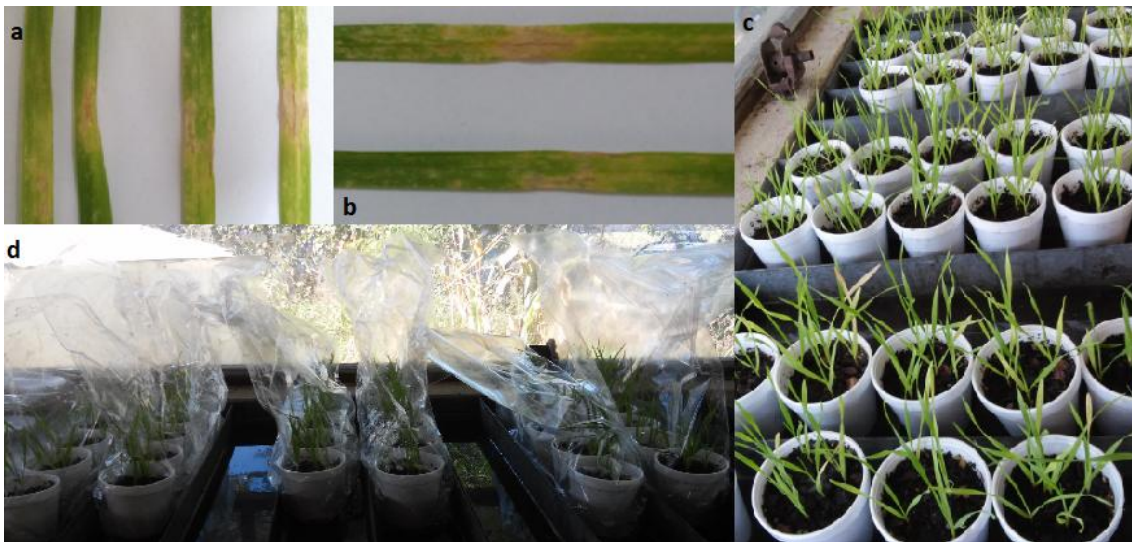


**Figura 2.1.** Arriba: Signo de la enfermedad en hojas de trigo colectadas a campo, luego de la incubación en cámara húmeda. Abajo: Conidios de *Pyrenophora* sp. observados al microscopio. Aumento 10x.

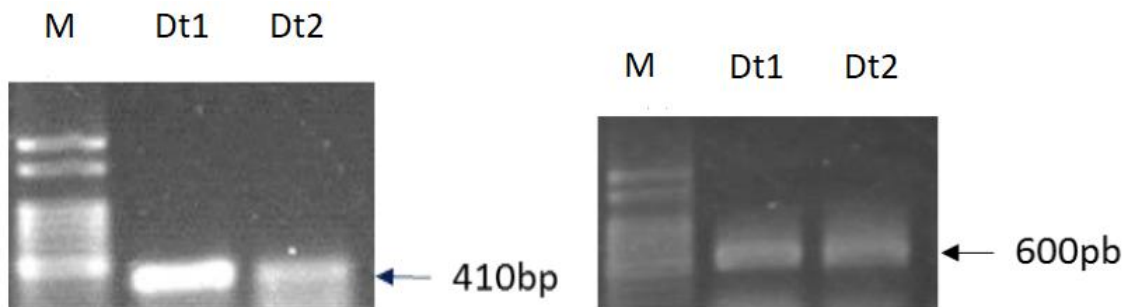




**Figura 2.2.** Crecimiento en cámara húmeda del hongo (a). Medio de cultivo V8 (b). Características de las colonias, observándose micelio gris claro y "tufts" (c), micelio gris oscuro (d) y pigmentación rojizo-anaranjada (e). Raspado de micelio para preparación del inóculo (f y g). Inóculo concentrado (h).



**Figura 2.3.** Síntomas sobre hojas de trigo inoculadas con los aislamientos de *Pyrenophora* sp. (a y b). Vista parcial del ensayo (c). Colocación de bolsas plásticas para conservar humedad (d).



**Figura 2.4.** Gel de agarosa al 1,5% mostrando amplificación de la PCR de los aislamientos Dt1 y Dt2 identificados como *P. teres f maculata*. a. Cebadores específicos PTM-F y PTM-R. b. Cebadores ITS5 e ITS4. M. = 1-kb ADN ladder.

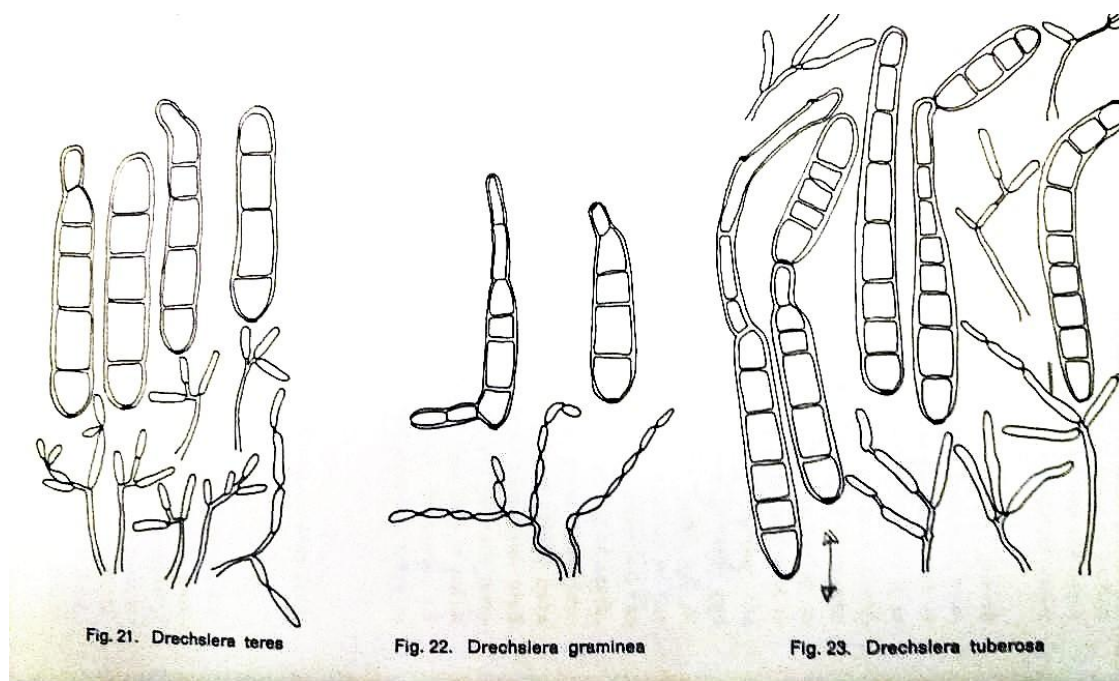
## 6. Discusión

En los últimos años, algunas investigaciones indican que otros miembros taxonómicos pertenecientes al género *Pyrenophora* pero no compatibles con la especie *tritici-repetis* son aislados desde plantas de trigo infectadas con síntomas de manchado foliar, muy similares a los de la mancha amarilla. Mikhailova *et al.* (2010) encontraron aislamientos de *P. teres* en cultivos de trigo en el noroeste de Rusia, mientras que Toth *et al.* (2008) reportaron por primera vez en Hungría la presencia de *P. teres* en trigo. A su vez Tonin, *et al.* (2015) identificaron una nueva especie del género, *P. siccans* asociada a los síntomas de la mancha amarilla; y recientemente Perelló *et al.* (2019) reportaron por primera vez en Argentina a *P. teres f. maculata* infectando cultivos de trigo. Por lo tanto este estudio sería confirmatorio de que existe otra especie del género *Pyrenophora* además de *P. tritici-repetis* que puede infectar al cultivo del trigo en Argentina.

En Argentina, en los últimos años durante muestreos de rutina llevados a cabo desde cultivos de trigo en diferentes áreas, muestras de hojas enfermas recolectadas en las últimas campañas de diferentes cultivares analizados, exhibieron lesiones necróticas de color marrón oscuro con y sin márgenes cloróticos típicas de mancha amarilla ocasionada por *P. tritici-repetis*, pero en este caso los conidios eran más cortos.

En este ensayo, más de la mitad de los conidios observados obtenidos de las muestras provenientes de hojas enfermas de trigo, no se correspondieron morfológicamente con las características de *P. tritici-repentis*, pero si con el género *Pyrenophora*. Las características morfoculturales descritas son compatibles con *Pyrenophora teres* (anamorfo: *Drechslera teres*), que es bien conocido y comúnmente aislado como patógeno de la cebada. Basado en las similitudes en la naturaleza de los conidióforos y en la forma y color de los conidios, algunas especies de *Pyrenophora* que atacan cereales a menudo pueden confundirse. *P. teres* se presenta en el mismo grupo morfológico (grupo 7) y puede ser confundida con *P. graminea* y *P. truberosa* (Chidambaram *et al.*, 1973). Todas las especies en este grupo poseen conidios cilíndricos y las 3 mencionadas presentan un patrón crecimiento similar bajo microscopio estereoscópico. Shoemaker (1962) señala algunas diferencias en las características para el reconocimiento morfológico. Los conidios de *P. teres* son más claros que los conidióforos y comparativamente más largos que los de *P. graminea*; por lo general tienen la célula basal inflada con una constricción en el septo basal, y rara vez producen conidios secundarios. *P. graminea* presenta conidióforos que llevan conidios del mismo color y con frecuencia se observan levemente oblongos en vez de

cilíndricos como en el caso de *P. teres*. Los conidios de *P. tuberosa* son más largos que los de *P. teres*, carecen de la célula basal inflada y regularmente tienen conidióforos secundarios (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Características morfoculturales de los conidios de tres especies pertenecientes al género *Pyrenophora*. Tomado de Chidambaram *et al.* (1973).

Asimismo los aislamientos fueron comparados en su morfología con cepas de referencia de *P. teres* procedentes de una colección caracterizada molecularmente y mantenida en el CIDEFI (Gene Bank accesión N° KF656728.1 y KF656729.1).

En cuanto a la identificación molecular, ésta nos permitió esclarecer la identidad de este nuevo integrante del complejo de manchas foliares que afecta al trigo, siendo *P. teres* f. *maculata*, un nuevo patógeno del cultivo de trigo en Argentina.

Por lo expuesto se puede no rechazar la primera hipótesis de este capítulo (**“Además de *P. tritici-repeticis* existen otras especies del género *Pyrenophora* que pueden infectar al trigo causando síntomas similares a la mancha amarilla”**).

En cuanto a la segunda hipótesis planteada (**“Es posible realizar una identificación morfológica y molecular del patógeno en cuestión”**) también no se rechaza ya que se identificó morfológica y molecularmente a la especie *P. teres* f. *maculata*.

## CAPÍTULO 3

### **Caracterización de la resistencia a *Pyrenophora spp* en cultivares argentinos de trigo.**

#### **1. Introducción**

Muchos de los cultivares comerciales argentinos son susceptibles a altamente susceptibles bajo condiciones naturales de alta presión de la enfermedad (Annone, 1998). En base a observaciones realizadas durante los años 1994, 1995 y 1996 el mismo autor presentó una lista de variedades comerciales con algún grado de resistencia frente a la enfermedad entre las que se encuentran Buck Charrua, Buck Guarani, Cooperación Calquin, Cooperación Maipun, Don Ernesto INTA, Klein Cacique, Klein Centauro, Klein Estrella, ProINTA Federal, ProINTA Guazu y ProINTA Real. También señaló que el rango de 1-30 % de severidad de mancha amarilla en hoja bandera parece el adecuado para caracterizar al material como moderadamente resistente. En un trabajo más reciente, llevado a cabo en tres localidades y durante los años 2003 y 2004, Annone & García (2005) caracterizaron 34 variedades comerciales de trigo frente a *P. tritici-repentis*, en condiciones naturales de campo, y encontraron que Buck Aguara, Klein Proteo, Relmo Tijereta, Buck Arriero y ProINTA Gaucho se manifestaron como las de mejor comportamiento. Galich & Galich (1994) analizaron el comportamiento de cultivares de trigo de distinto ciclo frente a *P. tritici-repentis* en el sur de Córdoba y Santa Fe, observando que sólo un grupo limitado se comportó como moderadamente susceptible y el resto como susceptible. Otras investigaciones más actuales realizadas en el año 2012 en Paraná, en donde se evaluó la resistencia a mancha amarilla bajo diferentes antecesores y fechas de siembra, encontraron que los cultivares Baguette 17, Baguette 701 Premium, Buck SY 300, Buck SY 200, SRM Nogal 111, Baguette Premium 11, BioINTA 3005 y Klein Tauro presentaron valores de severidad inferiores al 15%, el cual consideraron como umbral de acción (UDA) para la aplicación de fungicidas (Schutt de Varini *et al.*, 2013).

La resistencia frente a los diferentes patógenos es una característica deseable durante todo el ciclo del cultivo, pero muchas veces ésta se manifiesta en mayor o menor medida solo en alguna etapa de crecimiento del cultivo. Tadesse *et al.* (2010) encontraron niveles levemente más altos de susceptibilidad en la etapa adulta que en

la etapa de plántula, aunque hubo una tendencia similar para ambas etapas en todos los cultivares.

Todos los años se liberan al mercado nuevos cultivares que presentan nuevas características agronómicas mejoradas, pero también aparecen nuevas razas de los patógenos por lo que la búsqueda de resistencia es constante.

Por lo tanto, el objetivo de este ensayo fue caracterizar la resistencia tanto a los nuevos aislados de *P. teres* como a *P. tritici-repentis* en un set de cultivares argentinos de trigo utilizados comercialmente en la actualidad.

## **2. Hipótesis**

En base a los antecedentes mencionados, se plantearon las siguientes hipótesis:

- Los cultivares argentinos de trigo actualmente sembrados poseen una alta variabilidad en la resistencia a los patógenos *P. teres* y *P. tritici-repentis*, existiendo algunos cultivares resistentes.
- El nivel de resistencia de los cultivares de trigo a estos patógenos se mantiene durante todo el ciclo de cultivo.

## **3. Objetivos**

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar la resistencia a dos aislamientos de *P. teres* y uno de *P. tritici-repentis* en un set de cultivares argentinos de trigo utilizados comercialmente.
- Evaluar la severidad de la enfermedad en estado de plántula y estado adulto.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Aislamientos del hongo**

Se utilizó un aislamiento de *P. tritici-repentis* y dos aislamientos de *P. teres*. El aislamiento de *P. tritici-repentis* fue obtenido de la localidad Los Hornos, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires y designado como H017. Este aislamiento fue previamente caracterizado por Jecke (2015) bajo la denominación LH utilizando un set de cultivares diferenciales. El conjunto de diferenciales de trigo fue propuesto por Andrie *et al.* (2007) y Ali *et al.* (2010) con las líneas Glenlea, Katepwa, 6B365, 6B662,

Salamouni y M3. Se agregaron los diferenciales Coulter, Erik y 4B-160 utilizados en otros trabajos de investigación (Benslimane *et al.*, 2011; Lamari *et al.*, 2003). El aislamiento H017 se caracterizó por producir una reacción de necrosis y clorosis en las líneas Glenlea, Salomouni y Coulter, una reacción de clorosis en la línea 6B-365, una reacción de necrosis en la 4B-160 y resistencia en el resto. Tal como fue descrito en la introducción general, la reacción de necrosis en Glenlea indicaría la presencia de la toxina A; mientras que la reacción de clorosis en 6B-365 la presencia de la toxina C (Tabla 3.1). Este aislamiento comparte algún tipo de reacción característica de la raza 1, excepto por la ausencia de necrosis en Katepwa y la presencia de necrosis y clorosis en Salomouni. A su vez Jecke (2015) realizó un análisis molecular donde el aislamiento H017 se caracterizó por la presencia del gen *TOX B*. Este autor concluyó que no hubo coincidencias entre la caracterización fenotípica y genotípica. El aislamiento H017 al poseer un gen que codifica para la producción de la ToxB debería producir clorosis en las líneas Katepwa y 6B662 y, a pesar de ello, no causa clorosis en estas líneas. En base a estos estudios, el aislamiento H017 no se correspondería a las razas internacionalmente conocidas, de ahí su interés para ser utilizado en este estudio. Los dos aislamientos de *P. teres* fueron obtenidos de hojas de trigo enfermas, y se caracterizaron en el capítulo 2. Los aislamientos fueron designados como Dt1, proveniente de Los Hornos, Buenos Aires; y Dt2 de Paraná, Entre Rios.

**Tabla 3.1** Tipo de reacción de nueve líneas diferenciales de trigo usando frente al aislamiento de *P. tritici-repentis* H017.

Aislamiento	<b>Sintomas en el set de diferenciales</b>									
	Glenlea	Katepwa	6B662	6B365	Salomouni	Synthetic M3	4B-160	Coulter	Erik	
H017	N Cl	R	R	Cl	N Cl	R	N	N Cl	R	

Referencias: N= Necrosis; Cl= Clorosis; R= Resistente.

#### 4.2. Material vegetal

Se utilizaron 30 cultivares argentinos de los más sembrados en la campaña 2016. La lista de cultivares y la de su respectiva empresa/institución semillera se enumeran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Cultivares argentinos utilizados en el ensayo

<b>Nro</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Nro</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Nro</b>	<b>Cultivar</b>
1	ACA 303 Plus	11	Baguette 801 Premiun	21	Buck SY 211
2	ACA 307	12	Baguette Premiun 11	22	Don Mario Algarrobo
3	ACA 315	13	Bioceres Timbo	23	Klein Flamenco
4	ACA 320	14	Biolnta 3005	24	Klein Gladiador
5	ACA 356	15	Biolnta 3006	25	Klein Serpiente
6	ACA 360	16	Biolnta 3008	26	Klein Titanio
7	ACA 602	17	Buck Bellaco	27	Klein Yarara
8	ACA Cedro	18	Buck Meteoro	28	Sursem Lapacho
9	ACA Cipres	19	Buck SY 110	29	Sursem LE 2330
10	AGSeed Floripan 200	20	Buck SY 200	30	Sursem Nogal

### **4.3. Diseño experimental**

Se realizaron dos experimentos, uno a campo y otro en macetas macetas que fueron considerados como ambientes. El ensayo a campo se sembró el 24 de junio de 2016 en la Estación Experimental J. Hirschhorn de la FCAYF de la UNLP ubicada en la localidad de Los Hornos, partido de La Plata bajo un diseño de parcelas divididas con dos repeticiones. Las parcelas principales fueron los aislamientos de los patógenos y las subparcelas los 30 cultivares de trigo. Se sembraron de 20 a 25 semillas de cada cultivar en cada fila. Las parcelas fueron de 1 m de hileras individuales distanciadas a 0,2 m y separadas por una hilera de avena para reducir la interferencia entre parcelas. Los datos meteorológicos (precipitación mensual, humedad relativa y temperatura media) se registraron en una estación meteorológica situada a 300 m de los experimentos.

El ensayo en macetas se sembró el 26 de junio de 2016 en el predio de la FCAYF ubicado en el partido de La Plata y el diseño fue, al igual que el ensayo a campo, de parcelas divididas con dos repeticiones para cada estadio pero en este caso las subparcelas con cada cultivar de trigo fueron macetas plásticas de 10 litros. La parcela principal correspondió a los 3 aislamientos de los patógenos, y la subparcela a los cultivares. La siembra se realizó a mano colocando 8-10 semillas en cada maceta. Las plantas fueron regadas regularmente según las condiciones ambientales. Los datos meteorológicos se obtuvieron del Observatorio de La Plata, que posee una estación meteorológica situada a 300 m de los experimentos.

#### **4.4. Preparación del inóculo**

Para la replicación de los aislamientos, el medio de cultivo utilizado fue caldo V8, que se esterilizó en autoclave y se vertió en placas de Petri bajo flujo laminar. Los cultivos se incubaron durante 15-21 días a 23 ° C +/- 2 ° C en alternancia de luz y oscuridad para favorecer la esporulación del hongo siguiendo el protocolo sugerido por Raymond y Bockus (1982). El inóculo se preparó raspando asépticamente las colonias de esporulación con un bisturí y suspendiendo los conidios en agua desionizada. La suspensión conidial se ajustó a  $3 \times 10^3$  esporas / ml usando una cámara de recuento Newbauer. Se añadió Tween 20 (polisorbato 20) a 0,5 ml / l como tensioactivo.

#### **4.5. Inoculaciones y evaluaciones**

##### **4.5.1. Estado de plántula**

En esta tesis se utilizará el término “plántula” para designar al estado de crecimiento desde emergencia hasta que la planta posee cuatro hojas totalmente desplegadas (GS 14) (Zadoks *et al.*, 1974).

La inoculación se realizó en la etapa de dos hojas totalmente desplegadas (GS 12) (Zadoks *et al.*, 1974) con un pulverizador de mochila de 20 l operado manualmente, que se calibró a una tasa de 10 l por 100 m<sup>2</sup>. La misma se realizó sobre la mitad de la parcela a campo y sobre dos repeticiones en macetas, dejando un grupo de plantas sin inocular en esta etapa, las cuales fueron inoculadas en la etapa adulta. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron húmedas pulverizando con agua varias veces al día durante un período de tres días para mantener las condiciones húmedas necesarias para el desarrollo de la enfermedad. Las evaluaciones se realizaron 14 días después de la inoculación al mismo tiempo para todos los genotipos, estimando visualmente la severidad como porcentaje del área afectada por clorosis y necrosis en las dos hojas inferiores de siete plantas de cada parcela para cada repetición. Con los datos recopilados se calculó el porcentaje de severidad en plántulas (PSP), promedio de las dos hojas inferiores en las siete plantas de cada repetición.



#### **4.5.2. Estado adulto**

Las inoculaciones se realizaron en macollaje (GS 23). La severidad de la enfermedad se evaluó 21 días después de la aparición de la hoja bandera en cada cultivar, estimando la severidad como porcentaje de área afectada por clorosis y necrosis en las tres hojas superiores (hoja bandera, hoja bandera – 1 y hoja bandera - 2) de siete plantas de cada parcela y cada repetición. Esto se realizó de esta forma con la finalidad que el tiempo de exposición de dichas hojas a la enfermedad fuera el mismo en cada uno de los cultivares, evitando de esta manera sobre o subestimar los valores de severidad en función de mayores o menores tiempos de exposición experimentados por ciclos más cortos o más largos, respectivamente (todos los genotipos fueron evaluados al mismo estadio fenológico, pero en diferente momento temporal). De los datos de severidad recopilados se calculó el promedio de las 3 hojas superiores estimando el porcentaje de severidad en estado adulto (PSA).

Se evaluaron también los días a espigazón (DAE) de cada genotipo, contando los días desde emergencia de la plántula hasta que al menos el 50% de la parcela (genotipo) estuvo en espigazón (GS 59).

#### **4.6. Análisis de los datos**

Debido al desfase temporal en la evaluación de estado adulto se realizó una regresión para observar la relación entre el PSA y los DAE, tomando como variable dependiente al PSA para cada aislamiento y cada año, y como variable independiente a los DAE. Los datos en que la regresión fue significativa se corrigieron utilizando la fórmula propuesta Simón *et al.* (2004):  $Y_{corr} = Y(\text{dato}) - b_1 \times (x_{1i} - X_1)$  donde  $Y_{corr}$  es el PSA corregido,  $Y$  es el PSA evaluado para determinado genotipo,  $b_1$  es el coeficiente de regresión (pendiente de la recta) para DAE,  $x_i$  son los DAE para determinado genotipo y  $X$  son los DAE promedio de todos los genotipos.

Los datos fenotípicos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el programa GenStat12th Edition 2009, después de la transformación de la raíz cuadrada de arcoseno de los promedios para normalizar la varianza residual. Los experimentos, aislamientos y genotipos se consideraron como efectos fijos, mientras que las repeticiones se consideraron como efectos aleatorios. Las medias se compararon usando la prueba LSD ( $P < 0,05$ ). Se determinaron en base a los valores de LSD los límites para determinar los cultivares resistentes,

moderadamente resistentes, moderadamente susceptibles y susceptibles. Con el fin de determinar si la resistencia de los cultivares se mantiene durante todo el ciclo del cultivo se realizó una regresión entre las variables PSP y PSA.

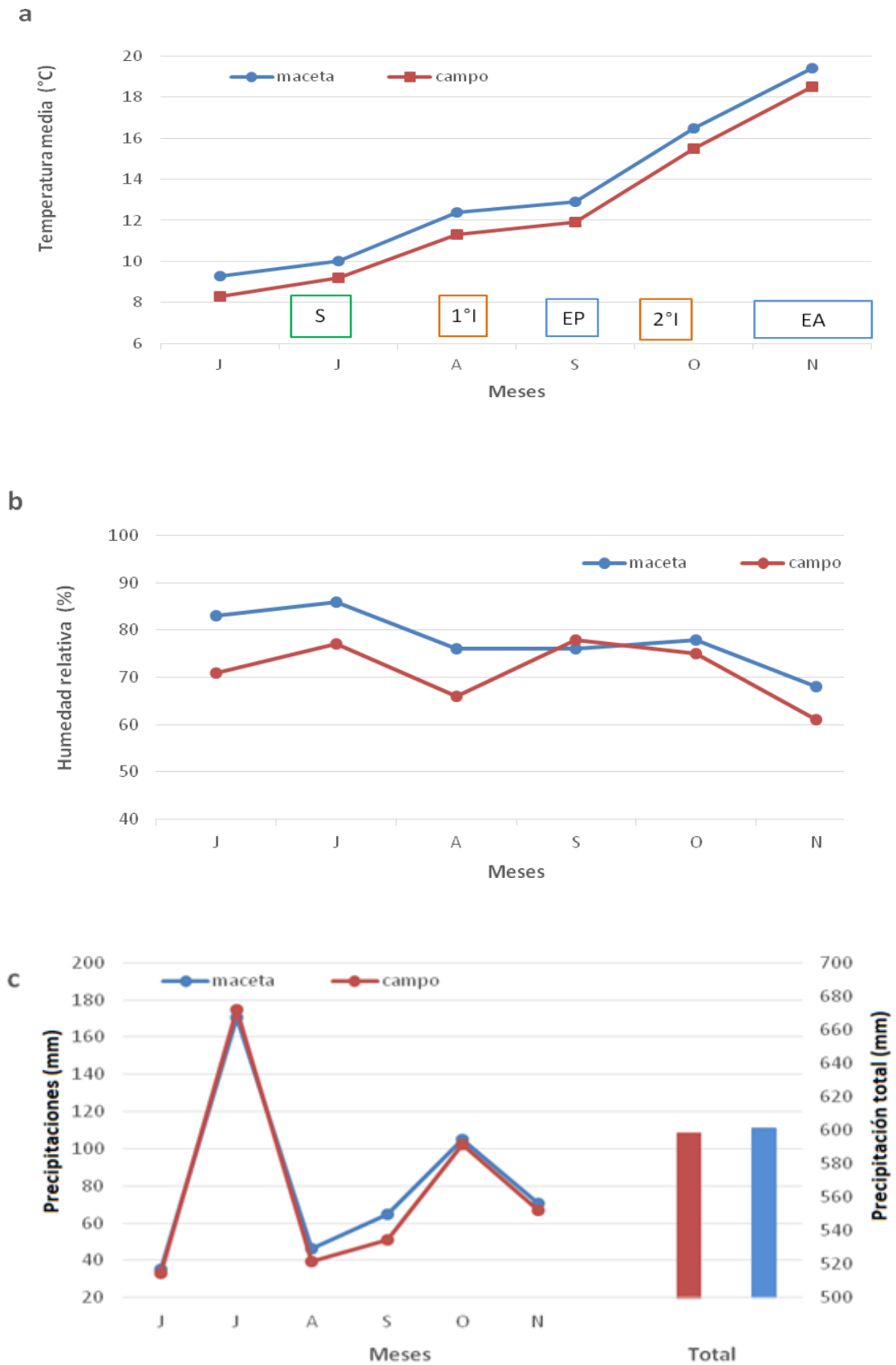
#### **4.7. Condiciones climáticas**

Considerando los meses que se realizaron los ensayos (junio a noviembre), las condiciones climáticas fueron similares para ambos ambientes (campo y maceta), ya que se encuentran a 14 km uno del otro, aunque es frecuente que varíen las precipitaciones. La temperatura media en todos los meses fue en promedio 1°C superior en el ambiente maceta (Fig. 3.1a). La humedad relativa media en los meses de los ensayos también fue un poco mayor en el ambiente maceta, sobre todo en los primeros meses (Fig. 3.1b). En este caso, las precipitaciones fueron similares entre ambientes. La precipitación total fue de 598 y 601 mm para el ambiente maceta y campo, respectivamente. Los meses de mayores precipitaciones fueron julio y octubre en ambos ambientes. La diferencia más importante en la precipitación mensual entre ambientes fue en septiembre, donde se registraron 14 mm más en el ambiente maceta. (Fig. 3.1c).

### **5. Resultados**

#### **5.1. Días a espigazón (DAE)**

Los DAE de los 30 cultivares evaluados fueron mayores en el ambiente 'a campo' (120 días promedio), donde los cultivares con ciclo más corto tuvieron 117 días y los de ciclo más largo 123 días. Al mismo tiempo en este ambiente los cultivares presentaron menor variabilidad en el ciclo. En el ambiente 'maceta' el DAE promedio fue de 118 y los cultivares tuvieron DAE más diversificados, teniendo los cultivares más cortos 105 días y los más largos 124 días (Anexo. Tabla A).



**Figura 3.1.** Datos climáticos. a. Temperatura media mensual y labores realizadas: S (siembra), 1<sup>o</sup>I (Primera inoculación), EP (Evaluación plántula), 2<sup>o</sup>I (Segunda inoculación), EA (Evaluación adulto). b. Humedad relativa mensual. c. Lluvias mensuales y total del periodo.

## 5.2. Análisis estadístico

Con el objetivo de analizar la posible relación entre la severidad de la enfermedad y el ciclo de los cultivares se realizó una regresión entre PSA y DAE, la cual no fue significativa para ningún aislamiento ni año, por lo tanto los valores de PSA no fueron corregidos por fórmula. Al realizar el ANOVA para la variable PSP, se observaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) para el factor cultivar y para la interacción ambiente x cultivar, mientras que el resto de los factores e interacciones no presentaron diferencias significativas. El análisis de la varianza para la variable PSA mostró efectos significativos para el factor ambiente ( $P < 0,05$ ) y altamente significativos para el factor cultivar ( $P < 0,001$ ), mientras que el factor aislamiento no mostró diferencias significativas. En cuanto a las interacciones entre los factores, la interacción doble ambiente x aislamiento mostró efecto significativo ( $P < 0,05$ ), mientras que las interacciones dobles ambiente x cultivar, aislamiento x cultivar y la interacción triple ambiente x aislamiento x cultivar, mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ).

**Tabla 3.3.** Cuadrados medios de los promedios transformados de las variables porcentaje de severidad en plántula (PSP) y adulto (PSA).

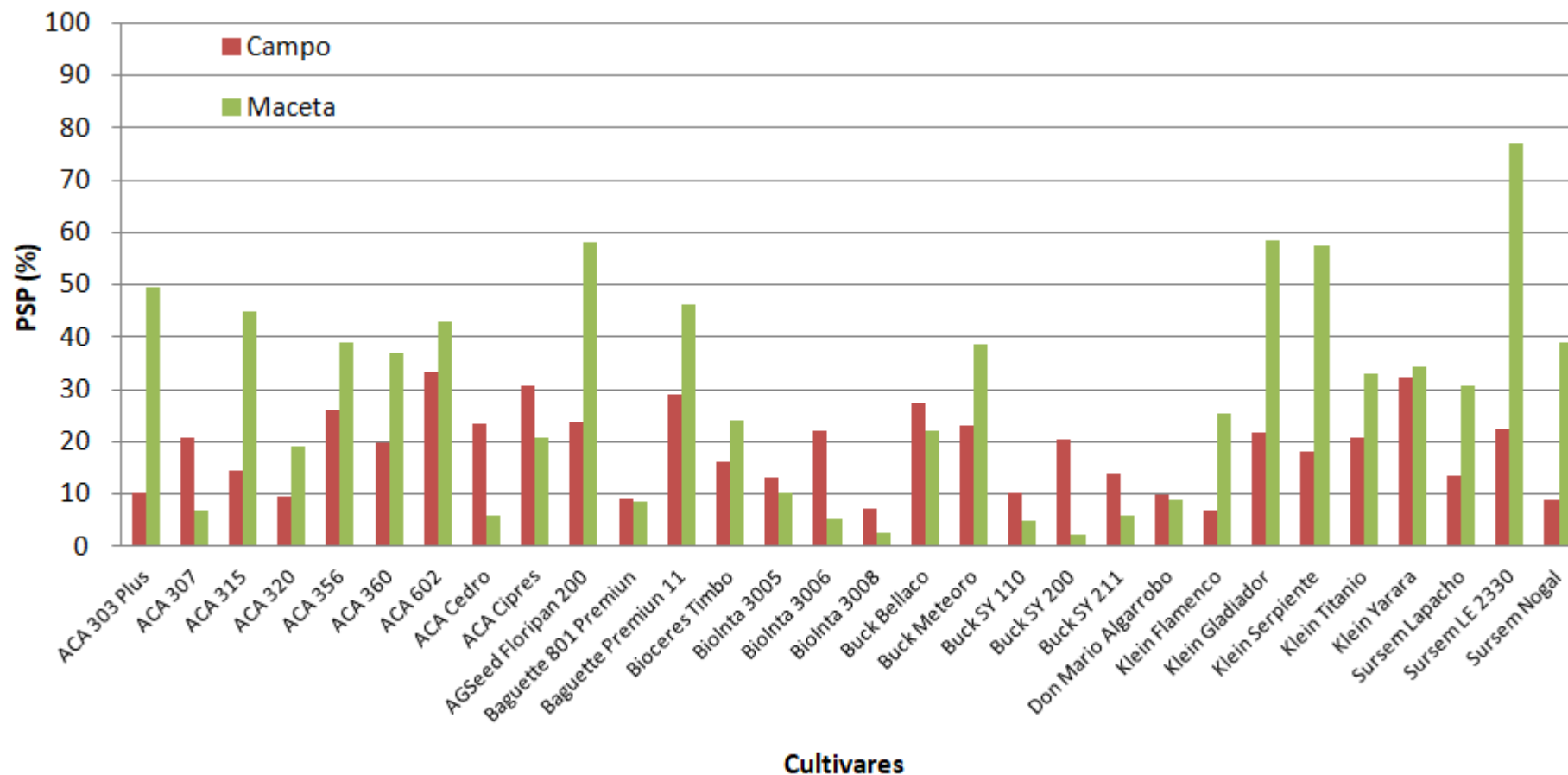
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	CUADRADO MEDIO	
		PSP	PSA
AMBIENTE	1	0,642	1,099 *
ERROR A	1	0,653	0,005
AISLAMIENTO	2	0,541	0,019
AMBIENTE x AISLAMIENTO	2	0,605	0,033 *
ERROR B	4	0,308	0,004
CULTIVAR	29	0,341 ***	0,201 ***
AMBIENTE x CULTIVAR	29	0,219 ***	0,079 ***
AISLAMIENTO x CULTIVAR	58	0,050	0,017 ***
AMBIENTE x AISLAMIENTO x CULTIVAR	58	0,061	0,020 ***
ERROR C	174	0,063	0,008
TOTAL	359		

\*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$

### 5.3. Resistencia en estado de plántula

El PSP promedio general fue de 23,6%, mientras que el promedio por ambiente fue mayor en maceta (28,6%) que a campo (18,6%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Al observar los promedios por cultivares el PSP presentó una alta variabilidad, oscilando entre 4,9% y 49,7%. Los cultivares más resistentes fueron BioInta 3008 (4,9%), Buck SY110 (7,5%), Baguette 801 Premiun (8,9%), Algarrobo (9,4%) y Buck SY211 (9,9%), mientras que los cultivares más susceptibles fueron LE2330 (49,7%), Floripan 200 (40,9%) y Gladiador (40,2%).

