

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE INFECCIÓN EN CEBADA DE UNA  
POBLACIÓN URUGUAYA DE *Cochliobolus sativus***

**por**

**Joaquín DA SILVA  
Joaquín DELL'ACQUA  
Juan Martín HUDSON**

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

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2017**

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. (PhD.) Fernanda Gamba

-----

Dr. Gustavo Azzimonti

-----

Ing. Agr. Agueda Scattolini

Fecha: 13 de diciembre de 2017

Autores: -----

Joaquín Da Silva

-----

Joaquín Dell'Acqua

-----

Juan Martín Hudson

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a nuestras familias, a nuestros amigos y a nuestros Clubes por el apoyo incondicional que siempre nos dieron. También a la gente de la Estación Mario A. Cassinoni, que sin su colaboración esto no podría haberse llevado a cabo.

También a nuestros compañeros y colegas que hicieron que esta etapa de nuestras vidas fuera inolvidable.

## TABLA DE CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN.....   | II     |
| AGRADECIMIENTOS.....  | III    |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....                                     | VI     |
| <br>  |        |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....  | 1      |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....                                    | 2      |
| 2.1 EL CULTIVO DE CEBADA.....   | 2      |
| 2.2 LA MANCHA BORROSA.....  | 2      |
| 2.2.1 <u>Importancia de la mancha borrosa a nivel mundial</u> .....       | 3      |
| 2.2.2 <u>Importancia de la mancha borrosa en Uruguay</u> .....            | 4      |
| 2.3 EL ORGANISMO CAUSAL.....  | 4      |
| 2.3.1 <u>Especialización patogénica</u> .....                             | 5      |
| 2.4 EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO.....  | 10     |
| 2.4.1 <u>Factores determinantes en el desarrollo de la epidemia</u> ..... | 10     |
| 2.4.1.1 Condiciones favorables para la mancha borrosa.....                | 10     |
| 2.4.2 <u>Ciclo biológico de la enfermedad</u> .....                       | 11     |
| 2.4.2.1 Formas de sobrevivencia y fuentes de inóculo.....                 | 12     |
| 2.4.2.2 Dispersión.....   | 12     |
| 2.4.2.3 Infección.....  | 13     |
| 2.4.2.4 Germinación, penetración y colonización.....                      | 13     |
| 2.4.2.5 Síntomas.....   | 14     |
| 2.4.3 <u>Toxinas</u> .....  | 15     |

|  |    |
|--|----|
| 2.5 IMPACTO INDUSTRIAL DE <i>Cochliobolus sativus</i><br>EN CEBADACERVECERA..... | 15 |
| 2.6 MANEJO DE LA MANCHA BORROSA.....   | 16 |
| 2.6.1 <u>Control cultural</u> .....  | 16 |
| 2.6.2 <u>Cuantificación de la enfermedad</u> .....                               | 18 |
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....   | 19 |
| 3.1 SIEMBRA.....   | 19 |
| 3.2 ELECCIÓN DE GENOTIPOS.....   | 19 |
| 3.3 OBTENCIÓN DE AISLADOS MONOSPÓRICOS Y<br>PRODUCCIÓN DE INÓCULO.....           | 23 |
| 3.4 INOCULACIÓN.....   | 25 |
| 3.5 REGISTRO DE LAS RESPUESTAS DE INFECCIÓN.....                                 | 25 |
| 4. <u>RESULTADOS</u> .....   | 28 |
| 4.1 RESULTADOS DE LOS GENOTIPOS INIA-INASE.....                                  | 29 |
| 4.2 RESULTADOS DE LOS GENOTIPOS DEL SET<br>DIFERENCIAL.....                      | 37 |
| 5. <u>DISCUSIÓN</u> .....  | 44 |
| 5.1 GENOTIPOS INIA-INASE.....  | 45 |
| 5.2 GENOTIPOS SET DIFERENCIAL.....   | 47 |
| 5.3 COMPARACIÓN SET DIFERENCIAL CON INIA-INASE.....                              | 52 |
| 6. <u>CONCLUSIONES</u> .....   | 53 |
| 7. <u>RESUMEN</u> .....  | 55 |
| 8. <u>SUMMARY</u> .....  | 56 |
| 9. <u>BIBLOGRAFÍA</u> .....  | 57 |
| 10. <u>ANEXOS</u> .....  | 68 |

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No.  | Página |
|---|--------|
| 1. Genotipos de cebada sembrados del set diferencial.....   | 19     |
| 2. Nombre, tipo de espiga, origen y pedigrí de catorce genotipos del set diferencial.....   | 21     |
| 3. Genotipos seleccionados de la red nacional de evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera (convenio INIA-INASE)..... | 22     |
| 4. Aislados de <i>C. sativus</i> utilizados.....  | 24     |
| 5. Promedios redondeados de las RI de veintiún aislados de <i>C. sativus</i> en veintiocho cebadas.....                           | 29     |
| 6. Promedios ajustados de las RI de veintiséis genotipos con ocho aislados de <i>C. sativus</i> .....                             | 37     |
| 7. Patotipos asignados según los diferenciales utilizados por Valjavec-Gratian y Steffenson.....                                  | 43     |
| 8. Comparación de antecedentes y resultados para trece genotipos INIA-INASE.....  | 47     |
| Figura No.  |        |
| 1. Escala de respuesta a la infección para plántulas de cebada.....   | 7      |
| 2. Escala para plantas adultas.....   | 7      |

|   |    |
|---|----|
| 3. Ciclo biológico de <i>Cochliobolus sativus</i> .....   | 11 |
| 4. Caracterización de veintiún aislados de <i>Cochliobolus sativus</i> ,<br>como frecuencia de los diferentes tipos de respuesta<br>de infección (alta, media y baja).....  | 31 |
| 5. Respuestas de infección (alta, media y baja) de veintiocho<br>genotipos de cebada frente a veintiún aislados de<br><i>Cochliobolus sativus</i> .....   | 32 |
| 6. Análisis de conglomerado realizado utilizando distancias<br>euclidianas para los veintiocho genotipos INIA-INASE.....  | 34 |
| 7. Dendograma de las similitudes en el promedio de respuestas de<br>infección a mancha borrosa de los veintiún aislados de <i>C. sativus</i> ,<br>agrupados en tripletas con sus respectivos grupos de virulencia,<br>sobre doce líneas de cebada, utilizando distancias euclidianas<br>elevadas al cuadrado..... | 36 |
| 8. Comportamiento de ocho aislados de <i>C. sativus</i><br>en los genotipos del set diferencial, según la respuesta a la<br>infección.....  | 39 |
| 9. Respuesta a la infección (alta, media y baja) de veintiséis<br>genotipos candidatos a integrar el set internacional diferencial<br>Inoculados con ocho aislados de <i>Cochliobolus sativus</i> .....   | 40 |
| 10. Análisis de conglomerado con distancias euclidianas para<br>los veintiocho genotipos del set diferencial.....   | 41 |
| 11. Análisis de conglomerados utilizando el promedio de respuesta<br>a la infección de ocho aislados de <i>C. sativus</i> en veintiocho<br>genotipos de cebada.....   | 42 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Mundialmente se pierde aproximadamente un 15% de la producción de los cultivos por causa de enfermedades (Mc Donald, 2010).

En cebada, se han registrado pérdidas históricas en rendimiento de grano de 7% hasta 30 % por mancha borrosa para Uruguay (Pereyra, 2005b).

Por lo que el objetivo general de este trabajo es estudiar la interacción de una población de *Cochliobolus sativus* colectados a nivel nacional sobre distintos cultivares de cebada. Estos últimos separados en dos grupos, con diversos materiales genéticos, algunos con conocido comportamiento previo y otros utilizados en estudios locales y/o extranjeros.

Más específicamente lo que se buscó fue caracterizar la virulencia de dicha población y en la medida de lo posible, agrupar cada aislado en grupos de virulencia o patotipos, utilizando diversos métodos de agrupamiento. Por otra parte, también se intentó caracterizar los niveles de resistencia en diversos cultivares de cebada, determinando la respuesta a la infección, estimada de acuerdo a una escala que permite determinar su nivel de resistencia o susceptibilidad en estado de plántula.

