

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMIA

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y SANITARIA  
DE UNA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE  
CEBADA POR RESISTENCIA A MANCHA BORROSA CAUSADA POR  
*COCHLIOBOLUS SATIVUS*

por

Javier ALBIN ISNARDI

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2008

Tesis aprobada por:

Director:

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Ph.D. Clara Pritsch

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. MSc. Fernanda Gamba

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Ph.D. Silvia Pereyra

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Ph.D. Ariel Castro

Fecha:

\_\_\_\_\_

Autor

\_\_\_\_\_  
Javier Albín Isnardi

## AGRADECIMIENTOS

A Clara Pritsch por su confianza y apoyo incondicional.

A Silvia Pereyra, Ariel Castro, Jorge Franco, Silvia Germán, Jorge Pereira, Susana Rodríguez, Fernanda Gamba y Virginia Pravia por su valiosa colaboración.

A mis Padres que hicieron capaz todo esto.

A Beatriz mi eterna compañera en todo.

## TABLA DE CONTENIDO

|  | Página |
|--|--------|
| PAGINA DE APROBACIÓN.....  | II     |
| AGRADECIMIENTOS.....   | III    |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....  | VI     |
| 1 <u>INTRODUCCIÓN</u> .....  | 1      |
| 2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</u> .....  | 3      |
| 2.1 <u>EL CULTIVO DE CEBADA CERVECERA EN EL URUGUAY</u> .....  | 3      |
| 2.2 <u>LIMITANTES SANITARIAS DE LA CALIDAD DE MALTA</u> .....  | 4      |
| 2.3 <u>MEDIDAS DE CONTROL SANITARIO EN CEBADA</u> .....  | 5      |
| 2.4 <u>MANCHA BORROSA DE LA CEBADA</u> .....   | 6      |
| 2.4.1 <u>Importancia a nivel internacional</u> .....   | 6      |
| 2.4.2 <u>Importancia a nivel nacional</u> .....  | 7      |
| 2.4.3 <u>Sintomatología</u> .....  | 7      |
| 2.4.4 <u>Condiciones predisponentes</u> .....  | 8      |
| 2.4.5 <u>Etiología de la enfermedad</u> .....  | 9      |
| 2.4.6 <u>Ciclo biológico de C. sativus</u> .....   | 10     |
| 2.4.7 <u>Rango de hospederos</u> .....   | 12     |
| 2.4.8 <u>Especialización fisiológica del patógeno</u> .....  | 13     |
| 2.4.9 <u>Biología del proceso de infección</u> .....   | 14     |
| 2.5 <u>GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN CEBADA</u><br>.....  | 15     |
| 2.6 <u>IMPORTANCIA Y USO EFICIENTE DE LAS COLECCIONES DE GERMPLASMA, PARA EL DESARROLLO DE MATERIALES RESISTENTES</u> .....          | 17     |
| 2.6.1 <u>Caracterización y evaluación</u> .....  | 20     |
| 2.6.2 <u>Utilización: estrategias de pre-mejoramiento</u> .....  | 21     |
| 2.6.3 <u>Aportes de la biotecnología en la evaluación de germoplasma</u> .....   | 22     |
| 2.6.4 <u>Estrategia de evaluación y utilización de las colecciones de germoplasma de cebada en INIA-La Estanzuela</u> .....          | 22     |
| 3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....  | 23     |
| 3.1 <u>GENOTIPOS</u> .....   | 23     |
| 3.2 <u>EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN PLANTA ADULTA EN LA COLECCIÓN MANCHA BORROSA DE INIA LA ESTANZUELA</u> ..... | 25     |
| 3.3 <u>EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN PLÁNTULA</u> .....  | 25     |
| 3.3.1 <u>Diseño experimental</u> .....   | 25     |
| 3.3.2 <u>Producción de inóculo e inoculación</u> .....   | 25     |
| 3.3.3 <u>Evaluación de la respuesta a la infección</u> .....   | 27     |
| 3.3.4 <u>Análisis de datos</u> .....   | 27     |
| 3.4 <u>ESTIMACIÓN DE COEFICIENTES DE COANCESTRÍA</u> .....   | 28     |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.5.1 | <u>Extracción de ADN</u> .....  | 28 |
| 3.5.2 | <u>Cuantificación de ADN</u> .....  | 29 |
| 3.5.3 | <u>Condiciones de amplificación</u> .....   | 29 |
| 3.6   | ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA BASADOS EN DATOS<br>GENEALÓGICOS Y MARCADORES RAPD.....   | 29 |
| 4     | <u>RESULTADOS</u> .....   | 31 |
| 4.1   | CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN<br>PLANTA ADULTA DE CEBADA DE LA COLECCIÓN DE MANCHA<br>BORROSA DE INIA LA ESTANZUELA (1998-2002).....                  | 31 |
| 4.2   | EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN<br>ESTADO DE PLÁNTULA.....   | 34 |
| 4.3   | ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA BASADO EN COANCESTRÍA.....  | 37 |
| 4.4   | ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA CON MARCADORES<br>MOLECULARES.....   | 39 |
| 4.5   | ANÁLISIS COMPARATIVO DEL NIVEL DE RI PROMEDIO ENTRE<br>GRUPOS DEFINIDOS POR COEFICIENTE DE COANCESTRÍA Y POR<br>EL NIVEL DE POLIMORFISMO OBTENIDO POR MARCADORES<br>RAPD..... | 41 |
| 4.6   | ANÁLISIS DE ASOCIACION ENTRE MARCADORES RAPD Y NIVEL DE<br>RESPUESTA A LA INFECCIÓN EN PLÁNTULA.....  | 43 |
| 5     | <u>DISCUSIÓN</u> .....  | 45 |
| 6     | <u>CONCLUSIONES</u> .....   | 51 |
| 7     | <u>RESUMEN</u> .....  | 52 |
| 8     | <u>SUMMARY</u> .....  | 53 |
| 9     | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....   | 54 |
| 10    | <u>ANEXOS</u> .....   | 62 |

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. |   | Página |
|------------|---|--------|
| 1.         | Especies monocotiledóneas huéspedes de <i>C. Sativus</i> .....  | 12     |
| 2.         | Colecciones de germoplasma de cebada en los seis centros principales en el mundo.....   | 18     |
| 3.         | Depositorios de colecciones operativas de germoplasma de cebada en el mundo.....  | 19     |
| 4.         | Genotipos elegidos para los análisis.....   | 24     |
| 5.         | Origen (cultivar y localidad) y año de muestreo de los aislamientos monospóricos de <i>C. sativus</i> utilizados en la inoculación. ....  | 26     |
| 6.         | Iniciadores utilizados en las amplificaciones aleatorias de ADN.....  | 29     |
| 7.         | Medias ajustadas de los valores de respuestas de infección (RI) a mancha borrosa en plántula y evidencia de diferencias significativas entre ellas por el método Tukey-Kramer en 33 genotipos de cebada. .... | 36     |
| 8.         | Valores de PTS2 asociados al dendrograma de la Figura 6.....  | 38     |
| 9.         | Valores de PTS2 para el análisis a partir de los datos moleculares. ....  | 41     |
| 10.        | Medias ajustadas de RI y su correspondiente error estándar para cada grupo formado en el dendrograma de coancestría. ....   | 42     |
| 11.        | Significancia de comparaciones múltiples entre grupos formados en el dendrograma de coancestría. ....   | 42     |
| 12.        | Medias ajustadas de RI y su correspondiente error estándar para cada grupo formado en el dendrograma de los datos moleculares.....  | 42     |
| 13.        | Significancia de comparaciones múltiples entre grupos formados en el dendrograma de los datos moleculares.....  | 43     |
|            |   |        |
| Figura No. |   |        |
| 1.         | Área sembrada de cultivos de secano (en miles de hectáreas) en el período 1999/00 a 2006/07 en Uruguay. ....  | 3      |
| 2.         | Escala de respuesta a la infección por <i>C. sativus</i> en hojas de plantas adultas de cebada.....   | 8      |
| 3.         | Ciclo Biológico de <i>C. Sativus</i> en cebada .....  | 11     |
| 4.         | Escala de respuesta a la infección de <i>C. sativus</i> en plántulas de cebada. ...   | 27     |
| 5.         | Severidad (%) promedio de mancha borrosa en planta adulta en 31 genotipos de una colección de cebada de INIA La Estanzuela (1998-2002). ....  | 32     |
| 6.         | Dendrograma para 22 genotipos de cebada a partir de una matriz de datos de disimilaridad basada en los datos de coancestría. ....   | 37     |
| 7.         | Dendrograma para 22 genotipos de cebada a partir de una matriz de datos de disimilaridad basada en los datos de marcadores RAPD.....  | 40     |

## 1 INTRODUCCIÓN

La cebada en Uruguay es el segundo cultivo en importancia entre las opciones de invierno y el tercer cultivo de secano en cuanto a área (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2007). El destino principal del grano es la producción de malta para la exportación. En consecuencia, la calidad del grano remitido por los productores a la industria maltera es un elemento clave en esta cadena agroindustrial.

Uno de los factores más determinantes de la disminución de la calidad del grano es la ocurrencia de enfermedades foliares. Dentro de éstas se destaca la mancha borrosa causada por *Cochliobolus sativus*. Las severas y frecuentes ocurrencias de esta enfermedad en nuestro país podrían explicarse por los siguientes tres factores. No se dispone de materiales comerciales con buen comportamiento a la enfermedad. El inóculo está siempre presente en el sistema debido a los grandes volúmenes de rastrojos remanentes en la superficie asociados a la amplia adopción de técnicas conservacionistas de suelo. Finalmente, el cultivo de trigo, principal cereal de invierno, también es afectado por esta enfermedad.

La evolución de los costos de producción ha reducido los márgenes de rentabilidad del cultivo, por lo tanto la búsqueda e identificación de fuentes de resistencia diversas y efectivas se vuelve una actividad estratégica de importante impacto potencial. Esta estrategia implica la evaluación de materiales genéticamente diversos bajo nuestras condiciones ambientales y población local del patógeno. Colecciones de germoplasma candidatas a expresar buenos niveles de resistencia a mancha borrosa en nuestras condiciones pueden obtenerse mediante programas de intercambio de germoplasma con instituciones internacionales y programas de mejoramiento de cebada de diferentes partes del mundo.

Desde 1992, INIA La Estanzuela ha conformado una colección dinámica de germoplasma de cebada para evaluar resistencia a mancha borrosa. La misma se evalúa en cuanto a la respuesta a la enfermedad en planta adulta. Los materiales más promisorios son integrados como líneas parentales en los bloques de cruzamiento para combinarse con material elite local. Este esquema de evaluación basado en el comportamiento fenotípico de los materiales (resistencia en planta adulta) deja aún sin abordar las siguientes interrogantes:

- ¿Las fuentes de mejor comportamiento sanitario manifiestan diferentes mecanismos de resistencia?

- ¿Las resistencias observadas se explican por diferentes determinantes genéticos?

Siguiendo esta línea de investigación los objetivos de este trabajo son:

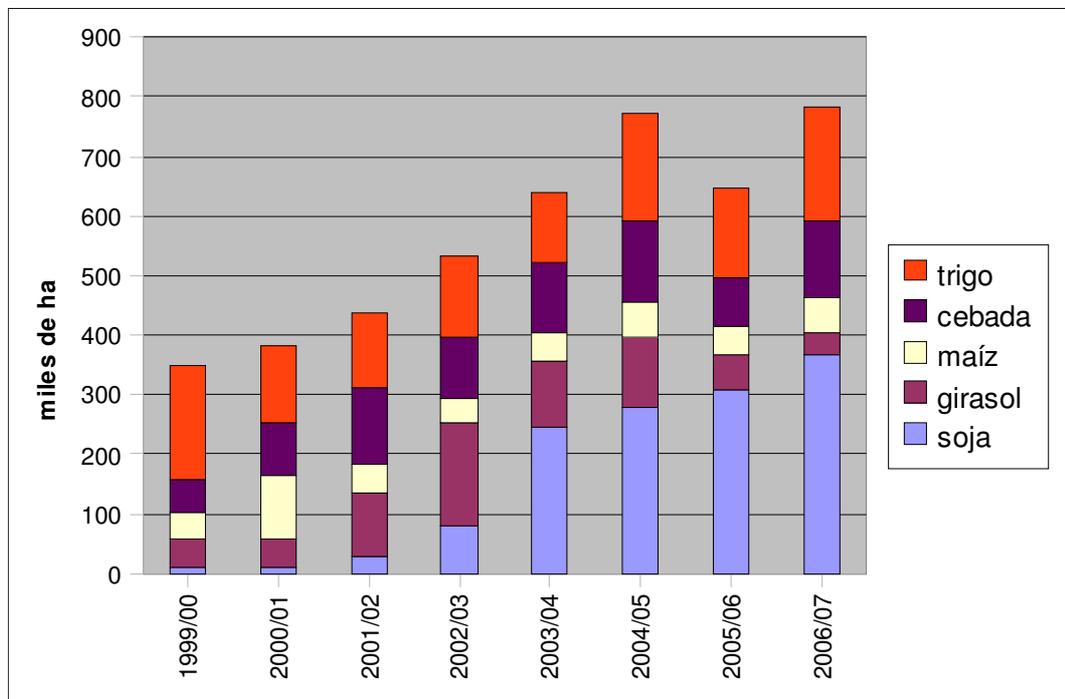
- Analizar el comportamiento sanitario en planta adulta de 31 genotipos seleccionados de los registros de la colección de mancha borrosa de INIA La Estanzuela colectados entre los años 1999 y 2002.
- Caracterizar el nivel de resistencia a nivel de plántula para el mismo grupo ampliado a 33 genotipos.
- Analizar la diversidad genética de los 22 genotipos a partir de: i) datos genealógicos; ii) datos de polimorfismos moleculares obtenidos a partir de marcadores RAPDs
- Elaborar una lista de materiales que sean diversos genéticamente, y con buenos niveles de resistencia en plántula y/o planta adulta.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 EL CULTIVO DE CEBADA CERVECERA EN EL URUGUAY

En Uruguay, el cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare subsp. vulgare* L.) es uno de los más importantes en cuanto a área de cultivo y significación económica en los predios agrícolas. Comparando las áreas ocupadas por cultivos de secano entre las zafas 1999/00 y 2006/07, la cebada siempre se ubicó dentro de los tres primeros lugares (Figura 1, URUGUAY. MGAP. DIEA, 2007). En nuestro país el grano cosechado tiene como destino principal la elaboración de malta para la exportación. Constituye una entrada de recursos muy importante para los productores no solo por su valor directo sino por la seguridad de comercialización al realizarse bajo contrato con las industrias malteras y con precio mínimo garantizado. Por otra parte la industria maltera planifica la distribución de áreas según variedad y financia los insumos lo que hace al cultivo particularmente atractivo para agricultores con problemas de acceso al crédito (Castro et al., 2007).

Figura 1: Área sembrada de cultivos de secano (en miles de hectáreas) en el período 1999/00 a 2006/07 en Uruguay.



Fuente: adaptado de URUGUAY. MGAP. DIEA (2007)

La calidad maltera del grano constituye unos de los factores fundamentales en la producción de cebada cervecera. Es un carácter complejo, ya que depende tanto de las propiedades físicas del grano maduro como de los niveles de actividad enzimática alcanzados durante la germinación. Ha sido definida como el producto de un conjunto de caracteres siendo los más estudiados por su importancia: calibre y peso de grano, porcentaje de extracto de malta, diferencia del extracto, viscosidad del mosto, friabilidad de la malta, contenido de nitrógeno en el grano malteado y en el mosto, índice de Kolbach, amonio libre en el mosto, índice Hartong y poder diastásico (Arias, 1991)

Entre las causas que pueden afectar la calidad de malta en la fase industrial se describen factores abióticos y bióticos que puedan haber actuado durante 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

## 2.2 LIMITANTES SANITARIAS DE LA CALIDAD DE MALTA

Las enfermedades a hongos que afectan la calidad de malta generan diferentes tipos de daños, los cuales se clasifican en directos e indirectos. Los daños directos son ocasionados por las enfermedades: i) punta negra, causada por el complejo de hongos compuesto por *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* y *Fusarium spp* (Miles et al., 1989), y ii) fusariosis de espiga (causada por *Fusarium graminearum*). Ambas enfermedades determinan directamente una disminución en el peso de mil granos y la tasa de germinación.

Las enfermedades causantes de daños indirectos más importantes en nuestro país son las manchas foliares, dentro de las cuales las que se destacan mancha borrosa (causada por *C. sativus*), escaldadura (causada por *Rynchosporium secalis*) y mancha en red (causada por *Drechslera teres*) (Pereyra, 1996).

Las manchas foliares 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. Conjuntamente, se observa un aumento de la respiración, transpiración y disminución de la fotosíntesis (Nutter et al., 1985)

Los componentes de calidad también puede ser comprometidos por enfermedades virales que afecten el área foliar. En el caso del virus BYDV, (virus del enanismo amarillo de la cebada, por su sigla en inglés) se lo asocia

con incremento de la proteína en grano, incrementos significativos en la proteína del mosto y en el poder diastásico, así como disminución en el extracto de malta. Otros parámetros en calidad maltera como color del grano, niveles de alfa-amilasa, y viscosidad del mosto no se afectaron significativamente (Edwards et al., 2001).

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). Según Germán (2006), las poblaciones de roya de la hoja son poco complejas en nuestro país presentando solo tres razas. También menciona que la enfermedad se hizo importante a nivel de campo a partir del año 2005 donde dos de las tres razas antes descritas produjeron una epidemia muy importante en las variedades más difundidas. Por otro lado Pereyra (1996) cita que las pérdidas en rendimiento causadas por esta enfermedad fluctuaron entre 17 a 25% mientras que la disminución del porcentaje del grano de categoría 1<sup>era</sup>+2<sup>da</sup> varió entre 3 a 25%. En cuanto a oídio se la considera una enfermedad secundaria en nuestro país, con prevalencia en zonas húmedas (Germán et al., 2005).