En la interacción doble ambiente × cultivar, se observó que la mayoría de los genotipos presentaron mayores PSP en el ambiente maceta en comparación con el ambiente campo. El rango de PSP en campo osciló entre 6,8% y 33,3%, mientras que en maceta fue entre 2% y 77%. Se consideraron diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad, teniendo en cuenta los valores generales y el valor de LSD (0,05%). Debido a la diferencia entre ambientes se consideraron diferentes rangos. Para el ambiente campo, los cultivares con PSP menor a 15% se consideraron resistentes (R), entre 15% y menores al 20%, moderadamente resistentes (MR), entre 20% y menores a 25%, moderadamente susceptibles y los de 25% de PSP o mayor como susceptibles (S). En cambio en el ambiente macetas quedaron establecidos los siguientes límites: menores a 20% de PSP, los cultivares resistentes (R); entre 20% y menores a 30%, moderadamente resistentes (MR), entre 30% y menores al 50% moderadamente susceptibles (MS) y mayor o igual a 50% de PSA los cultivares susceptibles (S). Los cultivares que se comportaron como R en ambos ambientes fueron BioInta 3008, Buck SY110, Baguette 801 Premiun, Algarrobo, Buck SY211 y BioInta 3005. Los cultivares ACA356, ACA602, Baguette Premiun 11, Gladiador, Yarará, Floripán 200 y Sursem LE2330 se comportaron como S o MS en ambos ambientes. Los cultivares Buck Bellaco y ACA Ciprés fueron S a campo y MR en macetas, mientras que el cultivar Serpiente tuvo el comportamiento inverso, MR a campo y S en maceta (Figura 3.2).



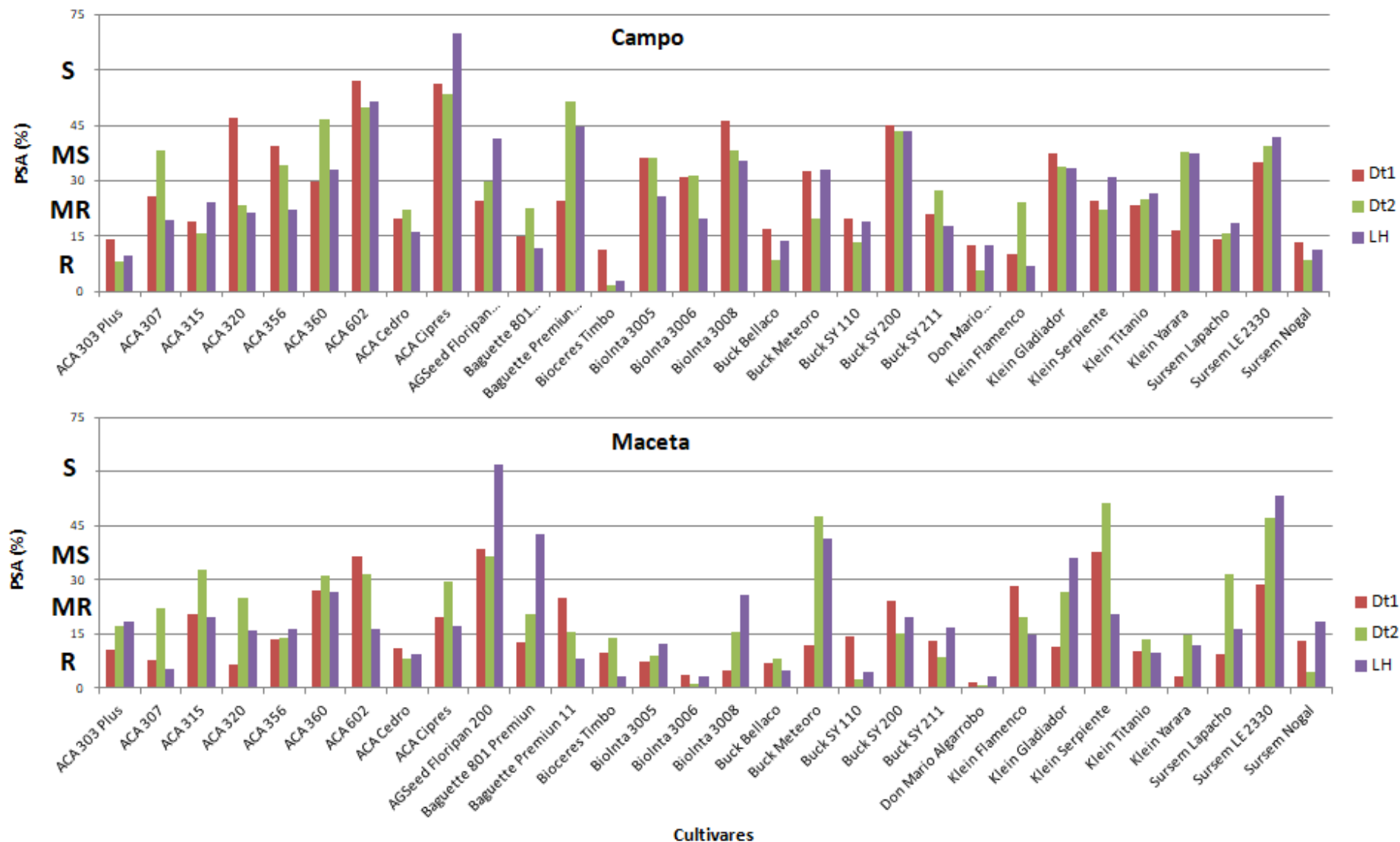
**Figura 3.2.** Porcentaje de severidad de la enfermedad en plántula (PSP) de 30 cultivares de trigo en dos ambientes, promedio de los tres aislamientos inoculados (H017, Dt1 y Dt2)

#### 5.4. Resistencia en estado adulto

El PSA promedio en el ambiente campo (27,1%) fue significativamente mayor al PSA promedio del ambiente maceta (18,5%), mientras que los promedios observados para los aislamientos fueron similares, Dt1 (21,5%), H017 (22,8%) y Dt2 (24,1%). Los 30 cultivares presentaron una alta variabilidad en el PSA, ya que el promedio osciló entre 6,1 % y 41,1%. Los cultivares que presentaron mayor resistencia fueron Algarrobo (6,1%), Timbó (7,1%), Bellaco (9,8%) y Nogal (11,5%) mientras que los cultivares más susceptibles fueron Ciprés (41,1%), LE2330 (40,9%), 602 (40,6%) y Floripan200 (38,8%).

En la interacción triple, también se consideraron diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad para facilitar la comprensión de los datos. En este caso los límites fueron iguales para los distintos ambientes. Quedaron establecidos los siguientes límites: menor a 15% de PSA, los cultivares resistentes (R); de 15% y menor a 30%, moderadamente resistentes (MR), de 30 y menor de 45% moderadamente susceptibles (MS) y mayor o igual a 45% de PSA los cultivares susceptibles (S).

De los 30 cultivares evaluados, diez se comportaron como R o MR frente a los tres aislamientos y en los dos ambientes ensayados, destacándose los cultivares Algarrobo y Timbó seguidos de Bellaco, Nogal, SY110, ACA 303Plus, Cedro, Flamenco, SY211 y Titanio. Los cultivares Lapacho y ACA 315 se mostraron en general como R o MR menos frente al aislamiento Dt2 en el ambiente maceta, frente al cual fueron MS. Similar comportamiento presentó el cultivar Baguette 801 Premiun pero éste fue MS frente al aislamiento H017 en maceta. Siete cultivares se comportaron como R o MR frente a los tres aislamientos solo en el ambiente maceta, mientras que a campo fueron S o MS frente a uno o dos de los aislamientos. En este grupo se encuentran los cultivares ACA 307 (MS a Dt2), ACA 320 (S a Dt1), Biointa 3006, Biointa 3005 y ACA 356 (MS a Dt1 y Dt2), Yará (MS a Dt2 y H017) y Baguette Premiun11 (S a Dt2 y MS a H017). Los cultivares Biointa 3008, Buck SY200 y Ciprés presentaron R o MR frente a los tres aislamientos en el ambiente maceta mientras que a campo se mostraron como S o MS frente a los tres aislamientos. Los siete cultivares restantes que fueron evaluados en este ensayo mostraron S o MS en ambos ambientes frente al menos un aislamiento. En este grupo están los cultivares Gladiador, Meteoro, Serpiente, ACA 360, Floripan200, ACA 602 y LE2330 (Figura 3.3).



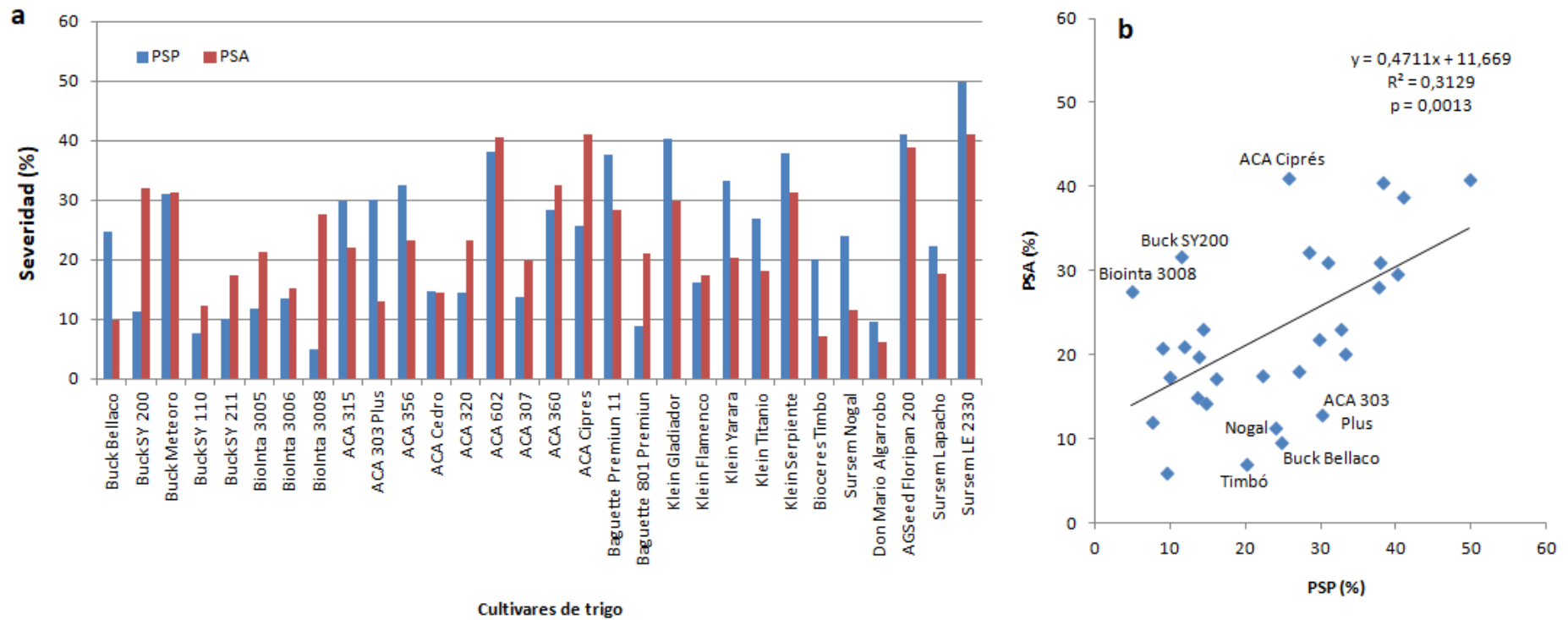
**Figura 3.3.** Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) de 30 cultivares de trigo frente a dos aislamientos de *P. teres* (Dt1 y Dt2) y uno de *P. tritici-repentis* (H017), en dos ambientes. Cultivos resistentes (R): 0-15% PSA; moderadamente resistentes (MR): 15-30%; moderadamente susceptibles (MS): 30-45% y los cultivos susceptibles (S): mayor o igual a 45% de PSA.



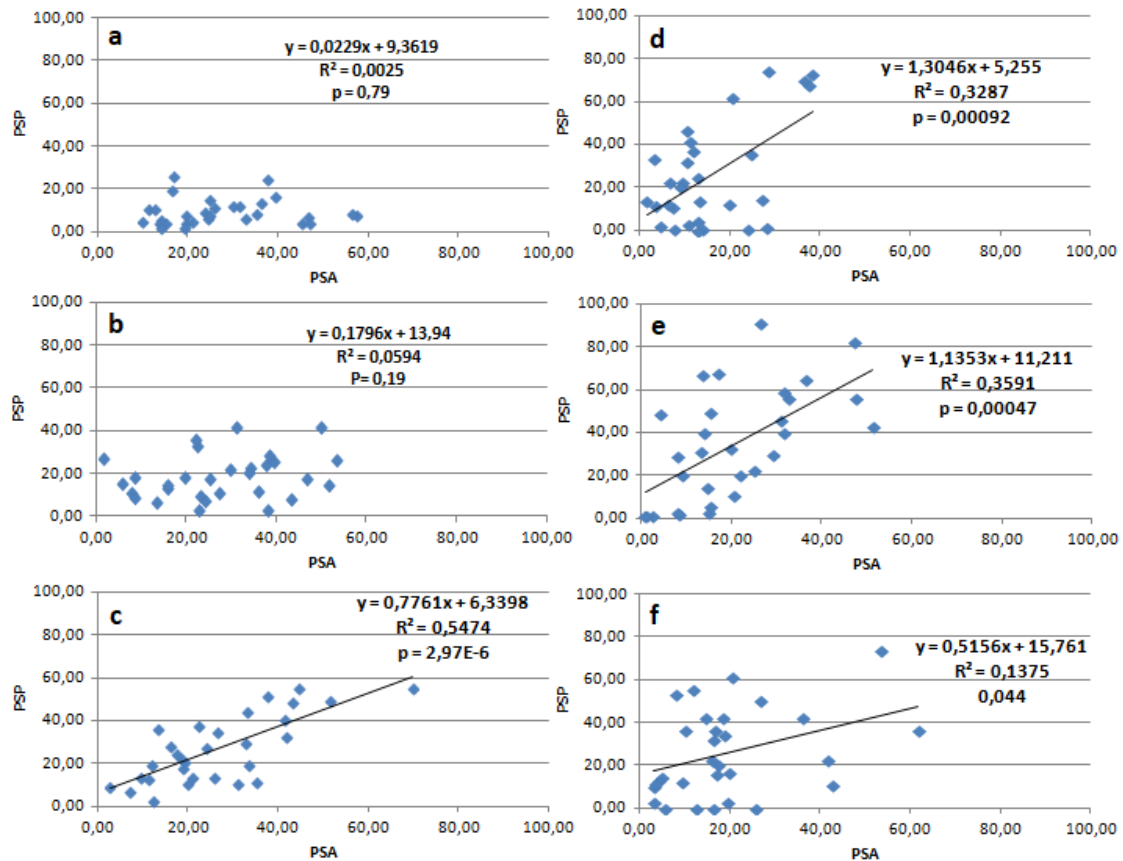
## 5.5. Relación entre PSP y PSA

Al analizar los promedios de severidad por cultivares, algunos presentaron valores similares de resistencia en ambos estados de crecimiento, mientras que otros mostraron resistencia en un solo estado (Figura 3.4.a). La regresión entre los PSP y PSA promedios resultó significativa ( $P= 0,0013$ ), aunque con una dispersión apreciable (Figura 3.4.b). Sin embargo considerando cada ambiente y aislamiento en particular, las regresiones entre PSA y PSP (Figura 3.5) resultaron significativas ( $p<0,05$ ) en el ambiente maceta para los tres aislamientos, mientras que en el ambiente campo solo fue significativa para el aislamiento H017.

Los cultivares Buck SY200, Biointa 3008 y ACA Ciprés presentaron algún nivel de resistencia en el estado de plántula pero en el estado de planta adulta fueron más susceptibles. En cambio los cultivares Buck Bellaco, ACA 303 Plus, Timbó y Nogal presentaron un comportamiento inverso, fueron más resistentes en la etapa adulta que en el estado de plántula. El resto de los cultivares mostraron niveles de severidad similares en ambos estados de crecimiento. (Figura 3.4.b).



**Figura 3.4.** a. Porcentaje de severidad promedio en estado de plántula (PSP) y adulto (PSA) de los 30 cultivares utilizados. b. Regresión entre PSA y PSP promedio de los dos ambientes y los tres aislamientos.



**Figura 3.5.** Gráfico de regresiones entre porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) y plántula (PSP) para los ambientes campo (izquierda) y maceta (derecha) y los aislamientos Dt1(a, d), Dt2 (b, e) y H017 (c, f).

## 6. Discusión

En este ensayo se realizó la caracterización de la resistencia genética a dos patógenos fúngicos pertenecientes al género *Pyrenophora* en un set de 30 genotipos de trigo actuales utilizando inoculaciones artificiales. Las inoculaciones artificiales utilizando aislamientos específicos del patógeno son dificultosas y representan un desafío considerable en términos de desarrollo de los experimentos, pero proporcionan una gran cantidad de información, la cual no puede ser lograda en infecciones naturales (Kema & van Silfhout, 1997). El uso de aislamientos individuales bajo condiciones de campo es requerido cuando se quiere probar la efectividad y el espectro de un determinado gen de resistencia, y representa la única forma fenotípica fiable que ayuda al mejorador en la selección de nuevos genotipos de buen comportamiento (Tabib Ghaffary *et al.*, 2011). En este estudio si bien el número de aislamientos utilizados fue limitado, se eligió el aislamiento H017 (*P. tritici-repentis*) ya que no se corresponde con razas previamente conocidas del patógeno y además representa a un grupo de aislamientos con características similares que fueron

encontrados en estudios previos (Moreno *et al.*, 2014). En el caso de *P. teres*, por el momento no se dispone de una colección de aislamientos, ya que hasta la actualidad no se conocía de su patogenicidad sobre trigo, por lo que se utilizaron dos aislamientos que habían producido infecciones en trigo. Varios de los cultivares comerciales de nuestro país son susceptibles a altamente susceptibles bajo condiciones naturales de alta presión de la enfermedad (Annone, 1998). Tal como fue mencionado anteriormente, todos los años se liberan al mercado nuevos cultivares que presentan nuevas características agronómicas mejoradas, pero también aparecen nuevas razas de los patógenos por lo que la búsqueda de resistencia es constante. Es claro que la confirmación de la patogenicidad de *P. teres* sobre trigo, implica que hay que realizar un estudio de la frecuencia de aparición y una caracterización de los aislamientos.

Una de las hipótesis planteadas en este capítulo es que **“los cultivares argentinos actualmente sembrados poseen una alta variabilidad en la resistencia a los patógenos *P. teres* y *P. tritici-repentis*, por lo tanto existen algunos que son resistentes”**. En este ensayo se encontraron varios genotipos con buen comportamiento frente a los aislamientos utilizados tanto en estado vegetativo como en estado adulto.

En el estado de plántula se observaron valores de severidad relativamente bajos (< 30%), sobre todo en el ambiente ‘campo’, ésto puede ser debido a que en el ambiente ‘maceta’ las condiciones climáticas fueron más propicias para la enfermedad, sobre todo en lo que respecta a la humedad relativa durante el periodo de evaluación. Asimismo las macetas negras pueden causar mayor temperatura del sustrato, y originar una mayor senescencia que acentúa el efecto de la enfermedad. Los cultivares con mejor comportamiento en plántula frente a los patógenos fueron Algarrobo, Buck SY110, Buck SY211, Biointa 3005, Biointa 3008 y Baguette 801 Premiun. Jecke (2015) en ensayos realizados con los mismos aislamientos y en la misma zona encontró en otro set de cultivares, unos pocos coincidentes con este trabajo, que los cultivares que presentaron mejor comportamiento en estado de plántula fueron Baguette 601, Buck SY 300, Buck SY 110, Don Mario Lenox, Baguette 17, Buck AGP Fast, Sursem Nogal, BioInta 1001, ProInta Puntal y SY100.

En estado adulto los cultivares de mejor comportamiento fueron Algarrobo, Timbó, Bellaco, Nogal, Buck SY110, ACA 303 Plus, Cedro, Biointa 3006, Flamenco, Buck SY211, Lapacho, Titanio y ACA 307. Mientras que los genotipos Floripan 200, ACA 602, LE 2330 y Ciprés fueron los más susceptibles. En coincidencia con este ensayo, otros investigadores, en ensayos realizados en el año 2016 en Marcos Juárez, encontraron algún nivel de resistencia frente a mancha amarilla en los genotipos

Bellaco, ACA 303 Plus y ACA 307, mientras que ACA Ciprés fue susceptible y ACA 602 y LE 2330 moderadamente susceptible (Donaire *et al.*, 2017). Del mismo modo, otros ensayos en Pergamino durante el 2016 (Red de Ensayos Territoriales) encontraron altos niveles de resistencia frente a mancha amarilla en los genotipos Algarrobo, Timbó, ACA 303 Plus y ACA 307; por otro lado los genotipos ACA 602, LE 2330 y Ciprés presentaron susceptibilidad frente a mancha amarilla, resultados similares encontrados en este ensayo.

A su vez se evaluaron los días a espigazón de cada cultivar para conocer la influencia de este atributo sobre la resistencia. No existió relación entre los DAE y el PSA, ésto puede ser debido a que los cultivares presentaban duración de ciclo similar y por lo tanto fueron expuestos a condiciones ambientales similares.

Otra de las hipótesis planteadas fue que **“la resistencia de los cultivares de trigo a los patógenos se mantiene durante todo el ciclo de cultivo”**. Al analizar el comportamiento de los cultivares frente a los patógenos en el estado de plántula y estado adulto se pudo observar que 14 cultivares presentaron algún nivel de resistencia en ambos estados, otros 7 mostraron resistencia solo en un estado, mientras que los restantes nueve fueron moderadamente susceptibles o susceptibles en ambos estados. Los cultivares Algarrobo de Don Mario, Buck SY 110 y ACA Cedro se destacaron por presentar una buena resistencia en ambos estados, mientras que los genotipos con mayor susceptibilidad durante todo el ciclo fueron Sursem LE2330, Floripan 200 y ACA 602. Tadesse *et al.* (2010) encontraron que la mayoría de los cultivares mostraron niveles levemente más altos de susceptibilidad en la etapa adulta bajo condiciones de campo que en la etapa de plántula en condiciones de invernadero, aunque hubo una tendencia similar para ambas etapas en todos los cultivares.

Resumiendo, en este capítulo se caracterizó la resistencia a *P. tritici-repentis* y *P. teres* en cultivares de trigo de los más utilizados en la Argentina detectando varios genotipos que presentaron susceptibilidad frente a los aislamientos utilizados. Esto sugiere la necesidad de seguir mejorando genéticamente la sanidad de los cultivares locales, lo que implica la búsqueda de materiales que posean genes de resistencia para poder ser utilizados en futuros programas de mejoramiento.

## CAPÍTULO 4

### Localización de la resistencia a *Pyrenophora spp.* en una colección de trigos primaverales

#### 1. Introducción

##### 1.1. Marcadores moleculares y selección asistida en el mejoramiento

La base fundamental del mejoramiento de plantas radica en la selección de genotipos específicos mostrando rasgos deseables. Selecciones típicas incluyen la evaluación de poblaciones de mejoramiento por uno o más rasgos de importancia agronómica, a fin de desarrollar nuevas variedades que presenten una adecuada combinación de genes (Bertrand *et al.*, 2008). En la búsqueda de este objetivo, la mayoría de los programas de mejoramiento utilizan cientos de poblaciones, las que involucran millones de plantas individuales (Witcombe & Virk, 2001). Adicionalmente, como la mayoría de los caracteres de importancia agronómica son complejos, es decir están determinados por muchos genes y en general presentan baja heredabilidad, la selección fenotípica es pospuesta hasta que las líneas alcanzan alto grado de homocigosis (F5 o F6). Luego de ello, las líneas seleccionadas son recién evaluadas a campo. Todos estos procesos, involucran tiempo (5-10 años) y costos considerables. En este tipo de trabajos, la selección asistida por marcadores puede ser de gran ayuda, incrementando significativamente la eficiencia y efectividad en el mejoramiento comparada con los métodos tradicionales de selección fenotípica (Collard *et al.*, 2005).

El uso de marcadores moleculares (fragmentos específicos de ADN con una ubicación conocida en el cromosoma) ofrece la oportunidad de realizar selección en generaciones y estadios tempranos, como así también estabilizar rápidamente en homocigosis aquellos genotipos deseados, con un gran impacto en tiempo, recursos y esfuerzo. Adicionalmente, utilizando marcadores moleculares es posible identificar tanto los factores como la arquitectura genética asociados a un determinado rasgo, como también detectar co-variaciones entre caracteres, como por ejemplo resistencia a enfermedades, ciclo y altura de planta (Miedaner & Korzun, 2012). ). En general, tanto marcadores co-dominantes: SSRs (*Simple Sequence Repeats*) o RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), como marcadores de tipo dominante: AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) y RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNAs*) han sido exitosamente usados en el mapeo de QTL (Landjeva *et*

*al.*, 2007; Abdurakhmonov & Abdukarimov, 2008), aunque los últimos con menor poder estadístico.

Actualmente, marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) y DArT (*Diversity Array Technology*), están siendo ampliamente utilizados en el escaneo de todo el genoma a fin de identificar QTL en muchas especies de plantas (Poland *et al.*, 2012). Estos sistemas de marcadores son de bajo costo por punto de datos y permiten detectar varios miles de loci en un solo ensayo, constituyendo plataformas de genotipado de alto rendimiento. Particularmente, la tecnología DArT se basa en la hibridación (similar a una plataforma de microarrays) para detectar presencia o ausencia de fragmentos individuales de ADN en representaciones genómicas generadas por métodos complejos de reducción de muestras de ADN (Jaccoud *et al.*, 2001). Esta técnica ha demostrado ser reproducible y de muy bajo costo, permitiendo la tipificación simultánea de varios cientos de loci polimórficos, extendidos a través de todo el genoma y sin la necesidad de tener información previa de la secuencia nucleotídica (Wenzel *et al.*, 2004).

## **1.2. Mapeo de genes asociados a caracteres de importancia agronómica**

Comprender la base genética de rasgos cuantitativos complejos de importancia es uno de los principales objetivos en el fitomejoramiento. Este tipo de rasgos están controlados por muchos loci y su caracterización molecular y mapeo genético se denomina mapeo de QTL. El objetivo del mapeo de genes es encontrar marcadores moleculares, de herencia neutral, estrechamente relacionados con factores genéticos que regulan tales rasgos. A través del mapeo de ligamiento se ha estimado tradicionalmente la variación de fenotipos a través de cambios en la secuencia de ADN y su ubicación en el genoma. En este enfoque clásico, el desequilibrio de ligamiento (DL) es creado a través del desarrollo de poblaciones de mapeo, seguido de la identificación de marcadores genéticos co-segregantes con el rasgo de interés (Collard *et al.*, 2005). Una alternativa más reciente y que ha demostrado mayor poder de mapeo en rasgos cuantitativos complejos es el mapeo asociativo, el cual centra la búsqueda de asociaciones marcador-carácter, basándose en el concepto de desequilibrio de ligamiento y sin necesidad de desarrollar poblaciones de mapeo (Flint-Garcia *et al.*, 2005).

### 1.3. Mapeo clásico

En el mapeo por ligamiento clásico la identificación de genes o QTL se basa en el principio de recombinación genética ocurrido en la meiosis ( Tanksley 1993). Esto permite a partir de marcadores moleculares generar mapas de ligamiento para una población específica. Como consecuencia, el primer paso es desarrollar poblaciones de mapeo (tales como F2, BC, DH, RIL, etc.), derivadas de la hibridación genética entre dos genotipos parentales contrastantes para determinado rasgo de interés. Seguidamente, los genotipos que conforman la población desarrollada son evaluados a fin de conocer la segregación del rasgo bajo estudio en diferentes ambientes. Posteriormente, un set de marcadores polimórficos entre ambos padres y segregante en la población de mapeo necesita ser identificado y genotipado. Los datos genotípicos generados, se utilizan para construir mapas de ligamiento, en los que se representa el orden (posición) y ligamiento (una distancia genética relativa en cM) de los marcadores moleculares usados, a lo largo de los grupos de ligamiento o segmentos de cromosomas particulares. Esto se logra mediante la evaluación de las tasas de recombinación entre marcadores. Por último, los marcadores ordenados a lo largo del mapa de ligamiento son estadísticamente correlacionados con el rasgo fenotípico medido en los genotipos de la población de mapeo. Esto permite identificar las regiones o QTL que afectan el rasgo de interés a partir de marcadores estrechamente ligados. En este último paso, los marcadores son utilizados para clasificar la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos en base a la presencia/ausencia de un marcador particular, luego se determina si existen diferencias significativas entre grupos respecto al rasgo medido (Collard *et al.*, 2005). Diferencias significativas en las medias fenotípicas de los diferentes grupos, indican que el/los marcadores usados para definir los grupos en la población de mapeo están ligados a QTL que controlan el rasgo en estudio.

Se han desarrollado distintos test estadísticos para la detección de QTL, comenzando con el análisis de marcador simple, mapeo por intervalo simple y, por último, el mapeo por intervalo compuesto (Liu, 1998). Los resultados en general son presentados a través de perfiles del logaritmo de las probabilidades o LOD (*Logarithmic of Odds*). Así, la posición más probable de un QTL sobre un cromosoma es aquella donde se obtiene un mayor valor de LOD. En principio eran ampliamente aceptados valores umbrales de LOD de 2 a 3, mientras que en la actualidad la determinación de umbrales de LOD se realiza comúnmente mediante pruebas de permutación y es específico de cada caso en particular (Churchill & Doerge, 1994).



Más allá de que este enfoque ha sido ampliamente utilizado y con el mismo se ha podido identificar una gran cantidad de QTL determinantes de caracteres de importancia, el mismo tiene una serie de limitaciones: (i) Presenta altos costos y tiempo asociados al desarrollo de las poblaciones biparentales, (ii) tiene baja resolución de mapeo debido al bajo número de eventos meióticos ocurridos durante el/los cruzamiento/s que da origen a la población de mapeo y solo unos pocos alelos (limitados a los presentes en los dos parentales) pueden ser evaluados simultáneamente (Flint-Garcia *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005). (iii) Por último, en general los dos parentales utilizados difieren en uno o unos pocos caracteres de importancia (condición fundamental para poder mapear el carácter), por lo que son pocas las características que pueden ser estudiadas simultáneamente en la misma población de mapeo.

#### **1.4. Mapeo por asociación**

El mapeo por asociación es un enfoque relativamente nuevo en plantas, el que se ha comenzado a utilizar en la identificación de QTL, ya que ha mostrado un mayor poder de detección en rasgos cuantitativos complejos, en comparación con el mapeo tradicional (Al-Maskri *et al.*, 2012). El mismo hace uso de poblaciones naturales (variedades locales, cultivares elite, materiales silvestres o exóticos, etc), evitando los tiempos y costos asociados al desarrollo de poblaciones biparentales. Adicionalmente, y como consecuencia de los numerosos eventos de recombinación históricos presentes en los genotipos incluidos en la población de mapeo, se genera una reorganización de los segmentos cromosómicos en pedazos más pequeños. Esto genera una reducción del DL en distancias cortas alrededor de los loci, y da lugar a significativa co-ocurrencia sólo entre loci físicamente cercanos, lo que aumenta en gran medida la resolución de mapeo (Ersoz & Buckler, 2009). Así, mientras en poblaciones bi-parentales utilizadas en mapeo clásico se generan pocos eventos de recombinación que permiten intercambio entre los cromosomas del orden de megabases, las poblaciones naturales empleadas en estudios de asociación presentan segmentos intercambiados del orden de kilobases (Paterson *et al.*, 1990; Stuber *et al.*, 1992; Thornsberry *et al.*, 2001). Adicionalmente, el mayor poder de detección de la metodología de mapeo asociativo permite identificar genes con efectos modestos o de baja heredabilidad sobre un determinado carácter (Hirschhorn & Daly 2005). El uso de poblaciones naturales permite a su vez, que pueda ser simultáneamente evaluado un *pool* genético mucho mayor y más representativo y como la variación alélica y marcadores polimórficos son observados en mayor

frecuencia en el panel (comparado con poblaciones biparentales), pueden identificarse nuevos alelos asociados al carácter de interés. Por otra parte, debido a que los individuos que conforman el panel o colección difieren en innumerables caracteres, es posible estudiar simultáneamente una gran cantidad de características de interés y hasta utilizar datos fenotípicos históricos.

