

Competencia entre aislamientos de *Septoria tritici* Rog. Ex. Desm., en trigos harineros (*Triticum aestivum* L.)*

Competition between isolates of *Septoria tritici* Rog. Ex Desm. in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)

Santos Gerardo Leyva Mir^{1§}, Emma Zavaleta Mejía², Lucy Gilchrists Saavedra³, Mireille Khairallah³ y Luis Antonio Mariscal Amaro⁴

¹Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. C. P. 56230. Estado de México. Tel. 9521500. Ext. 6179. ²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, C. P. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Carretera México-Veracruz, km 45. El Batán, 56130, Texcoco, Estado de México. ⁴Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5. C. P. 38110. Tel (461)6115323. [§]Autor para correspondencia: lsantos@correo.chapingo.mx.

Resumen

Para la obtención de genotipos de trigo resistentes a *Septoria tritici* se hacen inoculaciones con diferentes aislamientos; sin embargo, existe evidencia de competencia entre estos que sobrevalúa la respuesta de resistencia de los genotipos. Para comprobar esto, el objetivo de este estudio fue probar tres genotipos de trigo con diferente nivel de resistencia a éste hongo inoculado con aislamiento, P8, P9 y B1, individuales y en mezclas. El experimento se estableció en 2006 bajo un diseño de parcelas divididas con tres repeticiones. Se recolectaron picnidios de la hoja bandera y de la hoja inferior para identificar, mediante RFLP's, los aislamientos que se establecieron y prevalecieron en los diferentes genotipos. Cuando P8, P9 y B1 se inocularon individualmente se recuperó al aislamiento original; cuando se inocularon mezclados no se aisló P9, evidenciando la competencia entre aislamientos y la baja agresividad de P9. B1 tuvo la frecuencia de recuperación más alta. Con B1 y P8 se reaislaron variantes genéticas cuya presencia fue influenciada por el genotipo de trigo y los aislamientos con que se mezclaron. Debido a que la competencia puede reducir la agresividad y la patogenicidad de los aislamientos inoculados en mezcla, la mejor estrategia en los programas de mejoramiento de trigo para seleccionar resistencia, es la inoculación individual de aislamientos.

Abstract

Inoculations with different isolates are done to obtain wheat genotypes resistant to *Septoria tritici*; however, there is evidence of competition between the isolates that overestimates the resistance response of the genotypes. To check this, the aim of this study was to test three wheat genotypes with different levels of resistance to this fungus, which was inoculated with isolates P8, P9 and B1, individually and in mixtures. The experiment was established in 2006 under a split plot design with three replicates. Pycnidia were collected from the flag leaf and the lower leaf to identify, using RFLPs, the isolates that established and prevailed in the different genotypes. When P8, P9 and B1 were inoculated individually, the original isolate was recovered; when they were inoculated in mixture, P9 was not re-isolated, which evidenced the competition between the isolates and the low aggressiveness of P9. B1 had the highest recovery rate. With B1 and P8, genetic variants were reisolated whose presence was influenced by the wheat genotype and the isolates with which they were mixed. Because competition can reduce the aggressiveness and pathogenicity of the isolates inoculated in mixture, the best strategy in wheat breeding programs to select resistance is to inoculate the isolates individually.

* Recibido: julio de 2012
Aceptado: marzo de 2013

Palabras claves: agresividad, competencia, picnidios, variantes genéticas.

El tizón del trigo causado por *S. tritici* afecta la producción de este cereal en zonas lluviosas y frías, atacando genotipos enanos y de alto rendimiento. Los factores determinantes del hongo para la penetración y colonización del hospedante son alta humedad relativa y temperaturas de 15-22 °C (Chungu *et al.*, 2001). Los programas de mejoramiento genético de trigo para obtener resistencia a *S. tritici* inoculan con una mezcla de aislamientos del hongo para ampliar la representación de su variación patogénica y la respuesta de los cultivares de trigo; sin embargo, mediante RFLP's, McDonald *et al.* (1995), Linde *et al.* (2002) y Cohen *et al.* (2000) encontraron variación genética del hongo; mientras que otros investigadores han encontrado evidencia de interacciones y competencia entre aislamientos del hongo y genotipos de trigo (Kema *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 2003; Leyva *et al.*, 2008b; Simón *et al.*, 2012). Por otro lado, investigadores(as) (Zelikovitch y Eyal, 1991; Zelikovitch *et al.*, 1992; Gilchrist y Velázquez, 1994; Cárdenas *et al.*, 2003) reportaron que en *S. tritici* la inoculación con mezclas de aislamientos reduce significativamente la producción de picnidios en comparación con inoculaciones individuales. Zelikovitch y Eyal (1991) observaron que *S. tritici* produce metil-3, indolcarboxilato, un inhibidor de la formación de picnidios e involucrado en la regulación de los síntomas del hospedante. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue observar la competencia entre aislamientos de *S. tritici* en tres genotipos de trigo y caracterizar los diferentes aislamientos del hongo mediante RFLP's.