### 2.3 MEDIDAS DE CONTROL SANITARIO EN CEBADA

Básicamente hay tres formas de controlar las enfermedades; mediante resistencia genética, control cultural y químico. Con respecto a la incorporación de resistencia, la estrategia desarrollada en el programa de mejoramiento genético de INIA La Estanzuela, Uruguay ha sido específico para cada enfermedad. Las fuentes de resistencia se identifican en colecciones de germoplasma analizadas a nivel de planta adulta y se caracteriza además su comportamiento en plántula en el caso de las manchas foliares o el tipo de resistencia para fusariosis de espiga. En general, para manchas foliares se busca incorporar resistencia a materiales con buena adaptación y calidad maltera mediante retrocruzas (Pereyra et al., 2007).

Aunque existen variaciones en cuanto a la susceptibilidad genética a las diferentes manchas en los cultivares utilizados comercialmente en Uruguay, no existe resistencia genética a mancha borrosa. En cambio si se observan buenos comportamientos genéticos frente a mancha en red (Pereyra et al., 2007).

Entre las medidas culturales más importantes están: sembrar semilla libre de patógenos y la rotación de cultivos; esto está fundamentado porque todos los agentes causales de manchas foliares sobreviven en rastrojos y semillas, y poseen una importante eficiencia de pasaje a la hoja (Pereyra, 1996).

La implementación de la siembra directa ha complicado las medidas culturales. La eliminación de actividades de laboreos y quema de rastrojos ha determinado mayor volumen de rastrojo y con mayor tiempo de permanencia en la superficie del suelo. Estos dos factores favorecen claramente la supervivencia de los patógenos en el sistema. Esto se agrava en enfermedades como mancha borrosa que atacan trigo y cebada indiscriminadamente.

Pereyra (1996) menciona que cuando las medidas de resistencia y control cultural son ineficientes para el control de manchas foliares, el uso de fungicidas se plantea como una opción eventual. Este autor sugiere tener en cuenta varios aspectos para tomar la decisión de aplicación de fitosanitarios: el estado fenológico del cultivo, la susceptibilidad de la variedad y el nivel de infección. Según el estado fenológico del cultivo, recomienda considerar dos diferentes niveles de severidad como nivel crítico (umbral de aplicación). De esta manera, desde el estado de elongación hasta espigazón el nivel crítico se encuentra en 5% de severidad, y desde final de espigazón a grano lechoso en 15%.

## 2.4 MANCHA BORROSA DE LA CEBADA

### 2.4.1 Importancia a nivel internacional

En los últimos años, las epidemias de mancha borrosa se han intensificado en todas las zonas del mundo (Kumar et al., 2002). Para el caso de trigo, los esfuerzos puestos al servicio del mejoramiento para la resistencia a la roya de la hoja han producido grandes epidemias de mancha borrosa en los sistemas agrícolas intensivos en el sur de África (alrededor de 12.000.000 ha afectadas). Por otra parte en China, el reemplazo de variedades de campo de trigo por genotipos de alto potencial de rendimiento y con resistencia a roya de la hoja ha provocado un aumento de las epidemias de mancha borrosa. El patógeno *C. sativus* siempre está presente en Norte y Sur América mientras que aparece con menor frecuencia en algunas partes de Europa.

Las pérdidas de rendimiento en grano causadas por esta enfermedad fluctuaron entre 16 y 33% en variedades susceptibles de cebada (Fetch y Steffenson, 1994). Por otro lado, Dubin y Van Ginkel (1991), Saari (1998) reportan para el cultivo de trigo en el sur de Asia, pérdidas de rendimiento entre el 16 al 23%.

#### 2.4.2 Importancia a nivel nacional

Mancha borrosa junto con mancha en red y fusariosis de espiga representan una de las limitantes principales para obtener rendimientos y calidad de grano adecuados en los cultivos de cebada en Uruguay. La magnitud de las pérdidas es 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).

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 (Pereyra et al., 2007).

Pereyra et al. (2007) mencionan que se han registrado mermas en el rendimiento de hasta un 30% en aquellos casos donde la epidemia de mancha borrosa se produce antes de espigazón.

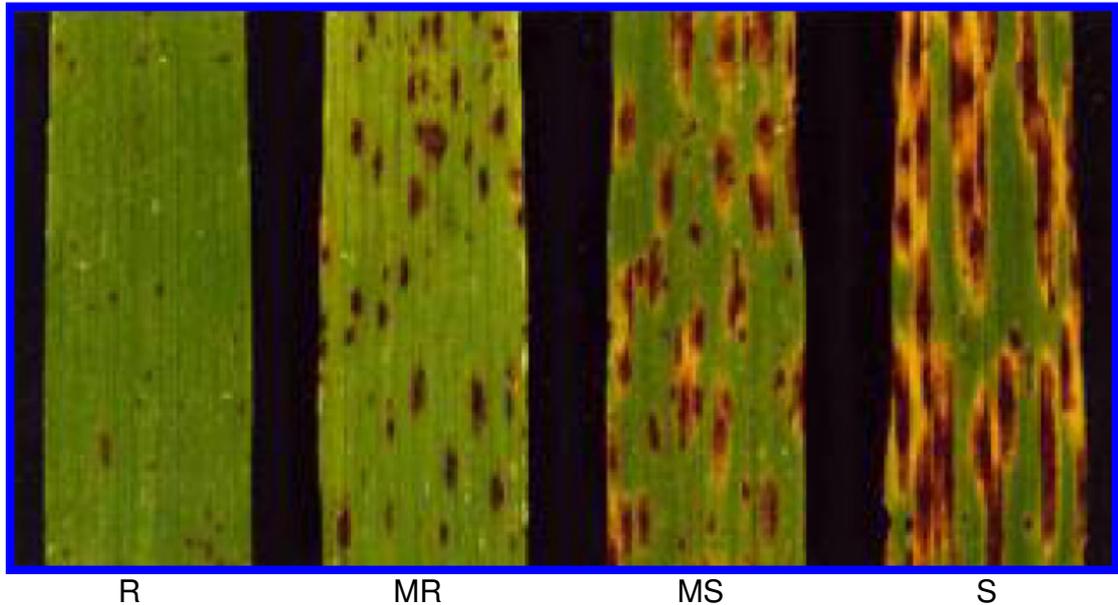
#### 2.4.3 Sintomatología

Los síntomas característicos de la mancha borrosa 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 de mancha borrosa causada por *C. sativus* pueden comenzar a observarse en el cultivo hospedero a partir del comienzo del desarrollo foliar, inclusive en estado de plántula si ocurren condiciones favorables, 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).

Fetch y Steffenson (1999) menciona que la sintomatología 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 hospedero-patógeno, las lesiones se vuelven más grandes y ovaladas con presencia de una halo clorótico bien marcado (Fig. 2)

Figura 2: Escala de respuesta a la infección por *C. sativus* en hojas de plantas adultas de cebada.



Referencias: R: reacción resistente, MR: reacción moderadamente resistente, MS reacción moderadamente susceptible y S: reacción susceptible.

Fuente: Fetch y Steffenson (1999).

#### 2.4.4 Condiciones predisponentes

La mancha borrosa 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.

Kumar et al. (2002) citan que en condiciones conducentes, tales como cinco o seis días de lluvia seguidos de temperaturas cálidas (entre 20 a 30 °C), la enfermedad puede desarrollarse muy rápido, agravándose si el cultivo atacado se encuentra en la etapa de tres cuarta espiga emergida (Zadoks 5.6; Zadoks et al., 1974) donde el cultivo se hace más susceptible al patógeno. También mencionan que bajo condiciones de baja intensidad de luz el patógeno puede colonizar intercelularmente los tejidos sin causar daños visibles.

Por otro lado, Pereyra et al. (2005) citan que las condiciones óptimas para la infección se encuentra entre 24 a 28 °C, entre 9 y 24 horas de agua libre sobre la hoja; desarrollándose luego favorablemente con la ocurrencia de lluvias.

#### 2.4.5 Etiología de la enfermedad

La mancha borrosa es causada por *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechs. ex Dastur (anamorfo: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.). Este forma parte de la clase Ascomycetes, dentro de la división Eumycota del reino Fungi. Los eumycotas son hongos verdaderos, habitualmente filamentosos y que se alimentan por absorción (Tinline, 1988).

Los ascomycetes comprenden varios miles de especies que pueden ser desde estrictamente saprófitas, hasta parásitos obligados de las plantas superiores. En estos últimos, existen algunos que pueden atacar y dañar severamente los cereales de invierno como trigo y cebada.

El ciclo de los ascomycetes comprende dos fases: la asexual y la sexual. Durante la primera el hongo produce conidióforos, es decir, estructuras que soportan esporas asexuales o conidios. Los conidióforos pueden nacer individualmente o en grupos, y libres, o en cuerpos fructíferos denominados picnidios o acérvulos. Desde el punto de vista fitopatológico, esta fase es muy importante porque se repite durante todo el ciclo del cultivo (ciclo secundario), y los conidios pueden infectar hojas, tallos, espigas, e incluso granos.

La fusión de dos núcleos haploides compatibles se produce en la segunda fase o ciclo sexual y, como consecuencia, se desarrollan cuerpos fructíferos (peritecios, cleistotecios o apotecios) capaces de resistir condiciones desfavorables de humedad y temperatura durante la ausencia del cultivo. En estos cuerpos fructíferos, dentro de ascas se producen ascosporas haploides mediante meiosis. Esta es la etapa invernante, aunque en la mayoría de los casos, las ascas o ascosporas no se forman ni maduran sino hasta el final del invierno o comienzo de la primavera. Las ascosporas se liberan al inicio de un nuevo ciclo del cultivo. Por lo tanto el hongo puede invernar también en forma de micelio y, en ocasiones, de conidio, o sobreviviendo saprofiticamente en los rastrojos.

El micelio de los ascomycetes está compuesto de hifas bien desarrolladas, delgadas o gruesas, profusamente ramificadas e interrumpidas por septas simples.

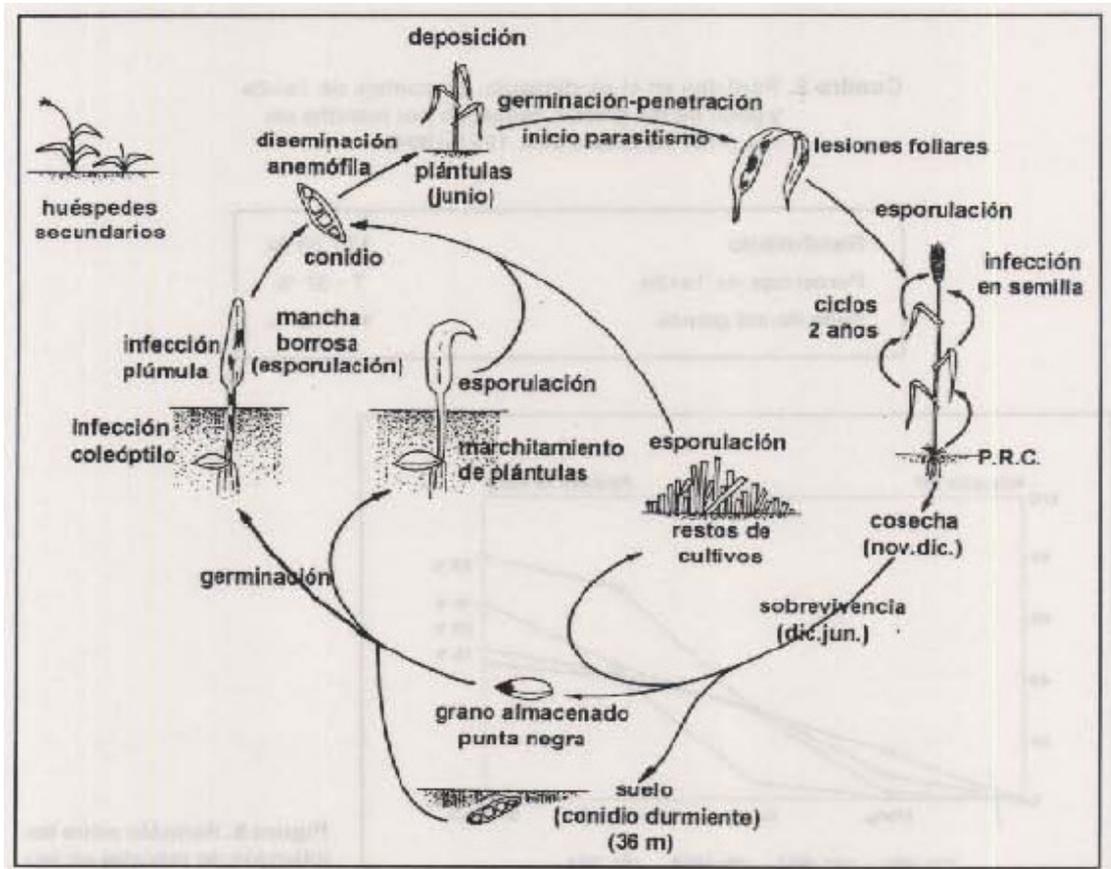
*Bipolaris sorokiniana* representa la fase asexual o anamórfica. Se caracteriza por conidios elípticos tabicados (60-120  $\mu\text{m}$  x 12-20  $\mu\text{m}$ ) con 5 a 9 células. Durante el proceso de infección, la producción de conidióforos con conidios ocurre en el tejido foliar y otras partes de la planta, 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 su desarrollo y mantenimiento en condiciones de laboratorio (Zong y Steffenson, 2002).

#### 2.4.6 Ciclo biológico de *C. sativus*

Las principales fuentes de inóculo primarias a partir de las cuales se desarrolla la enfermedad son: semilla enferma, conidios durmientes en el suelo (los cuales pueden permanecer con capacidad germinativa por 36 meses), plantas guachas o voluntarias y rastros de hospederos (Pereyra, 1996, Figura 3). En los últimos años con el desarrollo de prácticas conservacionistas de suelo como la siembra directa, la fuente de inóculo más importante para esta enfermedad son los residuos de los cultivos en la superficie (Stewart et al., 2005).

Figura 3: Ciclo Biológico de *C. sativus* en cebada



Fuente: Pereyra (1996).

Por otro lado, Rers, citado por Pereyra (1996) menciona que la semilla es una importante fuente de inóculo para la fase de podredumbre de raíces seminales, secundarias o coronales, lesiones en las primeras hojas y muerte de plantas luego de la emergencia.

A partir de conidios procedentes de las fuentes de inóculo primarias antes mencionadas, y con condiciones de temperaturas cálidas y alta humedad, se producen las primeras infecciones en los cultivos. Luego, con la ocurrencia de lluvias en la primavera se suceden los ciclos secundarios cada 10 a 14 días (Pereyra 1996, Pereyra et al. 2005).

#### 2.4.7 Rango de hospederos

El rango de hospederos de *C. sativus* es muy amplio. En la Cuadro 1 se muestra, como ejemplo, el rango de especies hospederas monocotiledóneas citados en la bibliografía (Kumar et al. 2002, Stewart et al. 2005). Pero por su importancia económica este patógeno se destaca por las manchas foliares que desarrolla en los cultivos de trigo y cebada.

Cuadro 1: Especies monocotiledóneas huéspedes de *C. sativus*.

|                               |
|-------------------------------|
| <hr/> <b>Cereales</b> <hr/>   |
| <i>Triticum aestivum</i>      |
| <i>Secale cereale</i>         |
| <i>Hordeum vulgare</i>        |
| <i>Hordeum murinum</i>        |
| <i>Avena sativa</i>           |
| <hr/> <b>Forrajeras</b> <hr/> |
| <i>Agropyron pectinatum</i>   |
| <i>Agropyron repens</i>       |
| <i>Alopecurus pratensis</i>   |
| <i>Beckmannia eruciformis</i> |
| <i>Bromus catharticus</i>     |
| <i>Bromus erectus</i>         |
| <i>Bromus inermis</i>         |
| <i>Dactylis glomerata</i>     |
| <i>Festuca heterophylla</i>   |
| <i>Festuca ovina</i>          |
| <i>Lolium multiflorum</i>     |
| <i>Lolium perenne</i>         |
| <i>Phalaris sp</i>            |
| <i>Pennisetum villosum</i>    |
| <i>Poa pratensis</i>          |
| <i>Setaria viridis</i>        |
| <i>Sorghum bicolor.</i>       |

Fuente: Kumar et al. (2002), Stewart et al. (2005)

#### 2.4.8 Especialización fisiológica del patógeno

En el estudio de la especialización fisiológica de un patógeno se distinguen dos conceptos importantes: patogenicidad y virulencia. La patogenicidad se refiere a la capacidad o incapacidad de un microorganismo para producir enfermedad. La virulencia indica el grado de patogenicidad de un patógeno. Ambos caracteres no dependen únicamente del genotipo del patógeno sino también del genotipo del hospedero (Shaner et al., 1992).

La primera descripción de la especialización fisiológica entre el patógeno y el hospedero realizada por Christensen en 1926, muestra diferencias considerables en la virulencia de algunos aislamientos de *C. sativus* atacando trigo y cebada. Kumar et al. (2002) también citan que Nelson encontró diferentes tipos de reacción en especies forrajeras al utilizar como inóculo las progenies de cruza entre aislamientos que mostraban diferente nivel de virulencia. De acuerdo con estos resultados, el carácter virulencia tendría una herencia compleja, determinada por muchos genes.

Fetch y Steffenson (1994) mencionan que inoculando plántulas de cebada en con dos aislamientos de *C. sativus* (ND90Pr y ND85F) en ensayos de invernáculo detectaron marcada diferencia en la virulencia principalmente al infectar genotipos de cebada de dos hileras. A su vez, encontraron que a nivel de campo no solo se observaba diferencia en la respuesta a la infección (RI), sino también en los niveles de severidad asociados a una interacción significativa entre aislamiento x genotipo.

