

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL EN LA
RESISTENCIA DE LA CEBADA A LA MANCHA BORROSA

por

Susana RODRÍGUEZ DECUADRO

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
2011

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Dr. Ariel Castro, la Dra. Silvia Germán y el Dr. Omar Borsani el 20 de diciembre de 2011. Autor: Susana Rodríguez Decuadro. Directora Dra. Clara Pritsch

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Paula Silva, Cynthia Torres, Javier Albín, Estela Baccino, Sebastián Mármol y Analía Cabrera, que han sido parte de esta tesis de una u otra manera.

A Clara Pritsch por su orientación en este trabajo.

Al tribunal: Ariel Castro, Silvia Germán y Omar Borsani, por sus correcciones y sugerencias.

A Oscar Bentancur por el asesoramiento estadístico.

A Silvia Pereyra por los datos fenotípicos aportados.

A toda la gente del Laboratorio de Biotecnología, de Genética y de Bioquímica.

A Magdalena Vaio, Paola Gaiero, Ariel Castro, Pablo Speranza y Lucía Gutierrez por sus aportes.

A Brian Steffenson por el envío de semillas.

A Magdalena, Eliana y Estelita por el apoyo emocional.

A mi familia y en especial a mis padres por su incondicional apoyo.

A Daniel, por acompañarme siempre.

Este trabajo fue posible gracias a la financiación de:

- Proyecto INIA-FPTA “Caracterización genómica del germoplasma de cebada por variables de calidad Maltera, agronómicas y sanitarias” (Responsable: Ariel Castro)
- Proyecto INIA-FPTA “Determinación de la variabilidad patogénica de los hongos causales de las manchas foliares (*Pyrenophora teres* y *Cochliobolus sativus*) y caracterización de la resistencia genética de cebada” (Responsable: Fernanda Gamba)
- MESA DE CEBADA

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1 EL CULTIVO DE CEBADA CERVECERA EN EL URUGUAY	1
1.2 LA MANCHA BORROSA DE LA CEBADA	1
1.2.1 <u>El patógeno</u>	3
1.2.2 <u>Especialización fisiológica del patógeno</u>	3
1.2.3 <u>Biología del proceso de infección</u>	4
1.3 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN CEBADA	6
1.4 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS BIÓTICO	10
1.5 DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL EN LA RESISTENCIA DE LA CEBADA A LA MANCHA BORROSA	13
1.6 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
2. <u>DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS EN QTLs DE RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN CEBADA</u>	17
2.1 ABSTRACT.....	17
2.2 RESUMEN.....	18
2.3 INTRODUCCIÓN	19
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.4.1 <u>Material Vegetal y Extracción de ADN</u>	21
2.4.2 <u>Evaluación de la resistencia a MB en planta adulta</u>	21
2.4.3 <u>Evaluación de la resistencia a MB en plántula</u>	22
2.4.4 <u>Marcadores Moleculares SSR y STS y Análisis Genotípico</u>	25

2.4.5 <u>Análisis de los datos</u>	25
2.5 RESULTADOS.....	28
2.5.1 <u>Nivel de resistencia a MB en genotipos de cebada</u>	28
2.5.2 <u>Diversidad Alélica</u>	28
2.5.3 <u>Haplotipos cromosómicos</u>	29
2.5.4 <u>Estructura genética de una colección de germoplasma de cebada</u>	32
2.6 DISCUSIÓN.....	36
2.7 BIBLIOGRAFÍA.....	42
3. <u>DIVERSIDAD EN LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A</u> <u><i>Cochliobolus sativus</i> EN HOJAS DE CEBADA</u>	46
3.1 RESUMEN.....	46
3.2 ABSTRACT.....	47
3.3 INTRODUCCIÓN.....	48
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.4.1 <u>Material Vegetal y Patógeno</u>	51
3.4.2 <u>Inoculaciones</u>	51
3.4.3 <u>Análisis de la respuesta a la infección en plántula</u>	52
3.4.4 <u>Detección histoquímica de ROS</u>	52
3.4.5 <u>Análisis Estadístico</u>	53
3.5 RESULTADOS.....	54
3.5.1 <u>Respuesta de infección en plántula</u>	54
3.5.2 <u>Micro-fenotipos de interacción</u>	55
3.6 DISCUSIÓN.....	65
3.7 BIBLIOGRAFÍA.....	69
4. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES</u>	73
4.1 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS.....	74
4.2 ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO EN LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED.....	77

4.3 DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL EN GENOTIPOS DE CEBADA RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A MB	79
5. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	81
6. <u>ANEXOS</u>	92
6.1 ANEXO 1	92

RESUMEN

El cultivo de la cebada en Uruguay tiene como destino principal la obtención de granos de buena calidad para la elaboración de malta. Uno de los factores determinantes de la disminución de la calidad del grano es la ocurrencia de enfermedades foliares, dentro de las que se destaca la mancha borrosa (MB) causada por *Cochliobolus sativus*. La resistencia genética es una de las estrategias utilizadas para proteger a los cultivos del ataque de hongos. La emergencia reciente en algunos países, de aislamientos del patógeno, virulentos para genotipos con resistencia efectiva por varias décadas, ha alertado sobre la falta de diversidad genética presente en los materiales utilizados hasta el momento como fuentes de resistencia. El objetivo de este trabajo fue detectar genotipos de cebada resistentes a la enfermedad en Uruguay, que estén pobremente relacionados tanto genética y funcionalmente con las fuentes de resistencia internacionales NDB112 y Bowman, ampliamente utilizadas hasta el momento. La diversidad genética fue evaluada mediante un análisis de haplotipos cromosómicos, utilizando marcadores moleculares SSR y STS asociados a nueve QTLs de resistencia a MB. Se analizaron 40 genotipos de cebada, entre los que se encontraban materiales elite, líneas avanzadas, fuentes de resistencia identificadas previamente y los genotipos de referencia para los QTLs analizados. El análisis de haplotipos en las regiones analizadas, permitió identificar siete genotipos resistentes a MB, poco relacionados genéticamente con NDB112 y Bowman, que serían candidatos a portar genes de resistencia diferentes a los ya reportados. Para el análisis funcional se eligieron 11 genotipos, que aparecieron como diversos en el análisis de haplotipos cromosómicos. Se evaluó la respuesta oxidativa producida en las células del huésped, durante las etapas tempranas de la interacción huésped-patógeno mediante análisis histoquímicos. Tanto genotipos resistentes como susceptibles manifestaron reacciones de defensa tipo APC y HR pre y post-penetración, en células de epidermis y mesófilo, aunque la proporción de cada una de ellas fue heterogénea entre los distintos genotipos. La HR postpenetración fue observada en mayor proporción en genotipos susceptibles por lo que parecería ser un mecanismo poco eficiente para detener el avance de este hongo hemibiotrofo, a diferencia de lo observado en hongos biotrofos.

Palabras clave: *Cochliobolus sativus*, diversidad, haplotipos, SSR, STS, microfenotipos, ROS

SUMMARY

Genetic and Functional Diversity in Barley Spot Blotch Resistance

In Uruguay, barley is primarily grown for malt production. One of the major constraints for high grain yield and quality is the occurrence of foliar diseases, especially spot blotch (SB), caused by *Cochliobolus sativus*. Genetic resistance is one of the main strategies used to protect crops against fungal attack. The recent emergence in North America of new *C. sativus* isolates expressing virulence on barley genotypes that have had effective resistance for several decades, has warned about the lack of genetic diversity present in germplasm currently used as sources of resistance. The aim of this study was to identify barley genotypes with effective SB resistance in Uruguay, whose resistance may be genetic and functionally unrelated to the ones contributed from the widely used NDB112 and Bowman genotypes. Genetic diversity was assessed by a chromosomal haplotype analysis using SSR and STS markers associated with nine SB resistance QTLs. We analyzed 40 genotypes of barley, including elite, advanced, and experimental lines with effective resistance as well as reference genotypes that had been previously subjected to QTL analysis. Analyses of haplotype diversity, and cluster analyses using 32 molecular markers allowed identifying seven SB resistant genotypes that were genetically poorly related to NDB112 and Bowman. To assess functional diversity in SB resistance, 11 barley genotypes were evaluated using histochemical analysis. Microphenotypes were depicted according to the frequency of host cells expressing oxidative response at each site of host-pathogen interaction during early stages of infection. The range of oxidative responses expressed by either resistant or susceptible genotypes was similar and included APC and HR during pre- and post-penetration stages at both epidermis and mesophyll cells. However, differences in the proportion of interaction sites expressing an individual response were observed among the genotypes. Frequency of interaction sites expressing post-penetration HR responses was significantly higher in susceptible than in resistant genotypes indicating that post-penetration HR would be an inefficient mechanism to stop the spread of hemibiotrophic *C. sativus*.

Keywords: *Cochliobolus sativus*, diversity, haplotype, SSR, STS, microphenotypes, ROS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 EL CULTIVO DE CEBADA CERVECERA EN EL URUGUAY

En Uruguay, el cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare subsp. vulgare* L.) es el segundo en importancia dentro de los cultivos de invierno (MGAP-DIEA. Anuario Estadístico Agropecuario 2010). El grano cosechado tiene, como destino principal en nuestro país, la elaboración de malta para la exportación. La calidad maltera del grano constituye entonces, uno de los factores fundamentales en la producción de cebada cervecera. Entre las causas que pueden afectar la calidad de malta se describen factores abióticos y bióticos que puedan haber actuado durante el período de desarrollo del cultivo, el proceso de desarrollo de la semilla así como durante su almacenamiento. Entre los primeros se encuentran el daño mecánico, climático, físico y de manejo. Entre los factores bióticos se puede mencionar el ataque de microorganismos, principalmente hongos.

Las manchas foliares producidas por hongos se encuentran entre las principales enfermedades de la cebada, produciendo daños indirectos en la calidad del grano. Se caracterizan por producir necrosis, clorosis y hasta defoliación, generando una disminución significativa de la radiación solar interceptada y absorbida, dando como consecuencia una menor producción de biomasa y menor rendimiento (Nutter *et al.*, 1985). Dentro de éstas, se destacan mancha borrosa (causada por *Cochliobolus sativus*), escaldadura (causada por *Rhynchosporium commune*) y mancha en red (causada por *Pyrenophora teres*) (Pereyra *et al.*, 2011). Recientemente, otras enfermedades foliares como el oídio (causada por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) y roya de la hoja (causada por *Puccinia hordei*) han aumentado su importancia (Pereyra *et al.*, 2007).

1.2 LA MANCHA BORROSA DE LA CEBADA

La mancha borrosa (MB), causada por el hongo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechsl. ex Dastur [anamorfo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem., sin. *Helminthosporium sativum* Pamm., King and Bakke], es una de las principales enfermedades foliares de la cebada.

Es considerada una enfermedad importante, sobre todo en lugares sub-tropicales, donde se encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo: altas temperaturas acompañadas de alta humedad. Está presente en el este de la India, sureste de China, en Norte y Sud América mientras que aparece con menor frecuencia en algunas partes de Europa, provocando pérdidas significativas en producción y calidad de grano y malta en varias de estas zonas del planeta. En los últimos años, las epidemias de mancha borrosa se han intensificado en numerosas zonas agrícolas (Kumar *et al.*, 2002) y se pronostica una mayor incidencia favorecida por el calentamiento global que provee condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del hongo (Franckowiak, 2008).

En Uruguay, la MB junto con la mancha en red y la fusariosis de la espiga representan una de las limitantes principales para obtener rendimientos y calidad de grano adecuados en los cultivos de cebada. Pereyra *et al.* (2005) mencionan que se han registrado a nivel nacional mermas en el rendimiento de grano de hasta 30%. La magnitud de las pérdidas es una función de la enfermedad presente, del momento en el ciclo del cultivo en que la misma se establece, de la susceptibilidad del cultivar y de las condiciones ambientales imperantes (Pereyra *et al.*, 2007). La frecuencia y severidad se ven incrementadas por la adopción de los productores de la práctica de siembra directa (descarta actividades de laboreos y quema de rastrojos) haciendo que el inoculo esté siempre presente en el sistema (Stewart *et al.*, 2005). La situación es agravada por el hecho de que el cultivo de trigo, principal cereal de invierno, también es afectado por esta enfermedad. De acuerdo a los datos de comportamiento a mancha borrosa de la oferta varietal a nivel comercial del Sistema Nacional de Evaluación de Cultivares se concluye que ninguna de las variedades comerciales presenta buenos niveles de resistencia a esta enfermedad (Castro *et al.*, 2011).

Los síntomas característicos de la MB en cebada se presentan como lesiones redondas a elípticas, de color marrón oscuro y a veces rodeadas de clorosis. En ambientes de producción agrícola, los síntomas comienzan a observarse en el cultivo hospedero a partir del comienzo del desarrollo foliar, inclusive en estado de plántula, y se incrementan principalmente en las hojas después de la espigazón. Este hongo también puede presentarse en corona, raíces, nudo, vaina, espiga y grano (Pereyra *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2002). Fetch y Steffenson (1999) han

desarrollado una escala de respuestas a la infección (RI) de 1 a 9 basada en el tipo (presencia de necrosis y clorosis) y tamaño relativo de las lesiones observadas en la segunda hoja de plántulas de cebada. Las nueve RI fueron clasificadas en tres grandes categorías de compatibilidad huésped-patógeno: baja (RIs de 1 a 3) intermedia (RIs de 4 y 5) y alta (RIs de 6 a 9). Además, se desarrolló una escala para planta adulta en cuatro clases de RIs: R=resistente, MR=medianamente resistente, MS=medianamente susceptible y S=susceptible, también basada en el tipo y tamaño relativo de las lesiones observadas (Fetch y Steffenson, 1999).

1.2.1 El patógeno

Cochliobolus sativus forma parte de la clase Ascomycete, dentro de la división Eumycota. Los ascomicetes comprenden varios miles de especies que pueden ser desde estrictamente saprófitas, hasta parásitos obligados de las plantas superiores. *Bipolaris sorokiniana* representa la fase asexual o anamórfica. Se caracteriza por conidios elípticos tabicados (60-120 µm x 12-20 µm) con 5 a 9 células. La producción de conidióforos con conidios ocurre en el tejido foliar y otras partes de la planta durante la infección, así como en rastrojos. La fase sexual o teleomórfica (*C. sativus*), raramente se encuentra en la naturaleza. Únicamente ha sido descrita su ocurrencia bajo las condiciones agroecológicas de Zambia (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005). Sin embargo, es posible favorecer el desarrollo de esporas sexuales en condiciones de laboratorio (Zhong y Steffenson, 2002). Este patógeno presenta un muy amplio rango de hospederos dentro de las monocotiledóneas, en especial gramíneas (Kumar *et al.*, 2002), pero por los niveles de daños ocasionados, las manchas foliares se destacan en los cultivos de trigo y cebada.

1.2.2 Especialización fisiológica del patógeno

La diversidad en virulencia de *C. sativus* fue estudiada por Fetch y Steffenson (1994). Estos autores detectaron marcadas diferencias en la virulencia de aislamientos de *C. sativus* en ensayos de invernáculo, principalmente al infectar genotipos de cebada de espigas de dos hileras. A su vez, encontraron que a nivel de campo no solo se observaba diferencia en el tipo de reacción, sino también en los niveles de severidad asociados a una interacción aislamiento x genotipo de la planta. La inoculación con aislamientos de *C. sativus* recolectados en Estados

Unidos, Japón y China en las variedades de cebada ND5883, Bowman y NDB112, utilizadas como genotipos diferenciales, permitió la identificación de tres patotipos (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997). Estos patotipos fueron designados 0, 1 y 2; donde el 0 muestra baja virulencia en los tres genotipos, el patotipo 1 muestra alta virulencia en Bowman y baja virulencia en ND5883 y en NDB112, y por último el patotipo 2 muestra alta virulencia solo en ND5883 (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997). Utilizando un análisis cualitativo de los datos de virulencia Ghazvini y Tekauz (2007) han encontrado ocho grupos de virulencia en 127 aislamientos de *C. sativus* pertenecientes a Canadá y otras regiones del mundo, mientras que el análisis cuantitativo de los mismos datos mostró que dicha población de *C. sativus* estaba compuesta por tres grupos de patogenicidad (alta, media y baja) (Ghazvini y Tekauz, 2008). Recientemente Knight *et al.* (2010) examinaron la variación genotípica y la virulencia de poblaciones de *C. sativus* de Australia, encontrando también grupos de patogenicidad baja, intermedia y alta.

1.2.3 Biología del proceso de infección

Sobre la base de los mecanismos de infección, los patógenos han sido divididos en dos o tres clases: biotrofos, necrotrofos y más recientemente hemibiotrofos. Los patógenos biotrofos obtienen su energía de células vivas mientras que los necrotrofos la obtienen de células muertas (revisado por Oliver e Ipcho, 2004). Sin embargo, algunos patógenos varían su comportamiento, dependiendo de las condiciones o etapa de su ciclo de vida en la que se encuentren. Estos patógenos han sido denominados hemibiotrofos (Glazebrook, 2005). Estas categorías no estarían tan claramente establecidas si tenemos en cuenta que varios reportes indican que un mismo patógeno ha sido clasificado en cada una de estas clases por diferentes autores. Según Oliver e Ipcho (2004), este tipo de clasificación, basada únicamente en su modo de nutrición no está sustentada por estudios de genómica ni de sensibilidad a fungicidas, por lo que un sistema de clasificación basado en la respuesta de la planta podría ser mucho más útil. Análisis genéticos sobre la resistencia a la enfermedad en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, proveen una división útil, basada en que la defensa contra patógenos biotrofos está controlada por la vía del salicilato y la de necrotrofos por la vía del jasmonato/etileno, encontrando sin embargo excepciones y complejidades adicionales (Glazebrook, 2005).

Cochliobolus sativus ha sido ubicado dentro de la categoría de hongos hemibiotrofos, ya que durante la infección, desarrolla una primera fase biotrofa, seguida de una fase necrotrófica. El análisis a nivel microscópico del desarrollo de este hongo durante la infección mostró las siguientes etapas: i) luego de la germinación de la espora y desarrollo de apresorio, el extremo apical de la hifa penetra la cutícula y pared celular de la célula epidérmica del hospedero, y se desarrolla y ramifica dentro de la célula epidérmica viva (fase biotrófica); ii) las hifas intracelulares invaden el espacio intercelular del mesófilo, acompañado de la muerte de las células de la epidermis y del mesófilo (fase necrotrófica) (Shäfer *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2001). El colapso de las células del hospedero en la fase necrotrófica parece ser mediado por toxinas secretadas por el hongo, ya que la muerte de células del hospedero no se asocia necesariamente al contacto directo con hifas; mas aún, la inyección de toxinas dentro de las hojas provoca una respuesta necrótica en la hoja similar a la desarrollada durante la infección (Kumar *et al.*, 2001). Varios tipos de toxinas han sido identificadas siendo las más estudiadas las de la familia heliminthosporol. Estas toxinas actuarían como desacopladores inhibiendo la fosforilación oxidativa en mitocondrias, la foto-fosforilación en cloroplastos y el bombeo de protones a través de la membrana plasmática (Briquet *et al.*, 1998). Por lo tanto, estas toxinas no estarían interactuando de forma específica con un único receptor de membrana del huésped (Kumar *et al.*, 2002). Los sistemas de compatibilidad toxina-dependientes, generalmente se asocian a la manifestación de una respuesta oxidativa. En el caso de MB, la respuesta oxidativa se pone en evidencia en células epidérmicas y del mesófilo con la acumulación de H₂O₂. Existiría una correlación positiva entre el nivel de susceptibilidad a mancha borrosa y la cantidad de H₂O₂ acumulado en las lesiones de las hojas. Por lo tanto la acumulación de H₂O₂ estaría asociada a la infección exitosa (compatible) del patógeno (Kumar *et al.*, 2001).

Las toxinas específicas de huésped, críticas para la virulencia de patógenos clasificados como necrotrofos, son moléculas efectoras que sólo son tóxicas para el huésped de la enfermedad pero son inocuas para la mayoría de las otras especies vegetales. Lo que es más, sólo genotipos específicos de la especie huésped son sensibles a la toxina. Los análisis genéticos de los huéspedes, muestran que en la mayoría de los casos, la sensibilidad a la toxina es una característica de herencia simple y dominante, implicando que el producto génico

asociado a susceptibilidad es el receptor directo o indirecto de la toxina. Este sistema es un espejo del clásico sistema gen a gen, a menudo encontrado en sistemas biotrofos. Sin embargo, estudios recientes en *Stagonospora nodorum*-trigo, han mostrado que el patógeno produce al menos cuatro toxinas independientes que interactúan con cuatro o más QTLs (Locus de Caracteres Cuantitativos por su sigla en inglés) de sensibilidad encontrados en el huésped. Cada interacción contribuye sólo marginalmente a la susceptibilidad a la enfermedad (Friesen *et al.*, 2008).

1.3 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN CEBADA

La resistencia a mancha borrosa de tipo cualitativo en cebada ha sido estudiada por numerosos autores (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997, Kutcher *et al.*, 1996, Steffenson *et al.*, 1996, Wilcoxson *et al.*, 1990, Arny, 1951, Griffee, 1925), los cuales concuerdan que se trataría de un carácter de herencia sencilla. Se han reportado seis loci diferentes asociados con la resistencia a MB en cebada (*Rcs1* a *Rcs6*) englobando los trabajos de Bilgic *et al.* (2006), Steffenson *et al.* (1996) y Sogaard y Von Wettstein (1987). *Rcs1*, *Rcs2* y *Rcs3* estarían localizados en los cromosomas 2H, 1H y 5H, respectivamente, de acuerdo a su asociación con varios marcadores morfológicos (Griffee, 1925). La designación de *Rcs4* se basa en datos genéticos de Arny (1951), pero no se tiene información que garantice su localización cromosómica. Utilizando el patotipo 1 de *C. sativus* en la población de mapeo Steptoe/Morex (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997). Steffenson *et al.* (1996) identificaron, mediante análisis cualitativos y cuantitativos de los datos, un *locus* de resistencia (designado *Rcs5*) en el cromosoma 7H. Posteriormente, Bilgic *et al.* (2006) reportaron un nuevo *locus* de resistencia a MB en estado de plántula y planta adulta, *Rcs6*, en el cromosoma 1H. *Rcs6* se pone en evidencia en la interacción Calicuchima-sib y el patotipo 2 de *C. sativus*.

En cuanto a resistencia cuantitativa a MB en planta adulta basada en el porcentaje de severidad, Steffenson *et al.* (1996) detectaron dos QTLs en la población de mapeo Steptoe/Morex (ambos cultivares de seis carreras). Un QTL, de efecto mayor que explica un 62% de la variación fenotípica fue localizado en el cromosoma 1H; un segundo QTL, con efecto menor que explica un

9% de la variación fenotípica, fue localizado en el cromosoma 7H en una región cercana a *Rcs5*. El cultivar Morex, estándar de calidad maltera en Estados Unidos, fue el genotipo dador de ambos QTLs de resistencia. De acuerdo a Steffenson *et al.* (1996) la resistencia durable segregando en la población Steptoe/Morex aportada por Morex derivaría de NDB112, línea experimental de seis carreras que ha mantenido su resistencia por más de 40 años. La resistencia de NDB112 estaría presente en los materiales malteros de seis carreras del medio oeste de Estados Unidos y a través del cultivar Nordic en el genotipo Bowman y sus líneas derivadas (Bovill *et al.*, 2010).

Con el objetivo de analizar la expresión de los QTLs en diferentes contextos genéticos Bilgic *et al.* (2005) analizaron la genética de la resistencia en cuatro poblaciones de mapeo: Steptoe/Morex (ambos de seis carreras), Dicktoo/Morex (ambos seis carreras), Harrington/Morex (dos/seis carreras) y Harrington/TR306 (ambos dos carreras). De esta manera, utilizando el patotipo 1 de *C. sativus*, obtuvieron 11 QTLs de resistencia: cuatro en plántula (*Rcs-qtl-3H-11-12*, *Rcs-qtl-3H-4-6*, *Rcs-qtl-7H-2-4*, *Rcs-qtl-7H-7*,) que explican en las diferentes poblaciones entre 4 y 85% de la variación fenotípica total; y siete en planta adulta (*Rcs-qtl-1H-6-7*, *Rcs-qtl-2H-3-5*, *Rcs-qtl-2H-7-8*, *Rcs-qtl-3H-2-4*, *Rcs-qtl-3H-9-11*, *Rcs-qtl-5H-10-11* y *Rcs-qtl-7H-2-4*) que explican entre 2 y 77% de la variación fenotípica. En el intervalo 7H 2-4, o sea entre los bins 2 a 4 del cromosoma 7H, colocan las resistencias en plántula y planta adulta de las cuatro poblaciones de mapeo estudiadas. Dentro de estos 11 QTLs, tres de ellos se destacan por explicar en cada caso, más del 30% de la variación fenotípica por lo que pueden considerarse QTLs mayores. En primer término, *Rcs-qtl-1H-6-7* (resistencia en planta adulta) detectado en la población Steptoe/Morex siendo Morex el dador del QTL. En segundo término *Rcs-qtl-3H-2-4* (resistencia en planta adulta) en la población Dicktoo/Morex siendo Morex el dador del QTL. Por último *Rcs-qtl-7H-2-4* (resistencia en plántula y planta adulta) detectado en las cuatro poblaciones de mapeo: Steptoe/Morex, Dicktoo/Morex, Harrington/Morex y Harrington/TR306, siendo Morex y TR306 los dadores del QTL. Es preciso destacar que el gen de resistencia *Rcs5* se localiza dentro del intervalo mencionado (7H bin 3). Este QTL refleja cierta independencia del contexto genético.

Bilgic *et al.* (2006) analizó la población Calicuchima-sib (seis carreras)/ Bowman-BC (dos carreras) en respuesta a los patotipos 1 y 2 de *C. sativus* reportando tres QTLs de resistencia a MB: uno de resistencia en plántula localizado en el cromosoma 4H que explica un 14% de la variación fenotípica (evidenciado en la interacción incompatible entre Bowman BC y patotipo 1 de *C. sativus*); y dos de resistencia en planta adulta uno localizado en el cromosoma 1H (evidenciado en la interacción incompatible Calicuchima-sib y patotipo 2 de *C. sativus*) y otro en el cromosoma 2H (evidenciado en la interacción incompatible entre Bowman y patotipo 1 de *C. sativus*), explicando el 21% y el 32% de la variación fenotípica, respectivamente. El QTL localizado en el cromosoma 1H, corresponde al *locus Rcs6* de resistencia en plántula al patotipo 2 y explica el 93% de la variación fenotípica en plántula y el 88% de de la variación fenotípica en planta adulta. El QTL de resistencia en plántula y planta adulta de Calicuchima-sib en el cromosoma 1H (patotipo 2) es novedoso, mientras que el QTL del cromosoma 2H, colocaliza con un QTL detectado en la población Harrington/Morex (patotipo1). Analizando globalmente todas las poblaciones, y por separado cada tipo de resistencia se detectan 15 QTL de resistencia en planta adulta correspondientes a ocho intervalos genómicos: dos intervalos en el 1H, dos en 2H, dos en el 3H, uno en el 5H, y uno en el 7H. Por su parte, se identificaron 10 QTL de resistencia en plántula correspondientes a seis intervalos genómicos: un intervalo en el 1H, dos en 3H, uno en el 4H y dos en el 7H. En total se pueden identificar once intervalos que se clasifican en: tres intervalos de resistencia en plántula (3H, 4H y 7H), cinco de resistencia en planta adulta (1H, 2H dos, 3H, 5H) y tres intervalos con ambas resistencias (1H, 3H, 7H).