Por otro lado, uno de los principales inconvenientes en los estudios de mapeo asociativo es que determinados factores como la estructura poblacional o alelos que ocurren en muy baja frecuencia pueden generar DL entre loci que no están físicamente ligados, causando altas tasas de asociaciones marcador-carácter falsos positivos (Flint-Garcia *et al.*, 2005). A fin de evitar este inconveniente, se requiere una caracterización de los genotipos incluidos en la población de mapeo y la separación del DL debido a ligamiento físico de aquél generado por la estructura de la población (Tadesse *et al.*, 2014). Se han desarrollado varios métodos para cuantificar y tener en cuenta dicha estructura en los estudios de mapeo asociativo (Sukumaran & Yu, 2014). Uno de los más utilizados es el propuesto por Pritchard *et al.* (2000), el cual estima la estructura poblacional (Q) a partir de un set de marcadores distribuidos sobre todo el genoma, incorporándola como covariable en un modelo lineal general en el análisis de asociación. Este enfoque fue posteriormente ampliado a través de un modelo lineal mixto, en el cual adicionalmente se incluyen las relaciones de parentesco o “*kinship matrix*” (K), lo cual ofrece un mejor control de ambos tipos de errores (I y II) (Yu *et al.*, 2006). Dependiendo de la escala de investigación, el mapeo asociativo puede ser clasificado en estudios de genes candidatos o estudios de asociación de todo el genoma (Zhu *et al.*, 2008). Estos últimos se han comenzado a utilizar recientemente en cereales, debido a la imposibilidad previa de genotipar un gran número de genotipos con la cantidad de marcadores requeridos. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de alto rendimiento tales como la tecnología de matrices de diversidad (DArT) (Jaccoud *et al.*, 2001) ha permitido superar tales dificultades, ya que proporciona una plataforma múltiple, lo que permite la genotipificación rápida y rentable de todo el genoma (Wenzel *et al.*, 2004). Así, este enfoque ha sido recientemente utilizado con éxito en numerosas especies de plantas para identificar marcadores asociados con diferentes rasgos agrónomicamente útiles, así como en el descubrimiento de su base genética (Zhu *et al.*, 2008).

## 2. Hipótesis

En base a los antecedentes mencionados, se plantearon las siguientes hipótesis:

- La existencia de variabilidad fenotípica en la resistencia a los patógenos *P. tritici-repentis* y *P. teres*, en una población internacional de 110 genotipos de trigo, presenta un componente genético, por lo que es posible localizar QTL que los determinan a través de mapeo por asociación.
- La acumulación de dos a más alelos significativamente asociados con la resistencia a enfermedades fúngicas en un mismo genotipo, presenta efectos aditivos y significativos sobre la misma.

## 3. Objetivos

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar la resistencia a dos aislamientos de *P. teres* y dos de *P. tritici-repentis* en una población internacional de 110 genotipos de trigo y localizar QTL que otorguen resistencia a dichos aislamientos.
- Detectar genotipos de trigo que posean QTL con efecto aditivo que otorguen resistencia a los patógenos investigados, para luego ser utilizados en futuros planes de mejoramiento.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Aislamientos del hongo

Se utilizaron dos aislamientos de *P. tritici-repentis* obtenidos de dos localidades de Argentina, Los Hornos (H017) y Gualaguaychú (G0327) y dos aislamientos de *P. teres* (Dt1 y Dt2) ya descritos en los capítulos anteriores. Los aislamientos de *P. tritici-repentis* fueron previamente caracterizados por Jecke (2015). El conjunto de diferenciales (i.e. líneas que difieren en resistencia frente a un set de aislamientos) de trigo fue propuesto por Andrie *et al.* (2007) y Ali *et al.* (2010) con las líneas Glenlea, Katepwa, 6B365, 6B662, Salamouni y M3. Se agregaron los diferenciales Coulter, Erik y 4B-160 utilizados en otros trabajos de investigación (Benslimane *et al.*, 2011; Lamari *et al.*, 2003). El aislamiento H017 ya fue caracterizado en el capítulo 2. El aislamiento G0327 se caracteriza por una reacción de necrosis y clorosis en Katepwa y 4B-160, de

clorosis en 6B-662, 6B-365 y Coulter, de necrosis en Glenlea y Salomouni y de resistencia en el resto de las líneas. La reacción de necrosis en Glenlea y Katepwa indicaría la presencia de la toxina A; la clorosis en 6B-662 y Katepwa indicaría la presencia de la toxina B y la reacción de clorosis en 6B-365 la presencia de toxina C. A su vez Jecke (2015) realizó un análisis molecular donde el aislamiento G0327 se caracterizó por la presencia del gen *TOX A* y *TOX B1*. Estos autores concluyeron que no hubo coincidencias entre la caracterización fenotípica y genotípica. El aislamiento G0327 es el que más correspondencia tuvo entre ambos tipos de caracterizaciones. Causó necrosis en Glenlea y Katepwa lo que concuerda con la presencia del gen *Tox A* y clorosis en Katepwa y 6B662 debido, probablemente, al gen *Tox B1*. Este aislamiento comparte algunas características de tipo de reacción de la raza 8 excepto por la presencia de necrosis en Salomouni (Jecke, 2015) (Tabla 4.1). En base a estos estudios, las razas utilizadas de *P. tritici-repentis* en este trabajo no se corresponderían a las razas internacionalmente conocidas.

**Tabla 4.1.** Tipo de reacción de nueve líneas diferenciales de trigo usando dos aislamientos de *P. tritici repentis*

Aislamiento	Síntomas en las líneas diferenciales					Synthetic M3	4B-160	Coulter	Erik
	Glenlea	Katepwa	6B662	6B365	Salomouni				
H017	N Cl	R	R	Cl	N Cl	R	N	N Cl	R
G0327	N	N Cl	Cl	Cl	N	R	N Cl	Cl	R

Referencias: N= Necrosis; Cl= Clorosis; R= Resistente.

## 4.2. Material vegetal

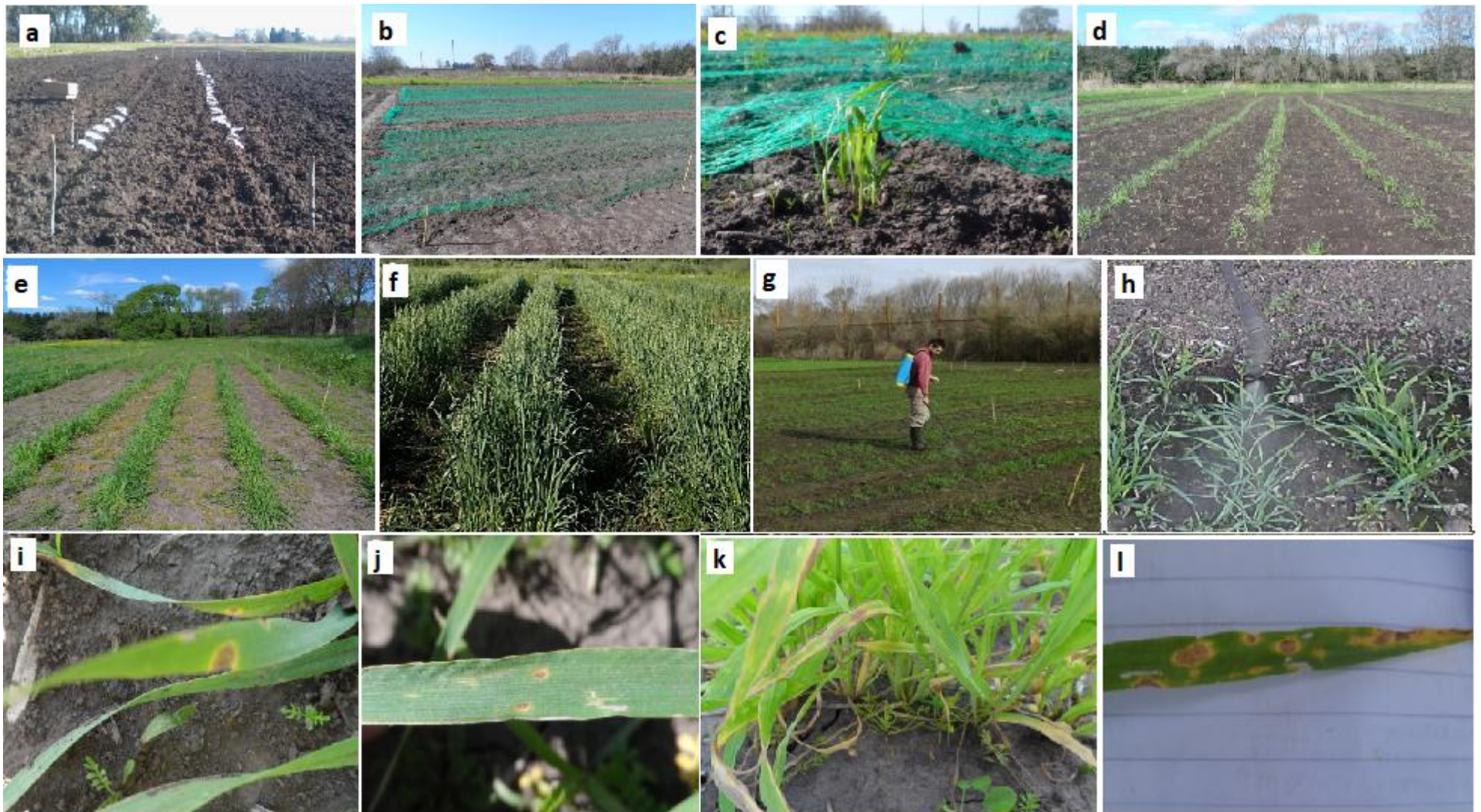
Se utilizó una población de 110 genotipos de trigos primaverales originarios de 27 países de todo el mundo, creada para mapeo asociativo y proporcionada por el Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) de Alemania. La población comprendió 57 genotipos provenientes de Europa, 30 de Asia, diez de América del Norte y América del Sur y uno de Australia; dos genotipos eran de origen desconocido (Tabla 4. 2).

**Tabla 4.2.** Variedades botánicas de *T. aestivum* con su país de origen.

Nro	Variedad botánica	Origen	Nro	Variedad botánica	Origen
1	lutescens	EUA	56	Lutescens	CHL
2	lutescens	CHN	57	Leucospermun	CHL
3	suberythrospemun	NPL	58	Milturum	ITA
4	milturum	IND	59	graecun	AUS
5	aestivum	IND	60	aestivum	EUA
6	meridionale	AFG	61	ferrugineum	EUA
7	lutescens	NPL	62	lutescens	SUE
8	milturum	POR	63	lutescens	SUE
9	lutescens	EUA	64	ferrugineum	SUE
10	ferrugineum	ALE	65	aestivum	FRA
11	lutescens	NZE	66	ferrugineum	ARG
12	unknown	NPL	67	ferrugineum	ARG
13	lutescens	POR	68	ferrugineum	EUA
14	lutescens	REU	69	ferrugineum	ESP
15	lutescens	POR	70	aestivum	ALE
16	ferrugineum	POR	71	aestivum	REU
17	lutescens	URU	72	aestivum	BUL
18	aestivum	IND	73	aestivum	ESP
19	lutescens	CAN	74	ferrugineum	SUE
20	lutescens	CAN	75	aestivum	EUA
21	lutescens	ALE	76	submeridionale	IRN
22	ferrugineum	POR	77	aureum	IRN
23	ferrugineum	FRA	78	aestivum	IRN
24	milturum	POR	79	aestivum	IRN
25	milturum	ITA	80	delfii	IRN
26	ferrugineum	ITA	81	graecun	IRN
27	aureum	FRA	82	graecun	IRN
28	aestivum	URU	83	aestivum	IRN
29	aestivum	URU	84	aestivum	MEX
30	pyrothrix	CHN	85	aestivum	BRA
31	subhostianum	CHN	86	aestivum	JAP
32	unknown	NPL	87	variable	CHN
33	nigricans	NPL	88	hostianum	CHN
34	pyrothrix	IND	89	leucospermun	CHN
35	aestivum	ITA	90	aestivum	CHP
36	ferrugineum	CAN	91	murinumcompactoides	CHP
37	lutescens	CHN	92	murinumcompactoides	CHP
38	villosum	IND	93	aestivum	CHP
39	ferrugineum	POR	94	murinumcompactoides	CHP
40	fulvocinereumcompactoides	AFG	95	aestivum	GRE
41	ferrugineum	AFG	96	ferrugineum	GRE
42	aureum	ITA	97	aestivum	GRE
43	aestivum	ITA	98	ferrugineum	GRE
44	aestivum	ITA	99	(population)	DES
45	milturum	ITA	100	lutescens	GRE
46	milturum	ITA	101	lutescens	GRE
47	aestivum	ITA	102	aestivum	GRE
48	aestivum	ITA	103	(population)	DES
49	aestivum	ITA	104	aestivum	GRE
50	aestivum	ITA	105	lutescens	GRE
51	ferrugineum	ITA	106	aestivum	GRE
52	aestivum	ITA	107	lutescens	GRE
53	melanopogon	RUS	108	aestivum	GRE
54	aestivum	AUS	109	lutescens	EUA
55	milturum	CHL	110	lutescens	ALE

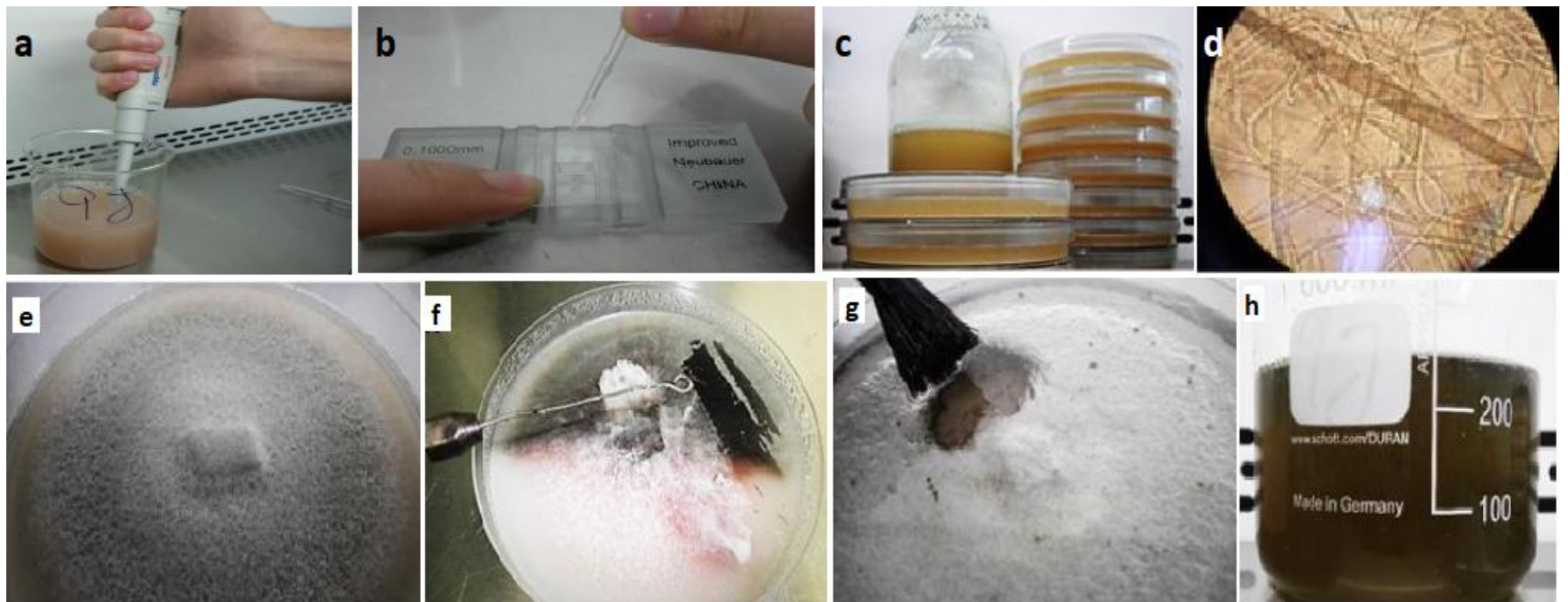
**Referencias:** EUA (Estados Unidos), CHN (China), NPL (Nepal), IND (India), AFG (Afganistán), POR (Portugal), ALE (Alemania), NZE (Nueva Zelanda), REU (Reino Unido), URU (Uruguay), CAN (Canadá), FRA (Francia), ITA (Italia), RUS (Rusia), AUS (Austria), CHL (Chile), SUE (Suecia), ARG (Argentina), ESP (España), BUL (Bulgaria), IRN (Irán), MEX (México), BRA (Brasil), JAP (Japón), CHP (Chipre), GRE (Grecia), DES (desconocido).





**Figura 4.1.** Ensayo a campo. Suelo preparado para la siembra (a), Colocación de redes para evitar daños por pájaros (b). Progresión fenotípica de los genotipos (c, d, e, f). Proceso de inoculación (g, h) Síntomas de la enfermedad (i, j, k, l).





**Figura 4.2.** Preparación del inóculo. Preparación de las diluciones (a), carga de la cámara de Neubauer (b). Cajas de Petri y medio de cultivo (c). Conidio de *D. tritici-repentis* (d). Colonia de *D. tritici-repentis* (e). Raspado del micelio del hongo con ansa (f, g). Suspensión concentrada antes de la dilución (h).

### **4.3. Diseño experimental**

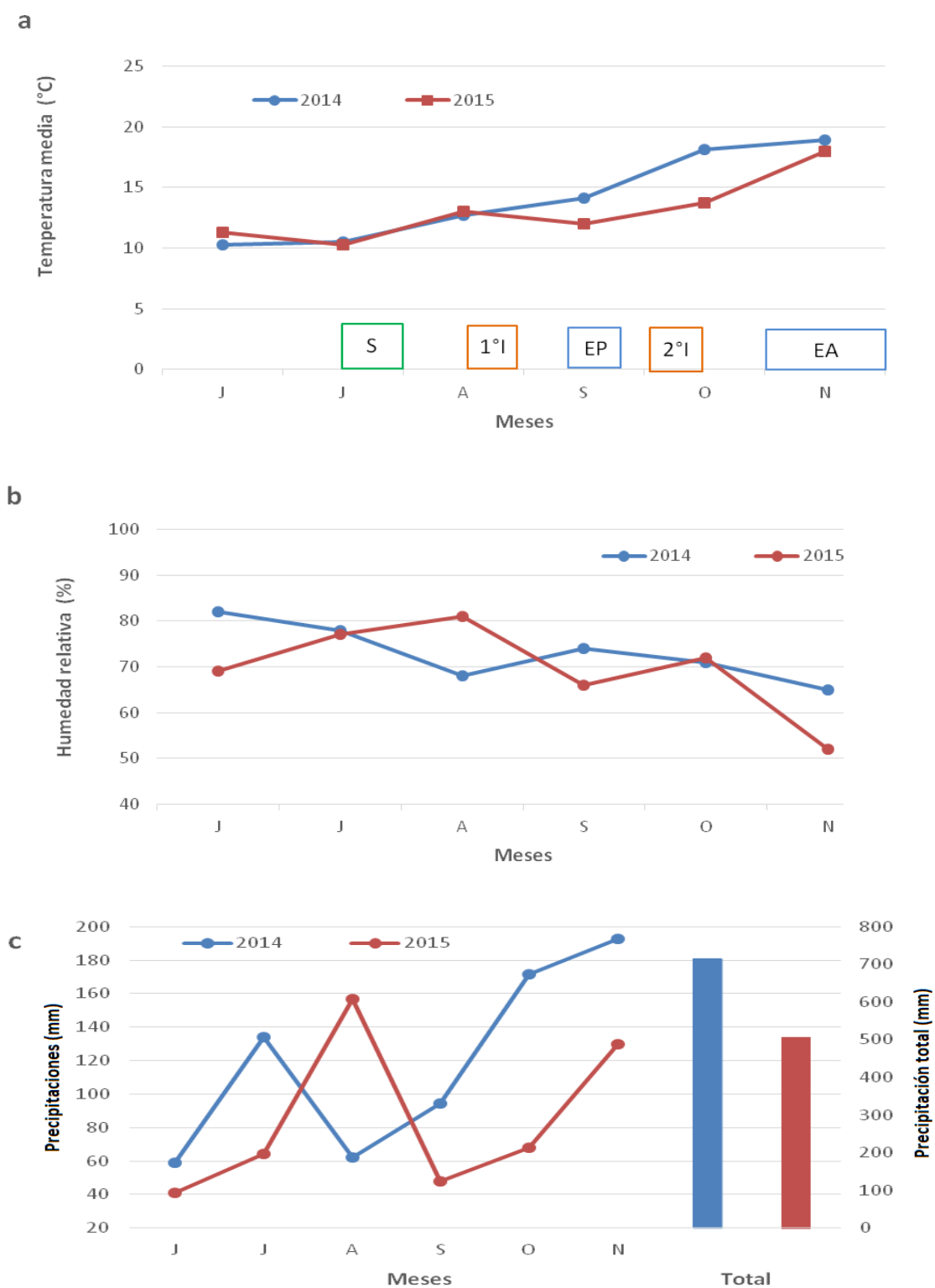
Se sembraron dos experimentos a campo el 30 de julio de 2014 y el 15 de julio de 2015 en la Estación Experimental J. Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestal (UNLP), bajo un diseño de parcelas divididas con dos repeticiones. Las parcelas principales fueron los años (2014 y 2015) y las subparcelas fueron los aislamientos dentro de cada año. Las sub-subparcelas fueron una población de 110 genotipos de trigo. Se sembraron a mano de 20 a 25 semillas de cada genotipo en cada hilera (1 m) distanciadas a 0,2 m (densidad aproximada entre 150 a 200 plantas/m<sup>2</sup>) y separadas por una hilera de avena para reducir la interferencia entre parcelas. Toda la colección fue inoculada con dos aislamientos de *P. tritici-repentis* y dos de *P. teres*. El medio de cultivo utilizado fue caldo V8, que se esterilizó en autoclave y se vertió en placas de Petri bajo flujo laminar. Los cultivos se incubaron durante 15-21 días a 23 ° C +/- 2 °C en alternancia de luz y oscuridad siguiendo el protocolo sugerido por Raymond y Bockus (1982). El inóculo se preparó raspando asépticamente las colonias de esporulación con un bisturí y suspendiendo los conidios en agua desionizada. La suspensión conidial se ajustó a 3x10<sup>3</sup> esporas / ml usando una cámara de recuento Neubauer. Se añadió Tween 20 (polisorbato 20) a 0,5 ml / l como tensioactivo. En cada ensayo se realizaron dos inoculaciones durante el ciclo del cultivo: en el estado de plántula con dos hojas desplegadas (GS 12), y en pleno macollaje (GS 23) (Zadoks *et al.*, 1974). Las parcelas se dividieron en dos partes, la mitad de las plantas fueron inoculadas en estado de plántula y la otra mitad en estado adulto. Para ello, el material vegetal fue pulverizado con la suspensión de inóculo con una mochila de mano en horas del atardecer y a razón de 10 l / m<sup>2</sup> de ensayo. Después de la inoculación cada ensayo se pulverizó con agua varias veces al día durante 3 días, de manera de alcanzar la humedad necesaria para el desarrollo del proceso de infección.

### **4.4. Condiciones climáticas**

Los datos meteorológicos se registraron en una estación meteorológica situada a 300 m de los experimentos. Durante los meses de los ensayos (junio a noviembre), las tendencias de temperatura y humedad relativa fueron similares para ambos años (2014 y 2015) (Figuras 4.3.a.b). Por el contrario, las precipitaciones variaron considerablemente entre años. La precipitación total fue de 714 y 507 mm para 2014 y 2015, respectivamente, en comparación con la media regional de 444 mm para ese período. La diferencia más importante en la precipitación mensual entre años fue en



octubre, ya que las precipitaciones fueron mayores en 2014 (171,8 mm) en comparación con 2015 (67,8 mm) y por lo tanto más propicias para el desarrollo de la enfermedad (Fig. 4.3.c).



**Figura 4.3.** Datos climáticos. a. Temperatura media mensual y labores realizadas: S (siembra), 1ºI (Primera inoculación), EP (Evaluación plántula), 2ºI (Segunda inoculación), EA (Evaluación adulto). b. Humedad relativa mensual. c. Precipitaciones mensuales y Precipitación total del periodo.

## **4.5. Evaluaciones fenotípicas**

### **4.5.1. Estado de plántula**

A fin de estimar en estado de plántula la resistencia genética de los genotipos a caracterizar, se evaluó el porcentaje de severidad de la enfermedad en plántula (PSP) de la enfermedad 14 días después de la primera inoculación (todos los genotipos fueron evaluados en el mismo estadio fenológico y momento temporal). Dicha evaluación se realizó mediante la estimación visual del área cubierta por clorosis + necrosis en las tres hojas inferiores de siete plantas de cada genotipo para cada repetición. Las evaluaciones comenzaron cuando los síntomas de la enfermedad permitieron una clara diferenciación entre los genotipos. Una vez registrado el PSP de cada hoja, se calculó un promedio de las tres hojas y las siete plantas evaluadas.

### **4.5.2. Estado adulto**

Para estimar la resistencia genética en estado adulto, el porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) fue evaluado 21 días después de la aparición de la hoja bandera en cada genotipo. Esto se realizó con la finalidad de que el tiempo de exposición de dicha hoja a la enfermedad fuera el mismo en cada uno de ellos, evitando de esta forma sobre o subestimar los valores de severidad en función de mayores o menores tiempos de exposición experimentados por ciclos más cortos o más largos, respectivamente (todos los genotipos fueron evaluados al mismo estadio fenológico, pero en diferente momento temporal). La evaluación del PSA se realizó a través de la estimación visual del área cubierta por clorosis + necrosis sobre siete plantas de cada genotipo para cada replicación, pero en esta ocasión en las tres hojas superiores (HB, HB-1 y HB-2). Con los datos recopilados se realizó un promedio del PSA de las dos hojas superiores y las siete plantas evaluadas. Se excluyó del análisis la HB-2 debido a su avanzado estado de senescencia en la mayoría de los genotipos.

Otro dato recopilado fueron los días a espigazón (DAE) de cada genotipo, contando los días desde emergencia de la plántula hasta que al menos el 50% de la parcela (genotipo) estuvo en espigazón (GS 59). También se tomó la altura de la planta (ADP) de cada genotipo en anthesis (GS60), midiendo siete plantas de cada repetición desde la base de la planta hasta la punta de la espiga, sin contar las aristas. Luego se calculó la altura promedio de cada genotipo.

#### 4.6. Análisis de datos fenotípicos

Debido al desfase temporal en la evaluación de estado adulto entre genotipos, se realizó una regresión múltiple para observar la relación entre el PSA y los DAE y la ADP tomando como variable dependiente al PSA para cada aislamiento y cada año, y como variables independientes a los DAE y la ADP. Los datos en que la regresión fue significativa se corrigieron mediante la siguiente fórmula propuesta por Simón *et al.* (2014):

$$Y \text{ corr} = Y (\text{dato}) - b_1 \times (x_{1i} - X_1) - b_2 \times (x_{2i} - X_2)$$

donde Y corr es el PSA corregido, Y es el PSA evaluado, b1 es el coeficiente de regresión (pendiente de la recta) para DAE, X1 son los DAE promedio de todos los genotipos, b2 es el coeficiente de regresión para ADP y X2 es la ADP promedio de todos los genotipos.

Los datos fenotípicos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANVA) con el programa GenStat12th Edition 2009, después de la transformación mediante la raíz cuadrada de arcoseno de los promedios para normalizar la varianza residual. Los experimentos, aislamientos y genotipos se consideraron como efectos fijos, mientras que las repeticiones se consideraron como efectos aleatorios. Las medias se compararon usando la prueba LSD (P = 0,05). Además, los componentes de la varianza fenotípica y genotípica también se estimaron a partir del ANVA y la información se usó para calcular la heredabilidad en sentido amplio ( $h^2$ ) como la relación de la varianza genotípica y fenotípica:  $h^2 = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_{ge/E} + \sigma^2_{ER})$ , donde  $\sigma^2_g$  denota la varianza genotípica,  $\sigma^2_{ge}$  la varianza de la interacción genotipo  $\times$  ambiente y  $\sigma^2$  la varianza del error. E y R son la cantidad de ambientes (años) y repeticiones, respectivamente.

#### 4.7. Genotipado y estructura poblacional.

El panel de mapeo fue genotipado con marcadores DArT. La tecnología DArT se basa en hibridaciones que detectan la presencia versus la ausencia de fragmentos individuales. Esta tecnología fue proporcionada por Triticarte Pty Ltd (Canberra, Australia; <http://www.triticarte.com.au>), un laboratorio de servicio de genotipificación de todo el genoma.

Se utilizó un total de 2836 marcadores DArT polimórficos denominados a través del prefijo “wPt” seguido por un identificador numérico. Aquellos con una frecuencia alélica < 5 % fueron excluidos del análisis, removiéndose así algunos marcadores, quedando un total de 2134.

A fin de evitar falsos positivos en el análisis de asociación marcador-carácter, se determinó la estructura genética de la colección de mapeo, utilizando el software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). La metodología de análisis propuesta por Pritchard *et al.* (2000) asume que los individuos dentro de la colección son una mezcla que proviene de K poblaciones y que el genoma de cada genotipo puede estar conformado por una o más de tales poblaciones. Se estimó el número más probable de sub-poblaciones presentes en la colección siguiendo el método de Evanno *et al.* (2005), en el cual el número de sub-grupos es maximizado. Los genotipos fueron incluidos en el grupo donde presentaron una probabilidad de pertenencia mayor a 0,5.

#### **4.8. Análisis de la asociación marcador-carácter (AMC).**

En el análisis de asociación cada experimento fue analizado por separado y el valor fenotípico de cada carácter correspondió al valor medio de sus dos repeticiones. Las asociaciones entre marcadores y rasgos fenotípicos se realizaron con el software TASSEL 2.01, utilizando en principio un modelo lineal general basado en la matriz Q (MLG-Q) derivada del STRUCTURE, la que fue introducida en el modelo como co-variable a fin de evitar falsos positivos debido a la presencia de estructura en la población de mapeo. Adicionalmente, utilizando la versión 2.1 de TASSEL se implementó el modelo lineal mixto sugerido por Yu *et al.* (2006), el cual utiliza tanto la matriz Q como la matriz de parentesco K (MLM-Q+K) en el siguiente modelo:  $y = X\beta + Qu + Zu + e$  donde  $y$  es el vector de observaciones fenotípicas,  $X$  es una matriz de datos genotípicos como efecto fijo,  $Q$  es la matriz de estructura como efecto fijo y  $Z$  la matriz de parentesco como efecto aleatorio.

Se utilizó el método EMMA (*Efficient Mixed-Model Association*), propuesto por Kang *et al.* (2008) para reducir el tiempo computacional requerido, mientras que los demás parámetros del MLM fueron dejados predeterminados por TASSEL. En todos los caracteres evaluados, se consideró como asociaciones marcador-carácter significativa cuando presentaron valores de  $P < 0,05$  en los dos experimentos analizados (años) y bajo los dos modelos utilizados (MLG y MLM). El mapa genético mostrando marcadores y/o regiones cromosómicas asociadas con cada rasgo evaluado fue realizado con el software MapChart versión 2.3 (Voorrips, 2002). Para visualizar la presencia de ligamientos entre rasgos, se presenta la distancia genética en cM.

## 5. Resultados

### 5.1. Análisis de los datos fenotípicos

#### 5.1.1. Días a espigazón (DAE) y altura de planta (ADP).

Los DAE variaron entre años, siendo mayores en el año 2015 debido a la siembra más temprana en este año, en cambio la ADP no presentó diferencias entre años. Los genotipos presentaron una alta variabilidad en los DAE, observándose para el año 2014 ciclos muy cortos de 72 DAE y ciclos largos de 108 DAE, y en 2015 ciclos de 90 a 121 DAE (Figura 4.4). La ADP también fue variable entre los genotipos, existiendo genotipos bajos de unos 70 cm y otros muy altos de 160 cm (Figura 4.5).

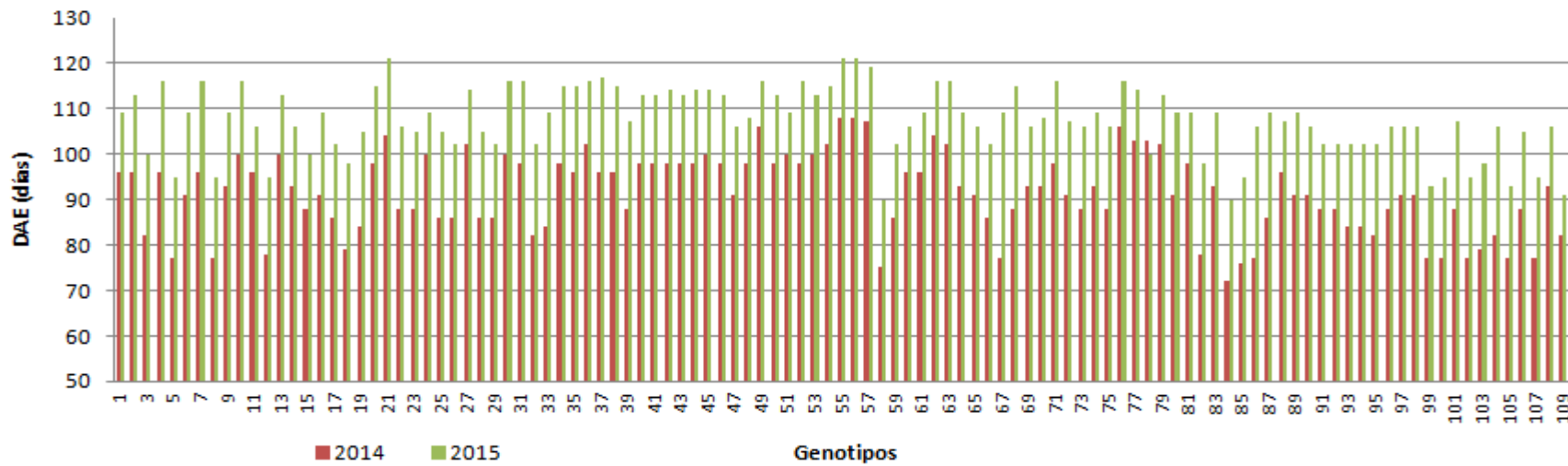
#### 5.1.2. Porcentaje de severidad

El análisis de la varianza para las variables PSP y PSA arrojó los siguientes resultados:

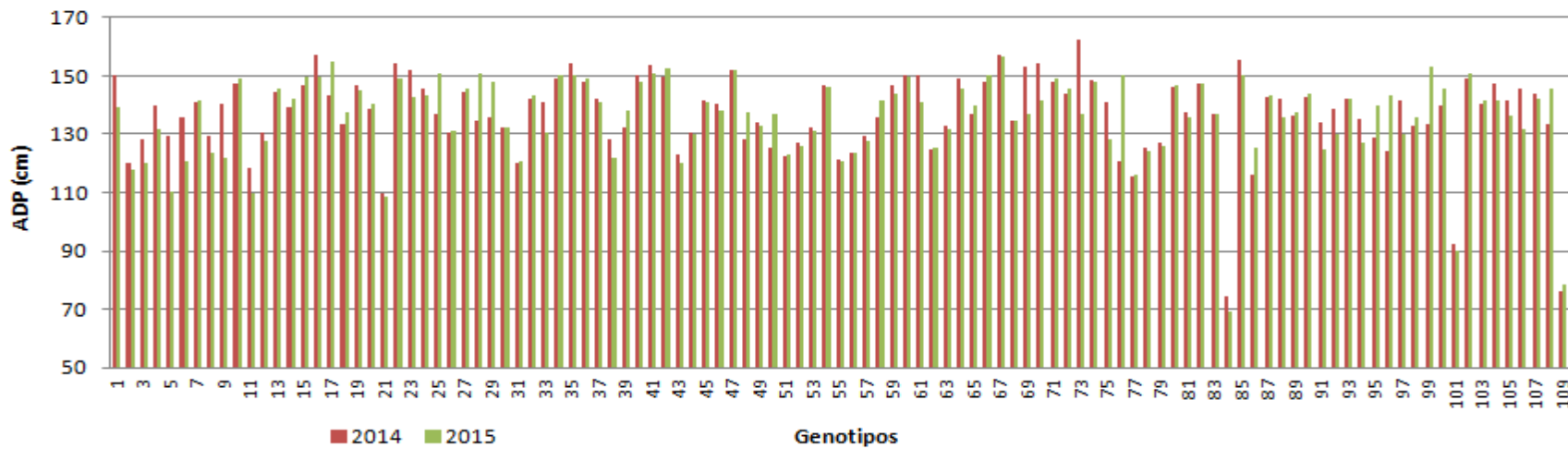
**Tabla 4.3.** Cuadrados medios de los promedios transformados de las variables porcentaje de severidad en plántula (PSP) y adulto (PSA), causado por dos aislamientos de *P. tritici repentis* y dos de *P. teres* en una colección de 110 genotipos de trigo.