El uso de materiales con buenos niveles de resistencia genética y la implementación de sistemas de rotación de cultivos que eviten la siembra reiterada de trigo y cebada serían las medidas de control más eficaces desde el punto de vista ambiental (Silva, 2011).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EL CULTIVO DE CEBADA

La producción de cebada (*Hordeum vulgare*) en el mundo para el 2014 alcanzó las 144 millones 334 mil toneladas en un área destinada de 49 millones 561 mil hectáreas (Akar et al., 2014).

En Uruguay durante los años agrícolas 2015 y 2016 se sembraron unas 93 mil hectáreas de cebada cervecera, siendo de los cultivos cerealeros industriales el cuarto en importancia de área sembrada y en toneladas exportadas, con una producción promedio de 3828 kilogramos por hectárea y un total de 355 mil toneladas. La producción está destinada a cebada cervecera, cebada cervecera malteada y cerveza, siendo la de mayor importancia para exportación la cebada cervecera malteada con un total de 211 mil toneladas y luego la cebada cervecera 4717 toneladas (MGAP. DIEA, 2016).

El principal comprador de cebada es Brasil siendo 88% de las exportaciones destinadas a este país, luego con menor importancia están Paraguay, Republica Dominicana y Bolivia. Uruguay exporta un 3,8% del total de malta exportada mundialmente (OEC, 2016).

### 2.2 LA MANCHA BORROSA

La mancha borrosa inducida por el hongo *Cochliobolus sativus* posee una amplia distribución geográfica en muchos países de Asia, América del Sur, Europa y América del Norte (Pereyra, 1996a). Es capaz de infectar una amplia gama de hospedantes siendo económicamente más importante en trigo y cebada (Mathre, 1997). Puede atacar las espigas, causando decoloración y oscurecimiento de la punta de los granos y por consiguiente, disminución de la calidad de la malta (Arias, 1991).

Además del rendimiento, la mancha borrosa puede afectar: a) la calidad física e industrial del grano (peso hectolítrico, niveles de proteína,) y b) el valor de siembra de la semilla (germinación, vigor, Kiesling, 1985). De los síntomas que puede inducir en todos los órganos de la planta, la mancha foliar es la que causa mayores pérdidas de rendimiento (Kumar et al., 2002). Los síntomas característicos de la mancha borrosa en cebada se presentan como lesiones redondas a elípticas, de color marrón oscuro y a veces con presencia de halo clorótico (Pereyra et al., 2005a).

### 2.2.1 Importancia de la mancha borrosa a nivel mundial

Las manchas foliares producidas por hongos son una de las principales limitantes en el logro de rendimientos altos y estables a través de los años (Mathre, 1997).

El agente causal de mancha borrosa es un patógeno foliar común en cebada en todo el mundo y es económicamente importante por la marcada reducción en rendimiento y calidad del cultivo que puede causar (Nutter et al., 1985).

En Canadá la presencia de mancha borrosa ha aumentado dramáticamente para la región Este. En el 2002 fue la principal enfermedad en cebada, atacando todos los campos de la provincia de Manitoba (Tekauz et al., 2003).

Entre 1960 y 1965 en Estados Unidos, la mancha borrosa fue especialmente dañina en la zona centro Oeste (Mathre, 1982). Las pérdidas en rendimiento oscilaron entre 16 y 33% en variedades susceptibles dependiendo de las condiciones ambientales predominantes (Nutter et al. 1985, Wilcoxson et al. 1990). Para este país la importancia de la mancha borrosa ha descendido del año 60 al 90 debido al uso de materiales de alta resistencia en cultivares de cebada de seis hileras en la región (Wilcoxson et al., 1990).

En Siria, Van Leur (1991) reportó pérdidas de rendimiento del 40% debido a infecciones de *C. sativus*. Es más importante al Norte de Cáucaso, en la región central de Chernozem, al Noroeste y centro de la zona No-Chernozem, Oeste y Este de Siberia y Kazajistán. Las pérdidas de rendimiento en Kazajistán fueron entre 25-45%; en Rusia 41% en epidemias puntuales (Agroatlas, s.f.).

En Brasil una de las enfermedades más destructivas encontradas es la mancha borrosa (Luz, 1982). Varios hongos atacan a la cebada, siendo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker el causante de una de las más serias enfermedades (Antoniazzi y Deschamps, 2007).

Para Argentina la mancha borrosa fue una de las enfermedades predominantes en 2002 y 2003 bajo condiciones de siembra directa y monocultivo (Carmona, 2003).

### 2.2.2 Importancia de la mancha borrosa en Uruguay

Las manchas foliares (mancha en red, mancha borrosa y escaldadura) y la roya de la hoja se han señalado como las enfermedades más frecuentes y severas durante el periodo 1977-1995 en Uruguay. Sin embargo, han sido las manchas foliares las que han presentado una mayor asociación con las mermas de rendimiento en el período mencionado. Las mermas registradas en rendimiento oscilaron de 10 a 15% pudiendo llegar hasta el 40% (Pereyra, 1996b).

Las características climáticas durante 2013 no fueron favorables para la ocurrencia de mancha borrosa. Los síntomas clásicos causada por *C. sativus* se presentaron en forma esporádica, tanto en ensayos como en chacras, pero la mancha borrosa de tipo ocular, si se constató en algunos genotipos, al igual que en el 2012 (Castro et al., 2014).

En nuestro país se han reportado pérdidas de rendimiento en grano entre 7% y 30% (Pereyra, 2005b). La creciente adopción de la técnica de siembra directa sin rotaciones adecuadas, ha causado un aumento en la incidencia de las manchas foliares en los últimos años (Pereyra et al., 2003). La escasez de cultivares con niveles aceptables de resistencia genética sería otro factor que explica la creciente importancia de este tipo de enfermedades (Gamba y Estramil, 2012).

### 2.3 EL ORGANISMO CAUSAL

El hongo *Cochliobolus sativus* es la fase teleomorfa (etapa sexual) de *Bipolaris sorokiniana* (anamorfo), agente causal de una amplia variedad de enfermedades. *B. sorokiniana* es un hongo Ascomycete perteneciente a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, subclase Sporomycetidae y orden Moniliales familia Dematiaceae. Tras el descubrimiento de la etapa perfecta, *C. sativus*, el hongo fue renombrado como *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (forma teleomórfica *Cochliobolus sativus* S. Ito & Kurib., Drechsler ex Dastur, syn. *Helminthosporium sativum* Pammel, C. M. King y Bakke), y pasó a ser un Ascomycete, clase Loculoascomycetes, orden Pleosporales y familia Pleosporaceae.

Históricamente se lo clasificó en *Helminthosporium* hasta que en 1959 se reclasificó su fase asexual en *Bipolaris* (Shoemaker, 1959).

Es un hongo que se multiplica parasitariamente en la planta viva y saprofiticamente en los restos vegetales, resultando una adición del inóculo al suelo (Reis, 1985).

El género *Cochliobolus* se caracteriza por producir un ascocarpo globoso con un cuello cilíndrico alargado, ascas cilíndricas, y ascosporas filiformes enrolladas helicoidalmente (Kumar et al. 2002, Acharya et al. 2011). El hongo se diferencia de otros miembros del género *Bipolaris* sobre la base de características morfológicas de conidióforos y conidiosporas (Kumar et al., 2002).

*B. sorokiniana* forma durante su desarrollo, estructuras asexuales llamadas conidióforos a partir de los cuales se producen los conidios (Gilchrist-Saavedra et al., 2005). Los conidióforos pueden desarrollar una forma individual o grupal (en racimos), son erectos, no ramificados, miden entre 100-150  $\mu\text{m}$  x 6-8  $\mu\text{m}$  y tienen varias septas (Zillinsky, 1984). Según Acharya et al. (2011), los conidióforos son largos, tabicados, simples, miden entre 6-10 x 110-220  $\mu\text{m}$ , presentan color marrón oscuro a oliva en la base y algo más pálido en el punto de crecimiento. Surgen en racimos a través de los estomas, mediante rupturas de la epidermis o heridas y producen conidios sucesivamente sobre nuevos puntos de crecimiento.