A nivel local, se ha localizado un nuevo QTL de resistencia a MB en planta adulta en la población de mapeo Baronesse (cultivar de dos carreras)/BCD47 (línea experimental de dos carreras) en el cromosoma 1H flanqueado por los marcadores microsatélites Bmac213 (Bin 3) y Bmag770 (Bin 6,7 u 8). El dador del QTL es BCD47 (Castro *et al.*, 2012).

Recientemente, Bovill *et al.* (2010) realizaron un análisis comparativo de las resistencias aportadas por cuatro fuentes de resistencia de dos carreras provenientes de América del Norte: dos líneas originarias de Dakota del Norte (ND11231-11, ND11231-12) y dos líneas provenientes de Canadá (TR251 y WPG8412-9-2-1) mediante la comparación de la significancia y localización de QTL de resistencia detectados en las correspondientes cuatro poblaciones de mapeo

(resistente x susceptible). En este trabajo utilizaron un único aislamiento para la detección de resistencia en plántula y planta adulta. Básicamente, las cuatro poblaciones coincidentemente detectaron dos QTL mayores, uno localizado en el cromosoma 3H que contribuyó a la resistencia en planta adulta (cuatro poblaciones), y otro localizado en el cromosoma 7H, que se asocia tanto a resistencia en plántula (cuatro poblaciones) como planta adulta (tres poblaciones). Ambos QTLs estarían localizados en las mismas regiones genómicas que las reportadas previamente por Bilgic *et al.* (2005), es decir intervalo 3H-1-3 e intervalo 7H-2-4, respectivamente. En consecuencia, el QTL de resistencia a planta adulta localizado en la región 3H1-3 es detectado en total por siete poblaciones de mapeo, mientras que en la región 7H-2-4 se detectaron QTL de resistencia a planta adulta en siete poblaciones y QTL de resistencia en plántula en un total de ocho poblaciones. Bovill *et al.* (2010) concluyeron que los genotipos dadores de resistencia presentarían una estrecha base genética y que la misma trazaría a solo tres genotipos: Manker, Bowman y NDB112, estando Bowman y Manker a su vez relacionados a NDB112. Coincidiendo con estas conclusiones, Fetch *et al.* (2008) reportaron que solamente el 5.8% (373 accesiones) de las más de 5000 accesiones de cebada de primavera de USDA National Small Grain Collection inoculadas con el patotipo 1, (el más representativo en EEUU) manifestó resistencia a mancha borrosa a nivel de campo. La gran mayoría de las líneas resistentes compartían el mismo origen, siendo prevalentemente provenientes de América del Norte posiblemente debido a la amplia representación de la resistencia de NDB112 en las líneas y cultivares que conforman la colección. La estrecha base genética de la resistencia a MB en uso en EEUU y también Canadá representa una amenaza al cultivo ya que aislamientos altamente virulentos para NDB112 han sido identificados en dichos países (Gyawali, 2010, Ghazvini y Tekauz, 2007). Utilizando este nuevo aislamiento, Gyawali (2010) encontró por mapeo asociativo de 384 líneas de cebada originarias del medioeste de EEUU, dos QTLs de resistencia a mancha borrosa en plántula, *Rcs-1H-84.6* y *Rcs-2H-106-122*. Estos dos QTLs no coinciden con ninguno reportado anteriormente y explican un muy pequeño porcentaje de la variación fenotípica observada.

En consecuencia, se reporta un interés creciente por detectar fuentes de resistencia a mancha borrosa de origen diverso (Bovill *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010). Es de destacar que como se mencionó antes, el trabajo de Bilgic *et al.* (2006) reportó la fuente Calicuchima-sib proveniente

del Programa ICARDA CIMMYT, no relacionada con NDB112, como portadora de un nuevo QTL de resistencia en plántula y planta adulta, efectivos frente al patotipo 2 en el cromosoma 1H mientras que porta resistencia a planta adulta frente al patotipo 1 en el 2H. De esta manera, Bovill *et al.* (2010) han sugerido la necesaria incorporación de Calicuchima-sib como fuente de resistencia diversa al germoplasma adaptado de cebada.

Con la finalidad de diversificar las fuentes de resistencia a mancha borrosa Fetch *et al.* (2003) reportaron que un alto número de accesiones de *H. spontaneum* manifestaban resistencia a nivel de plántula frente el patotipo 1. Más adelante, se han reportado QTLs de resistencia en plántula en tres poblaciones de mapeo biparentales *H. spontaneum* x *H. vulgare* (revisadas en Roy *et al.*, 2010) en las cuales se detectaron un total de cuatro QTL de resistencia en plántula, todos coincidentes con lo previamente reportados en *H. vulgare*. Sin embargo, el análisis de una colección de cerca de 300 accesiones de *H. spontaneum* por mapeo asociativo identificó 12 QTL de resistencia a plántula frente al patotipo 1 (Roy *et al.*, 2010). Entre los 12 QTL, cinco coincidieron con QTL reportados previamente en *H. vulgare*, uno en el 1H, región 1H-7 (coincidente con resistencia en planta adulta en una población de mapeo), uno en el cromosoma 2H, región 2H-8 (coincidente con QTL de resistencia a planta adulta reportado en dos poblaciones de mapeo), uno en el cromosoma 3H, región 3H-5 (la resistencia en plántula en esta región fue detectada previamente en un población biparental de mapeo), y dos en el cromosoma 7H: regiones 7H-2, y 7H-7 (cada región fue previamente reportada en cuatro y dos poblaciones de mapeo, respectivamente). De esta manera, estas cinco regiones asociadas a resistencia a mancha borrosa localizadas en los intervalos 1H-7, 2H-8, 3H-5, 7H-2 y 7H-7, parecen ser importantes en un amplio espectro de germoplasma.

1.4 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS BIÓTICO

Las plantas no poseen células de defensa móviles, ni un sistema inmune adaptativo. Presentan inmunidad innata, en cada célula de la planta y poseen además señales sistémicas que viajan desde los sitios de infección (Jones y Dangl, 2006). Estos autores plantean un sistema inmune vegetal de dos vías. En la primera, las plantas reconocen y responden a moléculas comunes a muchas clases de microorganismos, incluyendo no patógenos y en la segunda,

responden a factores de virulencia de patógenos o más recientemente denominados efectores, tanto directamente como a través de los efectos que producen en sus huéspedes. Las plantas están en permanente exposición a un número enorme de diferentes microorganismos. Sin embargo, a nivel de cada especie, el número de infecciones exitosas es limitado. Esto se debería a que la mayoría de las interacciones planta-microorganismos se clasificarían como “no apropiadas” a una especie huésped en particular lo cual se ha acuñado con el término resistencia de “huésped no apropiado”. Mysore y Ryu (2004) plantean que existen dos tipos de resistencia “huésped no apropiado”, la tipo I no produciría síntomas visibles mientras que la tipo II produciría una rápida respuesta hipersensible (HR), que lleva a la muerte de la célula atacada. Por su parte, la resistencia “huésped apropiado” denominada basal, presente en genotipos resistentes y susceptibles se caracteriza por presentar una leve resistencia a la penetración con participación de mecanismos de defensa independientes de la hipersensibilidad. Existen fuertes similitudes entre la resistencia “huésped no apropiado” y la resistencia basal a nivel del conjunto de respuestas del huésped frente al ataque del patógeno. Pero, aún no está claro si ambas resistencias involucran las mismas vías de transducción de señales. Trabajos recientes parecen indicar que en ambos tipos de resistencia están involucrados genes de vías metabólicas similares, donde la diferencia podría estar en la regulación de ambos tipos de resistencia Zellerhoff *et al.*, (2010) estudiaron la interacción de cebada con aislamientos adaptados y no adaptados a la especie hospedera, pertenecientes a los generos *Blumeria*, *Puccinia* (ambos biotrofos) y *Magnaporthe* (hemibiotrofo), encontrando que en ambos tipos de resistencia estarían involucrados genes de vías metabólicas similares, donde la diferencia podría estar en la regulación de ambos tipos de resistencia. Estos dos tipos de resistencia han despertado creciente interés debido a que se consideran que en ambos casos serían manifestaciones de resistencias durables y por su alta disponibilidad.

Los mecanismos de defensa asociados a la pared celular son importantes en la resistencia basal. Las plantas responden al intento de penetración del patógeno, mediante la rápida inducción de defensas que incluyen la inhibición de enzimas microbianas que degradan la pared de la célula huésped, el reforzamiento de dicha pared y la inducción de agentes antimicrobianos (Hückelhoven, 2007). Además de la naturaleza química del material que se deposita en la pared

celular alterada, tanto la velocidad de deposición como el nivel de compactación podrían ser cruciales en la defensa exitosa. El transporte y la secreción de compuestos de defensa de forma polarizada, *i.e.* a sitios específicos de la célula, dependen de un efectivo proceso de transporte mediado por cambios dinámicos en las membranas y en el citoesqueleto (Hückelhoven, 2007). El citoesqueleto y el sistema de endomembranas son sustancialmente rearrregados y polarizados cuando las plantas son atacadas por patógenos fúngicos (Kobayashi *et al.*, 1992). Se ha demostrado que en células epidérmicas de cebada, la reorganización del citoplasma dependiente de los filamentos de actina del citoesqueleto es importante para la resistencia basal al hongo hemibiotrofo *Magnaphorte grisea* (Jarosch *et al.*, 2005) y al biotrofo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Miklis *et al.*, 2007).

La acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el apoplasto es otro evento temprano en respuesta a la percepción de un elicitor o de la penetración de la pared celular (Torres *et al.*, 2006). Las ROS son moléculas clave en la bioquímica y la señalización de mecanismos de defensa no específicos de la planta. El H₂O₂ es requerido para la lignificación dependiente de inducción de peroxidasas que residen en las aposiciones de la pared celular (APC) (An *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2005), el entrecruzamiento de proteínas en la pared celular (Bolwell *et al.*, 2002) y la transducción de señales (Tenhaken *et al.*, 1995). La influencia de otros factores como el ambiente, las hormonas y la activación de diferentes vías de señalización juegan un rol importante en la acumulación de ROS. Del mismo modo, factores externos tales como diferentes tipos de patógeno pueden variar en su habilidad para disparar la producción de ROS (Hückelhoven, 2007).

Levine *et al.* (1994) sugirieron que las ROS localizados en los sitios de interacción célula vegetal-patógeno podrían cumplir diferentes roles defensivos. Dependiendo de la concentración, localización subcelular y duración de su producción, las ROS pueden involucrarse tanto en la prevención como en el disparo de la muerte celular. Shetty *et al.* (2008) han revisado diferentes modelos propuestos para explicar cómo las ROS y el óxido nítrico (NO) pueden disparar y regular la HR. Cuando las plantas son sometidas a estrés y se acumula ROS en niveles insuficientes (en oposición a la necrosis que es una muerte celular accidental, pasiva), los eventos de señalización llevan a una muerte celular programada a través de una HR. El inicio de la HR puede llevar a la

activación de otras respuestas de defensa y a la resistencia sistémica adquirida. En la HR, una fuerte reacción de defensa, culmina un suicidio celular local, que frena el frente de avance de los patógenos biotrofos. Por el contrario, la HR a menudo no es efectiva contra patógenos necrotrofos, ya que estos patógenos matan las células huésped para alimentarse de ellas (Shetty *et al.*, 2008).

Es de particular interés entonces determinar que rol juegan las ROS en HR/necrosis contra patógenos necrotrofos. Shetty *et al.* (2008) plantean las siguientes interrogantes: ¿todos los patógenos necrotrofos se benefician de la acumulación de ROS en el huésped? o alternativamente, algunos son inhibidos en algún grado por ROS u otras sustancias en las células que están muriendo? ¿Las toxinas producidas por estos patógenos y que matan a la célula huésped siempre causan la acumulación de ROS que a su vez causa la HR? Es importante también estudiar la interrelación entre ROS y NO, para poder comprender mejor la regulación de la resistencia, ya que estos son importantes reguladores de las respuestas de defensa frente a patógenos (Mur *et al.*, 2006).

1.5 DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL EN LA RESISTENCIA DE LA CEBADA A LA MANCHA BORROSA

La importante y creciente incidencia de la MB en los cultivos de cebada en varios países del mundo y en particular del Uruguay, la uniformidad genética detectada entre aquellos genotipos dadores de resistencia más ampliamente utilizados a nivel internacional y, la reciente detección en América del Norte de nuevos patotipos de *C. sativus* que amenazan a las resistencias hasta el momento consideradas más durables, justifican el esfuerzo de identificar fuentes de resistencia a *C. sativus* novedosas y genéticamente diversas. Afortunadamente, como resultante de la evaluación de resistencia en plántula y planta adulta a MB de un importante número de accesiones de cebada, de origen diverso y realizada durante varios años con buenas condiciones de infección, se detectaron genotipos con resistencia efectiva frente a la población de *C. sativus* de Uruguay (Castro *et al.*, 2011). Estos materiales son candidatos a ser portadores de resistencias novedosas y genéticamente diversas y por lo tanto no redundantes (Albín, 2008). Una estrategia reiteradamente reportada en la literatura para identificar fuentes de resistencia no

redundantes en varias especies cultivadas afectadas por diversas enfermedades es el análisis de haplotipos cromosómicos (Badea *et al.*, 2008, Tar' an *et al.*, 2007, Gosman *et al.*, 2007; Ogonnaya *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2006, McCartney *et al.*, 2004, Liu y Anderson, 2003). La misma consiste en el análisis comparativo de combinaciones alélicas de marcadores localizados en regiones genómicas asociadas a QTLs de resistencia. El avanzado desarrollo de mapas genéticos de cebada, entre los que se incluye el BinMap (Kleinhofs, 2004, Gardiner *et al.*, 1993) y los mapas consenso (Stein *et al.*, 2007, Varshney *et al.*, 2007, Rostoks *et al.*, 2005, Kleinhofs, 2004, Karakousis *et al.*, 2003, Forster *et al.*, 1997, Qi *et al.*, 1996, Langridge *et al.*, 1995), la abundante cantidad de marcadores moleculares mapeados disponibles (en particular SSR de alta informatividad) y la existencia de numerosas bases de datos de acceso libre en Internet (Sreenivasulu *et al.*, 2008) proporcionan la plataforma necesaria para realizar análisis genómicos en cebada análogos a los realizados por Badea *et al.* (2008), Gosman *et al.* (2007), Ogonnaya *et al.* (2007), Yu *et al.* (2006), McCartney *et al.* (2004) y Liu y Anderson (2003) en trigo.

Por otro lado, la base funcional de la resistencia a MB comienza a dilucidarse. Los estudios de las respuestas celulares tempranas a la infección en trigo (Ibeagha *et al.*, 2005) y cebada (Shäfer *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2001) señalaron la detección tanto de APC en epidermis, como la acumulación de H₂O₂ en epidermis y mesofilo, siendo ambas manifestaciones de reacción oxidativa. Más aún, los estudios comparativos realizados en diferentes mutantes de cebada que afectan el nivel de resistencia a MB, con sus correspondientes genotipos silvestres, han demostrado que el patrón espacio-temporal de la reacción oxidativa en las etapas tempranas de infección fue alterado (Shäfer *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2001). Además, el análisis del transcriptoma del tejido foliar inoculado con *C. sativus* de una accesión resistente de la cebada silvestre *H. vulgare spontaneum* puso en evidencia que la actividad transcripcional más relevante ocurre a las 24 h de la inoculación, momento en que la fase biotrófica pasaría a fase necrotrofica y que los genes relacionados con la respuesta oxidativa jugarían un rol particularmente importante en la defensa contra este hongo hemibiotrofo (Millett *et al.*, 2009). Globalmente, estos resultados indicarían una clara asociación de los ROS en la manifestación de resistencia.

1.6 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Este trabajo se planteó como objetivo caracterizar la diversidad genética y funcional de la resistencia a mancha borrosa en cebada.

En referencia a la diversidad genética este trabajo se planteó la siguiente pregunta:

¿Qué nivel de diversidad o redundancia genética presentan las fuentes de resistencia identificadas en Uruguay con respecto a las ampliamente conocidas?

La hipótesis propuesta es:

- Algunos de los genotipos de cebada de cebada resistente a MB son portadores de determinantes genéticos diversos

La estrategia elegida para responder esta pregunta consistió en caracterizar y comparar los haplotipos cromosómicos de QTL de resistencia a MB, previamente reportados, en un juego de 40 genotipos de cebada que incluyó: fuentes de resistencia efectivas identificadas en Uruguay, fuentes de resistencia de referencia y cultivares ampliamente cultivados en el país.

En referencia a la diversidad funcional de la resistencia a mancha borrosa en cebada este trabajo se planteó las siguientes preguntas:

¿La reacción oxidativa en la interacción de la cebada con *C. sativus* sigue siendo una respuesta importante al ampliar el número de genotipos de cebada analizados?

¿Los genotipos de cebada que sean portadores de genes de resistencia a MB putativamente diversos, manifestarán un único patrón espacio-temporal de respuesta oxidativa?

La hipótesis asociada a estas preguntas es:

- genotipos de cebada con comportamiento resistente a *C. sativus* pero genéticamente diversos presentarán diferencias en la regulación espacio-temporal de la reacción oxidativa frente al proceso de infección.

La estrategia experimental seleccionada consistió en comparar las respuestas de reacción oxidativa (mediante evaluación de la acumulación *in situ* de H₂O₂ en células de epidermis y mesófilo) y del avance del progreso de la infección en etapas tempranas de la infección (8, 24 y 48 horas después de la inoculación).de tejidos foliares de 11 genotipos resistentes y susceptibles a MB, diversos genéticamente.

De cumplirse las hipótesis planteadas, podríamos identificar genotipos de cebada resistentes a MB, genéticamente y funcionalmente no redundantes. Estos materiales podrían incluirse en programas de mejoramiento de cebada con la finalidad de mejorar la efectividad y durabilidad de la resistencia de nuevos cultivares.

Este trabajo incluye dos artículos científicos, en los cuales se discuten las dos hipótesis planteadas:

- Diversidad de haplotipos cromosómicos en QTLs de resistencia a mancha borrosa en cebada
- Diversidad en los mecanismos de resistencia y susceptibilidad a *Cochliobolus sativus* en hojas de cebada

2. DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS EN QTLs DE RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN CEBADA¹

2.1 ABSTRACT

Genetic diversity in relation to spot blotch (SB) resistance was investigated among 40 barley genotypes using 27 SSR and 8 STS markers. Within the barley set, 13 genotypes had shown effective SB resistance in Uruguay but had been poorly genetically characterized. For four other genotypes, considered as reference genotypes, the genetics of SB resistance is known. Molecular markers were chosen based on their putative association to nine, previously reported SB resistance QTLs. A total of 113 alleles were detected for 32 polymorphic markers for which polymorphism information content ranged from 0,13 (*EBmac405*) to 0,76 (*Bmac213*) with an average of 0,5. Cluster analyses, performed by both distance-based and model-based methods coincided in detecting four clusters with similar groupings, corresponding to both geographic origin and pedigree relationships. Haplotype analysis at nine chromosome haplotypes revealed either poor or lacking representation of three SB resistance *loci* derived from Morex in 20IBON#69, TR6 and ND17293, which in turn showed the least number of alleles in common with reference haplotypes as a whole. We identified genetically diverse, SB resistant genotypes that may carry putative, novel resistance genes. The information generated in this study will assist in the accumulation of diverse resistance sources into elite barley germoplasm and encourage new research work targeted to widen the knowledge of the genetic basis of SB resistance within *Hordeum vulgare* subsp *vulgare* pool.

Keywords: *Cochliobolus sativus*, *Hordeum vulgare*, haplotypes, SSR, STS

¹ Este artículo será publicado en la revista Journal of Basic and Applied Genetics (JBAG).

2.2 RESUMEN

En este trabajo se investigó la diversidad genética en relación a la resistencia a mancha borrosa (MB) entre 40 genotipos de cebada utilizando 27 marcadores SSR y 8 marcadores STS. Trece de los genotipos eran líneas resistentes efectivas en Uruguay, en general con escasa caracterización genética. Para otros 4 genotipos denominados genotipos de referencia, la genética de la resistencia a MB era conocida. Los marcadores se seleccionaron en base a su asociación putativa con nueve QTLs para resistencia a MB, previamente reportados. En total se detectaron 113 alelos para 32 marcadores polimórficos para los cuales el contenido de información polimórfica varió entre 0,13 (*EBmac405*) y 0,76 (*Bmac213*) con un promedio de 0,5. Tanto el análisis de agrupamiento realizado mediante métodos basados en distancia genética como en el modelo bayesiano coincidieron en detectar cuatro agrupamientos con similar integración en correspondencia al origen geográfico y a las relaciones genealógicas entre los genotipos. El análisis de nueve haplotipos cromosómicos reveló pobre o ausente representación de tres *loci* de resistencia derivados de Morex en los genotipos 20IBON#69, TR6 y ND17293, quienes a su vez presentaron el menor número de alelos en común con los haplotipos de referencia. Este trabajo identificó líneas resistentes a MB, genéticamente diversas que serían potencialmente portadores de genes de resistencia novedosos. La información generada facilitará la acumulación de resistencias diversas en el germoplasma elite e incentiva nuevas investigaciones dirigidas a ampliar la comprensión de la base genética de este carácter dentro de la subespecie *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*.

Palabras clave: *Cochliobolus sativus*, *Hordeum vulgare*, haplotipos, SSR, STS

2.3 INTRODUCCIÓN

La mancha borrosa (**MB**), es una de las principales enfermedades foliares de la cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L.). Esta enfermedad, causada por *Cochliobolus sativus*, determina importantes pérdidas en producción y calidad maltera del grano en varias partes del mundo (Kumar *et al.*, 2002, Steffenson *et al.*, 1996), incluyendo el Uruguay (Pereyra *et al.*, 2011). Su incidencia ha aumentado en los últimos años, debido a la falta de cultivares de cebada con niveles aceptables de resistencia genética y a las prácticas conservacionistas del suelo, esperándose un incremento de la misma en los próximos años como consecuencia del cambio climático y cambios en la virulencia en el patógeno (Ghazvini y Tekauz, 2007). La utilización de genotipos resistentes ha resultado un método eficiente y ecológico en el control de enfermedades.

Seis *loci* diferentes han sido asociados con la resistencia cualitativa a esta enfermedad (*Rcs1* a *Rcs6*) (revisado por Bilgic *et al.*, 2006). Se han detectado además, varios QTLs de resistencia a MB en poblaciones biparentales, tanto en planta adulta como en plántula (Figura 1) (Castro *et al.*, 2012, Bovill *et al.*, 2010, Bilgic *et al.*, 2006, Bilgic *et al.*, 2005, Steffenson *et al.*, 1996). Recientemente se ha incorporado el mapeo asociativo como estrategia para mapear QTLs (Zhu *et al.*, 2008). Roy *et al.* (2010) han utilizado esta metodología para evaluar accesiones de cebada silvestre (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*), encontrando 12 QTLs de resistencia a MB en plántula, coincidiendo cinco de ellos con los reportados en cebadas domesticadas.

En Estados Unidos, la resistencia a MB derivada del genotipo NDB112 ha sido efectiva durante 40 años en cebadas de seis hileras (Steffenson *et al.*, 1996). Morex, que incluye a NDB112 en su pedigrí, expresa resistencia durable a MB y ha sido utilizado en cruzamientos para identificar regiones cromosómicas asociadas con esta resistencia (Bilgic *et al.*, 2005). En cambio, la resistencia presente en el cultivar Bowman, también derivado de NDB112, no ha resultado durable, siendo susceptible al patotipo 2 encontrado en Dakota del Norte (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997, Fetch y Steffenson, 1994). La reciente emergencia de nuevos patotipos con virulencia para NDB112 (Ghazvini y Tekauz, 2007) alerta sobre uniformidad genética de la resistencia a MB en los cultivares de seis carreras y muestra la necesidad de encontrar fuentes

de resistencia genéticamente diversas para ser incorporadas en los programas de mejoramiento de cebada con la finalidad de mejorar la efectividad y durabilidad de nuevos cultivares. En Calicuchima-sib, un material de seis carreras no emparentado con NDB112 se encontró un QTL de resistencia al patotipo 1 de *C. sativus* en el cromosoma 2H y un gen de resistencia al patotipo 2 en el cromosoma 1H (Bilgic *et al.*, 2006). El trabajo de Bovill *et al.*, (2010) pone en evidencia la estrecha base genética de la resistencia disponible y sugiere la incorporación de Calicuchima-sib como fuente de resistencia diversa al germoplasma adaptado de cebada. La resistencia a varias enfermedades observada en *H. vulgare* subsp. *spontaneum*, incluyendo MB ha impulsado el estudio de esta especie emparentada de la cebada, para diversificar las fuentes de resistencia presentes hasta el momento (Roy *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2005).

Uruguay es un centro epidemiológico de mancha borrosa, lo que ha facilitado la identificación de fuentes de resistencia en colecciones de germoplasma diverso. Sin embargo, el registro de datos fenotípicos no permite por si solo conocer el grado de redundancia genética entre las fuentes de resistencia identificadas. Albin (2008) identificó siete genotipos de cebada de muy diverso origen con resistencia en plántula (3), en planta adulta (1) y ambas resistencias. El análisis de coancestría realizado para cuatro de ellos, indicó que pertenecían a tres pools genéticos diferentes indicando que podrían ser portadores de loci de resistencia diferentes.

Una estrategia para identificar genotipos candidatos a portar resistencias novedosas (no redundantes) es el análisis de haplotipos cromosómicos (Badea *et al.*, 2008, Tar an *et al.*, 2007, Ogonnaya *et al.*, 2007, Gosman *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2006, McCartney *et al.*, 2004, Liu y Anderson, 2003) que consiste en el análisis comparativo de combinaciones alélicas de marcadores moleculares localizados en regiones genómicas asociadas a QTLs de resistencia. El desarrollo de mapas genéticos de cebada, incluyendo el BinMap (Kleinhofs, 2004) y mapas de consenso (Close *et al.*, 2009, Stein *et al.*, 2007, Varshney *et al.*, 2007, Rostoks *et al.*, 2005), la abundante cantidad de marcadores moleculares mapeados de alta informatividad como los microsatélites (SSR) y libre accesibilidad de esta información (Sreenivasulu *et al.*, 2008) proporcionan la plataforma necesaria para realizar el análisis de haplotipos cromosómicos en cebada. Materiales con alta probabilidad de llevar nuevos genes de resistencia, identificados a través de esta metodología, podrían ser incluidos en poblaciones de mapeo.

