

INFORME PERIODO 2016-2017

1. APELLIDO..... KRIPELZ.....
Nombre(s).....Natalia Irene.....
Título(s)..... Técnico Principal.....Dirección Electrónico..kripelznatalia72@gmail.com.

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría..Técnico Principal.....Mes.... diciembre.....Año..1998
ACTUAL: Categoría ... Técnico PrincipalMes...agosto.....Año..2017

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

- a) Manchas foliares en trigo: aspectos relacionados con su posible manejo racional
- b) Control biológico de *Mycosphaerella graminicola* con especies de *Trichoderma*
- c) Cambios genéticos en *Mycosphaerella graminicola* que condicionana la resistencia a los fungicidas en la mancha de la hoja del trigo

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s)... CORDO CRISTINA ALICIA.....
Cargo Institución: INVESTIGADOR PRINCIPAL. CIDEFI Fac. de Cs.Agr. y Forest. de La Plata
Dirección: Calle.. 60 y 119 .N° s/n.....Ciudad..La Plata.....
C. P.:1900. Prov.: Buenos Aires..Tel.: 0221-4236758.Dirección Electrónica: cristcordo@gmail.com

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución..Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.
Dependencia...CIDEFI.....
Dirección: Calle.....60 y 119.....N ° ...s/n.....
Ciudad. La Plata.....C. P 1900.....Prov. Buenos Aires....Tel. 0221-4236758 int. 423

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....
Dependencia.....
Dirección: Calle.....Nº.....
Ciudad.....C. P.....Prov.....Tel.....
Cargo que ocupa.....

7. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA (Descripción para el repositorio institucional.

Máximo 150 palabras

8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

9. OTRAS ACTIVIDADES

9.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

9.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

9.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

10. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

11. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. (En este punto se indicará todo lo que se considere de interés para una mejor evaluación de la tarea cumplida en el período).

PAUTAS A SEGUIR EN LA ELABORACIÓN DEL INFORME

Pautas generales

- a) El informe debe contener los títulos y subtítulos completos que se detallan en hojas adjuntas y un índice
- b) Se deben anexar al final del informe las copias de las publicaciones, resúmenes de trabajos, informes y memorias técnicas a los que se hace referencia en el desarrollo del mismo, así como cualquier otra documentación que se considere de interés..
- c) El informe se deberá presentar impreso en hojas **perforadas** A-4. En la etiqueta de mismo se consignará el apellido y nombre del Personal de Apoyo y la leyenda «Informe Científico-tecnológico período
- d) Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.

INDICE

7. Resumen de la labor que desarrolla.

8. Exposición sintética de la labor desarrollada en el período

8.1 Manchas foliares en trigo: aspectos relacionados con su posible manejo racional

8.2 Control biológico de *Mycosphaerella graminicola* con especies de Trichoderma

8.3 Cambos genéticos en *Mycosphaerella graminicola* que condiciona la resistencia a los fungicidas en la mancha de la hoja de la mancha de la hoja de trigo

Anexo

9. Otras actividades

9.1 Publicaciones y comunicaciones

11. Otros elementos de juicio no contemplados en los títulos anteriores

7. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Origen de la infección de la semilla de trigo por *Septoria tritici*. Detección del patógeno por técnicas histológicas y moleculares.

Trichoderma harzianum como agente de biocontrol de *Mycosphaerella graminicola* en trigo.

Efecto biofungicida y su repercusión en la severidad de la enfermedad y el rendimiento.

Reducción de las enfermedades foliares del trigo (Septoriosis y Mancha amarilla) originadas en distintos sistemas de cultivo, mediante el manejo de la descomposición del rastrojo

Correlación entre la sensibilidad a los fungicidas del grupo de los triazoles y estrobilurinas y las mutaciones en los genes de *Mycosphaerella graminicola* condicionando resistencia a dichos grupos.

8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR

El presente informe reseña la actividad de apoyo a la investigación realizada desde el mes de septiembre del 2016 hasta el mes de agosto de 2017.

Para este período, se ha trabajado intensamente en el desarrollo del proyecto “Cambios genéticos en *Mycosphaerella graminicola* que condicionan la resistencia a los fungicidas en la mancha de la hoja del trigo.”

1). MANCHAS FOLIARES EN TRIGO, ASPECTOS RELACIONADOS CON SU POSIBLE MANEJO RACIONAL. SUBPROYECTO:

a) Descomposición del rastrojo

b) Dispersión de esporas de *Zymoseptoria tritici*

2). CONTROLBIOLÓGICO DE *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA* CON ESPECIES DE TRICHODERMA

3) CAMBIOS GENÉTICOS EN *MYCOSPHAERELLA GRAMINÍCOLA* QUE CONDICIONA LA RESISTENCIA A LOS FUNGICIDAS EN LA MANCHA DE LA HOJA DEL TRIGO

El proyecto tiene por finalidad: hallar técnicas indicadoras de la generación de resistencia a la aplicación de fungicidas foliares (para este caso, el grupo químico de los azoles).

OBJETIVO: Evaluar la pérdida de sensibilidad al efecto del fungicida tebuconazole (grupo de los triazoles) sobre las poblaciones de aislamientos de *Zymoseptoria tritici* (patógeno de la “mancha de la hoja del trigo”), de diferentes áreas de la región triguera argentina.

Objetivos específicos:

1) Mantener la población de 46 aislamientos de *Zymoseptoria tritici* de diferentes zonas de la región triguera argentina.

2) Preparar los materiales para la realización de los bioensayos tendientes a evaluar, in vitro, el ritmo de crecimiento de cada aislamiento bajo el efecto del tebuconazol en relación al mismo aislamiento crecido en medio de cultivo sin el fungicida.

3) Evaluar el efecto del fungicida tebuconazole sobre la germinación de los conidios de *Z. tritici* a través del crecimiento del tubo germinativo.

4) Evaluar la relación entre los biotipos que perdieron sensibilidad al efecto del fungicida y la ganancia de la patogenicidad del biotipo en plantas de trigo.

1) Durante el período informado se mantuvo la colección de aislamientos de *Z. tritici* que hasta el momento contó con poblaciones provenientes de diferentes localidades de la región triguera argentina, alguno de cuyos individuos se utilizaron en los experimentos de campo de años anteriores. La tarea de mantenimiento comprendió observaciones regulares del estado de las colonias y posterior repique periódico (cada 2 meses). La colección se mantiene bajo la forma de cultivo activo en tubos y cajas en el medio agar malta y en frascos de vidrio con vaselina estéril.

Se probó la conservación de colonias monospóricas en glicerol como alternativa al uso de la vaselina líquida estéril. Para ello se preparó una dilución de glicerol al 50%, se fraccionó en frascos de vidrio de 12ml con tapa a rosca, se esterilizó 20 min. a 121 °C, se dejó enfriar y se procedió a repicar trozos de colonia monospórica de cada uno de los aislamientos. Se conservó a -18 °C. Esta última técnica demostró mayor eficiencia en cuanto a tiempo requerido para recuperar el aislamiento.

2) Test de Sensibilidad a la acción del fungicida en medio nutritivo (in vitro).

El tebuconazol fue el formulado comercial provisto por la compañía BAYER CROP SCIENCE con nombre comercial FOLICUR 25W% El diseño experimental fue aleatorizado con 10 repeticiones considerando cada caja una repetición. Se ejecutó la técnica detallada a continuación con los 46 aislados

-En un Erlenmeyer de 500 mL se preparó 90 ml de medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) con cloranfenicol (250mg/L). Se esterilizó el medio y al descender la temperatura del mismo a 50°C, se agregó 50 µL de dimetil sulfoxido (DMSO). En otro erlenmeyer de 500 mL se preparó, 100mL de agua destilada estéril al que se le incorporó 2500µL de fungicida previamente filtrado (equivalente a la concentración de campo de 400cm³ /ha.)

-Se tomó un volumen de 10mL de la solución del fungicida incorporándolo al medio de cultivo. Para el control, se prepararon 90 mL de APG (2g/100mL) con cloranfenicol agregándole 10 mL de agua destilada estéril y 50 µL de DMSO.

-En diez cajas de Petri de 9 cm. de diámetro, se sembró 10 mL del medio de cultivo con fungicida. Se realizó el mismo procedimiento sembrando 10 cajas de Petri con el medio de cultivo sin fungicida.

-Se repicó un disco del patógeno crecido en medio de cultivo APG de 2 cm de diámetro aproximadamente en cada una de las cajas sembradas con medio de cultivo con fungicida y sin fungicida.

-Se incubó durante 7 días a 23°C y ciclos alternados de luz/ oscuridad. Se realizó la primera medición de los radios horizontal y vertical tomando dos planos a 90° cada uno. Se continuó incubando durante 14 días bajo las mismas condiciones..