Los conidios se desarrollan de forma lateral a partir de poros por debajo de las septas del conidióforo. Presentan color café, son oblongos, adelgazados hacia la punta, ligeramente curvos con paredes lisas y tienen una cicatriz basal. Miden entre 60-120  $\mu\text{m}$  x 12-20  $\mu\text{m}$  y tienen un número de septas que varía de 3 a 9 (Zillinsky, 1984). En el tejido del huésped produce micelio tabicado que se ramifica inter e intracelularmente (Acharya et al., 2011).

Desde el punto de vista fitopatológico, el desarrollo de conidios es muy importante porque se repite durante todo el ciclo del cultivo, y estos pueden infectar hojas, tallos, espigas y granos (Gilchrist-Saavedra et al., 2005).

El estado teleomórfico perfecto, se observó en el laboratorio y fue descrito primero como *Ophiobolus sativus*. Fue más tarde rebautizado a *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur en 1942. En condiciones naturales, el estado perfecto sólo se encontró en Zambia por Raemaekers en el 1988, y no se ha reportado de la aparición en otras áreas dominadas por el patógeno (Kumar et al. 2002, Acharya et al. 2011).

### 2.3.1 Especialización patogénica

El hongo presenta diversos perfiles de virulencia dependiendo del cultivar con el que interactúe. Existen diversos antecedentes mundiales que reportan diferencias en virulencia de *C. sativus*. El primer estudio que reportó especialización fisiológica entre aislados de trigo y de cebada fue Christensen, citado por Gamba y Estramil (2012).

Valjavec-Gratian y Steffenson (1997) evaluaron la virulencia diferencial de veintidós aislados de Dakota del Norte (EE.UU.) de *C. sativus*, en tres genotipos diferentes de cebada (ND 5883, Bowman y NDB 112). Once aislados adicionales de Minnesota, Dakota del Sur, Nebraska, Colorado, Japón y China fueron introducidos para su comparación. De estos treinta y tres aislados, tres patotipos (0, 1 y 2) fueron identificados basados en las respuestas de infección de los tres genotipos usados: el patotipo 0 exhibió baja virulencia y fue el que más apareció, el patotipo 2 presentó alta virulencia para el genotipo Bowman y baja para los otros dos y el patotipo 1 mostró alta virulencia para el genotipo ND 5883 y baja para Bowman y NDB 112 y fue el que se encontró en menor frecuencia. El patotipo 1 se encontró en la región Noreste y centro Este mientras que los patotipos 2 y 0 se encontraron en todo Dakota del Norte. Aislados que presentan el patrón de virulencia del patotipo 1 fueron identificados en Colorado, Nebraska, Japón y China. El resto de los aislados colectados fuera de Dakota del Norte fueron del patotipo 0.

En el trabajo de Fetch y Steffenson (1999), se utilizaron miles de genotipos de cebada que se evaluaron desde 1990 a 1998 en Dakota del Norte, y fueron plantados tanto en el campo como en invernáculos con ambiente controlado. Los cincuentaiséis aislados del patógeno provenían de Brasil, China, Estados Unidos, Japón, Nueva Zelanda, Polonia y Uruguay. De la evaluación de la diversa colección de germoplasmas de cebada y los aislados de *C. sativus*, se desarrolló una escala (1 a 9) de respuesta a la infección basada en el tipo (presencia de clorosis y necrosis) y tamaño relativo de las lesiones de mancha borrosa observadas en la segunda hoja de plántulas de cebada (figura 1). Estas nueve respuestas a la infección fueron clasificadas en baja (1 a 3), media (4 y 5) y alta (6 a 9) compatibilidad parásito-huésped. La respuesta baja mostró muy pequeñas lesiones necróticas con una clorosis marginal muy difusa o inexistente. La respuesta media a la infección fue constituida por lesiones necróticas medianas con un halo clorótico distintivo y delimitado, mientras que en la alta respuesta se observa necrosis largas con halo clorótico y diferentes grados de clorosis en expansión. Además, desarrollaron otra escala (figura 2) de cuatro categorías para plantas adultas (R=resistente, MR=moderadamente resistente, MS=moderadamente susceptible y S=susceptible), también basada en el tipo y tamaño relativo de las lesiones presentes en las hojas.

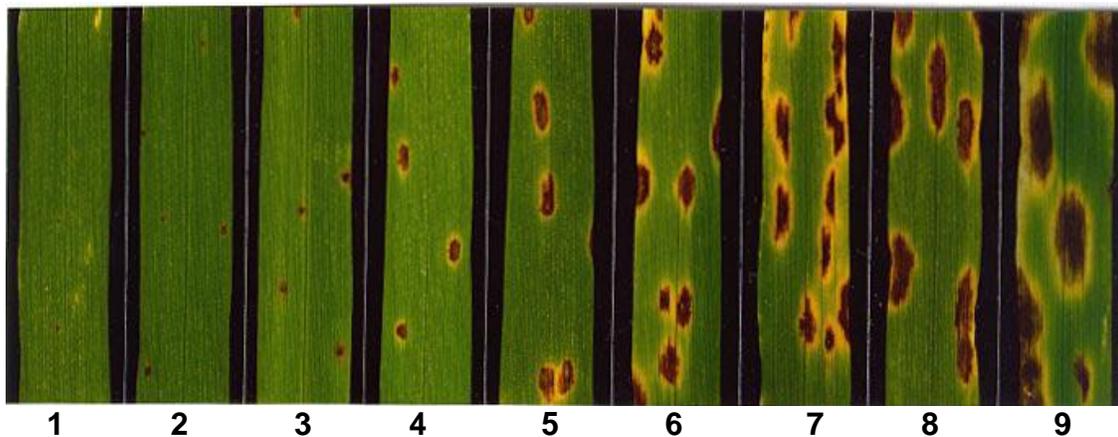


Figura 1. Escala de respuesta a la infección para plántulas de cebada.

Fuente: Fetch y Steffenson (1999).

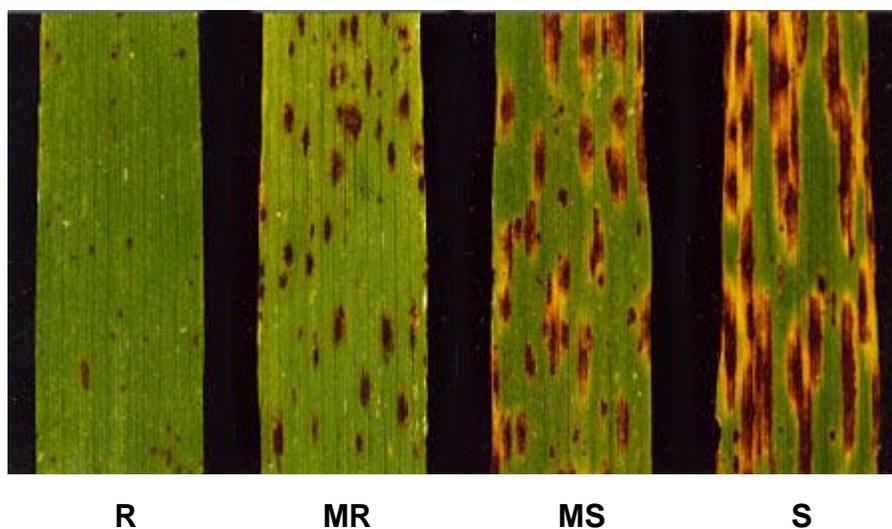


Figura 2. Escala para plantas adultas.

Fuente: Fetch y Steffenson (1999).