En un estudio donde se analizó la progenie del cruzamiento de los aislamientos de *C. sativus*: ND90Pr con ND93-1, virulento y no virulento al cultivar Bowman, respectivamente, se encontró una tasa de segregación de 1:1 para baja/alta virulencia, indicando la existencia de un único gen controlando la virulencia. Además esta relación de 1:1 se cumplió solamente al inocular el cultivar Bowman (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997a). Mediante inoculación en tres variedades diferentes de cebada (ND 5883, Bowman, ND B112) con 22 aislamientos recolectados en Dakota del Norte, Estados Unidos, y 11 aislamientos adicionales provenientes de Estados Unidos (Minnesota, Dakota del Sur, Nebraska, Colorado), Japón y China, estos autores identificaron tres patotipos. Estos patotipos fueron designados 0, 1 y 2; donde el 0 muestra baja virulencia en los tres genotipos, el patotipo 1 muestra baja virulencia en Bowman y alta virulencia en ND 5883 y en ND B112, y por último el patotipo 2 muestra alta virulencia solo en Bowman (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b).

Al igual que para *D. teres*, el único estudio realizado en América del Sur es en nuestro país y reporta tres grupos de aislamientos con virulencia diferencial (Gamba y Estramil, 2002). Sin embargo, estos estudios no son comparables con otros reportados porque fueron realizados con genotipos de cebadas diferentes. Esta falta de consistencia requiere de una estandarización del grupo de cebadas diferenciales así como de los protocolos de investigación a ser usados a nivel internacional. Existen antecedentes en la literatura de estudios de diversidad genética de *C. sativus* utilizando marcadores moleculares AFLP (Zong y Steffenson 2001, Zong y Steffenson 2002).

#### 2.4.9 Biología del proceso de infección

Durante la infección, *C. sativus* cuenta con una fase biotrófica y necrotrófica. Un análisis microscópico del desarrollo de este hongo durante la infección muestra claramente las siguientes etapas: i) penetración de la cutícula y pared celular de la célula epidérmica del hospedero, seguido por el desarrollo de la hifa de penetración, alimentándose de compuestos presentes en la cutícula (fase biotrófica); ii) invasión del mesófilo por parte de la hifa, acompañada de la muerte de las células de la epidermis y del mesófilo (fase necrotrófica). Raramente el patógeno penetra por aperturas estomáticas. El colapso de las células del hospedero en la fase necrotrófica es siempre indicada por un incremento en la fuga de electrones coincidiendo con el desarrollo de la enfermedad. Este colapso es producido a través de toxinas secretadas por el hongo, ya que las células mueren sin tener contacto directo con las hifas. Además, la introducción de toxinas dentro de las hojas provoca una respuesta necrótica en la hoja similar a la desarrollada durante la infección (Kumar et al., 2002).

Se han identificado varios tipos de toxinas siendo las más estudiadas las de la familia heliminthosporal. 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. Por lo tanto 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 mancha borrosa, la respuesta oxidativa se pone en evidencia en células epidérmicas y del mesófilo con la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno, intermediario de oxígeno reactivo). Existiría una correlación positiva entre el nivel de susceptibilidad a mancha borrosa y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado en las

lesiones de las hojas. Por lo tanto la acumulación de  $H_2O_2$  estaría asociada a la infección exitosa (compatible) del patógeno. De acuerdo a esto se explicaría la alta susceptibilidad a *C. sativus* de las líneas de cebada portadoras del gen *mlo*, que confiere resistencia raza-no específica frente al patógeno biotrófico *Blumeria graminis* mediante una rápida muerte celular y reacción oxidativa (Kumar et al. 2001, Kumar et al. 2002). Los determinantes fisiológicos o genéticos que determinen *a priori* el carácter durable de la resistencia no son conocidos (Michelmore, 2003).

## 2.5 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 (Griffee 1925, Arny 1951, Wilcoxson et al. 1990, Von Wettstein-Knowles 1992, Kutcher et al. 1996, Steffenson et al. 1996, Viljavee-Gratian et al. 1997a), los cuales concuerdan que se trataría de un carácter de herencia sencilla y explicado por 1 a 3 genes. Von Wettstein-Knowles (1992) describe cuatro loci para genes de resistencia a *C. sativus* en cebada: *hl1* (cromosoma 2H), *hl2* (cromosoma 1H), *hl3* (cromosoma 5H) y *hl4* (sin ubicación en el mapa). González Cisneros, citado por Steffenson et al. (1996) identificó dos genes de resistencia a mancha borrosa en el cultivar Bowman localizados en el cromosoma 1H y en el cromosoma 3H, respectivamente. Steffenson et al. (1996) estudiando la población de mapeo Steptoe/Morex, (ambos genotipos de seis hileras), localizaron un gen de resistencia en plántula en el cromosoma 7H presente en Morex, al que denominaron *Rcs5*. Recientemente, se ha localizado en el cromosoma 1H un nuevo gen de resistencia cualitativa, denominado *Rcs6* (Bilgic et al., 2006).

En cuanto a la resistencia cuantitativa a mancha borrosa en planta adulta, basada en el porcentaje de severidad, Steffenson et al. (1996) detectaron en la misma población Steptoe/Morex dos QTL (Locus de Caracteres Cuantitativos por su sigla en inglés). Uno de los QTL, de efecto mayor ( $r^2=0.62$ ) fue localizado en el cromosoma 1H; el segundo, con efecto menor ( $r^2=0.09$ ), localizado en el cromosoma 7H en una región cercana a *Rcs5*. El QTL del cromosoma 1H estaría ubicado en una región diferente a la asignada para la resistencia de Bowman detectada por González Cisneros. En el medio Oeste de Estados Unidos, donde la mancha borrosa es una enfermedad de importancia económica, se ha logrado un buen nivel de resistencia en los materiales malteros de seis hileras a través del uso de materiales derivados de la línea resistente ND B112. Esta fuente de resistencia ha permanecido efectiva por más de 40 años. La misma ha sido incorporada en el cultivar Morex, el estándar de calidad maltera para cebadas de seis hileras en América del Norte. De acuerdo a Steffenson et al. (1996) la resistencia durable segregando en la

población Steptoe/Morex derivaría de ND B112.

La resistencia a mancha borrosa en materiales de cebada de dos hileras está menos desarrollada. Por un lado, se reporta un escaso número de materiales adaptados de dos hileras con altos niveles de resistencia. Además, también son escasos los trabajos sobre la genética de la resistencia en estos materiales a excepción del cultivar Bowman (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997b). Cabe destacar que, desde 1990 se han reportado patotipos virulentos a Bowman en Estados Unidos. Por otro lado, la incorporación de la resistencia derivada de ND B112 en materiales de dos hileras ha sido difícil. Steffenson (2000) ha reportado una expresión diferencial de los QTLs asociados con resistencia cuantitativa (planta adulta) a mancha borrosa proveniente de Morex (seis hileras) cuando se los transfiere a contextos genéticos de dos hileras. Utilizando isolíneas segmentales del cultivar Harrington (dos hileras) con cada uno o ambos QTLs detectados en Steptoe/Morex, se puso en evidencia que el QTL del cromosoma 1H, inesperadamente, no era efectivo por sí solo en disminuir la severidad a mancha borrosa en planta adulta. En cambio, en estas isolíneas, las regiones genómicas conteniendo *Rcs5* determinaban descensos significativos de la severidad. Cuando ambas regiones genómicas estaban presentes se lograban niveles de resistencia aun mayores. De esta manera, Steffenson (2000) postula que en un contexto genético de dos hileras existiría un posible efecto de supresión del QTL de 1H mientras que *Rcs5* o un gen cercano serían responsables de conferir resistencia a planta adulta. Más recientemente, a partir del análisis de una población segregante de dobles haploides del cruzamiento Morex y Dicktoo (seis carreras) se reportaron tres QTL de resistencia en plántula, dos en los cromosomas 7H (uno cerca de *Rcs5* y otro cerca del centrómero) y el otro en el cromosoma 3H. Al igual que el caso anterior con Harrington, no se detectó resistencia a planta adulta en el cromosoma 1H. Estos datos muestran la complejidad de la expresión de la resistencia a mancha borrosa en los diferentes contextos genéticos y revela importantes implicancias en el mejoramiento dirigido a resistencia durable (Bilgic et al., 2005).

En general, aparte de los trabajos en los cultivares Morex y Bowman, ambos derivados de ND B112, poco se conoce sobre los determinantes genéticos en otros materiales derivados de estas líneas. Es especialmente interesante el caso de los cultivares derivados de Morex los cuales son potenciales portadores de resistencias derivadas de ND B112. No se han aportado aún evidencias que demuestren que la misma región genómica identificada en Morex está presente en ND B112 y en otras líneas derivadas con alto nivel de resistencia. Por otra parte, muy poco se conoce sobre la genética de la resistencia en otras fuentes de resistencia de dos y seis hileras. Tal es el caso de materiales provenientes

de otros programas de mejoramiento así como del programa ICARDA-IMMYT. Una amplia colección (dinámica) de fuentes de resistencia a mancha borrosa se encuentra en evaluación en INIA-La Estanzuela desde 1992 (Pereyra, 2007).

## 2.6 IMPORTANCIA Y USO EFICIENTE DE LAS COLECCIONES DE GERMPLASMA, PARA EL DESARROLLO DE MATERIALES RESISTENTES

Los recursos genéticos o germoplasma se define como la suma de combinaciones de genes o genotipos disponibles para el Mejoramiento genético (Gepts, 2006). El concepto “colección de germoplasma” se refiere a una colección discreta de accesiones, gestionada por una institución (como un banco genético); la colección es mantenida *ex situ* i.e. fuera del área de diversidad original o, *in situ* i.e. en áreas protegidas correspondientes a las zonas de diversificación (Greene y Morris, 2001). Las colecciones de germoplasma constituyen una fuente de diversidad genética que da soporte al mejoramiento genético de cultivos, así como son consideradas herramientas estratégicas en los esfuerzos de conservación.

El material genético presente en las colecciones de germoplasma puede asignarse a las siguientes tres fracciones o pools genéticos: especies cultivadas; especies consideradas recursos genéticos (ej. especies emparentadas) y especies no cultivadas (ej. especies salvajes). El germoplasma de cebada está compuesto de cultivares mejorados, variedades locales y especies emparentadas. Los institutos de investigación y organismos internacionales que conservan estos materiales se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Colecciones de germoplasma de cebada en los seis centros principales en el mundo.

| Especie                            | PGRC  | NSGC  | NGB  | ICARDA | VIR   | NIAS |
|------------------------------------|-------|-------|------|--------|-------|------|
| <i>H. vulgare ssp. vulgare</i>     | 22882 | 25024 | 1804 | 23639  | 17197 | -    |
| <i>H. vulgare</i>                  | 19684 | -     | 141  | -      | -     | 6853 |
| <i>H. vulgare var. distichon</i>   | -     | -     | -    | -      | -     | 1996 |
| <i>H mutant collection</i>         | -     | -     | 9647 | -      | -     | -    |
| <i>H. vulgare ssp spontaneum</i>   | 3875  | 1504  | 18   | 1696   | 150   | 16   |
| <i>H. vulgare ssp agriochriton</i> | -     | 1     | 45   | 9      | -     | 2    |

Referencias: PGRC: Centro de recursos genómicos vegetales (Alemania); NSGC: Colección nacional cereales (Estados Unidos); NGB: Banco genético nórdico; ICARDA: Centro internacional de investigación para agricultura en regiones áridas; NIAS: Instituto nacional de ciencias agrobiológicas.

Fuente: adaptado de Singh (2005).

Moseman y Smith (1985) han clasificado las colecciones de cebada en: i) colección base; ii) colecciones operativas. Las colecciones base son mantenidas en sistemas de almacenamiento de largo plazo para su preservación. Se componen de cultivares, selecciones, líneas de mejoramiento, variedades locales, no requieren cuidados especiales para su mantenimiento que en general es *ex situ* en bancos genéticos. La conservación *in situ* complementa el método anterior al preservar los procesos biológicos y sociales de la evolución. Las colecciones *ex situ* de cebada se ubican en instituciones localizadas en Estados Unidos, Canadá, Suecia, Siria, Rusia, Alemania y China (Singh, 2005)

Las colecciones operativas se dividen en colecciones generales y específicas, son mantenidas en países productores de cebada (Cuadro 3) y están disponibles para distribución entre investigadores. Una colección operativa especial conteniendo diferentes stocks genéticos, líneas macho-estériles y especies de *Hordeum* son mantenidas en la Colección Nacional de especies de cereales (National Small Grain Collection) en Aberdeen, Idaho, Estados Unidos.

Cuadro 3: Depositarios de colecciones operativas de germoplasma de cebada en el mundo.

| Institución/País                           | No. de accesiones |
|--|-------------------|
| ICARDA-CIMMYT, México.                     |                   |
| <i>H. vulgare</i>                          | 14986             |
| NBPGR, India                               |                   |
| <i>H. vulgare</i>                          | 11030             |
| CGN, Países Bajos                          |                   |
| <i>H. vulgare</i>                          | 3342              |
| <i>H. spontaneum</i>                       | 15                |
| <i>Hordeum spp.</i>                        | 64                |
| RICP, República Checa                      |                   |
| <i>H. vulgare</i> (cultivares avanzados)   | 2939              |
| <i>H. vulgare</i> (líneas de mejoramiento) | 955               |
| <i>H. vulgare</i> (cultivares locales)     | 99                |
| <i>Hordeum spp.</i>                        | 81                |
| INRA, Francia                              |                   |
| <i>H. vulgare</i>                          | 6341              |
| CFR, Nueva Zelanda                         |                   |
| <i>H. vulgare</i>                          | 1436              |

Referencias: ICARDA: Centro internacional de investigación para agricultura en regiones áridas; CIMMYT: Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo; NBPGR: Agencia nacional de recursos genéticos vegetal; CGN: Centro de recursos genéticos; RICP: Instituto de investigación de producción vegetal; INRA: Instituto nacional de investigación agronómica; CFR: Investigación en cultivos y alimentos.

Fuente: adaptado de Singh (2005).

Hoisington et al. (1999) sugieren que el acceso a un amplio rango de diversidad genética es crítico para un buen suceso en los programas de mejoramiento. Para ello es importante tener instituciones que, aparte de coleccionar y mantener especies silvestres, variedades tradicionales, especies no domesticadas, cultivares avanzados y líneas de mejoramiento, documenten pertinentemente cada accesión mediante un apropiado sistema de caracterización.

Dada la importancia en aumentar la variabilidad de los cultivos agrícolas en las últimas décadas ha existido una importante asignación de recursos económicos y humanos a la prospección, colección y conservación de germoplasma. Esto ha determinado que actualmente se evalúen en la región del MERCOSUR (Mercado Común del Sur) importantes colecciones de

germoplasma para muchas especies cultivadas y especies salvajes emparentadas. Para la mayoría de estas colecciones, se cuenta con datos de pasaporte, información parcial de caracterización para descriptores morfológicos, e información aún más restringida para caracteres de importancia agronómica (Abadie y Berretta, 2001a).

### 2.6.1 Caracterización y evaluación

Las colecciones deben proveer a los mejoradores de variantes genéticas, genes o genotipos, que les permitan responder a los nuevos desafíos planteados por los sistemas productivos, siendo para ello imprescindible conocer las características del germoplasma mediante una apropiada estrategia de caracterización (Abadie y Berretta, 2001a).

Se entiende por caracterización a la descripción de la variación que existe en una colección de germoplasma, en términos de características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad, es decir, características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente. La caracterización debe permitir diferenciar a las accesiones de una especie.

La fase de evaluación del germoplasma apunta a conocer características agronómicas útiles. Estos últimos caracteres son los de mayor interés para los mejoradores, ya que reflejan los patrones evolutivos del cultivo resultantes de la selección impuesta por agricultores y por estreses bióticos y abióticos. Lamentablemente, la complejidad genética de muchos caracteres sumado a la frecuente interacción genotipo-ambiente observada determinan que no siempre se puedan distinguir genotipos con precisión basados únicamente en una caracterización preliminar. Frecuentemente, los genotipos demuestran una adaptación sitio-específica por lo que se requiere la recolección de datos en diferentes localidades. Se ha mencionado la estrategia de desarrollar colecciones núcleo como una alternativa que permita una evaluación pormenorizada en una sub-muestra que represente la mayoría de la variación existente de la colección (Skinner et al. 1999, Abadie 2001b, Abadie y Berretta 2001a).

En cebada, varios alelos favorables relacionados con resistencia e enfermedades han sido identificados dentro del grupo de variedades locales o "landraces". Por ejemplo, dentro de colecciones de variedades locales de la zona Oeste de Asia y Norte de África (WANA) asociadas a los centros de diversidad se han identificado genes de resistencia a roya de hoja (Yahyaoui et al. 1988, Woldeab et al. 2007), escaldadura y mancha en red (Yitbarek et al.,

1998) y oídio (Czembor, 2001). Otras variedades locales alejadas del centro de origen y/o diversidad también han resultado muy valiosas como es el caso de Chevron, originario de Suiza, con alta resistencia a punta negra y también a la fusariosis de la espiga (Gebhardt et al. 1992, Canci et al. 2004).

Los alelos favorables aportados por especies emparentadas (alelos exóticos) a la cebada cultivada provienen prevalentemente de *H. vulgare subsp. spontaneum*. En esta especie, estrechamente relacionada a la cebada se han detectado numerosos alelos favorables tales como de resistencia a enfermedades a virus (Rouge et al., 2003) y a hongos (Genger et al. 2005, Von Korff et al. 2006), de rendimiento (Von Korff et al., 2006) y de calidad maltera (Eglinton et al., 1999). En algunos casos, la identificación de dichos alelos no ha sido exitosa en poblaciones de mapeo clásico debido al importante número de caracteres estructurales segregando simultáneamente. Para estos casos, la caracterización de la contribución del germoplasma exótico ha requerido esfuerzos de introgresión a un contexto genético adaptado a través por ejemplo de la estrategia de análisis de QTLs en poblaciones retrocruzas avanzadas (AB-QTL, Tanksley et al., 1996).