Para el análisis estadístico se promediaron ambos radios. La velocidad de crecimiento también se midió y se expresó en mm x día⁻¹.

Se calculó la tasa de inhibición del crecimiento de la colonia utilizando la siguiente fórmula: $(A-B/A) \times 100$ donde: A= es el valor del promedio de los radios horizontal y vertical del control sin fungicida; B= es el valor del promedio de los radios horizontal y vertical de los tratamientos con fungicida. Esta fórmula reflejó el porcentaje de eficiencia en la acción del fungicida.

Tabla 1-Lista de aislados de *Zymoseptoria tritici* procedentes de distintas localidades de la región triguera argentina

	Aislados	Origen Geográf	Año
1	FALP013SM1h1c2R2*	Tres Arroyos	2013
2	FALP013SM1h2c1R2	Tres Arroyos	2013
3	FALP013SMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
4	FALP015ACAh1c1R1	Bahia Blanca	2015
5	FALP013CMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
6	FALP014AUh1c1R2	Polvorines	2014
7	FALP014AUh2c1R2	Polvorines	2014
8	FALP014AUh4c1R2	Polvorines	2014
9	FALP014AUh5c1R2	Polvorines	2014
10	FALP013APAh1c2R2	CoronelDorregc	2013
11	FALP013APAh2c1R2	CoronelDorregc	2013
12	FALP013APAh3c1R2	CoronelDorregc	2013
13	FALP013LDS2h2c3R2	San Cayetano	2013
14	FALP013PERh2c1R2	Pergamino	2013
16	FALP013COPh2c2R2	Tres Arroyos	2013
17	FALP013COPh3c1R2	Tres Arroyos	2013
18	FALP013CARh2c3R2	San Cayetano	2013
19	FALP013LIN Ah1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
20	FALP013LIN Ah2c2R2	Cordoba(MJ)	2013
21	FALP013LIN Ah4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
22	FALP013LIN Ah3c1R2	Cordoba(MJ)	2013
23	FALP013LAVERh4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
24	FALP013LAVERh5c2R2	Cordoba(MJ)	2013
25	FALP013PERh3c3R2	Pergamino	2013
26	FALP015MIRs1h2c1R1	Miramar	2015
27	FALP015MIRs2h3c1R1	Miramar	2015
28	FALP014OREh1c1R2	Tres Arroyos	2014
29	FALP014LDs4h3c1R2	SanCayetano	2014
30	FALP015ACAh2c1R1	Bahia Blanca	2015
31	FALP014AUh3c1R2	Polvorines	2014
32	FALP013KGUEh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
33	FALP013KGUEh6c1R2	Cordoba(MJ)	2013

34	FALP013KGUEh5c1R2	Cordoba(MJ)	2013
35	FALP013LDs1h1c1R2	SanCayetano	2013
36	FALP013LDs3h2c2R2	SanCayetano	2013
37	FALP013LDs3h1c2R2	SanCayetano	2013
38	FALP013LDs2h2c1R2	SanCayetano	2013
39	FALP013LDs4h1c2R2	SanCayetano	2013
40	FALP013LDs4h2c1R2	SanCayetano	2013
41	FALP013PERh1c1R2	Pergamino	2013
42	FALP013CMh3c1R2	Tres Arroyos	2013
43	FALP013BINTAh1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
44	FALP013BINTAh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
45	FALP015MIRs1h1c1R2	Miramar	2015
46	FALP015MIRs1h3c1R2	Miramar	2015

*La nomenclatura utilizada incluye los datos de: Residencia de la colección, año de aislamiento, Localidad de procedencia, Sitio o puesto de recolección de hoja, número de hoja y cirro Ejemplo: FALP, 013, La Dulce, Sobre 2, hoja 1, cirro 1= FALP013LDS2h1c.

Medición de la tolerancia al tebuconazol

De los 46 aislados estudiados, solo 36 de ellos demostraron alguna reacción a la acción del fungicida. El análisis no paramétrico confirmó diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre aislados, al comparar el tratamiento con fungicida y el control sin él. Se establecieron distintos rangos de respuesta a la acción del químico:

Tanto a los 7 como a los 14 días de crecimiento los aislados se agruparon en distintos rangos de reacción como:

1-aislados que en presencia del fungicida crecieron más que sin fungicida; 2- aislados que crecieron igual con y sin fungicidas y 3-aislados que crecieron más sin fungicida, separados en dos grupos los aislados con menor efecto y con mayor efecto del fungicida.

Aplicando otros indicadores de la tolerancia al fungicida, como el Porcentaje de eficiencia y la velocidad de crecimiento por semana y diaria para cada aislado, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 2. Porcentaje (%) de Eficiencia en el control de *Z. tritici* con el fungicida Tebuconazol y la velocidad de crecimiento de cada uno de ellos en una semana y por día.

1	60.2	0.11	0.015
2	58.9	0.01	0.001
3	70.3	0.00	0.00
4	58.9	0.00	0.00
5	61.5	0.00	0.00
6	63.3	0.00	0.00
7	61.4	0.00	0.00

8	91.4	0.04	0.005
9	17.01	0.09	0.012
10	49.2	0.09	0.012
11	49.26	0.01	0.001
12	71.5	0.06	0.0008
13	54.7	0.09	0.012
14	57.4	0.04	0.004
15	61.0	0.00	0.00
16	55.0	0.00	0.00
17	65.0	0.00	0.00
18	67.5	0.00	0.00
19	-7.14	0.06	0.004
20	16.66	0.00	0.00
21	4.7	0.00	0.00
22	-19.04	0.03	0.002
24	4.76	0.00	0.00
25	-7.14	0.00	0.00
26	-7.14	0.00	0.00
27	4.7	0.00	0.00
28	4.7	0.10	0.007
32	7.21	0.26	0.037
35	20.97	0.05	0.0007
37	55.6	0.16	0.022
38	17.52	0.00	0.00
40	56.3	0.00	0.00
42	1.48	0.11	0.007
43	57.2	0.00	0.00
44	63.5	0.00	0.00
45	59.7	0.04	0.005

Se presentan a los aislados 9, 20, 21, 24, 27, 28, 32, 35, 42 como los que superaron el efecto inhibitor del fungicida, es decir fueron tolerantes, con valores de eficiencia de acción que varió entre 1,48 y 17,45%. significando un 25% del total de los aislamientos estudiados. Los restantes aislamientos, que representaron un 75% del total, se vieron vulnerados por el principio activo del fungicida.

En los aislamientos 19, 22, 25, 26 se obtuvieron valores negativos (-) (-7.14, -19.04, -7.14, -7.14 respectivamente), de porcentaje de eficiencia en la acción del fungicida, denotando también tolerancia al producto químico. No se demostró aún la correlación estadística entre el lugar procedencia de las poblaciones y la tolerancia de los aislados pertenecientes a las mismas aunque por simple observación de los valores medios la Provincia de Córdoba, de las localidades de la Verbena y de Marcos Juárez, reúnen el mayor número de individuos tolerantes.

3) Evaluar el efecto del fungicida tebuconazole sobre la germinación de los conidios de *Z. tritici* a través del crecimiento del tubo germinativo.

Se practicó la técnica de inhibición de la germinación de esporas del patógeno por acción del fungicida. Este experimento se aplica a estudios de sensibilidad al fungicida y tolerancia a las diferentes concentraciones del producto químico calculando el EC_{50} = (mitad de la concentración máxima efectiva).

La técnica consistió en:

-En nueve Erlenmeyers de 50mL c/u prepararon diferentes soluciones con 10mL de agua destilada estéril con las siguientes concentraciones de fungicida:

Fungicida (ul)	Fungicida (g/l) en 10 ml de agua
250	250
200	250
175	250
100	250
75	250
50	250
25	250
2.5	250
0.0	250

-Filtrar

-Para el control, preparar un Erlenmeyer 10 ml de agua destilada estéril sin fungicida .

-Prepara 15 eppendorf de 1500 uL para cada aislamiento de tal forma de organizar 3 repeticiones para cada concentración del fungicida.

-Colocar en cada eppendorf 1 mL de la solución del fungicida y agregar 500uL de una suspensión de conidios de $3,5 \times 10^6$

-Incubar 24 a 36h a una temperatura de 20-24°C en el laboratorio.

-Agregar 3 gotas de azul de algodón en cada eppendorf

Para el recuento e identificación de conidios germinados utilizar un campo de 100 x en el microscopio observando 20 conidios y repetir 3 veces.

-Anotar en una planilla los conidios germinados y no germinados, recontando en total 100 conidios

El resultado final se expresa en porcentaje de conidios germinados en relación a los no germinados. Se organizaron 3 repeticiones para cada tratamiento por aislamiento.