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	CUADRADO MEDIO	
		PSP	PSA
AMBIENTE (año)	1	28,695 *	3,615 *
ERROR A	1	0,049	0,226
AISLAMIENTO	3	1,849 *	0,298 *
AMBIENTE × AISLAMIENTO	3	0,192	0,235 *
ERROR B	6	0,208	0,031
GENOTIPO	109	0,112 ***	0,810 ***
AMBIENTE × GENOTIPO	109	0,042 ***	0,064 ***
AISLAMIENTO × GENOTIPO	327	0,020	0,015 ***
AMBIENTE × AISLAMIENTO × GENOTIPO	327	0,021	0,018 ***
ERROR C	872	0,022	0,009
TOTAL	1759		

\* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001



**Figura 4.4.** Días a espigazón (DAE) de los 110 genotipos de trigo utilizados en los ensayos.



**Figura 4.5.** Altura de planta (ADP) en cm de los 110 genotipos de trigo utilizados en los ensayos

### 5.1.2.1. Estado de plántula

Al realizar el ANVA de la variable PSP se encontraron diferencias significativas para los tres factores evaluados, ambiente (año), aislamiento y genotipo. En cuanto a las interacciones solo fue significativa la interacción ambiente × genotipo. La heredabilidad para el PSP fue de 0,81 (Tabla 4.3)

Se observó mayor promedio de PSP en el año 2014 (36 %) en comparación con el año 2015 (15 %) (Figura 4.6.a). En cuanto a los aislamientos utilizados, el aislamiento Dt2 presentó mayores valores de PSP, observándose una diferencia significativa con los otros tres aislamientos (Figura 4.6.b).



**Figura 4.6.** a. Porcentaje de severidad de la enfermedad en plántula (PSP) en dos años, promedio de cuatro aislamientos fúngicos y 110 genotipos de trigo utilizados. b. PSP de los cuatro aislamientos, promedio de dos años y 110 genotipos.

Existió una alta variabilidad en el PSP de los genotipos evaluados, el rango de PSP promedio osciló entre 8,2 y 47,2 %. El genotipo que se destacó sobre el resto fue el 8, aunque también presentaron valores bajos de PSP los genotipos 24, 47, 5 y 58. Los genotipos que presentaron los mayores valores de PSP fueron el 88, 89, 17 y 75 (Figura 4.7).

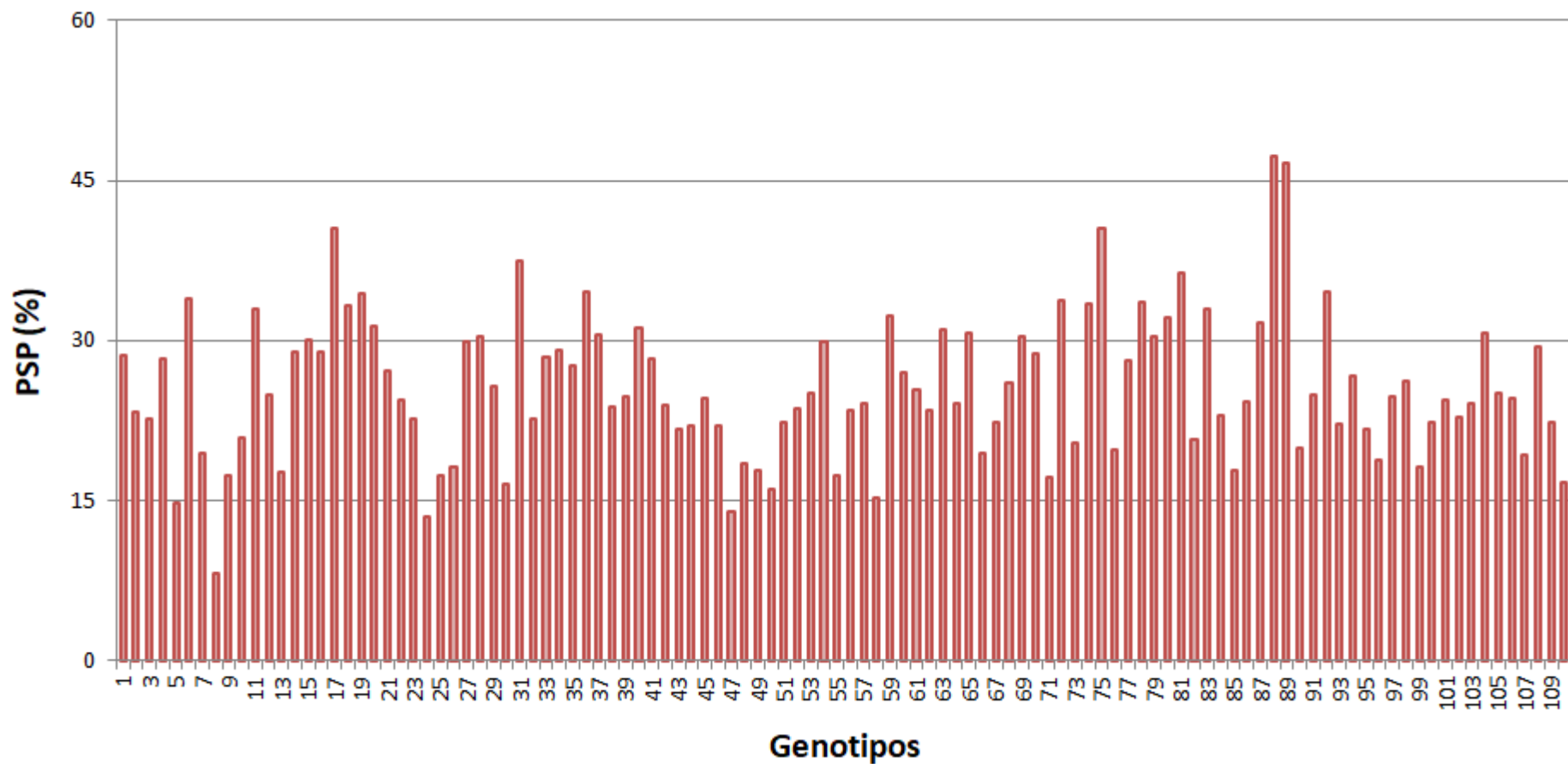
Al observar la interacción que existió entre los genotipos y los años, se observó que la mayoría de los genotipos presentaron mayores PSP en el año 2014 en comparación con el 2015. El rango de PSP en el año 2014 osciló entre 6,5% y 65%, mientras que en 2015 fue entre 4% y 31%. Con el objetivo de facilitar la comprensión de los datos y con fines agronómicos se consideraron diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad, teniendo en cuenta los valores generales y el valor de LSD (0,05%).

Debido a la diferencia entre ambientes se consideraron diferentes rangos cada año. Para el 2014, los genotipos con PSP menor a 20% se consideraron resistentes (R), los que superaron el 50% de PSP como susceptibles (S) y los genotipos con PSP entre 20-50% se consideraron moderadamente resistentes (MR) o moderadamente susceptibles (MS). Mientras que para el 2015 los rangos fueron: menor a 15% = R, entre 15 y menor a 20% = MR o MS y mayor o igual a 20% = S.

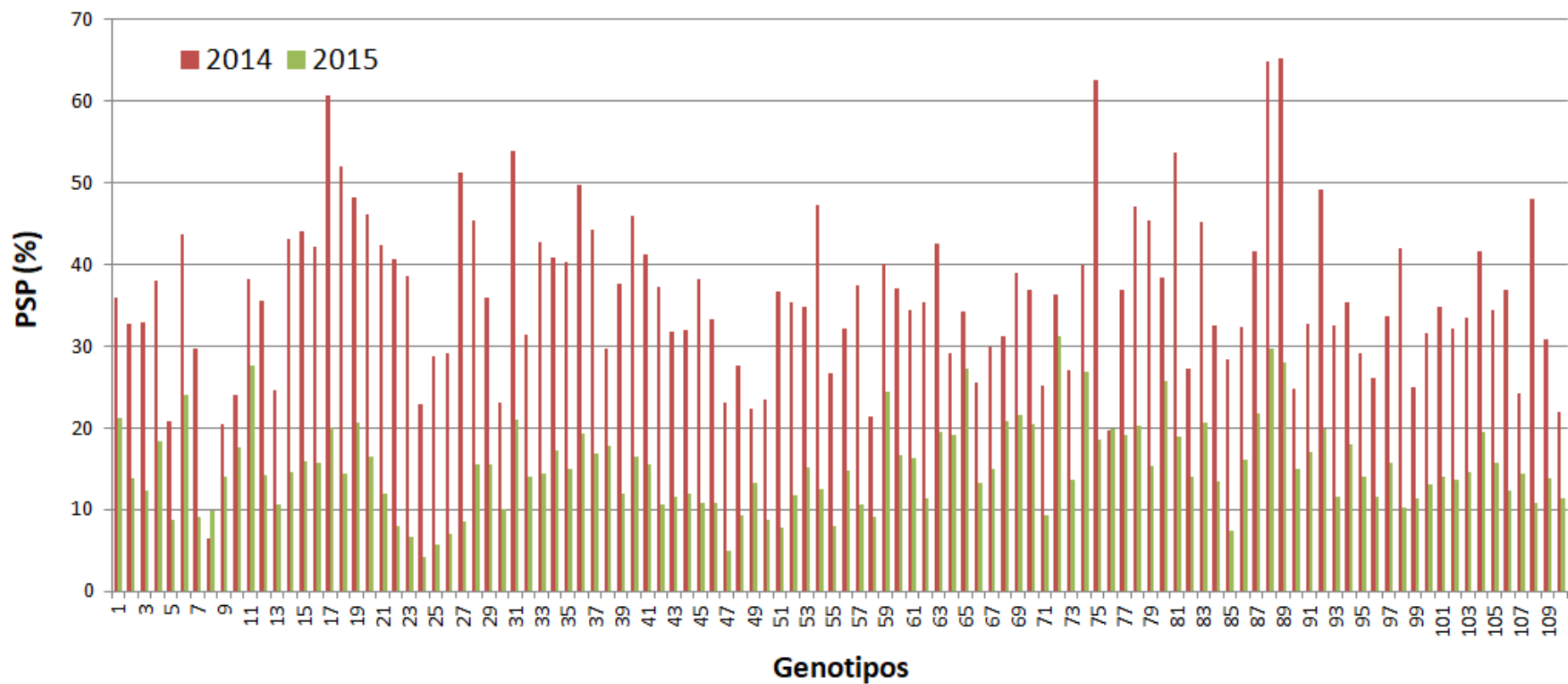
El genotipo más destacado fue el 8, que se comportó como R en ambos años. El genotipo 76 se comportó como R en 2014 y MR o MS en 2015. Los genotipos 17, 31, 88 y 89 fueron S en ambos años. Los genotipos 18 y 27 se comportaron como S en 2014, mientras que en 2015 fueron R (Figura 4.8).

Como se puede observar en la Figura 4.9 en el año 2014 sólo hubo dos genotipos R mientras que en 2015 hubo 60 genotipos. Mientras que S hay ocho en 2014 y 19 en 2015. El resto de los genotipos se comportaron como MR o MS.

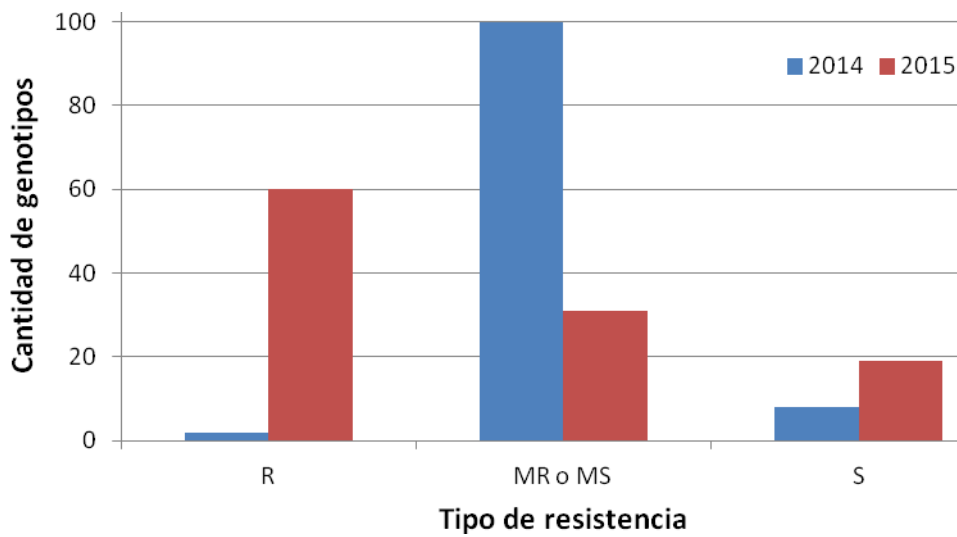




**Figura 4.7.** Porcentaje de severidad en plántula (PSP) de los 110 genotipos de trigo utilizados, promedio de los dos años y los cuatro aislamientos.



**Figura 4.8.** Porcentaje de severidad en plántula (PSP) de los 110 genotipos de trigo en los dos años, promedio de los cuatro aislamientos utilizados en los ensayos.



**Figura 4.9.** Frecuencia de genotipos en los diferentes rangos de severidad en plántula (tipos de resistencia), en los dos años de ensayo.

#### 5.1.2.2. Estado adulto

En los análisis de regresión entre PSA con DAE y ADP se observó que hay una correlación altamente significativa y positiva entre PSA y DAE para todos los aislamientos en ambos años, mientras que entre PSA y ADP no ocurrió lo mismo, siendo sólo significativo en el aislamiento H017 en 2015 (Tabla 4.4). Por este motivo los datos de PSA se corrigieron sólo teniendo en cuenta la regresión con DAE. Por lo tanto para la corrección se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Simón *et al.* (2004):

$$PSAc = PSA - b \times (DAE - DAE \text{ prom})$$

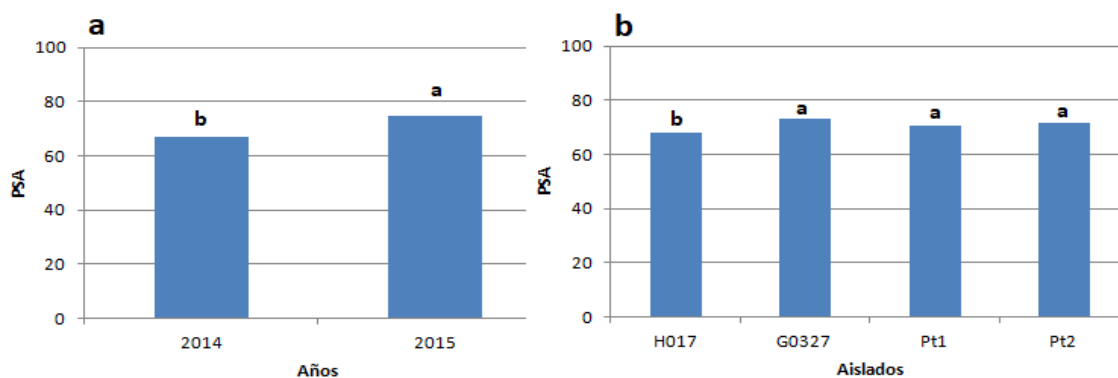
donde PSAC es el PSA corregido para determinado genotipo, PSA es el PSA evaluado para ese genotipo, b es el coeficiente de regresión (pendiente de la recta) para DAE, DAE es los DAE del genotipo y DAE prom es el DAE promedio de todos los genotipos. Por lo tanto los genotipos que poseían mayor DAE que el DAE promedio, su PSA evaluado fue reducido, y viceversa.

**Tabla 4.4.** P valor y coeficiente de regresión (b) en las regresiones de PSA con DAE y ADP

		H017		G0327		Dt1		Dt2	
		2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
DAE	P valor	3,69E-7	7,05E-18	2,39E-10	3,78E-12	3,59E-9	2,87E-13	1,14E-8	6,61E-10
	b (pendiente)	0,936	1,711	1,040	1,300	1,020	1,356	1,043	1,078
ADP	P valor	0,884	0,033	0,989	0,168	0,448	0,446	0,675	0,058
	b (pendiente)	-0,016	-0,226	0,001	-0,134	-0,082	-0,074	0,048	-0,170

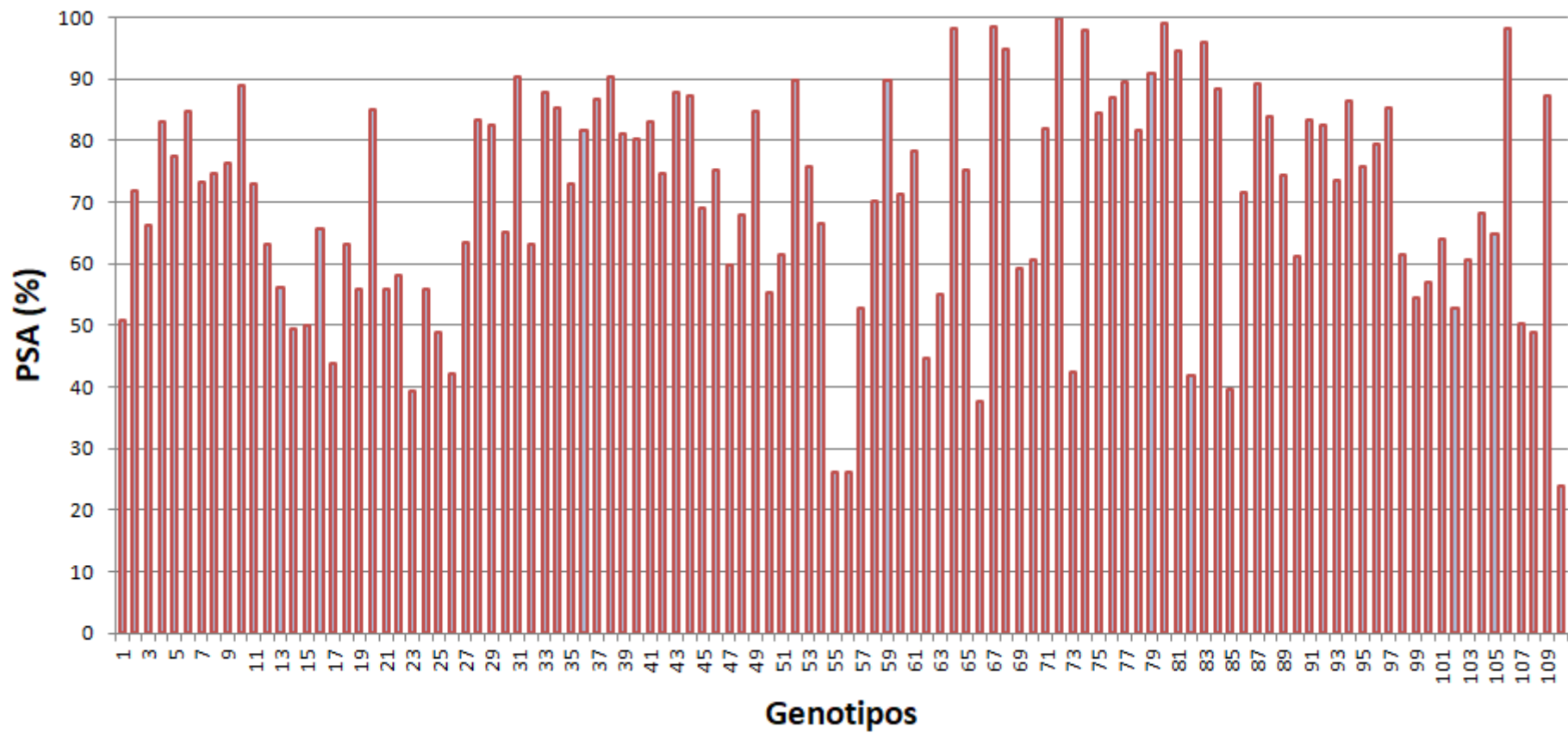
Los valores de PSA corregidos por DAE se analizaron mediante un ANVA y se observó que los tres factores, ambiente (año), aislamiento y genotipos fueron significativos, como así también las interacciones dobles y la interacción triple ambiente × aislamiento × genotipo (Tabla 4.3). La heredabilidad para el PSA fue de 0,96.

Al analizar el factor ambiente (años) se observó un mayor PSA en el año 2015 (74,7%) en comparación con el 2014 (67,1 %) (Figura 4.10.a). En cuanto a los aislamientos utilizados, el aislamiento H017 difirió significativamente de los otros tres aislamientos, siendo el menos agresivo, con un PSA promedio de 68,1 % (Figura 4.10.b).



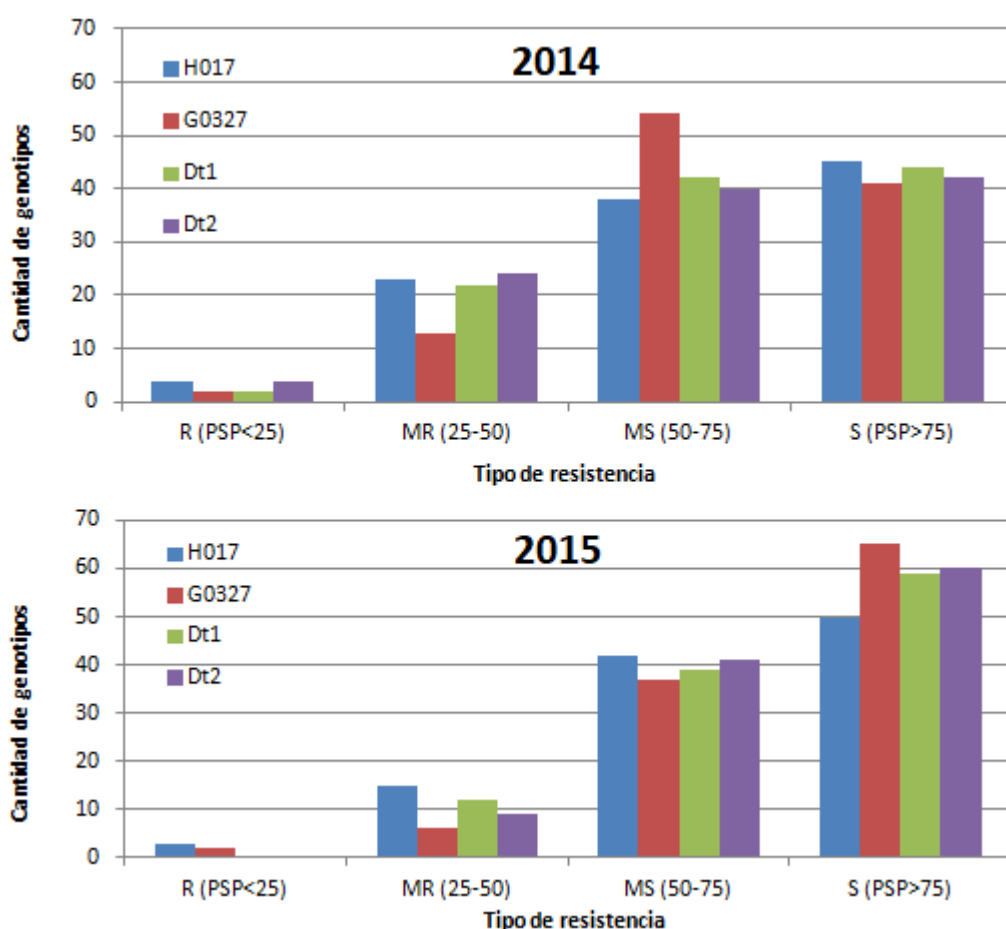
**Figura 4.10.** a. Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) en dos años, promedio de los cuatro aislamientos fúngicos y los 110 genotipos de trigo utilizados en los ensayos. b. PSA de los cuatro aislamientos, promedio de dos años y 110 genotipos.

Como se observa en la Figura 4.11 se encontró una alta variabilidad en los PSA de los genotipos, el rango osciló entre 23,8 % y 99,8 %. Los genotipos que presentaron menores valores (< 30%) de PSA promedio fueron el 55, 56 y 110. Mientras que los genotipos 64, 67, 68, 72, 74, 79, 80, 81, 83 y 106 fueron los de mayores PSA (>90%).

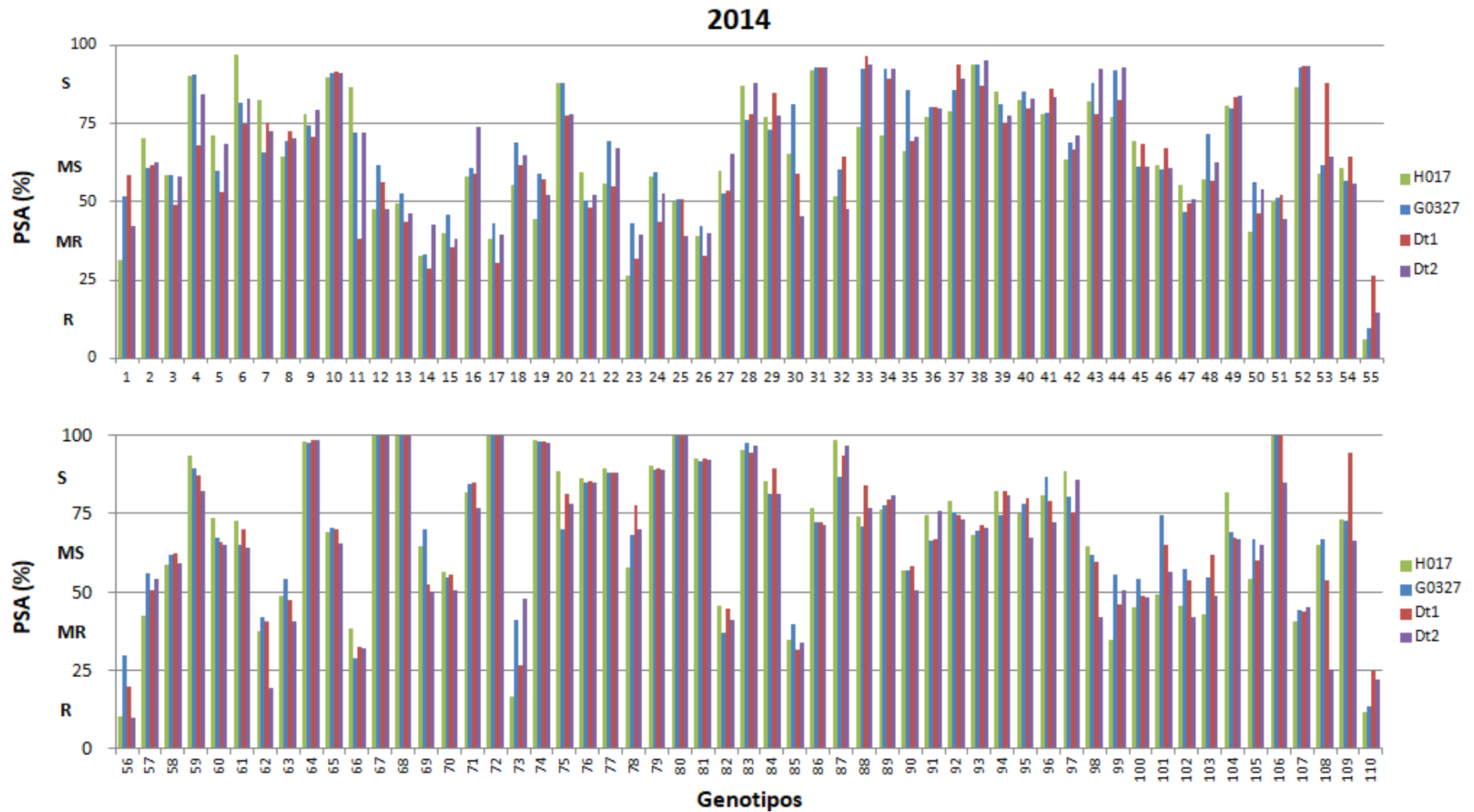


**Figura 4.11.** Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) de los 110 genotipos de trigo utilizados en los ensayos, promedio de los dos años y los cuatro aislamientos.

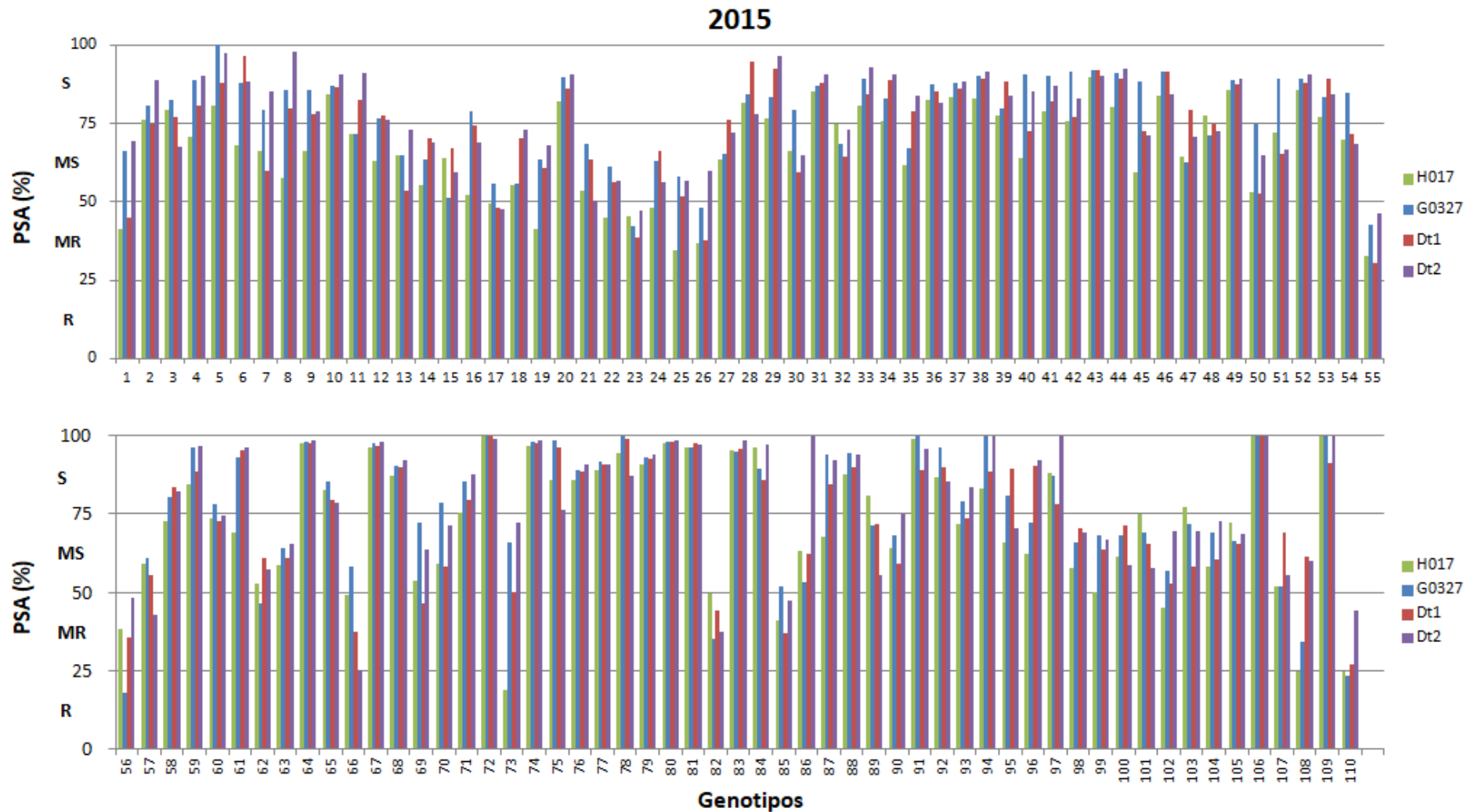
En la interacción triple ambiente × aislamiento × genotipo, al igual que en el estado de plántula se establecieron diferentes niveles de resistencia. En este caso para ambos ambientes quedaron establecidos los mismos límites: menor a 25% de PSA, los cultivares resistentes (R); entre 25% y menor a 50%, moderadamente resistentes (MR), entre 50 % y menor a 75% moderadamente susceptibles (MS) y mayor o igual a 75% de PSP los cultivares susceptibles (S) (Figura 4.12). Un 64,5% (71 genotipos) de los genotipos evaluados se comportaron como S o MS frente a los aislamientos en ambos años (Figura 4.12). El genotipo 110 se destacó por comportarse R frente a los dos aislamientos de *P. tritici-repentis* en ambos años, mientras que frente a los aislamientos de *P. teres* se mostró R en 2014 y MR en 2015. Los genotipos 23, 55, 56 y 82 se comportaron como R o MR frente a los cuatro aislamientos en ambos años. El genotipo 66 presentó una mejor resistencia frente a los aislamientos de *P. teres*, mientras que los genotipos 73 y 110 mostraron mejor comportamiento frente a los aislamientos de *P. tritici-repentis* (Figura 4.13a, Figura 4.13b).