#### 2.6.2 Utilización: estrategias de pre-mejoramiento

El pre-mejoramiento o valorización genética de germoplasma es un proceso previo al mejoramiento que viabiliza la transferencia de variabilidad genética útil al material adaptado, manteniendo las combinaciones multialélicas presentes en el material elite.

El pre-mejoramiento se basa en la incorporación en los materiales adaptados de genes o grupos de genes asociados a características favorables, provenientes de genotipos exóticos, otras especies, géneros o familias vegetales. El material resultante, “genéticamente valorizado”, es posteriormente incorporado en los programas de mejoramiento como líneas parentales para el desarrollo de cultivares. Por esta razón, este proceso también se denomina “diseño de líneas parentales”. El pre-mejoramiento constituye entonces la primera etapa en la utilización de los recursos genéticos luego de las etapas de colecta, identificación, conservación y caracterización/evaluación (Pritsch, 2001)

En los últimos 50 años se ha incrementado la brecha genética entre los pools de los materiales de elite y el de los exóticos. Las importantes diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos pools, así como en las combinaciones multialélicas prevalentes en cada pool, determinan que una incorporación directa de variabilidad genética útil en los materiales no

sea necesariamente exitosa (Allard, citado por Pritsch, 2001).

### 2.6.3 Aportes de la biotecnología en la evaluación de germoplasma

Las herramientas biotecnológicas recientes permiten la caracterización molecular del genoma de las accesiones de una colección de germoplasma. En numerosos casos estas herramientas han facilitado la utilización efectiva del recurso genético en los programas de mejoramiento.

Los abordajes moleculares facilitan el análisis de la composición de la diversidad genética entre y dentro de grupos de accesiones. Además, el desarrollo reciente de nuevos marcadores, mapas genéticos, localización de genes, aislamiento de genes y la posible manipulación de la estructura cromosómica (ingeniería cromosómica) mediante ingeniería genética y/o selección asistida por marcadores ha realizado según Gepts (2006) dos grandes tipos de aportes:

- se ha facilitado la exploración del genoma en regiones relevantes para su posterior manipulación
- ha permitido una caracterización extensiva del germoplasma mediante: la caracterización genotípica individual (fingerprinting); la evaluación de la estructura de la diversidad genética; y el análisis de la genética de poblaciones. En particular, ha contribuido a entender la bases genéticas de los fenotipos de importancia económica, y las interacciones evolutivas, ecológicas y humanas que afectan y/o explican la apariencia de dichos caracteres.

Gepts (2006) también destaca que la tecnología de marcadores moleculares ha mejorado nuestra comprensión de los recursos genéticos más que ningún otro tipo de dato genético.

### 2.6.4 Estrategia de evaluación y utilización de las colecciones de germoplasma de cebada en INIA-La Estanzuela

En INIA La Estanzuela se ha conformado una colección dinámica de germoplasma para mancha borrosa, que se evalúa en cuanto a la respuesta a la enfermedad en planta adulta desde 1992 y en plántula desde el 2003. Los materiales más promisorios destacados son integrados como líneas parentales en los bloques de cruzamiento para combinarse con material elite local.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 GENOTIPOS

En el Cuadro 4 se listan los 34 genotipos de cebada que se analizaron en este trabajo. Dichos materiales difieren entre si en sus orígenes (Estados Unidos, ICARDA-CIMMYT, Canadá, Corea del Norte, Uruguay, Suiza, Inglaterra y Australia); tipo de espiga (18 genotipos de 6 hileras, 16 de 2); y en categoría de material genético (17 líneas experimentales, 14 cultivares, y 3 líneas elite local). Todos excepto Bowman, Robust y Stander (31/34) pertenecían a la colección de mancha borrosa de INIA La Estanzuela (1998-2002). Los cultivares Quebracho y Clipper se incluyeron como testigos susceptibles.

**Cuadro 4: Genotipos elegidos para los análisis.**

| Genotipo                                       | Abreviación | No. hileras | Categoría           | Pedigrí  | Origen          |
|--|-------------|-------------|---------------------|--|-----------------|
| ND B112  | ND_B        | 6           | Línea experimental  | Reselección de Kindred C16969/C17117-17            | EEUU            |
| Morex  | Morex       | 6           | Cultivar            | Cree* /Bonanza                                     | EEUU            |
| Robust   | Robu        | 6           | Cultivar            | Morex/Manker                                       | EEUU            |
| Dickson  | Dick        | 6           | Cultivar            | 2*Traill/CI 10968//ND B112                         | EEUU            |
| Bonanza  | Bona        | 6           | Cultivar            | Vantage/Jet//Vantmore/3/2*Parkland/4/Conquest      | Canadá          |
| Harrington                                     | Harri       | 2           | Cultivar            | Klages/Gazelli//Betzes/Centennial                  | Canadá          |
| Sudan  | Sudan       | 6           | Cultivar            | CI 6489/CI 6489                                    |                 |
| TR6  | TR6         | 6           | Línea Experimental  | Sin información.                                   |                 |
| TR9  | TR9         | 6           | Línea Experimental  | Sin información.                                   |                 |
| 12IBYT#25                                      | 12IB#25     | 6           | Línea Experimental  | P_Dulce/Barberousse//Gloria-Bar/Come_B             | ICARDA-CIMMYT   |
| 4259/CI5831//SMA1/3/Patty B' /4/Shyri          | CY_A        | 2           | Línea Experimental  | 4259/CI5831//SMA1/3/Patty B' /4/Shyri              | ICARDA-CIMMYT   |
| Gloria/Come                                    | CY_B        | 6           | Línea Experimental  | Gloria/Come  | ICARDA-CIMMYT   |
| Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen              | CY_C        | 2           | Línea Experimental  | Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen                  | ICARDA-CIMMYT   |
| Nadja/Shyri//Gloria/Copal                      | CY_D        | 2           | Línea Experimental  | Nadja/Shyri//Gloria/Copal                          | ICARDA-CIMMYT   |
| Arupo/K8755//Mora                              | CY_E        | 2           | Línea Experimental  | Arupo/K8755//Mora                                  | ICARDA-CIMMYT   |
| Anca/2469//Valeriana/3/Shyri/4 /Patty.B/Ruda// | CY_F        | 2           | Línea Experimental  | Anca/2469//Valeriana/3/Shyri/4/Patty.B/Ruda//      | ICARDA-CIMMYT   |
| Norteña Daymán                                 | N_Day       | 2           | Cultivar            | ND 7085/ND 4994-15//ND 8968                        | EEUU            |
| CLE 202  | C_202       | 2           | Cultivar            | FNCl-22/Defra                                      | ROU             |
| CLE 218  | C_218       | 2           | Línea elite local   | CL120/E.Acacia                                     | ROU             |
| CLE 222  | C_222       | 2           | Línea elite local   | E.Acacia/CL136                                     | ROU             |
| Bowman   | Bowm        | 2           | Cultivar            | Klages//Fergus/Nordic/3/ND1156/4/Hector            | EEUU            |
| Cerise/Shyri/Aleli                             | Cerise      | 2           | Línea Experimental  | Cerise/Shyri/Aleli                                 | CIMMYT-ICARDA   |
| Stander  | Stand       | 6           | Cultivar            | Excel/M80-224                                      | EEUU            |
| Manker   | Mank        | 6           | Cultivar            | Cree/4/Parkland*2/NDB112/3/Vantage/2/Kindred/Jotun | EEUU            |
| Chevron  | Chev        | 6           | Cultivar            | Variedad de campo                                  | Suiza           |
| CI2291   | CI_22       | 2           | Línea Experimental  | CI_1326/CI_1326                                    | EEUU            |
| CI3331   | CI_33       | 2           | Línea Experimental  | Variedad de campo                                  | Inglaterra      |
| CI5098   | CI_50       | 6           | Línea Experimental  | Variedad de campo                                  | Corea del Norte |
| CI7251   | CI_72       | 6           | Cultivar (Moore)    | 2*Barbless/Chevron//Olli                           |                 |
| Tx7933   | Tx_33       | 6           | Línea Experimental  | Tokak/KY79-44//TAMBAR 401                          | EEUU            |
| Tx7934   | Tx_34       | 6           | Línea Experimental  | Tokak/KY79-44//TAMBAR 401                          | EEUU            |
| Pr434771                                       | Pr          | 6           | Línea Experimental  | Sin información                                    |                 |
| E. Quebracho                                   | E_Que       | 2           | Testigo susceptible | Atlas57//Prior/Ymer/3/B6671                        | Australia       |
| Clipper  | Clipp       | 2           | Testigo susceptible | Prior A/Proctor                                    | Australia       |

### 3.2 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN PLANTA ADULTA EN LA COLECCIÓN MANCHA BORROSA DE INIA LA ESTANZUELA

La colección de cebada para resistencia a mancha borrosa de INIA La Estanzuela es dinámica y abierta. Por año se evalúan cientos de líneas; para un número más reducido de ellas se dispone de más de un año de datos. En consecuencia, el análisis de los datos de la colección para el período 1998-2002 se realizó en dos etapas. En primer lugar, a partir del análisis de 1900 registros (combinación genotipo/año) de resistencia en planta adulta se seleccionaron 31 genotipos en base a: i) buen comportamiento reportado frente a mancha borrosa en el período considerado (24) y ii) buen comportamiento agrónomicos y/o calidad industrial (5). También se incluyeron dos testigos susceptibles (Estanzuela Quebracho y Clipper). En segundo lugar, se construyó un histograma con los datos de severidad de los 31 genotipos en el período y se clasificaron los materiales en base a su comportamiento sanitario. Las fechas de siembra, tipo de inoculación y detalles de las lecturas realizadas para el registro de nivel de resistencia se describen en el Anexo 1.

### 3.3 EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN PLÁNTULA

#### 3.3.1 Diseño experimental

Se evaluaron 33 genotipos de cebada (Cuadro 4). No se incluyó el cultivar Manker por problemas de germinación. Se sembraron en invernáculo en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Cada bloque estaba constituido de siete bandejas con nueve materiales cada una, menos una que contenía cinco. Cada bandeja constaba de un testigo susceptible (Estanzuela Quebracho o Clipper). Las plantas se sembraron en una mezcla de tierra:arena:sustrato en partes iguales y se mantuvieron a 20 °C con 17 horas de luz y 7 de oscuridad.

#### 3.3.2 Producción de inóculo e inoculación

El inóculo fue producido sobre la base de una mezcla de aislamientos monospóricos de *C. sativus* pertenecientes a la colección de la estación experimental INIA La Estanzuela. Esta mezcla estuvo compuesta por aislamientos provenientes de diferentes localidades (Paysandú, Young, La Estanzuela y Ombúes de Lavalle), años (1994, 1996 y 2001) y genotipos (Cuadro 5). De esta forma se buscó asegurar variabilidad en el hongo. Los aislamientos fueron mantenidos en cristales de silica gel o medio de cultivo

papa-dextrosa agar (PDA) ambos en heladera (4°C). La multiplicación del inóculo se produjo a partir de transferencia de algunos cristales de silica gel conteniendo al hongo, a placas de Petri con PDA, o mediante un raspado de cultivo sólido de *C. sativus* en PDA y posterior incubación en el mismo medio de cultivo, durante 18 días a 20-22°C y con 12 horas de fotoperíodo.

Cuadro 5: Origen (cultivar y localidad) y año de muestreo de los aislamientos monospóricos de *C. sativus* utilizados en la inoculación.

| Código  | Cultivar     | Localidad     | Año  |
|---------|--------------|---------------|------|
| 1       | N. Carumbé   | Paysandú      | 2001 |
| 2       | Q. Palomar   | Paysandú      | 2001 |
| 3       | NCL 94088    | Paysandú      | 2001 |
| 4       | E. Quebracho | Paysandú      | 2001 |
| 5       | Clipper      | Paysandú      | 2001 |
| HS 94-7 | FNC 6-1      | Young         | 1994 |
| HS 94-3 | AUS 490286   | La Estanzuela | 1994 |
| 8       | E. Quebracho | O. de Lavalle | 1996 |

El inóculo se obtuvo mediante agregado de agua destilada y posterior raspado de la superficie del medio de cada placa con una espátula de vidrio. Esta suspensión fue filtrada en gasa para remover todo fragmento de micelio. La concentración de conidios en la suspensión se cuantificó con hemacitómetro y se llevó posteriormente a una concentración de  $5 \times 10^3$  conidios/ml. Para mejorar el contacto gota-hoja se agregó polioxietileno 20-sorbitan monolaureato (TWEEN20, Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) a razón de una gota cada 20 ml de suspensión. Las plántulas se inocularon al estado de segunda hoja totalmente expandida a razón de 0.3 ml de suspensión de esporas por cada plántula. El inóculo fue aplicado usando un pincel de aire (VL set, Paasche Air Brush Company, Har Wood Heights, EEUU) accionado por un compresor (Motor Division St. Louis, SA55JXHTP-4698 CAT G230CX, MO. EEUU) con una presión de aire de 0.83 Kg./cm<sup>2</sup>. Luego de la inoculación las plántulas permanecieron en la oscuridad en un ambiente con 100% de humedad relativa por 24 horas, y se retornaron al invernáculo hasta el momento de la lectura.

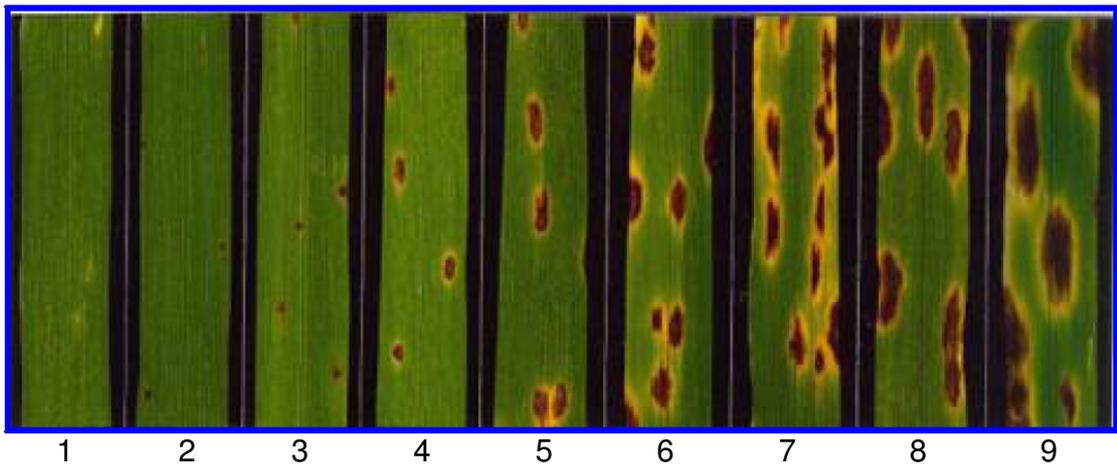
Una cuarta repetición fue inoculada con agua estéril con el fin de corroborar cuánto de la enfermedad medida podía provenir de la inoculación y cuanto de otros factores ya que el organismo causal tiene una gran eficiencia de pasaje de semilla a primera hoja (Pereyra, 1996). Este bloque no se incluyó en el análisis estadístico.

### 3.3.3 Evaluación de la respuesta a la infección

La lectura de la respuesta a la infección (RI) se realizó a los once días después de la inoculación momento en que el testigo expresaba lesiones susceptibles, pero previo a que las lesiones se superpusieran entre sí.

La RI se midió según la escala (1 a 9) de Fetch y Steffenson (1999) (Figura 4) donde las calificaciones se agrupan según la compatibilidad patógeno-hospedero. Lecturas de tipos de infección 1, 2 y 3 corresponden a reacciones patógeno-hospedero de baja compatibilidad (resistente), 4 y 5 compatibilidad media y 6, 7, 8 y 9 compatibilidad alta (susceptible).

Figura 4: Escala de respuesta a la infección de *C. sativus* en plántulas de cebada.



Fuente: Fetch y Steffenson (1999)

### 3.3.4 Análisis de datos

Los datos de RI fueron analizados mediante un procedimiento mixto (Mixed procedure) del programa The SAS System (SAS Institute, 1996). Para esto se tomó como efecto fijo a los genotipos (variedades y líneas) y el efecto de bloque se definió como aleatorio. Las diferencias significativas del comportamiento sanitario de los genotipos se obtuvieron mediante una prueba de Tukey-Kramer sobre el logaritmo de las medias ajustadas de cada genotipo.

### 3.4 ESTIMACIÓN DE COEFICIENTES DE COANCESTRÍA

Los coeficientes de coancestría ( $r$ ) entre los genotipos analizados fue calculada a partir de datos genealógicos obtenidos de la base de datos GRIN disponible en Internet (USDA. AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 2003).<sup>1</sup>  
<sup>2</sup> <sup>3</sup> <sup>4</sup> Para el cálculo de  $r$  se utilizaron los supuestos enumerados por Cox et al (1985), que son: i) un individuo recibe la mitad de los genes de cada progenitor, ii) los progenitores fueron homogéneos y homocigotas y iii) los ancestros con pedigrí desconocidos no están relacionados entre si ( $r = 0$ ). Los cálculos fueron realizados utilizando el programa KIN versión 1.04, de Tinker y Mather (1993b). Una excepción del supuesto ii) ocurre cuando se trata de una selección a partir de un antecesor heterogéneo, como una variedad de campo. En este caso y según Tinker y Mather (1993a), el coeficiente de parentesco entre una variedad de campo y una selección de esta es de 0.75. Para simular esta asunción en el KIN, se considera una consanguinidad de 0.5 para cada variedad de campo.