A las concentraciones ensayadas se observó una tendencia a que a mayor concentración del fungicida menor fue el porcentaje de esporas germinadas Fig. 1. No se realizó el cálculo de la recta de regresión para definir la concentración efectiva que cause el 50% de la inhibición de los conidios de *Z. tritici* **Elaborar una Tabla con los resultados**

Tabla. 1 Porcentaje de esporas germinadas a diferentes concentraciones del fungicida tebuconazole.

4) Evaluar la relación entre los biotipos que perdieron sensibilidad al efecto del fungicida y la ganancia de la patogenicidad del biotipo en plantas de trigo.

Para el desarrollo de la técnica se realizaron las siguientes tareas

- Prueba de germinación de las semillas de trigo del cultivar BIOINTA 2005 para calcular el poder germinativo de las mismas
- Organización del experimento en 3 series. Cada serie consistió en 4 repeticiones con tres tratamientos cada una.
- Acondicionamiento del box del invernáculo para las tres siembras consecutivas desarrolladas durante el período mayo-agosto.
- Siembras y mantenimiento de las plantas
- Preparación de inóculo e inoculaciones
- Cosecha y posterior evaluación de las plantas.

Comentario [u1]: Para todo el informe tener en cuenta esta redacción{

El tebuconazol se ensayó sobre plántulas de trigo frente a la agresividad de 36 aislamientos de *Z. tritici*. Se aplicó como un protector contra el patógeno, dos días antes de la inoculación.

El control producido por el tebuconazole fue alto, con una frecuencia de eficacia de 14/ 36 aislamientos totales, con una variación en la eficiencia de 47-94%. (Figs. 1, 2,3) Los aislamientos 3, 8, 10, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 26, 43,44, 45 y 46. mostraron un grado de resistencia al tratamiento con fungicida. Algunos aislamientos desarrollaron sólo necrosis careciendo de desarrollo picnidial (por ejemplo aislamientos 2, 28, 34 y 35); otros aislamientos demostraron baja eficiencia en el tratamiento con fungicida porque en el transcurso de la conservación a baja temperatura y en vaselina, perdieron agresividad (por ejemplo: 2, 12, 25, 26, 27,34

El comportamiento de los aislamientos en este test fue muy variable, contando por ejemplo con el aislamiento 5 con valores porcentuales de necrosis y picnidios altos en el control y bajos o nulos en el tratamiento con fungicida; el aislamiento 1 con alta necrosis y bajo porcentaje de picnidios pero todos los valores bajos; aislamiento 3 con alto porcentaje de necrosis y bajo porcentaje de picnidios en el tratamiento con el fungicida y el control con bajo porcentaje de necrosis y picnidios.

Por su parte el aislamiento 6 resultó un ejemplo de alta eficiencia por parte del fungicida, contrariamente al aislamiento 37 con alto porcentaje de necrosis y moderado de picnidio en el control sin fungicida y en el tratamiento con fungicida que respondió igual que el control.

Fig 2.Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 1- 10 considerando desarrollo necrótico sobre la hoja del cultivar BioINTA 2005..

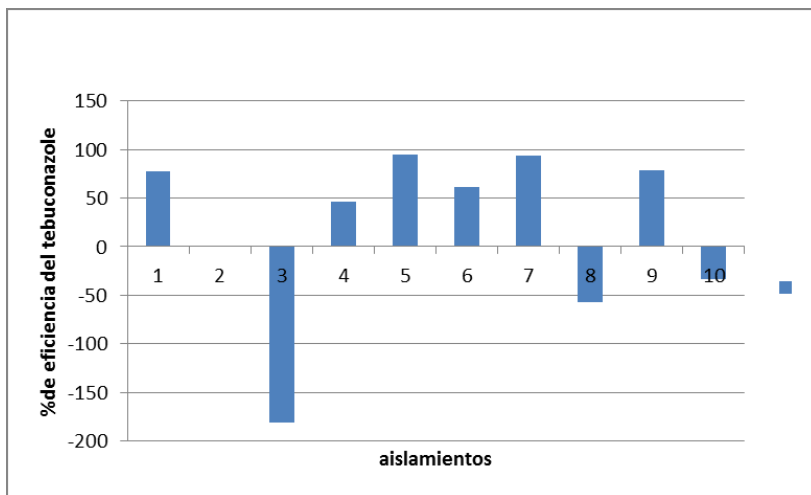


Fig. 3 .Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 11- 20 considerando desarrollo necrótico en la hoja del cultivar BioINTA 2005

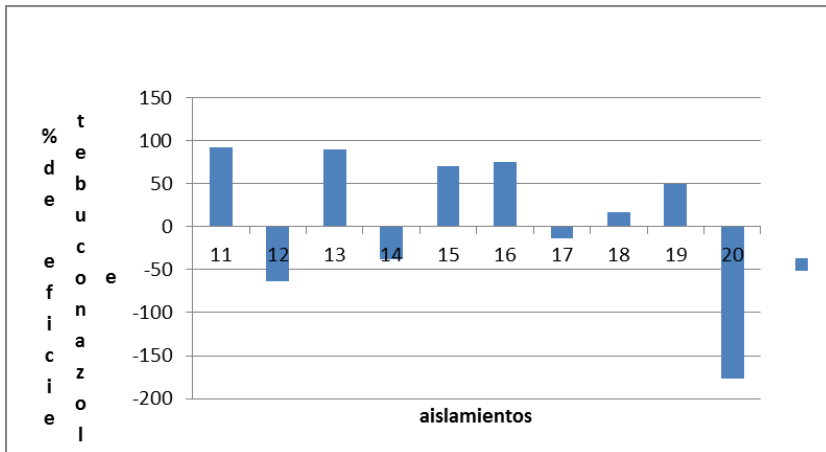
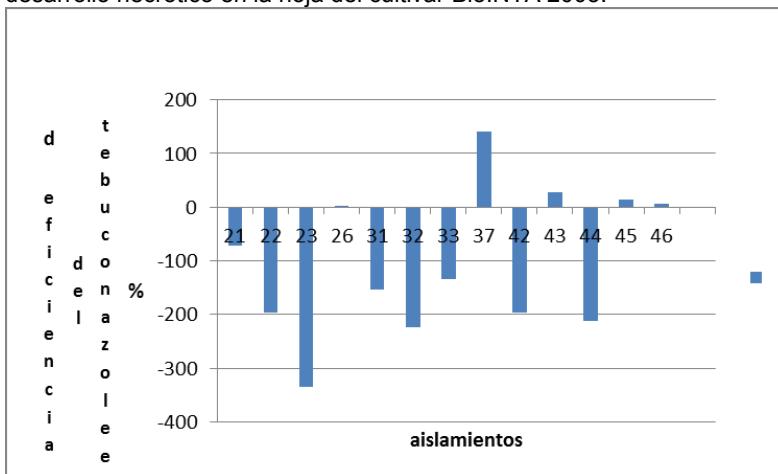
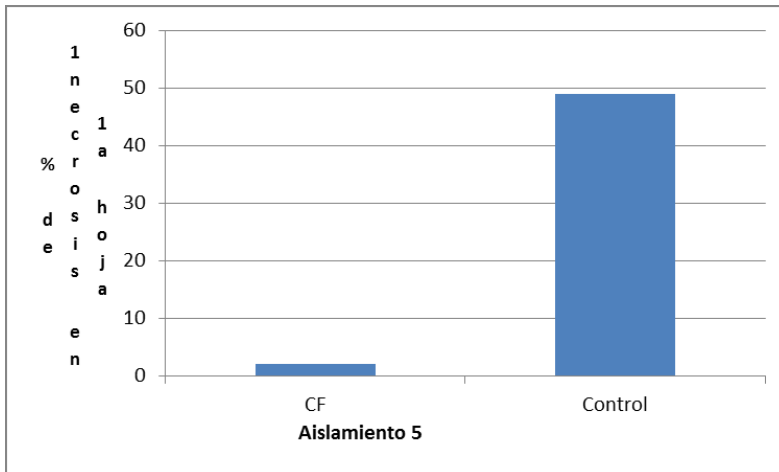


Fig. 4. Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 21-26, 31-37, 42-46 considerando desarrollo necrótico en la hoja del cultivar BioINTA 2005.



Dentro de los valores positivos se diferencian valores mayores del 30 % como aislamientos que no perdieron sensibilidad al fungicida, los valores menores corresponden a los que manifestaron tendencia a la resistencia. Por su parte, también las barras negativas manifiestan grados de resistencia teniendo en cuenta que se han eliminado los aislamientos con baja agresividad.

Fig.5. Valores medios de necrosis como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.