**Figura 4.12.** Frecuencia de genotipos en los diferentes rangos de severidad en estado adulto (tipos de resistencia), en dos años y frente a los cuatro aislamientos.



**Figura 4.13a.** Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) de los 110 genotipos de trigo frente a los cuatro aislamientos utilizados (H017, G0327, Dt1 y Dt2) en el año 2014. Cultivares resistentes (R); moderadamente resistentes (MR), moderadamente susceptibles (MS) y cultivares susceptibles (S).



**Figura 4.13b.** Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) de los 110 genotipos de trigo frente a los cuatro aislamientos utilizados (H017, G0327, Dt1 y Dt2) en el año 2015. Cultivares resistentes (R); moderadamente resistentes (MR), moderadamente susceptibles (MS) y cultivares susceptibles (S).

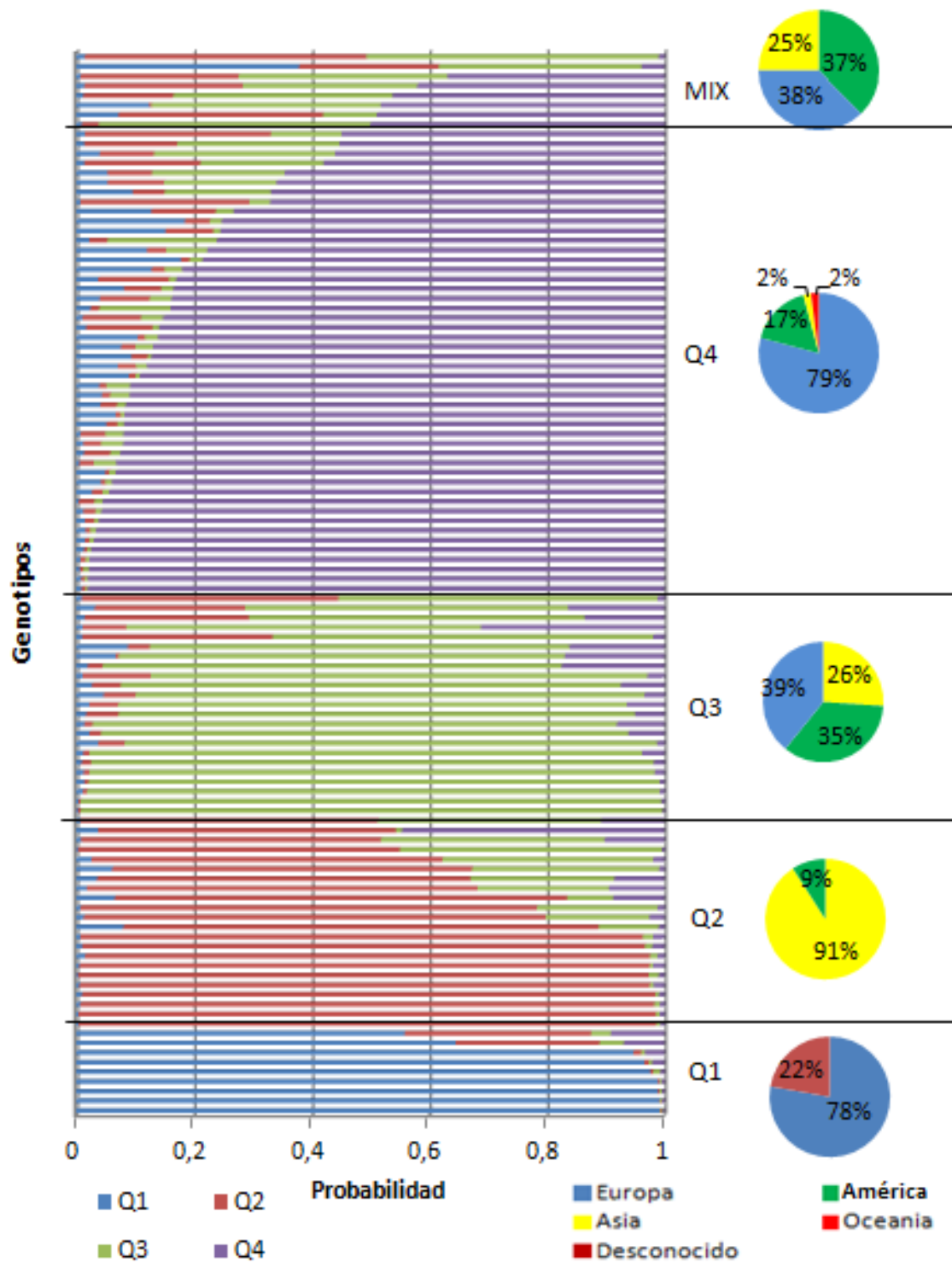


### 5.1.3. Estructura poblacional

De los 2134 marcadores DArT, 817 se ubicaron sobre el genoma A, 932 sobre el genoma B y 385 sobre el genoma D, cubriendo una distancia genética de 990,9, 1028,5 y 850,9 cM, respectivamente. Todos los cromosomas fueron cubiertos por marcadores, siendo los cromosomas 4D y 5D los que menos cantidad de marcadores presentaron, cuatro cada uno.

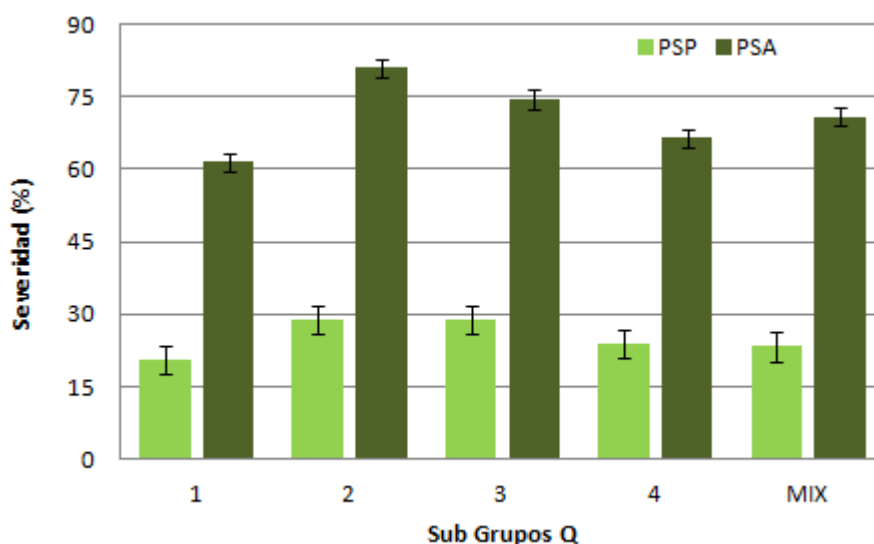
La presencia de estructuración en la población de mapeo puede ocasionar asociaciones erróneas, por lo que debe ser considerada en el análisis (Flint-García *et al.*, 2003). En este estudio, cuatro sub-grupos fueron identificados en la población de mapeo (Figura 4.14) y hubo un grupo de genotipos donde las proporciones de pertenencia a los sub-grupos fueron equilibradas y por lo tanto se incluyeron en un quinto subgrupo denominado MIX. La mayoría de los genotipos (48) en el análisis fueron asignados al sub-grupo 4 (Q4), en el cual el 79% de los genotipos provienen de Europa, 17% de América, 2% de Asia y 2% de Oceanía. El sub-grupo Q3 con 23 genotipos está integrado por un 39% de los mismos provenientes de Europa, un 35% de América y un 26% de Asia. El sub-grupo Q2 con 22 integrantes, la mayoría de Asia (91%) y solo dos genotipos (9%) de América. El sub-grupo Q1 con 9 genotipos todos originarios de Europa a excepción de 2 genotipos de origen desconocido. El sub-grupo MIX posee un 38% de genotipos Europeos, 37% de América y 25% de Asia.

El agrupamiento por estructura fue consistente con el origen y pedigrí de los genotipos, ya que por ejemplo en sub-grupo Q1 de los 9 genotipos, 5 son de Grecia; en el Q2 la mayoría son asiáticos y en el Q4 la mayoría son europeos con una alta participación de genotipos de Italia.



**Figura 4.14.** Estructura poblacional de 110 genotipos de trigo. A la izquierda, cada genotipo está representado por una barra coloreada, donde cada color representa la proporción de pertenencia del mismo a los grupos. A la derecha, gráfico de torta mostrando el origen por continentes de los genotipos pertenecientes a cada sub-grupo.

Al observar el comportamiento de cada sub-grupo de genotipos frente a la enfermedad se detectaron diferencias significativas entre los mismos. En el estado de plántula el grupo Q1 fue el que menor PSP presentó, difiriendo significativamente de los sub-grupos Q2 y Q3. Mientras que en estado adulto el sub-grupo Q1 también fue el que presentó menores valores de severidad difiriendo significativamente de los otros grupos (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Porcentaje de severidad en plántula (PSP) y adulto (PSA) para los sub-grupos de genotipos determinados por el programa STRUCTURE, promedio de dos años y cuatro aislamientos.

## 5.2. Asociación marcador-carácter (AMC)

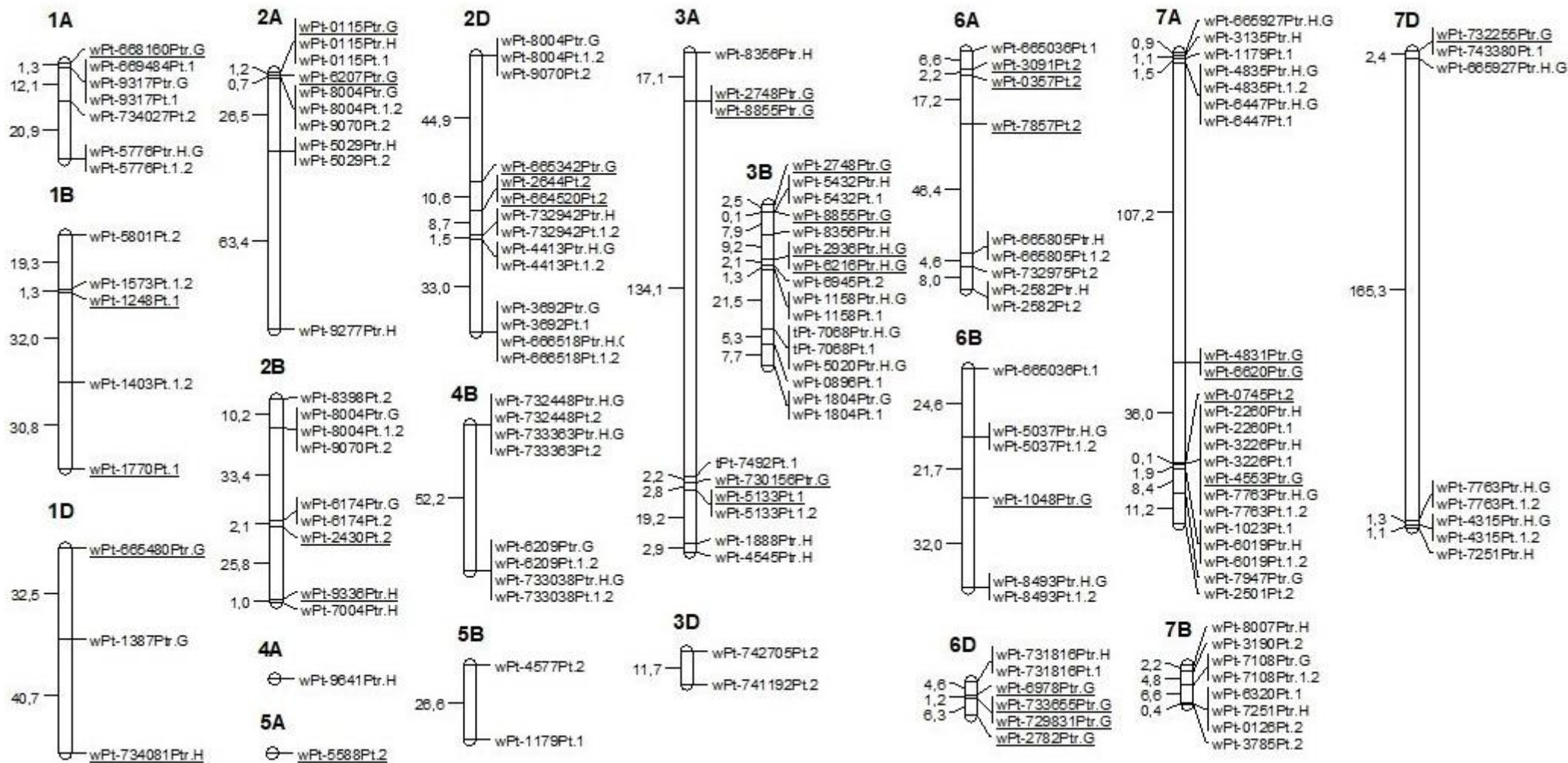
Asociaciones marcador carácter fueron consideradas significativas cuando presentaron valores de  $P < 0,05$  bajo los dos modelos utilizados (MLG y MLM). La consistencia a través de los dos experimentos, se consideró como criterio adicional para reducir el riesgo de incluir asociaciones falso positivas. Considerando todos los rasgos evaluados, se identificaron 187 asociaciones marcador-carácter (AMC) con 110 marcadores involucrados. Los marcadores asociados con la resistencia en plántula fueron diferentes de los marcadores asociados con la resistencia en estado adulto, a excepción de los marcadores wPt-0115 en el cromosoma 2A y wPt-5133 en el cromosoma 3A, que presentaron asociaciones en ambos estados de crecimiento.

En estado de plántula, se identificaron 36 AMC que implicaron 34 marcadores. Al analizar la resistencia frente a *P. tritici-repentis*, se encontraron dos marcadores asociados al aislamiento H017, 19 para el aislamiento G0327 y 2 para ambos aislamientos. En los aislamientos de *P. teres* se identificaron tres marcadores asociados al aislamiento Dt1 y ocho al aislamiento Dt2.

Los 34 marcadores correspondieron a regiones genéticas en los cromosomas 1A (uno), 1B (dos), 1D (dos), 2A (dos), 2B (dos), 2D (tres), 3A (cuatro), 3B (cuatro), 5A (uno), 6A (tres), 6B (uno), 6D (cuatro), 7A (cuatro) y 7D (uno) (Figura 4.16).

En la etapa adulta se identificaron 151 AMC que implicaron 78 marcadores, 20 para el aislamiento H017, 12 para el aislamiento G0327 y 18 para ambos aislamientos de *P. tritici-repentis*. Otorgando resistencia a *P. teres* se identificaron 21 marcadores para Dt1, 20 para Dt2 y otros 21 marcadores se asociaron significativamente a ambos aislamientos. Los 78 marcadores correspondieron a regiones genéticas en los cromosomas 1A (cuatro), 1B (tres), 1D (uno), 2A (cinco), 2B (cinco), 2D (seis), 3A (cinco), 3B (ocho), 3D (dos), 4A (uno), 4B (cuatro), 5B (dos), 6A (cuatro), 6B (tres), 6D (uno), 7A (doce), 7B (siete) y 7D (cinco) (Figura 4.16).

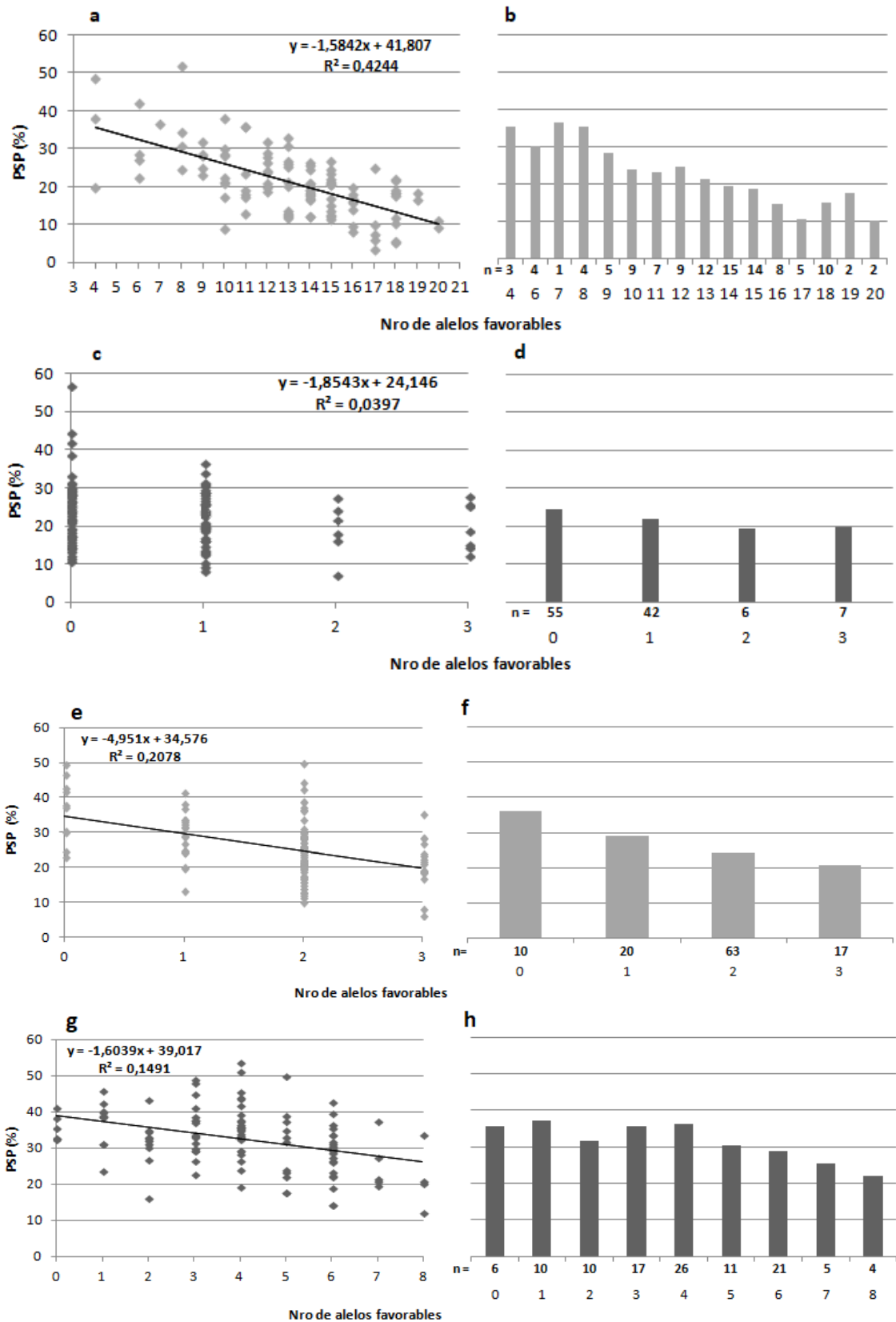
El ligamiento genético entre marcadores significativamente asociadas a la resistencia fue definido siguiendo la clasificación propuesta por Maccaferri *et al.* (2005), quien definió cuatro clases de pares de marcadores en función de su distancia genética: 1- ligamiento estrecho (<10 cM); 2- ligamiento moderado (10–20 cM); 3- ligamiento escaso (20–50 cM); 4- independientes (>50 cM). En este estudio si los marcadores se encontraban estrechamente ligados (<10 cM), se los consideró como una única región cromosómica. De los 110 marcadores que presentaron AMC en ambos estados de crecimiento, se redujo a 57 regiones cromosómicas. Estas 57 regiones están distribuidas en 19 de los 21 cromosomas del genoma, 1A (tres regiones), 1B (cuatro), 1D (tres), 2A (tres), 2B (cuatro), 2D (cinco), 3A (cuatro), 3B (cinco), 3D (dos), 4A (uno), 4B (dos), 5A (uno), 5B (dos), 6A (cuatro), 6B (cuatro), 6D (dos), 7A (cuatro), 7B (dos) y 7D (dos).



**Figura 4.16.** Mapa genético incluyendo AMC para resistencia a *P. tritici-repentis* y *P. teres*. Marcadores subrayados y sin subrayar representan AMC en estado de plántula y adulto respectivamente. Al final del nombre del marcador se colocó frente a que patógeno dio la AMC, Ptr (*P. tritici-repentis*) y Pt (*P. teres*) seguido del aislamiento: H (H017), G (G0327), 1 (Dt1) y 2 (Dt2). A la izquierda de cada cromosoma se observa la distancia genética (en cM) entre cada marcador.

### 5.3. Relación entre el número de alelos favorables y la resistencia

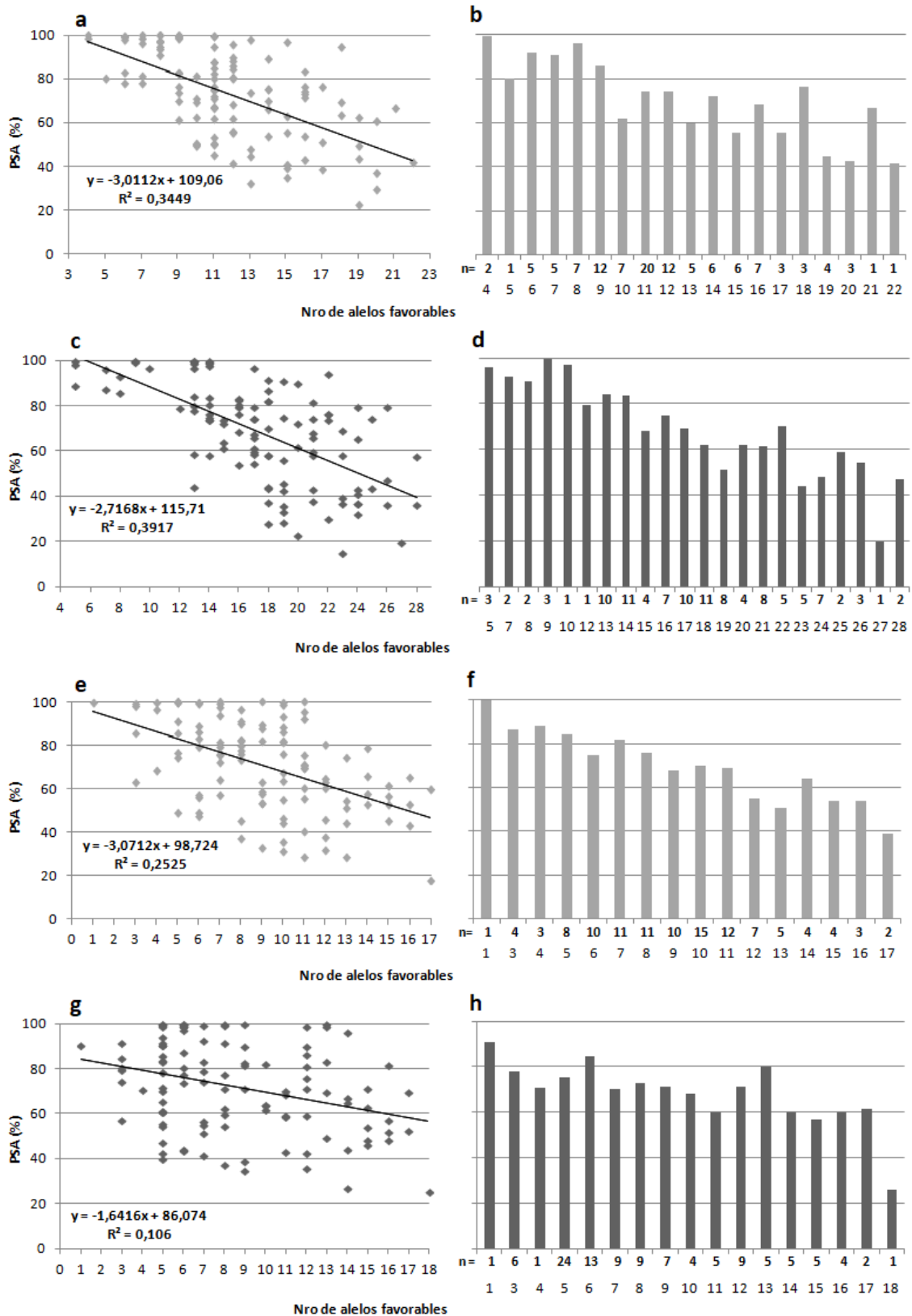
En estado de plántula, considerando los 21 marcadores DArT identificados para el aislamiento G0327, el número de alelos favorables (es decir aquellos alelos que contribuyeron con la resistencia) presentes en un genotipo específico varió de 4 a 20. En los genotipos con mayor número de alelos favorables se observó una tendencia de menor porcentaje de severidad, demostrando un efecto aditivo significativo. A medida que aumentó el número de alelos favorables, la severidad de la enfermedad se redujo, con un coeficiente de regresión de -1,58 y valores de R<sup>2</sup> de 0,42 (P <0,001) (Figura 4.17.a). Por lo tanto, se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de severidad generados por la acumulación de alelos resistentes, alcanzando valores por debajo del 20% cuando 14 o más marcadores estaban presentes en el mismo genotipo (Figura 4.17.b). Considerando los cuatro marcadores identificados para el aislamiento H017, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 0 a 3. Aunque existió una alta dispersión en la regresión, se observó una leve tendencia donde los genotipos con más alelos favorables presentaron menor severidad, con un coeficiente de regresión de -1,85 y valores R<sup>2</sup> de 0,04 (P <0,05) (Figura 4.17. c). Considerando los tres marcadores identificados para el aislamiento Dt1, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 0 a 3. Si bien también existió una alta dispersión en los datos, se observó una tendencia que a medida que aumentó el número de alelos favorables, la gravedad de la enfermedad se redujo, con un coeficiente de regresión de - 4,95 y valores R<sup>2</sup> de 0,21 (P <0,001) (Figura 4.17.e). Teniendo en cuenta los 8 marcadores identificados para el aislamiento Dt2, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 0 a 8. Al igual que frente a los otros aislamientos los genotipos con mayor número de alelos favorables tendieron a un menor porcentaje de severidad, demostrando un efecto aditivo significativo. El coeficiente de regresión fue de -1,60 y el R<sup>2</sup> de 0,15 (P <0,001) (Figura 4.17.g). Se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de severidad generados por la acumulación de alelos resistentes, alcanzando valores por debajo del 30% cuando seis o más marcadores estaban presentes en el mismo genotipo (Fig. 4.17.h). La frecuencia de alelos resistentes para cada QTL dentro de la colección de trigo varió del 11% (wPt-6216 y wPt-2936, ambos del cromosoma 3B) al 89% (wPt-732255, cromosoma7D).



**Figura 4.17.** A la izquierda, regresión entre PSP y número de alelos favorables, a) aislamiento G0327, c) aislamiento H017, e) aislamiento Dt1 y g) aislamiento Dt2. A la derecha, efecto de la acumulación de alelos favorables en el PSP entre diferentes clases, n indica el número de genotipos que contiene cada clase. b) aislamiento G0327, d) aislamiento H017, f) aislamiento Dt1 y h) aislamiento Dt2.

En la etapa adulta, considerando los 30 marcadores DArT identificados para el aislamiento G0327, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 4 a 22. En la figura 4.18.a, si bien existe una alta dispersión en la regresión, se observa que al aumentar el número de alelos favorables, la severidad tiende a disminuir, con un coeficiente de regresión de  $-3,01$  y  $R^2$  de  $0,34$  ( $P < 0,001$ ). En general, los genotipos con un mayor número de alelos favorables mostraron un menor porcentaje de severidad (Figura 4.18.b). Teniendo en cuenta los 38 marcadores identificados para el aislamiento H017, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 5 a 28. En la regresión se observó una tendencia similar que frente al aislamiento G0327, con un coeficiente de regresión de  $-2,72$  y un  $R^2$  de  $0,39$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 4.18.c.d). En el caso del aislamiento de *P. teres* Dt1 se identificaron 42 marcadores, aunque la cantidad de alelos favorables presentes en los diferentes genotipos varió de 1 a 17. Los genotipos con mayor acumulación de alelos favorables tendieron a menores PSA, siendo el coeficiente de regresión de  $-3,07$  y el  $R^2$  de  $0,25$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 4.18.e.f). De los 41 marcadores identificados para Dt2, el número de alelos favorables presentes en un genotipo específico varió de 1 a 18. El análisis de regresión realizado entre el PSA y la cantidad de alelos favorables arrojó un coeficiente de regresión de  $-1,64$  y un  $R^2$  de  $0,11$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 4.18.g). En la figura 4.18.h se puede observar el genotipo que posee la mayor cantidad de alelos favorables posee un PSA menor a 30%. La frecuencia de alelos resistentes para cada QTL dentro del panel de trigo varió del 11% (wPt-3692, cromosoma 2D) al 86% (wPt-669484, cromosoma 1A).





**Figura 4.18.** A la izquierda, regresión entre PSA y número de alelos favorables, a) aislamiento G0327, c) aislamiento H017, e) aislamiento Dt1 y g) aislamiento Dt2. A la derecha, efecto de la acumulación de alelos favorables en el PSA entre diferentes clases, n indica el número de genotipos que contiene cada clase. b) aislamiento G0327, d) aislamiento H017, f) aislamiento Dt1 y h) aislamiento Dt2.

## 6. Discusión

El estudio de rasgos complejos en el mejoramiento requiere significativa diversidad genética dentro del germoplasma a ser analizado (Flint-Garcia *et al.*, 2005). En especies como el trigo donde se dispone de colecciones núcleo (i.e colecciones con alta variabilidad genética), las mismas constituyen un material ideal para estudios de mapeo por asociación (Whitt & Buckler, 2003). Una de las hipótesis planteadas en este ensayo es que **“la existencia de variabilidad fenotípica en la resistencia a los patógenos *P. tritici-repentis* y *P. teres*, en una población internacional de 110 genotipos de trigo, presenta un componente genético, por lo que es posible localizar QTL que los determinan a través de mapeo por asociación”**.

Efectivamente en esta población de mapeo, se ha observado una considerable y significativa variación fenotípica en los caracteres evaluados y bajo todos los experimentos; permitiendo estudiar la base genética responsable de tales variaciones, como también su estabilidad a través de los ambientes evaluados. También se observaron diferencias significativas entre los subgrupos generados por el programa STRUCTURE para la resistencia en las etapas de plántula y adulto. En cuanto a la severidad en el estado de plántula los niveles más altos observados en 2014 en comparación con 2015, se atribuyeron a condiciones ambientales más favorables (precipitaciones y humedad relativa) para el desarrollo de la enfermedad, especialmente durante los primeros meses del cultivo. La mayor severidad en la etapa adulta con respecto al estado plántula puede deberse a temperaturas, que fueron más propicias para el desarrollo de la enfermedad en esa etapa. Las condiciones ambientales ideales para el desarrollo de la enfermedad incluyen temperaturas entre 18 y 28°C y un período de humectación igual o superior a 30 h (Reis *et al.*, 2001). En el estado de plántula, en el mes de julio, las temperaturas medias fueron inferiores a 15°C en ambos años, mientras que en la etapa adulta, por el mes de noviembre las temperaturas medias rondaron los 18°C. Comparando la severidad en las dos etapas evaluadas, se observó que muy pocos genotipos mostraron resistencia en ambas etapas, mientras que la mayoría lo hizo solo en uno. Esto indica una expresión diferente de los genes de resistencia en ambas etapas. Tadesse *et al.* (2010) encontraron que la mayoría de los cultivares mostraron niveles levemente más altos de susceptibilidad en la etapa adulta bajo condiciones de campo que en la etapa de plántula en condiciones de invernadero, aunque hubo una tendencia similar para ambas etapas en todos los cultivares. Se observó una alta heredabilidad en ambos estadios para la variable severidad, lo que indica la relevancia de la varianza genotípica y la viabilidad de seleccionar para este rasgo. Patel *et al.* 2013 también

informaron una heredabilidad relativamente alta para la resistencia a aislamientos novedosos de *P. tritici-repentis* en Estados Unidos.

En Argentina y en algunos otros países del mundo, aparecen nuevas razas de los patógenos, ya que algunos aislamientos no se corresponden con las razas conocidas (Ali *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Moreno *et al.* 2014) y la ubicación de la resistencia no ha sido mapeada. A su vez aparecen nuevos patógenos, que eran específicos de otros cultivos y ahora también afectan al trigo, como el caso de *P. teres*, siempre asociado al cultivo de cebada, y en los últimos años varios trabajos concluyen que también puede enfermar al trigo causando síntomas similares a los producidos por *P. tritici-repentis* (Mikhailova *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2008).

En cuanto a la posibilidad de localizar QTL de resistencia planteada en la hipótesis, este capítulo muestra los resultados de un estudio de mapeo por asociación realizado para identificar regiones genómicas que condicionan la resistencia a mancha amarilla del trigo causada por el patógeno *P. tritici-repentis* y al patógeno *P. teres*, en una población de 110 genotipos de trigos primaverales, usando 2134 marcadores DArT. En este trabajo, se encontraron un total de 187 AMC relacionados con 110 marcadores asociados de manera significativa con la resistencia. Los 110 marcadores se distribuyeron en 57 regiones cromosómicas en 19 de los 21 cromosomas, de los cuales en el cromosoma 6D no se han documentado hasta el momento. Por su parte de las 57 regiones cromosómicas detectadas en el presente trabajo, 14 regiones se asociaron sólo a alguno de los dos aislamientos de *P. tritici-repentis*, otras 16 regiones sólo a los aislamientos de *P. teres* y 27 regiones presentaron asociación con aislamientos de ambos patógenos. A su vez de las 57 regiones, 12 se asociaron sólo en el estado de plántula, 34 sólo en estado adulto y 11 regiones en ambos estados. Estos resultados son consistentes con el rendimiento fenotípico e indican que la resistencia en ambas etapas está controlada por algunas regiones comunes pero también por otras diferentes.

Además, es necesario considerar que los aislamientos utilizados en este estudio no pertenecen a las razas conocidas estudiadas hasta ahora. Esto es importante para expandir la base genética de la resistencia a *P. tritici-repentis* a medida que se encuentran nuevas regiones que condicionan la resistencia a nuevos aislamientos. A su vez las regiones cromosómicas que otorgan resistencia a *P. teres* son totalmente novedosas, ya que este hongo siempre se lo consideró patógeno de cebada.