Aislamientos del patógeno. Se usaron tres aislamientos de *S. tritici* con diferente virulencia y origen: P8 el más virulento y P9 menos virulento, de Pátzcuaro, Mich.; y B1, de virulencia similar a P8, de Atizapán, México (Leyva *et al.*, 2008a).

Hospedero. Los genotipos de trigo TRAP#1/BOW y SUZ6//ALONDRA/PAVON resistentes a *S. tritici*, y el susceptible KAUZ (Gilchrist y Velázquez, 1994) fueron sembrados en el ciclo primavera-verano 2006 en CIMMYT, Toluca, México. El diseño experimental fue de parcelas divididas con tres repeticiones, la parcela grande fueron los siete tratamientos, P8, P9, B1, P8×P9, P8×B1, P9×B1 y P9×P8×B1; y las parcelas pequeñas los tres genotipos de trigo. La parcela experimental fueron tres

Key words: aggressiveness, competition, genetic variants, pycnidia

Wheat blight caused by *S. tritici* affects the production of wheat in rainy and cold regions, attacking dwarf and high yielding genotypes. The factors that determine the penetration and colonization of the host by the fungus are high relative humidity and temperatures of 15-22 °C (Chungu *et al.*, 2001). Wheat breeding programs trying to obtain resistance against *S. tritici* inoculate a mixture of isolates of the fungus to increase the representation of its pathogenic variation and the response of the wheat cultivars; however, using RFLPs, McDonald *et al.* (1995), Linde *et al.* (2002) and Cohen *et al.* (2000) found genetic variation in the fungus, while other researchers have found evidence of interactions and competition between fungal isolates and wheat genotypes (Kema *et al.*, 1996; Cardenas *et al.*, 2003; Leyva *et al.*, 2008b; Simon *et al.*, 2012). Moreover, researchers (Zelikovitch and Eyal, 1991; Zelikovitch *et al.*, 1992; Gilchrist and Velázquez, 1994; Cárdenas *et al.*, 2003) reported that in *S. tritici* the inoculation with isolate mixtures significantly reduced the production of pycnidia compared to individual inoculations. Zelikovitch and Eyal (1991) found that *S. tritici* produces methyl-3-indolecarboxylate, an inhibitor of the formation of pycnidia involved in the regulation of host symptoms. Therefore, the aim of this study was to observe the competition between isolates of *S. tritici* in three wheat genotypes and to characterize the different isolates of the fungus by RFLPs.

Isolates of the pathogen. Three isolates of *S. tritici* with different virulence and origin were used: the most virulent was P8 and the less virulent P9, both from Patzcuaro, Michoacan; B1, of similar virulence to P8, was from Atizapán, Mexico (Leyva *et al.*, 2008a).

Host. Wheat genotypes TRAP#1/BOW and SUZ6//ALONDRA/PAVON, resistant to *S. tritici*, and the susceptible genotype KAUZ (Gilchrist and Velázquez, 1994) were planted in the spring-summer cycle of 2006 at CIMMYT, Toluca, Mexico. The experimental design was split plot with three replicates; the large plot had the seven treatments, P8, P9, B1, P8×P9, P8×B1, P9×B1 and P9×P8×B1, while the small plots had the three wheat genotypes. The experimental plot had three furrows of 0.80 × 3 m in length. The agronomic practices used were the same that are used in commercial plantings in the region.

surcos de 0.80×3 m de longitud. Las prácticas agronómicas fueron las que se realizan en siembras comerciales de la región.

Inoculación y reaislamiento del hongo. Se realizó con los siete tratamientos, mezclándose según Zelikovitch y Eyal (1991) una hora antes de realizar la inoculación para mantener viables los conidios, agregándoles Tween20® (0.5). Las plantas se inocularon en etapa de amacollamiento con una aspersora de ultra bajo volumen, con presencia de lluvia para asegurar 18 h de HR al 100%, la concentración fue de 1×10^6 esporas mL⁻¹. En cada repetición se marcaron al azar seis plantas de cada genotipo. Cuando los aislamientos inoculados se establecieron y el hongo avanzó en sentido vertical a partes superiores de la planta, en etapa de grano masoso se colectó la hoja bandera en el genotipo susceptible, y la hoja inferior a ésta en los genotipos resistentes, de las seis plantas marcadas. Las hojas se etiquetaron y conservaron a 5 °C.