9. Otras actividades

9.1 Publicaciones y comunicaciones

11. Otros elementos de juicio no contemplados en los títulos anteriores

. Ingreso de antecedentes de investigación del Director, al sistema del SIGEBA (Conicet y UNLP) y al Repositorio Institucional de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, CIC Digital.

. Carga de los datos obtenidos de los experimentos llevados a cabo en planillas para el posterior análisis estadístico

. Mantenimientos de pedido de material para aislar

.

Anexo 3

Cambios en la sensibilidad de las poblaciones de *Z. tritici* al fungicida Tebuconazole

(inhibidor de la síntesis de los esteroides).

Introducción

Las enfermedades foliares causadas por hongos son la mayor restricción biótica que limita el rendimiento y la calidad en trigo (*Triticum aestivum* L.). En **Argentina**, las manchas foliares están producidas por organismos necrótrofos, o hemibiótrofos que causan muerte del tejido foliar. Las manchas más importantes son: la mancha amarilla [(*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs., *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker)] y la mancha de la hoja del trigo causada por *Septoria tritici* Rob. ex Desm., Teleomorph *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. in Cohn, actualmente el patógeno se denomina *Zymoseptoria tritici* (P. Crous) produce manchas amarillentas como puntos que luego se alargan se tornan marrón pálido y finalmente marrón oscuro usualmente rodeadas por una zona estrecha y amarilla.

El control de este último patógeno se realiza de forma integrada, combinando varias medidas ya sea preventivas, como la resistencia genética, el manejo de las fechas de siembra y de la resistencia de los cultivares según la zona de cultivo, la aplicación de fertilizantes y el manejo del sistema de labranza y curativas como la aplicación de fungicidas. La estrategia de control por resistencia genética ha sido poco exitosa debido a que la reacción del patógeno es altamente variable según el cultivar que colonice y además el patógeno muestra un alto grado de especialización adaptándose a la condición de resistencia y tornándose más patogénico al cabo de unos pocos años. Los cultivares en la Argentina son generalmente moderadamente susceptibles a susceptibles con sólo unos pocos con moderada resistencia, aunque la práctica del manejo integrado incluye cultivares con aceptable nivel de resistencia.

En Argentina la aplicación de fungicidas es una práctica habitual en el manejo de enfermedades en trigo. Más aún, el uso de fungicidas es importante porque la región triguera argentina combina cultivares moderadamente susceptibles de base genética estrecha, con elevado potencial de rendimiento y sembrados en una gran superficie. Todo esto, sumado a una elevada presión de inóculo del patógeno derivado de adecuados niveles de humedad, temperatura que influye en la aparición del patógeno, condiciona la aparición de enfermedades.

Los triazoles y las estrobilurinas son los fungicidas sistémicos usados para controlar las enfermedades foliares del trigo en la Argentina. Datos estadísticos de han demostrado que el 50% de los productos usados en Argentina son triazoles y que el 50% restante es una combinación de formulaciones que contiene triazoles y estrobilurinas.

Los fungicidas sistémicos son adsorbidos por la superficie de las hojas o raíces y son translocados dentro de la planta a través de los conductos xilemáticos. Este

tipo de fungicidas generalmente se mueven hacia arriba en el tallo por efecto de la transpiración y pueden acumularse en los márgenes de la hoja.

Los triazoles están caracterizados por ser un activo inhibidor del ergosterol que es el mayor estrol en los hongos. Los esteroides derivan de los terpenos y son una parte esencial de la membrana de la célula fúngica. Estas moléculas son rígidas y achatadas y en su asociación con la membrana celular le dan estabilidad haciéndolas flexibles y permitiendo el control de la permeabilidad. Los Inhibidores de la síntesis del Ergosterol (IsSE) han llegado a ser uno de los más importantes grupos de fungicidas, de todos modos ellos no son efectivos en controlar Oomicetes debido a que ellos no poseen la vía de síntesis del ergosterol.

El Tebuconazole pertenece al grupo de los fungicidas derivados de los triazoles, es sistémico siendo absorbido y redistribuido vía xilemática (movimiento acropétalo). Tiene propiedades, preventivas, curativas y erradicantes cuando es aplicado sobre el follaje de las plantas.

OBJETIVO: Evaluar la pérdida de sensibilidad al efecto del fungicida tebuconazole (grupo de los triazoles) sobre las poblaciones de aislamientos de *Zymoseptoria tritici* (patógeno de la “mancha de la hoja del trigo”), de diferentes áreas de la región triguera argentina..

Objetivos específicos:

- Aislar una población de numerosos aislamientos de *Zymoseptoria tritici* de diferentes zonas de la región triguera argentina.
- Reconocer los diferentes tipos morfológicos del talo y su ritmo de crecimiento mediante las técnicas de cultivo del patógeno sin uso del fungicida.
- Evaluar la patogenicidad de cada uno de los individuos de la población aislada mediante, inoculaciones artificiales en invernáculo.
- Establecer mediante bioensayos, el efecto in vitro del fungicida tebuconazole evaluando el ritmo de crecimiento de cada aislamiento en relación al mismo aislamiento crecido en medio de cultivo sin el tratamiento con el fungicida.
- Evaluar el efecto del fungicida tebuconazole sobre la germinación de los conidios de *Z. tritici* a través del crecimiento del tubo germinativo.
- Evaluar la relación entre los biotipos que perdieron sensibilidad al efecto del fungicida y la ganancia de la patogenicidad del biotipo en plantas de trigo.

El cumplimiento de los tres primeros objetivos fue presentado en el informe del período 14-15. La puesta en marcha de los restantes objetivos se realizó con la participación de la

Lic Clara Trofino en el mes de agosto de 2015 con su primer año de beca de experiencia laboral.

Con la Licenciada se realizaron trabajos de puesta a punto para los experimentos a y b.

Materiales y métodos

El proyecto se organizó en tres tipos de experimentos que se detallan a continuación.

Para todas las pruebas, la población de aislamientos está constituida por 46 aislamientos cuya reacción se evaluó con cada uno de los experimentos puestos a punto.

Se presentan los resultados obtenidos hasta el momento con la población completa de aislamientos (Tabla 1) para el caso de a) y una parte de esa población para los experimentos b) y c)

Tabla 1-Lista de aislamientos de *Zymoseptoria tritici* procedentes de distintas localidades de la región triguera argentina

aislamiento	Aislamiento	Origen	Año
1	FALP013SM1h1c2R2	Tres Arroyos	2013
2	FALP013SM1h2c1R2	Tres Arroyos	2013
3	FALP013SMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
4	FALP015ACAh1c1R1	Bahia Blanca	2015
5	FALP013CMh1c1R2	Tres Arroyos	2013
6	FALP014AUh1c1R2	Polvorines	2014
7	FALP014AUh2c1R2	Polvorines	2014
8	FALP014AUh4c1R2	Polvorines	2014
9	FALP014AUh5c1R2	Polvorines	2014
10	FALP013APAh1c2R2	CoronelDorrego	2013
11	FALP013APAh2c1R2	CoronelDorrego	2013
12	FALP013APAh3c1R2	CoronelDorrego	2013
13	FALP013LDS2h2c3R2	San Cayetano	2013
14	FALP013PERh2c1R2	Pergamino	2013
16	FALP013COPh2c2R2	Tres Arroyos	2013
17	FALP013COPh3c1R2	Tres Arroyos	2013
18	FALP013CARh2c3R2	San Cayetano	2013
19	FALP013LIN Ah1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
20	FALP013LIN Ah2c2R2	Cordoba(MJ)	2013
21	FALP013LIN Ah4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
22	FALP013LIN Ah3c1R2	Cordoba(MJ)	2013
23	FALP013LAVERh4c1R2	Cordoba(MJ)	2013
24	FALP013LAVERh5c2R2	Cordoba(MJ)	2013
25	FALP013PERh3c3R2	Pergamino	2013

26	FALP015MIRs1h2c1R1	Miramar	2015
27	FALP015MIRs2h3c1R1	Miramar	2015
28	FALP014OREh1c1R2	Tres Arroyos	2014
29	FALP014LDs4h3c1R2	SanCayetano	2014
30	FALP015ACAh2c1R1	Bahia Blanca	2015
31	FALP014AUh3c1R2	Polvorines	2014
32	FALP013KGUEh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
33	FALP013KGUEh6c1R2	Cordoba(MJ)	2013
34	FALP013KGUEh5c1R2	Cordoba(MJ)	2013
35	FALP013LDs1h1c1R2	SanCayetano	2013
36	FALP013LDs3h2c2R2	SanCayetano	2013
37	FALP013LDs3h1c2R2	SanCayetano	2013
38	FALP013LDs2h2c1R2	SanCayetano	2013
39	FALP013LDs4h1c2R2	SanCayetano	2013
40	FALP013LDs4h2c1R2	SanCayetano	2013
41	FALP013PERh1c1R2	Pergamino	2013
42	FALP013CMh3c1R2	Tres Arroyos	2013
43	FALP013BINTAh1c1R2	Cordoba(MJ)	2013
44	FALP013BINTAh2c1R2	Cordoba(MJ)	2013
45	FALP015MIRs1h1c1R2	Miramar	2015
46	FALP015MIRs1h3c1R2	Miramar	2015

Los siguientes experimentos de laboratorio se pusieron a punto a través de los bioensayos de: 1) sensibilidad a la acción del fungicida . Se utilizó el fungicida Tebuconazole, Nombre comercial FOLICUR 25W% cuya acción sobre el patógeno se dirige a inhibir la síntesis del ergosterol, interfiriendo en la formación de las paredes celulares del hongo.

a) Test de Sensibilidad a la acción del fungicida en medio nutritivo (in vitro).