En Siria, Arabi y Jawar (2003) estudiaron diversos patotipos de *C. sativus* utilizando treinta y un aislados en trece genotipos de cebada. Se identificaron cuatro patotipos en base a su infección y a la forma de la lesión que provocaron. El patotipo 1 indujo pequeñas y redondas lesiones necróticas marrones oscuras. El patotipo 2, presentó lesiones necróticas alargadas, color marrón claro con áreas de clorosis expandida. El patotipo 3 mostró lesiones marrón claro con gris en el centro y márgenes cloróticos. Por su parte el

patotipo 4 indujo lesiones necróticas marrón oscura con clorosis expandida. El porcentaje de área foliar que exhibía síntomas de enfermedad para cada genotipo fue determinado utilizando una escala numérica del 1 al 9, siendo 1 el más resistente y 9 muy susceptible. El patotipo 1 exhibió baja virulencia en todos los genotipos utilizados, el patotipo 2 y patotipo 3 fueron moderadamente virulentos y el patotipo 4 tuvo una alta virulencia. Los patotipos que se encontraron en mayor cantidad fueron el 3 y 4. El genotipo AECS 71 fue altamente resistente a todos los patotipos, sugiriendo la existencia de un mecanismo de resistencia general.

El estudio realizado en Australia en 2004, se llevó adelante utilizando diecisiete cultivares de cebada con diferentes reacciones a *C. sativus* así como variedades resistentes de trigo, centeno y triticale que fueron incluidos en el set diferencial inicial (Meldrum et al., 2004). Cinco de estos cultivares de cebada y un cultivar de trigo utilizados, habían exhibido respuesta de infección en estudios previos. Las líneas de cebada fueron Larker (resistente), Klaxon/Tallon-34 (moderadamente resistente), Gilbert (moderadamente resistente a moderadamente susceptible), Klaxon/Tallon-45 (moderadamente susceptible) y Skiff (susceptible). Estas veinte líneas de cultivares australianos e internacionales que se incluyeron fueron selectos de un set diferencial preliminar. Las líneas y cultivares fueron seleccionadas por tener un rango de respuesta de infección ya muestreados en invernáculo y en suelo; y además se conocía su resistencia a patotipos originada en América del Norte. Treinta y cuatro aislados de *C. sativus* de un amplio rango geográfico fueron usados en el estudio. Los aislados fueron colectados de varios huéspedes, parte de plantas e incluso del restrojo. Todos estos aislados fueron colectados entre 1995 y 1999 excepto el aislado SB17 el cual fue colectado en 1985. Se estudió la relación entre infección y concentración de conidios y la enfermedad fue evaluada sobre las líneas, las de respuesta a la infección de 1 a 4 fueron clasificadas como resistentes mientras que aquellas con respuesta de infección 5 a 9 se clasificaron como susceptibles. Los dos patotipos más comunes fueron 377 (quince aislados) y 000 (doce aislados). Estos dos patotipos representaron el 79% del total. Los restantes siete aislados pueden ser separados en cuatro patotipos, 177 (cuatro aislados), 033, 404 y 737 con un aislado cada uno. El análisis de conglomerados de la respuesta de infección separó los treinta y seis aislados en seis patotipos agrupados en cuatro distintos grupos. Grupo 1 consistía en patotipo 177, 377 y 737, grupo 2 patotipo 000, grupo 3 patotipo 404 y grupo 4 patotipo 003. Los grupos 1 y 2 contenían treinta y dos aislados (92%). Los grupos 3 y 4 un solo aislado. Los cultivares de cebada Beecher, Bonanza, Bowman, Heartland, Klaxon/Tallon-34, Larker, NDB112, QB1991-1 fueron resistentes a todos los aislados testeados y consecuentemente fueron agrupados juntos (Meldrum et al., 2004).

En el estudio de Ghazvini y Tekauz (2007), se buscó estudiar la diversidad en la virulencia de aislados de *B. sorokiniana* provenientes de Canadá y otras partes del mundo: noventa y dos aislados fueron recolectados en Canadá y treinta y cinco fueron de Australia, Uruguay, Polonia, Brasil, EEUU y México. Se utilizaron un total de doce genotipos de cebada: seis canadienses y seis de Estados Unidos. Todos los aislados inoculados mostraron síntomas de mancha borrosas en los doce cultivares testeados. Las lesiones mostraron diferentes tamaños y ocuparon la hoja de diferente manera. Los síntomas variaron de manchas necróticas muy pequeñas sin clorosis, hasta lesiones necróticas largas acompañadas de un halo marginal distintivo. Los aislados fueron clasificados en ocho grupos de virulencia. A nivel general el 62% de los aislados se agrupó dentro de los tres grupos más virulentos. Otros treinta y dos aislados, correspondiente al 25%, estuvieron dentro del grupo menos virulento. De los ocho aislados uruguayos utilizados ninguno se encontró en el grupo más virulento, sin embargo, siete de ellos sí se encontraron dentro de los otros dos grupos más virulentos. El restante aislado estuvo en el menos virulento de todos los grupos.

Gamba y Estramil (2012) en el primer estudio exploratorio realizado en Uruguay, sugirieron la existencia de tres perfiles de virulencia diferencial, en un grupo de treinta y siete aislados y quince genotipos de cebada. Trabajos posteriores encontraron tres cebadas uruguayas que permitieron distinguir tres grupos de virulencia diferencial, entre treinta aislados. En ese estudio, también se inocularon los tres patotipos estadounidenses (patotipo 0: ND 93-1; patotipo 1: ND 90Pr, y patotipo 2: ND 85F), identificados y caracterizados por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997) y veintiséis aislados uruguayos que fueron inoculados en las tres cebadas diferenciales (ND 5883, Bowman y NDB 112) usadas por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997). Se identificaron dos grupos de aislados, uno de igual comportamiento al patotipo 1 y el otro igual al patotipo 2. No se encontró ningún aislado con patrón de virulencia similar al patotipo 0 (Gamba y Estramil, 2002). Otro reporte nacional sugiere la existencia de una alta variabilidad de la población local de *C. sativus*, así como niveles muy bajos de resistencia genética de la cebada (Gamba, 2011).

Previamente Gamba (2011), publicó resultados en los cuales los aislamientos y las cebadas fueron ordenados por la predominancia de fenotipos de infección altos hasta bajos. Se utilizaron cuarenta y cuatro aislamientos monospóricos y uno canadiense (aislado por Ghazvini y Tekauz, 2007), para inocularlos en veintiocho genotipos de cebada. Los aislamientos 02.81.3 y 02.10.2 fueron los que mostraron avirulencia sobre el mayor número de cebadas (84%). Se identificaron ocho virulentos sobre todas las cebadas, pero diferentes entre sí teniendo en cuenta los otros dos fenotipos de infección (intermedio y alto). El comportamiento de las cebadas fue variable entre

AMBEV 19, resistente al mayor número de aislamientos (51,6%) y AMBEV 23, susceptible a todos los aislamientos. Los otros materiales presentaron un importante rango de comportamiento diferente frente a este grupo de aislamientos. En este estudio no fue posible agrupar aislamientos con similar patrón de avirulencia/virulencia.

## 2.4 EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO

### 2.4.1 Factores determinantes en el desarrollo de la epidemia

Las enfermedades en las plantas se desarrollan como resultado de la combinación de tres componentes básicos: plantas susceptibles, patógeno virulento y condiciones ambientales favorables por un período de tiempo determinado (Agrios, 2005).

#### 2.4.1.1 Condiciones favorables para la mancha borrosa

Las condiciones favorables para la infección foliar son temperaturas óptimas de 25 a 28 °C y al menos 24 horas de agua libre en la superficie de las hojas (Reis, 1985).

Forcelini, citado por Possamai y Ferrari (2015), relata que para *B. sorokiniana*, el efecto de la temperatura es dividido en tres niveles. En órganos aéreos, la transmisión es mayor entre 20-25 °C, en cuanto que temperaturas entre 15-20 °C restringe más al patógeno. En el sistema radicular con temperaturas ambiente entre 25-30 °C ocurre mayor muerte de plantas por mayor infección de las mismas. La temperatura funcionaría como instrumento regulador de la intensidad del proceso. Como los conidios germinan y penetran en las hojas necesitan temperaturas entre 24 a 28 °C y 9 a 24 horas de agua libre en la superficie de la hoja por una a dos semanas.