Las hojas se desinfectaron por 15 s en etanol (70%) y 90 s en hipoclorito de sodio (0.5%), el tejido se mantuvo en cámara húmeda por 12 h a temperatura ambiente para inducir la formación de cirrus en cada picnidio. Por medio de un conteo previo de la densidad de picnidios × área foliar de la hoja bandera y hoja inferior, se determinó el tamaño de muestra, seleccionándose los picnidios por medio de un muestreo aleatorio (Cochran, 1980). De cada tratamiento de aislamiento individual se tomaron dos picnidios por hoja, en las mezclas de dos aislamientos cuatro picnidios, y en la mezcla de los tres aislamientos ocho picnidios. El cirrus de cada picnidio se transfirió a una caja Petri con medio LMSA.

Multiplicación de aislamientos. Se caracterizaron 468 aislamientos a partir de los picnidios individuales, 36 para cada tratamiento individual, 72 para cada tratamiento de P8×P9, P8×B1 y P9×B1, y 144 para P9×P8×B1; más los tres aislamientos originales. Para obtener 3 g de tejido fungoso se cultivaron los aislamientos en medio de cultivo líquido por 7 d en movimiento continuo a 150 rpm a temperatura ambiente. El hongo formó bolas de micelio y esporas, se extrajo el micelio por centrifugación a 1 900 g por 15 min, se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero.

Extracción, cuantificación y digestión de DNA. Los tres procedimientos se hicieron de acuerdo al protocolo para especies vegetales de CIMMYT (CIMMYT, 2006). Para la digestión se utilizaron las endonucleasas: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* y *BamIII*.

Fungal inoculation and reisolation. This was performed with the seven treatments, mixing, according to Zelikovitch and Eyal (1991), one hour prior to inoculation in order to maintain the conidia viable, adding Tween20® (0.5). The plants were inoculated at the tillering stage with an ultra low volume sprayer in the presence of rain to ensure 18 h of HR at 100%; the concentration was of 1×10^6 spores mL⁻¹. Six plants of each genotype were marked randomly at each replicate. When the inoculated isolates were established and the fungus advanced vertically to the upper parts of the six marked plants in the dough grain stage (Tottman *et al.*, 1979), the flag leaf of the susceptible genotype was collected, as well as the leaf below the flag leaf in the resistant genotypes. The leaves were labeled and stored at 5 °C.

The leaves were disinfested for 15 s in ethanol (70%) and 90 s in sodium hypochlorite (0.5%); the tissue was kept in a moist chamber for 12 hours at room temperature to induce the formation of cirrus on each pycnidium. Sample size was determined through a previous count of the density of pycnidia×leaf area of the flag and lower leaves, selecting the pycnidia through random sampling (Cochran, 1980). Two pycnidia per leaf were taken from each individual isolate treatment in the mixtures of two isolates and four pycnidia, and in the mixture of the three isolates and eight pycnidia. The cirrus of each pycnidium was transferred to a Petri dish with LMSA medium.

Multiplication of isolates. 468 isolates were characterized from the individual pycnidia, 36 for each individual treatment, 72 for each treatment with P8×P9, P8×B1, and P9×B1, and 144 for P9×P8×B1, plus the three original isolates. To obtain 3 g of fungal tissue the isolates were grown in liquid culture medium for 7 d in continuous movement at 150 rpm and room temperature. The fungus formed mycelium and spore balls; the mycelium was extracted by centrifugation at 1 900 g for 15 min, frozen with liquid nitrogen and pulverized in a mortar.

Extraction, quantification and digestion of DNA. The three procedures were done according to the protocol for plant species of CIMMYT (CIMMYT, 2006). For digestion, we used the endonucleases: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* and *BamIII*.

Electrophoresis. The DNA fragments were separated by electrophoresis on 0.7% agarose gel (SeaKem agarose FMC Bio Productor) of 20 x 25 cm, using two combs and a buffer at 0.03 V/cm for 22 h. The gel was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Electroforesis. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (SeaKem agarose FMC Bio Productor), de 20 x 25 cm, utilizando dos peines y un amortiguador a 0.03 V/cm por 22 h. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

Transferencia. Para este procedimiento se siguió el protocolo citado por CIMMYT, (2006). Se transfirió el DNA cortado a una membrana de nylon (MS Magnagraph Nylon Membrane), utilizando un amortiguador de transferencia por 20 h, según la técnica Southern. Después de las 20 h, la membrana se remojó en citrato sódico salino por 15 min, se secó por 10 min y luego se fijó el DNA en la membrana con luz UV (120 000 μ joules). Se puso la membrana a hornear a 95 °C 3 h, y se almacenó a 4 °C.