Con el objetivo de investigar los patrones de diversidad genética en regiones cromosómicas asociadas a QTLs de resistencia a MB e identificar genotipos portadores de genes de resistencia putativamente novedosos, en este trabajo se compararon los haplotipos cromosómicos de 40 genotipos de cebada de origen diverso, con comportamiento variable a MB en Uruguay, en nueve regiones asociadas con la resistencia a MB tanto en plántula como en planta adulta, utilizando los genotipos de Morex, Bowman-BC, Calicuchima-sib y Harrington como genotipos de referencia.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Material Vegetal y Extracción de ADN

Cuarenta genotipos de cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L.) incluyendo 18 materiales provenientes de EEUU, tres de ICARDA-CIMMYT, dos de Canadá y 15 cultivares cultivados en Uruguay (Tabla 1) fueron analizados. Seis de los 40 genotipos identificados como genotipos de referencia correspondieron a dadores de QTLs de resistencia a MB reportados en la bibliografía. Semillas de los 40 materiales fueron sembradas en cámara de crecimiento a 23°C, 70% de humedad relativa y 16 h de fotoperíodo (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Para la extracción de ADN, hojas de plántulas de siete días fueron procesadas de acuerdo a Doyle y Doyle (1990).

2.4.2 Evaluación de la resistencia a MB en planta adulta

Treinta de los 40 genotipos de cebada fueron evaluados por su resistencia a MB en planta adulta (Tabla 1). Los ensayos fueron realizados a campo, en parcelas de dos hileras de 1 m de largo, en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Las plantas fueron evaluadas en viveros de invierno/primavera y de verano durante el período 2001-2010. Las parcelas fueron inoculadas durante las etapas de crecimiento Zadoks (ZGS) 45-49 (Zadoks *et al.*, 1974), una o dos veces con una mezcla de ocho a diez aislamientos monospóricos de *C. sativus* obtenidos de diferentes años, variedades y regiones dentro de la zona de cultivo de cebada en Uruguay. Se utilizó una concentración de 8×10^3 conidios/ml a una tasa de 50 ml/m². La severidad fue medida en base a la evaluación visual del porcentaje de área foliar afectada en una parcela base desde la etapa de

grano lechoso a la etapa de grano pastoso. La respuesta de infección (RI) fue evaluada según Fetch y Steffenson (1999).

2.4.3 Evaluación de la resistencia a MB en plántula

Treinta y cuatro de los 40 genotipos de cebada fueron evaluados por su resistencia a MB en estado de plántula (Tabla 1). Los ensayos se realizaron en invernadero en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Se sembraron en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Cada bloque estaba constituido de siete bandejas con nueve materiales cada una. Previo a la inoculación las plántulas estuvieron a 20-25°C, con fotoperíodo de 12 horas. Las plántulas se inocularon cuando la segunda hoja se encontraba completamente expandida. (Zadoks GS 13; Zadoks *et al.*, 1974) con una suspensión de conidios con los mismos aislamientos de *C. sativus* utilizados en los experimentos de campo. La concentración del inóculo fue de 6×10^3 conidios/ml, aplicado de manera uniforme a las plantas con un aerógrafo (modelo VL3, Paasche Air Brush Company, Harwood Heights, IL) dejando 0.1 mL de inóculo por planta. Después de la inoculación, las plántulas se incubaron en condiciones controladas (20-22°C, fotoperíodo de 12 horas, 100% de humedad relativa) durante 24 h. Luego las plantas retornaron a las condiciones previas a la inoculación. La reacción en plántula se midió en la segunda hoja, 10-12 días después de la inoculación, utilizando la escala de RIs de 1-9 propuesta por Fetch y Steffenson (1999) donde RIs de 1 a 3 representan baja compatibilidad, RIs de 4 y 5 compatibilidad intermedia y RIs de 6 a 9 compatibilidad alta.

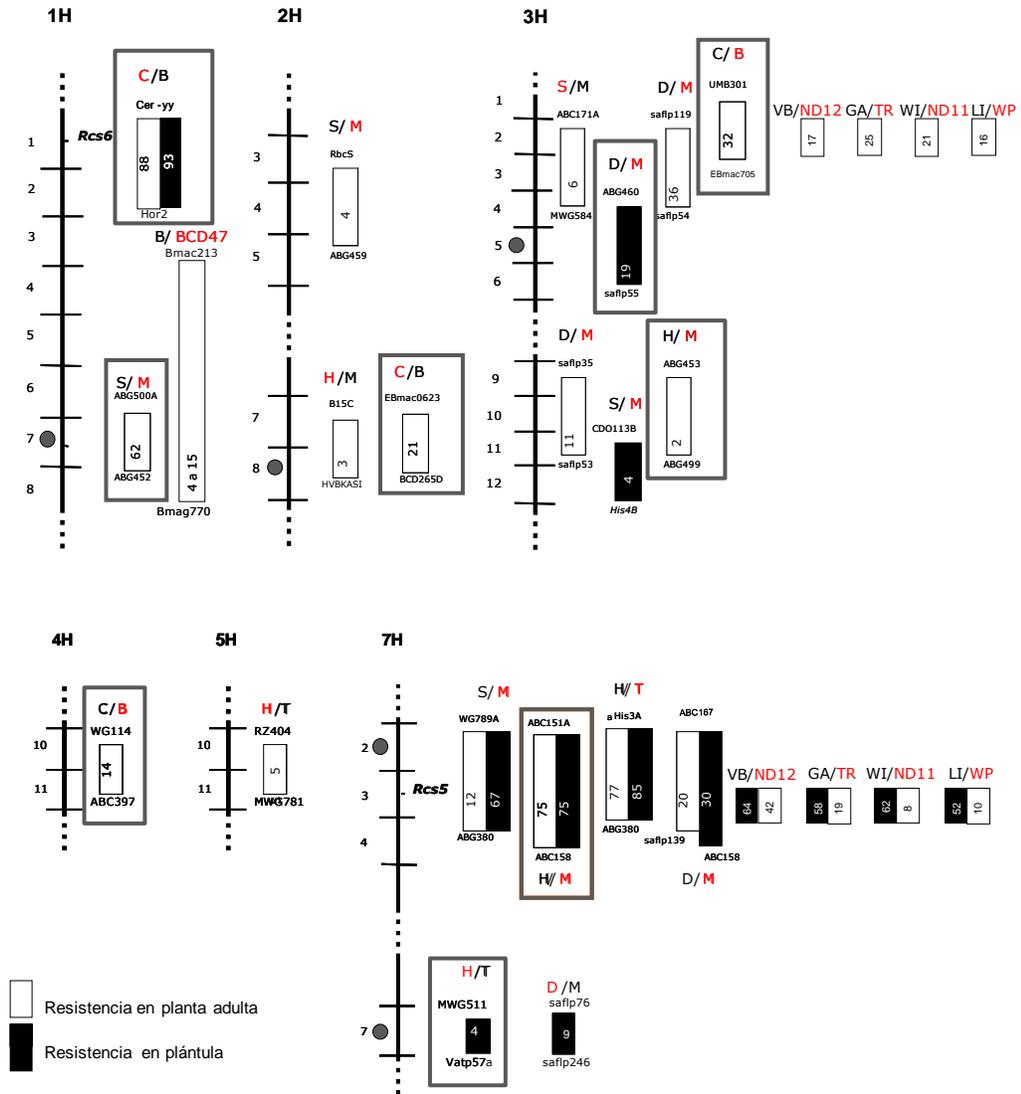


Figura 1: Representación de seis de los siete cromosomas de cebada, ubicando dos *loci* de resistencia cualitativa a MB (*Rcs5* y *Rcs6*), 25 QTLs de resistencia a MB en planta adulta y 13 QTLs de resistencia a MB en plántula. Los números a la izquierda de cada cromosoma representan la posición (en bins). Cada QTL está representado por un rectángulo conteniendo la información siguiente: marcadores flanqueantes, porcentaje de variación fenotípica explicado por cada QTL, nombre de la población de mapeo utilizada: S/M (Steptoe/Morex), D/M (Dicktoo/Morex), H/M (Harrington/Morex), H/T (Harrington/TR306), C/B (Calicuchima-sib/Bowman-BC), B/BCD47 (Baronesse/BCD47), VB/ND12 (VB9524/ND1231-12), GA/TR (Gairdner/TR251), WI/ND11 (WI12875-17/ND11231-11) LI/WP (Lindwall/WPG8412-9-2-1). El padre donante del QTL de resistencia está indicado en color rojo. Los rectángulos grises indican los nueve QTLs analizados en este trabajo. Los círculos grises muestran regiones en donde se han encontrado QTLs de resistencia a MB en plántula en *H. spontaneum*, que colocalizan con QTLs de resistencia a MB en *H. vulgare*. Adaptado de: Castro *et al.*, (2012), Bovill *et al.*, (2010), Roy *et al.*, (2010), Bilgic *et al.*, (2006), Bilgic *et al.*, (2005), Steffenson *et al.*, (1996).

TABLA 1. Origen, pedigrí, reacción a mancha borrosa en plántula y planta adulta de 40 genotipos de cebada en La Estanzuela (Colonia) durante 2001-2010.

	Nombre	Número de Hileras	Origen	Pedigrí	Respuesta a la Infección (RI)		Severidad (%)
					Plántula	Planta adulta	
cultivares y líneas avanzadas locales	Perún	2	Europa	HE1728/Karat	5	MR	<25
	Carumbé	2	Uruguay	ND9034/TR226	4	MR-MS	<30
	INIA Guaviyú (CLE 240)	2	Uruguay	ND16680/ND13111(Carumbé)	5	MR-MS	20-40
	INIA Viraró (CLE226)	2	Uruguay	Defra//FNCl 22/FNC 1	5	MS	15-70
	INIA Ceibo (CLE202)	2	Uruguay	FNCl-22/Defra	6-7	MS	20-80
	INIA Arrayán (CLE233)	2	Uruguay	Defra/CI 5791	6-7	MS	15-75
	Ackermann Madi	2	Alemania	AC4404/Katharina//Krona	8	MS	sd
	Ambev488	2	Uruguay	Br2/Lisa	7-8	MS	sd
	Quebracho	2	Uruguay	Atlas57//Prior/Ymer/3/B6671	6-7	MS	20-80
	CLE 247	2	Uruguay	N. Carumbé/CLE175	6-7	S	40-80
	CLE 253	2	Uruguay	Perún/I. Aromo	9	S	sd
	CLE 250	2	Uruguay	GP 313/CLE 194//I.Ceibo	7	S	sd
	Clipper	2	Australia	Prior A/Proctor	8	S	60-90
	Defra	2	Uruguay	Gerlinde/Karat	sd	sd	sd
FNC-I	2	Uruguay	Bido/Magnific 102-C	6-7	sd	sd	
Fuentes de Resistencia efectivas en Uruguay	12IBYT#25	6	ICARDA-CIMMYT	Dulce/Barberousse//Gloria-Bar/Come_B	2	R	T-20
	TR6	6	sin información	sin información	3	R	T-20
	Tx7934	6	Texas-EEUU	Tokak/KY79-44//TAMBAR 401	3-4	R	T-15
	NDB112 ^a	6	EEUU	Reselección de Kindred CI6969/CI7117-17	2-3	R	T-20
	20IBON#69	2	ICARDA-CIMMYT	Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen	5	MR	2-30
	ND17293	2	ND-EEUU	ND14651/ND15062	4	MR	2-15
	ND17380	2	ND-EEUU	Logan/ND15053	4	MR	5-30
	ND17268	2	ND-EEUU	ND15080/Conlon	4	MR	2-30
	ND23122	2	ND-EEUU	ND18172/DH6/ND19931	4	MR	2-25
	ND23180	2	ND-EEUU	ND19888/ND18380-1	4	MR	5-35
	ND21990	2	ND-EEUU	ND18919/ND19119-1	6-7	MR-MS	5-25
Bowman	2	ND-EEUU	Klages//Fergus/Nordic/3/ND1156/4/Hector	3-4	MR-MS	30	
FA2291	2	sin información	sin información	3-4	sd	30 ^b	
genotipos de referencia	BCD47	2	Oregon-EEUU	Shyri/Galena//Orca/Harrington*2	8	MS	20-40
	Harrington	2	Canadá	Klages/Gazelli//Betzes/Centennial	9	S	75
	Morex	6	EEUU	Cree/Bonanza	3 ^b	sd	30-60 ^b
	TR306	2	Canadá	Abee/Revere//WM793-1776	sd	sd	sd
	Calicuchima-sib	6	ICARDA-CIMMYT	Iran/UNA8271//Gloria-sib/Comanche-sib	sd	sd	sd
	Bowman BC	2	EEUU	ND586/Clho2376//ND4880)4* Bowman	sd	sd	sd
otros genotipos de EEUU	Manker	6	EEUU	d/Jotun	sd	R	5
	Robust	6	EEUU	Morex/Manker	4 ^b	sd	sd
	Stander	6	EEUU	Excel/M80-224	3 ^b	sd	sd
	Excel	6	EEUU	Robust/MN77-825	sd	sd	sd
	ND5883	2	ND-EEUU	Clipper/línea experimental Canadá702-10	7	MS	40

RI plántula: según escala de 1-9, RI entre 1-5=resistente; entre 6-9=susceptible. RI planta adulta: R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente susceptible; S: susceptible (según escalas de Fetch y Steffenson, 1999).

^aSe incluyeron dos orígenes de NDB112

^bResultados previos reportados en Albín (2008)

sd: sin dato.

2.4.4 Marcadores Moleculares SSR y STS y Análisis Genotípico

Para el análisis de haplotipos cromosómicos se seleccionaron 27 marcadores SSR y ocho marcadores STS (Tabla 2 y 3) localizados próximos a nueve QTLs de resistencia a MB (*Rcs-qt1-1H-1-2*, *Rcs-qt1-1H-5-7*, *Rcs-qt1-2H-7-8*, *Rcs-qt1-3H-1-3*, *Rcs-qt1-3H-4-6*, *Rcs-qt1-3H-9-12*, *Rcs-qt1-4H-10-11*, *Rcs-qt1-7H-2-4*, *Rcs-qt1-7H-7*). Dos a seis marcadores SSR y STS, con localización conocida (Varshney *et al.*, 2007) y presentes en más de un mapa genético fueron seleccionados por intervalo interrogando la base de datos Graingenes 2.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes>). Los cebadores y las condiciones de amplificación utilizados se obtuvieron de Graingenes 2.0, con pequeñas modificaciones; alternativamente, los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fueron realizadas en un volumen total de 15 µL conteniendo 0.4 µM de cada cebador, 0.1 mM de cada desoxirribonucleótido, 2.5 mM MgCl₂, 1 unidad de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 125 ng de ADN utilizando un termociclador PalmCycler (modelo CG1-96, Corbett research). Los resultados de las amplificaciones se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 3% en buffer TBE 1% (Cuba de Electroforesis BIO-RAD Sub-Cell Moldel 96) o en geles de poliacrilamida (6%) no desnaturizante (“MEGA-GEL unidad vertical rendimiento elevado” modelo C-DASG-400-50, C.B.S Scientific Co.). La identificación de tamaños de los diferentes alelos (en pares de bases) de cada individuo, fue realizada con el software CrossChecker versión 2.91 (Buntjer, 1999) a partir de la imagen digital de los geles.

2.4.5 Análisis de los datos

Diversidad Alélica Se utilizó el programa Power Marker V3.25 (Liu y Muse, 2005) para calcular el número de alelos por marcador, la frecuencia del alelo más abundante y el contenido de información polimórfica de cada marcador (PIC). Se calcula con la formula siguiente:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

Donde p_{ij} es la frecuencia en la población del alelo j para el marcador i y n es el numero de alelos para cada marcador (Botstein *et al.* 1980).

Se utilizó el programa GGT32 (Van Berloo, 1999) para obtener los genotipos gráficos de los 40 individuos en cada intervalo genómico, comparando posteriormente para cada intervalo, el haplotipo (patrón de combinaciones alélicas) del genotipo de referencia con los haplotipos de los restantes 39 genotipos.

Agrupamiento basado en distancia: Para estimar las relaciones genéticas existentes entre los cuarenta genotipos, se realizó un análisis de conglomerados y de Coordenadas Principales utilizando el programa DARwin 5 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006). Las similitudes genéticas se estimaron mediante el coeficiente “Simple Matching”:

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L \sum_{i=1}^L \frac{m_i}{\pi}}$$

donde: d_{ij} es la disimilitud entre las unidades i y j , L es el número de loci, π es la ploidía y m_i es el número de alelos apareados por locus i . La matriz de similitudes genéticas resultante fue utilizada para los agrupamientos mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) y un dendrograma. Éste último se construyó utilizando el método Neighbor Joining (NJ).

Agrupamiento basado en modelo bayesiano: Se utilizó el programa STRUCTURE versión 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) para inferir la estructura genética y el número de grupos (k) en el conjunto de los 40 genotipos. Se realizaron diez corridas independientes para cada valor de k , variando k entre 1 y 10. Se fijaron los parámetros del programa para: “admixture ancestry model”, “correlated allele frequencies” y “degree of admixture alpha inferred from the data” (Pritchard y Wen, 2003). Cada corrida fue fijada por un periodo de “burn-in” de 10000 iteraciones seguido de 10000 iteraciones MCMC (Monte Carlo Markov Chain). Se estimó el número de grupos más probable de acuerdo a Evanno *et al.*, (2005). Con el valor más probable de k ($k=4$) se volvió a realizar el análisis por un periodo de “burn-in” de 10000 iteraciones seguido de 100000 iteraciones MCMC.

Tabla 2. Tipo, localización, secuencias de cebadores y temperatura de renaturalización de 35 marcadores moleculares ligados a nueve QTLs de resistencia a MB

Marcador	Tipo	Cromosoma	Cebador directo	Cebador reverso	Temperatura renaturalización (°C)
ABG059	STS	1H	GCCATCACGAGTTTAGTCTT	TTCGGGTTGAGTCTGTTAGC	55
Hor2	STS	1H	CCACCATGAAGACCTTCCTC	TCGCAGGATCCTGTACAACG	58
GMS021	SSR	1H	CTATCACACGACGCAACATG	CCTGAGAAAAGAAAGCGCAAC	55
Bmac213	SSR	1H	ATGGATGCAAGACCAAAC	CTATGAGAGGTAGAGCAGCC	58
Bmac090	SSR	1H	ACATCAACCCCTCGCTC	CCGCACATAGTGGTTACATC	58
EBmac405	SSR	1H	ATGTAGCTCGGAATGTGTAGT	CATGTTGGATAAGAGTAGAGGA	55
HVM64	SSR	1H	GATGTGAAGGCTGCCCTG	ACACGCCCTATTACCCAGTG	55
HVM20	SSR	1H	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCCTCTTTAC	55
ABG452	STS	1H	GGAGACATGCGAGAATGGAT	AGCCCAACTTTCTCATGCAC	58
EBmac0623	SSR	2H	CGAACATTGTCGTGTTAGTAA	CTGTATGCATAACCTATGG	58
HVBKASI	SSR	2H	ATTGGCGTGACCGATATTTATGTTCA	CAAAACTGCAGCTAAGCAGGGGAACA	65
EBmac715	SSR	2H	GCGAACATTGTCATGTTAGTA	TGTATGCCAGACCTATG	57
Bmag518	SSR	2H	AATGCCATGATGTTATTGG	AAGAAGATTACATCGAATAGATCA	58
UMB301	SSR	3H	CTTACATGTCTGGAAAACA	GACATGTTGAAGGTGGCTT	58
HVLTTPB	SSR	3H	TGCTGAGACGCTGAGTACGTTG	CAAACCTCACGATTCCTCTCAAAG	55
EBmac705	SSR	3H	GTGAAAACCTGAGTGAAACTC	TTGAGGAGAAGTAATGACGAT	55
Bmac0067	SSR	3H	AACGTACGAGCTCTTTTCTA	ATGCCAACTGCTTGTTTAG	55
HVM27	SSR	3H	GGTCGGTTCGCCGTTAGTG	TCCTGATCCAGAGCCACC	57
EBmac871	SSR	3H	TGCCTCTGTTGTGTTATTGT	CCCCAAGTGAACATTGAC	55
ABG453	STS	3H	GCTATTGACAAGCAATGCC	GGTGACGTAGCACGCACTAA	55
Bmag841	SSR	3H	GGAAAGTACTTCAAACCTGAA	CTTACAAGATGATGAGAACGA	57
Bmag606	SSR	3H	CTATTTGTAATGTATGTATGTTCCC	TCATTGGTCCAGATAATACAA	57
EBmac788	SSR	4H	TAACCTACTTTATCCATGGCA	ATGATGAGAACTCTTCAACC	58
HvMlo3	SSR	4H	CTTCCATGTACCTACAG	CGAACTGGTATTCCAAGG	55
ABG397	STS	4H	TTACAGGGCCAGGTTACTG	TTGTCTTCCCCTTCTGGTG	58
GBM1326	SSR	7H	AGAGCACAACCCCTGGAGG	GTAGAGGCAGCCCTTCTCCT	55
GBM5060	SSR	7H	GTAGAGGCAGCCCTTCTCCT	AGGAGAGTGGAGCAGAGCAC	55
ABG380	STS	7H	AAGCCAAACAACCTAGAAAGG	GCTGTCAACAGGAAGAAACCC	58
EBmac603	SSR	7H	ACCGAAACTAAATGAACTACTCTG	TGCAAACTGGTCTATTAAGGG	55
MWG622	STS	7H	TGCAGCCGTGAAGGTATCG	AACCATCAACGTCTAGCTCCG	58
ABC158	STS	7H	AAAGCTAGGACAAAAATACC	AACAGAGGACAAAGATAACAC	50
Bmag341	SSR	7H	TCATGGAGACCGTTGTAGT	CCACAAGCCTCTGTTCTC	55
Bmag321	SSR	7H	ATTATCTCCTGCAACAACCTA	CTCCGGAACCTACGACAAG	58
Bmac031	SSR	7H	AGAGAAAAGAAAATGTACCA	ATACATCCATGTGAGGGC	58
Bmag507	SSR	7H	CAACTAGCATACCCAAGCTATA	ACCCCTATTTCAATAATGGA	57

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Nivel de resistencia a MB en genotipos de cebada

El nivel de resistencia frente a la infección por *C. sativus* (Tabla 1) tanto a nivel de plántula como de planta adulta fue variable entre los genotipos analizados. El grupo de 15 cultivares y líneas avanzadas locales presentaron bajos niveles de resistencia en ambas situaciones. No se encontraron en este grupo, materiales resistentes en planta adulta, sólo uno (Perún) fue moderadamente resistente y dos (Carumbé e INIA Guaviyú) variaron entre moderadamente resistentes y moderadamente susceptibles (MR-MS). Los restantes se comportaron de forma moderadamente susceptible (MS) o susceptible (S). El porcentaje de severidad se correlacionó en general con la respuesta a la infección (RI) en planta adulta. Las RI en plántula para estos materiales, según la escala de Fetch y Steffenson (1999) variaron entre 4 y 9. Los 13 genotipos con resistencia a MB efectiva en Uruguay presentaron bajos niveles de severidad (menor a 30%) y tipos de reacción en planta adulta de R, MR, MR-MS, mientras que la RI a nivel de plántula no fue superior a 4, excepto para 20IBON#69 y ND21990 (RI=5 y 6-7, respectivamente). BCD47 y Harrington tuvieron una reacción MS y S, respectivamente en planta adulta y RI de 8 y 9 en plántula. ND5883 presentó una RI de 7 en plántula y MS en planta adulta.

2.5.2 Diversidad Alélica

De los 27 SSR seleccionados para el análisis sólo HVM64 fue monomórfico mientras que de los ocho STS seleccionados, seis fueron polimórficos. Los 26 marcadores SSR polimórficos detectaron entre dos y seis alelos por marcador y presentaron valores PIC que variaron entre 0,13 y 0,76. Los seis marcadores STS polimórficos detectaron entre dos y cuatro alelos por marcador y presentaron valores PIC entre 0,21 y 0,76 (tabla 3). En conjunto, los 32 marcadores polimórficos generaron un total de 113 alelos. El promedio de alelos por marcador fue 3,53 y el valor PIC promedio fue 0,5.

2.5.3 Haplotipos cromosómicos

El número de haplotipos por región cromosómica varió entre ocho y 35 de acuerdo a los genotipos gráficos representados en la Figura 2. Las regiones con menor número de haplotipos correspondieron a los intervalos 2H bin 7-8 y 3H bin 1-3 mientras que el mayor número de haplotipos se asoció a los intervalos 1H bin 1-2 y el 7H bin 2-4. En un mismo cromosoma, se observaron diferencias en el número de haplotipos por intervalo. En general, para valores similares de PIC por marcador y por intervalo, el número de haplotipos estuvo asociado positivamente al número de marcadores analizados por intervalo. El número de haplotipos marcadamente menor observado en el intervalo 3H bin 1-3 (8) comparado con 4H bin 10-11 (23), ambos con tres marcadores, se explicaría por el reducido valor de PIC de los marcadores del 3H bin 1-3. Globalmente, un mayor número de haplotipos se asociaron a los intervalos de los cromosomas 7H, 1H y 4H comparado con los intervalos de los cromosomas 2H y 3H.

El análisis de los haplotipos de los genotipos caracterizados como resistentes a nivel local permite distinguir tres patrones (Tabla 4). En los intervalos 1H-6-7, 3H-1-3 y 7H-7, los 13 genotipos resistentes presentaron al menos un alelo en común con el haplotipo de referencia correspondiente. En los intervalos 1H-1-2, 2H-7-8, 4H-10-11 y 7H-2-4, la ausencia de alelos comunes se detectó en 4, 1, 3 y 3 genotipos, respectivamente. Por último, para los intervalos 3H-4-6 y 3H-9-12, la ausencia de coincidencia se observó en 7 y 6 genotipos, respectivamente. Es interesante destacar que el genotipo NDB112, ampliamente considerado como el dador de la resistencia durable presente en Morex (Steffenson *et al.*, 1996) compartió con Morex únicamente siete de 14 alelos. Además, la presencia del haplotipo de Bowman-BC en las seis líneas resistentes de Dakota del Norte, derivadas de Bowman, varió según el intervalo cromosómico considerado. Mientras el haplotipo de la región 3H-1-3 estuvo casi completamente representado, el de la región 4H-10-11 estuvo ausente o muy pobremente representado. Considerando el conjunto de los 32 marcadores correspondientes a las nueve regiones genómicas, el número mayor (18) de alelos en común con haplotipos de referencia correspondió a Tx7934; además, TX7934 mostró la representación máxima de los alelos de Morex siendo similar a la observada en NDB112 (7 de 14). En cambio, la menor representación de los haplotipos de referencia se

observó en 20IBON#69, TR6 y ND17293 con únicamente 9 alelos comunes. Estos genotipos presentan también la más baja representación de los alelos derivados de Morex (hasta 2 de los 14 alelos).

Tabla 3. Diversidad alélica de 35 marcadores moleculares asociados a nueve QTLs de resistencia a MB en cebada. Para cada QTL se indica el genotipo de referencia (dador del alelo resistente).