### 3.5 PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN RAPD

#### 3.5.1 Extracción de ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de cebada se extrajo mediante una modificación del protocolo descrito por Tinker et al. (1992). Una muestra de aproximadamente 150 mg. de hoja fresca o en su defecto conservadas a  $-85^{\circ}$  C, se maceró en presencia de 0.6 ml. de buffer CTAB e incubó a una temperatura de  $60^{\circ}$  C durante 45 min. Luego, se agregó 0.6 ml. de alcohol cloroformo/isoamil (24:1) y se centrifugó a 12000g por 5 min. a  $4^{\circ}$  C. A la fase acuosa resultante, removida y transferida a un micro tubo de 1.5 ml, se le agregó igual volumen de isopropanol frío y se dejó precipitar 15 min. a  $-20^{\circ}$  C. El precipitado resultante luego de centrifugar a 17000g por 10 min. a  $4^{\circ}$  C, conteniendo ADN, se resuspendió en 50  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8).

---

<sup>1</sup> Pereyra, S. 2003. Com. personal

<sup>2</sup> Germán, S. 2003. Com. personal

<sup>3</sup> Capettini, F. 2003. Com. personal

<sup>4</sup> Marshall, R. 2003. Com. personal

### 3.5.2 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN extraído fue estimada por comparación visual con cantidades de ADN conocidas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 3 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Tres diluciones del ADN de cada individuo (1:1; 1:2 y 1:4) de la resuspensión lograda de cada extracción se compararon con tres cantidades conocidas de un ADN genómico comercial (100, 50 y 25 ng).

### 3.5.3 Condiciones de amplificación

Las reacciones de amplificación, se realizaron en un volumen final de 25µl compuesto por solución tampón (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl), entre 3 y 4 ng de ADN genómico, 200 nM de iniciador (Operon), 100 µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> y 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un termociclador mediante un programa de 45 ciclos de 1 min. a 92º C, 1 min. a 35º C, 2 min. a 72º C, con un etapa inicial de 5 min. a 94º C, una extensión final de 4 min. a 72º C, y una temperatura de tapa de 105º C. Los productos de amplificación se migraron en un gel de agarosa al 1.5% (peso/volumen) utilizando el tampón TAE (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M edta) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. En el Cuadro 6 se listan los iniciadores que se utilizaron junto a su secuencia.

Cuadro 6: Iniciadores utilizados en las amplificaciones aleatorias de ADN.

| <b>Código</b> | <b>Secuencia</b> |
|---------------|------------------|
| OPV 14        | AGATCCCGCC       |
| OPV 20        | CAGCATGGTC       |
| OPV 18        | TGGTGGCGTT       |
| OPR 17        | CCGTACGTAG       |
| OPR 20        | ACGGCAAGGA       |
| OPT 7         | GGCAGGCTGT       |

### 3.6 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA BASADOS EN DATOS GENEALÓGICOS Y MARCADORES RAPD

A partir de los coeficientes *r* estimados se construyó una matriz de similaridad. Esta matriz se depuró de tal manera de retener únicamente aquellos genotipos que estuvieran emparentados con al menos un genotipo. Seguidamente, se transformó esta matriz en una matriz de disimilaridad. La transformación se hizo a partir de la formula:

$$[2(1-r)]^{1/2}$$

donde  $r$  es el coeficiente de coancestría.

Para el caso del análisis con marcadores RAPD, la matriz de similaridad se construyó por el método de asociación simple ( $\delta_{ii'}=[a+d]/[a+b+c+d]$ ), donde  $\delta_{ii'}$  es la similaridad entre el individuo  $i$  e  $i'$ ; y  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$  son combinaciones de presencia y/o ausencia para una banda en dos individuos. La frecuencia con la cual se presentan estas cuatro se resume en una tabla 2x2 como la siguiente:

| Objeto $i$ | objeto $i'$ |     |
|------------|-------------|-----|
|            | 1           | 0   |
| 1          | (a)         | (b) |
| 0          | (c)         | (d) |

Después de haber obtenido la matriz de distancias para ambos métodos, pedigrí y molecular, se procedió a analizarlas mediante la rutina de análisis de conglomerados de acuerdo a Ward (1963) del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1996). Para estimar el número de grupos definidos en cada dendrograma se consideró aquel asociado al mínimo valor de la variable pseudo  $T^2$  (PST<sup>2</sup>).

A los efectos de analizar si se detectan diferencias significativas entre los valores de RI promedios de los grupos detectados en cada dendrograma se utilizó un procedimiento GLM de paquete estadístico The SAS System.

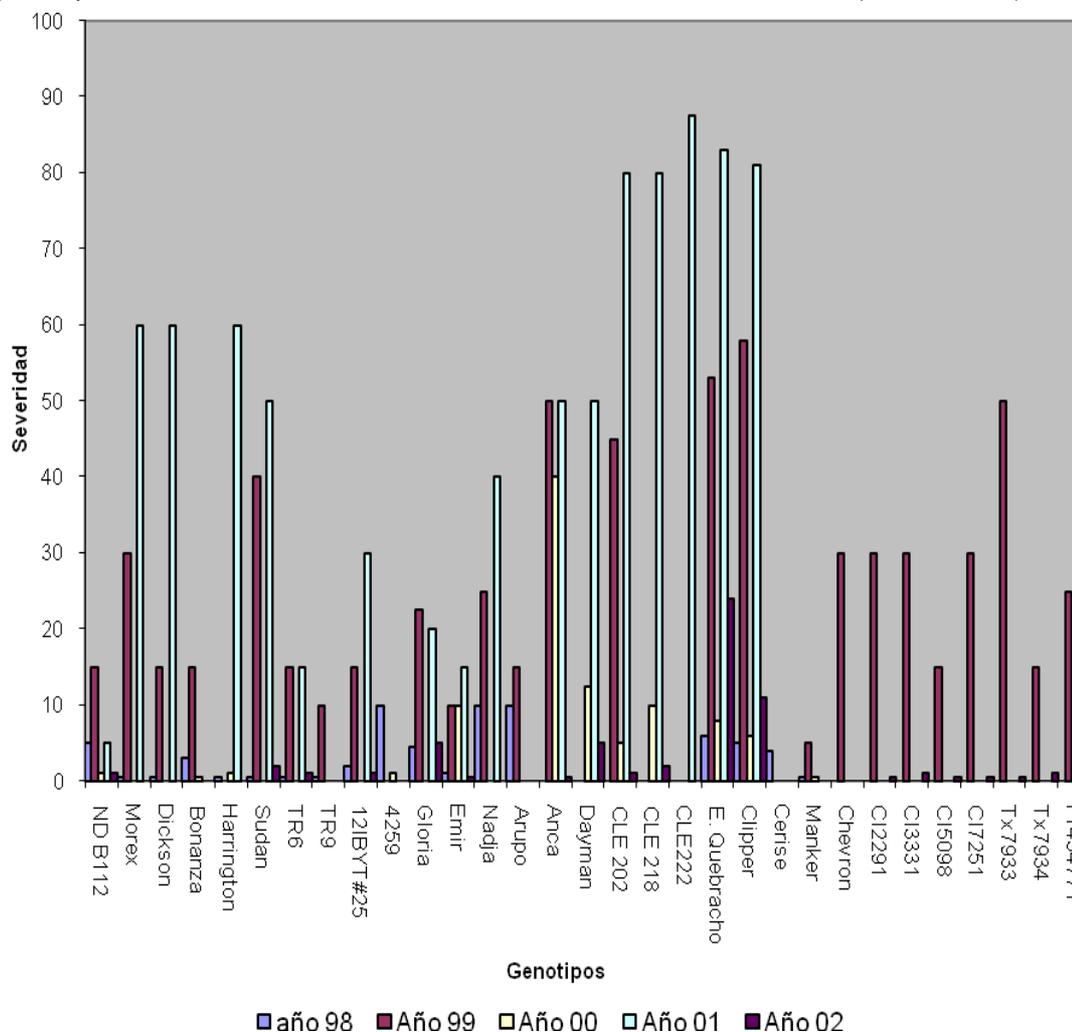
Finalmente, se analizó la asociación entre nivel de resistencia a plántula y presencia/ausencia de cada marcador RAPD mediante un procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1996).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN PLANTA ADULTA DE CEBADA DE LA COLECCIÓN DE MANCHA BORROSA DE INIA LA ESTANZUELA (1998-2002)

Los niveles de mancha borrosa, medidos como porcentaje de área foliar afectada (severidad), de 31 materiales pertenecientes a la colección de cebadas de INIA La Estanzuela evaluados en el período 1998-2002 se presentan en la Figura 5. Se observa que para la serie de años considerada el rango de severidad detectado fue de 0 a 87%, donde los testigos susceptibles presentaron valores que se encontraron en un rango de 6% a 83% para E. Quebracho y de 5 a 81% para Clipper (Anexo 2).

Figura 5: Severidad promedio de mancha borrosa en planta adulta en 31 genotipos de una colección de cebada de INIA La Estanzuela (1998-2002).



Nota: La tabla de datos con los valores originales a partir de los cuales se construyo la grafica se presentan el Anexo 2

Cabe destacar que los valores de infecciones independientemente del genotipo tienen un componente importante de efecto año. Además este mismo efecto hace que en cada año sean más predominante algunas manchas foliares que otras. Antes de analizar la diferencia de enfermedad entre genotipos, se definirá la característica de cada año.

El criterio para definir la calidad del año para la evaluación de enfermedades es el siguiente: cuando el promedio de los valores de infección de los testigos susceptibles es superior a los 30% se toma como un año informativo para evaluar manchas foliares. Esto ocurrió en los años 1999 y 2001.

En el año 1999 el promedio de severidad fue de 27%, y los valores de los testigos susceptibles Clipper y E. Quebracho fueron de 58 y 53%, respectivamente. Por su parte en el 2001, el promedio de severidad fue de 49%, y los valores de los testigos susceptibles Clipper y E. Quebracho fueron de 81 y 83%, respectivamente. En el año 1999 se observó también mancha en red causada por *D. teres* mientras que en el año 2001 se observó además de mancha borrosa niveles importantes de escaldadura causada por *R. secalis* (Anexo 3).

Los años 1998, 2000 y 2002 no fueron informativos debido a los bajos valores de severidad detectados. En el 1998 se aprecia que el promedio de severidad fue de 3%, y los valores de los testigos susceptibles Clipper y E. Quebracho fueron de 5 y 6 %, respectivamente. Análogamente, en el año 2000 el promedio de severidad fue de 8%, y los valores de los testigos susceptibles Clipper y E. Quebracho fueron de 6 y 8 %, respectivamente. Finalmente, en el año 2002 el promedio de severidad fue de 2%, y los valores de los testigos susceptibles Clipper y E. Quebracho fueron de 11 y 4 %, respectivamente. En estos tres años junto a mancha borrosa se observó escaldadura, causada por *R. secalis* (Anexo 3)

De acuerdo a los datos de la Fig. 5 se pueden distinguir cinco grupos de materiales según al nivel y estabilidad de la resistencia a mancha borrosa. En primer lugar, se destacan los materiales ND B112, TR 6, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C) ya que presentan menos de 15% de severidad durante los cuatro o cinco que se dispone de datos.

En segundo lugar se distinguen los materiales Bonanza, TR9, 4259/CI5831//SMA1/3/Patty`B`/4/Shyri (CY\_A), Arupo/K8755//Mora (CY\_E), Cerise y Manker con buenos niveles de resistencia con un máximo de 15% de severidad en dos o tres años de evaluación pero que no incluyen al año 2001. Dado que el año 2001 resultó ser muy informativo para discriminar los genotipos entre resistentes y susceptibles y se carece de información para este año se optó por distinguir estos seis genotipos de los tres anteriormente citados.

En tercer lugar, otro grupo de materiales con dos tres y cuatro años de evaluación tienen buenos comportamientos excepto en el año 2001 en el cual

muestran un aumento notorio en la severidad. Dentro de estos se encuentran los genotipos Dickson que en el 1998 y 1999 presenta valores de severidad de 0 y 15%, respectivamente, pero en cambio en el año 2001 presenta 60%, lo que lo ubica en valores muy similares a los de los testigos susceptibles; Harrington con 1% en 2000 y 60% en 2001 y Nadja/Shyri//Gloria/Copal (CY\_D) con 10, 25 y 40% para los años 1998, 1999 y 2001, respectivamente.

En cuarto lugar, se destacan genotipos con bajos niveles de resistencia incluyendo Morex, Sudan, Anca/2469//Valeriana/3/Shyri/4/Patty.B/Ruda// (CY\_F), Gloria/Come (CY\_B), y las elite locales N. Daymán, CLE 202, CLE218 y CLE 222 con niveles de severidad entre 20 y 87% para los años de alta infección (1999 y 2001).

Por último se encuentran los materiales reportados por su buen nivel de resistencia por Steffenson et al. (1998) que incluyen CI 2291, CI 3331, CI 5098, CI7251, Tx 7933, Tx 7934 y Pr 434771 además de Chevron (fuente de resistencia de decoloración de grano; Gebhardt et al., 1992). Todos estos materiales fueron evaluados los años 1999 y 2002 con la excepción de Chevron que solo presenta datos en 1999. De este grupo se distinguen como materiales muy promisorios CI 5098 y Tx 7934 con valores de severidad de 15% para el año 1999, siendo el resto de comportamiento no satisfactorio.

#### 4.2 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A MANCHA BORROSA EN ESTADO DE PLÁNTULA

Con el objetivo de complementar los datos de resistencia en planta adulta se realizó un ensayo de evaluación de resistencia en plántula en invernáculo. En este ensayo se incluyeron 33 materiales descritos en el Cuadro 7. Con respecto a los 31 previamente descritos se agregaron los cultivares Bowman, Stander y Robust por tener reportado buen comportamiento a mancha borrosa (pero sin datos en la colección de mancha borrosa de 1998-2002). El cultivar Manker no fue incluido en este ensayo debido a problemas de germinación.

El rango de RI en este ensayo cubrió parcialmente la escala de 1 a 9 definida por Fetch y Steffenson (1999). Los valores de medias ajustadas de RI observados abarcaron valores desde 2 a 7. Por otro lado las lecturas en los testigos susceptibles fueron de 5 en Clipper y E. Quebracho. De acuerdo a la escala de 1 a 9 esos últimos datos indicarían un nivel medio de compatibilidad patógeno-hospedero, mientras compatibilidades altas (susceptibilidad) se asocian a valores de 6 y 9. Por último se observa un alto grado de solapamiento entre los intervalos de confianza de las medias ajustadas de cada genotipo (Cuadro 7).

Para identificar a los genotipos con mejor valor de resistencia a mancha borrosa se consideraron aquellos cuyas medias ajustadas difirieron estadísticamente de las correspondientes a ambos testigos susceptibles. Por lo tanto los genotipos resistentes del ensayo fueron TR 6, ND B112, CI 2991, 12IBYT#25, Bowman y Tx 7934. Sin embargo, se puede observar que para los genotipos N. Daymán, Gloria/Come, Pr 434771 y CI 5098, las medias ajustadas difieren significativamente del testigo más susceptible (Clipper).

Cuadro 7: Medias ajustadas de los valores de respuestas de infección (RI) a mancha borrosa en plántula y evidencia de diferencias significativas entre ellas por el método Tukey-Kramer en 33 genotipos de cebada.

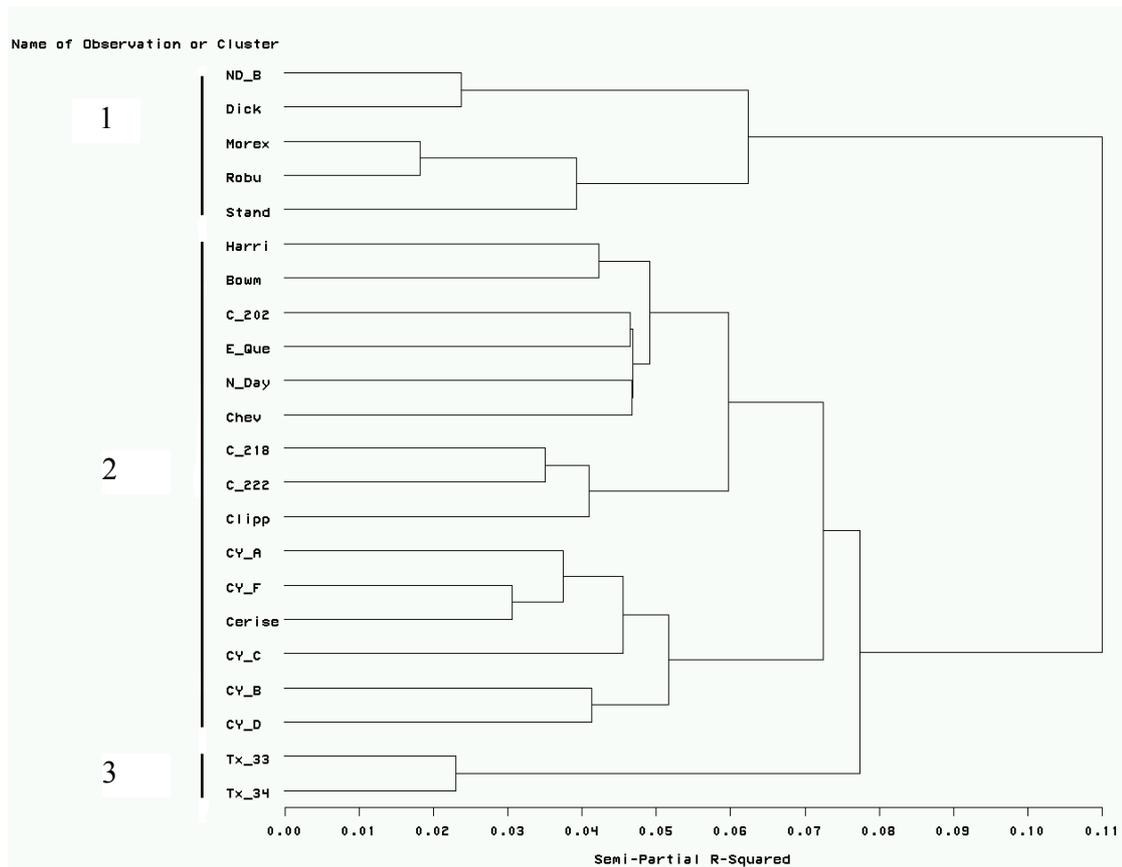
| <b>Material</b>                    | <b>Media ajustada de RI</b> | <b>Tukey-Kramer</b> |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| TR6                                | 2                           | a                   |
| ND B112                            | 2                           | ab                  |
| 12IBYT#25                          | 2                           | abc                 |
| CI2291                             | 2                           | abc                 |
| Tx7934                             | 2                           | abc                 |
| Bowman                             | 2                           | abc                 |
| Pr434771                           | 3                           | abcd                |
| N. Daymán                          | 3                           | abcd                |
| Gloria/Come                        | 3                           | abcd                |
| CI5098                             | 3                           | abcd                |
| CI3331                             | 3                           | abcde               |
| Stander                            | 3                           | abcde               |
| CI7251                             | 3                           | abcde               |
| TR9                                | 3                           | abcde               |
| Dickson                            | 3                           | abcde               |
| Sudan                              | 3                           | abcde               |
| CLE 218                            | 3                           | abcde               |
| Nadja/Shyri//Gloria/Copal          | 3                           | abcde               |
| Morex                              | 3                           | abcde               |
| Robust                             | 4                           | abcde               |
| 4259/CI5831//SMA1/3/Patty`B´...    | 4                           | abcde               |
| Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri...    | 4                           | abcde               |
| Bonanza                            | 4                           | abcde               |
| CLE 202                            | 4                           | bcde                |
| CLE222                             | 4                           | bcde                |
| Arupo/K8755//Alelí                 | 4                           | bcde                |
| Cerise/Shyri/Aleli                 | 4                           | bcde                |
| Harrington                         | 5                           | cde                 |
| Chevron                            | 5                           | cde                 |
| E. Quebracho (testigo susceptible) | 5                           | de                  |
| Tx7933                             | 5                           | de                  |
| Clipper (testigo susceptible)      | 5                           | e                   |
| Anca/2469//Valeriana/3/Shyri.....  | 7                           | e                   |