Sondas. Se utilizaron ocho clones de plásmidos de *Escherichia coli* con fragmentos al azar de DNA de diferente tamaño. Se utilizaron los clones que permitieron separar los aislamientos de *S. tritici*. El marcaje de sondas se hizo con la técnica de nick translation (McDonald y Martínez, 1990) utilizando digoxigenina al 2.5%.

Hibridación y detección. Se realizó con la metodología de quimioluminiscencia citada por CIMMYT (2006). Las membranas se reusaron de tres a cuatro veces lavándolas para quitar todo vestigio de la sonda anteriormente hibridada utilizando SSC 0.1 X y SDS al 0.01% a 82 °C por 4 min.

Análisis de datos. Los datos de las bandas de los 468 aislamientos se observaron y compararon con los patrones de los aislamientos originales P9, P8 y B1. Se registró la presencia o ausencia de cada uno de los aislamientos y se contabilizaron las bandas de algunos reaislamientos provenientes de campo. Con la frecuencia de aislamientos de picnidios por hoja se hizo un análisis de varianza y prueba de Tukey (Martínez, 1988) incluyendo el porcentaje de recuperación de los aislamientos originales y sus variantes.

Las inoculaciones en trigo fueron inóculo primario de *S. tritici* que se presentó en hoja bandera en la variedad susceptible KAUZ, y en la hoja inferior en los genotipos resistentes. Las sondas PSTL192, PSTL70 y las enzimas *EcoRI* y *EcoRII* mostraron mayores polimorfismos, permitiendo diferenciar los tres aislamientos de *S. tritici*; se

Transfer. For this procedure, we followed the protocol cited by CIMMYT (2006). The cut DNA was transferred to a nylon membrane (MS Magnagraph Nylon Membrane), using a transfer buffer for 20 h, according to the Southern technique. After 20 h, the membrane was steeped in saline sodium citrate for 15 min and dried for 10 min; the DNA was then fixed to the membrane with UV light (120 000 μ joules). The membrane was baked at 95 °C for 3 h, and stored at 4 °C.

Probes. Eight clones of *Escherichia coli* plasmids with random DNA fragments of different size were used. The clones used were those that allowed to separate the isolates of *S. tritici*. The labeling of probes was done by the nick translation technique (McDonald and Martínez, 1990) using 2.5% digoxigenin.

Hybridization and detection. This was done with the chemiluminescence method cited by CIMMYT (2006). The membranes were reused three to four times, washing them to remove all traces of the previously hybridized probe using SSC 0.1 X and 0.01% SDS at 82 °C for 4 min.

Data analysis. The data from the bands of the 468 isolates were observed and compared with the patterns of the original isolates P9, P8 and B1. The presence or absence of each of the isolates was recorded and the bands of some field reisolates were counted. An analysis of variance and a Tukey test were performed with the frequency of pycnidia isolates per leaf (Martínez, 1988), including the percent recovery of the original isolates and their variants.

The inoculations in wheat were the primary inoculum of the *S. tritici* that presented in the flag leaf of the susceptible variety KAUZ, and in the lower leaf of the resistant genotypes. Probes PSTL192 and PSTL70, and enzymes *EcoRI* and *EcoRII* showed higher polymorphisms, which allowed to distinguish the three isolates of *S. tritici*; the combination of PSTL70 and *EcoRI* was used for identifying the fungus, coinciding with McDonald and Martínez (1990), for whom this combination allowed an adequate separation of isolates. Of the 468 isolates processed by RFLPs, the first ones corresponded to the original isolates P8, P9 and B1. The variants P8 and B1 were evidenced by changes in the DNA banding; this genetic variation among isolates of *S. tritici* has been attributed to the presence of the sexual stage of the fungus; however, this variation may result from the

usó la combinación PSTL70 y *EcoRI* para la identificación del hongo, coincidiendo con McDonald y Martínez (1990), donde esta combinación permitió una adecuada separación de aislamientos. De los 468 aislamientos procesados por RFLP's, los primeros correspondieron a los aislamientos originales P8, P9 y B1. Las variantes de P8 y B1 se evidenciaron por cambios en el bandeo en el DNA; esta variación genética entre aislamientos de *S. tritici* ha sido atribuida a la presencia de la fase sexual del hongo; sin embargo, esta variación puede resultar de parasexualidad entre núcleos del micelio (McDonald *et al.*, 1995); este fenómeno, en este estudio, pudo ser el responsable de la variación, ya que la fase sexual no se ha detectado en México.