Intervalo Cromosómico	Marcador	Posición Mapa (cM) ^a	Nº alelos	Frecuencia del alelo mas abundante	tamaño de banda (pb)	PIC	Genotipo de referencia
<i>Rcs-qt1-1H-1-2</i>	<u>ABG059</u>	15.6	4	0.74	210-359	0.37	Calicuchima
	<u>Hor2</u>	15.8	3	0.39	839-1085	0.57	
	GMS021	25.62	5	0.5	156-176	0.62	
	Bmac213	30.81	6	0.29	152-182	0.76	
<i>Rcs-qt1-1H-6-7</i>	Bmac090	63.66	3	0.40	189-221	0.56	Morex
	EBmac405	64.84	2	0.93	127-131	0.13	
	HVM64	65.55	1	1	250	0	
	HVM20	66.25	5	0.50	141-165	0.55	
	ABG452	68.1	1	1	410	0	
<i>Rcs-qt1-2H-7-8</i>	EBmag623	67.01	2	0.67	151-163	0.35	Calicuchima
	HVBKASI	67.01	2	0.61	194-217	0.36	
	EBmac715	67.97	2	0.67	160-166	0.35	
	Bmag518	72.01	4	0.33	155-177	0.69	
<i>Rcs-qt1-3H-1-3</i>	<u>UMB301</u>	1	3	0.66	238-255	0.45	Bowman-BC
	HVLTPPB	20.49	3	0.88	209-219	0.19	
	EBmac705	20.49	2	0.88	158-166	0.19	
<i>Rcs-qt1-3H-4-6</i>	Bmac0067	49.76	5	0.42	112-151	0.62	Morex
	HVM27	51	3	0.48	198-206	0.56	
	EBmac871	57.62	6	0.48	192-218	0.66	
<i>Rcs-qt1-3H-9-12</i>	ABG453	77.33	1	1	1000	0	Morex
	Bmag841	91.21	5	0.61	112-129	0.54	
	Bmag606	101.77	3	0.525	118-156	0.51	
<i>Rcs-qt1-4H-10-11</i>	EBmac788	97.67	6	0.42	144-179	0.66	Bowman-BC
	<u>Hvmlo3</u>	100.2	3	0.55	233-245	0.48	
	ABG397	103.64	2	0.86	126-253	0.21	
<i>Rcs-qt1-7H-2-4</i>	GBM1326	31.24	3	0.50	162-178	0.55	Morex
	GBM5060	31.24	3	0.38	188-206	0.59	
	ABG380	34.78	4	0.33	469-493	0.69	
	EBmac603	35.39	5	0.36	147-191	0.67	
	<u>MWG622</u>	39.98	4	0.38	759-868	0.68	
	ABC158	41.28	3	0.5	750-850	0.55	
<i>Rcs-qt1-7H-7</i>	Bmag341	78.22	3	0.48	217-224	0.53	Harrington
	Bmag321	79.24	3	0.67	215-233	0.44	
	Bmac031	81.75	2	0.66	195-198	0.35	
	Bmag507	84.1	4	0.33	122-160	0.68	

^abasado en el mapa publicado por Varshney *et al.*, (2007) excepto para los marcadores subrayados, para los cuales se estimaron sus posiciones mediante comparación de mapas publicados en GrainGenes 2.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes>).

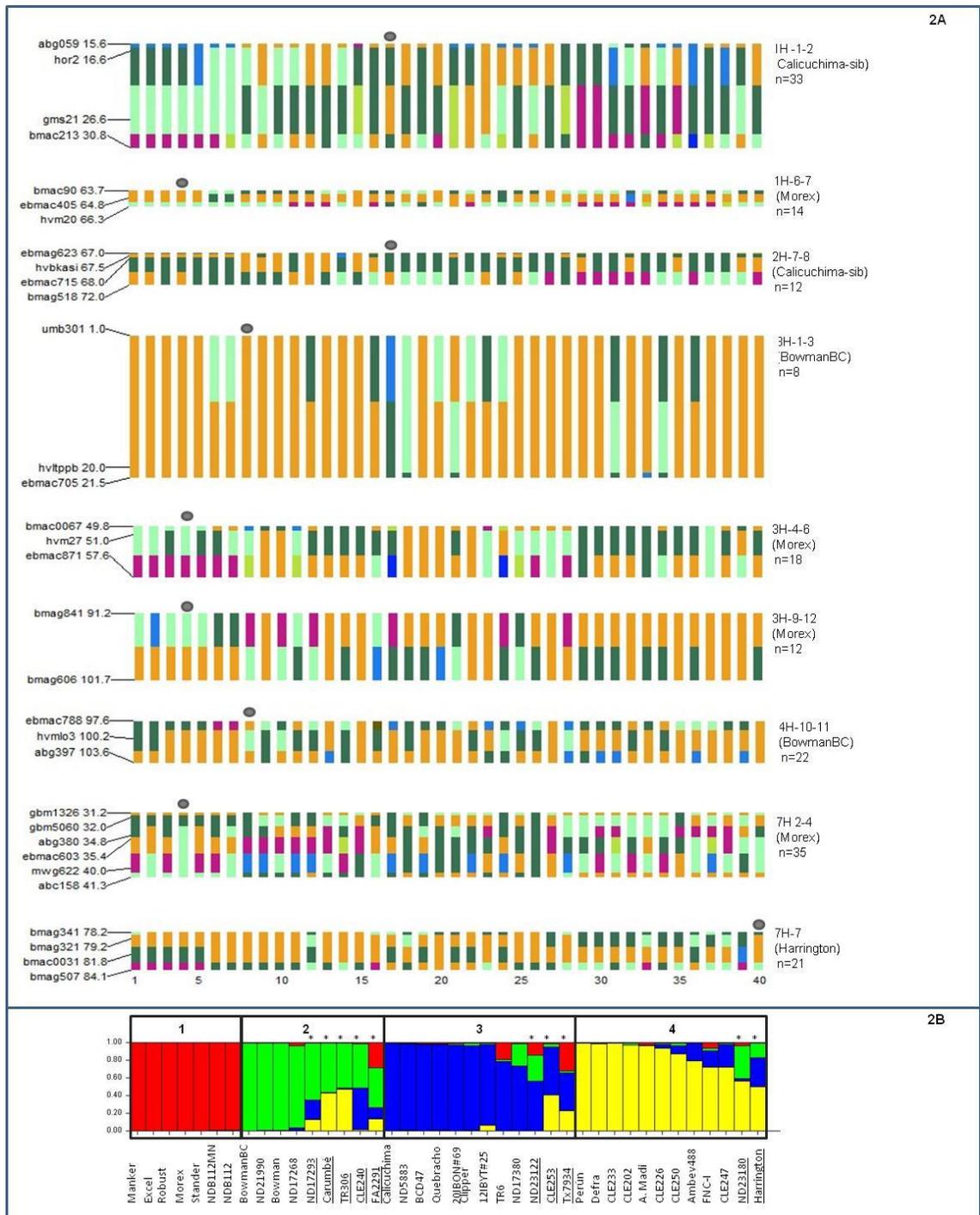


Figura 2. Genotipos gráficos y estructura poblacional de 40 genotipos de cebada, basados en el análisis de 26 SSR y seis STS asociados a nueve QTLs de resistencia a MB. (A) Genotipos gráficos. Segmentos de diferente color indican alelos diferentes. Con un círculo de color gris se indica el haplotipo del cultivar de referencia. La distancia en *cM* es la descrita en la tabla 2 excepto para marcadores que mapeaban en el mismo lugar. En ese caso se utilizó una

distancia máxima de 1.5 cM entre ellos para poder observar los distintos marcadores en la representación. A la derecha de los genotipos gráficos se describe el QTL, el genotipo de referencia y el número de haplotipos (n) (B) Estructura genética poblacional estimada para el valor más probable de subpoblaciones o grupos (k=4). Cada barra representa un genotipo; los segmentos coloreados representan la contribución estimada de cada subpoblación al individuo. Los genotipos que presentan menos del 70% de pertenencia a determinado grupo fueron señalados con un asterisco.

Tabla 4. Número de alelos compartidos entre el genotipo de referencia y los materiales con comportamiento resistente en Uruguay para cada intervalo cromosómico asociado a MB descrito en la Tabla 3

Genotipos con comportamiento resistente en Uruguay	1H-1-2 (Calicuchima) ^a n=4	2H-7-8 (Calicuchima) n=4	3H-1-3 (Bowman-BC) n=3	4H-10-11 (Bowman-BC) n=3	1H-6-7 (Morex) n=3	3H-4-6 (Morex) n=3	3H-9-12 (Morex) n=2	7H-2-4 (Morex) n=6	7H-7 (Harrington) n=4
NDB112	0	2	2	1	1	1	1	4	2
20IBON#69	1	2	1	1	1	0	0	1	2
TR6	0	2	2	1	1	0	0	1	2
Tx7934	2	2	3	1	2	2	1	2	3
12IBYT#25	2	4	2	0	2	1	1	0	4
Bowman	1	0	3	2	2	0	0	2	2
FA2291	2	1	2	1	1	0	1	4	2
ND17268	0	4	3	2	1	1	1	0	2
ND17293	1	1	2	1	1	0	0	1	2
ND17380	1	3	3	1	2	1	0	0	2
ND21990	1	2	3	0	2	0	1	1	2
ND23180	2	1	3	0	2	0	1	2	1
ND23122	0	3	3	1	2	2	0	1	2

^an corresponde al número de marcadores analizados para cada intervalo

2.5.4 Estructura genética de una colección de germoplasma de cebada

Con el objetivo de analizar las relaciones genéticas ente las fuentes de resistencia se caracterizó la estructura genética presente en los 40 genotipos de cebada a nivel de nueve regiones cromosómicas asociadas a resistencia a mancha borrosa. Para ello se siguieron dos tipos de análisis de agrupamientos: uno basado en el modelo bayesiano y otro basada en distancia genética. Mediante el análisis de agrupamiento basado en el modelo bayesiano (ver figura 2B), se identificó que el número de grupos mas probable era cuatro. Los genotipos se distribuyeron en cada grupo según la probabilidad de pertenencia o afiliación a cada grupo. Treinta de los 40 genotipos analizados fueron asignados a un grupo específico (afiliación al grupo mayor a 70%); sin embargo, diez genotipos: FA2291, ND17293, ND23122, ND23180, Tx7934, TR306, Harrington y las líneas elite locales Carumbé, INIA Guaviyú y CLE253 fueron considerados de origen mezclado por ser representativos de más de un grupo (afiliación al grupo menor al 70%). De todas maneras, los grupos formados así como las afiliaciones múltiples en los genotipos ‘mezclados’ son altamente consistentes con el origen geográfico y la genealogía de los

materiales que muchas veces se asocia a cruza entre genotipos de diferentes pools genéticos. El grupo 1 incluyó a las cebadas de seis carreras de Minnesota; en este grupo se ubica el genotipo resistente NDB112 y como era de esperar no hay ningún genotipo elite de Uruguay. El grupo 2 incluyó a las cebadas de dos carreras relacionadas con Bowman desarrolladas en Estados Unidos (Dakota del Norte), y Canadá. En este grupo se incluyeron cinco genotipos con comportamiento MR-MS o MR: las líneas resistentes de ND: Bowman, ND17268, ND17293, ND21990 y el genotipo de dos carreras de origen no identificado FA2291; además, se incluyeron dos cultivares de uso local con nivel MR a MB: Carumbé e INIA Guaviyu (Tabla 1). El grupo 3 incluyó genotipos derivados de al menos cuatro orígenes: i) el programa ICARDA-CIMMYT, ii) Australia (o derivados de genotipos australianos), y de programas de mejoramiento de iii) Dakota del Norte y iv) Texas de Estados Unidos. Del origen ICARDA CIMMYT se incluyeron aquí las líneas resistentes de dos carreras 20IBON#69 y de seis carreras 12IBYT#25; de Estados Unidos las líneas ND17380 y ND23122 y TX7934. Además, el genotipo resistente TR6 de seis carreras se incluyó también en este grupo; globalmente este grupo incluyó a siete fuentes de resistencia efectivas en Uruguay. Además, en el grupo se incluyeron tres genotipos elite en uso en Uruguay (Clipper, Quebracho, CLE253), susceptibles a MB, todos ellos derivados de genotipos de Australia. El grupo 4 integró prevalentemente a genotipos de dos carreras altamente asociados con germoplasma europeo (checo, alemán) pero también presentando afiliaciones significativas al grupo 2 y 3. El único genotipo resistente a MB en este grupo fue ND23180 de Estados Unidos (Dakota del Norte).

En la figura 2A los genotipos se ordenaron de acuerdo al resultado obtenido en el STRUCTURE (2B). Se puede ver que para cada región genómica analizada, en general los materiales que pertenecen a un mismo grupo del STRUCTURE, presentaron haplotipos similares en cada región, como era esperable. El grupo que presenta haplotipos con mayor grado de similitud en todas las regiones (con excepción de la del cromosoma 7H bin 2-4), es el grupo 1, en el que se encuentran todos los materiales de Minnesota emparentados con Morex. En este grupo, todos los materiales tienen casi un 100% de pertenencia a dicho grupo. Es interesante

destacar que significativamente, las variantes alélicas observadas en NDB112 contrastan con la alta uniformidad observada en el resto del grupo.

Mediante un método de agrupamiento Neighbour Joining, el dendrograma representado en la figura 3 permitió identificar claramente cuatro agrupamientos. En general, la integración de estos grupos mostró un alto grado de coincidencia con respecto a los grupos estimados por el programa STRUCTURE (figura 2B) y fueron identificados con los números I al IV. El grupo I, coincidió con el grupo 1 del STRUCTURE que incluyó al genotipo resistente NDB112 y además incluyó a Tx7934. En el grupo II fueron incluidos cinco genotipos resistentes a nivel local (Bowman, ND21990, ND17268, ND23122 y ND17380). Además se integraron dos materiales elite con comportamiento medianamente resistente (CLE240 y Carumbé). En el grupo III se incluyó un genotipo resistente de ICARDA-CYMMIT (20IBON#69) y el resistente TR6. El grupo IV mantuvo la inclusión de la línea resistente ND23180 y también incluyó a las líneas ND17293, FA2291 y 12IBYT#25. En resumen, 9 de las 13 genotipos con comportamiento MR-R en Uruguay fueron asignados consistentemente a los mismos grupos: NDB112, Bowman, ND21990 y ND17268 20IBON#69, TR6, ND17380 y ND23122 y ND23180. En cambio, diferente integración a grupos se observó para los genotipos: ND17293, FA2291, Tx7934, 12IBYT#25 coincidiendo con la afiliación a múltiples grupos detectado por STRUCTURE. El análisis de coordenadas principales (PCoA) (Anexo 2) no presentó diferencias significativas en la distribución de los materiales, con el dendrograma presentado en la figura 3.

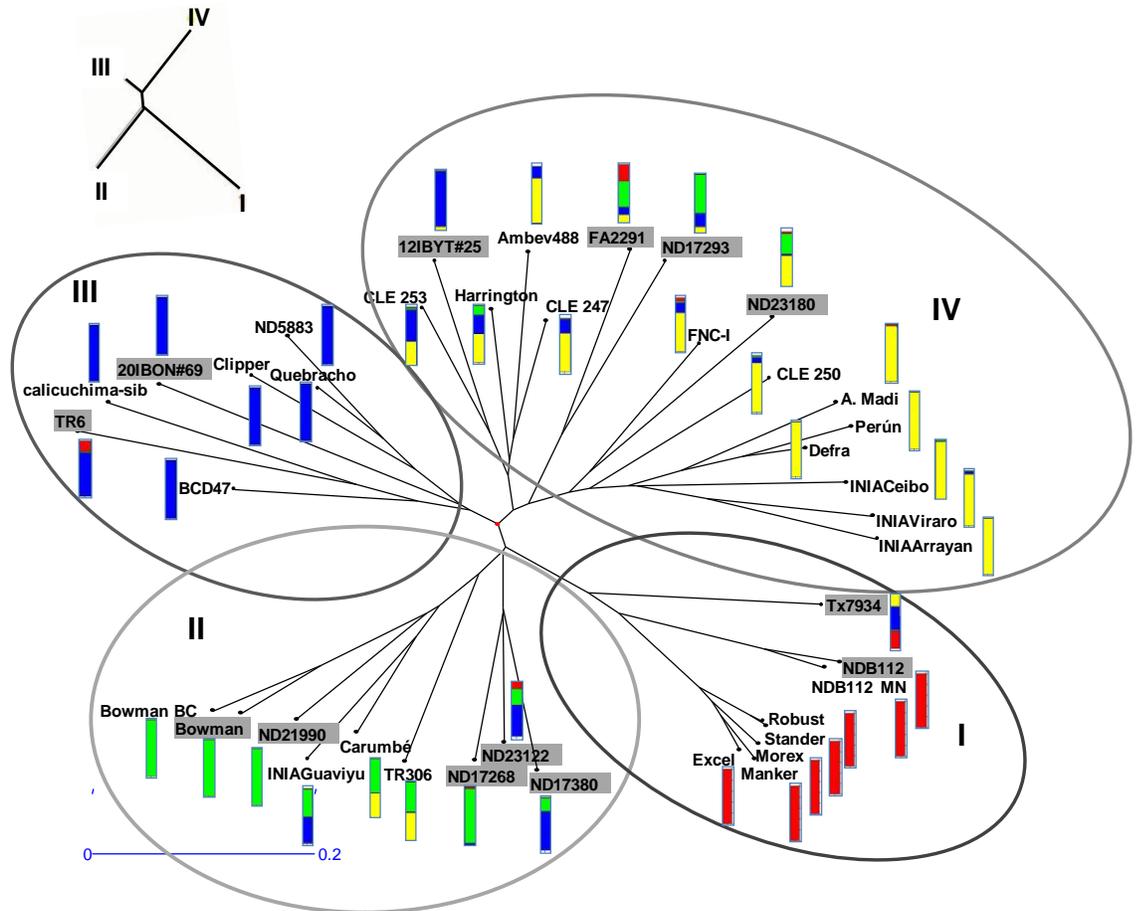


Figura 3. Dendrograma resultante de la matriz de distancia genética basado en el análisis de 32 SSR asociados a nueve QTLs de resistencia a MB, de una colección de 40 genotipos de cebada. El método de agrupamiento utilizado fue "Neighbour Joining" (NJ). En gris se sombreadon los genotipos con comportamiento resistente a nivel local. En el extremo superior izquierdo se muestra el árbol NJ obtenido con el programa STRUCTURE, para el k más probable (k=4) (ver figura 2B). Se englobaron los cuatro grupos de acuerdo a la coincidencia con los grupos 1, 2, 3 y 4 resultantes del programa STRUCTURE.

2.6 DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el comportamiento fenotípico frente a la infección por *C. sativus* de una colección de 40 genotipos de cebada y se caracterizó la diversidad alélica de marcadores asociados a nueve QTLs de resistencia a esta enfermedad como medio de inferir las relaciones genéticas entre estos genotipos. El supuesto principal de este trabajo fue considerar que el análisis de coincidencia/divergencia de los haplotipos cromosómicos asociados a QTLs de resistencia entre genotipos resistentes y genotipos de referencia, puede contribuir a predecir si la base genética de la resistencia disponible está estrechamente relacionada a resistencias previamente caracterizadas, genéticamente o se trata de determinantes genéticos de resistencia novedosas (Liu y Anderson 2003; McCartney *et al.*, 2004).

Para el germoplasma analizado y con los marcadores moleculares seleccionados, dos regiones cromosómicas (2H bin 7-8, 3H bin 1-3) presentaron un número de haplotipos marcadamente menor a otras sugiriendo un mayor grado de uniformidad genética en estas zonas. Dado que la densidad de marcadores por intervalo fue baja, la distribución no fue regular y el valor PIC de los marcadores no fue similarmente alto, trabajos futuros dirigidos a confirmar estos resultados deberán levantar las limitantes señaladas. Alternativamente, estas regiones podrían estar sujetas a fuertes presiones de selección. Regiones cromosómicas con marcada reducción de la diversidad alélica han sido descritas en el brazo corto del cromosoma 3H para un amplio rango de germoplasma de cebada y sería resultante de selección durante la domesticación de la especie (Comadran *et al.*, 2011).

Los 13 genotipos que habían sido identificados como fuentes de resistencia a mancha borrosa efectivas en Uruguay (Tabla 1) provienen de orígenes geográficos diversos e incluyeron nueve genotipos de Estados Unidos derivados de programas de dos y seis carreras de la región de Dakota del Norte, Minnesota y Texas, dos genotipos del Programa ICARDA-CIMMYT, y dos genotipos sin identificación de origen. En particular las seis fuentes de resistencia derivadas del Programa de Dakota del Norte son el resultado de la estrategia de cruzamientos dirigidos a la acumulación de fuentes de resistencia de origen diverso (Franckowiak, 2001). De hecho tres de las seis líneas manifestaron afiliación a múltiples grupos en el gráfico producidos por

STRUCTURE. Otras líneas resistentes que manifestaron afiliación múltiple fueron FA2291 de la cual no conocemos su origen y Tx7934, cultivar desarrollado en Texas con genotipos de Turquía, Japon, Europa y Estados Unidos en su genealogía y en menor medida TR6.

Con el objetivo de estimar el nivel de redundancia de las resistencias presentes en los 13 genotipos resistentes comparados con cuatro genotipos de referencia se cuantificó el número de alelos compartidos en nueve intervalos cromosómicos (Tabla 4). Considerando las relaciones genealógicas entre estos materiales se podía anticipar que los haplotipos de Morex (4) y de Bowman BC (2) podrían estar presentes con mayor probabilidad en las líneas NDB112, Bowman y las seis líneas resistentes de Dakota del Norte. Igualmente, era probable que los haplotipos de Calicuchima-sib (2) estuvieran presentes en 12IBYT#25 por derivar ambos del padre Gloria/Come, dador de resistencia a múltiples enfermedades. El haplotipo de Harrington tendría una mayor probabilidad de estar representado en las líneas Dakota del Norte y Minnesota.

El intervalo 7H 2-4 ha sido asociado a resistencia cuantitativa a MB (plántula y planta adulta) y cualitativa (*Rcs5*) en un número importante de mapas; siendo muy importante la contribución de este *locus* en la expresión de resistencia en germoplasma derivado de cruza de dos carreras x seis carreras (Bilgic *et al.*, 2005). El alto número de marcadores analizados en este intervalo (6) y su alto valor PIC (mayor a 0.5) dan fuerte apoyo a las comparaciones realizadas. El haplotipo de Morex (genotipo de referencia para este intervalo) estaría representado en NDB112 y en FA2291 ya que compartieron 4 de 6 alelos, y parcialmente representado en Tx7934, Bowman y ND23180 con únicamente dos alelos compartidos sugiriendo que es posible o bien que existieron eventos de recombinación recientes en el haplotipo de Morex o bien que se trata de alelos originalmente diferentes. Este haplotipo no estaría representado en los restantes genotipos resistentes.

El intervalo 1H bin 6-7 corresponde al QTL de resistencia durable efectivo en el germoplasma de seis carreras del mediooeste americano. Llamativamente, el genotipo NDB112, dador putativo de dicha resistencia mostró una única coincidencia con el haplotipo de Morex. Si bien el bajo número de marcadores en el intervalo y variable PIC limitan nuestras conclusiones sería interesante verificar con mayor número de marcadores si efectivamente la resistencia de Morex proviene de NDB112. Alternativamente, podría ocurrir que los marcadores en los cuales

Morex y NDB112 no comparten alelos, no estén asociados a la resistencia. Tanto genotipos relacionados (Bowman, Líneas de Dakota del Norte) como no relacionados con Morex presentaron haplotipos parcialmente similares.

El haplotipo 3H 1-3 de Bowman parecería estar relativamente representado en el juego de fuentes de resistencia, con una menor semejanza con 20IBON#69 esperable. Estos resultados sin embargo hay que tomarlos con cautela ya que pueden estar influidos por el bajo nivel de polimorfismo detectado en esta región para todos los genotipos, tanto resistentes como susceptibles. En cambio, para el haplotipo 4H-10-11 los marcadores utilizados presentaron valores PIC más elevados, lo cual es consistente con una mayor dispersión de valores de alelos comunes observados. De las líneas resistentes de Dakota del Norte, ND17268 tiene una mejor representación de éste.

En cuanto al intervalo 1H 1-2, únicamente los genotipos Tx7934, 12IBYT#25, FA2291 y ND23180 presentaron dos alelos comunes con el haplotipo de Calicuchima-sib. Como se mencionó antes, Calicuhima-sib y 12IBYT#25 están genéticamente relacionadas. Es interesante destacar que los alelos comunes en Tx7934, no coincidieron con los de 12IBYT#25 y a su vez estos difieren de los alelos que si comparten FA2291 y ND23180. Probablemente los alelos de Calicuchima-sib en ND23180 deriven de genotipos de ICARDA-CIMMYT presentes en su genealogía. Para el intervalo 2H 7-8 (Calicuchima) se detectaron tres alelos comunes con ND23122 y cuatro (todos) con 12IBYT#25 y ND17268 sugiriendo que posiblemente el alelo de este QTL de Calicuchima o uno similar esté presente en dichos genotipos. Tanto ND17268 y ND23122 tienen a Gloria/Come en su genealogía, genotipo dador de resistencia a múltiples enfermedades.

Los genotipos que portan el menor número de alelos con los genotipos de referencia son 20IBON#69, TR6, ND17293. No conocemos el origen de TR6 aunque sabemos que se asociaría de acuerdo al análisis de agrupamientos con NDB112 y TX7934. Por otra parte, 20IBON#69 derivado del programa ICARDA CIMMYT y ND17293 de Dakota del Norte coinciden en el hecho que ambos han sido resultado de cruzas amplias dirigidas a acumular fuentes de resistencias diversas. Si bien es sugerente que ambas comparten Shyri en su genealogía, dador de

resistencia a múltiples enfermedades, no se ha reportado aún que Shyri sea fuente de resistencia a MB.

Todos los genotipos con comportamiento resistente podrían o bien poseer alelos diferentes de los genes de resistencia en alguna de las nueve regiones analizadas, o bien los QTLs de resistencia de estos materiales podrían estar ubicados en otras regiones del genoma. En principio se esperaría que los genes involucrados en la resistencia a MB se encontraran en la misma ubicación en diferentes genotipos de cebada, ya que el orden de los genes es bastante conservado dentro de una especie. Sin embargo se sabe que existen eventos de translocación que hacen que algunas regiones no se conserven en los cromosomas. Se ha probado que existe variabilidad haplotípica dentro de la especie cebada en la región del *locus Rph7* y otras regiones estudiadas, posiblemente debido a una rápida y reciente divergencia en el genoma de la cebada (Scherrer *et al.*, 2005). Esto podría ser la causa de que genes de resistencia se encuentren en ubicaciones diferentes en líneas diferentes de una misma especie, especialmente por la rápida reorganización que parece ocurrir en las regiones que codifican para este tipo de genes (Leister *et al.*, 1998), si bien la reorganización observada es especialmente debida a variación en el número de copias de un gen o variación en regiones intergénicas dentro de un *locus* (Scherrer *et al.*, 2005, Leister *et al.*, 1998). En la especie silvestre *H. vulgare subsp. spontaneum*, estrechamente emparentada con *H. vulgare subsp. vulgare*, se han encontrado 12 QTLs de resistencia a MB, cinco de ellos localizados en la misma región que otros QTL previamente reportados en poblaciones de cebada domesticada, mientras que el resto se encuentra en nuevas posiciones (Roy *et al.*, 2010).