En condiciones de baja intensidad de la luz, el patógeno puede colonizar los tejidos del huésped intercelular sin causar daños visibles (Dehne y Oerke, 1985).

Según Kumar et al. (2002) la enfermedad puede desarrollarse muy rápido si el cultivo se encuentra en la etapa de tres cuartos de la espiga emergida, ya que el cultivo se hace más susceptible al patógeno.

Temperaturas oscilando entre 24 y 28 °C, junto con días lluviosos, y presencia de agua libre en la superficie de la hoja por 9 a 24 hs, favorecen el inicio de la infección. En rangos de temperatura de 10 °C a 30 °C causa marchitamientos, pero si la humedad relativa no es la mencionada

precedentemente, los efectos son leves. Con condiciones de temperatura (mayores a 32 °C) y baja humedad se reduce el grado de infección (SINAVIMO, 2016).

#### 2.4.2 Ciclo biológico de la enfermedad

Mancha borrosa es una enfermedad policíclica, es decir que el patógeno cumple más de un ciclo de infección y producción de inóculo por estación de crecimiento (Altier y Pereyra, 2011). En la figura 3 (Pereyra y Germán, 2011) se puede observar el ciclo del hongo.

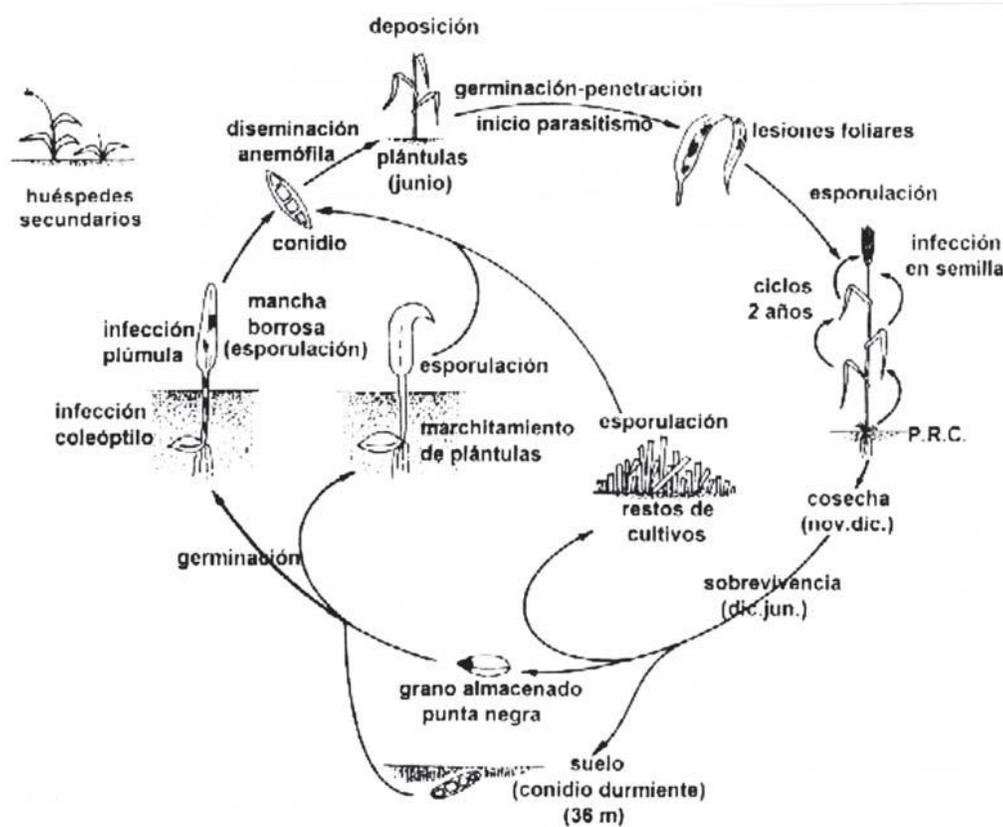


Figura 3. Ciclo biológico de *Cochliobolus sativus*. Dibujo: E. Ramallo.

#### 2.4.2.1 Formas de sobrevivencia y fuentes de inóculo

*Cochliobolus sativus* es un patógeno cosmopolita, provoca enfermedad tanto en cebada como en trigo y además puede sobrevivir sobre una gama muy amplia de huéspedes secundarios, como por ejemplo *B. catharticus* (cebadilla), *L. multiflorum* (raigrás), *Phalaris* sp. (Falaris) y *S. bicolor* (sorgo, Pereyra y Germán, 2011). También se ha encontrado presente en avena y maíz. Esto lleva a que el hongo sea viable durante muchos meses, aunque su efecto en el desarrollo de la enfermedad aún no ha sido determinado para estos cultivos (Díaz de Ackermann et al., 2004).

Además *C. sativus* puede sobrevivir en forma de conidio durmiente libre en el suelo (Pereyra y Germán, 2011). Estos tienen baja habilidad saprofítica y se mantienen durmientes (micostasis) evitando su germinación en ausencia del huésped (Chinn y Tinline 1964, Cook y Baker 1983). En Brasil se ha determinado que pueden permanecer en el suelo hasta 36 meses (Reis, 1985).

Las principales fuentes de inóculo son las semillas, las lesiones necróticas en plantas del cultivo y plantas voluntarias, rastrojos infectados de huéspedes y para la fase de podredumbre radicular y de coronas, los conidios durmientes en el suelo (Reis, 1985). *C. sativus* al igual que *Drechslera teres*, sobrevive asociado a la semilla de cebada desde donde se transmite a la plántula en forma muy eficiente (González, 2010).

En la actualidad la siembra directa predomina sobre la siembra convencional. En siembra directa, el rastrojo es la fuente de inóculo más importante para las manchas foliares, seguido de la semilla (fuente principal en siembra convencional), y por último el suelo, el aire, los huéspedes secundarios y las plantas voluntarias. La relación entre el rastrojo remanente en la superficie del suelo en siembra directa y el incremento en la severidad de las manchas foliares de cebada ha sido ampliamente demostrada (Jordan y Allen 1984, Rees y Platz 1987, Khan 1988).

#### 2.4.2.2 Dispersión

*C. sativus* tiene distintas maneras de ingresar a un cultivo: por aire, acompañando a la semilla o permaneciendo en la chacra en el período entre zafra ya sea en el suelo, en posibles huéspedes alternativos y/o en el rastrojo (Pereyra y Germán, 2011).

Ingold, citado por Pereyra et al. (2002) afirma que la liberación de las esporas puede realizarse a través de una descarga violenta o pasivamente a través del viento, la lluvia o insectos. A su vez, la dispersión pasiva comprende dos tipos de esporas con biología diferentes; las "esporas-secas" y las

“esporas-viscosas”. Las esporas-secas pueden ser desprendidas y transportadas por el viento, como es el caso de la mancha borrosa.

La capacidad de dispersión de *B. sorokiniana* es limitada dado que presenta esporas grandes y pesadas por lo que son diseminadas por el viento a distancias cortas (Pereyra, 1996a), que oscilan entre 50 a 200 m (Reis y Reis, 1994). Igualmente, Carmona (2008), afirma que el viento no puede transportar los conidios a grandes distancias porque las esporas son grandes y pesadas y agrega que la diseminación a largas distancias es realizada a través de la semilla infectada.

#### 2.4.2.3 Infección

La infección está relacionada a la duración del periodo de mojado de los tejidos y a la temperatura del ambiente. Las primeras ocurren en las hojas, la mayoría de las veces en primavera a partir de conidios llevados por el viento producidos en restos de cultivos o en otros huéspedes, bajo condiciones de temperaturas cálidas y alta humedad. La mancha borrosa se puede encontrar en todos los estados de desarrollo de la planta tanto en hojas como en vainas. Aunque puede presentarse en estados tempranos del cultivo, en el follaje generalmente se desarrolla luego de la espigazón, cuando las temperaturas más cálidas la favorecen (Pereyra y Germán, 2011). Las infecciones que se presentan en las raíces y coronas antes o durante la floración usualmente matan la planta antes de la formación del grano (Zillinsky, 1984).