Al analizar las 41 regiones cromosómicas que se asociaron con resistencia a *P. tritici-repentis*, 15 de ellas son novedosas. En el cromosoma 1A, se encontraron dos regiones que confirieron resistencia a los nuevos aislamientos utilizados en este

estudio. Estas regiones están cercanas al gen mayor *tsc1*, y varios autores también encontraron QTL en posiciones similares para resistencia a Ptr ToxA (Pérez-Lara *et al.*, 2017), Ptr ToxA y Ptr ToxC (Sun *et al.*, 2010) y frente aislamientos novedosos de EE. UU. (Patel *et al.*, 2013). En el cromosoma 1D se hallaron tres regiones que dieron resistencia en posiciones similares a las encontradas por Patel *et al.* (2013) para nuevos aislamientos y Gurung *et al.* (2011) para la raza 1. En el cromosoma 2A se detectaron tres regiones que dieron resistencia, dos de las cuales no estaban documentadas previamente. Gurung *et al.* (2011) y Chu *et al.* (2008) encontraron resistencia para la raza 1 en una región similar a una de las regiones detectadas en este estudio. Mientras que en el cromosoma 2B se encontraron tres regiones en posiciones similares a las encontradas por Pérez-Lara *et al.* (2017), Gurung *et al.* (2011) para Ptr ToxA, Sun *et al.* (2010) para la raza 1 y Patel *et al.* (2013) para nuevos aislamientos. Además, estas regiones están cerca del gen mayor *tsc2*. En el cromosoma 2D se asociaron con la resistencia cuatro regiones, tres de las cuales no estaban documentadas previamente. Gurung *et al.* (2011) encontraron resistencia para la raza 1 y Patel *et al.* (2013) encontraron resistencia para aislamientos nuevos en una posición similar a una de las regiones detectadas en el cromosoma 2D. En el cromosoma 3A se detectaron cuatro regiones que dieron resistencia, tres de las cuales no fueron documentadas. Mientras que en el cromosoma 3B hubo cinco regiones que confirieron resistencia, de las cuales tres son novedosas. Chu *et al.* (2010) encontraron resistencia a la raza 1 en regiones similares a las encontradas en este trabajo en los cromosomas 3A y 3B. En el cromosoma 4A detectamos una única región que proporciona resistencia en una posición similar a la encontrada por otros autores para la raza 1 (Gurung *et al.*, 2011 y Chu *et al.*, 2010). Mientras que en el cromosoma 4B encontramos dos regiones, una nueva y otra también encontrada por Gurung *et al.* (2014) para la raza 5. En el cromosoma 5B, Faris *et al.* (1996) detectaron varios locus asociados a la resistencia frente a *P. tritici-repentis*, mientras que en este estudio se detectaron solo dos marcadores pero asociados a *P. teres*. En el cromosoma 6A se detectaron dos regiones, una de las cuales también fue encontrada por Patel *et al.* (2013), mientras que la restante no se ha informado hasta el momento. A su vez, en el cromosoma 6B se encontraron tres regiones. Singh *et al.* (2016) encontraron resistencia en regiones similares. Mientras que en el cromosoma 6D se detectaron dos regiones nunca mencionadas en la literatura hasta el momento. Con respecto a lo que se encontró en el cromosoma 7A, una región fue novedosa y dos también fueron encontradas por Patel *et al.* (2013) y Gurung *et al.* (2014) para la raza 1. Se encontró una sola región en el cromosoma 7B que también fue encontrada por

Chu *et al.* (2010), finalmente en el cromosoma 7D, una región fue novedosa y la otra también fue citada por Faris *et al.* (2012).

Por otro lado, Gurung *et al.* (2014) encontraron resistencia a la mancha foliar bacteriana y a mancha de la hoja en el cromosoma 6B, en una región novedosa encontrada en este trabajo. Perez-Lara *et al.* (2017) encontraron resistencia a la roya amarilla en una región similar a la encontrada en este estudio como novedosa para mancha amarilla. Gerard (2017) encontró resistencia a mancha de la hoja en los cromosomas 1D, 2A, 2D, 2B, 3A, 3B, 6B y 7B, en regiones similares a las encontradas en este trabajo. La resistencia de amplio espectro ha sido ampliamente reportada en el trigo, incluida la detección en germoplasma no adaptado con resistencia a múltiples enfermedades y la agrupación de genes de resistencia en distintas regiones genómicas (Gurung *et al.*, 2009). Estos resultados también están en línea con los informados por Miedaner *et al.* (2012, 2013) y Zwart *et al.* (2010), quienes encontraron regiones genómicas que confirieron resistencia de amplio espectro a *Gibberella zeae*, mancha amarilla, mancha de la hoja y roya de la hoja.

Otra hipótesis planteada fue que **“la acumulación de dos a más alelos significativamente asociados con la resistencia en un mismo genotipo, presenta efectos aditivos y significativos sobre la misma”**. Si bien frente a la mayoría de los aislamientos las regresiones presentaron  $R^2$  bajos, éstas fueron significativas, observando que los genotipos con mayor número de alelos favorables para la resistencia tendieron a un menor porcentaje de severidad, demostrando un efecto aditivo significativo, en los dos años y frente a los dos aislamientos de *P. tritici-repentis* y a los dos de *P. teres*. Estos resultados demuestran la potencialidad del mapeo asociativo en la investigación de rasgos complejos como la resistencia a enfermedades.

En conclusión, el estudio de mapeo por asociación realizado permitió determinar los factores genéticos determinantes de la base genética de la resistencia a dos patógenos del género *Pyrenophora*. Del total de marcadores asociados encontrados en este estudio, una considerable proporción de acuerdo a nuestro conocimiento no han sido reportados previamente y por lo tanto representan nuevos factores genéticos posibles de utilizar en el mejoramiento. Sin embargo, una validación previa de los mismos es necesaria a fin de poder utilizar los mismos en selección asistida por marcadores. Los efectos aditivos identificados en aquellos marcadores asociados con la resistencia genética confirman que su piramidización en un mismo fondo genético representa una estrategia válida. Esta información puede ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevas variedades mejoradas, aunque una validación más precisa de los resultados es requerida.

## CAPÍTULO 5

### Discusión general

La mancha amarilla es una de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de trigo en todas las áreas trigueras del mundo (Uranga *et al.*, 2015). Tal como fue descrito en otros pasajes de esta tesis, esta enfermedad es producida por el patógeno *P. tritici-repentis*. Sin embargo, en los últimos años en diferentes regiones de Argentina, se encontraron cultivos de trigo con lesiones típicas de mancha amarilla, pero los conidios aislados desde el tejido foliar resultaron mucho más cortos que los descritos para dicha especie. La intensificación de los sistemas de cultivo, la utilización de cultivares susceptibles, falta de rotación, las prácticas de labranza mínima, la alta variabilidad genética de los patógenos causales, así también como el cambio climático global, han incrementado la incidencia y severidad de la enfermedad (Annone & García, 2004; Fraije *et al.*, 2005, Mergoum *et al.*, 2007). La resistencia genética es la base del manejo integrado, ya que tiene una baja relación costo/beneficio y preserva el medio ambiente. Como consecuencia, la resistencia genética en la planta huésped se ha convertido en un carácter objetivo en el mejoramiento genético del cultivo. Esto implica la necesidad de nuevas fuentes de resistencia y la identificación cromosómica precisa de la base genética determinante, a fin de facilitar su uso en el mejoramiento y lograr un adecuado manejo de la enfermedad. El primer paso en la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia es la caracterización fenotípica de diversos genotipos de trigo.

El objetivo general de esta tesis es contribuir al mejoramiento de la resistencia a la mancha amarilla del trigo a través de la investigación de la estructura de especies del género *Pyrenophora* y la localización molecular de la resistencia en una población de genotipos de trigo previamente seleccionados.

En el **Capítulo 2** el objetivo fue esclarecer la identidad de la nueva especie del género *Pyrenophora* asociada a los síntomas de la mancha amarilla a través del estudio morfológico y molecular de estos nuevos aislamientos de *Pyrenophora*. Tanto los estudios moleculares como los morfológicos determinaron que el patógeno era compatible con *P. teres* f. *maculata*, comúnmente aislado como patógeno de la cebada, causando la mancha en red. Este resultado concuerda con otros autores (Tóth *et al.*, 2008; Mikhailova *et al.*, 2010), donde encontraron en otros países a *P. teres* asociado al cultivo de trigo. Estos resultados permiten no rechazar la primera

hipótesis planteada en este capítulo: **“Además de *P. tritici-repentis* existen otras especies del género *Pyrenophora* que pueden infectar al trigo causando síntomas similares a la mancha amarilla”**, ya que los estudios morfológicos y moleculares determinaron que si bien el aislamiento pertenece al género *Pyrenophora*, no se corresponde con la especie típica causante de la mancha amarilla, *P. tritici-repentis*. La segunda hipótesis planteada en este capítulo fue que **“es posible realizar una identificación morfológica y molecular del patógeno en cuestión”**. Esta hipótesis no se rechaza ya que se corroboró que mediante estos estudios que los aislamientos utilizados se corresponden con *P. teres* f. *maculata*.

En el **Capítulo 3** se realizó una caracterización de la resistencia genética a *P. tritici-repentis* y a los nuevos aislamientos de *P. teres* identificados en el capítulo 2, en cultivares argentinos de trigo utilizados comercialmente. El principal objetivo de este capítulo fue determinar los niveles de resistencia a estos dos patógenos de los cultivares nacionales de trigo. En este ensayo se evaluó la severidad en los estados de plántula y adulto, en 30 cultivares argentinos de trigo de los más sembrados en la campaña 2016, de los cuales tres se destacaron por presentar una buena resistencia en ambos estados, otros tres fueron susceptibles durante todo el ciclo y el resto mostraron resistencia sólo una etapa de crecimiento. Estos resultados permiten no rechazar la primer hipótesis de este capítulo: **“Los cultivares argentinos actualmente sembrados poseen una alta variabilidad en la resistencia a los patógenos *P.teres* y *P.tritici-repentis*, existiendo algunos cultivares resistentes”**. A su vez, basándose en estos resultados se puede rechazar la segunda hipótesis, la cual planteaba que: **“El nivel de resistencia de los cultivares de trigo a los patógenos se mantiene durante todo el ciclo de cultivo”**, ya que se observó que varios genotipos mostraron resistencia en una sola de las etapas, indicando una expresión diferente de los genes de resistencia en ambas etapas. Tadesse *et al.* (2010) encontraron que la mayoría de los cultivares mostraron niveles levemente más altos de susceptibilidad en la etapa adulta bajo condiciones de campo que en la etapa de plántula en condiciones de invernadero. La conclusión del Capítulo 3 es que se detectaron varios genotipos que presentaron susceptibilidad frente a los patógenos *P. teres* y *P. tritici-repentis*. Esto sugiere la necesidad de seguir mejorando genéticamente la sanidad de los cultivares locales, lo que implica la búsqueda de materiales que posean genes de resistencia para poder ser utilizados en futuros programas de mejoramiento.

El mejoramiento genético conjuntamente con mejoras en las prácticas agronómicas ha generado importantes incrementos en el rendimiento de cultivo de trigo tanto a nivel mundial como en Argentina (FAO, 2013; Vanzetti *et al.*, 2013). Sin

embargo, en los últimos años la tasa de aumento de la productividad de trigo ha ido disminuyendo, lo que, sumado al efecto previsto del cambio climático, las pérdidas ocasionadas por enfermedades y plagas y el incremento demográfico estimado, deja en claro la necesidad de incrementar las tasas de ganancia. A fin de alcanzar este objetivo, el estudio y exploración de la diversidad genética a niveles moleculares por medio de tecnologías de genética molecular y la integración de dicha información con métodos de mejora convencionales es fundamental (Chao *et al.*, 2007). La diversidad genética es vital en el desarrollo de genotipos mejorados y los estudios de mapeo por asociación permiten que un muy amplio pool de genes pueda ser analizado. La disección de la base genética de rasgos complejos a través de mapeo por asociación ha sido reportada en diversos cultivos como arroz, maíz, cebada y trigo (Zhu *et al.*, 2008). En el **Capítulo 4** los objetivos fueron identificar posibles genes de resistencia en estado de plántula y adulto en una colección de 110 genotipos de diverso origen, creada para estudios de mapeo por asociación frente a dos aislamientos de *P. tritici-repentis* que no pertenecen a razas conocidas y dos aislamientos de *P. teres* capaces de infectar trigo. En esta población de mapeo, se ha observado una considerable y significativa variación fenotípica en los caracteres evaluados y bajo todos los experimentos; permitiendo estudiar la base genética responsable de tales variaciones, como también su estabilidad a través de los ambientes evaluados. Se encontró mayor severidad en la etapa adulta con respecto al estado plántula, que puede deberse a temperaturas más altas, las cuales fueron propicias para el desarrollo de la enfermedad en esa etapa. A su vez, el mapeo asociativo arrojó como resultado un total de 187 asociaciones marcador – carácter (severidad) (AMC). Estas asociaciones involucraron 110 marcadores, los cuales se distribuyeron en 57 regiones cromosómicas en 19 de los 21 cromosomas, de los cuales en el cromosoma 6D no se han documentado hasta el momento. Se detectaron 41 regiones cromosómicas que se asociaron con resistencia a *P. tritici-repentis*, de las cuales 15 de ellas son novedosas; mientras que para *P. teres* se detectaron 43 regiones. Lo interesante es que 27 regiones cromosómicas presentaron asociación con aislamientos de ambos patógenos, ya que de esta manera se amplía el espectro de la resistencia. La resistencia de amplio espectro es muy importante ya que detectar genes o QTL que otorguen resistencia a varios patógenos aumenta de manera considerable la eficiencia del mejoramiento. Si bien existen numerosos trabajos donde se encontraron genes mayores de resistencia y numerosos QTL, la mayoría de éstos utilizan razas del patógeno conocidas. En este trabajo se utilizaron razas locales que según trabajos de investigación anteriores (Jecke, 2015) no se corresponden con las razas conocidas, por lo tanto las fuentes de resistencia detectadas en este estudio sirven para mejorar



la resistencia genética a nivel local. En Argentina y en algunos otros países del mundo, constantemente aparecen nuevas razas de los patógenos (Ali *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Moreno *et al.* 2014), por lo tanto la ubicación de la resistencia es un trabajo constante. A su vez se utilizaron aislamientos de *P. teres* encontrados en hojas de cultivos de trigo, y que se volvieron a inocular para corroborar su capacidad de infectar al cultivo. Por lo tanto las fuentes de resistencia detectadas para *P. teres* son inéditas en el cultivo de trigo. Estos resultados nos permiten no rechazar la primera hipótesis del capítulo: **“La existencia de variabilidad fenotípica en la resistencia a los patógenos *P. tritici-repentis* y *P. teres*, en una población internacional de 110 genotipos de trigo, presenta un componente genético, por lo que es posible localizar QTL que los determinan a través de mapeo por asociación”**. Otro resultado observado fue que los genotipos con mayor número de alelos favorables para la resistencia tendieron a un menor porcentaje de severidad, demostrando un efecto aditivo significativo. Esto permite no rechazar la otra hipótesis planteada: **“La acumulación de dos a más alelos significativamente asociados con la resistencia en un mismo genotipo, presenta efectos aditivos y significativos sobre la misma”**. Estos efectos aditivos identificados en aquellos marcadores asociados con la resistencia genética confirman que su piramidización en un mismo fondo genético representa una estrategia válida. Esta información puede ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevas variedades mejoradas. Estos resultados demuestran la potencialidad del mapeo asociativo en la investigación de rasgos complejos como la resistencia a enfermedades.

### **Principales conclusiones de la tesis**

- Además del patógeno *P. tritici-repentis* que causa la mancha amarilla del trigo, existe otro patógeno del género *Pyrenophora* que afecta al trigo causando síntomas similares a la mancha amarilla. Este nuevo patógeno se corresponde con *P. teres*, agente causal de la mancha en red en cebada, siendo más específicamente la forma especial *P. teres* f. *maculata*.
- Existen cultivares de trigo argentinos susceptibles a los aislamientos utilizados de *P. tritici-repentis* y *P. teres*, como así también existen cultivares resistentes, algunos a todos los aislamientos y otros solo a algunos.
- La resistencia frente a los patógenos en algunos cultivares se expresa durante todo el ciclo del cultivo, mientras que otros cultivares presentan resistencia en un solo estado de crecimiento.

- Se detectaron nuevas regiones del genoma de trigo mediante el uso de marcadores moleculares que otorgan resistencia a los aislamientos de *P. tritici-repentis* y *P. teres* utilizados en este ensayo.
- La acumulación de dos a más alelos significativamente asociados con la resistencia en un mismo genotipo, presenta efectos aditivos y significativos sobre la misma.
- La piramidización de estos alelos con efectos aditivos en un mismo fondo genético representa una estrategia válida para el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades.

### **Futuras investigaciones**

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se propone como futuras investigaciones, por un lado, por lo expuesto en el capítulo 2, continuar con la caracterización del patógeno *P. teres* utilizado en este ensayo, mediante estudios bioquímicos para analizar el tipo de toxinas involucradas. Como así también determinar la frecuencia de aparición del patógeno en diferentes regiones del país.

A su vez, se propone el desarrollo de poblaciones de mapeo a partir de los cultivares argentinos que han exhibido resistencia frente a los aislamientos utilizados (Capítulo 3) para localizar resistencia en poblaciones locales. Dentro de este grupo como fue mencionado se destacaron los cultivares Algarrobo de Don Mario, Buck SY 110 y ACA Cedro, que presentaron resistencia tanto en estado adulto como en estado de plántula y frente a los dos patógenos. Otros cultivares a utilizar pueden ser Buck Bellaco, ACA 303 Plus, Bioceres Timbó y Sursem Nogal, los cuales presentaron resistencia a ambos patógenos sobretodo en planta adulta.

Otro estudio a futuro sería revisar si los marcadores detectados se encuentran presentes de manera aleatoria a través de los distintos subgrupos de la estructura poblacional, o si por el contrario están mas presentes en algún subgrupo en particular.

Por último, más allá del hecho que varias de las regiones genéticas identificadas a través de mapeo asociativo (Capítulo 4) coincide con genes previamente reportados (lo cual demuestra la utilidad de la metodología utilizada), dichos resultados deben ser validados antes de ser utilizados en el mejoramiento. Para tales validaciones se propone utilizar diferentes metodologías, desde el desarrollo de poblaciones bi-parentales, líneas isogénicas y mapeo fino, entre otras.

## Referencias bibliográficas

- Abdurakhmonov, I.Y. & Abdukarimov, A. 2008. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *International Journal of Plant Genomics* 2008:1-18.
- Agrios, G.N. 2005. Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*.
- Akhavan, A., Turkington, T.K., Kebede, B., Tekauz, A., Kutcher, H.R., Kirkham, C., *et al.* 2015. Prevalence of mating type idiomorphs in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* populations from the Canadian prairies. *Canadian journal of plant pathology*, 37(1), 52-60.
- Al-Maskri, A.H., Sajjad, M. & Khan, S.H. 2012. Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *International Journal of Agricultural and Biological* 14:1537–1546.
- Alam, K.B. & Gustafson, J.P. 1988. Tan-spot resistance screening of Aegilops species. *Plant Breeding* 100: 112–118.
- Ali, S. & Francl, L.J. 2001a. First report of tan spot on wheat in Pakistan. *Plant Disease* 85: 1031.
- Ali, S. & Francl, L.J. 2001b. Recovery of *Pyrenophora tritici-repentis* from barley and reaction of 12 cultivars to five races and two host-selective toxins. *Plant Disease* 85: 580-584.
- Ali, S. & Francl, L.J. 2002a. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* from Brazil. *Plant Disease* 86: 9.
- Ali, S. & Francl, L.J. 2002b. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates obtained from wheat in South America. *Plant Protection Science* 38 (Special Issue 2): 302-304.
- Ali, S., Ling, H., Meinhardt, S. & Francl, L. 2002. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host-selective toxin. *Phytopathology* 92: S3.
- Ali, S., Gurung, S. & Adhikari, T.B. 2010. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Disease* 94: 229-235.
- Alvarez, R. & Steinbach, H.S. 2009. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research* 104:1-5.
- Andrie, R.M., Pandelova, I. & Ciuffetti, L.M. 2007. A combination of phenotypic and genotypic characterization *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology* 97: 694-701.
- Annone, J.G. 1985. Presencia de la “mancha tostada” del trigo (*Helminthosporium tritici-repentis*). Carpeta de Producción Vegetal. Trigo. Tomo VII. INTA, EEA Pergamino. Informe N° 88.
- Annone, J. 1998. Tan spot of wheat in Argentina: importance and disease management strategies. Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*), Mexico, 339-345.
- Annone, J.G. 2004. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: Su importancia relativa en las regiones productoras Norte y Sur. En: A Todo Trigo. Actas del congreso 13 y 14 de Mayo 2004. Mar del Plata. Argentina. p. 53-58.
- Annone, J.G. 2006. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: su importancia relativa en las Regiones productoras Norte y Sur. In: Congreso A Todo Trigo. Conocimiento y Producción. Federación de Centros y Entidades Gremiales de Acopiadores de Cereales, Hotel Sheraton, 18 y 19 de Mayo de 2006. Mar del Plata, Argentina. pp 53-58.
- Annone, J.G. & García, R. 2004. Las principales manchas foliares del trigo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); *Revista Idia XXI* N° 6 junio 2004. pp 58-64.

- Annone, J.G., & García, R. 2005. Status of resistance of Argentinean wheat cultivars to the causal agent of tan spot. In 7th International Wheat Conference. Libro de Resúmenes (Vol. 126).
- Annone, J.G., Botta, G. & Ivancovich, A. 1994. Ocurrencia de la mancha bronceada del trigo en el área norte de la provincia de Buenos Aires. Actas del II Congreso Nacional de Trigo y primer simposio Nacional de Cereales de Invierno. pp 205-208.
- Annone, J.G., García, R., Botta, G. & Ivancovich, A. 2001. Pérdidas de rendimiento 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* N° 16. Vol. VI. EEA Pergamino. INTA Pergamino. 32 pp
- Annone, J.G., García, R., Polidoro, O.O. & Calzolari, A.M. 2004. Respuesta de cultivares de trigo a *Pyrenophora tritici-repentis*, agente causal de la "mancha amarilla". In Congreso Nacional de Trigo. 6. Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal. 4. 2004 10 20-22, 20 al 22 oct. 2004. Bahía Blanca, Buenos Aires. AR.
- Araya, C.M. & Cárdenas, C. 1999. Variabilidad patogénica y fuentes de resistencia a poblaciones de *Colletotrichum lindemuthianum* en Costa Rica. Actas de Congreso XXXIX Reunión Anual APS-CD. Puerto Rico. pp. 72.
- Ariyawansa, H.A., Kang, J.C., Alias, S.A., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2014. *Pyrenophora*. *Mycosphere*, 5(2), 351-362.
- Bai, G. & Shaner, G. 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease*, 78: 760-766
- Ballance, G.M., Lamari, L. & Bernier, C.C. 1989. Purification and characterization of a host selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 203-213.
- Ballance, G.M., Lamari, L., Kowatsch, R. & Bernier, C.C. 1996. Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology*, 1209.
- Benslimane, H., Lamari, L., Benbelkacem, A., Sayoud, R. & Bouznad, Z. 2011. Distribution of races of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria and identification of a new virulence type. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(2), 203-211.
- Bertrand, C., Collar, Y. & Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 363:557–572.
- Bhathal, J.S., Loughman, R. & Speijers, J. 2003. Yield Reduction in Wheat in Relation to Leaf Disease From Yellow (tan) Spot and Septoria Nodorum Blotch. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 435-443
- Braun, H.J., Atlin, G. & Payne, T. 2010. Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. In: Reynolds MP, ed. Climate change and crop production. Wallingford, UK: CABI Publishers, pp.115–138.
- Bockus, W.W., Davis, M.A. & Shroyer, J.P. 1992. Effect of foliar fungicide application on seed size of winter wheat. *Journal of Applied Seed Protection*, 10, 1-16.
- Bolsa de Comercio de Rosario. 2017. Guía estratégica para el agro. Estimaciones de producción. Disponible en: <http://www.bcr.com.ar/pages/gea/estimaProd.aspx>. Último acceso: julio 2018.
- Barreto, D.E. & Carmona, M.A. 1993. Microflora of barley seed and malt in Argentina. In *Proceedings* (Vol. 1, pp. 70-74).
- Barreto, D.E. & Carmona, M.A. 1994. Panorama sanitario de la cebada cervecera Argentina. Estado actual de las investigaciones 1990-1993. Actas de las 1ras. Jornadas de actualización técnica-económica del cultivo de cebada cervecera. Bolsa de cereales, Buenos Aires, 100-106.
- Barreto, D.E. & Carmona, M.A. 1996. Field incidence of *Pyrenophora teres* and infection on barley seed. *RIA*, 26(1), 61-65.

- Carmona, M.A. 1994. Distribución, incidencia y severidad de las enfermedades foliares de la cebada cervecera en la provincia de Buenos Aires en 1992. *Fitopatología*, 29, 214-217.
- Carmona, M.A., Barreto, D.E. & Wright, E.R. 1992. Relevamiento de las enfermedades fúngicas de la cebada cervecera en la provincia de Buenos Aires. *Revista Facultad Agronomía* (Buenos Aires), 13(2-3), 187-192.
- Carmona, M., Reis, E.M. & Cortese, P. 1999. Manchas foliares del trigo: diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo. Eds. Carmona M., Reis E.M. y P. Cortese. pp 32.
- Carmona, M. (2003). Manejo Integrado de la mancha amarilla del trigo. Publicación Técnica, (99), 1-6.
- Chao, S., Zhang, W. Dubcovsky, J. & Sorrells, M. 2007. Evaluation of genetic diversity and genome-wide linkage disequilibrium among U.S. wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm representing different market classes. *Crop Science* 47:1018–1030.
- Chidambaram, P., Mathur, S.B., & Neergaard, P. 1973. Identification of seed-borne *Drechslera* species. *Friesia* 10:165-207.
- Chu, C.G., Friesen, T.L., Xu, S.S., Faris, J.D. 2008. Identification of novel tan spot resistance loci beyond the known host-selective toxin insensitivity genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 117:873–881
- Chu, C.G., Chao, S., Friesen, T.L., Faris, J.D., Zhong, S., Xu, S.S. 2010. Identification of novel tan spot resistance QTLs using an SSR-based linkage map of tetraploid wheat. *Molecular breeding* 25(2): 327-338.
- Churchill, G.A. & Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963–971.
- CIMMYT. 2009. Agricultura para el futuro de nuestros nietos: producción de maíz y trigo y el cambio climático en los países en desarrollo. Informe Anual del CIMMYT 2008-2009. México, D.F.: CIMMYT. 20 p.
- Ciuffetti, L.M., Tuori, R.P. & Gaventa, J.M. 1997. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell* 9: 135-144.
- Ciuffetti, L.M., Francl, L.J., Balance, G.M., Bockus, W.W., Lamari, L., Meinhardt, S.W. & Rasmussen, J.B. 1998. Standardization of toxin nomenclature in the *Pyrenophora tritici-repentis*/wheat interaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 421-424.
- Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Martinez, J.P., Pandelova, I. & Andrie, R.M. 2003. Proteinaceous toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* and investigation of the site-of-action of Ptr Tox A. Proceedings of the Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop. North Dakota Agricultural Experiment Station. pp 96-102.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. & Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- Cordo, C.A., Simón, M.R., Chidichimo, H.O., Fernández, L., & Kripelz, N.I. 2005. Mineralización de los residuos de trigo provenientes de distintos sistemas de labranza: Efecto sobre la pérdida de peso y dinámica del nitrógeno. In XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina (pp. 19-22).
- Cornell, H.J. & Hoveling, A.W. 1998. Wheat: chemistry and utilization, technomic publishing Co. Pennsylvania, USA. 422 p.
- Daud, H.M. & Gustafson, J.P. 1996. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as B-genome progenitor of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 39:543-548.
- Day, P.R. 1960. Variation in phytopathogenic fungi. *Annual Review of Microbiology* 14: 1-16.
- de Wolf, E.D., Effertz, R.J., Ali, S. & Francl, L.J. 1998. Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 349-370.
- Diaz de Ackermann, M. 1987. Resistance among winter wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* isolates and variability in fungal growth, color, sporulation and pathogenicity. M. Sc. Tesis. North Dakota State University. Fargo. 49 pp.

- Dubcovsky, J. & Dvorak, J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Science* 316:1862-1866.
- Donaire, G., Bainotti, C., Salines, J., Frascina, J., Alberione, E., & Gómez, D. 2017. Comportamiento productivo de cereales de invierno en INTA EEA Marcos Juárez. Campaña agrícola 2017.
- Endo, T.R. & Gill, B.S. 1996. The deletion stocks of common wheat. *Journal of Heredity* 87:295-307.
- Ersoz, E.S., Yu, J. & Buckler, E.S. 2009. Applications of linkage disequilibrium and association mapping in maize Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement, Springer Berlin Heidelberg, 173–195 pp.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- FAOSTAT, 2010, 2013 y 2014. <http://faostat.fao.org/>.
- Faris, J.D., Anderson, J.A., Francl, L.J., & Jordahl, J.G. 1996. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*, 86(5), 459-463.
- Faris, J.D., Abeysekara, N.S., McClean, P.E., Xu, S.S. & Friesen, T.L. 2012. Tan spot susceptibility governed by the Tsn1 locus and race-nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa. *Molecular breeding* 30:1669–1678.
- Faris, J.D., Liu, Z., & Xu, S.S. 2013. Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9), 2197-2217.
- Feldman, M. & Levy, A.A. 2011. Instantaneous genetic and epigenetic alterations in the wheat genome caused by allopolyploidization, in Transformations of Lamarckism, From Subtle Fluids to Molecular Biology, edited by S. B. Gissis, E. Jablonka. The MIT press, Cambridge, MA, 261–270 pp.
- Fernandez, M.R., Clarke, J.M. & DePauw, R.M. 1994. Response of durum wheat kernels and leaves at different growth stages to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease* 78: 597-600.
- Flavell, R.B. 1982. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence, in Genome Evolution, edited by G. A. Dover and R. B. Flavell, Academic Press, New York, 301-323 pp.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M. & Buckler, E.S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54:357-374.
- Flint-Garcia, S.A., Thillet, A.C., Yu, J., Pressoir, G.S., Romero, M., et al. 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant Journal* 44:1054-1064.
- Fischer, R.A. & Edmeades, G.O. 2010. Breeding and cereal yield progress. *Crop Science* 50:85–98.
- Fischer, R.A., Byerlee, D. & Edmeades, G.O.. 2009. Can technology deliver on the yield challenge to 2050? Proceedings of the Expert Meeting on How to Feed the World in 2050, FAO, Rome.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S. & Lucas, J.A. 2005. Role of ascospores in further spread of Qol-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95:933–941.
- Friesen, T.L., Ali, S., Kleim, K.K. & Rasmussen, J.B. 2005. Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology* 95: 1144-1150.
- Galarza, C., Vallone, P., Gudelj, V., Cazorla, C. & Baigorria, T. 2011. Caracterización de rastros en sistemas agrícolas estabilizados. EEA Marcos Juárez, 7 p.
- Galich, M.T.V. de & Galich, A. 1994. Enfermedades del trigo en el área sur de Santa Fe y Córdoba correspondientes a la subregión II Norte, Año 1993/94. EEA Marcos Juárez. INTA Marcos Juárez. Información para extensión N° 5 . 7 pp.