Los agrupamientos encontrados en base a datos moleculares fueron consistentes con las relaciones genealógicas y el origen geográfico de los genotipos, mostrando independiencia del metodo utilizado. Nueve de los 13 genotipos con resistencia efectiva en Uruguay fueron asignados consistentemente a los mismos grupos tanto en el dendrograma como en el STRUCTURE. Los cuatro genotipos (ND17293, FA2291, TX7934, 12IBYT#25) que tuvieron diferente integración a grupos por los métodos ya mencionados, son materiales cuyo afiliación a múltiples grupos fue detectado por el programa STRUCTURE. Tx7934, por ejemplo se agrupa en el dendrograma con los materiales de Minnesota y con NDB112. Sin embargo en el

STRUCTURE aparece en grupo 3 pero con cierto grado de pertenencia a tres de los grupos resultantes. La información de su pedigrí no permite relacionarlo genéticamente con los materiales de Minnessota. 12IBYT#25 y Calicuchima-sib materiales de ICARDA-CIMMYT, emparentados a través de Gloria/Come, aparecen en el dendrograma en grupos diferentes, mientras que en el STRUCTURE aparecen en el mismo grupo. En el dendrograma 12IBYT#25 se ubica con materiales mayormente de origen europeo. Esto podría explicarse por la presencia de Barberousse en el pedigrí de este material. La afiliación múltiple detectada en ND17293 al grupo 2 del STRUCTURE, asociado a genotipos derivados de Bowman, y al grupo IV del dendrograma, asociados a germoplasma de Republica Checa y Alemania explican el origen de los alelos de adaptación y calidad presentes en este genotipo. Debido a que no se asocia ni con el grupo de ICARDA CIMMYT ni al de NDB112, podría ser considerado como una fuente de resistencia alternativa, con origen aún desconocido. Es llamativo encontrar en el grupo del material Calicuchima-sib materiales de origen australiano como Clipper, Quebracho y ND5883 (que tiene a Clipper en su genealogía). La similitud genética entre estos genotipos no se esperaba debido a que no parecen estar emparentados genéticamente. ND5883 comparte cuatro de los ocho alelos de Calicuchima-sib en las regiones 1H bin 1-2 y 2H bin 7-8, tres de los cuales los comparte en esta última región. El hecho de que compartan varios alelos, y por esta razón aparezcan agrupados en este tipo de análisis podría deberse a una identidad por estado y no por descendencia. De todas maneras, es interesante destacar que ambos genotipos son susceptibles al patotipo 1 y resistentes al patotipo 2 de *C. sativus* (Bilgic *et al.*, 2006, Fetch y Steffenson, 1994).

Si bien el análisis de haplotipos cromosómicos utilizando marcadores moleculares resulta útil para detectar materiales con QTLs de resistencia a enfermedades no redundantes o diversos con respecto a los presentes en los genotipos referencia, este trabajo tuvo como limitantes el bajo número de marcadores utilizados en algunos intervalos, el bajo valor PIC para algunos marcadores y el nivel de resolución medianamente bueno obtenido (4pb) para discriminar alelos. Un mayor número de marcadores por intervalo y mejores niveles de resolución deberían considerarse en futuros trabajos. Aunque se ha reportado que los SSR genómicos y otras secuencias genómicas evolucionan más rápidamente que los genes (Chee *et al.*, 2004), este tipo

de marcadores moleculares continúan siendo una herramienta válida para evaluar la diversidad en regiones asociadas a QTLs de interés. Hay que tener en cuenta que las diferencias alélicas entre genotipos a nivel de SSR asociados a un QTL sugieren pero no confirman que existan diferencias alélicas en los genes de resistencia asociados. Sin embargo, es más probable que genotipos que tengan alelos diferentes en los SSR posean alelos diferentes en los genes de resistencia. Por esta razón, la identificación de genotipos resistentes con alta diversidad alelica en regiones asociadas a resistencia a MB, sugiere la identificación de genotipos portadores de genes de resistencia a MB novedosos.

Una contribución principal de este trabajo fue la identificación de tres genotipos resistentes (TR6, 20IBON#69, ND17293) que no portarían alelos de resistencia derivados de Bowman y Morex. Este resultado es especialmente importante por la reciente vulnerabilidad de NDB112, dador putativo de la resistencia de Morex, frente a nuevos patotipos de *C. sativus* presentes en Estados Unidos y Canadá aunque aún no identificados en Uruguay (Gamba F. com. pers.) siempre que estos materiales resulten efectivamente resistentes a los nuevos patotipos. El análisis de las relaciones alélicas entre las resistencias presentes en TR6, 20IBON#69, ND17293, ND23180, 12IBYT#25, FA2291 y Tx7934 y el mapeo de los determinantes genéticos presentes en los genotipos más diversos parecerían ser una alternativa interesante con respecto a la introgresión de resistencias identificadas en la especie silvestre *H. vulgare* subsp. *spontaneum*.

Este trabajo aporta información sobre las relaciones genéticas de una colección diversa de genotipos de cebada a nivel de *loci* conocidos de resistencia a esta enfermedad. Este trabajo sugiere que las líneas resistentes, genéticamente diversas identificadas serían potencialmente portadoras de genes novedosos de resistencia a MB. Esta información será útil como criterio en la elección de líneas parentales a incluir en programas dirigidos a acumular resistencias diversas en el germoplasma elite y para el diseño de nuevas investigaciones dirigidas a ampliar la comprensión de la base genética de este carácter.

2.7 BIBLIOGRAFÍA

- Albín J. (2008). Caracterización genética y sanitaria de una colección de germoplasma de cebada por resistencia a mancha borrosa. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. UdelaR. 56 p.
- Badea A., Eudes F., Graf R.J., Laroche D.A., Sadasivaiah R.S. (2008). Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and Winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica*. 164: 803-819.
- Bilgic H., Steffenson B.J., Hayes P.M. (2006). Molecular mapping of loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley. *Phytopathology*. 96: 699-705.
- Bilgic H., Steffenson B.J., Hayes P.M. (2005). Comprehensive genetic analyses reveals differential expression of spot blotch resistance in four populations of barley. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1238-1250.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Bovill J., Lehmensiek A., Sutherland M.W., Platz G.J., Franckowiak J., Mace E. (2010). Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations. *Mol. Breed.* 26: 653-666
- Buntjer J.B. (1999). Cross Checker fingerprint analysis software, v. 2.9, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands.
- Castro A.J, Gamba F., Germán S., Gonzalez S., Hayes P.M., Pereyra S., Perez C. (2012). Quantitative trait locus analysis of spot blotch and leaf rust resistance in the BCD47x Baronesse barley mapping population. *Plant Breed.* 131: 258-266.
- Chee P.W., Rong J., Williams-Coplin D., Schulze S.R., Paterson A.H. (2004). EST derived PCR-based markers for functional gene homologues in cotton. *Genome*. 47: 449-462.
- Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Waugh, R. (2009). Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*. 10: 582-590.
- Comadran J., Ramsay L., MacKenzie K., Hayes P., Close T.J., Muehlbauer G., Stein N., Waugh R. (2011). Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium in cultivated barley. *Theor. Appl. Genet.* 122: 523-531.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Fetch T.G. Jr, Steffenson B.J. (1999). Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Dis.* 83:213-217.
- Fetch T.G. Jr, Steffenson B.J. (1994). Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 202-206.
- Franckowiak J. (2001). Accumulating genes for disease resistance in two-rowed barley for North Dakota. In: *Breeding barley in the new millennium: Proceedings of an International Symposium*. Mexico, D.F. CIMMYT pp 39-46.
- Ghazvini H., Tekauz A. (2007). Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Dis.* 91: 814-821.
- Gosman N., Bayles R., Jennings P., Kirby J., Nicholson P. (2007). Evaluation and characterization of resistance to fusarium head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathol.* 56: 264-276.
- Kleinhofs A. (2004). Integrating molecular and morphological/physiological marker maps. *Barley Genet. Newsl.* 34:111-122
- Kumar J., Schäfer P., Hüchelhoven R., Langen G., Baltrusch H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K. (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of a global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant Pathol.* 3:185-195.
- Leister D, Kurth J, Laurie D. (1998). Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 370-375.
- Liu S., Anderson J.A. (2003). Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Sci.* 43:760-766.
- Liu K., Muse S.V. (2005). PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics.* 21: 2128-2129 Available from: <http://www.powermarker.net>
- McCartney C.A., Somers D.J., Fedak G., Cao W. (2004). Haplotype diversity at fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 109: 261-271.

- Ogbonnaya F.C., Imtiaz M., DePauw R.M. (2007). Haplotype diversity of preharvest sprouting QTLs in wheat. *Genome*. 50: 107-118.
- Pereyra S., Díaz M., Germán S., Cabrera K. (2011). Manchas foliares en cebada: reconocimiento, epidemiología y estrategias de manejo. In: Manejo de enfermedades de trigo y cebada. (Eds.) Serie Técnica 189, INIA, Uruguay, pp. 139-157.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Pritchard J.K., Wen W. (2003). Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Rostoks N., Borevitz J.O., Hedley P.E. (2005). Single feature polymorphism discovery in the barley transcriptome. *Genome Biol.* 6: R54.
- Roy J.K., Smith K.P., Muehlbauer G.J., Chao S., Close T.J., Steffenson B.J. (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Mol. Breed.* 26: 243-256.
- Rozen S., Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.
- Scherrer B., Isidore E., Klein P., Kim J., Bellec A., Chalhoub B., Keller B., Feuillet C. (2005). Large intraspecific haplotype variability at the *Rph7* locus results from rapid and recent divergence in the barley genome. *Plant Cell*. 17: 361-374.
- Sreenivasulu N., Graner A., Wobus U. (2008). Barley Genomics: An Overview. *Int. J. Plant Genomics*. 2008: 1-13.
- Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. (1996). Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Phyrenophora teres f. teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 92: 552-558.
- Stein N., Prasad M., Scholz U. (2007). A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* 114: 823-839.
- Tar' an B., Warkentin T., Tullu A., Vandenberg A. (2007). Genetic relationships among Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes based on the SSRs at the quantitative trait loci for resistance to Ascochyta blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 39-51.

- Valjavec-Gratian M., Steffenson B.J. (1997). Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Dis.* 81: 1275-1278.
- Van Berloo R. (1999). GGT: software for the display of graphical genotypes. *Journal Hered.* 90: 328-329.
- Varshney R.K., Marcel T.C., Ramsay L., Russell J., Röder M.S., Stein N., Waugh R., Langridge P., Nix R.E., Graner A. (2007). A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1091-1103.
- Yu J.B., Bai G.H., Cai S.B., Ban T. (2006). Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to *Fusarium* head blight. *Theor. Appl. Genet.* 113: 308-320.
- Yun S.J., Gyenis L., Hayes P.M., Matus I., Smith K.P., Steffenson B.J., Muehlbauer G.J. (2005). Quantitative trait loci for multiple disease resistance in wild barley. *Crop Sci.* 45: 2563-2572.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14: 415-421.
- Zhu C., Gore M., Buckler E.S., Yu J. (2008). Status and prospects of Association Mapping in plants. *Plant Genome.* 1: 5-20.

3. DIVERSIDAD EN LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A *Cochliobolus sativus* EN HOJAS DE CEBADA²

3.1 RESUMEN

Cochliobolus sativus es el agente causal de la mancha borrosa (MB) de la cebada. Esta enfermedad foliar es responsable de importantes pérdidas de producción en varias regiones del mundo, por lo que numerosos esfuerzos se están realizando con la finalidad de desarrollar genotipos de cebada con resistencia durable. Los genotipos que expresan resistencia a nivel macroscópico, genéticamente poco relacionados podrían desplegar mecanismos diversos de defensa a nivel celular (microfenotipos). En este trabajo se estudiaron los mecanismos de defensa desarrollados por 11 genotipos de cebada mediante análisis histoquímico del estrés oxidativo producido en epidermis y mesófilo de tejido foliar inoculado, durante las etapas tempranas de la interacción huésped-patógeno. En todos los genotipos analizados, tanto resistentes como susceptibles, se observaron reacciones de defensa tipo aposiciones de la pared celular (APC) y reacción hipersensible (HR) en etapas pre y post-penetración en células de epidermis y mesófilo, encontrando variación en la proporción de cada una de ellas en los distintos genotipos. Los resultados sugerirían que la formación de APC, si bien podría enlentecer el avance del hongo, no es un mecanismo totalmente efectivo. Al contrario de lo observado para hongos biotrofos, la HR postpenetración parecería indicativa de compatibilidad. El análisis del conjunto de las variables, permitió discriminar entre genotipos resistentes y susceptibles, estando este último grupo asociado a mayores niveles de acumulación de H₂O₂. Este trabajo puso en evidencia la diversidad funcional a nivel de microfenotipos tanto dentro del grupo de resistentes como de susceptibles indicando que probablemente diferentes mecanismos de resistencia y susceptibilidad estarían operativos en el juego de genotipos evaluados.

Palabras clave: *Hordeum vulgare*, microfenotipos, Aposiciones de pared celular (APC), Reacción hipersensible (HR), especies reactivas del oxígeno (ROS)

² Este artículo será publicado en la revista Anales de Biología.

3.2 ABSTRACT

Cochliobolus sativus is the causal agent of spot blotch in barley. This foliar disease is responsible for significant yield losses in several regions of the world and hence, many efforts are being made in order to develop barley genotypes with durable resistance. There is scarce information on whether macroscopic resistance observed at genetically unrelated, genotypes may be explained by diverse defense mechanisms at the cellular level. In this paper, we studied defense mechanisms of 11 barley genotypes by histochemical analysis of oxidative stress in epidermis and mesophyll of infected leaf tissues during early stages of *C. sativus* infection. In all genotypes, defense reactions like cell wall appositions (CWA) and hypersensitive reaction (HR) both pre-and post-penetration were observed, although variation was found in the proportion of each in the different genotypes. Results suggested that although CWA formation might slow fungal development, it is not fully effective. Unlike what has been reported for biotrophic fungi, HR postpenetration response would be indicative of compatibility. Overall, analysis of variables discriminated resistant from susceptible genotypes. Higher levels of both H₂O₂ accumulation was associated with susceptibility. This study evidenced a level of microphenotype functional diversity within both resistant and susceptible genotypes indicating that it is likely that diverse mechanisms of resistance and susceptibility may be present in the set of analyzed genotypes.

Keywords: *Hordeum vulgare*, microphenotype, Cell Wall Appositions (CWA), Hypersensitive Response (HR), Reactive Oxygen Species (ROS)

3.3 INTRODUCCIÓN

Cochliobolus sativus [(Ito & Kuribayashi) Drechs. ex Dastur; anamorfo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker] es un hongo de la clase Ascomycete, capaz de producir mancha borrosa en cereales de importancia económica como el trigo y la cebada. Presenta una amplia distribución mundial, principalmente en regiones cálidas y húmedas, siendo responsable de importantes pérdidas de producción en varios países de Asia y América (Kumar et al. 2002), incluyendo al Uruguay (Pereyra et al. 2005). La sintomatología de esta enfermedad varía según el grado de resistencia del genotipo de cebada, donde los más resistentes presentan lesiones pequeñas de forma redondas a oblongas sin presencia de halo clorótico. A medida que aumenta la compatibilidad huésped-patógeno, las lesiones se vuelven más grandes y ovaladas con presencia de un halo clorótico bien marcado (Fetch & Steffenson, 1999).

En la mayoría de las interacciones planta-patógeno, opera en el huésped el mecanismo de reconocimiento de lo “no propio”, basado en la percepción de moléculas del microorganismo y/o del nivel de integridad celular de la planta. Este principio parece estar operativo en diferentes tipos de resistencia, debido a que mecanismos de transducción de señales similares están activos tanto en la resistencia de huésped no apropiado (especie específica), como en las resistencias de huésped apropiado tanto de tipo raza específica como de la resistencia basal cuantitativa, raza no específica (Huckeloven 2007). Esta última, está activa en plantas compatibles a un determinado patógeno, limitando la severidad de la enfermedad que éste produce. Una vez que el patógeno es reconocido, la planta responde rápidamente mediante la inducción de defensas en el apoplasto que incluyen la inhibición de enzimas microbianas que degradan la pared celular, el reforzamiento de la pared celular (mediante aposiciones de la pared celular) y el “ataque químico” al patógeno mediante agentes antimicrobianos (fitoalexinas, quitinasas, proteasas, defensinas) (revisado por Huckeloven 2007). El estrés oxidativo, en el cual se producen grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) es una de las respuestas celulares más tempranas que siguen al reconocimiento exitoso del patógeno. Una rápida producción de ROS, visualizada por técnicas histoquímicas, es frecuentemente reportada en los sitios de ataque de los hongos (Kumar et al. 2001, Thordal-Christensen et al. 1997) así

como también en interacciones simbióticas (Nanda et al. 2010). Específicamente, el H_2O_2 ha sido involucrado en el reforzamiento de la pared celular, la muerte celular por reacción de hipersensibilidad (HR) y la transducción de señales que llevan a activación de genes de defensa tanto en la célula atacada como en las células adyacentes, debido a que el H_2O_2 es una molécula difusible (revisado por: Shetty et al. 2008, Torres et al. 2006, Tenhaken et al. 1995).

La HR es una reacción de defensa local que incluye cambios bioquímicos y estructurales que culminan en la muerte celular de la célula en contacto con el patógeno, como manera de restringir la entrada del mismo (Levine et al. 1994). La HR ha mostrado ser efectiva como mecanismo de defensa frente al ataque de hongos biotrofos como *Blumeria graminis*, en donde se vio que la HR producida en las células del huésped frena el crecimiento del patógeno (Thordal-Christensen et al. 1997). Por el contrario, los patógenos necrotrofos pueden utilizar células muertas como portales para entrar a la planta y alimentarse del tejido muerto. Para el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*, se ha sugerido que la HR es en realidad disparada por el hongo, facilitando la colonización en las células huésped (Govrin & Levine 2000). Ya que la utilidad de la HR como estrategia de resistencia parece variar, dependiendo del tipo de patosistema, ¿qué ocurrirá en patógenos que tienen una fase inicial biotrófica seguida de una fase necrotrófica?

Cochliobolus sativus ha sido clasificado de acuerdo a su modo de nutrición, como un hongo hemibiotrofo. En una etapa inicial de la infección, las hifas del hongo penetran la cutícula, pared celular y se desarrollan dentro de la célula epidérmica sin alterar la integridad de la membrana citoplasmática. La segunda etapa (necrotrófica) está asociada a la liberación de toxinas y muerte de las células epidérmicas y del mesófilo (Shäfer et al. 2004, Kumar et al. 2002, 2001). Según Kumar et al. (2001), el H_2O_2 podría jugar un rol dual en la interacción cebada-*C. sativus*. La acumulación inicial de H_2O_2 , localizada en paredes de la epidermis representaría cambios bajo control del huésped que restringen la accesibilidad celular del hongo, mientras que, la intensa acumulación de H_2O_2 observada en una segunda etapa en el mesófilo, que parece colapsar, podría ser un indicio de una insuficiente capacidad celular anti-oxidativa por sobrecarga. De esta manera la reacción oxidativa en el mesófilo parece por lo tanto una reacción caótica por pérdida del control celular más que una muerte celular programada y, probablemente

sea provocada por las toxinas del hongo. El rol del H_2O_2 en la muerte celular inducido por toxinas es sustentado por el hallazgo de que los filtrados de cultivo del hongo conteniendo toxinas provocan la acumulación de H_2O_2 en las hojas de cebada, que a continuación se vuelven necróticas (Kumar et al. 2001). En resumen, en las fases iniciales de la interacción, las ROS parecen estar involucradas entonces en el desarrollo de los procesos de defensa, mientras que en etapas más tardías durante la colonización del patógeno, el rol de las ROS es más discutido y podría vincularse a reacciones de compatibilidad planta-patógeno.

Estudiando las reacciones de defensa presentes en el cultivar de cebada Haisa, moderadamente susceptible a *C. sativus* y su mutante albino, supersusceptible *albostrians*, Shäfer et al. (2004) clasificaron las respuestas de defensa en las células epidérmicas como: reacciones pre-penetración incluyendo la formación de aposiciones de la pared celular (APC) y/o la reacción hipersensible (HRpre), que resultaría en la imposibilidad del hongo de penetrar la célula epidérmica; y las reacciones de defensa post-penetración, como la reacción hipersensible post-penetración (HRpost). De acuerdo a estos autores, este último mecanismo impediría la llegada del hongo al mesófilo, luego de haber entrado a la epidermis.

La introducción de cultivares resistentes a los programas de mejoramiento de especies representa una estrategia eficiente y ecológica de control de la enfermedad. Numerosos trabajos en cebada han identificado materiales de origen diverso con niveles aceptables de resistencia a mancha borrosa a nivel internacional (Fetch et al. 2008, Bilgic et al. 2006) y local (Albín 2008, Pereyra & Stewart 1996). Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de resistencia operativos en dichos materiales. Comportamientos de resistencia diferenciales a nivel de plántula y planta adulta han sido observados en algunos de dichos materiales (Albin 2008, Bilgic et al. 2006). Además, reacciones de infección aislamiento-específicas han sido reportadas (Gyawali 2010, Ghazvini & Tekauz 2007, Bilgic et al. 2006, Fetch y Steffenson 1994). La diversidad en los fenotipos de reacción parece indicar que existen mecanismos de resistencia o de susceptibilidad diversos en distintos genotipos de cebada. Sin embargo, pocos estudios han sido publicados sobre los factores celulares y moleculares que contribuyen a la resistencia a *C. sativus* y la posible relación que existe entre la producción de ROS y la resistencia a la enfermedad (Shäfer et al. 2004, Kumar et al. 2001). Menos aún se ha profundizado en la comparación entre

genotipos a nivel de sus respuestas de defensa celulares. Ibeagha et al. (2005) encontraron una mayor frecuencia de APC en genotipos de trigo resistentes a *C. sativus* que en genotipos susceptibles, en estado de plántula, pero no encontraron diferencias significativas en la proporción de HR pre y post penetración. Estos autores propusieron que la frecuencia de APCs y la extensión de colonización de las hifas en el mesófilo serían indicadores del potencial de defensa de cada genotipo huésped.

El objetivo de este trabajo fue comparar los mecanismos de defensa desplegados por once genotipos de cebada con comportamiento variado frente a la infección con *C. sativus*, evaluando mediante histoquímica el patrón espacio-temporal de la respuesta de estrés oxidativo producida en las células de epidermis y mesófilo de tejido foliar, durante las etapas tempranas de infección y registrando el avance de la colonización del patógeno.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material Vegetal y Patógeno

Once genotipos de cebada con niveles variables de resistencia a MB, fueron evaluados incluyendo cinco genotipos de Estados Unidos (Morex, NDB112, Bowman, ND17293 y ND5883), dos genotipos de Europa (Ingrid y Perún), dos de ICARDA-CIMMYT (20IBON#69 y Calicuchimasib), una línea local susceptible (CLE253) y una línea de origen desconocido TR6 (Tabla 1). Macetas con seis plántulas de cada genotipo se colocaron en cámara de crecimiento a 23°C, 70% de humedad relativa y 16 h de fotoperíodo (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

El aislamiento monospórico 04.1.4 de *C. sativus* se obtuvo de una hoja infectada de la variedad de cebada U5293 procedente del Departamento de Colonia, Uruguay, y se incrementó en medio sólido PDA (*potato dextrose agar*) incubado a 23°C con 12 h de fotoperíodo (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), durante 14 días.

3.4.2 Inoculaciones

Para la preparación del inóculo, se raspó el micelio de *C. sativus* desarrollado en placas y se recuperó con agua destilada conteniendo 0.02% de Tween 20. La suspensión obtenida fue

filtrada utilizando dos capas de gasa, para obtener una suspensión de esporas libre de micelio. Para la evaluación de respuesta a la infección, plántulas de 14 días de los 11 genotipos fueron inoculadas mediante aspersión, con una suspensión de 5000 esporas/ml (0.2 ml por plántula), mientras que para el análisis histoquímico (Shäfer et al. 2004), plántulas de 7 días fueron inoculadas con una suspensión de 100.000 esporas/ml. En paralelo, plantas de cada uno de los genotipos se asperjaron con agua destilada (conteniendo 0.02% Tween 20) como control. Seguidamente a la inoculación, cada maceta fue cubierta con una bolsa de nylon ajustada con una banda elástica para asegurar una humedad relativa del 95%. Durante las primeras 24 hdi (horas después de la inoculación) las macetas fueron colocadas en oscuridad y luego retornadas a la cámara de crecimiento.

3.4.3 Análisis de la respuesta a la infección en plántula

La respuesta a la infección (RI) producida por el aislamiento 04.1.4 en los 11 genotipos se evaluó utilizando la escala de 1-9 diseñada por Fetch & Steffenson (1999). Valores RI de 1 a 3 son indicativos de baja compatibilidad, 4-5 son considerados como intermedios, mientras que RIs de 6 a 9 como de alta compatibilidad. Esta evaluación se realizó en la segunda hoja de plántulas de 10 días luego de la inoculación. Se analizaron tres plántulas por cada genotipo.