La rápida variación en el genoma, como lo observado en este estudio se ha reportado también por Kabbage *et al.* (2008). Las tres variantes del aislamiento P8 fueron P8*1, P8*2, P8*3 y P8*1-2; de B1 fueron: B1*1, B1*2 y B1*3. En el Cuadro 1 se observa que los aislamientos inoculados de forma individual se recuperaron 100%. P9 se recuperó 100% en dos genotipos, en KAUZ se recuperó 91%. De las inoculaciones de P8×P9 el 88 y 100% de reaislamientos en los tres genotipos correspondió a P8 sin recuperar a P9. En P8×B1, P8 se aisló en 42 y 84%; B1 se aisló en 100, 58 y 16%, y varió dependiendo del genotipo de trigo. En P9×B1, 86 y 99% de reaislamientos correspondieron a B1 y al igual que en P8×P9 no se recuperó P9. La prevalencia de B1 y P8 en mezclas dependió de la combinación de los aislamientos y del genotipo. Con la mezcla de los tres aislamientos solamente se recuperaron B1 (48, 93 y 91%) y P8 (52, 7 y 9%) según el genotipo, sin recuperar a P9.

Lo anterior claramente evidencia la competencia entre aislamientos, sugiriendo que P9 fue menos agresivo. Asimismo, los resultados sugieren que P8 fue menos agresivo que B1, dado que la frecuencia de recuperación de B1 fue más alta (16 a 100%) que la de P8 (7 a 100%) cuando ambos aislamientos estuvieron en mezcla (Cuadro 1). La prevalencia de B1 indica que este aislamiento fue el más agresivo. La existencia de competencia entre aislamientos, cuando se realizan inoculaciones con mezclas, ha sido previamente señalada por otros investigadores (Zelikovitch y Eyal, 1991; Eyal, 1992; Gilchrist y Velázquez, 1994; Linde *et al.*, 2002).

parasexuality among nuclei in the mycelium (McDonald *et al.*, 1995); this phenomenon could have been responsible for the variation in this study, as the sexual stage has not been detected in Mexico.

The rapid variation of the genome, such as that observed in this study, has also been reported by Kabbage *et al.* (2008). The three variants of the P8 isolate were P8*1, P8*2, P8*3 and P8*1-2; of B1 they were: B1*1, B1*2 and B1*3. Table 1 shows that the individually inoculated isolates were 100% recovered. P9 was 100% recovered in two genotypes and 91% in KAUZ. Of the inoculations with P8×P9, 88 and 100% of the reisolates in the three genotypes corresponded to P8, while P9 was not recovered. In P8×B1, P8 was isolated in 42 and 84%; B1 was isolated in 100, 58 and 16%, and varied depending on the wheat genotype. In P9×B1, 86 and 99% of the reisolates corresponded to B1, and, the same as in P8×P9, P9 was not recovered. The prevalence of B1 and P8 in mixtures depended on the combination of the isolates and the genotype. With the mixture of the three isolates only B1 (48, 93 and 91%) and P8 (52, 7 and 9%) were recovered, according to the genotype, while P9 was not recovered.

This clearly demonstrates that there is competition between isolates, with the suggestion that P9 was less aggressive. Furthermore, the results suggest that P8 was less aggressive than B1, since the recovery rate of B1 was higher (16 to 100%) than that of P8 (7 to 100%) when both isolates were in mixture (Table 1). The prevalence of B1 indicates that this isolate was the most aggressive. The existence of competition between the isolates when inoculations with mixtures are performed has been previously reported by other researchers (Zelikovitch and Eyal, 1991; Eyal, 1992; Gilchrist and Velázquez 1994; Linde *et al.*, 2002).

The analysis of variance indicated interactions between isolates and genotypes (unpublished data). In all cases, except for the variants P8*1 and P8*1,2, the interaction isolate×genotype was significant. According to the analysis, the wheat genotypes significantly influenced the presence of isolates and variants P8, B1*1, B1*2, P8*2 and P8*3. When P8 and P9 were inoculated individually there was no variation in the recovered reisolates. With the individual inoculation of B1, 5 and 8% of the variants B1*1 and B1*2 were reisolated, respectively; the remaining 86% was of the original B1 isolate.

Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos recuperados de hoja bandera y hoja inferior en tres genotipos de trigo inoculados con aislamientos individuales y en mezclas de *S. tritici*, en Atizapán, Toluca, México.

Table 1. Frequency of isolates recovered from flag leaves and lower leaves in three wheat genotypes inoculated with individual isolates and in mixtures of *S. tritici* in Atizapán, Toluca, Mexico.