Nota: Diferencias de  $Pr>|t| \geq 0.10$  se atribuye la misma letra

### 4.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA BASADO EN COANCESTRÍA

El coeficiente de coancestría se calculó entre 25 de los 34 genotipos listados en el Cuadro 4. Para los genotipos TR6, TR9, 12IBYT#25, Pr 434711, CI 2291, CI 3331, Arupo/K8755//Mora, Sudan y CI 5098 no se dispuso de información de pedigrí y/o no presentaban parentesco con ninguno de los demás. Sin embargo, para el análisis de conglomerado tampoco se incluyeron los datos relativos a los genotipos Bonanza, Manker y CI 7251 porque no se obtuvo ADN para su posterior análisis molecular. En consecuencia, en la Figura 6 se muestra el dendrograma obtenido a partir de la matriz de disimilaridad construida con los coeficientes de coancestría de 22 materiales.

Figura 6: Dendrograma para 22 genotipos de cebada a partir de una matriz de datos de disimilaridad basada en los datos de coancestría.



De acuerdo a los valores de la variable  $PST^2$  descrito en el cuadro 8, el

número de grupos que se asocia al primer mínimo detectado en la variable  $PST^2$  corresponde a tres grupos. De esta manera en el dendrograma de la figura 6 podrían identificarse tres grupos principales.

Cuadro 8: Valores de  $PTS^2$  asociados al dendrograma de la Figura 6

| No. grupos | $PTS^2$ |
|------------|---------|
| 1          | 2.5     |
| 2          | 1.7     |
| 3          | 1.6     |
| 4          | 2.3     |
| 5          | 1.4     |
| 6          | 1.3     |
| 7          | 1.1     |
| 8          | 1       |

El grupo 1 (cinco genotipos) se encuentra formado por materiales de seis hileras provenientes de Minnesota, Estados Unidos. Estos materiales tienen como particularidad que pertenecen a un mismo programa de mejoramiento (Universidad de Minnesota). El ND B112 forma parte del programa de mejoramiento como progenitor.

El grupo 2 se compone de 15 genotipos, de los cuales prevalecen los de dos hileras (13/15). Dentro de este grupo se identifican claramente dos subgrupos. Uno se encuentra formado por la totalidad (6/6) de los genotipos provenientes de ICARDA-CIMMYT, y el otro básicamente por genotipos de Estados Unidos (Harrington, Bowman y N. Daymán) y australianos (Clipper y E. Quebracho) vinculados a programa de mejoramiento de cebada de INIA (líneas avanzadas CLE 202, CLE 218 y CLE 222). Los únicos materiales de seis hileras son Gloria/Come (CY\_B) (ICARDA-CIMMYT) y Chevron (Suiza), línea experimental y variedad de campo, respectivamente.

Por último, el grupo 3 está formado por genotipos de seis hileras, hermanos enteros, perteneciente a un programa de mejoramiento del estado de Texas, Estados Unidos.

El dendrograma basado en el coeficiente de coancestría separó claramente los grupos según su lugar de origen. Esto no llama la atención dado que los programas de mejoramiento de cebada utilizan básicamente materiales adaptados para las condiciones existentes en cada región como base para el mejoramiento de nuevos genotipos; lo que redundaría en un creciente grado de

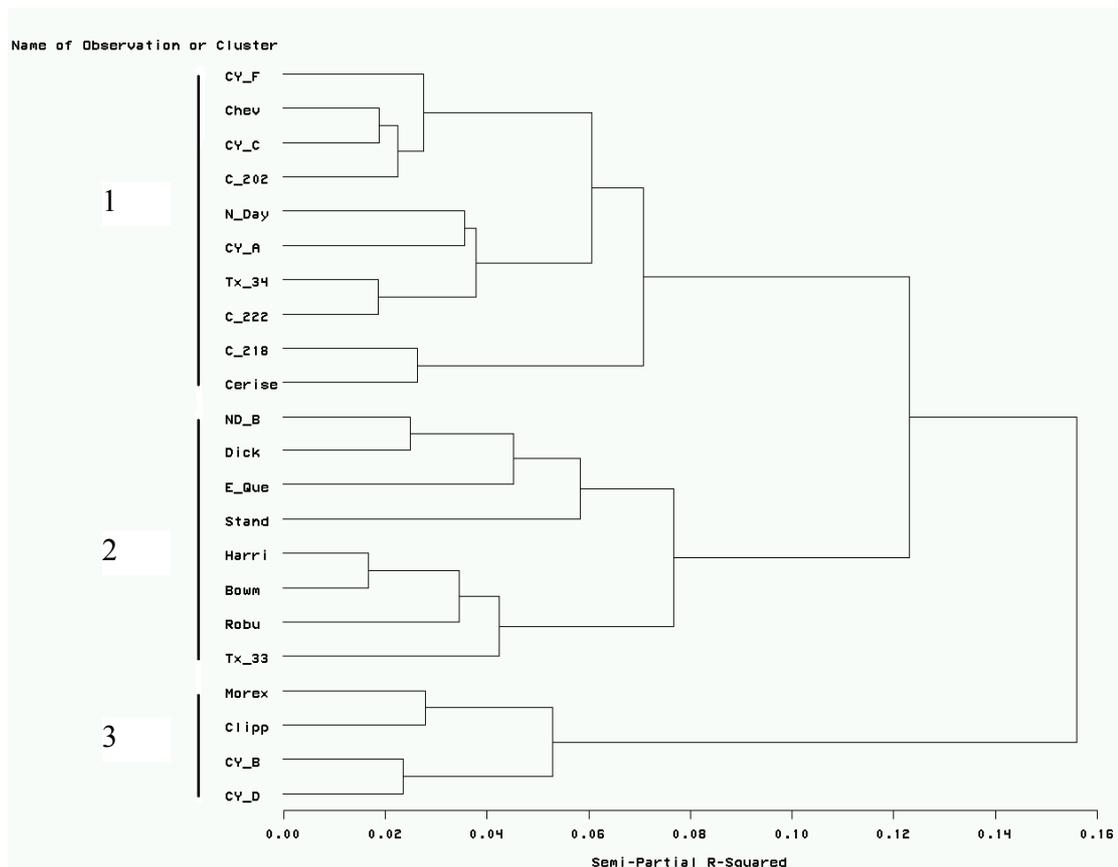
parentesco entre ellos y explica en parte los resultados obtenidos en este caso.

#### 4.4 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA CON MARCADORES MOLECULARES

La amplificación de ADN genómico de 22 genotipos (ver 4.3) de cebada utilizando seis iniciadores produjo un total de 55 bandas. Para el análisis se eliminaron 8 por ser monomórficas. Entre las 47 bandas analizadas, 31 presentaron alta intensidad.

El dendrograma de la figura 7 se obtuvo a partir de una matriz de disimilaridad utilizando 31 bandas polimórficas. No se apreciaron diferencias en la estructura del dendrograma cuando se consideraron las 47 bandas totales.

Figura 7: Dendrograma para 22 genotipos de cebada a partir de una matriz de datos de disimilitud basada en los datos de marcadores RAPD.



De acuerdo al valor de la variable  $PST^2$  (Cuadro 9), el número estimado de grupos presentes en el dendrograma sería tres.

Cuadro 9: Valores de PTS<sup>2</sup> para el análisis a partir de los datos moleculares.

| No. grupos | PTF <sup>2</sup> |
|------------|------------------|
| 1          | 3.7              |
| 2          | 3.2              |
| 3          | 2.1              |
| 4          | 2.3              |
| 5          | 2.3              |
| 6          | 1.7              |
| 7          | 2.1              |
| 8          | 1.8              |

En la Figura 7 se puede ver que cuatro de los seis materiales del ICARDA-CIMMYT se encuentran en el grupo 1 y los restantes dos se encuentran en el grupo 3. A su vez, el grupo 2 nuclea a todos los materiales de Dakota del Norte y Minnesota exceptuando a Morex.

Por otro lado los tres materiales del programa de mejoramiento de INIA La Estanzuela (CLE 218, CLE 202 y CLE222) se encuentran agrupados en el grupo 1.

#### 4.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DEL NIVEL DE RI PROMEDIO ENTRE GRUPOS DEFINIDOS POR COANCESTRÍA Y POR EL NIVEL DE POLIMORFISMO OBTENIDO POR MARCADORES RAPD

Las medias ajustadas de RI de cada grupo definido en el dendrograma del análisis de coancestría (Figura 6) se presentan en la Cuadro 10. Las comparaciones múltiples realizadas por el método Tukey-Kramer no ponen en evidencia diferencias significativas entre ellas (Cuadro 11).

Cuadro 10: Medias ajustadas de RI y su correspondiente error estándar para cada grupo formado en el dendrograma de coancestría.

| Grupo | Media ajustada de respuesta a infección | Error estándar |
|-------|---|----------------|
| 1     | 3.0032                                  | 0.51129915     |
| 2     | 3.9862                                  | 0.2951987      |
| 3     | 3.7775                                  | 0.80843494     |

Cuadro 11: Significancia de comparaciones múltiples entre grupos formados en el dendrograma de coancestría.

| Grupo | Grupo | Pr> t * |
|-------|-------|---------|
| 1     | 3     | 0.7018  |
| 1     | 2     | 0.2441  |
| 2     | 3     | 0.9682  |

\*Prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

Análogamente, el Cuadro 12 describe los valores de medias ajustadas para el RI para los grupos identificados en el dendrograma basado en los marcadores RAPD (Figura 7). La comparación estadística de estas medias se describe en el Cuadro 13.

Cuadro 12: Medias ajustadas de RI y su correspondiente error estándar para cada grupo formado en el dendrograma de los datos moleculares.

| Grupo | Media ajustada de respuesta a infección | Error estándar |
|-------|---|----------------|
| 1     | 3.8872                                  | 0.38404575     |
| 2     | 3.57375                                 | 0.4293762      |
| 3     | 3.7255                                  | 0.60722965     |

Cuadro 13: Significancia de comparaciones múltiples entre grupos formados en el dendrograma de los datos moleculares

| Grupo | Grupo | Pr> t * |
|-------|-------|---------|
| 1     | 2     | 0.8507  |
| 1     | 3     | 0.9725  |
| 2     | 3     | 0.9773  |

\*Prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

Al igual que en el análisis anterior, no se detectaron diferencias significativas en el valor de RI entre los grupos formados en el dendrograma basado en marcadores moleculares RAPDs.

#### 4.6 ANÁLISIS DE ASOCIACION ENTRE MARCADORES RAPD Y NIVEL DE RESPUESTA A LA INFECCIÓN EN PLÁNTULA

Con el objetivo de estudiar si existe alguna asociación entre marcadores individuales y nivel de enfermedad se analizaron para los 22 genotipos descritos en las Figuras 6 y 7, los valores promedios de RI (escala ordinal) en ausencia o presencia de cada marcador (31) mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1996).

No se encontró diferencia significancia entre el valor de RI para ningún marcador. Vale la pena mencionar que en el caso de los marcadores M18 y M30 (Pr > F de 0.1478 y 0.1170, respectivamente) su presencia se asocia a menores valores de RI. En el caso del marcador M30 se detectó producto de amplificación únicamente en los materiales Bowman y N. Daymán. Dado este resultado sería necesario repetir la amplificación para descartar la presencia de falsos negativos o falsos positivos y/o desarrollar un nuevo marcador de mayor robustez a partir del análisis de la secuencia amplificada. Resulta interesante observar que estos genotipos están emparentados presentando un coeficiente de coancestría de 0.00023, y además son los únicos de los materiales analizados que pertenecen a una línea de mejoramiento de Dakota del Norte.

A continuación se estudió la prevalencia del producto de amplificación del marcador M18 entre los 22 genotipos evaluados. Considerando materiales resistentes en plántula aquellos que obtuvieron valores de RI estadísticamente diferente a ambos testigos susceptibles (Bowman, ND B112 y Tx 7934) se visualiza la presencia del marcador M18 en todos ellos (3/3), mientras para los 19 susceptibles restantes, nueve de ellos presentan la banda. Ahora si se utiliza

como criterio de resistencia valores de RI significativamente menores al los del testigo Clipper (se agregan Gloria/Come y N. Daymán), cuatro entre cinco de los resistentes presentan la banda M18. Por su lado, ocho de los 17 susceptibles también la presentan. Estos resultados indicarían que el marcador M18 no tendría una fuente de asociación con el fenotipo resistente. Sin embargo la frecuencia de esta banda es mucho más alta en el grupo de los resistentes comparado con el grupo de los susceptibles. Podría suponerse que esta banda representa una región del genoma conservada. A pesar de esto dicha banda aparece en fenotipos resistentes para los cuales el dendrograma basado en el coeficiente de coancestría los asignó a grupos diferentes. Sería deseable ampliar el análisis de la presencia del marcador M18 considerando la totalidad de los 33 genotipos de cebada analizados en el ensayo de plántula.

## 5 DISCUSIÓN

El desarrollo de materiales de cebada con niveles de resistencia efectivos frente a las razas de patógenos locales requiere la implementación de jardines de evaluación de un número importante de fuentes de resistencia. Generalmente estos tipos de ensayos aportan información en cuanto al comportamiento sanitario en planta adulta, por lo que para algunos materiales más interesantes se pueden realizar algunos ensayos de resistencia en plántula complementarios. Es deseable contar con estas dos fuentes de información ya que los determinantes genéticos de resistencia en plántula y en planta adulta suelen no coincidir. La caracterización detallada de los tipos de resistencias y de sus determinantes genéticos contribuye a una mejor utilización del germoplasma y optimiza el diseño de combinaciones entre tipos de resistencia complementaria (Steffenson et al., 1996).

El análisis de los niveles de resistencia a mancha borrosa en planta adulta (severidad) de la colección de INIA La Estanzuela (Fig. 5) permitió identificar tres genotipos con resistencia efectiva y estable frente a la población local del patógeno. Considerando niveles menores a 15% de severidad y cuatro años de evaluación (1998-2001) se destacaron los genotipos: ND B112, TR 6, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C). En un segundo plano, se distinguen los genotipos Bonanza, TX7934, CI 5098, Manker, TR9 y 4259/CI5831//SMA1/3/Patty`B´/4/Shyri (CY\_A) por presentar valores menores a 15%. Aunque estos materiales fueron evaluados en un solo año (1999), éste fue de alta infección, con la excepción de 4259/CI5831//SMA1/3/Patty`B´/4/Shyri (CY\_A) evaluado en 1998-1999. Ningún otro material mantuvo consistentemente en los años evaluados un buen comportamiento de resistencia. Llamativamente, el cultivar Morex, reportado como portador de resistencia durable a mancha borrosa tanto en plántula como planta adulta, se comportó como susceptible en las condiciones de evaluación de la colección.

De acuerdo a los agrupamientos detectados en el dendrograma de la Fig. 6 basados en coeficiente de coancestría se deduce que las tres fuentes de resistencia a mancha borrosa en planta adulta identificadas (ND B112, TR 6, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C) son altamente diversas. Mientras que NDB112 pertenece al grupo 1, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C) pertenece al grupo 2, específicamente en el subgrupo integrado por materiales de ICARDA-CIMMYT. El genotipo TR 6, no incluido en el análisis de coancestría, probablemente no tenga ningún tipo de parentesco con las otras dos fuentes. Estas fuentes podrían ser portadoras de diversos determinantes genéticos de resistencia a mancha borrosa.

La caracterización de resistencia a planta adulta utilizando severidad es apropiada para el caso de enfermedades que se desarrollan al final del ciclo del cultivo. Sin embargo, para el caso de manchas foliares asociadas potencialmente a sistemas de compatibilidad mediadas por toxinas, Fetch y Steffenson (1999) sugieren complementar la caracterización de resistencia a nivel de campo incorporando el dato de RI a la infección en planta adulta. Esto implica tener en cuenta el tamaño de las manchas y la presencia o ausencia de halo clorótico. Estos autores hacen un especial énfasis en el halo clorótico ya que en enfermedades como mancha parda del trigo causada por *Pyrenophora tritici-repentis* se comprobó que algunas toxinas son las responsables de producir el halo en los materiales más susceptibles, no siendo así en los resistentes (Gamba y Lamari, 1998). En consecuencia, para caracterizar con más precisión la resistencia en planta adulta a esta mancha foliar sería importante en el futuro complementar los datos analizados con información de RI en planta adulta.