3.4.4 Detección histoquímica de ROS

Se tomaron muestras de la primera hoja de tres plantas diferentes de cada genotipo a las 8, 24 y 48 hdi (horas después de la inoculación). La detección *in situ* de ROS se llevó a cabo mediante tinción con 3,3-diaminobenzadina (DAB-D-8001; Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo de Thordal-Christensen et al. (1997) con modificaciones. Segmentos de hojas de tres plantas por cada genotipo fueron infiltrados durante 30 minutos con 1 mg/ml de DAB (pH 3.8, HCl). Los segmentos infiltrados fueron seguidamente incubados durante cuatro horas en oscuridad. Posteriormente, las hojas fueron fijadas y decoloradas en TCA (0.15% tricloroacético (peso/vol) en etanol:cloroformo (4:1; vol/vol)) durante 48 h con una reposición. Con la finalidad de observar las estructuras fúngicas, las hojas fijadas fueron tratadas, a continuación, con el colorante

fluorescente Calcofluor (F-6259, Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo de Rohringer et al. (1977). Brevemente, los segmentos de hoja fijados fueron lavados 2 x 15 min con etanol 50%, 2X15 min con 50 mM NaOH y 3 x 10 min con agua destilada. A continuación se colocaron durante 30 min en 0.1 M Tris/HCl (pH 8.5) y durante 5 min en oscuridad en una solución 0.3% de Calcofluor. Posteriormente, los segmentos fueron lavados 4 x 10 min con agua destilada, 1 x 30 min en glicerol 25% y finalmente guardados en glicerol 50%. Por cada genotipo, se analizaron tres segmentos de hoja (un segmento por planta). Utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus VANOX, se contabilizaron 50 sitios de interacción por segmento de hoja (se definió sitio de interacción como el lugar donde una estructura fúngica (hifa y/o apresorio) se encontraba en contacto con alguna célula del huésped produciéndose ROS en alguna región de la célula de la epidermis y/o del mesófilo. Las hifas teñidas con Calcofluor fueron observadas utilizando microscopía de fluorescencia (luz UV filtro de excitación 368 nm, emisión 420 nm) mientras que la tinción de las estructuras celulares DAB positivas de las hojas fueron observadas con microscopía de luz visible. En cada sitio de interacción se registró la presencia/ausencia de: aposiciones de la pared celular (APC), paredes de células epidérmicas (PE), paredes de células del mesófilo (PM), células epidérmicas en reacción hipersensible (HRE), células del mesófilo en reacción hipersensible (HRM) (en ambos casos pre y post penetración de la hifa en la célula epidérmica) que manifestaran acumulación de ROS (tinción DAB+). Además, para medir el avance de la infección, en cada sitio se registró la presencia de hifas con apesorios (pre-penetración), intracelulares en la epidermis e hifas intercelulares en el mesófilo. También se calculó porcentaje de células epidérmicas con hifas intracelulares que expresaban HR. Se realizaron tres experimentos en donde en cada uno de ellos se incluyó al genotipo NDB112 como testigo resistente.

3.4.5 Análisis Estadístico

Para cada una de las variables analizadas se calculó el porcentaje de sitios de interacción que presentaban la variable en cada una de las tres repeticiones, estimando la media ajustada por el efecto experimento. Para las variables donde se contó el número de muestras que

presentaban la característica, se utilizaron modelos lineales generalizados (análisis de devianza) asumiendo distribución binomial de la variable observada en relación al total de observaciones. Para la variable % de células epidérmicas penetradas en HR, se ajustó un modelo lineal general (Anava) validándose el supuesto de normalidad. Para cada variable, la significancia de las diferencias entre los genotipos contra el genotipo NDB112 (utilizado como testigo) fue evaluada mediante el test de Dunnett. Se utilizó el software estadístico SAS versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, 2005). Con el objetivo de caracterizar los materiales genéticos de acuerdo al conjunto de las variables analizadas se realizó un Análisis de Componentes Principales. Los componentes principales se calcularon usando la matriz de correlaciones de las variables estandarizadas. Con la finalidad de visualizar el efecto de cada variable en el patrón de agrupamiento de los genotipos, se construyeron biplots con los dos primeros componentes principales. Para el cálculo de los componentes principales se usó el software R versión 2.12.1. (The R Foundation for Statistical Computing).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Respuesta de infección en plántula

Las RI observadas en plántula variaron entre 3 y 9 (Figura.1, Tabla 1). Reacciones de alta compatibilidad fueron observadas en genotipos provenientes de cuatro orígenes: Perún, ND5883, CLE253, Calicuchima-sib y 20IBON#69, mientras que reacciones de compatibilidad intermedia se observaron en genotipos de probablemente tres orígenes: TR6, Ingrid, Morex y Bowman. Los genotipos con reacciones de baja compatibilidad fueron ND17293 y NDB112 (Tabla 1). Las lecturas RI obtenidas en los genotipos NDB112, Bowman y ND5883, utilizados como genotipos diferenciales por Valjavec-Gratian & Steffenson (1997) asignarían el aislamiento 04.1.4 al patotipo1.

3.5.2 Micro-fenotipos de interacción

Con el objetivo de visualizar y comparar los mecanismos tempranos de defensa entre once genotipos de cebada, se analizaron los microfenotipos de interacción en tejido foliar infectado, mediante la detección histoquímica de ROS y de estructuras fúngicas. A las 8 hdi, se observaron consistentemente esporas germinadas pero rara vez se detectaron apresorios. En este tiempo de observación, se detectaron algunas manchas circulares marrones en la pared celular de la epidermis (Fig 2 A); en baja frecuencia se detectó tinción con DAB en áreas localizadas de la pared de las células epidérmicas (Fig 2B). A las 24 hdi, frecuentemente se observaron apresorios en contacto con las paredes anticlinales de células epidérmicas y en algunos casos en contacto con estomas (figura 2C, 2D y 2E). A las 24 y 48 hdi, la acumulación de ROS fue evidente tanto en las APC (figuras 2C y 2G) y paredes (figura 2C) de células epidérmicas como en paredes del mesófilo (figura 2D). En algunos sitios de interacción, células de la epidermis y/o del mesófilo se tiñeron completamente con DAB, indicativo de reacción HR (figuras 2F y 2G 2K y 2L). Las respuestas HR en epidermis pre (HRE pre, Fig 2F-G) y postpenetración (HRE post, Fig 2H-I) a veces eran acompañadas, en cada caso, de respuestas HR en células de mesofilo (HRM pre, Fig 2K-L y HRM post, Fig 2M). Frecuentemente, en el mismo sitio de interacción se registró la presencia de H₂O₂ en diferentes localizaciones sub-celulares. La colonización del espacio intercelular del mesofilo se observó a las 48 hdi (Fig 2 N-0). Los genotipos analizados no presentaron diferencias en el tipo de respuesta de defensa observado.

Tabla 1. Origen, pedigrí y respuesta a la infección (RI) en plántula de once genotipos de cebada inoculados con el aislamiento monospórico 04.1.4 de *C. sativus* según la escala de Fetch & Steffenson (1999).

MATERIAL	Número de Hileras	ORIGEN	PEDIGRÍ	Respuesta a la infección (RI) en plántula
ND5883	2	EEUU	Clipper/línea experimental Canadá702-10	9
Perún	2	Europa	HE1728/Karat	7
CLE 253	2	Uruguay	Perún/l. Aromo	7
calicuchima-sib	6	ICARDA-CIMMYT	LBIran/UNA8271//Gloria-sib/Comanche-sib	7
20IBON#69	2	ICARDA-CIMMYT	Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen	6
Ingrid	2	Europa	Balder//Binder/Opal	5
Morex	6	EEUU	Cree/Bonanza	5
Bowman	2	EEUU	Klages//Fergus/Nordic/3/ND1156/4/Hector	4
TR6	6	sin información	sin información	4
ND17293	2	EEUU	ND14651/ND15062	3
NDB112	6	EEUU	Reselección de Kindred CI6969/CI7117-17	3

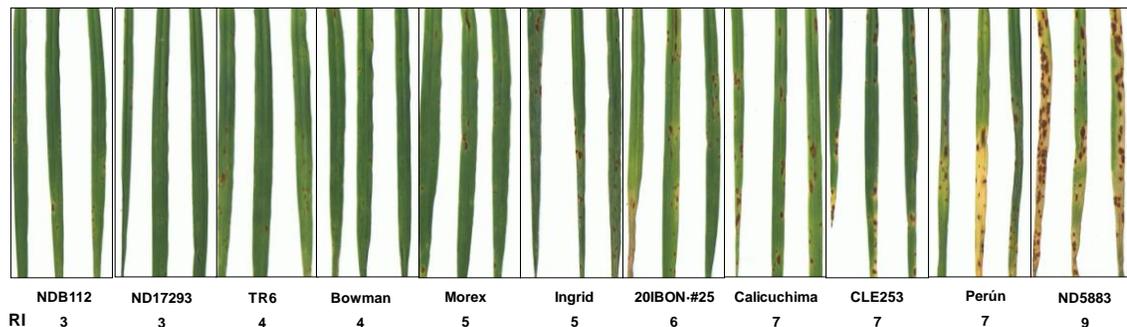


Figura 1. Respuestas a la infección (RIs) observadas en 11 genotipos de cebada inoculados con el aislamiento monospórico 04.1.4 de *C. sativus*. Se utilizó la escala de 1-9 según Fetch & Steffenson (1999).

La evaluación cuantitativa de los microfenotipos expresados a las 24 y 48 hdi en diez genotipos de cebada comparados con NDB112 se realizó calculando la proporción de sitios de interacción que presentaron cada una de las seis variables de respuestas a la infección y las dos variables de avance de la infección (Tabla 2). En términos generales, a las 24 hdi, las respuestas más frecuentemente detectadas fueron la formación de APC y la respuesta HR en células epidérmicas pre-penetradas; en general, las otras cuatro respuestas de defensa se detectaron en una frecuencia mucho menor siendo particularmente baja la frecuencia de respuestas HR en

mesófilo. En cuanto al avance de la infección, se detectaron hifas con desarrollo intracelular en epidermis y más raramente hifas colonizando el espacio intercelular del mesofilo. Para los genotipos con mayores niveles de resistencia (RI menor a 5): Bowman, ND17293 y TR6 no se detectaron diferencias significativas con NDB112 en ninguna de las variables analizadas. Los genotipos de más alta susceptibilidad (RI mayor a 6): Calicuchima-sib, Perun, ND5883 y CLE253 presentaron diferencias significativas para un grupo de variables. Aquellos genotipos con RI 5 o 6: Morex, 20IBON#69 e Ingrid, dieron resultados variables. Mientras que Morex e 20IBON#69 presentaron un patrón de respuesta semejante al grupo de mayor resistencia, Ingrid se comporto para algunas variables de forma similar al grupo más susceptible. Al analizar con mayor detalle el comportamiento de los genotipos del grupo susceptible observamos que a las 24 hdi se distinguen tres patrones de respuestas: el genotipo CLE253 únicamente sobresale por presentar una frecuencia significativamente alta de APC; sin embargo no se distingue por presentar reacción oxidativa o colonización exitosa del hongo. En segundo lugar, el genotipo Calicuchima-sib se distingue por el contrario por una frecuencia significativamente menor de APC asociado a niveles significativamente altos de desarrollo de hifas dentro de las células epidérmicas; al igual que en CLE253, este genotipo tampoco sobresale por su respuesta oxidativa. Por último, el tercer patrón compartido por los genotipos Perun y ND5883 se caracterizó por presentar altos niveles de respuestas HR en células epidérmicas post penetración asociados con abundante colonización intracelular (epidermis).

A las 48 hdi, es evidente que la variable APC y HR en epidermis pre-penetración son detectadas menos frecuentemente que a las 24 hdi mientras que aumentaron notoriamente las frecuencias de las respuestas HR post penetración en epidermis. Además, la colonización de hifas intracelulares (epidermis) e intercelulares en mesofilo es mayor. En este tiempo de observación, los genotipos que expresan altos niveles de resistencia continúan sin manifestar diferencias significativas con NDB112. Morex, con RI=5, se distinguió por presentar frecuencias más altas de respuestas HR en células epidérmicas pre-penetración. En cuanto a los genotipos susceptibles (RI entre 6 y 9), a las 48 hdi se observan dos patrones de respuesta. Uno asociado a los genotipos Calicuchima-sib y 20IBON#69, caracterizado por una alta colonización de hifas en el mesofilo, mientras que no se destacan niveles de reacción oxidativa. El segundo patrón

corresponde al resto de los genotipos susceptibles (ND5883, CLE253, Perún) caracterizado por altos niveles de HR en células epidérmicas post penetración y HR en mesófilo y altos niveles de colonización de la epidermis ampliando ahora también al mesofilo. Mientras que Perun y ND5883 mantendrían a las 48 hdi en términos generales el mismo patrón observado a las 24 hdi, CLE253 comenzaría a manifestar la asociación de HR y masiva colonización de epidermis y mesofilo recién a las 48 hdi.

Globalmente, el grupo de genotipos resistentes no presento diferencias con el genotipo NDB112 en general para ninguna de las variables examinadas. Por su parte, todos los genotipos susceptibles se asociaron con mayores niveles de colonización de epidermis y/o mesófilo, siendo más evidente a las 48 hdi. Sin embargo, se detectó que la colonización puede o no asociarse con niveles significativamente altos de respuestas oxidativa (expresada en células en HR). En particular, las respuestas HR significativas en mesofilo, únicamente se observaron a las 48 hdi y en células subyacentes a células epidérmicas penetradas (HRM post) y coincidiendo con una alta colonización del mesofilo. En cambio, las respuestas HR de células del mesofilo, subyacentes a células epidérmicas pre- penetradas (HRM pre) mantuvieron frecuencias similarmente bajas, entre todos los genotipos.

El análisis multivariado (figura 3) muestra a través de un biplot de que manera cada una de las diferentes variables agrupa o separa los materiales genéticos. En el diagrama, los genotipos más resistentes se ubicaron en un grupo bastante compacto a la centro-derecha (NDB112, Bowman y ND17293) y de forma más dispersa hacia abajo (Morex y TR6). Los genotipos susceptibles CLE253, ND5883 se agruparon entre si a la extrema izquierda mientras que otros como Calicuchima-sib y Perún, presentaron una alta dispersión tanto hacia arriba (Calicuchima-sib), como hacia abajo (20IBON#69 y Perún) del diagrama, estando cada uno de ellos significativamente separado uno de otro. Es notorio que los vectores de la mayoría de las variables asociadas a respuestas oxidativas mas tempranas (24 hdi) y de las variables que describen el crecimiento del hongo a las 48 hdi tanto en epidermis como mesófilo se ubican en la misma orientación, sobre el eje horizontal del diagrama. Niveles crecientes de dichas variables se asocian a los genotipos susceptibles ND5883, CLE253 y Perún. Mientras que NDB112 y ND17293 (ambos con una RI=3) están íntimamente asociados en la Fig. 2, Bowman y TR6,

(ambos con RI=4) están distanciados entre si. Por su parte Morex e Ingrid (ambos con RI=5) están aun más ampliamente distanciados en el biplot. Es interesante destacar que la dispersión del genotipo TR6 del otro grupo de resistentes (NDB112, Bowman y ND17293) estaría explicado por niveles crecientes de las variables asociadas a la respuesta oxidativa, en este caso a las 48 hdi (mas tardía). Estas variables incluyen APC, PE, PM y reacción HR tanto en epidermis como mesófilo para los casos en los cuales las hifas aun no han penetrado las células epidérmicas.

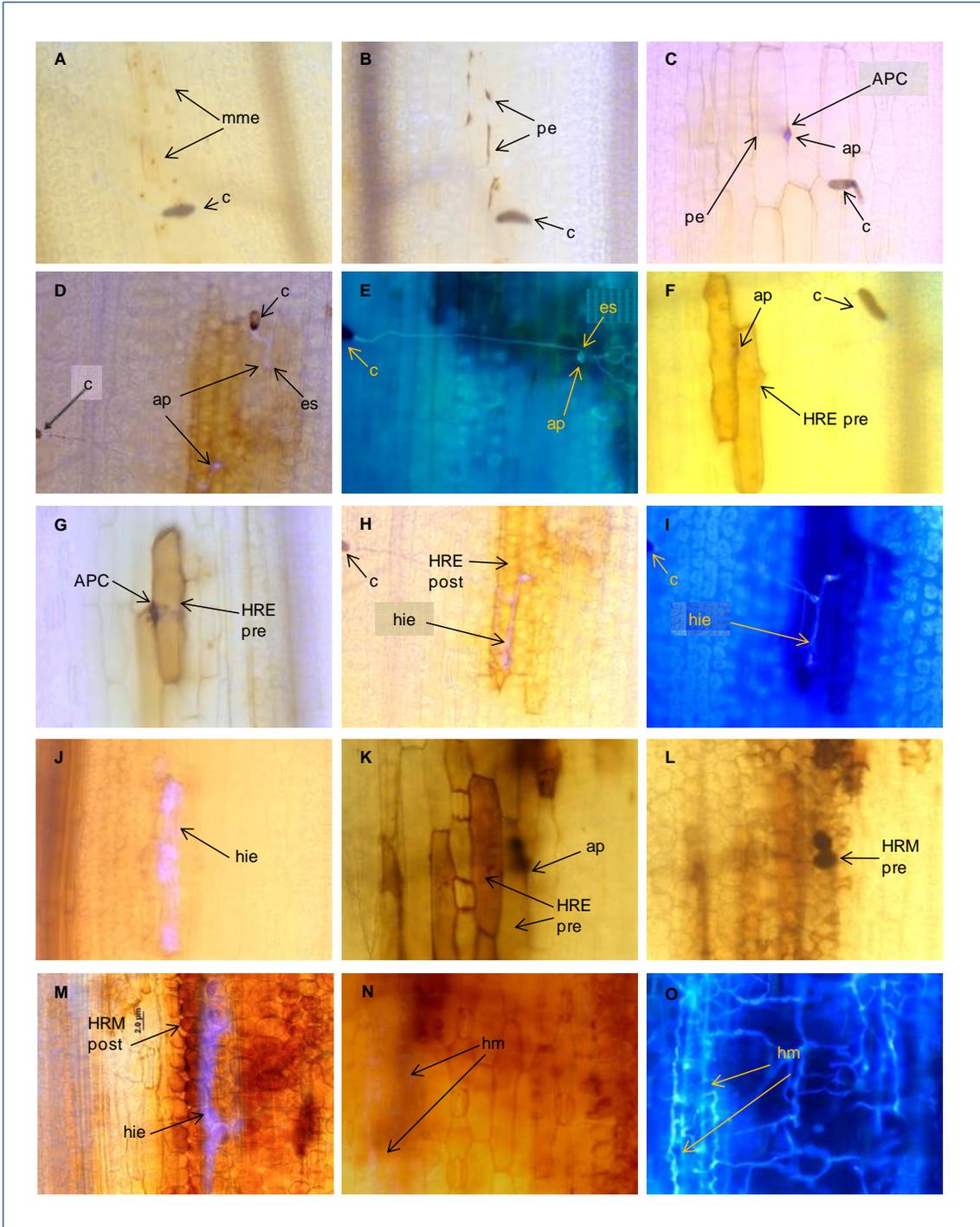


Figura 2. Microfenotipos de interacción de diferentes genotipos de cebada con el aislamiento 04.1.4 de *C. sativus*. Doble tinción con 3,3-diaminobenzidina (DAB) para detección de ROS y con calcofluor para detección de estructuras fúngicas. A las 8 hdi: (A) Manchas marrones en células epidérmicas (mme) en la vecindad de un conidio (c) germinado (fuera de foco). (B) Tinción DAB localizada en paredes de células epidérmicas (pe). A las 24 hdi: (C) formación de APC (estructura marrón) debajo de apresorio (ap) y paredes de células epidérmicas con tinción DAB localizada. (D) apresorios (ap) contactando pared anticlinal de célula epidérmica y estoma (es). (E) hifa penetrando a través del estoma y accediendo al mesófilo (F) apresorio sobre pared anticlinal de células de epidermis que se encuentran en HR (HREpre). (G) células epidérmicas en HR y formación de APC por debajo de apresorio (H) penetración exitosa evidenciada por la presencia de hifa intracelular (hie) surgiendo del apresorio. La célula epidérmica se encuentra en HR (HREpost). (I) misma imagen que en (H) pero bajo luz UV, observándose mejor la hifa intracelular. A las 48 hdi: (J) hifa intracelular (hie) en célula epidérmica que no se encuentra en HR. (K) apresorio (fuera de foco) sobre célula epidérmica en HR (HREpre) y células del mesófilo subyacentes en HR (HRMpre). (L) misma imagen que en (K) pero haciendo foco sobre el mesófilo. (M) hifa intracelular en célula epidérmica (fuera de foco) y mesófilo subyacente en HR (HRMpost). (N) infección exitosa evidenciada por presencia de hifas en el mesófilo (hm). Se observa una tinción DAB generalizada. (O) misma imagen que en (N) pero bajo luz UV, observándose mejor la ramificación de hifas en espacio intercelular del mesófilo. Todos estos microfenotipos fueron observados a las 24 y 48 hdi en todos los genotipos, con la excepción de (O) que fue observado casi exclusivamente a las 48 hdi, y en todos los genotipos. Los genotipos difirieron en el porcentaje de sitios de interacción que presentaban cada uno de los microfenotipos observados.

Tabla 2. Respuestas celulares y avance de la infección observadas en tejidos foliares de 11 genotipos de cebada inoculados con *C. sativus* a las 24 y 48 hdi.

		24 hdi															
Exp.	Genotipo	apositiones en pared celular (APC)		HR epidermis prepenetración		HR epidermis postpenetración		HR mesófilo prepenetración		HR mesófilo postpenetración		Hifas epidermis (intracelulares)		Hifas mesófilo (intercelulares)		% células en HR con hifas intracelulares	
		Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st
3	ND5883	0.513	0.035	0.393	0.058	0.273*	0.041	0.027	0.011	0.007	0.005	0.347	0.042	0.127	0.029	79.33*	7.83
1	PERUN	0.653	0.058	0.413	0.078	0.093*	0.019	0.013	0.010	0.013	0.006	0.107*	0.020	0.000	0.003	88.67	20.25
1	CLE253	0.813*	0.047	0.420	0.078	0.040	0.013	0.027	0.014	0.000	0.004	0.053	0.014	0.007	0.003	91.67	20.25
2	CALICUCHIMA	0.273* ^{ad}	0.048	0.220	0.059	0.107	0.029	0.027	0.013	0.027	0.007	0.280*	0.020	0.000	0.009	38.33	18.45
1	20IBON#69	0.500	0.061	0.293	0.072	0.007	0.005	0.020	0.012	0.013	0.006	0.027	0.010	0.000	0.003	33.33	20.25
2	INGRID	0.407	0.053	0.440	0.071	0.220*	0.040	0.020	0.011	0.013	0.005	0.273*	0.020	0.047	0.013	80.00	18.45
1	MOREX	0.407	0.060	0.233	0.067	0.020	0.009	0.027	0.014	0.000	0.004	0.067	0.016	0.000	0.003	29.00	20.25
3	BOWMAN	0.460	0.052	0.287	0.054	0.213	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.340	0.042	0.067	0.022	69.00	7.83
1	TR6	0.393	0.059	0.307	0.073	0.000	0.000	0.020	0.012	0.000	0.004	0.007	0.005	0.000	0.003	0.00	20.25
2	ND17293	0.440	0.053	0.313	0.066	0.040	0.019	0.020	0.011	0.013	0.005	0.113	0.014	0.013	0.007	33.33	18.45

		48hdi															
Exp.	Genotipo	apositiones en pared celular (APC)		HR epidermis prepenetración		HR epidermis postpenetración		HR mesófilo prepenetración		HR mesófilo postpenetración		Hifas epidermis (intracelulares)		Hifas mesófilo (intercelulares)		% células en HR con hifas intracelulares	
		Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st	Media	error st
3	ND5883	0.120	0.034	0.173	0.069	0.507*	0.048	0.013	0.013	0.113	0.054	0.693	0.071	0.453*	0.091	74.33*	7.53
1	PERUN	0.247	0.049	0.260	0.047	0.400*	0.050	0.100	0.030	0.113	0.032	0.467*	0.071	0.147*	0.025	85.83*	5.62
1	CLE253	0.007	0.009	0.100	0.032	0.467*	0.051	0.020	0.014	0.447*	0.051	0.467*	0.071	0.200*	0.028	71.33*	5.62
2	CALICUCHIMA	0.093	0.026	0.087	0.029	0.307	0.042	0.013	0.010	0.180	0.037	0.633*	0.025	0.360*	0.046	48.66	8.23
1	20IBON#69	0.107	0.035	0.300	0.049	0.133	0.035	0.120	0.032	0.060	0.024	0.287	0.064	0.213*	0.029	43.33	5.62
2	INGRID	0.087	0.025	0.120	0.033	0.393	0.045	0.000	0.000	0.220	0.039	0.620*	0.026	0.440*	0.047	63.67	8.23
1	MOREX	0.273	0.050	0.347*	0.051	0.147	0.036	0.147	0.035	0.020	0.014	0.233	0.060	0.033	0.013	58.67	5.62
3	BOWMAN	0.133	0.036	0.260	0.080	0.373	0.047	0.020	0.016	0.133	0.058	0.493	0.077	0.187	0.071	77.00*	7.53
1	TR6	0.107	0.035	0.240	0.046	0.080	0.028	0.127	0.033	0.040	0.020	0.167	0.053	0.080	0.019	45.33	5.62
2	ND17293	0.127	0.030	0.220	0.042	0.260	0.040	0.053	0.020	0.187	0.037	0.507	0.026	0.213	0.039	52.00	8.23

Los genotipos se ordenaron de igual manera que en la Tabla 1. Los datos corresponden a la proporción estimada de sitios de interacción (lugar donde una estructura fúngica (hifa, apresorio) se encontraba en contacto con alguna célula del huésped produciéndose ROS (DAB+) en alguna región de la célula de la epidermis y/o del mesófilo) que presentaron la variable. Se muestra la media y el error estándar (error st) calculado para cada variable y genotipo. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) cuando se comparó el testigo resistente con cada uno de los restantes genotipos, de acuerdo al test de Dunnett. En todos los casos donde se encontraron diferencias significativas, los valores fueron mayores a los observados en el testigo resistente con la excepción de ^a

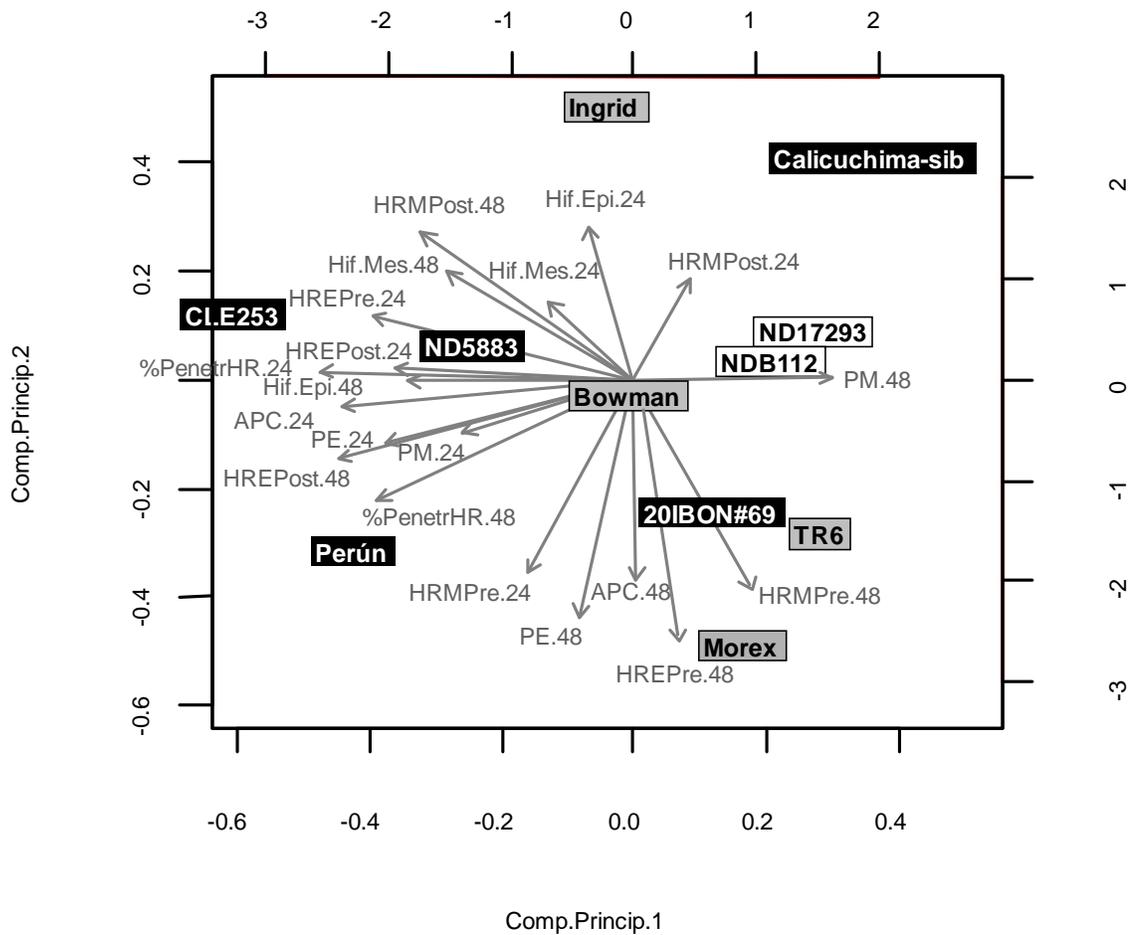


Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCoA), basado en el estudio de 20 variables (de respuesta oxidativa y avance de la infección) seleccionadas para el análisis comparativo de 11 genotipos de cebada. Se construyó un Biplot con los dos primeros componentes del análisis, en el que se muestran tanto las variables analizadas como los genotipos estudiados. El porcentaje de variación explicado por el eje 1 fue de 42% y de 21% para el eje 2. Los genotipos con RI 6-9 fueron representados en recuadros de color negro, los que presentaron RI 4-5, en recuadros grises y los que presentaron RI 1-3 en recuadros blancos. APC: aposiciones de la pared celular; HREpre: HR en epidermis pre-penetración; HREpost: HR en epidermis post-penetración; HRMpre: HR en mesófilo pre-penetración; HRMpost: HR en mesófilo post-penetración; PE: paredes de la epidermis; PM: paredes del mesófilo; Hif.Epi: hifas en la epidermis; Hif Mes: hifas en el mesófilo; %PenetrHR: porcentaje de células epidérmicas penetradas en HR; 24: 24 hdi; 48: 48 hdi.