Si ocurren las condiciones adecuadas, las hifas producen conidióforos, que emergen a través de los estomas del tejido del huésped. La emergencia de conidióforos produce la liberación de conidios, los cuales son transportados a través del viento y salpicaduras de la lluvia, construyendo así epidemias policíclicas (Acharya et al., 2011).

#### 2.4.2.4 Germinación, penetración y colonización

Una vez en contacto con la superficie del huésped y siempre que las condiciones ambientales sean favorables, el inoculo del patógeno entra en una fase de crecimiento rápido, apoyado por sus propias reservas de alimento. Durante este periodo el organismo patógeno es más vulnerable a las condiciones adversas como por ejemplo, la desecación y por consiguiente, depende más del ambiente; una vez producida la penetración, el organismo patógeno vuelve a estar protegido de las condiciones externas (Stubbs, 1986).

Cuando los conidios germinan se produce el tubo germinativo, que está rodeado por grueso sustrato mucilaginoso. Este sustrato mucilaginoso permite la germinación de los conidios al permanecer adherido a la superficie del hospedero. A continuación, se hincha el tubo germinal para producir el apresorio, a partir del cual se seguirá desarrollando la infección de las hifas. Las hifas luego entran al tejido hospedero ya mediante la ruptura de la epidermis o vía estomas. Inmediatamente después de la entrada al tejido hospedero, la hifa se divide y ramifica rápidamente sobre todo el espacio intercelular del mesófilo (Acharya et al., 2011).

Khan et al. (1992), reportan que el proceso de germinación, emisión del tubo germinativo y penetración puede llevar hasta 96 horas, dependiendo de la resistencia genética del cultivar.

El hongo generalmente penetra las células a partir del apresorio, mediante un fino tubo de penetración, el cual internamente produce una vesícula. A partir de esta vesícula, se forman hifas secundarias que invaden el mesófilo intercelular (Larenz et al., 1986).

Como patógeno hemibiótrofo que es, *B. sorokiniana* experimenta una fase biotrófica seguida de una fase de crecimiento necrotrófica. Análisis microscópicos del desarrollo del hongo en hojas susceptibles de cebada muestran claramente las distintas fases de crecimiento caracterizadas por la penetración en la cutícula y pared celular, seguida por un desarrollo de la hifa dentro de las células epidérmicas hospederas vivas (fase biotrófica). Luego le sigue la fase necrotrófica, donde se da una invasión de la hifa dentro de la capa del mesófilo, acompañado por la muerte de las células del mesófilo y de la epidermis. En algunos casos el patógeno penetra vía estomas. En la fase necrotrófica las células mueren antes de entrar en contacto directo con la hifa producto de la secreción de toxinas. Al menos dos tipos de toxinas han sido postuladas como involucradas en la necrosis en hojas infectadas. Estas toxinas son el helminthosporol que actúa como desacoplador de la membrana y el compuesto de sorokinianin inhibidor de la síntesis celular (Kumar et al., 2002).

#### 2.4.2.5 Síntomas

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 estadio de plántula provocando marchitamiento de plántulas y pueden incrementarse principalmente en las hojas después de la espigazón. Este hongo puede presentarse además en corona y raíces, causando podredumbre, también en

nudos los cuales pueden presentar lesiones castaño-oscuro que se proyectan a los entrenudos, en vaina, espiga y en grano (Pereyra et al., 2005a).

### 2.4.3 Toxinas

El colapso de las células del hospedero en la fase necrotrófica estaría asociado a la secreción de toxinas por el hongo, ya que las células mueren sin tener contacto directo con las hifas. Las principales toxinas producidas por *Bipolaris sorokiniana* son: prehelminthosporal, helminthosporal y el compuesto sorokinianin (Kumar et al., 2002).

El prehelminthosporal es el más abundante y activo de los tres, producido en cantidades de 1.2-2.1 µg/mg de materia seca del tejido fúngico (Carlson et al., 1991). En su forma aldehído, ejerce un efecto inhibitorio en el bombeo de protones por H<sup>+</sup>-ATPasa de una manera en la que es dependiente de la dosis (Olbe et al., 1995). Además, inhibe las actividades enzimáticas de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y β-1,3-glucano sintasa (Briquet et al., 1998).

Se han identificado varios tipos de toxinas pertenecientes a la familia helminthosporal, la cual es la más estudiada, ya que actúan como desacopladores, inhibiendo la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, la fotofosforilación en los cloroplastos y el bombeo de protones a través de la membrana plasmática. En 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 reactivo del oxígeno). Existiría entonces una correlación positiva entre el nivel de susceptibilidad y la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en lesiones de las hojas, por lo que estaría asociado a la infección exitosa por parte del patógeno (Kumar et al., 2002).

Sorokinianin es un compuesto que ha sido aislado de cultivos filtrados de hongos (Nakajima et al., 1994), y muestra actividad inhibitoria en la germinación de la semilla de cebada (Nakajima et al., 1998).

## 2.5 IMPACTO INDUSTRIAL DE *Cochliobolus sativus* EN CEBADA CERVEZERA

Inoculaciones con *C. sativus* redujeron el rendimiento, los componentes del rendimiento y la calidad de la malta. Tanto los factores de rendimiento como los de calidad fueron más afectados negativamente si la inoculación ocurrió inmediatamente antes de la emergencia de la hoja bandera (Z 3.7, Zadoks et al., 1974) o en la anthesis (Z 6.0) que en el desarrollo temprano del grano lechoso (Z 7.3, Nutter et al., 1985).

Arias, citado por Pereyra y Germán (2011) afirma que la mancha borrosa es capaz de disminuir el peso y tamaño de grano y dependiendo del momento de comienzo de la enfermedad, estas reducciones pueden llegar al orden del 40% en ambas variables. *C. sativus*, además, reduce la calidad del grano por lo que una alta incidencia de punta negra puede llevar al rechazo del lote en algunos países.

Como la calidad de la cebada para industria es muy importante, para la exportación se deben cumplir con ciertos requisitos. Brasil es el principal comprador de nuestro país y exige: a) humedad: entre 12%-13%, penalizado si es mayor a 14%. b) pureza varietal: 95%. c) poder germinativo: mínimo 92%. d) PMG: 40-42 g. e) peso hectolítrico: 68-72 Kg por hectolitro. f) tamaño: tipo 1: mayor a 2,5 mm, tipo 2: 2,2-2,5 mm y tipo 3: menor a 2,2 mm descarte. g) porcentaje de proteína: 8,5%-11,5%. h) homogeneidad: por tamices (Arias, 1991).

La reducción en rendimiento por mancha borrosa es en gran parte función de la reducción en el peso del grano (Nutter et al., 1985). Cuando la infección de las plantas es severa, las plantas pueden quedar pequeñas, las espigas no emergen completamente y los granos son más livianos (Karov et al., 2009). Según Wiewióra (2006), todos los granos provenientes de plantas con alta infección tuvieron un menor peso de mil granos (PMG) respecto a plantas control. Plantas infectadas en la etapa de Z 3.1 redujeron su PMG en 7,9 gramos respecto al control (plantas sin inocular).

Infecciones del grano afectan significativamente su capacidad germinativa. Granos fuertemente infectados con el patógeno germinan peor que aquellos con menos infección. Se ha demostrado que aquellos que fueron inoculados con el patógeno, su germinación disminuyó de 93% en granos control a 75% en granos fuertemente infectados. El descenso de la capacidad germinativa está asociado a un incremento de plantas anormales (Wiewióra, 2006). El poder germinativo es la principal característica de una cebada cervecera, ya que todos los granos deberían germinar durante el malteo. Los granos que no germinen, jamás serán malta sino adjuntos (o grano crudo), depreciando el valor del producto final (Arias, 1991).