AI	Frecuencia de recuperación (%) de aislamientos en los genotipos inoculados								
	TRAP (R)			SUZ (R)			KAUZ (S)		
	P9	P8	B1	P9	P8	B1	P9	P8	B1
P9	100	0	0	100	0	0	91	<u>9</u>	0
P8	0	100	0	0	100	0	0	100	0
B1	0	0	90(10) [†]	0	0	100	0	0	75(25)
P8×P9	0	50(38)	<u>12</u>	0	87(13)	0	0	70(30)	0
P8×B1	0	0	83(17)	0	42	58	0	80(4)	16
P9×B1	0	<u>15</u>	85	0	<u>14</u>	86	0	<u>1</u>	99
P8×P9×B1	0	<u>52</u>	48	0	<u>7</u>	93	0	<u>9</u>	91

AI= aislamiento inoculado; [†]frecuencias en paréntesis corresponden a variantes detectadas. Cifras subrayadas corresponden a contaminaciones. TRAP= TRAP#1/BOW; SUZ= SUZ6//ALONDRA/PAVON; R= resistente; S= susceptible.

El análisis de varianza indicó interacciones entre aislamientos y genotipos (datos no publicados). En todos los casos, con excepción de las variantes P8*1 y P8*1,2, la interacción aislamiento×genotipo fue significativa. Según el análisis, los genotipos de trigo influyeron de manera significativa en la presencia de los aislamientos y las variantes P8, B1*1, B1*2, P8*2 y P8*3. Con P9 y P8 inoculados individualmente no se presentó ninguna variación en los reaislamientos recuperados. Con la inoculación individual de B1 se reaislaron las variantes, B1*1 en 5% y B1*2 en 8% y el resto, 86%, fue del aislamiento B1 original.

En la mezcla de P8×P9 la variante P8*1 se reaisló 15%, P8*2; 5% y P8*1, 2; 7%; el resto fue del P8 original. En P8×B1 se detectaron con baja frecuencia las variantes B1*1, 1%, B1*3, 4%, P8*1, 1%, y con frecuencia de 40 y 53% los aislamientos P8 y B1. En P9×B1 las variantes que se aislaron fueron P8*1, 1%, P8*3, 10%, y B1 y P8 con una frecuencia de 80 y 8%, no se detectaron variantes con la mezcla de los tres aislamientos. El genotipo de trigo influyó en la presencia de variantes del hongo, en SUZ6//ALONDRA/PAVON sólo se desarrollaron las variantes de P8, en KAUZ y TRAP#1/BOW se aislaron variantes de P8 y B1 (Cuadro 2). La frecuencia más alta de reaislamientos correspondió a B1 (48 a 56%) (Cuadro 2). En aislamientos × genotipo (Cuadro 2), el aislamiento B1 fue el más prevalente (48 a 56%) independientemente del genotipo inoculado; seguido de P8 (30 a 35%), en este caso, la máxima recuperación de P9 fue 8%.

La frecuencia de recuperación de variantes de B1 y P8 fue influenciada por la combinación de los aislamientos en la mezcla y por el genotipo de trigo (Cuadro 3). La agresividad

In the mixture of P8×P9, 15% of the variant P8*1 was reisolated; also 5% of P8*2, and 7% of P8*1, 2; the rest was the original P8. Variants B1*1, B1*3 and P8*1 were detected in P8×B1 in low frequencies, 1%, 4% and 1%, respectively; the isolates P8 and B1 were detected in frequencies of 40 and 53%, respectively. In P9×B1, the variants that were isolated were P8*1 (1%), P8*3 (10%), B1 (80%) and Q8 (8%); no variants were detected with the mixture of the three isolates. The wheat genotype influenced the presence of the fungus variants; in SUZ6//ALONDRA/PAVON only the P8 variants developed; in KAUZ and TRAP#1/BOW the variants of P8 and B1 were isolated (Table 2). The highest frequency of reisolation corresponded to B1 (48-56%) (Table 2). In isolates×genotype (Table 2), the isolate B1 was the most prevalent (48 to 56%) regardless of the genotype inoculated, followed by P8 (30 to 35%); in this case, the maximum recovery of P9 was 8%.

The rate of recovery of the variants B1 and P8 was influenced by the combination of the isolates in the mixture and by the wheat genotype (Table 3). The aggressiveness of the isolates depended on the genotype into which the mixture was inoculated; for example, the variant P8*1 was isolated with a high frequency (13 to 17%) in all three wheat genotypes when they were inoculated with P9×P8, but its frequency was low (4%) or null when inoculated with P8×B1.

It was evident that the prevalence of B1 and P8 was influenced by the wheat genotypes. McDonald and Martínez (1990) found high genetic variation among isolates of *S. tritici*, noting that this variability results in new isolates

de los aislamientos dependió del genotipo en el que se inoculó la mezcla, por ejemplo, la variante P8*1 fue aislada con una frecuencia alta (13 a 17%) en los tres genotipos de trigo cuando éstos fueron inoculados con P9×P8, pero su frecuencia fue baja (4%) o nula cuando se inoculó con P8×B1.

that are capable to overcome resistance in resistant varieties or to resist the effect of fungicides. However, it should be emphasized that the variations detected in the DNA of the reisolates of the fungus are not necessarily related to changes in virulence or aggressiveness.