3.6 DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de las respuestas del huésped cebada frente a la infección del hongo *C. sativus* en genotipos con comportamiento diferencial frente al patógeno. Se seleccionaron genotipos de cebada con comportamiento resistente y susceptible a la enfermedad, que pertenecen a pools genéticos diferentes. Se utilizó una aproximación microscópica que comprende la detección de ROS mediante tinción con DAB y la visualización de las estructuras fúngicas mediante la tinción con el químico fluorescente Calcofluor.

La evaluación a nivel macroscópico de las RI en los materiales seleccionados, permitió detectar materiales resistentes, intermedios y susceptibles (RIs entre 3 y 9). Con los genotipos diferenciales utilizados por Valjavec-Gratian & Steffenson (1997) se determinó que el aislamiento de *C. sativus* utilizado pertenecería al patotipo 1. Para el genotipo Calicuchima-sib se encontró una RI de 7, mostrando que este genotipo es susceptible al aislamiento utilizado. Bilgic *et al.* (2006) encontraron que Calicuchima-sib es susceptible al patotipo 1 y resistente al patotipo 2 por lo que el resultado encontrado en este trabajo parecería reforzar la idea de que el aislamiento 04.1.4 pertenece al patotipo 1, dentro de la clasificación por patotipos de Valjavec-Gratian & Steffenson (1997) para *C. sativus*.

En todos los genotipos estudiados, se encontraron a nivel microscópico las mismas respuestas del huésped frente a la interacción con *C. sativus* reportadas por Schäfer *et al.*, (2004). Sin embargo, en este trabajo y en oposición a lo que sostienen Schäfer *et al.* (2004), no resulta evidente que las reacciones de defensa tempranas (24hdi) ya sea en etapas de pre-penetración tales como la formación de APC y/o la HR así como las HR post sean por si solos eficaces en impedir que el hongo colonice el mesófilo. Estas reacciones de defensa no fueron exclusivas de genotipos resistentes, encontrándose también en los materiales susceptibles, en mayor proporción aún que en el testigo resistente, en algunos casos.

La formación de APC como mecanismo de defensa ha sido estudiada en las interacciones que involucran tanto hongos biotrofos como hemibiotrofos y necrotrofos (Ibeagha *et al.* 2005, Kumar *et al.* 2001, Hüchelhoven *et al.* 1999, Jarosch *et al.* 1999). Se ha postulado que las APC, no solamente frenarían la penetración del hongo, sino también permitirían contener a las células

en HR, al bloquear los plasmodesmas, impidiendo que la muerte celular se propague a células vecinas (An et al. 2006). En la interacción cebada-oidio, la acumulación de ROS detectada *in vivo* con DAB en las APC han sido estrechamente asociada a APC efectivas, (Hückelhoven et al. 1999). En el trabajo presentado aquí, el genotipo Calicuchima-sib, susceptible al aislamiento 04.1.4 presentó un porcentaje de APC a las 24 hdi significativamente menor que el testigo resistente, indicando una relación entre la formación de APC y la resistencia. Sin embargo, el genotipo CLE253, también susceptible al aislamiento de *C. sativus* utilizado, presentó a las 24 hdi un porcentaje de APC significativamente mayor que el testigo resistente NDB112. En todos los genotipos se observó una disminución en el porcentaje de APC a las 48 hdi, con respecto al porcentaje encontrado a las 24 hdi. Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Ibeagha et al. (2005) en trigo, donde el genotipo resistente presentó en los tres tiempos evaluados un mayor porcentaje de APC que el genotipo susceptible. Parecería entonces que este mecanismo de defensa permite enlentecer el avance del patógeno, si bien no es totalmente efectivo. Por esta razón quizás en Calicuchima-sib, que tiene un menor porcentaje de APC a las 24 hdi que el testigo, se observa un mayor porcentaje de hifas intracelulares en la epidermis que NDB112 ya a las 24 hdi, a diferencia de CLE253.

La falla en la formación de una APC efectiva, parecería desencadenar una HR como segunda línea de defensa en la interacción de la cebada con el patógeno biotrofo *B. graminis*, de forma de contener la infección (Vanacker et al. 2000). A diferencia de lo observado para *B. graminis*, investigaciones realizadas con el hongo hemibiotrofo *Magnaportha grisea* mostraron que la HR ocurre usualmente en células en donde la APC no ha podido frenar el crecimiento del hongo, pero demasiado tarde para prevenir la enfermedad (Jarosch et al. 1999). En este caso la HR puede ser considerada una consecuencia de la destrucción celular asociada a la susceptibilidad, más que a la resistencia (Jarosch et al. 1999). Se ha postulado que la HR es un mecanismo eficiente para controlar hongos biotrofos, como en el caso de oídio (Thordal-Christensen et al. 1997) pero no es efectiva en hongos necrotrofos (Govrin & Levine, 2000). Sin embargo, estudios realizados en la interacción del trigo con el hongo biotrofo *Puccinia striiformis f.sp. tritici*, no encontraron asociación entre la inhibición del crecimiento de las hifas del hongo y la muerte celular con acumulación de ROS (Melichar et al. 2008). En la interacción cebada-C.

sativus analizada en este trabajo, al igual que en Ibeagha et al. (2005), no se encontraron diferencias significativas en la HRE pre-penetración entre los genotipos (tanto resistentes como susceptibles) ni a las 24 ni a las 48 hdi, con la excepción del material Morex, a las 48 hdi. Entonces, este mecanismo de defensa pre-penetración parecería basal, compartido por genotipos resistentes o susceptibles. En cambio, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos susceptibles CLE253, Perún, ND5883 y el testigo resistente cuando se evaluó el porcentaje de células epidérmicas en HR post penetración. Esto podría estar indicando que la susceptibilidad está asociada a un mayor porcentaje de HRE post penetración. Hüchelhoven (2007) propone que el rol de la muerte celular asociada a la HR es complejo y podría depender del momento en que aparece la HR. Parecería entonces, de acuerdo a este trabajo, que para un hongo hemibiotrofo como *C. sativus*, la HRE post penetración es un mecanismo que no funciona efectivamente como defensa sino por el contrario, estaría asociado a la susceptibilidad del huésped. Sin embargo, no se puede generalizar la asociación entre susceptibilidad y HREpost, ya que el genotipo Calicuchima-sib, también susceptible a la enfermedad, si bien presentaba un porcentaje mayor de hifas en la epidermis que el testigo, el porcentaje de las mismas que se encontraba en HR no difería de las observadas en el testigo resistente.

Las diferencias encontradas en las variables APC y HREpost entre genotipos susceptibles, con respecto al testigo resistente, permiten afirmar que las estrategias de defensa desplegadas por los materiales susceptibles analizados no son iguales. El análisis univariado en este trabajo, permitió encontrar diferencias entre los genotipos susceptibles con respecto a NDB112 (resistente) pero no entre éste y otros genotipos resistentes. En la interacción *Beta vulgaris-Erysiphe betae*, sin embargo, se observó variación en las estrategias de los materiales resistentes cuando se compararon con el testigo susceptible, por mayores porcentajes de APC o de HR temprana y tardía en genotipos resistentes (Fernandez-Aparicio et al. 2009).

El análisis de componentes principales, teniendo en cuenta todas las variables analizadas, ha permitido separar a los genotipos analizados, en especial los que se comportan de manera más susceptible. El biplot construido a partir de este análisis, muestra que los genotipos más susceptibles se ubican hacia la izquierda, tanto por las variables de respuesta oxidativa tempranas (24 hdi) como por las variables de avance del hongo (48 hdi) con la excepción de

Calicuchima-sib y 20IBON#69. La acumulación de ROS en grandes cantidades ha sido implicada en interacciones compatibles de la cebada con patógenos necrotrofos y hemibiotrofos como *Rhynchosporium secalis* y *Pyrenosphora teres* (Able 2003). Shetty et al. (2007) encontraron que en la interacción del trigo con el hongo hemibiotrofo *Septoria tritici*, la esporulación del hongo coincide con una acumulación masiva del ROS, Sin embargo, su remoción por infiltración con catalasa resultó en un crecimiento incrementado del patógeno, indicando que el patógeno puede tolerar la presencia de ROS, pero su crecimiento es de alguna manera inhibido. En esta misma línea, Kumar et al. (2001) propusieron un rol dual del H₂O₂ en la resistencia de la cebada a *C. sativus*, implicado en una primera etapa en reacciones de defensa y en una segunda etapa, una acumulación excesiva, especialmente en el mesófilo, podría estar involucrado en una patogénesis exitosa. Estos autores proponen que dicha acumulación estaría indicando una pérdida del control celular sobre los procesos oxidativos, probablemente provocada por las toxinas del hongo. El mejor conocimiento de la biosíntesis de estas toxinas, la disponibilidad de secuencias genómicas fúngicas y técnicas de disrupción génicas permitirán el desarrollo de herramientas para estudiar en profundidad el rol de las toxinas en disparar la muerte celular y la enfermedad (Howlett 2006). El desarrollo de estas herramientas sería útil para avanzar en el análisis de nuestro patosistema.

En este trabajo se realizaron los primeros estudios cuantitativos dirigidos a caracterizar los mecanismos subyacentes de resistencia y susceptibilidad en la interacción cebada-*C. sativus*. Las respuestas oxidativas en la epidermis y el avance de la colonización del patógeno en las primeras 48 hdi constituyen parámetros informativos para la caracterización de los mecanismos de resistencia y susceptibilidad. Su inclusión en futuros estudios celulares y moleculares resultaría valiosa para comenzar a revelar las bases moleculares de la resistencia de la cebada a *C. sativus*. A pesar de tener un carácter preliminar, este estudio permitió detectar diversidad en los mecanismos de resistencia y susceptibilidad en genotipos de cebada. Este resultado podría ser de utilidad para la inclusión de genotipos con comportamiento diverso frente a la enfermedad, en programas de mejoramiento.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

- Able A. 2003. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221: 137-143.
- Albín J. 2008. Caracterización genética y sanitaria de una colección de germoplasma de cebada por resistencia a mancha borrosa. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. UdelaR. 56 p.
- An Q, Ehlers K, Kogel K-H, van Bel AJE & Hüchelhoven R. 2006. Multivesicular compartment proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist* 172: 563-576.
- Bilgic H, Steffenson BJ & Hayes PM 2006. Molecular mapping of loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley. *Phytopathology* 96: 699-705.
- Fernández-Aparicio M, Prats E, Emeran AA & Rubiales D. 2009. Characterization of resistance mechanisms to powdery mildew (*Erysiphe betae*) in Beet (*Beta vulgaris*). *Phytopathology* 99: 385-389.
- Fetch TG Jr, Steffenson BJ, Bockelman HE & Wesenberg DM. 2008. Spring barley accessions with dual spot blotch and net spot resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 534-542.
- Fetch TG Jr & Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease* 83:213-217.
- Fetch TG Jr & Steffenson BJ. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 202-206.
- Ghazvini H & Tekauz A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease* 91: 814-821.
- Govrin EM & Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757.

- Gyawali S. 2010. Association mapping of resistance to common root rot and spot blotch in barley, and population genetics of *Cochliobolus sativus*. PhD thesis. North Dakota State University. 194 p.
- Howlett BJ. 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 371-375.
- Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-127.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C & Kogel K-H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the Powdery Mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251-1260.
- Ibeagha AE, Hückelhoven R, Schäfer P, Singh DP & Kogel K-H. 2005. Model wheat genotypes as tools to uncover effective defense mechanisms against the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 95: 528-532.
- Jarosch B, Kogel K-H & Schaffrath U. 1999. The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 508-514.
- Kumar J, Schäfer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschan H, Stein E, Nagarajan S & Kogel KH. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of a global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3: 185-195.
- Kumar J, Hückelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S & Kogel KH. 2001. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Phytopathology* 91: 127-133.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R & Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Melichar JPE, Berry S, Newell C, MacCormack R & Boyd LA. 2008. QTL identification and microphenotype characterization of the developmentally regulated yellow rust resistance in the UK cultivar Guardian. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 391-399.

- Nanda AK, Andrio E, Marino D & Dunand C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 195-204.
- Pereyra S, Diaz M & Stewart S. 2005. Manual de identificación de enfermedades en cereales de invierno. *Boletín de Divulgación INIA, Uruguay*. 61: 50.
- Pereyra S & Stewart S. 1996. Screening for disease resistance in Uruguay. *Barley Newsletter* 40: 45-47.
- Rohringer R, Kim WK, Samborski DJ & Howes NK. 1977. Calcofluor: a potical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67: 808-810.
- SAS Institute Inc. 2005. SAS lenguaje: Versión 9.2. SAS Institute, Cary, NC.
- Schweizer P & Stein N. 2011. Large-Scale Data Integration Reveals Colocalization of Gene Functional Groups with Meta-QTL for Multiple Disease Resistance in Barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1492-1501.
- Shäfer P, Hüchelhoven R & Kogel K-H. 2004. The white barley mutant *albostrians* show a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 366-373.
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB & Shetty HS. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 267-280.
- Shetty NP, Mchrabi R, Lütken H, Haldrup A, Kema GHJ, Collinge DB & Jørgensen HJL. 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* in wheat. *New Phytologist* 174: 637-647.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA & Lamb C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4158-4163.

- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y & Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194.
- Torres MA, Jones JDG & Dangi JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141: 373-378.
- Valjavec-Gratian M & Steffenson BJ. 1997. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Disease* 81: 1275-1278.
- Vanacker H, Carver TLW & Foyer CH. 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* 123: 1289-1300.

4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES

Las enfermedades producidas por microorganismos causan pérdidas económicas serias en la mayoría de los cultivos, al reducir el rendimiento y calidad de los mismos. Una de las estrategias utilizadas para proteger a los cultivos de la infección por diferentes patógenos es la resistencia genética. Cuando se encuentran disponibles variedades resistentes, y la resistencia resulta durable esta es aún considerada la aproximación más efectiva y el método de control preferido para evitar las pérdidas en la agricultura producidas por factores bióticos.

La mancha borrosa, es una importante enfermedad foliar que afecta a los cultivos de cebada. Esta enfermedad, producida por el hongo *Cochliobolus sativus*, provoca pérdidas significativas en producción y calidad de grano y malta en varias regiones del planeta, especialmente en regiones subtropicales. En Uruguay se han detectado reducciones del rendimiento que han llegado hasta el 30% en años en que las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad (Pereyra *et al.*, 2011). Las variedades comerciales disponibles en nuestro país no han mostrado un buen comportamiento a mancha borrosa (Castro *et al.*, 2011), por lo que desde 1992, en INIA La Estanzuela anualmente se instalan ensayos de evaluación con la finalidad de detectar materiales con comportamiento resistente a la enfermedad. En estas evaluaciones se han incluido materiales provenientes de EEUU, como NDB112 y Bowman, que han mostrado un comportamiento resistente en dicho país (Fetch y Steffenson, 1994). La resistencia de NDB112 ha resultado efectiva por cuatro décadas, sin embargo la de Bowman no ha sido tan durable (Steffenson *et al.*, 1996). La detección en Canadá, de aislamientos de *C. sativus*, virulentos para NDB112 (Ghazvini y Tekauz, 2007) ha puesto de manifiesto la necesidad de encontrar nuevas fuentes de resistencia, no relacionadas con los genotipos Bowman y NDB112 (Bovill *et al.*, 2010). Si bien en Uruguay los programas de evaluación mencionados han detectado materiales promisorios con resistencia en estado de plántula o planta adulta y pertenecientes a orígenes diversos (Pereyra y Stewart, 1996; Albín, 2008), la evaluación fenotípica no permite saber si las fuentes de resistencia seleccionadas presentan determinantes genéticos de resistencia diferentes o redundantes.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue identificar genotipos con comportamiento resistente a MB con genes de resistencia posiblemente diversos. El primer abordaje utilizado para cumplir con este objetivo fue el análisis y comparación de los haplotipos cromosómicos presentes, en el germoplasma estudiado, en nueve regiones reportadas en la literatura por la presencia de QTLs de resistencia a MB mediante marcadores moleculares (SSR y STS). La segunda estrategia utilizada fue el análisis histoquímico del estrés oxidativo producido en las células del huésped cebada, durante las etapas tempranas de la interacción huésped-patógeno. Para esto fueron estudiados once genotipos de los analizados por haplotipos cromosómicos para comparar sus mecanismos de defensa a nivel celular. Estos materiales fueron seleccionados por pertenecer a diferentes grupos en el análisis global de las relaciones genéticas.

4.1 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS CROMOSÓMICOS

El análisis de haplotipos cromosómicos en las nueve regiones analizadas permitió observar una variación en el número de haplotipos en los diferentes intervalos. Se observaron regiones más conservadas como la región 3H-1-3 del cromosoma 3H y menos conservadas como en las regiones 1H-1-2, 7H-2-4 y 4H-10-11. La mayor variabilidad en estas últimas regiones podría deberse a dos motivos diferentes: 1) el fenómeno de la recombinación es más frecuente en el genoma de la especie cebada en las regiones que se observaron como más variables; o 2) la observación de mayor variabilidad en determinadas regiones fue debida a la elección de marcadores y genotipos en tales regiones.

Drader *et al.* (2009) encontraron un alto porcentaje de recombinación en el intervalo 7H-2-5. Esta región incluye al *locus Rcs5*, además de *loci* asociados a 24 características agronómicas importantes incluyendo genes análogos (u homologos) a genes de resistencia R de tipo NBS-LRR. El tipo de genes presentes en estas regiones podrían estar explicando la mayor variabilidad. Leister *et al.* (1998) han detectado en cebada una gran diversidad intraespecífica en genes R tipo NBS-LRR basada esencialmente en variantes de número de copias. En la región 1H-1-2 se encuentra el *locus* de resistencia a MB *Rcs6* (Bilgic *et al.*, 2006) y en la región del cromosoma 4H se encuentra el gen *Mlo*, cuyo producto proteico ha sido asociado con múltiples

reacciones de defensa (Buschges *et al.*, 1997). Si bien en todas las regiones genómicas estudiadas en este trabajo se encuentran genes y QTLs de resistencia a varias enfermedades (mancha borrosa, mancha en red, septoriosis, escaldadura, y oídio), globalmente la densidad de este tipo de *loci* es mayor en las regiones 1H-1-2 y 7H-2-4 (ver figura 3 de Yun *et al.*, 2005). Estas dos zonas, y la 4H-11-12 han sido incluidas dentro de los ocho “hot spots” para la resistencia a varias enfermedades (Schweizer y Stein, 2011). En la región 3H bin 1-3 (poco variable en este trabajo), se localiza el *locus Rph7*, (resistencia a roya de la hoja) (BinMap 2005, Graingenes 2.0). Brunner *et al.* (2003) encontraron una alta densidad de genes en un fragmento de ADN que incluía dicho *locus*, encontrando sin embargo una frecuencia de recombinación más baja en la región del *locus Rph7* que la presente en zonas proximales a éste. Estudios posteriores, analizando 41 líneas de cebada, mostraron que la variabilidad de haplotipos observada en dicho *locus* se restringe a regiones intergénicas (Scherrer *et al.*, 2005). Por lo tanto para determinar si realmente se trata de una región menos variable, el intervalo 3H-1-3 debería estudiarse con un mayor número de marcadores moleculares.

Varios autores ((Badea *et al.*, 2008, Tar an *et al.*, 2007, Gosman *et al.*, 2007; Ogonnaya *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2006, McCartney *et al.*, 2004, Liu y Anderson, 2003) han sugerido el supuesto de que si un genotipo de cebada posee el mismo patrón de alelos (haplotipo) en los marcadores asociados al QTL de resistencia que el genotipo de referencia para ese QTL, entonces posiblemente ambos materiales posean el mismo QTL de resistencia. Sin embargo, esto solamente se aplicaría de forma sólida para el caso de genotipos vinculados genealógicamente. Por ejemplo, el genotipo 12IBYT#25 que compartió con Calicuchima seis de ocho alelos, y NDB112 que compartió con Morex siete de los 14 alelos (en particular aquellos localizados en el intervalo 7H-2-4) serían casos de genotipos relacionados que podrían tener cierto nivel de redundancia en la resistencia presente en Calicuchima y Morex, respectivamente. Sin embargo, este razonamiento no es necesariamente aplicable si no se conoce si la identidad de los alelos es por compartir una misma ascendencia o genealogía o simplemente por estado. Por esta razón es importante tener una buena información sobre la genealogía de los genotipos a analizar. En este trabajo se encontraron pocos genotipos con los mismos haplotipos que los genotipos de referencia. Sin embargo, en la región 3H-1-3, varios genotipos presentaron el

mismo haplotipo que Bowman-BC, y no todos estaban relacionados genéticamente con el mismo. Esta región es poco variable en el conjunto de materiales por lo que debería saturarse con más marcadores moleculares, como se mencionó con anterioridad.

Tanto el análisis de diversidad de haplotipos cromosómicos de cada región por separado, como el del conjunto de las nueve regiones estudiadas, detectó varios materiales pobremente relacionados genéticamente con los genotipos Morex y Bowman, así como con NDB112. Este trabajo sugiere que las líneas TR6, 20IBON#69, ND17293, ND23180, 12IBYT#25, FA2291 y Tx7934 podrían ser portadoras de determinantes genéticos de resistencia a MB diferentes con respecto a los previamente reportados. La base genética de la resistencia en estos materiales podría explicarse por variantes alélicas nuevas en los genes o QTLs de resistencia a MB, ya reportados o, alternativamente, por genes o QTLs localizados en otras regiones genómicas. Estas alternativas podrían estudiarse mediante estudios de mapeo para comprobar si los QTLs de resistencia a MB de estos genotipos se encuentran localizados en regiones ya reportadas, o se encuentran en nuevas regiones cromosómicas.

De manera complementaria, se podría analizar el grado de co-localización entre los QTLs de resistencia a MB y los loci de genes involucrados en reacciones de defensa. Recientemente se han conectado QTLs de resistencia a oídio con genes candidatos en la resistencia basal (Aghnoum *et al.*, 2010). En algunos genotipos de cebada, los loci *Rcs5*, *Rcs6* y el gen *Mlo* colocalizan con QTLs de resistencia a MB. De estos tres loci, únicamente *Mlo* ha sido secuenciado. Sería interesante estudiar la diversidad alélica del gen *Mlo* y de los genes presentes en los loci *Rcs5* y *Rcs6* entre los diferentes genotipos resistentes. Si bien los marcadores funcionales (derivados de secuencias caracterizadas funcionalmente) serían superiores a los marcadores de ADN al azar (RFLPs, AFLPs y SSR) porque nos permiten ver polimorfismo dentro de la secuencia del propio gen, el desarrollo de éstos es aún limitado ya que se conoce la función de aproximadamente un 10 % de los genes vegetales. (Andersen y Lübberstedt, 2003).

4.2 ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO EN LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED

El segundo objetivo del trabajo fue analizar a nivel celular el patrón de respuestas tempranas de infección a *C. sativus* descritas por Schäfer et al (2004) en genotipos resistentes y susceptibles, diversos genéticamente. Mediante evaluación histoquímica de la acumulación de ROS se registro la frecuencia de las respuestas APC, HR pre y postpenetración. Simultáneamente se registró el del progreso de infección. El análisis histoquímico realizado no permitió detectar una combinación de variables (de respuesta oxidativa y de avance del hongo) exclusiva de genotipos resistentes o de genotipos susceptibles. Asimismo, los niveles mas altos en las frecuencias observadas para cada una de las variables de respuestas celulares analizadas no se asociaron con mayores niveles de resistencia. Se puede afirmar que para los genotipos estudiados, la formación de APC no es exclusiva de genotipos resistentes ya que se observó también en genotipos susceptibles. Niveles contrastantes de frecuencia de APC fueron encontrados entre los genotipos susceptibles indicando que existiría diversidad en este mecanismo de defensa en dichos genotipos.

Considerando las respuestas observadas en epidermis, el mecanismo de defensa HRpre-penetración, parecería ser basal, no adjudicándose únicamente a genotipos resistentes o susceptibles. Por otro lado, para varios genotipos susceptibles analizados la frecuencia de HRpost-penetración fue significativamente más alta que el testigo resistente NDB112, por lo que esta variable parecería estar asociada a la susceptibilidad. Sin embargo, no podemos generalizar la asociación entre susceptibilidad y HRpost ya que genotipos susceptibles como Calicuchima-sib no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo resistente NDB112, indicando otro aspecto de diversidad de respuestas entre los genotipos susceptibles.