## 2.6 MANEJO DE LA MANCHA BORROSA

### 2.6.1 Control cultural

El uso de materiales con buenos niveles de resistencia genética y la rotación de cultivos que eviten la siembra de trigo y cebada en forma reiterada, serían las medidas de control más eficaces desde el punto de vista ambiental

(Silva, 2011). Las rotaciones con cultivos diferentes a los cereales y el arado profundo de los rastros enfermos son las prácticas culturales recomendadas para reducir la incidencia de la enfermedad (Zillinsky, 1984).

Pereyra et al. (2003), encontraron un efecto significativo del tipo de cultivo previo a la cantidad de conidios de *Bipolaris sorokiniana* por gramo de suelo seco. La cebada usada como cultivo previo aumentó la cantidad de *C. sativus* con respecto a trigo o girasol.

En base a la información generada en el país durante estudios epidemiológicos, un período de dos a tres años sin cultivos huéspedes en el invierno sería suficiente para reducir infecciones tempranas de mancha borrosa. Los requerimientos de temperaturas más altas determinan que la mancha borrosa sea una enfermedad que aparezca generalmente luego de la espigazón; por lo que las siembras tardías determinarían un período mayor de condiciones favorables para la enfermedad durante el ciclo del cultivo.

El análisis sanitario del rastrojo del cereal de invierno de la zafra anterior puede ser una herramienta orientativa para decidir la siembra. Es un análisis rápido que cuantifica conidios del hongo presentes en el rastrojo dando una idea del potencial patogénico del mismo ya que sabiendo la cantidad de inóculo y de rastrojo se puede estimar un potencial de infección.

Debido a que más del 80% del área sembrada de cebada es bajo la modalidad de siembra directa, la medida clave para viabilizar la siembra directa es el uso de rotación con cultivos no huéspedes a los patógenos de cebada. La rotación es una forma de eliminar al huésped, dándole tiempo suficiente a los microorganismos del suelo a mineralizar el rastrojo. Esta práctica disminuye el inóculo inicial llevando a que la enfermedad aparezca más tardíamente, tenga menor tasa de desarrollo y menor intensidad máxima (Pereyra y Germán, 2011).

El desarrollo de genotipos resistentes de cebada a la mancha borrosa es considerada la forma más económica de controlar esta enfermedad (Arabi y Jawhar, 2003).

El uso de cultivares con resistencia genética es el principal sostén del manejo integrado, sin embargo, su efectividad puede ser afectada por el tipo y nivel de resistencia, así como por variaciones de la virulencia en la población del hongo (Gamba y Estramil, 2012).

## 2.6.2 Cuantificación de la enfermedad

- Distrain

Distrain es un programa de computación de uso público desarrollado por Tomerlin y Howell (1988), para capacitarse en la estimación de la severidad de las enfermedades foliares presentes en los distintos cereales de invierno. Dentro de estas enfermedades se destacan: mancha en red, mancha borrosa, escaldadura y roya de la hoja (Tomerlin y Howell, 1988).

- Video-imagen

*"En la actualidad se cuenta con algunas técnicas basadas en el uso de video-imagen, estas permiten estudiar la presencia de lesiones en el tejido vegetal, y relevar el área afectada real a través del uso de una computadora con programas especializados como Assess 2.0 ® (Lamari, 2008). Este software permite una rápida medición de área foliar, porcentaje de enfermedad, largo de raíz, conteo de lesiones, porcentaje de cobertura de suelo a través de material escaneado, fotografías digitales, microscopía, etc."* (Pereyra y Germán, 2011).

A nivel de chacra, en general se recomienda determinar la severidad de las manchas foliares. Es posible utilizar el dato de incidencia (% de hojas con lesiones > a 2 mm) por ser más fácil y objetivo. Sin embargo, debido a que la relación entre severidad e incidencia sólo es lineal en los niveles más bajos de ambas variables, sólo debe utilizarse incidencia cuando los niveles de severidad no superan 7 a 8% (Pereyra y Germán, 2011).

El nivel de infección de un cultivo se obtiene mediante un monitoreo en 8-10 puntos de la chacra evaluando en cada punto 15 a 20 tallos por severidad y/o incidencia de las enfermedades presentes. Una vez que se está entrenado en la determinación de severidad es posible recorrer la chacra y hacer una estimación visual en cada uno de esos puntos de la chacra (Pereyra y Germán, 2011).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 SIEMBRA

Se sembraron 4 genotipos de cebada (4-6 semillas de cada uno) en cada maceta de 0,6 litros con el objetivo de tener al menos 4 repeticiones de cada interacción. Por lo que el número objetivo de plantas fue de 16 por maceta, aproximadamente. El sustrato que se utilizó era una mezcla de tierra de campo y abonos naturales.

Luego de sembradas permanecieron en la cámara de crecimiento de la EEMAC, en condiciones controladas a 21° C y 16 h de fotoperiodo. No hubo agregado de fertilizante y el riego se manejó de modo que no sea limitante para el crecimiento normal de las plántulas.

#### 3.2 ELECCIÓN DE GENOTIPOS

Se sembraron un grupo de veintiocho cebadas candidatas a integrar un set diferencial internacional (cuadro 1). Esto se decidió en base a la cantidad de antecedentes que existen para algunos de estos genotipos, parte de los cuales se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 1. Genotipos de cebada sembrados del set diferencial.

| <b>SET DIFERENCIAL INTERNACIONAL</b> |            |           |            |
|--------------------------------------|------------|-----------|------------|
| 12 IBYT#25                           | CLE 253    | Lindwall  | NRB 091084 |
| A. Madi                              | Conlon     | N. Daymán | Perún      |
| Bowman                               | Conquest   | ND 17293  | Skiff      |
| CI 5791                              | Delta      | ND 23122  | Stirling   |
| CI 9214                              | Gilbert    | ND 23180  | Tolar      |
| CIHO 1227                            | I. Ceibo   | ND 5883   | TR 251     |
| CIHO 6311                            | I. Guaviyú | NDB 112   | TX 7934    |

Según Valjavec-Gratian y Steffenson (1997) los tres genotipos de cebada ND 5883, Bowman y NDB 112 se incorporaron porque se descubrió que eran útiles para diferenciar los tipos de virulencia de *C. sativus*. Bowman derivó de la cruz Klages//Fergus/Nordic/3/ND 1156/4/Hector y exhibe resistencia moderada a *C. sativus* a través de Nordic, presumiblemente debido a genes originalmente derivado de NDB 112. ND 5883 se seleccionó a partir de un cruce entre Clipper (PI 349366) y la línea experimental canadiense 702-10. La línea NDB 112 se desarrolló en la Universidad Estatal de Dakota del Norte, Fargo, durante la década de 1950 y se origina en la cruz entre CI 7117-77 y Kindred. Exhibe alta resistencia a *C. sativus*.

Por su parte Ghazvini y Tekauz (2007), también incluyeron estas tres líneas que se utilizaron previamente para caracterizar la población de *B. sorokiniana* en Dakota del Norte y para la identificación de patotipos en este y otros experimentos. Los cultivares desarrollados en los Estados Unidos y ampliamente usados en Manitoba, de los cuales la línea diferencial Conlon fue la única seleccionada para integrar el set; fueron incluidos en este estudio para brindar información adicional sobre la virulencia de aislados canadienses. Los genotipos canadienses TR 251 y TR 261 fueron elegidos en base a sus reacciones diferenciales a varios aislados en estudios previos.

Los cultivares australianos Stirling, Gilbert, Lindwall y Skiff fueron seleccionados porque dieron una gama de respuestas de infección en evaluaciones a campo e invernadero. Stirling y Gilbert fueron incluidas por haber mostrado moderada susceptibilidad en Australia, mientras que Skiff estaba caracterizada como susceptible en dicho país. Lindwall por su parte, fue incluida por ser susceptible a podredumbre de raíz. Los tres genotipos internacionales (ND 5883, Bowman y NDB 112) fueron también elegidos para usar en este estudio realizado en Australia, ya que tienen resistencias conocidas a los patotipos que se originaron en América del Norte. Las líneas diferenciales CIHO 1227 y CI 6377, fueron incluidos por haber sido caracterizados como resistentes en Dakota del Norte (Meldrum et al., 2004).