- Gamba, F.M. & Lamari, L. 1998. Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 408-414.
- Gamba, F.M., Lamari, L. & Brûlé-Babel, A. 1998. Inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexaploid wheats. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 401-407.
- Gerard, G.S., Börner, A., Lohwasser, U. & Simón, M.R. 2017. Genome-wide association mapping of genetic factors controlling Septoria tritici blotch resistance and their associations with plant height and heading date in wheat. *Euphytica* 213(1), 27.
- Gilchrist, S.L. 1992. Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in CIMMYT bread wheat germplasm. Proceedings of the 2nd international tan spot workshop. Advances in tan spot research. North Dakota State University, Fargo. pp. 44-49.
- Gilchrist, S.L., Fuentes, S. & de la Isla de Bauer, M. 1984. Identificación de *Helminthosporium tritici-repentis* (= *Pyrenophora trichostoma*) agente causal de un tizón de la hoja de trigo en México. *Agrociencia* 56: 151-162.
- Gill, K.S.Y. & Gill, B.S. 1994. Higher level of recombination in wheat is due to more cross-overs/arm and localized recombination hot-spots, in Plant Genome II. The second International Conference on the Plant Genome, San Diego, 64 p.
- Gupta, S., Loughman, R. 2001. Current virulence of *Pyrenophora teres* on barley in Western Australia. *Plant Disease* 85(9), 960-966.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. & Kulwal, P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* 57:461-485.
- Gurung, S., Bonman, J.M., Ali, S., Patel, J., Myrfield, M., Mergoum, M., Singh, P.K. & Adhikari, T.B. 2009. New and diverse sources of multiple disease resistance in wheat. *Crop Science* 49:1655-1666.
- Gurung, S., Mamidi, S., Bonman, J.M., Jackson, E.W., del Río, L.E., Acevedo, M. & Adhikari, T.B. 2011. Association analysis of quantitative trait loci conferring tan spot resistance in spring wheat landraces. *Theoretical and Applied Genetics* 123:1029-1041.
- Gurung, S., Mamidi, S., Bonman, J.M., Xiong, M., Brown-Guedira, G. & Adhikari, T.B. 2014. Genome-wide association study reveals novel quantitative trait loci associated with resistance to multiple leaf spot diseases of spring wheat. *PLoS One*, 9(9), e108179.
- Hammer, K. 1984. The domestication syndrome. *Kulturpflanze* 32:11-34 (in German).
- Hirschhorn, J.N. & Daly, M.J. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* 6:95-108.
- Hosford, R.M.Jr. 1971. A form of *Pyrenophora trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathology* 61: 28-32.
- Hosford, R.M.Jr. 1981. Tan Spot. En: Tan Spot of Wheat and Related Diseases. Workshop. Ed. Hosford, R.M. Jr. North Dakota State University, Fargo. pp. 1-24.
- Hosford, R.M.Jr & Busch, R.H. 1974. Losses in wheat caused by *Pyrenophora trichostoma* and *Leptosphaeria avenaria* f. sp. triticea. *Phytopathology* 64: 184-187.
- Hunger, R.M. & Brown, D.A. 1987. Colony color, growth, sporulation, fungicide sensitive and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease* 71: 907-910.
- Hussain, S.S. & Rivandi, A. 2007. Molecular breeding for drought tolerance in plants: wheat prospective. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* 44:35-62.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, K. & Kilian, A. 2001. Diversity arrays: a solidstate technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29:1-7.
- Jantasuriyarat, C., Vales, M.I., Watson, C.J.W. & Riera-Lizarazu, O. 2004. Identification and mapping of genetic loci affecting the free threshing habit and spike

- compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108:261–273.
- Jecke, F.A. 2015. Caracterización de nuevos aislados de *Drechslera tritici-repentis* y su efecto sobre el comportamiento de cultivares de trigo (Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales).
- Joshi, A.K., Azab, M., Mosaad, M., Moselhy, M., Osmanzai, M., Gelalcha, S., Bedada, G. *et al.* 2011. Delivering rust resistant wheat to farmers: a step towards increased food security. *Euphytica* 179:187-196.
- Kang, H.M., Zaitlen, N.A., Wade, C.M., Kirby, A., Heckermann, D., Daly, M.J. & Eskin, E. 2008. Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178:1709-1723.
- Kariyawasam, G.K., Carter, A.H., Rasmussen, J.B., Faris, J., Xu, S.S., Mergoum, M. & Liu, Z. 2016. Genetic relationships between race-nonspecific and race-specific interactions in the wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. *Theoretical and applied genetics*, 129(5), 897-908.
- Kema, G.H. & 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(3), 266-272.
- Kihara, H. 1944. Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (Japanese). *Agricultural and Horticulture* 19:13-14.
- Koeck, M., Hardham, A.R. & Dodds, P.N. 2011. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology*, 13: 1849-1857.
- Kohli, M., Mehta, Y.R. & Ackermann, M. 1992. Spread of Tan Spot in the Southern Cone region of South America. Proceedings of the 2nd international tan spot workshop. Advances in tan spot research. North Dakota State University, Fargo. pp. 86–90.
- Kollers, S., Rodemann, B., Ling, J., Korzun, V., Ebmeyer, E., Argillier, O., Hinze, M., Plieske, J., Kulosa, D., Ganai, M.W. & Röder, M.S. 2013. Whole genome association mapping of Fusarium head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 8:e57500.
- Kollers, S., Rodemann, B., Ling, J., Korzun, V., Ebmeyer, E., Argillier, O., ... & Röder, M.S. 2014. Genome-wide association mapping of tan spot resistance (*Pyrenophora tritici-repentis*) in European winter wheat. *Molecular breeding*, 34(2), 363-371.
- Kremer, M., Hoffmann, G.M. 1992. Effect to *Drechslera tritici-repentis* as the cause of wheat yellow leaf spot disease on kernel yield and dry matter production. *Journal of Phytopathology*, 99: 509-605.
- Krupinsky, J.M. 1987. Pathogenicity on wheat of *Pyrenophora tritici-repentis* isolated from *Bromus inermis*. *Phytopathology* 77: 760-765.
- Krupinsky, J.M. 1992. Grass host of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease* 76: 92-95.
- Krupinsky J.M., Halvorson A.D., Tanaka, D.L. & Merrill, S.D. 2007. Nitrogen and tillage effects on wheat leaf spot diseases in the northern Great Plains. *Agronomy Journal*, 99: 562-569.
- Lamari, L. & Bernier, C.C. 1989a. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) based on type lesions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 49-56.
- Lamari, L. & Bernier, C.C. 1989b. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 284-290.
- Lamari, L. & Bernier, C.C. 1991. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 81: 1092-1095.



- Lamari, L. & Gilbert, J. 1998. Toward a coherent model of host-pathogen interactions in tan spot of wheat: An epilogue to the Third International Workshop on Tan Spot of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 440-443.
- Lamari, L., Sayoud, R., Boulif, M. & Bernier, C.C. 1995. Identification a new race in *Pyrenophora tritici-repentis*: implications for the current pathotype classification system. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17: 312-318.
- Lamari, L., Gilbert, J. & Tekauz, A. 1998. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 396-400.
- Lamari, L., Strelkov, S.E., Yahyaoui, A., Orabi, J. & Smith, R.B. 2003. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology* 93: 391-396.
- Lamari, L., Mc Callum, B.D. & de Pauw, R.M. 2005. Forensic pathology of Canadian bread wheat: The case of Tan Spot. *Phytopathology* 95: 144-152.
- Landjeva, S., Korzun, V. & Borner, A. 2007. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156:271–296.
- Leisová, L., Hanzalová, A. & Kucera, L. 2008. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *Journal of Plant Pathology* 90: 223-245.
- Lepoint, P., Renard, M.E., Legrève, A., Duveiller, E. & Maraite, H. 2010. Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 100: 474-483.
- Li, H.B., Yan, W., Liu, G.R., Wen, S.M., & Liu, C.J. 2011. Identification and validation of quantitative trait loci conferring tan spot resistance in the bread wheat variety Ernie. *Theoretical and applied genetics*, 122(2), 395-403.
- Liu, B. 1998. *Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis* CRC Press, Boca Raton, 648 p.
- Luz da W.C. & Hosford, R.M.Jr. 1980. Twelve *Pyrenophora trichostoma* races for virulence to wheat in the central plains of North America. *Phytopathology* 70: 1193-1196.
- Manning, V.A., Pandelova, I. & Ciuffetti, L. M. 2002. A race for a novel host-selective toxin. (Abstr.) *Phytopathology* 92: S51.
- Mao, S.L., Wei, Y.M., Cao, W., Lan, X.J., Yu, M., Chen, Z.M., ... & Zheng, Y.L. 2010. Confirmation of the relationship between plant height and Fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. *Euphytica*, 174(3), 343-356.
- Martínez, J.P., Ottum, S.A., Ali, S., Francl, L.J. & Ciuffetti, L.M. 2001. Characterization of the ToxB gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 675-677.
- Martínez, J.P., Oesch, N.W. & Ciuffetti, L.M. 2004. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, ToxB, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17: 467-474.
- Mcfadden, E.S. & Sears, E.R. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* 37:81-89.
- Mendez, M.J. & Buschiazzo, D.E. 2010. Wind erosion risk in agricultural soils under different tillage systems in the semiarid Pampas of Argentina. *Soil and Tillage Research*, 106(2), 311-316.
- Mehta Y.R. & Gaudencio, C.A. 1991. The effects of tillage practices and crop rotation on the epidemiology of some major wheat diseases. En: *Wheat for the Nontraditional Warm Areas*. Ed. D.E Saunders. Mexico. pp. 266-283.
- Mehta, Y.R., Mehta, A. & Riede, C.R. 2004. Molecular and pathogenic variability of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates causing tan spot of wheat in the state of Paraná, Brazil. *Summa Phytopathologica* 30: 436-444.

- Meinhardt, S., Ali, S., Ling, H. & Francl, L. 2003. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host-selective toxin. Proceedings of the Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop. *North Dakota Agricultural Experiment Station*. pp 117-121.
- Mergoum, M., Singh, P., Ali, S., Elias, E., Anderson, J., Glover, K. & Adhikari, T. 2007. Reaction of elite wheat genotypes from the northern Great Plains of North America to Septoria diseases. *Plant Disease* 91:1310–1315.
- Miedaner, T.H. & Korzun, V. 2012. Marker-Assisted Selection for Disease Resistance in Wheat and Barley Breeding, *Phytopathology*, 102:560-566.
- Miedaner, T., Zha, Y., Gowda, M., Longin, C.F.H., Korzun, V., Ebmeyer, E., Kazman, E. & Reif, J.C. 2013. Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in European wheat. *BMC Genomics* 14: 858.
- Mihtra, M.A. 1934. Leaf spot disease of wheat caused by *Helminthosporium tritici-repentis* Died. *Indian Journal of Agricultural Science* 4: 692-700.
- Mikhailova, L.A., Ternyuk, I.G. & Mironenko, N.V. 2010. *Pyrenophora teres*, an agent causing wheat leaf spot. *Microbiology* 79:561-565.
- Miralles, D.J. & Slafer, G.A. 2007. Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *The Journal of Agricultural Science* 145:139–149.
- Misra, A.P. & Singh, R.A. 1972. Pathogenic differences among three isolates of *Helminthosporium tritici-repentis* and the performance of wheat varieties against them. *Indian Phytopathology* 25: 350-353.
- Moreno, M.V. 2007. Caracterización cultural, patogénica, genética y bioquímico-molecular de *Pyrenophora tritici-repentis* en Argentina. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 188 pp.
- Moreno M.V. & Perelló, A.E. 2010. Occurrence of *Pyrenophora tritici-repentis* causing tan spot in Argentina. En: Management of Fungal Pathogens: Current Trends and Progress. Eds A. Arya & A. Perelló. Buenos Aires, La Plata. pp. 275-290.
- Moreno, M.V., Stenglein, S.A., Perelló, A.E. & Balatti, P.A. 2008. Pathogenic and genetic diversity of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* causing tan spot of wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 122:239-252.
- Moreno, M.V., Arambarri, A.M. & Perelló, A. 2011. Diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from the Argentinian wheat growing area: morphocultural and pathogenic analysis. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*.1: 365-382.
- Moreno, M.V., Stenglein S.A. & Perelló, A.E. 2012. *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot: a review of intraspecific genetic diversity. En: *Genetic Diversity / Book 2*. Ed. Maahmut Caliskan (INTECH publisher). pp 297-330.
- Moreno, M.V., Stenglein, S.A. & Perelló, A.E. 2014. Distribution of races and Tox genes in *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from wheat in Argentina. *Tropical Plant Pathology* 40(2):141-146.
- Motovilín, A.A. 2000. The response of oat cultivars to fungicide application against leaf blight. *Zashchita i Karantin Rastenii*, (10).
- Moya, P. 2017. Antagonismo y efecto biocontrolador de *Trichoderma spp.* sobre *Drechslera teres*, agente causal de la "mancha en red" de la cebada (*Hordeum vulgare L. var. vulgare*). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Oliver, R.E., Cai, X., Wang, R.C., Xu, S.S., Friesen, T.L. 2008. Resistance to tan spot and Stagonospora nodorum blotch in wheat-alien species derivatives. *Plant Disease* 92:150–157.
- Patel, J.S., Mamidi, S., Bonman, J.M., Adhikari, T.B. 2013. Identification of QTL in spring wheat associated with resistance to a novel isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Crop Science* 53:453–483.
- Paterson, A.H., DeVerna, J.W., Lanini, B. & Tanksley, S.D. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124:735–742.

- Pecchia, S., Mercatelli, E., & Vannacci, G. 1998. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. *FEMS Microbiology Letters*, 166(1), 21-27.
- Perelló, A.E., Moreno, M.V., Simón, M.R. & Sisterna, M. 2003. Tan spot of wheat (*Triticum aestivum* L.) infection and different stages of crop development and inoculum type. *Crop Protection*, 22: 157-169.
- Perelló, A.E., Yannicari, M., Castro, A.M. & Moreno, M.V. 2012. Genetic analysis and comparative virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat in Argentina. *African Journal of Microbiology Research* 6: 5558-5567.
- Perello, A.E., Couretot, L., Curti, A., Uranga, J.P., & Consolo, V.F. 2019. First report of spot lesion of wheat caused by *Pyrenophora teres* f. sp *maculata* observed in Argentina. *Crop Protection* 122: 19-22.
- Perez-Lara, E., Semagn, K., Tran, V.A., Ciechanowska, I., Chen, H., Iqbal, M., N'Diaye, A., Pozniak, C., Strelkov, S.E., Hucl, P.J., Graf, R.J., Randhawa, H., Spaner, D. 2017. Population Structure and Genome wide Association Analysis of Resistance to Disease and Insensitivity to Ptr Toxins in Canadian Spring Wheat Using 90K SNP Array. *Crop Science* 57:1-18.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E. & Jannink, J.L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7(2):e32253.
- Pujol Vieira dos Santos, A.M., Santos Matsumura, A.T. & Van der Sand, S.T. 2002. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by a random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetic and Molecular Biology* 25: 243-250.
- Rajaram, S. 1999. Historical aspects and future challenges of an international wheat program. In: M. van Ginkel, Mc Nab, A., Krupinsky J. (eds.), *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals. A compilation of global research*. CIMMYT, México, pp.1-17.
- Raymond, P.J., Bockus, W.W. 1982. An in vitro technique for profuse sporulation of *Drechslera tritici-repentis*, (Abstr.). *Phytopathology* 72, 934.
- Rees L.G. & Platz, G.J. 1979. The occurrence and control of yellow spot of wheat in North-Eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 19: 369-372.
- Rees L.G. & Platz, G.J. 1980. The epidemiology of yellow leaf spot of wheat in Southern Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research* 31: 259-267.
- Rees, R.G. & Syme, J.R. 1981. Epidemics of stem rust and their effects on grain yield in the wheat WW15 and some of its derivatives. *Australian Journal of Agricultural Research* 32, 725-730.
- Rees, L.G., Platz, G.J. & Mayer, R.J. 1982. Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers an plots. *Australian Journal of Agricultural Research* 33: 899-908.
- Rees, I.G. & Platz, G.J. 1983. Effects of yellow spot of wheat in Southern Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 39-46
- Rees, L.G. & Platz, G.J. 1990. Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in bread wheats. *Euphytica* 45: 59-69.
- Rees L.G. & Platz, G.J. 1992. Tan Spot and its control-Some Australian experiences. Proceedings of the 2nd international tan spot workshop. Advances in tan spot research. North Dakota State University, Fargo. pp. 1-9.
- Reis, E.M., Casa, R.T. & Medeiros, C.A. 2001. Diagnose, patometria e controle de Doenças de cereais de Inverno. Londrina: E. S. Comunicação S/C Ltda, 2001. 94 p.
- Reynolds, M.P. & Borlaug, N.E. 2006. Impacts of breeding on international collaborative wheat improvement. *The Journal of Agricultural Science* 144:3-17.
- Riede, C.R., Francl, L.J., Jordahl, J.G. & Meinhardt S.W. 1996. Additional sources of resistance to tan spot of wheat. *Crop Science* 36: 771-777.

- Rosegrant, M.W. & Agcaoili, M. 2010. Global food demand, supply, and price prospects to 2010. Washington, DC: *International Food Policy Research Institute*.
- Schierenbeck, M., Fleitas, M.C., Simón, M.R. 2014. Componentes ecofisiológicos involucrados en la generación de biomasa afectados por enfermedades foliares en trigo. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, ISSN: 0080-2069 (impresa) y 2314369X (en línea), Pág. 247-250.
- Schierenbeck, M., Fleitas, M.C., Mirales, D.J., Simón, M.R. 2016. Does radiation interception or radiation use efficiency limit the growth of wheat inoculated with tan spot or leaf rust? *Field Crop Research*, 199:65-76.
- Schilder, A.M.C., Bergstrom, G.C. 1990. Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathology*, 80: 84-90.
- Schilder, A.M.C. & G.C. Bergstrom. 1994. Infection of wheat seed by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany* 72: 510-519.
- Schutt de Varini, L.S., Formento, Á.N., Velázquez, P.D., & Velázquez, J.C. 2013. Comportamiento de cultivares de trigo a mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis*) en lotes con diferentes antecesores. *Revista Agromercado. Cuadernillo Clásico de Trigo N°174*. pp. 21-24. ISSN 1515-223X.
- Sears, E.R. 1954. The aneuploids of common wheat. *Missouri Agricultural Experiment Station Research bulletin* 572:1-58.
- Sharp, E.L., Sally, B.K. & Mc Neal, F.H. 1976. Effect of *Pyrenophora* wheat leaf blight on the thousand kernel weight of 30 spring wheat cultivars. *Plant Disease* 60: 135-138.
- Sheridan, J.E. 1977. *Drechslera* spp. and other seed-borne pathogenic fungi in New Zealand cereals. *New Zealand journal of agricultural research*, 20(1), 91-93.
- Shewry, P.R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60:1537–1553.
- Shewry, P.R. & Hey, S.J. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy* 178–202.
- Shoemaker, R.A. 1962. *Drechslera lto*. *Canadian Journal of Botany*, 40(6), 809-836.
- Simón, M.R., Worland, A.J. & Struik, P.C. 2004. Influence of plant height and heading date on the expression of the resistance to *Septoria tritici* blotch in near isogenic lines of wheat. *Crop science*, 44(6), 2078-2085.
- Simón, M.R., Ayala, F., Terrile, I., Golik, S., Perelló, A., Cordo, C.A. & Chidichimo, H. 2011. Integrated foliar disease management to prevent yield loss in Argentinean wheat production. *Agronomy Journal*, 103:1441-1451
- Singh, R.P., Ma, H., Rajaram, S. 1995. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease*, 79:238-240.
- Singh, P.K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T.B., Elias, E.M., Anderson, J.A., Glover, K.D. & Berzonsky, W.A. 2006. Evaluation of elite wheat germplasm for resistance to tan spot. *Plant Disease* 90: 1320–1325.
- Singh, P.K., Singh, R.P., Duveiller, E., Mergoum, M., Adhikari, T.B. & Elias, E.M. 2010. Genetics of wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica* 171: 1-13.
- Singh, P.K., Crossa, J., Duveiller, E., Singh, R.P. & Djurle, A. 2016. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYT's historical bread wheat set. *Euphytica*, 207(3): 515-525.
- Statista, 2018. [www.statista.com/statistics/267268/production-of-wheat-worldwide-since-1990/](http://www.statista.com/statistics/267268/production-of-wheat-worldwide-since-1990/). Ultimo acceso: 3/10/2018
- Strelkov, S.E. & Lamari, L. 2003. Host-parasite interaction in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 339-349.
- Strelkov, S.E., Lamari, L., Sayoud, R. & Smith, R.B. 2002. Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 29-35.
- Strelkov, S.E., R.F. Kowatsch, G.M. Balance & L. Lamari. 2006. Characterization of the Tox B gene from North America and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 164-170.

- Stuber, C.W., Lincoln, S.E., Wolff, D.W., Helentjaris, T. & Lander, E.S. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132:823–839.
- Sukumaran, S. & Yu, J. 2014. Association mapping of genetic resources: achievements and future perspectives, in: Tubersoa R, Garner A, Frison E (eds) *Genomics of Plant Genetic Resources*, 207–235 pp.
- Sun, X.C., Bockus, W., Bai, G.H. 2010. Quantitative trait loci for resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in a Chinese wheat. *Phytopathology* 100:468–473.
- Tabib Ghaffary, S.M. 2011. Efficacy and mapping of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Doctoral Thesis Wageningen University, Wageningen, NL 233 p.
- Tadesse, W., Hsam, S.L.K., Wenzel, G. & Zeller, F.J. 2006a. Identification and monosomic analysis of tan spot resistance genes in synthetic wheat lines (*Triticum turgidum* L. x *Aegilops tauschii* Coss.). *Crop Science* 46: 1212–1217.
- Tadesse, W., Hsam, S.L.K. & Zeller, F.J. 2006b. Evaluation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars for tan spot resistance and chromosomal location of a resistance gene in cultivar ‘Salamouni’. *Plant Breeding* 125:318–322.
- Tadesse, W., Reents, H.J., Hsam, S.L.K. & Zeller, F.J. 2010. Relationship of seedling and adult plant resistance and evaluation of wheat germplasm against tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 58:339–346.
- Tadesse, W., Ogonnaya, F.C., Jighly, A., Nazari, K., Rajaram, S. & Baum, M. 2014. Association mapping of quantitative resistance to stripe rust (*Puccinia tritici*) in winter wheat cultivars and elite genotypes targeted to the CWANA region. *Crop Science* 54:607–616.
- Talbot, P.H.B. 1973. On the genus *Helminthosporium sensu lato*. *Australian Plant Pathology Society Newsletter*, 2(2), 3-7.
- Tanksley, S.D., 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205–233.
- Tekauz, A. 1983. Reaction of Canadian barley cultivars to *Pyrenophora graminea*, the incitant of leaf stripe. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 5(4), 294-301.
- Thornsberry, J.M., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D. & Buckler, E.S. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetic* 28:286–289.
- Tonin, R.B., Reis, E.M. & Gómez, D.E. 2015. Sensibilidad a fungicidas in vitro de micelios de *Drechslera siccans* aislada a partir de trigo. RIA. *Revista de investigaciones agropecuarias*, 41(2), 192-200.
- Tóth, B., Csősz, M., Kopahnke, D. & Varga, J. 2008. First report on *Pyrenophora teres* causing lesions of wheat leaves in Hungary. *Plant Pathology*, 57(2), 385-385.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. & Dubcovsky, J. 2006. ANAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat. *Science* 314:1298–1301.
- Uranga, J.P., Schierenbeck, M., Perelló, A.E., Borner, A. & Simón, M.R. 2015. Variabilidad en la resistencia a mancha amarilla en genotipos de trigos primaverales de diversos orígenes. *Fave. Sección ciencias agrarias*, 14(2), 0-0.
- Utermark, M. 1995. Sobrevivencia de *Drechslera teres* en el rastrojo de cebada. VI Reunión Nacional de Investigaciones de Cebada. Latu, Bahía Blanca, Argentina, 6-7.
- Van Ginkel, M., Rajara, S. 1993. Breeding for durable resistance to disease in wheat: an international perspective. In: Jacobs T, Parlevliet JE (Eds.) *Durability of disease resistance*. Dordrecht: Kluwer Academics, pp 259-272.
- Vanderplank, J.E. 1963. *Disease resistance in plants*. Ed. Academic Press. Inc. Orlando, Florida. 206 pp.
- Vanderplank, J.E. 1978. *Genetic and molecular basis of plant pathogenesis*. Ed. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 167 pp.

- Vanzetti, L.S., Yerkovich, N., Chialvo, E., Lombardo, L., Vaschetto, L. & Helguera, M. 2013. Genetic structure of argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and Molecular Biology* 36:391-399.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.
- Wanjugi, H., Coleman-Derr, D., Huo, N., Anderson, O. & Gu, Y.Q. 2009. Rapid development of PCR-based genome-specific repetitive DNA junction markers in wheat. *Genome* 52:576–587.
- Wegulo, S.N. 2011. Tan spot of cereals. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2011-0426-01. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/TanSpot.aspx>. Último acceso: octubre de 2018.
- Wenzel, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A. & Kilian, A. 2004. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9915–9920.
- Wheat initiative. 2015. Disponible en [http://www.wheatinitiative.org/sites/default/files/attached\\_file/wheatinitiative\\_vision\\_document.pdf](http://www.wheatinitiative.org/sites/default/files/attached_file/wheatinitiative_vision_document.pdf). Último acceso junio 2018.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York, 315-322 pp. 315-322.
- Whitt, S.R. & Buckler, E.S. 2003. Using natural allelic diversity to evaluate gene function. *Methods in Molecular Biology* 236: 123-139.
- Wicker, T., Mayer, K.F.X., Gundlach, H., Martis, M., Steuemagel, B., *et al.* 2011. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *Plant Cell* 23:1706–1719.
- Wiese, M.V. 1987. Compendium of wheat diseases. Ed. *The American phytopathological Society*. St. Paul. 106 pp.
- Williams, K.J., Smyl, C., Lichon, A., Wong, K.Y., Wallwork, H. 2001. Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australas Plant Pathology*. 30:37–44
- Wiik, L. 2009. Control of fungal diseases in winter wheat. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp. pp. 19.
- Witcombe, J.R. & Virk, D.S. 2001. Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. *Euphytica* 122:451–462.
- Wright, K.H. & Sutton, J.C. 1990. Inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* in relation to epidemics of tan spot of winter wheat in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12: 149-157.
- Young, R.A. & Kelly, J.D. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. *Crop Science* 37: 940-946.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., *et al.* 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38:203-208.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.
- Zhang, G. & Berbee, M.L. 2001. *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 1048-1063.
- Zhang, X. & Jin, Y. 1998. Sensitivity of Ptr ToxA and tan spot infection responses in *Aegilops/Triticum* complex. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 415–418.

- Zhang, H., Francl, L.J., Jordahl, J.G. & Meinhardt, S.W. 1997. Structural and physical properties of a necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 87: 154-160.
- Zhu, C., Gore, M., Buckler E. & Yu, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1:5-20.
- Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades de cereales de grano pequeño. Ed. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT. El Batán, México. 142 pp.
- Zwart, R.S., Thompson, J.P., Milgate, A.W., Bansal, U.K., Williamson, P.M., Raman, H., Bariana, H.S. 2010. QTL mapping of multiple foliar disease and root-lesion nematode resistances in wheat. *Molecular breeding* 26:107–124.

## Anexo

**Tabla A.** Días a espigazón (DAE) de los 30 cultivares de trigo evaluados en dos ambientes, a campo y macetas.

CULTIVAR DE TRIGO Y CRIADERO	DIAS A ESPIGAZON (DAE)	
	Maceta	Campo
Buck Bellaco	115	119
Buck SY 200	105	119
Buck Meteoro	115	119
Buck SY 110	115	119
Buck SY 211	115	119
Biolnta 3005	115	120
Biolnta 3006	115	119
Biolnta 3008	115	119
ACA 315	119	120
ACA 303 Plus	119	120
ACA 356	119	120
ACA Cedro	119	120
ACA 320	119	120
ACA 602	105	117
ACA 307	122	123
ACA 360	120	122
ACA Cipres	123	122
Baguette Premiun 11	119	119
Baguette 801 Premiun	124	123
Klein Gladiador	123	119
Klein Flamenco	124	119
Klein Yarara	119	119
Klein Titanio	119	117
Klein Serpiente	123	120
Bioceres Timbo	123	122
Sursem Nogal	115	118
Don Mario Algarrobo	119	119
AGSeed Floripan 200	123	119
Sursem Lapacho	119	119
Sursem LE 2330	119	119
<b>DAE PROMEDIO</b>	<b>118,13</b>	<b>119,63</b>
<b>DAE MÁXIMO</b>	<b>124</b>	<b>123</b>
<b>DAE MÍNIMO</b>	<b>105</b>	<b>117</b>



**Tabla B.** Porcentaje de severidad en plántula (PSP) de 30 cultivares de trigo en dos ambientes, inoculados con tres aislamientos (H017, Dt1 y Dt2).

Criadero y nombre del cultivar de trigo	Ambiente		Media cultivar
	campo	maceta	
Buck Bellaco	27,33	22,17	24,75
Buck SY 200	20,48	2,17	11,33
Buck Meteoro	23,15	38,75	30,95
Buck SY 110	10,06	4,93	7,49
Buck SY 211	13,96	5,90	9,93
BioInta 3005	13,17	10,33	11,75
BioInta 3006	22,00	5,07	13,53
BioInta 3008	7,33	2,50	4,92
ACA 315	14,40	45,00	29,70
ACA 303 Plus	10,33	49,67	30,00
ACA 356	26,00	39,00	32,50
ACA Cedro	23,50	6,00	14,75
ACA 320	9,42	19,17	14,29
ACA 602	33,33	43,00	38,17
ACA 307	20,72	6,83	13,78
ACA 360	19,92	36,90	28,41
ACA Cipres	30,51	20,70	25,61
Baguette Premiun 11	28,92	46,17	37,54
Baguette 801 Premiun	9,06	8,67	8,86
Klein Gladiador	21,83	58,50	40,17
Klein Flamenco	6,79	25,33	16,06
Klein Yarara	32,17	34,33	33,25
Klein Titanio	20,83	33,00	26,92
Klein Serpiente	18,00	57,50	37,75
Bioceres Timbo	16,00	24,17	20,08
Sursem Nogal	8,83	38,83	23,83
Don Mario Algarrobo	10,00	8,83	9,42
AGSeed Floripan 200	23,71	58,17	40,94
Sursem Lapacho	13,39	30,83	22,11
Sursem LE 2330	22,50	77,00	49,75
<b>Promedios por ambiente</b>	<b>18,59</b>	<b>28,65</b>	
<b>Promedio general</b>			<b>23,62</b>
<b>LSD (0,05) interacción ambiente x cultivar = 26,5</b>			

Verde oscuro: resistente; Verde claro: moderadamente resistente  
Amarillo: moderadamente susceptible; Rojo: Susceptible

**Tabla C.** Porcentaje de severidad en estado adulto (PSA) de 30 cultivares de trigo frente a dos aislamientos de *P. teres* (Dt1 y Dt2) y uno de *P. tritici-repentis* (H017), en dos ambientes.

Criadero y nombre del cultivar de trigo	AMBIENTE						Media cultivar
	Campo			Maceta			
	Dt1	Dt2	H017	Dt1	Dt2	H017	
Buck Bellaco	16,75	8,38	13,53	6,94	8,06	5,00	9,78
Buck SY 200	45,20	43,40	43,28	24,30	15,29	19,61	31,85
Buck Meteoro	32,68	19,63	32,98	12,00	47,71	41,66	31,11
Buck SY 110	19,60	13,40	18,85	14,19	2,56	4,31	12,15
Buck SY 211	20,98	27,35	17,70	13,09	8,48	16,88	17,41
Biolnta 3005	36,13	36,00	25,78	7,41	9,10	12,50	21,15
Biolnta 3006	31,13	31,18	19,85	3,53	1,33	3,14	15,03
Biolnta 3008	46,38	38,10	35,20	4,78	15,60	25,68	27,62
ACA 315	18,95	15,78	24,20	20,63	32,77	19,85	22,03
ACA 303 Plus	14,05	7,93	9,50	10,59	17,13	18,61	12,97
ACA 356	39,25	34,20	22,28	13,36	13,94	16,50	23,26
ACA Cedro	19,61	22,31	16,08	11,13	8,29	9,29	14,45
ACA 320	46,88	23,20	21,18	6,47	25,21	16,13	23,18
ACA 602	57,13	49,88	51,50	36,71	31,75	16,46	40,57
ACA 307	25,83	38,28	19,23	7,88	22,27	5,53	19,84
ACA 360	29,83	46,53	32,95	27,28	31,02	26,76	32,40
ACA Cipres	56,35	53,38	69,88	19,90	29,48	17,30	41,05
Baguette Premiun 11	24,68	51,58	44,75	24,85	15,65	8,08	28,27
Baguette 801 Premiun	14,83	22,62	11,85	12,88	20,71	42,78	20,95
Klein Gladiador	37,53	33,75	33,53	11,31	26,56	36,06	29,79
Klein Flamenco	9,90	24,20	7,03	28,22	19,88	14,73	17,33
Klein Yarara	16,40	37,63	37,55	3,47	14,79	11,93	20,30
Klein Titanio	23,43	25,08	26,45	10,45	13,42	9,99	18,14
Klein Serpiente	24,38	22,13	31,08	37,68	51,42	20,38	31,18
Bioceres Timbo	11,18	1,78	2,80	9,66	14,13	3,30	7,14
Sursem Nogal	13,40	8,38	11,15	13,18	4,33	18,50	11,49
Don Mario Algarrobo	12,33	5,80	12,40	1,60	0,94	3,41	6,08
AGSeed Floripan 200	24,65	29,83	41,48	38,53	36,58	61,88	38,83
Sursem Lapacho	13,98	15,70	18,45	9,36	31,81	16,36	17,61
Sursem LE 2330	34,88	39,53	41,75	28,78	47,40	53,31	40,94
Prom amb y aislamiento	27,28	27,56	26,47	15,67	20,59	19,20	
Promedios por ambiente		27,11			18,49		
Promedio general							22,80

LSD (0,05) interacción triple = 14,4

Verde oscuro: resistente (0-15%); Verde claro: moderadamente resistente (15-30%)

Amarillo: moderadamente susceptible (30-45%); Rojo: Susceptible (> a 45%)

**Tabla D.** Altura de planta (ADP) en cm y días a espigazón (DAE) de 110 genotipos de trigo en dos años de ensayo.

Genotipo	ADP (Altura de planta en cm)		DAE (Días a espigazón)	
	2014	2015	2014	2015
1	150,50	139,17	96	109
2	120,00	118,00	96	113
3	128,17	120,17	82	100
4	139,67	131,50	96	116
5	129,33	110,50	77	95
6	135,67	120,83	91	109
7	140,83	141,33	96	116
8	129,17	123,50	77	95
9	140,50	121,67	93	109
10	147,33	149,33	100	116
11	118,67	109,50	96	106
12	130,67	127,83	78	95
13	144,67	145,67	100	113
14	139,50	142,00	93	106
15	146,67	149,83	88	100
16	157,00	149,83	91	109
17	143,00	154,83	86	102
18	133,67	137,33	79	98
19	146,50	145,00	84	105
20	138,50	140,17	98	115
21	109,50	108,67	104	121
22	154,50	148,83	88	106
23	152,17	142,83	88	105
24	145,50	143,17	100	109
25	136,67	150,67	86	105
26	130,50	131,00	86	102
27	144,67	145,33	102	114
28	134,50	150,67	86	105
29	135,50	147,67	86	102
30	132,33	132,50	100	116
31	120,33	120,67	98	116
32	142,17	143,00	82	102
33	141,00	130,83	84	109
34	149,17	150,50	98	115
35	154,17	150,50	96	115
36	148,17	149,00	102	116
37	142,33	141,17	96	117
38	128,33	122,17	96	115
39	132,33	138,33	88	107
40	150,00	148,00	98	113

---

41	153,83	151,00	98	113
42	149,67	152,67	98	114
43	122,83	120,33	98	113
44	130,33	129,83	98	114
45	141,50	140,83	100	114
46	140,33	138,33	98	113
47	151,83	152,17	91	106
48	128,00	137,33	98	108
49	134,17	133,00	106	116
50	125,33	137,00	98	113
51	122,33	123,33	100	109
52	127,17	126,17	98	116
53	132,17	131,00	100	113
54	146,83	146,33	102	115
55	121,50	121,00	108	121
56	123,83	123,83	108	121
57	129,17	127,67	107	119
58	135,50	141,83	75	90
59	146,83	144,00	86	102
60	150,17	149,50	96	106
61	150,50	140,83	96	109
62	124,50	125,17	104	116
63	132,83	131,67	102	116
64	149,00	145,83	93	109
65	137,17	139,83	91	106
66	148,17	150,33	86	102
67	157,17	156,67	77	109
68	134,33	134,33	88	115
69	153,17	136,83	93	106
70	154,17	141,33	93	108
71	148,17	149,17	98	116
72	143,67	145,50	91	107
73	162,33	137,00	88	106
74	148,33	148,00	93	109
75	141,17	128,33	88	106
76	121,00	150,50	106	116
77	115,67	116,17	103	114
78	125,33	124,00	103	100
79	127,33	125,83	102	113
80	146,00	146,50	91	109
81	137,67	135,83	98	109
82	147,50	147,17	78	98
83	136,67	137,17	93	109
84	74,67	69,00	72	90

---

<b>85</b>	155,67	150,00	76	95
<b>86</b>	115,83	125,50	77	106
<b>87</b>	142,50	143,17	86	109
<b>88</b>	142,33	135,67	96	107
<b>89</b>	136,33	137,67	91	109
<b>90</b>	142,67	143,83	91	106
<b>91</b>	134,00	124,67	88	102
<b>92</b>	138,67	130,17	88	102
<b>93</b>	142,33	142,17	84	102
<b>94</b>	135,17	127,00	84	102
<b>95</b>	129,00	139,67	82	102
<b>96</b>	124,33	143,33	88	106
<b>97</b>	141,67	129,83	91	106
<b>98</b>	132,67	135,83	91	106
<b>99</b>	133,33	153,33	77	93
<b>100</b>	139,83	145,67	77	95
<b>101</b>	92,33	90,00	88	107
<b>102</b>	149,00	150,67	77	95
<b>103</b>	140,33	141,83	79	98
<b>104</b>	147,33	141,33	82	106
<b>105</b>	141,50	136,50	77	93
<b>106</b>	145,67	131,67	88	105
<b>107</b>	144,00	142,33	77	95
<b>108</b>	133,33	145,83	93	106
<b>109</b>	76,17	78,67	82	91
<b>110</b>	101,50	100,50	107	121
<b>Promedio</b>	<b>136,65</b>	<b>135,73</b>	<b>91,53</b>	<b>107,60</b>

**Tabla E.** Porcentaje de severidad en adulto (PSA) en 110 genotipos de trigo, frente a cuatro aislamientos y en dos ambientes (años).