En células del mesófilo el comportamiento fue similar en todos los genotipos en las etapas tempranas de la interacción (24 hdi). Sin embargo, a las 48 hdi, CLE253 presentó un mayor porcentaje de HRMpost que el testigo resistente a las 48 hdi. Si bien este genotipo presentó además diferencias significativas en el porcentaje de hifas en el mesófilo a las 48 hdi con respecto a NDB112, otros genotipos susceptibles como 20IBON#69, Perún, Calicuchima-sib, Ingrid y ND5883 también presentaron mayor porcentaje de hifas en el mesófilo que el testigo pero

no una mayor acumulación de H₂O₂ en el mesófilo, por lo menos hasta las 48 hdi por lo que la variable HRMpost estaría asociada a la susceptibilidad de CLE253 pero no a la de otros genotipos susceptibles. Por otro lado se observó, como era esperable, que los genotipos que presentaron lecturas de RI de 6 a 9, manifestaron los niveles más altos de frecuencias de presencia de hifas en el mesófilo. La excepción fue Ingrid, con un RI de 5, que mostró un mayor porcentaje de esta variable que el testigo. En este genotipo se observó un comportamiento más susceptible en primera hoja que en segunda hoja, en la cual se realizaron las observaciones para las RI.

A diferencia del análisis univariado, que no permitió encontrar diferencias entre los genotipos resistentes pero sí entre los susceptibles, el análisis multivariado permitió separar a los genotipos resistentes Morex, TR6 y medianamente susceptible 20IBON#69 del grupo de resistentes NDB112, Bowman y ND17293. En este análisis, las diferencias entre estos grupos estarían explicadas por niveles crecientes de las variables asociadas a la respuesta oxidativa a las 48 hdi (más tardía): APC y reacción HR tanto en epidermis como mesófilo para los casos en los cuales las hifas aun no han penetrado las células epidérmicas.

El análisis de expresión de genes relacionados con el metabolismo de las ROS y con la regulación de la muerte celular podría ser útil para caracterizar a nivel molecular el comportamiento diferencial de cebada frente al ataque de *C. sativus* (Shäfer *et al.*, 2004, Hückelhoven *et al.*, 2001). Estudios recientes han mostrado patrones de expresión similares de genes sub y sobre representados en la resistencia “huésped apropiado” y “huésped no apropiado”, sugiriendo que tanto la resistencia “huésped no apropiado” como la resistencia basal están relacionadas funcionalmente, existiendo probablemente una regulación más compleja en la resistencia “huésped no apropiado” (Zellerhoff *et al.*, 2010). En el estudio que se presenta aquí, si bien se han observado diferencias entre los genotipos estudiados, en la representación de cada una de las distintas variables, no se encontraron mecanismos de defensa exclusivos de genotipos resistentes. Diferentes células o conjunto de células se comportan de diferente manera, dentro de la misma hoja de un genotipo, por lo que posiblemente la expresión de genes es diferente en esas células. Se ha probado la existencia de un patrón diferencial de expresión de genes en células epidérmicas individuales con comportamiento diferente frente al patógeno *B.*

graminis (Gjetting *et al.*, 2004). Las reacciones diferentes observadas en una misma hoja podrían deberse a que durante la interacción huésped-patógeno las señales liberadas por ambos parecen variar de un sitio de interacción a otro, llevando en algunos casos al avance del patógeno mientras que en otros, la célula huésped logra desplegar sus mecanismos de defensa en forma rápida y eficiente. Además de esto, diferencias espaciales y temporales en la expresión de genes relacionados con la defensa podrían estar ocurriendo en estas células. ¿Que hace que algunos genotipos sean más eficientes en sus mecanismos de defensa? De acuerdo a los resultados aquí presentados, la eficiencia diferencial de los genotipos de cebada en sus mecanismos de defensa parecería estar relacionado a la existencia de diferencias cuantitativas, más que cualitativas entre los mismos, que los hacen resistentes o susceptibles a *C. sativus*.

4.3 DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL EN GENOTIPOS DE CEBADA RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A MB

Este trabajo permitió identificar genotipos de cebada potencialmente diversos genéticamente, cuando se analizaron con marcadores moleculares, en regiones cromosómicas asociadas a la resistencia a MB. De los cuarenta materiales analizados por haplotipos cromosómicos, se propone que siete de ellos (TR6, 20IBON#69, ND17293, ND23180, 12IBYT#25, FA2291, Tx7934) podrían ser estudiados en mayor profundidad como posibles portadores de resistencia a MB, diversa con respecto a la aportada por los genotipos Bowman y NDB112. Tres de estos materiales (TR6, 20IBON#69, ND17293) fueron seleccionados para el análisis funcional utilizando una aproximación histoquímica para detectar la acumulación de H₂O₂ en células en contacto con *C.sativus*. Se eligieron además los genotipos NDB112, Bowman y ND5883 utilizados como diferenciales para detectar patotipos del patógeno (Fetch y Steffenson, 1994). Se incluyó un material susceptible en condiciones locales como CLE253 y uno moderadamente resistente en planta adulta, como Perún. Calicuchima-sib, no evaluado en Uruguay, también fue incluido, así como Ingrid, por ser un material utilizado en otro trabajo (Kumar *et al.*, 2001) para estudios histoquímicos.

Debido a que los genotipos TR6, 20IBON#69, ND17293, presentaron el menor número de alelos en común con Morex, y Bowman, en las regiones en donde éstos son los genotipos de

referencia, se esperaba que los mecanismos de resistencia de estos tres genotipos fueran diferentes a los presentes en Morex, NDB112 y Bowman. Sin embargo, el análisis multivariado detectó diferencias solamente para los genotipos TR6 y 20IBON#69 mientras que inesperadamente ND17293, tuvo un comportamiento similar a NDB112 y Bowman. Aunque ND17293 tiene a Bowman en su pedigrí (se ha sugerido que este genotipo sería un dador indirecto de la resistencia a NDB112), es posible también que haya acumulado resistencias de otras fuentes de orígenes muy diversos (Shyri, Gloria/Copal) y por lo tanto su apariencia como de origen mezclado (afiliado a diferentes grupos) en el análisis de estructura de la población era esperable. Es por esta razón que la alta similitud funcional de la resistencia observada entre ND17293 y Bowman y NDB112 no fue anticipada.

CLE253, si bien tiene a Perú en su genealogía, se comporta de manera más susceptible a campo que este último. En plántula, con el aislamiento 04.1.4, ambos tuvieron un RI de 7, si bien su respuesta oxidativa no fue igual en ambos genotipos. TR6, de pedigrí desconocido, tuvo un comportamiento resistente tanto en plántula como en planta adulta en nuestras condiciones, por lo que debería ser tenido en cuenta para futuros estudios y para los programas de mejoramiento. 20IBON#69, si bien es medianamente susceptible en plántula, tiene un buen comportamiento en planta adulta, por lo que también debería ser tenido en cuenta. Calicuchimasib y ND5883, no tuvieron un comportamiento semejante a nivel de respuesta oxidativa. En el análisis global de los 32 marcadores moleculares estos genotipos aparecían como muy similares genéticamente, aunque por genealogía esto no era esperable ya que no están emparentados. Es importante destacar que estos genotipos resultaron susceptibles a un aislamiento posiblemente del patotipo1, por lo que deberían evaluarse frente a un aislamiento perteneciente al patotipo 2, frente al que nuestra hipótesis es que se comporten de manera resistente (Bilgic *et al.*, 2006, Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997). Estos genotipos, si bien no se comportan de forma resistente en nuestras condiciones, deberían tenerse en cuenta en el caso de comprobarse a nivel local, la existencia del patotipo 2 de *C. sativus*. Los genotipos ND23180, 12IBYT#25, FA2291, Tx7934, posiblemente diversos genéticamente, podrían agregarse a los estudios de diversidad funcional, tanto mediante estudios histoquímicos como de expresión de genes de defensa.

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Able A. 2003. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma*, 221(2):137-143.
- Aghnoum R, Marcel TC, Johrde A, Pecchioni N, Schweizer P, Niks RE. 2010. Basal host resistance of barley to powdery mildew: connecting quantitative trait loci and candidate genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1): 91 - 102.
- Albín J. 2008. Caracterización genética y sanitaria de una colección de germoplasma de cebada por resistencia a mancha borrosa. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. UdelaR. 56 p.
- An Q, Ehlers K, Kogel K-H, van Bel AJE, Hüchelhoven R. 2006. Multivesicular compartment proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist*, 172(3): 563 - 576.
- Andersen JR, Lübberstedt T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 8(11): 554 - 560.
- Arny DC. 1951. Inheritance of resistance to spot blotch in barley seedlings. *Phytopathology*, 41(1): 691 - 698.
- Badea A, Eudes F, Graf RJ, Laroche DA, Sadasivaiah RS. 2008. Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and Winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica*, 164(3): 803 - 819.
- Bilgic H, Steffenson BJ, Hayes PM. 2006. Molecular mapping of loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley. *Phytopathology*, 96(7): 699 - 705.
- Bilgic H, Steffenson BJ, Hayes PM. 2005. Comprehensive genetic analyses reveals differential expression of spot blotch resistance in four populations of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7): 1238 - 1250.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1367 - 1376.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 32(1): 314 - 331.
- Bovill J, Lehmensiek A, Sutherland MW, Platz GJ, Franckowiak J, Mace E. 2010. Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations. *Molecular Breeding*, 26(4): 653 - 666.
- Briquet M, Vilret D, Goblet P, Mesa M, Eloy MC. 1998. Plant cell membranes as biochemical targets of the phytotoxin helminthosporol. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes*, 30(3): 285 - 295.
- Brunner S, Keller B, Feuillet C. 2003. A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcollinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics*, 164: 673 - 683.
- Buntjer JB. 1999. Cross Checker fingerprint analysis software, v. 2.9, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands.
- Büsches R, Holtricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P. 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88(5): 695 - 705.
- Castro AJ, Gamba F, Germán S, Gonzalez S, Hayes PM, Pereyra S, Perez C. 2012. Quantitative trait locus analysis of spot blotch and leaf rust resistance in the BCD47x Baronesse barley mapping population. *Plant Breeding*, 131(2): 258 - 266.
- Castro M, Germán S, Pereyra S, Vázquez D. 2011. Resultados experimentales de evaluación de cultivares de cebada período 2008-2009-2010. En: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigos, cebadas y colza de los 3 últimos años. Período 2008-2009-2010. Resultados experimentales n°11. Inase INIA Uruguay. 129 p.
- Chee P W, Rong J, Williams-Coplin D, Schulze SR, Paterson AH. 2004. EST derived PCR-based markers for functional gene homologues in cotton. *Genome*, 47(3): 449 - 462.
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L, Waugh, R. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*, 10: 582. doi:10.1186/1471-2164-10-582
- Comadran J, Ramsay L, MacKenzie K, Hayes P, Close TJ, Muehlbauer G, Stein N, Waugh R. 2011. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium in cultivated barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(3): 523 - 531.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13 - 15.
- Drader T, Johnson K, Brueggeman R, Kudrna D, Kleinhofs A. 2009. Genetic and physical mapping of a high recombination region on chromosome 7H(1) in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(4): 811 - 820.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611 - 2620.
- Fernández-Aparicio M, Prats E, Emeran AA, Rubiales D. 2009. Characterization of resistance mechanisms to powdery mildew (*Erysiphe betae*) in Beet (*Beta vulgaris*). *Phytopathology*, 99(4): 385 - 389.
- Fetch TG Jr, Steffenson BJ, Bockelman HE, Wesenberg DM. 2008. Spring barley accessions with dual spot blotch and net spot resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(4): 534 - 542.
- Fetch TG, SteVenson BJ, Nevo E. 2003. Diversity and sources of multiple disease resistance in *Hordeum spontaneum*. *Plant Disease*, 87: 1439 - 1448.
- Fetch TG Jr, Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease*, 83(3): 213 - 217.
- Fetch TG Jr, Steffenson BJ. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(3): 202 - 206.
- Forster BP, Russel JR, Ellis RP, Handley LL, Hackett CA, Nevo E, Waugh R, Gordon DC, Keith R, Powell W. 1997. Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley: a strategy using maps, markers and the wild species. *New Phytologist*, 137(1): 141 - 147.
- Franckowiak J. 2008. Resumen preliminar de temas tratados en el encuentro Spot Blotch Workshop En: The 10th International Barley Genetics Symposium. Ceccarelli, S. and Grando, S. (Eds). Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium, 5-10 April 2008, Alexandria, Egypt. ICARDA, PO Box 5466, Aleppo, Syria. pp. 794.
- Franckowiak J. 2001. Accumulating genes for disease resistance in two-rowed barley for North Dakota. En: Breeding barley in the new millennium: Proceedings of an International Symposium. Mexico, D.F.-CIMMYT pp 39 - 46.

- Friesen TL, Faris JD, Solomon PS, Oliver RP. 2008. Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*, 10(7): 1421 - 1428.
- Gardiner J, Coe EH, Melia-Hancock S, Hoisington D, Chao S. 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. *Genetics*, 134(1): 917 - 930.
- Ghazvini H, Tekauz A. 2008. Host-Pathogen interactions among barley genotypes and *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Plant Disease*, 92(2): 225 - 233
- Ghazvini H, Tekauz A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease*, 91(7): 814 - 821.
- Gilchrist-Saavedra LG, Fuentes-Dávila C, Martínez-Cano RM, López-Atilano E, Duveiller RP, Singh M, Henry EI, García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F. CIMMYT. 68 p.
- Gjetting T, Carver TLW, Skøt L, Lyngkjær MF. 2004. Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(7): 729 - 738.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1): 205 - 227.
- Gosman N, Bayles R, Jennings P, Kirby J, Nicholson P. 2007. Evaluation and characterization of resistance to fusarium head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 56(2): 264 - 276.
- Govrin EM, Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13): 751 - 757.
- Griffiee F. 1925. Correlated inheritance of botanical characters in barley and manner of reaction to *Heminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 30(1): 915 - 935.
- Gyawali S. 2010. Association mapping of resistance to common root rot and spot blotch in barley, and population genetics of *Cochliobolus sativus*. PhD thesis. North Dakota State University. 194 p.
- Howlett BJ. 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4): 371 - 375.

- Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1): 101 - 127.
- Hückelhoven R, Dechert C, Trujillo M, Kogel K-H. 2001. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*, 47(6): 739 - 748.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K-H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the Powdery Mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology*, 119(4): 1251 - 1260.
- Ibeagha AE, Hückelhoven R, Schäfer P, Singh DP, Kogel K-H. 2005. Model wheat genotypes as tools to uncover effective defense mechanisms against the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, 95(5): 528 - 532.
- Jarosch B, Collins NC, Zellerhoff N, Schaffrath U. 2005. RAR1, ROR1 and the actin cytoskeleton contribute to basal resistance to *Magnaporthe grisea* in barley. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 18(5): 397 - 404.
- Jarosch B, Kogel K-H, Schaffrath U. 1999. The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(6): 508 - 514.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323 - 329.
- Karakousis A, Gustafson JP, Chalmers KJ, Barr AR, Langridge P. 2003. A consensus map of barley integrating SSR, RFLP, and AFLP markers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(11): 1173 - 1185.
- Kleinhofs A. 2004. Integrating molecular and morphological/physiological marker maps. *Barley Genetics Newsletter*. 34(1):111-122
- Knight N, Platz G, Lehmensiek A, Sutherland MW. 2010. An investigation of genetic variation among Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* from different cereal tissues and comparison of their ability to cause spot blotch on barley. *Australasian Plant Pathology*, 39(3): 1-16

- Kobayashi I, Kobayashi Y, Yamaoka N, Kunoh H. 1992. Recognition of a pathogen and a non-pathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts. *Canadian Journal of Botany*, 70(9): 1815 - 1823.
- Kumar J, Schäfer P, Hüchelhoven R, Langen G, Baltruschanr H, Stein E, Nagarajan S, Kogel K. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of a global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3(4): 185 - 195.
- Kumar J, Hüchelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel K-H. 2001. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Phytopathology*, 91(2): 127 - 133.
- Kutcher HR, Bailey KL, Rossnagel BG, Lefte WG. 1996 Identification of RAPD markers for common rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. *Genome*, 39(1): 206 - 215.
- Langridge P, Karakousis A, Collins N, Kretschmer J, Manning S. 1995. A consensus linkage map of barley. *Molecular Breeding*, 1(4): 389 - 395.
- Leister D, Kurth J, Laurie D. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1): 370 - 375.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4): 583 - 593.
- Liu G, Sheng X, Greenshields DL, Ogieglo A, Kaminskyj S, Selvaraj G, Wei Y. 2005. Profiling of Wheat Class III Peroxidase Genes Derived from Powdery Mildew-Attacked Epidermis Reveals Distinct Sequence-Associated Expression Patterns. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7): 730 - 741.
- Liu K, Muse SV. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9): 2128 – 2129. Available from: <http://www.powermarker.net>
- Liu S, Anderson JA. 2003. Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Science*, 43(3): 760 - 766.

- McCartney CA, Somers DJ, Fedak G, Cao W. 2004. Haplotype diversity at fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2): 261 - 271.
- Melichar JPE, Berry S, Newell C, MacCormack R, Boyd LA. 2008. QTL identification and microphenotype characterization of the developmentally regulated yellow rust resistance in the UK cultivar Guardian. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(3): 391 - 399.
- Miklis M, Consonni C, Bhat RA, Lipka V, Schulze-Lefert P, Panstruga R. 2007. Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiology*, 144(2): 1132 - 1143.
- Millett BP, Xiong Y, Dahl SK, Steffenson BJ, Muehlbauer GJ. 2009. Wild barley accumulates distinct sets of transcripts in response to pathogens of different trophic lifestyles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1): 91 - 98.
- MGAP-DIEA. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias 2010. Anuario Estadístico Agropecuario. Uruguay. p 49. Disponible en www.mgap.gub.uy/diea
- Mur LAJ, Carver TLW, Prats E. 2006. NO way to live, the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 57(3): 489 - 505.
- Mysore KS, Ryu CM. 2004. Non-host resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2): 97 - 104.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Dunand C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2): 195 - 204.
- Nutter EW, Pederson VD, Foster AE. 1985. Effect of inoculations with *Cochliobolus sativus* at specific growth stages on grain yield and quality of malting barley. *Crop Science*, 25(6): 933 - 938.
- Ogbonnaya FC, Imtiaz M, DePauw RM. 2007. Haplotype diversity of preharvest sprouting QTLs in wheat. *Genome*, 50(2): 107 - 118.
- Oliver RP, Ipcho SV. 2004. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5(4): 347 - 352.
- Pereyra S, Díaz M, Germán S, Cabrera K. 2011. Manchas foliares en cebada: reconocimiento, epidemiología y estrategias de manejo. En: Manejo de enfermedades de trigo y cebada. (Eds.) Serie Técnica 189, INIA, Uruguay. pp 139-157.

- Pereyra S, Germán S, Stewart S, Castro M, Díaz J. 2007. Aportes de la investigación para el manejo de manchas foliares y fusariosis de la espiga en cebada. En: Reunión de investigación en cebada cervecera. "100 Años de la Facultad de Agronomía". Mayo, 2007. Paysandú, Uruguay. Edición en CD.
- Pereyra S, Díaz M, Stewart S. 2005. Manual de identificación de enfermedades en cereales de invierno. INIA, Uruguay. Boletín de Divulgación 61(2):50.
- Pereyra S, Stewart S. 1996. Screening for disease resistance in Uruguay. *Barley Newsletter*, 40(1): 45 - 47.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Pritchard JK, Wen W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945 - 959.
- Qi X, Stam P, Lindhout P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 39(2): 379 - 394.
- Röhringer R, Kim WK, Samborski DJ, Howes NK. 1977. Calcofluor: a potical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology*, 67(1): 808 - 810.
- Rostoks N, Borevitz JO, Hedley PE. 2005. Single feature polymorphism discovery in the barley transcriptome. *Genome Biology*, 6(6): R54.
- Roy JK, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chao S, Close TJ, Steffenson BJ. 2010. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding*, 26(2): 243 - 256.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- SAS Institute Inc. 2005. SAS lenguaje: Versión 9.2. SAS Institute, Cary, NC.
- Scherrer B, Isidore E, Klein P, Kim J, Bellec A, Chalhoub B, Keller B, Feuillet C. 2005. Large intraspecific haplotype variability at the *Rph7* locus results from rapid and recent divergence in the barley genome. *Plant Cell*, 17(2): 361 - 374.

- Schweizer P, Stein N. 2011. Large-Scale Data Integration Reveals Colocalization of Gene Functional Groups with Meta-QTL for Multiple Disease Resistance in Barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(12): 1492-1501.
- Shäfer P, Hückelhoven R, Kogel, K-H. 2004. The white barley mutant *albostrians* show a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4): 366 - 373.
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3): 267 - 280.
- Shetty NP, Mchrabi R, Lütken H, Haldrup A, Kema GHJ, Collinge DB, Jørgensen HJL. 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* in wheat. *New Phytologist*, 174(3): 637 - 647.
- Søgaard B, Von Wettstein-Knowles P. 1987. Barley: Genes and chromosomes. *Carlsberg Research Communications*, 52(2): 123 - 196.
- Sreenivasulu N, Graner A, Wobus U. 2008. Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics*, 2008(1): 1 - 13.
- Steffenson BJ, Hayes PM, Kleinhofs A. 1996. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Phyrenophora teres f. teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(5): 552 - 558.
- Stein N, Prasad M, Scholz U. 2007. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(5): 823 - 839.
- Stewart S, Pereyra S, Diaz M. 2005. Manchas foliares en trigo y cebada bajo siembra directa: conceptos y estrategias de control. Documento on line 36. INIA, Uruguay (www.inia.org.uy).
- Tar' an B, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A. 2007. Genetic relationships among Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes based on the SSRs at the quantitative trait loci for resistance to Ascochyta blight. *European Journal of Plant Pathology*, 119(1): 39 - 51.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10): 4158 - 4163.

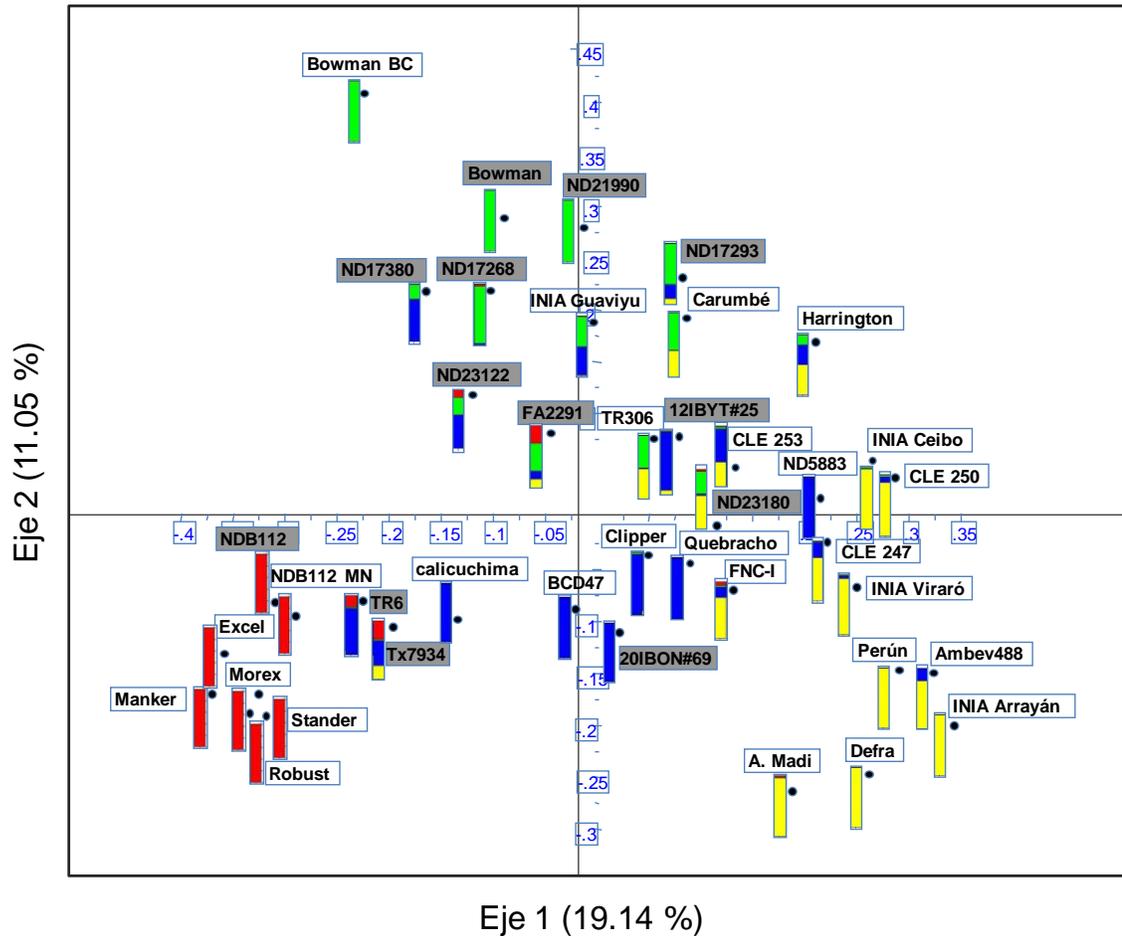
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6): 1187 - 1194.
- Torres MA Jones JDG, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141(2): 373 - 378.
- Valjavec-Gratian M, Steffenson BJ. 1997. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Disease*, 81(11): 1275 - 1278.
- Van Berloo R. 1999. GGT: software for the display of graphical genotypes. *The Journal of Heredity*, 90(2): 328 - 329.
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH. 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, 123(4): 1289 - 1300.
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Rusell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Nix RE, Graner A. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(6): 1091 - 1103.
- Wilcoxson RD, Rasmusson DC, Miles MR. 1990. Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance. *Plant Disease*, 74(3): 207 - 210.
- Yu JB, Bai GH, Cai SB, Ban T. 2006. Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(2): 308 - 320.
- Yun SJ, Gyenis L, Hayes PM, Matus I, Smith KP, Steffenson BJ, Muehlbauer GJ. 2005. Quantitative trait loci for multiple disease resistance in wild barley. *Crop Science*, 45(6): 2563 - 2572.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6): 415 - 421.
- Zellerhoff N, Himmerbach A, Dong W, Bieri S, Schaffrath U, Schweizer P. 2010. Non-host resistance of barley to different fungal pathogens is associated with largely distinct quantitative transcriptional responses. *Plant Physiology*, 152(4): 2053 - 2066.

Zhong S, Steffenson BJ. 2002. Identification and characterization of DNA markers associated with a locus conferring virulence on barley in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6): 1049 - 1054.

Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J. 2008. Status and prospects of Association Mapping in plants. *The Plant Genome*, 1(1): 5 - 20.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO 1



Análisis de coordenadas Principales (PCoA), resultante de la matriz de distancia genética, basado en el análisis de 32 SSR asociados a nueve QTLs de resistencia a MB, para una colección de 40 genotipos de cebada. Entre paréntesis se indicó el porcentaje de variación explicada por cada eje. En gris se sombreadon los genotipos con comportamiento resistente a nivel local. Se agregó a la representación el resultado del programa STRUCTURE para cada individuo ($k=4$)