El ensayo de caracterización de resistencia en plántula permitió identificar seis genotipos con respuesta a la infección estadísticamente diferente de los dos testigos: TR 6, ND B112, CI 2991, 12IBYT#25, Bowman y Tx 7934. Coincidiendo con el comentario realizado para las mejores fuentes de resistencia en planta adulta, las mejores fuentes de resistencia en plántula son altamente diversas entre si. De esta manera y de acuerdo al dendrograma de la Fig. 6, ND B112 se ubica en el grupo 1, Bowman en el grupo 2, Tx 7934 en el grupo 3, mientras que TR 6, CI2991, 12IBYT#25 no incluidos en el dendrograma tienen muy alta probabilidad de no estar emparentados con ninguno de ellos.

La particularidad del ensayo de resistencia en plántula fue el estrecho rango (2-7) de respuesta a la infección detectado para una escala de 1 a 9. Esto produjo un gran solapamiento de intervalos y poca diferenciación entre genotipos, (Cuadro 5). Para cada genotipo, supuestamente homocigotos y homogéneos, al utilizar una escala continua del 1 al 9, se observaron hasta seis diferentes tipos de reacción (rango máximo) que en la mayoría de los casos no fueron correlativos por lo cual las medias de RI por genotipo fueron ajustadas estadísticamente. Un comportamiento similar fue reportado por Fetch y Steffenson (1999). Probablemente, este hecho explique el solapamiento de los intervalos de confianza observados. Mientras que Fetch y Steffenson (1999) observaron generalmente dos valores correlativos de infección (raramente tres) por genotipo, y que el valor más común representaba más del 75% de los casos, en este trabajo se observó una mayor dispersión de valores, lo que a su vez podría cuestionar la homogeneidad de los materiales. Por otro lado cabe mencionar que en las condiciones del ensayo, los testigos susceptibles

presentaron valores de RI de 5; dicho valor pertenece al rango de la categoría medianamente susceptibles.

Según Fetch y Steffenson (1999), para propósitos de mejoramiento por resistencia a mancha borrosa las líneas avanzadas deben mostrar niveles de RI entre 1 a 5 en plántula (Figura 4) y de niveles R a MR en planta adulta (Figura 2), complementando estos últimos con buenos comportamientos de severidad en las localidades donde mancha borrosa cause daños a fines de ciclo, como es el caso de nuestro país.

En total se identificaron siete fuentes de resistencia, altamente diversas de las cuales tres presentan resistencia a nivel de plántula y planta adulta (ND B112, Tx 7934 y TR6), una presenta únicamente resistencia a planta adulta (Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen), y tres (Bowman, 12IBYT#25 y CI2291) presentan únicamente resistencia en estado de plántula.

Esto confirma que los determinantes genéticos de ND B112 (fuente de resistencia durable por más de 50 años) son efectivos a las razas locales de patógenos. En cuanto a TR 6 presenta una excelente opción ya que si bien no se sabe su pedigrí probablemente provenga de otro programa de mejoramiento que ND B112 y por tanto existen chances que los determinantes genéticos de resistencia sean diferentes.

Si observamos los otros genotipos que mostraron buen comportamiento en plántula pero no en planta adulta se denota que 12IBYT#25 presenta muy buen comportamiento en los años 2002 y 1998, en el año 1999 presenta un 17% pero es muy deficiente en 2000 (Figura 5) Wilcoxson et al. (1990) mencionan que cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de mancha borrosa algunos cultivares y líneas experimentales que usualmente se comportan como resistentes o moderadamente resistentes en planta adulta, pueden comportarse como moderadamente susceptibles. Además mencionan que la enfermedad mancha en red puede ser confundida con mancha borrosa y se puede confundir estas dos enfermedades cuando los síntomas de mancha en red no son del todo típicos, categorizando materiales que siempre han tenido buen comportamiento como susceptibles a mancha borrosa.

CI 2991 presenta un comportamiento deficiente para sus dos años de evaluación en planta adulta; y Tx 7934 que también consta con dos años de evaluación (1999-2001) presenta 0 y 17% de severidad respectivamente (que teniendo en cuenta el año no es mal comportamiento). Bowman no presenta datos en planta adulta.

Castro (2002) menciona que el estudio de las relaciones existentes entre el germoplasma en uso (diversidad genética) constituye un elemento esencial en el proceso de toma de decisiones dentro de un programa de mejoramiento. El coeficiente de coancestría, definido como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en dos individuos sean idénticos por descendencia, es la medida clásica de relación genética.

Si bien los mejoradores buscan que los determinantes genéticos para la resistencia pertenezcan a pools genéticos diferentes, lo que aumentaría la probabilidad de que los alelos o genes determinantes de la misma sean diferentes y posibiliten una resistencia durable, pueden existir dos tipos de objetivos de mejoramiento: i) de corto y mediano plazo; y ii) de largo plazo.

En el objetivo de corto y mediano plazo se utilizan materiales de pools genéticos “ceranos” o, dicho de otra manera, materiales de un grado de adaptación similar. Según lo citado por Castro (2002) se ha encontrado que los cruzamiento entre materiales de similar adaptación se ajustan en general a la distribución esperada (1:1 en cruza simples, 3:1 en retrocruzas, etc.), lo que permite planificar mejor los programas. En este sentido, los materiales de dos hileras Bowman y Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C) con resistencia en plántula y planta adulta, respectivamente serían las fuentes de resistencia candidatas. Estas fuentes integran el mismo pool genético con los cultivares adaptados para nuestro país (N. Daymán, E. Quebracho y Clipper) y con los elite local CLE 202, CLE 218 y CLE 222.

Los objetivos de largo plazo se refieren a los programas que incluyen el pre-mejoramiento de materiales poco adaptados y muchas veces de origen desconocido que tienen buenos comportamientos sanitarios, pero constan a su vez de muy pobre grado de adaptación. Para este escenario se dispondría de los materiales de seis hileras ND B112, TR 6 y Tx7934, todos con muy buen comportamiento en plántula y en planta adulta. Mientras NDB112 pertenece al grupo 1, el segundo pertenece al grupo 3 (Figura 6), mientras los materiales elite locales pertenecen al grupo 2, como ya fue mencionado. Potencialmente, los determinantes genéticos de estos tres materiales serían diferentes a los presentes en Bowman y Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (CY\_C) (grupo 2). Otros dos materiales: CI2291 (dos hileras) y el 12IBYT#25 (seis hileras), con buenos comportamiento a nivel de plántula podrían utilizarse para objetivos de largo plazo. Estas líneas también aportarían potencialmente determinantes de resistencia diversos, ya que bajo el supuesto iii) del cálculo de coancestría (Materiales y métodos) los materiales con pedigrí no conocido no estarían relacionados entre si. Sin embargo, Castro (2002) cuestiona la validez de dicho supuesto ya que es probable que exista cierta base genética común entre

muchos ancestros, y por tanto el valor de coancestría esté subvaluado. En contraposición, el efecto en la subestimación sería mínimo de acuerdo con Gizlice et al. (1993). Por último, sería deseable contar con más años de evaluación a campo de los materiales TR9, 4259/CI5831//SMA1/3/Patty`B`/4/Shyri (CY\_A), Arupo/K8755//Mora (CY\_E), Cerise y Manker, ya que presentaron niveles interesantes de resistencia a planta adulta.

Otra forma de analizar la diversidad genética entre las fuentes de resistencia es por medio de marcadores moleculares. Bai et al. (2003) usaron AFLP y SSR para medir diversidad de resistencia a fusariosis de espiga en trigo y Dávila et al. (1998) usaron RAMP para determinar relaciones genéticas en cebada.

El dendrograma producido a partir de los datos de RAPD presenta tres grupos muy diversos. Sin embargo, cada uno de los grupos detectados abarcó genotipos de dos y seis hileras y diferentes orígenes (Figura 7). La baja correspondencia observada entre los dendrogramas construidos a partir de las matrices de distancias con datos genealógicos y con datos moleculares podría explicarse por consistir cada uno en diferentes aproximaciones de evaluar diversidad genética, cada uno de los cuales sujetos a diferentes tipos de errores (Graner et al., 1994).

Por tanto no parece ser este un método útil para medir diversidad en genotipos autógamos, que presenten datos genealógicos completos, o ancestros de estos, ya que para este caso la mejor información sobre diversidad se obtiene de los datos de coancestría como antes se mencionó. Cox et al. (1985) mencionan que las estimaciones genéticas con este método necesitan de datos de genealogía muy detallados por lo cual serían apropiadas cuando los pedigrí son bien conocidos y las poblaciones son autofecundas como la cebada, mientras que no serían precisos para poblaciones naturales o especies con fecundación cruzada.

Algunos autores mencionan que los métodos moleculares generan valores subvaluados de diversidad genética. Esto se debería a que los marcadores utilizados estarían explorando zonas del genoma compuestas en gran porcentaje por zonas conservadas. En este aspecto Barrett et al. (1998) menciona que el método AFLP muestra menores valores de diversidad que el método basado en Pedigrí.

Sin embargo, cuando se quiere evaluar diversidad en colecciones de colecta a campo donde se desconoce su origen, en colecciones de germoplasma donde los genotipos integrantes de la misma carezcan de información de

genealogía, o cuando se compara dos sub-especies, los métodos moleculares que copian o cortan el genoma al azar pueden brindar información valiosa (Dávila et al., 1998).

No se detectaron diferencias significativas entre las medias ajustadas del RI de los grupos definidos por: coeficiente de coancestría, o por los marcadores RAPDs. De hecho, dentro de cada grupo se observaron genotipos con marcadas diferencias en sus niveles de resistencia. Eso estaría indicando que los determinantes de resistencia están dispersos en los diferentes grupos de cebada detectados.

En este trabajo no se detectó ninguna asociación significativa entre marcadores y nivel de resistencia. Posiblemente, las zonas genómicas implicadas en la expresión de resistencia no fueron exploradas por los marcadores RAPDs utilizados. Alternativamente, el método utilizado no fue capaz de detectar polimorfismos en las zonas relevantes. El uso de otros marcadores moleculares con distribución conocida en el genoma y con mayor poder de detectar polimorfismo, como es el caso de los microsatélites, podría contribuir a la detección de regiones genómicas asociadas a la resistencia.

## 6 CONCLUSIONES

- Se identificaron siete genotipos de cebada, resistentes a mancha borrosa, genéticamente diversos, y portadores de diferentes mecanismos de resistencia: resistencia en plántula y/o en planta adulta.
- El análisis de diversidad genética basado en coancestría para 22 genotipos permitió detectar tres grupos. Similarmente también se detectaron tres grupos en el análisis de diversidad genética basado en RAPDs. Sin embargo, la asignación de genotipos a cada grupo fue diferente según el análisis usado.
- No se encontró diferencia significativa entre las medias de RI en plántula de los grupos identificados por los dos métodos aplicados para medir diversidad genética.
- No se encontró asociación entre la RI en plántula y marcadores RAPDs individuales.
- Para objetivos de mejoramiento de corto plazo se destacan como fuentes de resistencia los genotipos de dos hileras: Bowman (resistencia a nivel de plántula) y Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen (resistencia en planta adulta).
- Los genotipos de seis hileras: ND B112, TR 6 y Tx 7934, portadores de ambos mecanismos de resistencias pueden ser fuentes de resistencia para un objetivo a mediano o largo plazo, o para programas de premejoramiento mediante el desarrollo de líneas parentales.
- CI 2291 (dos hileras) y 12IBYT#25 (seis hileras) se consideran líneas promisorias, portadoras de resistencia a nivel de plántula.

## 7 RESUMEN

La mancha borrosa causada por *Cochliobolus sativus* es una de las enfermedades foliares más importantes en el cultivo de cebada en Uruguay. Según el estado fenológico del cultivo y las condiciones ambientales, esta enfermedad puede causar pérdidas de entre 10% y 43% en el rendimiento, además de reducir notablemente la calidad maltera del grano por pérdida de peso de grano y su capacidad germinativa así. No existe resistencia genética efectiva para esta enfermedad en los cultivares comerciales usados en nuestro país. Desde 1992 se está evaluando una colección de germoplasma de cebada en INIA La Estanzuela según su comportamiento frente a mancha borrosa en planta adulta. Si bien esa información es importante, será valioso conocer el comportamiento sanitario de estos materiales en plántula y realizar una caracterización genética al menos de los materiales más promisorios. Se evaluaron la severidad en planta adulta en 31 genotipos; la respuesta a la enfermedad en plántula en 33 genotipos; la diversidad genética por dos métodos: coeficiente de coancestría y marcadores RAPDs en 22 genotipos. Estos 22 genotipos están presentes en los cuatro análisis mientras que 30 genotipos son comunes entre el análisis de resistencia en planta adulta y plántula. Estos genotipos incluyen materiales de dos y seis hileras y provenían de diferentes orígenes (Estados Unidos, Centro Internacional de Mejoramiento de Trigo y Maíz, Canadá, Corea del Norte, Uruguay, Suiza, Inglaterra y Australia). Se encontraron siete genotipos con comportamiento resistente frente a la enfermedad; de los cuales Bowman, CI2291 y 12IBYT#25 presentaron resistencia en el estado de plántula, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen mostró resistencia en planta adulta, y por último ND B112, TR 6 y Tx 3934 manifestaron ambos mecanismos de resistencia. A partir de la técnica RAPDs se obtuvieron 31 marcadores polimórficos, de las cuales no se encontró asociación entre ninguno de estos y la respuesta a la infección. El análisis de coancestría separó tres grupos, donde cada uno de ellos estaba formado preferentemente por genotipos procedentes de los mismos programas de mejoramiento. En cambio, el análisis de diversidad por medio de marcadores RAPDs separó tres grupos diversos y con muy baja correspondencia con el método anterior. No se encontraron diferencias significativas en los valores promedios de RI de los grupos identificados por el análisis molecular. El mismo resultado se obtuvo para el análisis de los grupos formados a partir de los datos de coancestría. Esto indicaría que los genotipos resistentes y susceptibles a mancha borrosa están distribuidos entre grupos genéticamente diversos. Estos resultados sugieren que los genotipos resistentes identificados en este trabajo son candidatos a portar diferentes genes de resistencia a mancha borrosa.

Palabras clave: Cebada; Mancha borrosa; Resistencia.

## 8 SUMMARY

Barley spot blotch caused by *Cochliobolus sativus* is one of the most important foliar diseases of barley in Uruguay. According to the phenological stage of the crop as well as environmental conditions, this disease can determine between 10% and 40% of yield losses; also, it can notably reduce kernel quality by decreasing germination capacity as well as kernel weight. Effective resistance against this disease is not available among current commercial cultivars in Uruguay. Since 1992, a Barley germplasm collection is being evaluated for spot blotch resistance at adult plant stage in INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Despite the relevance of ranking resistance sources according to phenotypic scores, it would be valuable to further assess resistance performance at seedling stages and to genetically characterize the most promising materials. Adult plant resistance (severity) and seedling resistance (infection response) to spot blotch were evaluated for 31 and 33 genotypes, respectively. These two analyses shared 30 genotypes. Genetic diversity was analyzed in 22 genotypes based on coancestry coefficients as well as RAPD markers. This set of 22 genotypes was present in all four analyses. Barley genotypes included two- and six-rowed materials from different origins (USA, CIMMIY, Canada, North Korea, Uruguay, Switzerland, England and Australia). Seven genotypes were identified as good resistance sources including Bowman, CI2291 and 12IBYT#25 with seedling resistance, Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen with adult plant resistance, and ND B112, TR 6 and Tx 3934 with both seedling and adult plant resistance. Diversity analysis based on RAPDs produced 31 polymorphic markers. No association between infection response and single RAPD markers was found. Pedigree-based diversity analysis identified three groups. Notably, genotypes assigned to each cluster derived from the same breeding programs. Similarly, cluster analyses based on molecular data identified three diverse groups. However, a very low correspondence was found between the genotypes assigned to each group in both methods. No association was found among any marker and infection response. Also, average level of infection response from each group detected based on either RAPD diversity or coancestry coefficient did not differ significantly. Therefore, resistant and susceptible genotypes were distributed throughout genetically diverse groups. These results suggested that resistant genotypes identified in this work may harbor different spot blotch resistance genes.

Key words: Barley; Spot blotch; Resistance.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. ABADIE, T.; BERRETTA, A. 2001a. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: Berreta, A.; Rivas, M. coords. Estrategia en recursos filogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo, IICA/PROCISUR. pp. 91-99.
2. \_\_\_\_\_. 2001b. Desarrollo de colecciones núcleo de recursos fitogenéticos In: Berreta, A.; Rivas, M. coords. Estrategia en recursos filogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo, IICA/PROCISUR. pp. 101-109.
3. ARIAS, G.,1991. Calidad industrial de la cebada cervecera. Montevideo, INIA. (Serie Técnica no. 18).
4. ARNY, D. C. 1951. Inheritance of resistance to spot blotch in barley seedlings. *Phytopathol.* 41:691-698.
5. BAI, G.; GUO, P.; KOLB, F. L. 2003. Genetic relationships among head blight resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Sci.* 43:498-507.
6. BARRETT, B. A.; KIDWELL K. K.; FOX P. N. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetics diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1271-1278.
7. 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. Gen.* 111(7):1238-1250.
8. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2006. Molecular mapping of loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley. *Phytopathol.* 96:699-705.
9. CANCI, P. C.; NDUULU, M.; MUEHLBAUER, J.; DILL-MACKY, R.; RASMUSSEN, D. C.; SMITH, K. P. 2004. Validation of quantitative trait loci for *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Mol. Breed.* 14:91-104.