Genotipos	<i>P. tritici repentis</i>				<i>P. teres</i>				Media genotipos
	H017		G0327		Dt1		Dt2		
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015	
1	31,54	41,35	51,78	65,99	58,69	44,98	42,08	69,49	50,74
2	70,31	76,01	60,85	80,73	61,69	74,68	62,58	88,93	71,97
3	58,43	79,51	58,66	82,39	48,97	77,06	58,19	67,69	66,36
4	90,31	70,88	90,60	88,82	68,19	80,86	84,33	90,19	83,02
5	71,36	80,56	59,87	100,00	53,07	88,09	68,65	97,54	77,39
6	96,87	67,92	81,55	87,87	74,79	96,60	83,05	88,49	84,64
7	82,31	66,38	65,85	79,07	75,19	59,86	72,58	85,19	73,30
8	64,51	57,56	69,37	85,64	72,57	79,84	70,15	98,04	74,71
9	78,12	66,35	74,22	85,63	70,50	78,10	79,21	78,99	76,39
10	89,56	84,38	90,93	87,07	91,36	86,61	90,91	90,69	88,94
11	86,31	71,49	71,85	71,77	37,94	82,42	71,83	90,97	73,07
12	47,42	63,06	61,58	76,39	56,05	77,59	47,61	76,33	63,25
13	49,31	65,01	52,68	64,98	43,36	53,68	46,41	72,93	56,04
14	32,87	55,24	33,22	63,33	28,50	70,42	42,46	68,97	49,38
15	39,80	63,76	45,67	51,39	35,35	67,31	37,93	59,44	50,08
16	57,99	52,35	60,55	78,68	59,04	74,35	74,05	68,99	65,75
17	37,93	49,33	43,00	55,78	30,39	48,10	39,27	47,54	43,92
18	55,24	55,18	69,04	55,99	61,78	70,27	64,82	73,10	63,18
19	44,30	41,20	59,08	63,63	57,18	60,78	52,10	68,05	55,79
20	87,69	82,09	88,01	89,87	77,40	85,96	77,75	90,77	84,94
21	59,57	53,32	50,27	68,57	48,28	63,57	51,99	50,55	55,76
22	55,55	44,74	69,17	61,33	54,85	56,17	67,18	56,47	58,18
23	26,55	45,45	43,17	42,13	31,60	38,78	39,68	47,30	39,33
24	57,81	48,10	59,18	63,18	43,36	66,35	52,41	56,24	55,83
25	49,93	34,70	51,00	58,13	50,64	51,53	39,02	56,80	48,97
26	38,93	36,58	42,00	48,28	32,89	37,85	40,02	60,04	42,07
27	59,94	63,55	52,60	65,18	53,32	76,07	65,33	72,10	63,51
28	87,18	81,45	76,25	84,13	78,14	94,53	87,88	78,05	83,45
29	76,93	76,58	73,00	83,53	84,64	92,60	77,52	96,27	82,63
30	65,06	66,13	80,93	79,32	59,11	59,61	45,16	64,94	65,03
31	92,19	85,38	92,76	87,07	92,90	88,11	92,75	90,69	90,23
32	51,68	74,83	60,41	68,28	64,47	64,35	47,44	72,79	63,03
33	73,80	80,60	92,33	89,43	96,59	84,10	93,68	92,74	87,91
34	70,94	75,59	92,51	83,12	89,40	88,71	92,50	90,77	85,44
35	66,31	61,84	85,85	66,87	69,19	78,96	70,58	83,77	72,92
36	76,94	82,38	80,10	87,57	80,32	85,11	79,83	81,69	81,74
37	78,81	83,16	85,60	87,77	93,69	86,25	89,08	88,37	86,59
38	93,81	82,84	93,85	90,37	86,94	89,46	95,08	91,52	90,48
39	85,30	77,53	80,92	79,53	75,10	88,56	77,43	83,65	81,00

40	82,44	63,76	85,26	90,73	79,65	72,68	83,00	85,18	80,34
41	77,94	79,01	78,51	89,98	86,15	82,18	83,50	87,18	83,05
42	63,44	75,80	69,01	91,43	66,65	76,82	71,25	83,10	74,69
43	81,94	89,51	87,76	91,98	78,15	91,93	92,25	90,18	87,96
44	77,19	80,30	92,01	90,93	82,40	89,32	92,75	92,35	87,15
45	69,31	59,55	61,18	88,18	68,61	72,57	61,41	71,10	68,99
46	61,69	83,76	60,51	91,73	66,90	91,43	60,75	84,18	75,12
47	55,24	64,49	46,55	62,58	49,29	79,42	50,80	70,72	59,89
48	56,94	77,32	71,51	70,98	56,65	74,96	62,75	72,57	67,96
49	80,44	85,63	79,94	88,57	83,24	87,61	83,65	89,44	84,82
50	40,44	53,26	56,26	74,73	46,15	52,43	53,75	64,93	55,24
51	50,31	71,85	51,18	89,18	52,36	65,10	44,66	66,49	61,39
52	86,44	85,63	92,76	89,07	93,40	88,11	93,25	90,69	89,92
53	59,06	77,01	61,43	83,48	88,11	89,18	64,16	84,43	75,86
54	60,69	69,84	56,85	84,62	64,57	71,71	55,83	68,27	66,55
55	6,03	32,57	9,61	42,82	26,20	30,57	14,82	46,30	26,12
56	10,07	38,32	29,86	17,82	19,70	35,57	9,91	48,05	26,16
57	42,25	59,24	55,90	60,92	50,72	55,29	53,96	42,96	52,66
58	58,48	72,62	61,70	80,39	62,36	83,62	59,24	82,22	70,08
59	93,68	84,58	89,50	96,35	87,14	88,60	82,02	96,79	89,83
60	73,56	73,74	67,10	78,08	65,69	72,67	64,83	74,72	71,30
61	72,56	69,10	65,10	93,18	70,19	95,10	64,08	96,24	78,19
62	37,57	52,63	42,02	46,57	40,53	61,11	19,24	57,19	44,61
63	48,69	58,88	54,10	64,32	47,32	60,86	40,58	65,44	55,02
64	98,12	97,60	97,72	98,18	98,50	97,60	98,46	98,49	98,08
65	68,99	82,74	70,55	85,58	69,79	79,42	65,30	78,72	75,14
66	38,18	49,33	28,75	58,28	32,39	37,60	31,77	25,04	37,67
67	100,00	96,10	100,00	97,43	100,00	96,60	100,00	98,24	98,55
68	100,00	87,34	100,00	90,37	100,00	89,96	100,00	92,02	94,96
69	64,37	53,74	69,97	72,33	52,25	46,67	49,96	63,47	59,10
70	56,37	59,07	54,47	78,73	55,50	58,21	50,46	71,32	60,52
71	81,94	75,38	84,26	85,57	84,90	79,61	76,75	87,69	82,01
72	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	98,82	99,85
73	16,55	18,99	41,17	65,83	26,60	49,92	47,68	72,22	42,37
74	98,62	96,60	98,22	98,18	98,25	97,35	97,71	98,49	97,93
75	88,55	85,99	69,92	98,58	81,10	96,09	78,18	76,22	84,33
76	86,19	85,63	84,69	89,07	85,24	88,61	84,90	90,94	86,91
77	89,25	89,05	88,06	91,68	88,30	90,82	88,03	90,85	89,50
78	57,75	94,51	68,31	100,00	77,80	98,90	69,78	87,10	81,77
79	90,19	90,76	89,10	92,98	89,32	92,68	89,08	94,18	91,03
80	100,00	97,60	100,00	98,18	100,00	98,10	100,00	98,49	99,05
81	92,69	96,35	91,61	96,43	92,65	97,35	92,00	97,24	94,54
82	45,67	49,43	36,83	35,24	44,80	44,02	41,11	37,35	41,81
83	95,12	95,35	97,47	94,93	94,25	95,85	96,71	98,49	96,02
84	85,29	96,31	81,07	89,64	89,46	85,87	81,37	97,22	88,28

85	34,55	41,06	39,66	51,89	31,59	36,84	33,70	47,33	39,58
86	76,86	63,24	72,37	53,08	72,32	62,17	71,40	100,00	71,43
87	98,34	67,60	86,75	94,18	93,44	84,35	96,63	92,24	89,19
88	74,06	87,53	70,85	94,28	83,94	89,81	76,58	93,90	83,87
89	76,49	80,85	77,80	71,43	79,41	71,60	80,80	55,49	74,24
90	56,74	63,99	57,05	68,08	58,29	59,17	50,55	74,97	61,11
91	74,55	99,04	66,42	100,00	66,85	89,10	75,68	95,79	83,43
92	79,05	86,58	75,42	96,03	74,35	90,10	72,93	85,29	82,47
93	68,05	71,58	69,58	79,03	71,43	73,60	70,60	83,54	73,43
94	82,30	83,08	74,33	100,00	82,18	88,35	80,85	100,00	86,39
95	75,18	66,08	77,91	81,03	79,97	89,35	67,19	70,29	75,87
96	80,80	62,49	86,92	72,33	78,85	90,34	72,43	91,97	79,52
97	88,49	88,24	80,55	87,08	75,29	77,92	85,80	99,86	85,40
98	64,49	57,99	61,80	65,83	59,54	70,42	42,05	69,22	61,42
99	34,51	49,98	55,52	68,24	46,07	63,55	50,40	66,99	54,41
100	45,21	61,56	54,12	68,39	48,82	71,34	48,15	58,83	57,05
101	49,30	75,03	74,63	69,03	64,85	65,56	56,43	57,90	64,09
102	45,76	45,31	57,37	56,64	53,57	52,84	42,15	69,58	52,90
103	42,74	77,18	54,54	71,99	62,03	58,27	48,57	69,60	60,61
104	81,68	58,05	69,16	68,96	67,22	60,42	66,69	72,60	68,10
105	54,36	72,23	66,62	66,24	60,07	65,30	64,90	68,74	64,81
106	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	84,93	100,00	98,12
107	40,36	52,06	44,12	51,89	43,57	69,09	44,90	55,58	50,20
108	64,87	24,61	66,72	34,33	53,50	61,23	25,21	59,85	48,79
109	73,18	100,00	72,91	100,00	94,47	91,26	66,19	100,00	87,25
110	11,50	24,57	13,40	23,57	24,72	27,07	21,86	44,05	23,84

Media Año x									
Aislamiento	66,48	69,64	68,68	77,07	66,97	74,52	66,09	77,58	
Media									
Aislamiento	68,06		72,88		70,75		71,84		
	año			año					
Media Año	2014	67,06		2015	74,70				
Media general	70,88								

LSD interacción triple = 16,2

Verde oscuro: resistente (0-25%); Verde claro: moderadamente resistente (25-50%)

Amarillo: moderadamente susceptible (50-75%); Rojo: Susceptible (> a 75%)



**Tabla F.** Asociaciones marcador-carácter (AMC) detectadas en ambos años con los dos métodos (GLM y MLM) para resistencia en estado de plántula y estado adulto frente a dos aislamientos de *P.tritici-repentis* (H017 y G0327) y dos de *P. teres* (Dt1 y Dt2) en 110 genotipos de trigo.

Tratamiento		Marcador	Crom	Pos cm	Año 2014			Año 2015			
Estado	Aislamiento				$\rho$ GLM	$\rho$ MLM	R <sup>2</sup>	$\rho$ GLM	$\rho$ MLM	R <sup>2</sup>	
Plántula	H017	1	wPt-734081	1D	91,15	0,0348	0,0137	0,0392	0,0439	0,0383	0,0347
		2	wPt-9336	2B	100,73	0,0260	0,0217	0,0449	0,0089	0,0380	0,0598
		3	wPt-6216	3B	54,35	0,0127	0,0124	0,0552	0,0349	0,0450	0,0374
		4	wPt-2936	3B	54,35	0,0137	0,0157	0,0531	0,0214	0,0162	0,0435
Plántula	G0327	1	wPt-668160	1A	1,37	0,0196	0,0469	0,0501	0,0143	0,0170	0,0489
		2	wPt-665480	1D	17,93	0,0114	0,0400	0,0568	0,0134	0,0134	0,0492
		3	wPt-0115	2A	17,60	0,0005	0,0008	0,1074	0,0063	0,0063	0,0593
		4	wPt-6207	2A	18,83	0,0117	0,0337	0,0592	0,0249	0,0301	0,0412
		5	wPt-665342	2D	60,28	0,0008	0,0060	0,0985	0,0007	0,0009	0,0885
		7	wPt-8855	3A	46,74	0,0010	0,0045	0,0949	0,0016	0,0016	0,0784
		6	wPt-2748	3A	46,74	0,0016	0,0089	0,0875	0,0042	0,0045	0,0648
		8	wPt-730156	3A	182,98	0,0005	0,0020	0,1065	0,0164	0,0136	0,0465
		9	wPt-2748	3B	34,69	0,0016	0,0089	0,0875	0,0042	0,0045	0,0648
		10	wPt-8855	3B	37,30	0,0010	0,0045	0,0949	0,0016	0,0016	0,0784
		11	wPt-6216	3B	54,35	0,0010	0,0015	0,0925	0,0067	0,0071	0,0576
		12	wPt-2936	3B	54,35	0,0011	0,0023	0,0919	0,0140	0,0149	0,0464
		13	wPt-1048	6B	84,80	0,0251	0,0244	0,0448	0,0160	0,0195	0,0462
		14	wPt-6978	6D	106,99	0,0063	0,0082	0,0654	0,0147	0,0163	0,0468
		16	wPt-729831	6D	108,25	0,0059	0,0084	0,0669	0,0240	0,0267	0,0405
		15	wPt-733655	6D	108,25	0,0171	0,0245	0,0512	0,0168	0,0196	0,0458
		17	wPt-2782	6D	114,53	0,0121	0,0165	0,0547	0,0240	0,0260	0,0396
		19	wPt-6620	7A	122,34	0,0027	0,0023	0,0783	0,0147	0,0168	0,0472
		18	wPt-4831	7A	122,34	0,0083	0,0093	0,0642	0,0227	0,0295	0,0428
		20	wPt-4553	7A	158,36	0,0119	0,0186	0,0562	0,0372	0,0462	0,0348
21	wPt-732255	7D	1,64	0,0046	0,0086	0,0706	0,0225	0,0243	0,0412		
Plántula	Dt1	1	wPt-1248	1B	43,66	0,0377	0,0245	0,0372	0,0022	0,0163	0,0802
		2	wPt-1770	1B	106,52	0,0236	0,0255	0,0452	0,0005	0,0020	0,1041
		3	wPt-5133	3A	185,83	0,0209	0,0235	0,0489	0,0068	0,0130	0,0644
Plántula	Dt2	1	wPt-2430	2B	74,93	0,0036	0,0110	0,0775	0,0012	0,0066	0,0774
		2	wPt-2644	2D	70,93	0,0340	0,0121	0,0431	0,0129	0,0305	0,0481
		3	wPt-664520	2D	70,93	0,0325	0,0091	0,0444	0,0032	0,0084	0,0660
		4	wPt-5588	5A	40,16	0,0152	0,0211	0,0546	0,0052	0,0184	0,0586
		5	wPt-3091	6A	29,44	0,0045	0,0376	0,0754	0,0482	0,0427	0,0302
		6	wPt-0357	6A	31,56	0,0022	0,0244	0,0882	0,0245	0,0219	0,0392
		7	wPt-7857	6A	48,79	0,0410	0,0433	0,0392	0,0052	0,0314	0,0590
		8	wPt-0745	7A	158,34	0,0067	0,0385	0,0673	0,0233	0,0470	0,0382
Adulto	H017	1	wPt-5776	1A	35,70	0,0009	0,0040	0,0816	0,0132	0,0237	0,0450
		2	wPt-0115	2A	17,60	0,0369	0,0419	0,0341	0,0251	0,0362	0,0378
		3	wPt-5029	2A	45,96	0,0092	0,0463	0,0419	0,0030	0,0086	0,0723
		4	wPt-9277	2A	109,43	0,0135	0,0292	0,0485	0,0237	0,0456	0,0391
		5	wPt-732942	2D	79,57	0,0010	0,0062	0,0811	0,0083	0,0234	0,0508
		6	wPt-4413	2D	81,14	0,0001	0,0016	0,1100	0,0013	0,0041	0,0771
		7	wPt-666518	2D	114,05	0,0108	0,0330	0,0501	0,0125	0,0469	0,0465
		8	wPt-8356	3A	29,58	0,0066	0,0245	0,0608	0,0193	0,0404	0,0446
		9	wPt-1888	3A	204,98	0,0132	0,0150	0,0475	0,0247	0,0496	0,0383
		10	wPt-4545	3A	207,88	0,0329	0,0269	0,0378	0,0153	0,0263	0,0475
		11	wPt-5432	3B	37,19	0,0023	0,0069	0,0721	0,0097	0,0266	0,0487
		12	wPt-8356	3B	45,21	0,0066	0,0245	0,0608	0,0193	0,0404	0,0446
		13	wPt-1158	3B	57,77	0,0030	0,0070	0,0669	0,0007	0,0036	0,0837
		14	tPt-7068	3B	79,27	0,0022	0,0160	0,0686	0,0053	0,0291	0,0550
		15	wPt-5020	3B	79,27	0,0022	0,0182	0,0686	0,0058	0,0302	0,0539
		16	wPt-9641	4A	98,35	0,0223	0,0494	0,0398	0,0028	0,0069	0,0642
		17	wPt-732448	4B	16,63	0,0013	0,0120	0,0794	0,0074	0,0353	0,0541
		18	wPt-733363	4B	16,63	0,0024	0,0148	0,0730	0,0098	0,0344	0,0516

			19	wPt-733038	4B	68,79	0,0002	0,0039	0,0766	0,0105	0,0375	0,0509
			20	wPt-665805	6A	95,20	0,0004	0,0036	0,0984	0,0206	0,0352	0,0399
			21	wPt-2582	6A	107,79	0,0004	0,0077	0,0983	0,0196	0,0470	0,0510
			22	wPt-5037	6B	63,10	0,0053	0,0344	0,0591	0,0070	0,0210	0,0520
			23	wPt-8493	6B	116,76	0,0001	0,0008	0,1087	0,0005	0,0028	0,0873
			24	wPt-731816	6D	102,43	0,0242	0,0317	0,0394	0,0476	0,0495	0,0294
			25	wPt-665927	7A	11,57	0,0070	0,0163	0,0586	0,0023	0,0200	0,0711
			26	wPt-3135	7A	12,54	0,0132	0,0488	0,0482	0,0101	0,0301	0,0494
			28	wPt-6447	7A	15,12	0,0084	0,0286	0,0523	0,0058	0,0257	0,0546
			27	wPt-4835	7A	15,12	0,0085	0,0313	0,0541	0,0012	0,0071	0,0773
			29	wPt-2260	7A	158,36	0,0006	0,0070	0,0893	0,0126	0,0476	0,0473
			30	wPt-3226	7A	158,36	0,0017	0,0148	0,0762	0,0144	0,0496	0,0457
			31	wPt-7763	7A	158,36	0,0066	0,0332	0,0560	0,0124	0,0355	0,0459
			32	wPt-6019	7A	160,29	0,0015	0,0145	0,0752	0,0141	0,0494	0,0441
			33	wPt-8007	7B	210,41	0,0215	0,0242	0,0425	0,0106	0,0129	0,0510
			34	wPt-7251	7B	223,95	0,0090	0,0407	0,0529	0,0059	0,0297	0,0561
			35	wPt-665927	7D	4,00	0,0070	0,0163	0,0586	0,0023	0,0200	0,0711
			36	wPt-7763	7D	169,31	0,0066	0,0332	0,0560	0,0124	0,0355	0,0459
			37	wPt-4315	7D	170,56	0,0001	0,0026	0,1192	0,0002	0,0016	0,1008
			38	wPt-7251	7D	171,71	0,0090	0,0407	0,0529	0,0059	0,0297	0,0561
Adulto	G0327		1	wPt-9317	1A	2,73	0,0150	0,0120	0,0470	0,0131	0,0092	0,0462
			2	wPt-5776	1A	35,70	0,0042	0,0170	0,0627	0,0037	0,0107	0,0618
			3	wPt-1387	1D	50,44	0,0003	0,0281	0,1062	0,0004	0,0393	0,0959
			4	wPt-8004	2A	19,55	0,0094	0,0221	0,0536	0,0147	0,0452	0,0452
			5	wPt-8004	2B	39,38	0,0094	0,0221	0,0536	0,0147	0,0452	0,0452
			6	wPt-6174	2B	72,82	0,0236	0,0230	0,0410	0,0090	0,0192	0,0520
			7	wPt-7004	2B	101,70	0,0171	0,0326	0,0449	0,0140	0,0246	0,0449
			8	wPt-8004	2D	15,37	0,0094	0,0221	0,0536	0,0147	0,0452	0,0452
			9	wPt-4413	2D	81,14	0,0024	0,0305	0,0723	0,0000	0,0001	0,1462
			11	wPt-666518	2D	114,05	0,0036	0,0164	0,0662	0,0068	0,0245	0,0552
			10	wPt-3692	2D	114,05	0,0052	0,0245	0,0619	0,0138	0,0435	0,0474
			12	wPt-1158	3B	57,77	0,0030	0,0080	0,0679	0,0044	0,0132	0,0602
			13	tPt-7068	3B	79,27	0,0004	0,0030	0,0944	0,0047	0,0473	0,0578
			14	wPt-5020	3B	79,27	0,0004	0,0034	0,0929	0,0049	0,0441	0,0573
			15	wPt-1804	3B	92,28	0,0159	0,0307	0,0474	0,0021	0,0074	0,0718
			16	wPt-732448	4B	16,63	0,0002	0,0032	0,1096	0,0006	0,0097	0,0865
			17	wPt-733363	4B	16,63	0,0007	0,0076	0,0929	0,0025	0,0176	0,0711
			19	wPt-733038	4B	68,79	0,0003	0,0050	0,1041	0,0001	0,0020	0,1147
			18	wPt-6209	4B	68,79	0,0026	0,0294	0,0733	0,0008	0,0131	0,0875
			20	wPt-5037	6B	63,10	0,0007	0,0237	0,0882	0,0034	0,0202	0,0646
			21	wPt-8493	6B	116,76	0,0035	0,0286	0,0655	0,0000	0,0007	0,1184
			22	wPt-665927	7A	11,57	0,0010	0,0103	0,0871	0,0130	0,0382	0,0487
			23	wPt-4835	7A	15,12	0,0017	0,0107	0,0768	0,0003	0,0025	0,0954
			24	wPt-6447	7A	15,12	0,0018	0,0097	0,0734	0,0020	0,0114	0,0690
			25	wPt-7763	7A	158,36	0,0010	0,0100	0,0829	0,0097	0,0359	0,0496
			26	wPt-7947	7A	168,67	0,0234	0,0248	0,0416	0,0153	0,0466	0,0458
			27	wPt-7108	7B	217,45	0,0153	0,0211	0,0479	0,0090	0,0358	0,0540
			28	wPt-665927	7D	4,00	0,0010	0,0103	0,0871	0,0130	0,0382	0,0487
			29	wPt-7763	7D	169,31	0,0010	0,0100	0,0829	0,0097	0,0359	0,0496
			30	wPt-4315	7D	170,56	0,0000	0,0052	0,1326	0,0010	0,0282	0,0823
Adulto	Dt1		1	wPt-9317	1A	2,73	0,0142	0,0090	0,0445	0,0046	0,0043	0,0614
			2	wPt-669484	1A	2,73	0,0417	0,0224	0,0306	0,0187	0,0163	0,0417
			3	wPt-5776	1A	35,70	0,0056	0,0204	0,0556	0,0010	0,0021	0,0798
			4	wPt-1573	1B	42,35	0,0040	0,0356	0,0614	0,0084	0,0268	0,0535
			5	wPt-1403	1B	75,70	0,0001	0,0025	0,1082	0,0021	0,0155	0,0733
			6	wPt-0115	2A	17,60	0,0229	0,0280	0,0390	0,0378	0,0472	0,0335
			7	wPt-8004	2A	19,55	0,0092	0,0234	0,0508	0,0133	0,0230	0,0474
			8	wPt-8004	2B	39,38	0,0092	0,0234	0,0508	0,0133	0,0230	0,0474
			9	wPt-8004	2D	15,37	0,0092	0,0234	0,0508	0,0133	0,0230	0,0474
			10	wPt-732942	2D	79,57	0,0011	0,0082	0,0778	0,0011	0,0072	0,0780
			11	wPt-4413	2D	81,14	0,0002	0,0034	0,0981	0,0002	0,0013	0,1045
			12	wPt-666518	2D	114,05	0,0024	0,0084	0,0679	0,0019	0,0077	0,0723
			13	wPt-3692	2D	114,05	0,0056	0,0308	0,0567	0,0030	0,0149	0,0684

			14	tPt-7492	3A	180,79	0,0015	0,0031	0,0731	0,0117	0,0355	0,0482
			15	wPt-5133	3A	185,83	0,0016	0,0015	0,0767	0,0056	0,0093	0,0614
			16	wPt-5432	3B	37,19	0,0015	0,0112	0,0732	0,0006	0,0024	0,0893
			17	wPt-1158	3B	57,77	0,0003	0,0026	0,0947	0,0027	0,0134	0,0674
			18	tPt-7068	3B	79,27	0,0000	0,0004	0,1151	0,0090	0,0429	0,0505
			19	wPt-0896	3B	84,63	0,0392	0,0074	0,0342	0,0326	0,0103	0,0388
			20	wPt-1804	3B	92,28	0,0094	0,0317	0,0516	0,0102	0,0436	0,0516
			21	wPt-733038	4B	68,79	0,0000	0,0018	0,1229	0,0000	0,0005	0,1258
			22	wPt-6209	4B	68,79	0,0005	0,0159	0,0907	0,0004	0,0035	0,0956
			23	wPt-1179	5B	125,13	0,0028	0,0261	0,0679	0,0059	0,0485	0,0596
			24	wPt-665036	6A	22,82	0,0087	0,0135	0,0514	0,0139	0,0375	0,0464
			25	wPt-665805	6A	95,20	0,0042	0,0406	0,0610	0,0029	0,0160	0,0689
			26	wPt-665036	6B	38,51	0,0087	0,0135	0,0514	0,0139	0,0375	0,0464
			27	wPt-5037	6B	63,10	0,0002	0,0011	0,1029	0,0067	0,0467	0,0555
			28	wPt-8493	6B	116,76	0,0002	0,0026	0,0989	0,0003	0,0019	0,0962
			29	wPt-731816	6D	102,43	0,0330	0,0212	0,0339	0,0488	0,0307	0,0298
			30	wPt-1179	7A	13,63	0,0028	0,0261	0,0679	0,0059	0,0485	0,0596
			31	wPt-4835	7A	15,12	0,0003	0,0030	0,0962	0,0029	0,0129	0,0689
			32	wPt-6447	7A	15,12	0,0004	0,0034	0,0880	0,0049	0,0178	0,0586
			33	wPt-7763	7A	158,36	0,0073	0,0320	0,0522	0,0019	0,0070	0,0718
			34	wPt-2260	7A	158,36	0,0002	0,0054	0,0985	0,0015	0,0138	0,0773
			35	wPt-3226	7A	158,36	0,0006	0,0114	0,0866	0,0035	0,0283	0,0650
			36	wPt-6019	7A	160,29	0,0011	0,0218	0,0752	0,0117	0,0497	0,0474
			37	wPt-1023	7A	160,29	0,0006	0,0163	0,0873	0,0130	0,0494	0,0488
			38	wPt-7108	7B	217,45	0,0050	0,0164	0,0601	0,0157	0,0445	0,0470
			39	wPt-6320	7B	223,95	0,0061	0,0495	0,0545	0,0088	0,0462	0,0515
			40	wPt-743380	7D	1,64	0,0034	0,0449	0,0619	0,0038	0,0257	0,0626
			41	wPt-7763	7D	169,31	0,0073	0,0320	0,0522	0,0019	0,0070	0,0718
			42	wPt-4315	7D	170,56	0,0004	0,0185	0,0905	0,0000	0,0011	0,1237
Adulto	Dt2		1	wPt-734027	1A	14,83	0,0050	0,0208	0,0607	0,0166	0,0485	0,0429
			2	wPt-5776	1A	35,70	0,0006	0,0018	0,0887	0,0069	0,0148	0,0541
			3	wPt-5801	1B	23,09	0,0204	0,0278	0,0433	0,0049	0,0131	0,0622
			4	wPt-1573	1B	42,35	0,0023	0,0110	0,0710	0,0004	0,0014	0,0944
			5	wPt-1403	1B	75,70	0,0002	0,0027	0,1055	0,0010	0,0059	0,0829
			6	wPt-8004	2A	19,55	0,0068	0,0193	0,0577	0,0090	0,0115	0,0523
			7	wPt-9070	2A	19,55	0,0067	0,0173	0,0613	0,0105	0,0210	0,0533
			8	wPt-5029	2A	45,96	0,0111	0,0395	0,0553	0,0053	0,0150	0,0636
			9	wPt-8398	2B	29,21	0,0047	0,0176	0,0609	0,0318	0,0497	0,0347
			10	wPt-8004	2B	39,38	0,0068	0,0193	0,0577	0,0090	0,0115	0,0523
			11	wPt-9070	2B	39,38	0,0067	0,0173	0,0613	0,0105	0,0210	0,0533
			12	wPt-6174	2B	72,82	0,0341	0,0459	0,0356	0,0161	0,0446	0,0448
			13	wPt-8004	2D	15,37	0,0068	0,0193	0,0577	0,0090	0,0115	0,0523
			14	wPt-9070	2D	15,37	0,0067	0,0173	0,0613	0,0105	0,0210	0,0533
			15	wPt-732942	2D	79,57	0,0002	0,0011	0,1043	0,0059	0,0166	0,0571
			16	wPt-4413	2D	81,14	0,0000	0,0003	0,1332	0,0016	0,0059	0,0749
			17	wPt-666518	2D	114,05	0,0082	0,0226	0,0545	0,0009	0,0015	0,0818
			18	wPt-5133	3A	185,83	0,0033	0,0078	0,0702	0,0254	0,0371	0,0401
			19	wPt-6945	3B	56,53	0,0040	0,0465	0,0649	0,0035	0,0174	0,0642
			20	wPt-742705	3D	14,56	0,0168	0,0347	0,0459	0,0262	0,0488	0,0382
			21	wPt-741192	3D	26,27	0,0092	0,0178	0,0554	0,0121	0,0203	0,0496
			22	wPt-732448	4B	16,63	0,0009	0,0117	0,0857	0,0006	0,0127	0,0892
			23	wPt-733363	4B	16,63	0,0033	0,0246	0,0697	0,0008	0,0052	0,0873
			24	wPt-733038	4B	68,79	0,0002	0,0019	0,1120	0,0001	0,0004	0,1151
			25	wPt-6209	4B	68,79	0,0018	0,0201	0,0770	0,0011	0,0050	0,0811
			26	wPt-4577	5B	98,54	0,0417	0,0176	0,0329	0,0119	0,0099	0,0493
			27	wPt-665805	6A	95,20	0,0008	0,0102	0,0870	0,0039	0,0124	0,0633
			28	wPt-732975	6A	99,76	0,0154	0,0413	0,0482	0,0116	0,0034	0,0510
			29	wPt-2582	6A	107,79	0,0011	0,0222	0,0844	0,0074	0,0363	0,0554
			30	wPt-5037	6B	63,10	0,0007	0,0050	0,0881	0,0171	0,0406	0,0440
			31	wPt-8493	6B	116,76	0,0005	0,0051	0,0906	0,0010	0,0089	0,0785
			32	wPt-4835	7A	15,12	0,0097	0,0334	0,0525	0,0008	0,0053	0,0856
			33	wPt-7763	7A	158,36	0,0024	0,0234	0,0698	0,0008	0,0046	0,0823
			34	wPt-6019	7A	160,29	0,0043	0,0369	0,0619	0,0010	0,0129	0,0786

35	wPt-2501	7A	179,90	0,0105	0,0245	0,0510	0,0266	0,0464	0,0376
36	wPt-3190	7B	212,62	0,0074	0,0426	0,0561	0,0022	0,0407	0,0706
37	wPt-7108	7B	217,45	0,0057	0,0091	0,0615	0,0150	0,0313	0,0464
38	wPt-0126	7B	224,04	0,0159	0,0461	0,0464	0,0082	0,0180	0,0551
39	wPt-3785	7B	224,40	0,0334	0,0475	0,0381	0,0173	0,0187	0,0465
40	wPt-7763	7D	169,31	0,0024	0,0234	0,0698	0,0008	0,0046	0,0823
41	wPt-4315	7D	170,56	0,0000	0,0015	0,1338	0,0006	0,0175	0,0898

---