Cuadro 2. Porcentaje de aislamientos recuperados en hoja bandera e inferior en tres genotipos de trigo inoculados con aislamientos individuales y en mezcla de *S. tritici*, en Atizapán, Toluca, México.

Table 2. Percentage of isolates recovered in the flag and lower leaves of three wheat genotypes inoculated with individual isolates and in mixture of *S. tritici* in Atizapán, Toluca, Mexico.

GEN	Porcentaje de recuperación de aislamientos originales y variantes									
	P9	P8	B1	B1*1	B1*2	B1*3	P8*1	P8*2	P8*1,2	P8*3
TRAP (R)	7.6 a	34.6 a	55.7 a	19.2 b	0 a	1.9 b	2.5 a	0 a	3.2 b	0 a
SUZ6 (R)	7.6 a	30.1 a	51.2 a	0 a	0 a	0 a	2.5 a	3.2 a	0 a	3.8 b
KAUZ (S)	7.6 a	33.9 a	48.0 a	0 a	1.9 a	0 a	3.2 a	3.2 a	1.9 b	0.6 a

GEN= genotipo; cifras con la misma letra en cada columna son iguales estadísticamente al 0.05% (Tukey); R= resistente; S= susceptible.

Cuadro 3. Porcentaje de variantes recuperadas en los tres genotipos de trigo inoculados con los aislamientos B1, P9×P8, P8×B1 y P9×P8×B1 de *S. tritici*, en Atizapán, Toluca, México.

Table 3. Percentage of variants recovered in the three wheat genotypes inoculated with isolates B1, P9×P8, P8×B1 and P9×P8×B1 of *S. tritici* in Atizapán, Toluca, Mexico.

GEN	Porcentaje de recuperación de variantes de aislamientos										
	B1		P9×P8				P8×B1			P9×P8×B1	
	B1*1	B1*2	P8*1	P8*2	P8*1,2	P8*8,3	B1*1	B1*3	P8*1	P8*1	P8*3
T (R)	17 a	0 b	17 a	0 a	21 b	0 a	4 b	13 b	0 a	0 a	0 a
S (R)	0 b	0 b	13 a	3 b	0 a	4 b	0 a	0 a	0 a	<u>4 b</u>	<u>3 b</u>
K (S)	0 b	3 a	17 a	3 b	13 a	1 a	0 a	0 a	4 b	0 a	4 b

GEN= genotipo; cifras con la misma letra en cada columna son iguales estadísticamente al 0.05% (TUKEY); cifras subrayadas fueron contaminantes; T= TRAP#1/BOW; S= SUZ6//ALONDRA/PAVON; K= KAUZ; R= resistente; S= susceptible.

Fue evidente que la prevalencia de B1 y P8 fue influenciada por los genotipos de trigo. McDonald y Martínez (1990) detectaron gran variación genética entre aislamientos de *S. tritici* señalando que esta variabilidad dar lugar a nuevos aislamientos capaces de sobrepasar la resistencia en variedades resistentes ó capaces de resistir el efecto de los fungicidas. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que las variaciones detectadas en el DNA de los reaislamientos del hongo no necesariamente están relacionadas con cambios en virulencia o agresividad.

Las variantes genéticas de los aislamientos originalmente inoculados solamente se detectaron en los dos aislamientos más agresivos, B1 y P8, y las variantes de P8 únicamente se presentaron en inoculaciones de mezclas de dos aislamientos. En contraste las variantes de B1 solamente se presentaron cuando se inoculó sólo o en combinación con P8. La variación genética observada en las cepas reaisladas fue

Genetic variants of the originally inoculated isolates were detected only in the two more aggressive isolates, B1 and P8, while the variants of P8 occurred only in inoculations with mixtures of two isolates. In contrast, B1 variants were present only when it was inoculated alone or in combination with P8. The genetic variation observed in reisolated strains was influenced by the wheat genotype and by the combination in inoculated mixtures. The genotype SUZ6//ALONDRA/PAVON, considered the more resistant, was the one that induced fewer variants.

Each host exerted a different degree of selection pressure depending on the isolate with which it interacted; likewise, the selection pressure exerted by the competition depended on the combination of isolates and the effect of the interaction host-isolate. The selection tests for wheat genotypes resistant to *S. tritici* with inoculations of mixtures of isolates of this fungus lead to the overestimation the resistance responses

influenciada por el genotipo de trigo y por la combinación en las mezclas inoculadas. El genotipo SUZ6//ALONDRA/PAVÓN considerado el más resistente fue el que menos variantes indujo.