10. CASTRO, A. 2002. Análisis de la coancestría en el germoplasma utilizado en el mejoramiento de cebada en Uruguay. *Agrociencia*. 6 (1):27-39.
11. \_\_\_\_\_.; CAPETTINI, F.; SANDOVAL, J. S.; ORGEDA, G.; PEREYRA, S.; HAYES, P. 2007. Identificación y utilización de resistencia durable a enfermedades de cebada en América Latina. Proyecto FONTAGRO. (en línea). s.l., FONTAGRO. Consultado 21 oct. 2008. Disponible en [http://www.fontagro.org/Projects/06\\_17\\_Cebada/prop\\_06\\_17.pdf](http://www.fontagro.org/Projects/06_17_Cebada/prop_06_17.pdf)
12. COX, T. S.; KANG, Y. T.; FORMAN, M. B.; RODGERS, D. M. 1985. Relationship between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. *Crop. Sci.* 25:529-532.
13. CZEMBOR, J. H. 2001. Sources of resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. hordei*) in Moroccan barley land race. *Can. J. Plant. Pathol.* 23:260-269.
14. DÁVILA, J. A.; SÁNCHEZ DE LA HOZ, M. P.; LOARCE, Y.; FERRER, E. 1998. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley. *Genome*. 41:477-486.
15. DUBIN, H.J.; VAN GINKEL, M. 1991. The status of wheat diseases and disease research in warmer areas. In: Saunders D. A. coord. *Wheat for the non-traditional warmer areas*. México, D. F., CIMMYT. pp. 125-145
16. DUVEILLER, E.; GARCÍA ALTAMIRANO, I. 2000. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. *Pl. Pathol.* 49: 235–242.
17. EDWARDS, M. C.; FETCH, T. G.; SCHWARZ, P. B.; STEFFENSON, B. J. 2001. Effect of *Barley yellow dwarf virus* infection on yield and malting quality of barley. *Plant Dis.* 85: 202-207.
18. EGLINTONG, J.K.; EVANS, D. E.; BROWN, A. H. D.; LANGRIDGE, P.; MCDONALD, G.; JEFFERIES, S. P.; BARR, A. R. 1999. The use of wild barley (*Hordeum vulgare ssp spontaneum*) in breeding for quality and adaptation. (en línea). In: *Australian Barley Technical Symposium (9th., 1999, Canberra, Australia)*. Proceedings. Canberra, Australia, The Regional Institute. s.p. Consultado 12 mar. 2008. Disponible en <http://www.regional.org.au/au/abts>

19. 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.
20. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Dis.* 83:213-217.
21. GAMBA, F.; LAMARI, L. 1998. Mendelian inheritance of resistance to tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). *Can. J. Plant Pathol.* 20: 408-414.
22. \_\_\_\_\_.; ESTRAMIL, E. 2002. Variation in virulence within an Uruguayan population of *Cochliobolus sativus*. *In*: International Workshop on Barley LeafBlights (2<sup>nd</sup>., 2002, Aleppo, Syria). Proceedings. Aleppo, Syria, ICARDA. s.p.
23. GEBHARDT, D. J.; RASMUSSEN, D. C.; WILCOXSON, R. D. 1992. Cyclic breeding used to incorporate kernel discoloration resistance into malting barley. *Crop Sci.* 32: 352-356.
24. GENGER, R. K.; MESBITT, K.; BROWN, A. H. D.; ABBOT, D. C.; BURDON, J. J. 2005. A novel barley scald resistance gene; genetic mapping of the *Rrs15* scald resistance gene derived from wild barley, *Hordeum vulgare ssp spontaneum*. *Plant Breed.* 124:137-141.
25. GEPTS, P. 2006. Plant genetic resources conservation and utilization; the accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Sci.* 46:2278-2292.
26. GERMÁN, S.; DÍAZ, M.; PEREYRA, S.; CASTRO, M. 2005. Roya de la hoja y oidio de trigo y cebada. *In*: Jornada Técnica de Cultivos de Invierno (2005, Colonia, Uruguay). Memórias. Montevideo, INIA. pp. 10-21.
27. \_\_\_\_\_. 2006. Profundizando sobre las royas de la hoja de trigo y cebada: disminución de riesgo en el cultivo mediante una diversificación efectiva de las variedades disponibles. *Revista INIA.* 7:15-16.
28. GILCHRIST-SAAVEDRA, L.; G. FUENTES-DÁVILA, C.; MARTÍNEZ-CANO, R.M.; LÓPEZ-ATILANO, E.; DUVEILLER, R.P.; SINGH, M.; HENRY, E I.; GARCÍA, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2<sup>a</sup>. ed. México, D.F., CIMMYT. p. 68

29. GIZLICE, Z.; CARTER, T. E.; BURTON, J. W. 1993 Genetic diversity in North American soybean. I: Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. *Crop Sci.* 33: 614-620.
30. GRANER, A.; LUDWIG, W. F.; MELCHINGER, A.E. 1994. Relationships among European barley germplasm; II. Comparison of RFLP and pedigree data. *Crop Sci.* 34:1199-1205.
31. GREENE, S. L.; MORRIS, J. B. 2001. The case for multiple-use plant germplasm collections and a strategy for implementation. *Crop Sci.* 41:886–892.
32. GRIFEE, F. 1925. Correlated inheritance of botanical characters in barley and manner of reaction to *Heminthosporium sativum*. *Jou. of Agr. Res.* 30:915-935.
33. HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. 1999. Plant genetic resources; what can they contribute toward increased crop productivity? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5937–5943.
34. KUMAR, J.; HÜCKELHOVEN, 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*). *Phytopathol.* 91:127–133.
35. \_\_\_\_\_.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTRUSCHANR, H.; STEIN, E.; NAGARAJAN, S.; KIGEL, K. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of a global concern; cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant Pathol.* 3: 185-195.
36. KUTCHER, H.R.; BAILEY, K. L.; ROSSNAGEL, B.G.; LEFFE, W. G. 1996. Identification of RAPD markers for common rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. *Genome.* 39:206-215.
37. MICHELMORE, R. W. 2003. The impact zone; genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Op. Plant. Biol.* 6:397-404.

38. MILES, M. R.; WILCOXSON, R. D.; RASMUSSEN, D. C. 1989. Inheritance of resistance to kernel discoloration of barley. *Plant Dis.* 73:711-715.
39. MOSEMAN, J. G.; SMITH, D. H. 1985. Germplasm resources. *Agronomy.* 26:57-72.
40. NUTTER, E. W.; PEDERSON, V. D.; FOSTER, A. E. 1985. Effect of inoculations with *Cochliobolus sativus* at specific growth stages on grain yield and quality of malting barley. *Crop Sci.* 25:933-938.
41. PEREYRA, S. 1996 Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo, INIA. pp. 110-111 (Serie Técnica no. 74).
42. \_\_\_\_\_; DIAZ, M.; STEWART, S. 2005. Manual de identificación de enfermedades en cereales de invierno. Montevideo, INIA. 50 p. (Boletín de Divulgación no. 61).
43. \_\_\_\_\_; 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. *In*: Reunión de Investigación en Cebada Cervecera (2007, Paysandú). Trabajos presentados. Paysandú, Facultad de Agronomía. s.p.
44. PRITSCH, C. 2001 El pre-mejoramiento y la utilización de los recursos fitogenéticos. *In*: Berreta, A.; Rivas, M. coords. Estrategia en recursos filogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo, IICA/ PROCISUR. pp. 111-121.
45. ROUGE, B.; LINZ, A.; PICKERING, R.; PROESELER, G.; GREIF, P.; WEHLING, P. 2003. Mapping of *Rym 14hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theor. Appl. Gen.* 107:965-971.
46. SAARI, E. E.; PRESCOTT, J. B. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant. Dis. Rep.* 59:377-380.
47. \_\_\_\_\_. 1998. Leaf blight disease and associated soil borne fungal pathogens of wheat in South and Southeast Asia. *In*: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab, A. coords. *Helminthosporium* blights of wheat; spot blotch and tan spot. México, D.F., CIMMYT. pp. 37-51.

48. SAS INSTITUTE. 1996. SAS lenguaje; reference, versión 6.12. Cary, NC. s.p.
49. SHANER, G.; STROMBERG, E. L.; BARKER, K. R. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 47-66.
50. SINGH, R. J. 2005. Utilization of genetic resources for barley improvement. *In*: Sing, R. J.; Jauhar, P. P. coords. Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement. Kentucky, CRC/Taylor and Francis. v. 2, pp. 233-256.
51. SKINNER, D. Z.; BAUCHAN, G. R.; AURICHT, G.; HUGHES, S. 1999. A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections. *Crop Sci.* 39:1237-1242.
52. STEFFENSON, B. J. ; HAYES, P. M. ; KLEINHOF, 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. Gen.* 92:552-558.
53. \_\_\_\_\_.; FETCH, T. G.; WESENBERG, D.; BOCKELMAN, H. 1998. Sources of resistance to net and spot blotch in barley. *Phytopatol.* 88:85.
54. \_\_\_\_\_. 2000. Durable resistance to spot blotch and stem rust in barley. *In*: Logue, S. coord. Barley genetics VIII. Adelaide, Adelaide University. v.1, pp.39–44.
55. STEWART, S.; PEREYRA, S.; DIAZ, M. 2005. Manchas foliares en trigo y cebada bajo siembra directa; conceptos y estrategias de control. (en línea). Montevideo, INIA. sp. (Documento on line no. 36). Consultado 10 feb. 2008. Disponible en <http://www.inia.org.uy>.
56. TANKSLEY, S. D.; GRANDILLO S.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNN, T. 1996. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Gen.* 2:213-224.

57. TINKER, N. A.; FORTIN, M. G.; MATHER, D. E. 1992. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Gen.* 85:976-984.
58. \_\_\_\_\_; MATHER, D. E. 1993a. KIN; software for computing kinship coefficients. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 15 jul. 2003. Disponible en <http://gnome.agrenv.mcgill.ca/pub/genetics/software/kin/>
59. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1993b. KIN; software for computing kinship coefficients. *J. Hered.* 84: 238.
60. TINLINE, R. D. 1988. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. *Adv. Pl. Pathol.* 6: 113-122.
61. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2003. National plant germplasm system. (en línea). Washington, D.C. USA. Consultado 22 nov. 2003. Disponible en <http://www.ars-grin.gov/npgs/>.
62. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2007. Anuario estadístico 2007. Montevideo. p. 74.
63. VALJAVEC-GRATIAN, M.; STEFFENSON, B. J. 1997a. Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley. *Phytopathol.* 87:1140-1143.
64. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1997b. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Dis.* 81:1275-1278.
65. VON KORFF, M.; WANG, H.; LÉON, J.; PILLEN, K. 2006. AB-QTL analysis in spring barley; II. Detection of favourable exotic alleles for agronomic traits introgressed from wild barley (*H. vulgare ssp. spontaneum*). *Theor. Appl. Gen.* 112:1221-123.
66. VON WETTSTEIN-KNOWLES, P. 1992. Cloned and mapped genes; current status. *In*: Shewry, P. R. coord. *Barley; genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. Wallingford, UK, CAB. s.p.
67. WARD, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Asso.* 301(58): 236-244.

68. WILCOXSON, R. D.; RASMUSSEN, D. C.; MILES, M. R. 1990. Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance. *Plant Dis.* 74: 207-210.
69. WOLDEAB, G.; FININSA, C.; SINGH, H.; YUEN, J.; CROSSA, J. 2007. Variation in partial resistance to barley leaf rust (*Puccinia hordei*) and agronomic characters of Ethiopian landrace lines. *Euphytica.* 158:139-151.
70. YAHYAOU, A. H.; SHARP, E. L.; REINHOL, D. 1988. New sources of resistance to *Puccinia hordei* in barley land race cultivars. *Phytopathol.* 78:905-908.
71. YITBAREK, S.; BERHANE, L.; FIKADU, A.; VAN LEUR, J. A. G.; GRANDO, S.; CECCARELLI, S. 1998. Variation in Ethiopian barley landrace populations for resistance to barley leaf scale and net blotch. *Plant Breed.* 117:419-423.
72. ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14:415-421.
73. ZONG, S.; STEFFENSON, B. J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopatol.* 91: 469-476.
74. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 2002. Identification and characterization of DNA markers associated with a locus conferring virulence on barley in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Theor. Appl. Gen.* 104:1049-1054

## 10 ANEXOS

Anexo 1: Condiciones de siembra, inoculación, y evaluación de nivel de resistencia en la colección de mancha borrosa de INIA La Estanzuela (1998-2002)

En el período 1998 al 2002 el nivel de resistencia a mancha borrosa de la colección de INIA La Estanzuela se midió en base a severidad, i.e. porcentaje de área foliar afectado (% AFA). También se registró la importancia relativa de las diferentes manchas foliares presentes. Las lecturas de la enfermedad se buscaron realizarlas al estado de grano lechoso del promedio de los genotipos<sup>1</sup>. De los cinco años de evaluación en cuatro de ellos se realizó inoculación artificial mediante aspersion de conidios.

En el año 1998 la colección se sembró el 15 de julio en la localidad de Young, en parcelas de dos surcos de un metro cada uno. Se fertilizó el 21 de mayo con un fertilizante de composición 10-50-0, N (%) -P (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) -K (K<sub>2</sub>O) respectivamente. La infección se produjo de forma natural.

El 4 de octubre fue sembrada la colección correspondiente al año 1999. Esta siembra fue en INIA La Estanzuela, en hill plots bajo un telado, y con un sistema de aspersion. Fue inoculado el 23 de noviembre, con una concentración de 2.75X10<sup>4</sup> conidios de *C. sativus* /ml, cuando las plantas se encontraban en promedio en estado de embuche.

La colección del año 2000 se sembró el 18 de octubre en INIA La Estanzuela, y fue inoculada con una suspensión de conidios, igual que el año 1999.

En el año 2001 la colección se sembró en hill plots en INIA La Estanzuela el 11 de septiembre, y fue fertilizada con 20 unidades de N/ha en forma de urea. La inoculación fue realizada con una suspensión de 1.2X10<sup>5</sup> conidios *C. sativus* /ml, el 15 de noviembre.

La colección del año 2002 se sembró el 16 de julio en INIA La Estanzuela, en parcelas de dos surcos de un metro. Se fertilizó el 21 de agosto y el 26 de septiembre, con 24 y 72 unidades de N en forma de urea respectivamente. Los materiales fueron inoculados con una concentración de 1.3X10<sup>3</sup> conidios *C. sativus* /ml el 20 de octubre.

<sup>1</sup> Pereyra, S. 2008. Com. personal

Anexo 2: Valores de severidad (%AFA) a mancha borrosa en planta adulta de 31 genotipos de cebada de la colección de INIA La Estanzuela (período 1998 - 2002).

| Material  | Años |      |      |      |    |
|---|------|------|------|------|----|
|   | 98   | 99   | 00   | 01   | 02 |
| ND B112   | 5    | 15   | T*   | 5    | T* |
| Morex   | 0    | 30   | -    | 60   | -  |
| Dickson   | 0    | 15   | -    | 60   | -  |
| Bonanza   | 3    | 15   | 0    | -    | -  |
| Harrington  | 0    | -    | T*   | 60   | -  |
| Sudan   | 0    | 40   | -    | 50   | 2  |
| TR6   | 0    | 15   | -    | 15   | T* |
| TR9   | 0    | 10   | -    | -    | -  |
| 12IBYT#25   | 2    | 15   | -    | 30   | T* |
| 4259/CI5831//SMA1/3/Patty B`/4/Shyri  | 10   | -    | 0    | -    | -  |
| Gloria/Come   | 4.5  | 22.5 | -    | 20   | 5  |
| Emir/3/Api/CM67//Bus/4/Shyri/5Sen   | T*   | 10   | 10   | 15   | 0  |
| Nadja/Shyri//Gloria/Copal   | 10   | 25   | -    | 40   | -  |
| Arupo/K8755//Mora   | 10   | 15   | -    | -    | -  |
| Anca/2469//Valeriana/3/Shyri/4/Patty.B/Ruda//Aleli/5<br>/Cerise/Laurel//Aleli | -    | 50   | 40   | 50   | 0  |
| Daymán  | -    | -    | 12.5 | 50   | 5  |
| CLE 202   | -    | 45   | 5    | 80   | T* |
| CLE 218   | -    | -    | 10   | 80   | 2  |
| CLE222  | -    | -    | -    | 87,5 | -  |
| E. Quebracho (testigo susceptible)  | 6    | 53   | 8    | 83   | 4  |
| Clipper (testigo susceptible)   | 5    | 58   | 6    | 81   | 11 |
| Cerise/Shyri/Aleli  | 4    | -    | -    | -    | -  |
| Manker  | 0    | 5    | 0    | -    | -  |
| Chevron   | -    | 30   | -    | -    | -  |
| CI2291  | -    | 30   | -    | -    | 0  |
| CI3331  | -    | 30   | -    | -    | T* |
| CI5098  | -    | 15   | -    | -    | 0  |
| CI7251  | -    | 30   | -    | -    | 0  |
| Tx7933  | -    | 50   | -    | -    | 0  |
| Tx7934  | -    | 15   | -    | -    | T* |
| Pr434771  | -    | 25   | -    | -    | 0  |

- \*T corresponde a trazas. Para la confección de la figura 6 a este valor se le asignó un nivel de 1%.

Anexo 3: Promedio de severidad de mancha borrosa para el conjunto de geneotipos estudiados y para los testigos susceptibles para el periodo 1998-2002

| Año  | Promedio* | E. Quebracho** | Clipper** |
|------|-----------|----------------|-----------|
| 1998 | 3         | 6              | 5         |
| 1999 | 27        | 53             | 58        |
| 2000 | 8         | 8              | 6         |
| 2001 | 49        | 83             | 81        |
| 2002 | 2         | 4              | 11        |

\*Promedio de severidad de los materiales en estudio.

\*\*severidad en planta adulta.