1. En un Erlenmeyer de 500 mL preparar 90 ml de medio de cultivo Agar papa glucosado (APG) con cloranfenicol y cuando este llegue a una temperatura de 50°C aproximadamente agregar 50 uL de dimetil sulfoxido (DMSO)
2. En otro erlenmeyer de 500 mL preparar 100mL de agua destilada estéril e incorporar 2200uL de fungicida previamente filtrado
3. Tomar un volumen de 10mL de la solución del fungicida e incorporarlos al medio de cultivo.
4. Para el control, preparar en otro erlenmeyer de 100mL 90 mL de APG con cloranfenicol y agregarle 10 mL de agua destilada estéril e incorporar 50 uL de DMSO.

5. Sembrar en diez cajas de Petri de 9 cm de diámetro, 10 mL del medio de cultivo con fungicida en cada uno.
6. Realizar el mismo procedimiento sembrando 10 cajas de Petri con el medio de cultivo sin fungicida.
7. Repicar un disco del patógeno crecido en medio de cultivo APG de 2 cm de diámetro aproximadamente en cada una de las cajas sembradas con medio de cultivo con fungicida y sin fungicida.
8. Incubar durante 7 días a 23°C y ciclos alternados de luz/ oscuridad . Realizar la primera medición de los radios horizontal y vertical. Luego continuar incubando hasta cumplir 14 días de incubación.
9. Calcular la tasa de inhibición del crecimiento de la colonia utilizando la siguiente fórmula

$(A-B/A) \times 100$ donde :

A= es el valor del promedio de los radios horizontal y vertical del control sin fungicida

B= es el valor del promedio de los radios horizontal y vertical de los tratamientos con fungicida.

Como complemento de éste, se realizó otro bioensayo *in vitro* basado en:

b) la inhibición de la germinación de esporas del patógeno por acción del fungicida. Este experimento se aplica a estudios de sensibilidad al fungicida y tolerancia a las diferentes concentraciones del producto químico calculando el EC_{50} = (mitad de la concentración máxima efectiva).

Test de Inhibición de la germinación de esporas del patógeno por acción del fungicida.

-En cuatro Erlenmeyers de 50mL c/u preparar cuatro soluciones con 10mL de agua destilada estéril con las siguientes concentraciones de fungicida:

250 uL equivalente a 250g/L en 10mL	
200uL	
175uL	
100	
75	
50uL	
25 uL	
2,5	2,5g/L en 10mL
0,0	

- Filtrar

-Para el control, preparar en un Erlenmeyer 10 ml de agua destilada estéril sin fungicida .

-Prepara 15 eppendorf de 1500 uL para cada aislamiento de tal forma de organizar 3 repeticiones para cada concentración del fungicida.

-Colocar en cada eppendorf 1 mL de la solución del fungicida y agregar 500uL de una suspensión de conidios de $3,5 \times 10^6$

-Incubar 24 a 36h a una temperatura de 20-24°C en el laboratorio.

-Agregar 3 gotas de azul de algodón en cada eppendorf

Para el recuento e identificación de conidios germinados utilizar un campo de 100 x en el microscopio observando 20 conidios y repetir 3 veces.

-Anotar en una planilla los conidios germinados y no germinados, recontando en total 100 conidios

El resultado final se expresa en porcentaje de conidios germinados en relación a los no germinados. Se organizaron 3 repeticiones para cada tratamiento por aislamiento.

c)Experimento de invernáculo

Consistió en evaluar el porcentaje de inhibición en la severidad de la enfermedad desarrollado por la aplicación del fungicida a la dosis de campo ($400\text{cm}^3/\text{ha}$.) 48 h anteriores a la inoculación de *Z. tritici*. El total de aislamientos analizados comprendió 46 individuos. Después de 21-25 días de incubación de la enfermedad a una temperatura de 14-24°C y un régimen de luz de 10h de luz/14 h de oscuridad se procedió a evaluar la severidad como porcentaje de cobertura necrótica y picnidial de los tratamientos inoculados con y sin el fungicida y se calculó la tasa de inhibición por acción del fungicida, a través de la siguiente fórmula:

$(A-B/A) \times 100$ donde

-A es la severidad de la enfermedad de las plantas sin control

-B es la severidad de la enfermedad de las plantas con control .

d)Experimento molecular

Detectar a través de métodos basados en amplificación por PCR y secuenciación, las mutaciones en el genes CYP51 relacionados con la reducción de la sensibilidad a los fungicidas del grupo azoles.

Para cumplir con esta etapa el proyecto se ha contactado a la Dra. Fabiana Consolo del INBIOTEC de Mar del Plata.

Relacionado con esta investigación se acondicionó el micelio de cada uno de los 54 aislamientos para la extracción de ADN. Para ello se obtuvieron colonias monospóricas que posteriormente se sembraron en medio líquido YMA (extracto de levadura 4g, sacarosa 4 g extracto de malta 4 g y 250 mg de cloranfenicol en 1L de agua destilada). Luego de 7 días de crecimiento en agitación a 22 °C el volumen de conidios secundarios desarrollado en el medio se centrifugó 15 min. a 5000rpm en frío. El pellet de conidios secundarios se concentró y lavó con agua destilada esteril y se conservó en tubos eppendorf a -18°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Durante el período informado también se mantuvo la colección de aislamientos de *S. tritici* que hasta el momento contó con poblaciones provenientes de diferentes localidades de la región triguera argentina, alguno de cuyos individuos se utilizaron en los experimentos de campo de años anteriores. La tarea de mantenimiento comprendió observaciones regulares del estado de las colonias y posterior repique periódico (cada 2 meses). La colección se mantiene bajo la forma de cultivo activo en tubos y cajas en el medio agar malta y en frascos de vidrio con vaselina estéril.

Se probó la conservación de colonias monospóricas en glicerol como alternativa al uso de la vaselina líquida estéril. Para ello se preparó una dilución de glicerol al 25%, se fraccionó en frascos de vidrio de 12ml con tapa a rosca, se esterilizó 20 min. a 121 °C, se dejó enfriar y se procedió a repicar trozos de colonia monospórica de cada uno de los aislamientos. Se conservó a -18 °C.

Análisis de los datos.

Los valores de velocidad de crecimiento de las colonias, de eficiencia del fungicida al efecto del tebuconazole se transformará logarítmicamente y el porcentaje de necrosis y el de cobertura picnidial se transformarán por raíz cuadrada de arco seno. Luego se aplicará un ANOVA y un Test de LSD. Por último mediante un análisis de correlación simple se asociarán la tolerancia al fungicida y la patogenicidad de cada aislamiento en la población del patógeno

RESULTADOS

Los resultados presentados en este informe surgen del análisis de los valores medios para cada experimento. Los valores numéricos de velocidad de crecimiento de cada aislamiento en cajas de petri con APG y los resultados de porcentaje de necrosis y porcentaje de picnidios serán analizados estadísticamente, a la brevedad.

a) Test de Sensibilidad a la acción del fungicida en medio nutritivo (in vitro).

La sensibilidad de 46 aislamientos de *Z. tritici* se probó bajo el efecto del Tebuconazole FOLICUR 25W% a una concentración de 0,400L/h. Se

ensayaron grupos de 18, 9 y 10 aislamientos por vez correspondientes a cada uno de los tiempos probados.

Los resultados se presentan como el

Tabla 2. Porcentaje (%) de Eficiencia en el control de *Z. tritici* con el fungicida Tebuconazole y la velocidad de crecimiento de cada uno de ellos en una semana y por día.