Cada hospedante ejerció diferente grado de presión de selección dependiendo del aislamiento con el cual interaccionó; asimismo, la presión de selección ejercida por la competencia dependió de la combinación de aislamientos y del efecto de la interacción hospedante-aislamiento. Las pruebas de selección de genotipos de trigo resistentes a *S. tritici* con inoculaciones de mezclas de aislamientos de este hongo propician el riesgo de sobrevaluar las respuestas de resistencia, debido a que la competencia puede reducir la agresividad y la patogenicidad de los aislamientos inoculados en la mezcla. Por lo tanto, la mejor estrategia en los programas de mejoramiento de trigo es inocular individualmente los aislamientos seleccionados como altamente patogénicos en una fase avanzada de selección.

Literatura citada

- Cárdenas, S. E.; Gilchrist, S. L. I. y Leyva, M. S. G. 2003. Histopatología del tizón foliar inducido por *Septoria tritici* Roberge in Desmaz., en 13 líneas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 21(2):137-142.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. CIMMYT. 92 p.
- Chungu, C.; Gilbert, J. and Smith, T. F. 2001. *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. 2001. Plant Dis. 85:430-435.
- Cochran, G. W. 1980. Técnicas de muestreo. Editorial Continental, México. 513 p.
- Cohen, P. S.; Zilberstein, A.; Schuster, S.; Sharon, A. and Eyal, Z. 2000. Elucidation of *Septoria tritici* × wheat interactions using GUS-expressing isolates. Phytopathology 90:207-304.
- Eyal, Z. 1992. The response of field-inoculated wheat cultivars to mixtures of *Septoria tritici* isolates. Euphytica 61:25-35.
- Gilchrist, S. L. and Velázquez, C. 1994. Interaction of *Septoria tritici* isolate-wheat as adult plant under field condition. In: Arseniuk, E.; Goral, T. and Czembor, P. (Eds.). Proceedings of the 4th international workshop on: *Septoria* of cereals. Ihar Radzikow, Poland. 111-114 pp.
- because competition can reduce the aggressiveness and pathogenicity of the isolates inoculated into the mixture. Therefore, the best strategy in wheat breeding programs is to inoculate individually the isolates selected for being highly pathogenic in an advanced stage of selection.

End of the English version



- Kabbage, M.; Leslie, F. J.; Zeller, A. K.; Hulbert, H. S. and Bockus, W. W. 2008. Genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of *Septoria tritici* blotch, in Kansas winter wheat. J. Agric. Food Environ. Sci. 2(1):1-9.
- Kema, G. H. J.; Annone, G. J.; Sayoud, R.; Van Silfhout, C. H.; Van Ginkel, M. and de Bree, J. 1996. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. Phytopathology 86:200-212.
- Leyva, M. S. G.; Gilchrist, S. L.; Huerta, E. J. y Villaseñor, M. H. E. 2008a. Efecto de la interacción de aislamientos de *Septoria tritici* Rob. ex. Desm., inoculados en diferentes genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.), en el periodo de latencia. Rev. Mex. Fitopatol. 26(1):15-20.
- Leyva, M. S. G.; Gilchrist, S. L.; Zavaleta, M. E. y Khairallah, M. 2008b. Interacción de componentes de resistencia e inóculo en trigo (*Triticum aestivum* L.) con tizón foliar (*Septoria tritici* Rob. ex. Desm.). Agrociencia 42(3):313-325.
- Linde, C. C.; Zhan, J. and McDonald, B. A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: form lesions to continents. Phytopathology 92:946-955.
- Martínez, G. A. 1988. Diseños experimentales. Editorial Trillas. México, D.F. 130 p.
- McDonald, B. A.; Pettway, R. E.; Chen, R. S.; Boeger, J. M. and Martínez, J. P. 1995. The population genetics of *Septoria tritici* (teleomorph *Mycosphaerella graminicola*). Canadian J. Bot. 73:292-301.
- McDonald, B. and Martínez, J. P. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in *Septoria tritici* occur at a frequency. Current Genetics 17:133-138.
- Simón, R. M.; Cordo, A. C.; Castillo, S. N.; Struik, C. P. and Borner, A. 2012. Population structure of *Mycosphaerella graminicola* and location of genes for resistance to the pathogen: recent advances in Argentina. International J. Agron. ID 680275. 7 p.
- Zelikovitch, N. and Eyal, Z. 1991. Reduction in pycnidial coverage after inoculation of wheat with mixtures of isolates of *Septoria tritici*. Plant Dis. 75:907-910.
- Zelikovitch, N.; Eyal, Z. and Kashman, Y. 1992. Isolation, purification and biological activity of an inhibitor from *Septoria tritici*. Phytopathology 82:275-278.