Primer grupo de aislamientos

aislamiento	Porcentaje (%) de eficiencia	cm crecidos /semana	cm por dia
1	60.2	0.11	0.015
2	58.9	0.01	0.001
3	70.3	0.00	0.00
4	58.9	0.00	0.00
5	61.5	0.00	0.00
6	63.3	0.00	0.00
7	61.4	0.00	0.00
8	91.4	0.04	0.005
9	17.01	0.09	0.012*
10	49.2	0.09	0.012

Tabla 3. Porcentaje (%) de Eficiencia en el control de *Z. tritici* con el fungicida Tebuconazole y la velocidad de crecimiento de cada uno de ellos en una semana y por día.

Segundo grupo de aislamientos

aislamiento	Porcentaje (%) de eficiencia	cm crecidos /semana	cm por dia
11	49.26	0.01	0.001

12	71.5	0.06	0.0008
13	54.7	0.09	0.012
14	57.4	0.04	0.004
15	61.0	0.00	0.00
16	55.0	0.00	0.00
17	65.0	0.00	0.00
18	67.5	0.00	0.00
Tercer grupo de aislamiento	Porcentaje (%) de eficiencia	cm crecidos /semana	mm por dia
19	-7.14	0.06	0.004
20	16.66	0.00	0.00
21	4.7	0.00	0.00
22	-19.04	0.03	0.002
24	4.76	0.00	0.00
25	-7.14	0.00	0.00
26	-7.14	0.00	0.00
27	4.7	0.00	0.00
28	4.7	0.10	0.007

Tabla 4. Porcentaje (%) de Eficiencia en el control de *Z. tritici* con el fungicida Tebuconazole y la velocidad de crecimiento de cada uno de ellos en una semana y por dia.

Cuarto grupo de aislamientos

aislamiento	Porcentaje (%) de eficiencia	cm crecidos /semana	cm por dia

32	7.21	0.26	0.037
35	20.97	0.05	0.0007
37	55.6	0.16	0.022
38	17.52	0.00	0.00
40	56.3	0.00	0.00
42	1.48	0.11	0.007
43	57.2	0.00	0.00
44	63.5	0.00	0.00
45	59.7	0.04	0.005

Existe una gran variabilidad en cuanto a la respuesta de los aislamientos al efecto del fungicida demostrado por las diferentes velocidades de crecimiento en el medio APG a lo largo de los 14 días de observación como así también en los valores de la tasa de crecimiento diario.

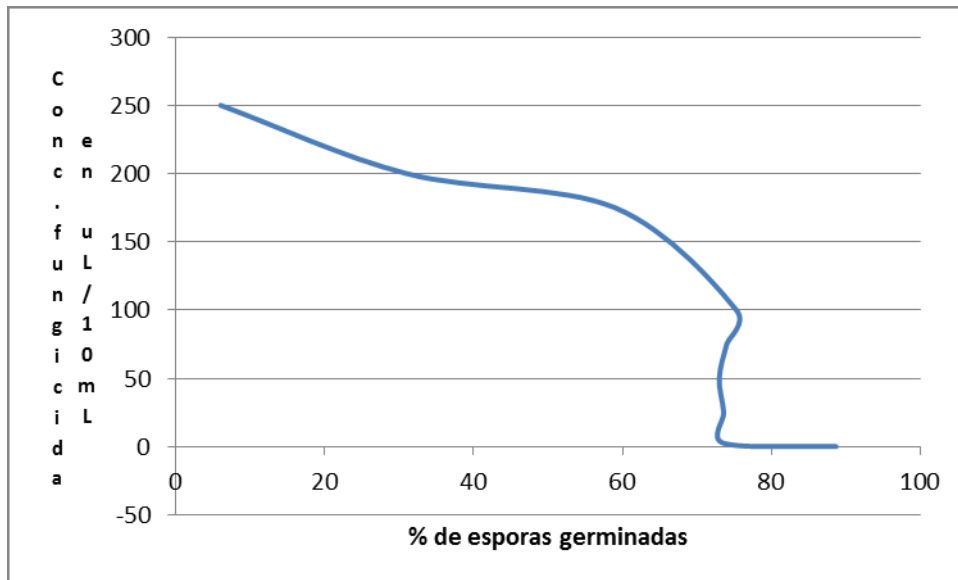
Otro parámetro que permite detectar estas diferencias es el de Porcentaje de eficiencia en el control del patógeno por el fungicida. Se presentan a los aislamientos 9, 20, 21, 24, 27, 28, 32, 35, 42 como los aislamientos que superaron el efecto inhibitor del fungicida, es decir tolerantes, con valores de eficiencia de acción que varió entre 1,48 y 17,45%.significando un 25% del total de los aislamientos estudiados. Los restantes aislamientos que representan un 75% del total, se vieron vulnerados por el principio activo del fungicida.

En los aislamientos 19, 22, 25, 26 se obtuvieron valores negativos (-)(-7.14, -19.04,--7.14, -7.14 respectivamente, de porcentaje de eficiencia en la acción del fungicida, denotando también tolerancia al producto químico.

b) Test de Inhibición de la germinación de esporas del patógeno por acción del fungicida.

A las concentraciones ensayadas se observó una tendencia a que a mayor concentración del fungicida menor fue el porcentaje de esporas germinadas Fig. 1. No se realizó el cálculo de la recta de regresión para definir la concentración efectiva que cause el 50% de la inhibición de los conidios de *Z. tritici*

Fig. 1 Porcentaje de esporas germinadas a diferentes concentraciones del fungicida tebuconazole.



c) Resistencia de los aislamientos al tebuconazole en plantas de trigo.

El tebuconazole se ensayó sobre plántulas de trigo frente a la agresividad de 36 aislamientos de *Z. tritici*. Se aplicó como un protector contra el patógeno, dos días antes de la inoculación.

El control producido por el tebuconazole fue alto, con una frecuencia de eficacia de 14/ 36 aislamientos totales, con una variación en la eficiencia de 47-94%. (Figs. 1, 2,3)

Los aislamientos 3, 8, 10, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 26, 43,44, 45 y 46. mostraron un grado de resistencia al tratamiento con fungicida. Algunos aislamientos desarrollaron sólo necrosis careciendo de desarrollo picnidial (por ejemplo aislamientos 2, 28, 34 y 35); otros aislamientos demostraron baja eficiencia en el tratamiento con fungicida porque en el transcurso de la conservación a baja temperatura y en vaselina, perdieron agresividad (por ejemplo: 2, 12, 25, 26, 27,34

El comportamiento de los aislamientos en este test fue muy variable, contando por ejemplo con el aislamiento 5 con valores porcentuales de necrosis y picnidios altos en el control y bajos o nulos en el tratamiento con fungicida; el aislamiento 1 con alta necrosis y bajo porcentaje de picnidios pero todos los valores bajos; aislamiento 3 con alto porcentaje de necrosis y bajo porcentaje de picnidios en el tratamiento con el fungicida y el control con bajo porcentaje de necrosis y picnidios.

Por su parte el aislamiento 6 resultó un ejemplo de alta eficiencia por parte del fungicida, contrariamente al aislamiento 37 con alto porcentaje de necrosis y moderado de picnidio en el control sin fungicida y en el tratamiento con fungicida que respondió igual que el control.

Fig 2.Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 1- 10 considerando desarrollo necrótico sobre la hoja del cultivar BioINTA 2005..

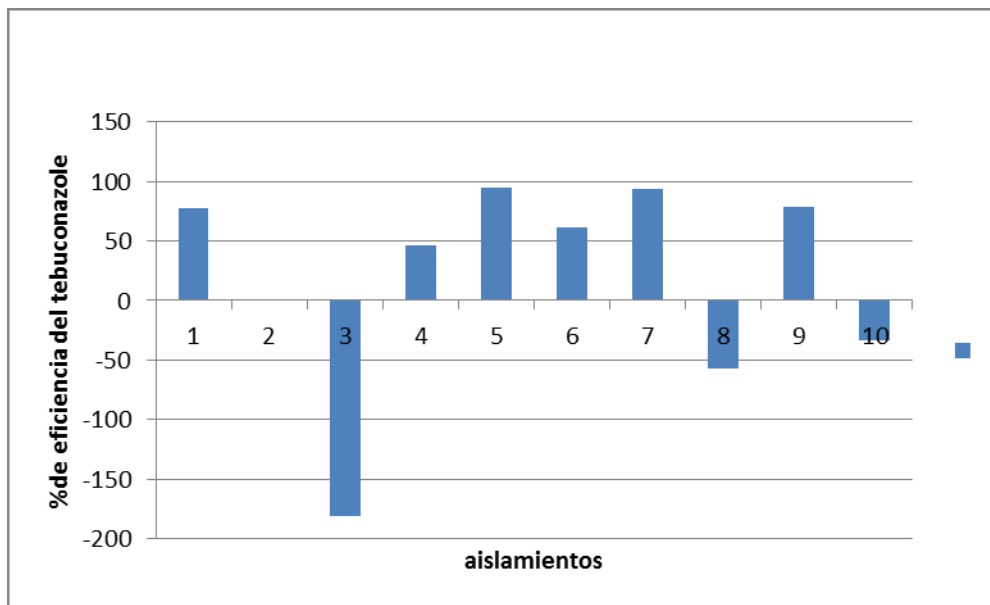


Fig. 3 .Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 11- 20 considerando desarrollo necrótico en la hoja del cultivar BioINTA 2005

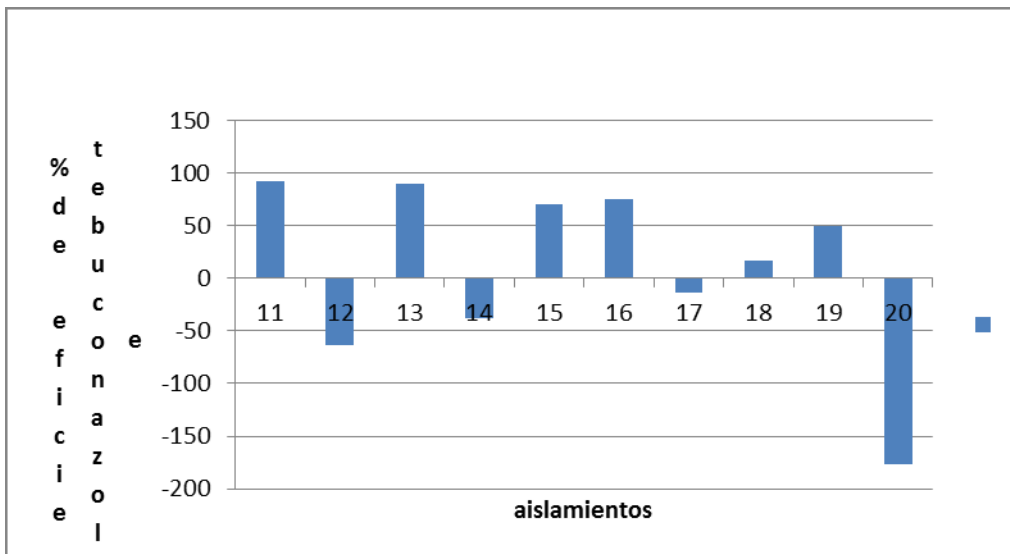
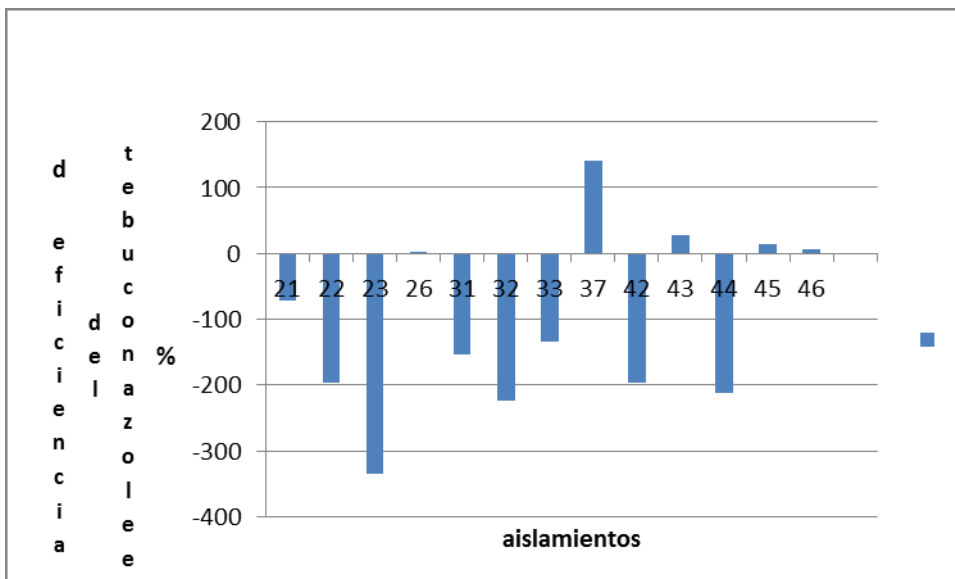


Fig. 4. Eficiencia del tratamiento con tebuconazole sobre los aislamientos 21-26, 31-37, 42-46 considerando desarrollo necrótico en la hoja del cultivar BioINTA 2005.



Dentro de los valores positivos se diferencian valores mayores del 30 % como aislamientos que no perdieron sensibilidad al fungicida, los valores menores corresponden a los que manifestaron tendencia a la resistencia. Por su parte, también las barras negativas manifiestan grados de resistencia teniendo en cuenta que se han eliminado los aislamientos con baja agresividad.

Fig.5. Valores medios de necrosis como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.

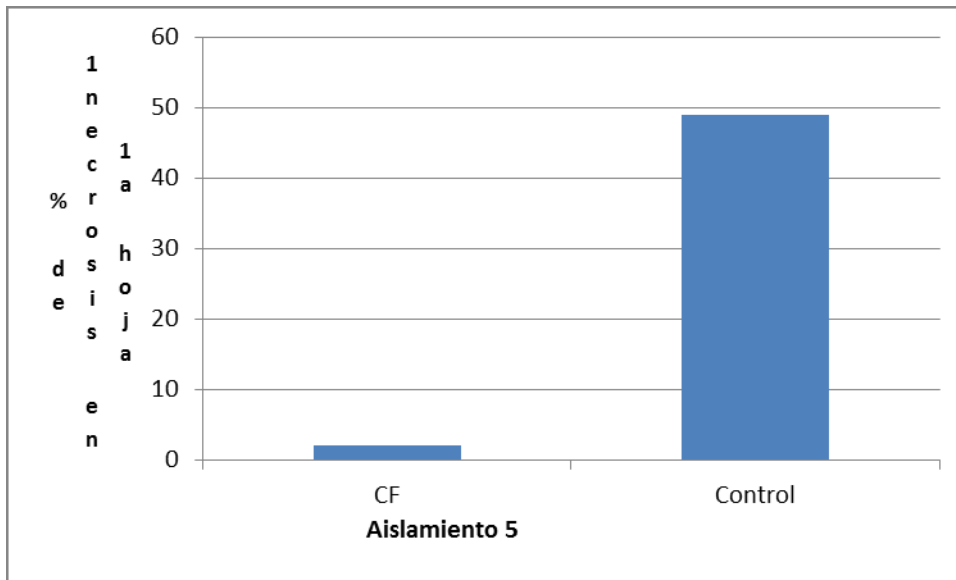
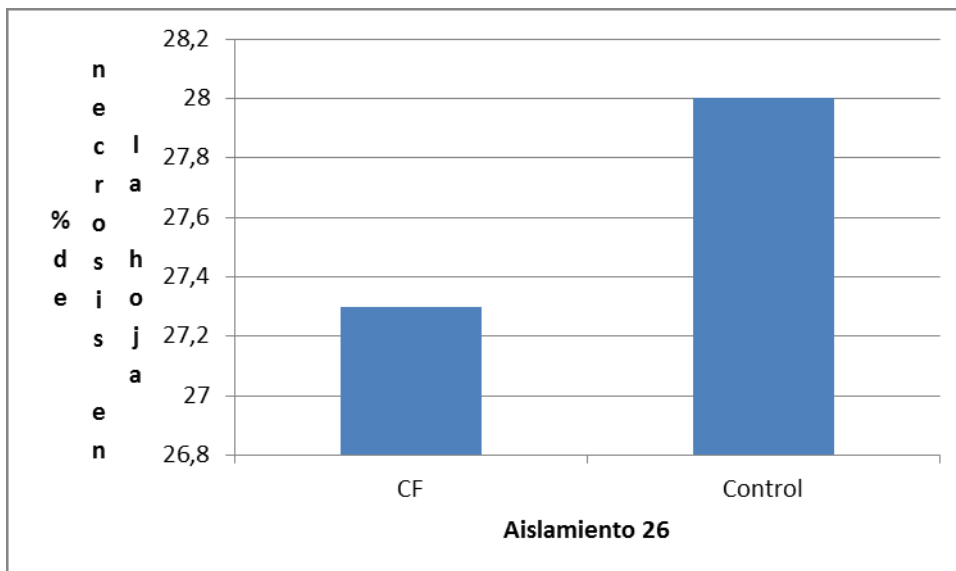


Fig.6 Valores medios de necrosis como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.



Para los resultados de porcentaje de cobertura picnidial se observa la misma variabilidad en la tolerancia a la acción del fungicida. De 36 aislamientos (17/36) 17 se mantuvieron sensibles al fungicida mientras que 19/36 demostraron tolerancia al tebuconazole.

Fig. 7. Valores medios de cobertura picnidial como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005. CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.

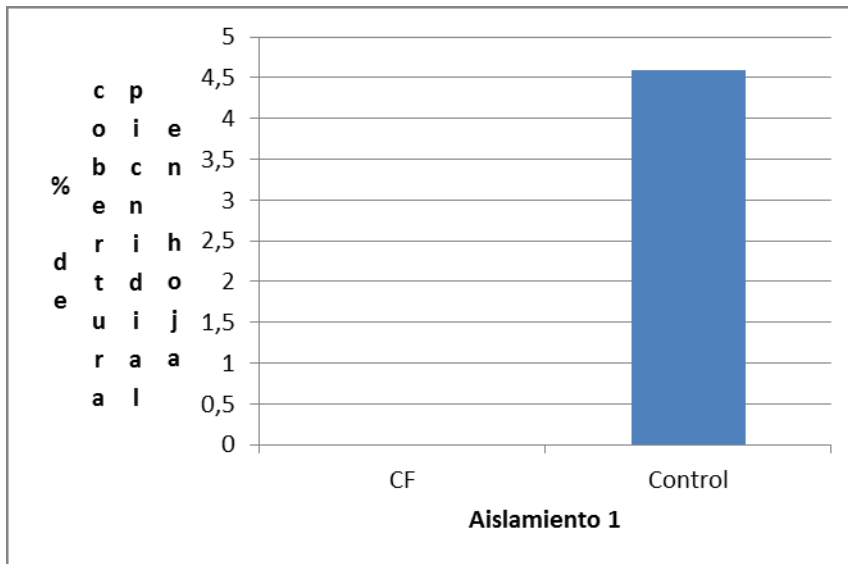


Fig. 8. Valores medios de cobertura picnidial como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005. CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.

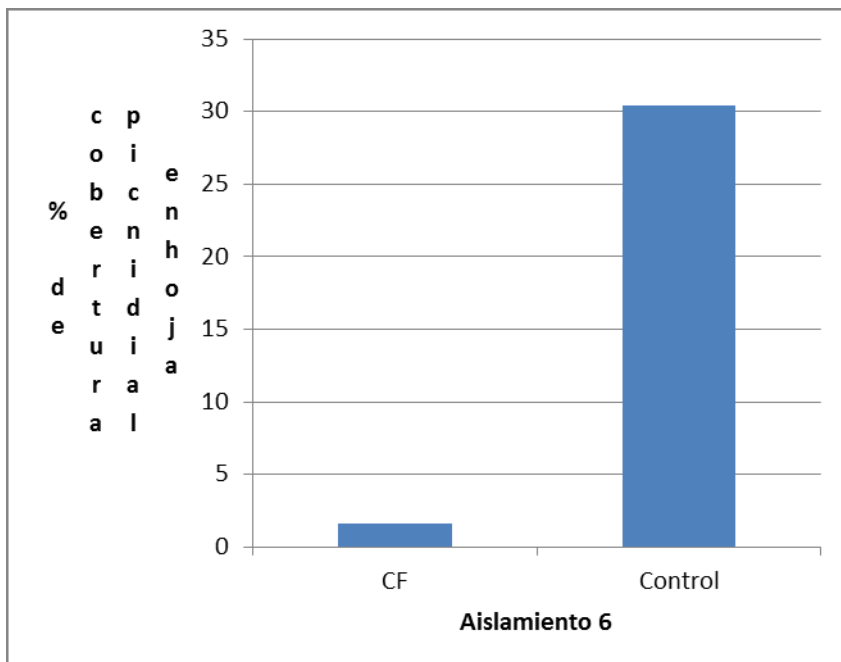
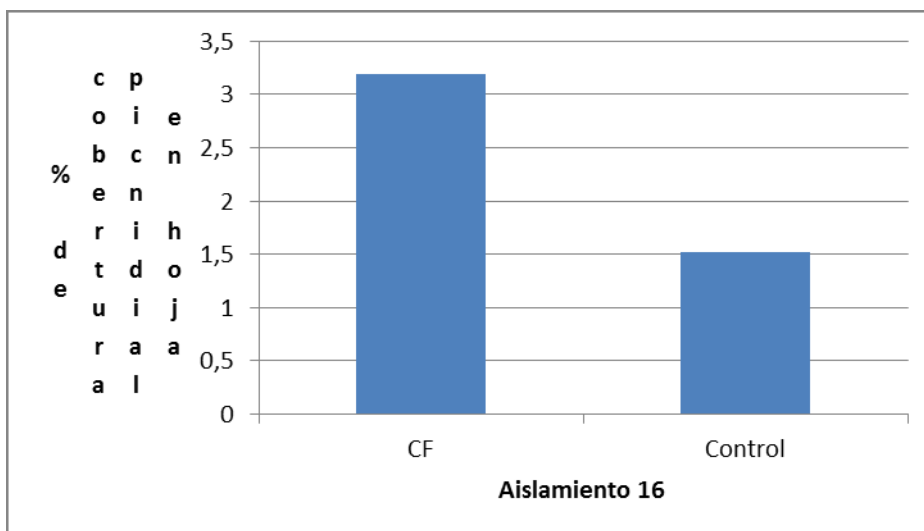


Fig. 9. Valores medios de cobertura picnial como porcentaje, en la 1° hoja del cultivar BioINTA 2005. CF tratamiento con fungicida; Control inoculado solo con *Z.tritici*.



En las figuras 7,8 se presentan ejemplos de aislamientos sensibles y en la Fig. N°9 el aislamiento es tolerante.

Discusión y conclusiones

Los resultados anteriores corresponden a los experimentos de ajuste de las técnicas presentadas. En 2017 se repetirán los 3 tipos de experimentos y se incluirá la técnica de sensibilidad al fungicida por microtitulación para determinar la Dosis inhibitoria 50 (DI50), con las concentraciones de fungicida y la inhibición en la germinación de los conidios (Ronis et al. 2013). La conclusión a este estudio se logrará después del análisis estadístico propuesto, aunque a continuación se resaltan algunas:

En las condiciones de campo argentinas, el uso de los fungicidas es una práctica común que se ajusta a la resistencia del cultivar y a la presión de inóculo del patógeno habitual de la zona (Simón et al. 2013). El uso frecuente de fungicida afecta la sensibilidad de los aislamientos fúngicos, efecto que se ha manifestado en la alta variabilidad observada en la velocidad de crecimiento de la población del patógeno en condiciones in vitro. La frecuencia de cambio fue de 12 aislamientos tolerantes /46. Para el experimento in vivo de 36 aislamientos inoculados en plántulas tratadas con el fungicida (17/36) 17 se mantuvieron sensibles al producto químico mientras que 19/36 demostraron tolerancia al tebuconazole. El próximo objetivo será correlacionar la patogenicidad de los aislamientos y la tolerancia al fungicida. Se intentará investigar la asociación entre la patogenicidad y la

tolerancia ambos atributos gobernados por caracteres cuantitativos. Cougler y Mundt (2002) observaron que aislamientos de *Mycosphaerella graminicola* provenientes de cultivares tratados con un fungicida protector (clorotalonil) fueron más agresivos que los aislamientos muestreados a partir de los mismos cultivares provenientes de campos sin tratamiento con fungicida. Varios aislamientos, entre ellos 31,32, 33 y 34 mostraron esa tendencia.

En el transcurso de la investigación se manifestó alguna dificultad en mantener los aislamientos con una patogenicidad inalterada a través del tiempo. Este inconveniente puede confundir los resultados de eficiencia del fungicida "in vivo" por falta de una reacción susceptible en el tratamiento control (plántula de trigo inoculada sólo con el aislamiento de *Z. tritici*). Como medida inicial se cambiará la forma de conservar los aislamientos desde vaselina a glicerol y se extremarán los cuidados en el número de generaciones de repique (Cordo et al 1982).

Hasta el momento se :

-Se observa variabilidad de los aislamientos en respuesta a la tolerancia al fungicida Tebuconazole, tanto para experimentos in vitro como in vivo.

- Se observó diferencias en la germinación de los conidios de *Z. tritici* a concentraciones variables del fungicida. Se requieren más experimentos para obtener una respuesta precisa a la DI50

Se continua trabajando en la puesta a punto de la técnica para amplificar el gen CYP51 a través de los cuatro primers diseñados por Leroux et al.(2007).

Se determinará la presencia de mutaciones asociadas a la sobre expresión del gen CYP51. Hasta el momento en los trabajos de investigación se han descrito 15 de ellas. Para el gen que condiciona sensibilidad al tebuconazole se describió al genotipo I136A como responsable de la resistencia a este fungicida (Leroux et al. 2007; Marzani, 2011; Yang et al. 2013; Ronis et al. 2014).