Cuadro 2. Nombre, tipo de espiga, origen y pedigrí de catorce genotipos del set diferencial.

| <b>Material</b> | <b>Número de hileras</b> | <b>Origen</b> | <b>Pedigrí</b>                          |
|-----------------|--------------------------|---------------|---|
| Bowman          | 2                        | DN (EEUU)     | Klages//Fergus/Nordic/3/ND1156/4/Hector |
| ND 5883         | 2                        | DN (EEUU)     | Clipper/línea experimental Canadá702-10 |
| NDB 112         | 6                        | DN (EEUU)     | Reselección de Kindred CI6969/CI7117-17 |
| TX 7934         | 6                        | Texas (EEUU)  | Tokak/KY79-44//TAMBAR 401               |
| A. Madi         | 2                        | Alemania      | AC4404/Katharina//Krona                 |
| INIA Ceibo      | 2                        | Uruguay       | FNCI-22/Defra                           |
| ND 17293        | 2                        | DN (EEUU)     | ND14651/ND15062                         |
| ND23122         | 2                        | DN (EEUU)     | ND18172/DH6/ND19931                     |
| ND 23180        | 2                        | DN (EEUU)     | ND19888/ND18380-1                       |
| CLE 253         | 2                        | Uruguay       | Perún/l. Aromo                          |
| INIA Guaviyú    | 2                        | Uruguay       | ND16680/ND13111(Carumbé)                |
| N. Daymán       | 2                        | Uruguay       | ND7085/ND4994-15//ND8968                |
| Perún           | 2                        | Europa        | HE1728/Karat                            |
| 12IBYT#25       | 6                        | ICARDA-CIMMYT | P_Dulce/Barberousse//Gloria-Bar/Come_B  |

DN: Dakota del Norte.

Como la germinación y las plantas logradas de los materiales del set diferencial no fue buena, se decidió evaluar cebadas comerciales, las cuales mostraron comportamiento diferencial en la Red Nacional de Evaluación Nacional de Cultivares de Cebada Cervecera (Convenio INIA-INASE), algunas con fuentes de resistencia conocida y de base genética diferente (cuadro 3).

Una gran cantidad de semillas de diferentes genotipos fueron proporcionadas por INIA-INASE, de las cuales se seleccionaron las doce con registros de antecedentes y las dieciséis restantes fueron las de mayor porcentaje de germinación, dando un total de veintiocho cebadas que pueden observarse en el cuadro 3.

Cuadro 3. Genotipos seleccionados de la red nacional de evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera.

| CULTIVAR    | CRIADERO         | Germinación (%) | Comportamiento frente a mancha borrosa |      |      |
|-------------|------------------|-----------------|--|------|------|
|             |                  |                 | 2013                                   | 2014 | 2015 |
| MOSA/09/312 | JOSEF BREUN      | 91              | ..                                     | IA   | IA   |
| MOSA/10/489 | NORDSAAT         | 91              | ..                                     | IB   | IB   |
| BLONDIE     | NORDSAAT         | 94              | ..                                     | I    | I    |
| MOSA/10/508 | S. RECHERCHES    | 96              | ..                                     | ..   | IA   |
| MOSA/11/213 | ACKERMANN        | 91              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/11/277 | NORDSAAT         | 94              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/12/284 | ACKERMANN        | 93              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/13/123 | ACKERMANN        | 96              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/13/113 | ACKERMANN        | 96              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/14/276 | LIMAGRAIN        | 89              | ..                                     | ..   | ..   |
| MOSA/12/143 | ACKERMANN        | 90              | ..                                     | ..   | ..   |
| CLE 232     | INIA             | 98              | ..                                     | IB   | IB   |
| CLE 233     | INIA             | 92              | I                                      | I    | I    |
| CLE 280     | INIA             | 94              | ..                                     | I    | I    |
| CLE 295     | INIA             | 95              | ..                                     | ..   | ..   |
| CLE 300     | INIA             | 95              | ..                                     | ..   | ..   |
| CLE 301     | INIA             | 94              | ..                                     | ..   | ..   |
| CLE 302     | INIA             | 97              | ..                                     | ..   | ..   |
| N. DAYMÁN   | MALTERIA URUGUAY | 89              | I                                      | I    | I    |
| UMBRELLA    | MALTERIA URUGUAY | 97              | BI                                     | ..   | I    |
| EXPLORER    | MALTERIA URUGUAY | 98              | ..                                     | ..   | AI   |
| AMBEV 303   | MALTERIA URUGUAY | 98              | ..                                     | ..   | ..   |
| MUSA 31     | MALTERIA URUGUAY | 96              | ..                                     | ..   | I    |
| N. CARUMBÉ  | MALTERIA URUGUAY | 98              | I                                      | I    | I    |
| MUSA 19     | MALTERIA URUGUAY | 91              | I                                      | ..   | I    |
| AMBEV 312   | MALTERIA URUGUAY | 96              | ..                                     | ..   | ..   |
| AMBEV 328   | MALTERIA URUGUAY | 96              | ..                                     | ..   | ..   |
| AMBEV 329   | MALTERIA URUGUAY | 96              | ..                                     | ..   | ..   |

B: bajo nivel de infección, I: intermedio nivel de infección, A: alto nivel de infección, ..: sin dato.

Fuente: INIA e INASE (2015).

### 3.3 OBTENCIÓN DE AISLADOS MONOSPÓRICOS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO

Los aislados monospóricos presentados en el cuadro 4, se obtuvieron a partir de trozos de 15 a 20 mm de hojas con síntomas de mancha borrosa; algunas inoculadas en laboratorio y otras colectadas en el campo, todas en nuestro país y en los años 2011, 2012 y 2014. Los lugares de colecta fueron Young, Paysandú, Valdez, Quebracho, Porvenir, San Félix, entre otros. En el año de trabajo (2016), las condiciones ambientales no favorecieron la ocurrencia de mancha borrosa, por lo que no se pudieron coleccionar muestras propias. Por todo esto, y para facilitar la obtención de los aislados monospóricos, se recurrió a utilizar muestras de hojas inoculadas que pertenecían a genotipos como Bowman y NDB 112.

Luego de ser desecadas y esterilizadas superficialmente, las muestras se colocaron en placas de petri de 9 cm con papel de filtro humedecido. La esporulación se promovió incubando estos trozos de hoja por 2-3 días a 21° C, cada conidio se transfirió con una aguja esterilizada a una placa de Petri que contenía agar V<sub>8</sub> al 10 % con CaCO<sub>3</sub> y se mantuvieron a 20° C y 12 h de fotoperíodo por 6-8 días. La multiplicación del inóculo se realizó colocando 4-6 trozos de la colonia en varias placas de Petri que contenían el mismo medio e incubándolas en las mismas condiciones anteriores.

De los veintidós aislados monospóricos utilizados (cuadro 4), varios se lograron de la misma muestra de campo, ya que se “pescaron” los conidios individualmente. Estas muestras se obtuvieron sobre cultivares de cebada diferentes bajo el supuesto de que cada cultivar puede presentar diferente comportamiento a mancha borrosa, lo cual podría ejercer cierta presión de selección en la virulencia de los aislados que de ellas se obtienen (solo se conoce algunas fuentes de resistencia).

Todos los aislados fueron nombrados bajo el mismo criterio, siendo el primer número la referencia del año en que la muestra fue colectada. Esto incluyó también a los obtenidos de las hojas inoculadas, los cuales no mantuvieron su anterior nombre. El aislado 08.106 fue nombrado como 11.01.A y el 94.4 como 11.04.B. En el cuadro 4 se puede observar que aislado fue inoculado en los diferentes grupos de cebadas.

Cuadro 4. Aislados de *C. sativus* utilizados.

| <b>INIA-INASE</b>      |                       |                      |                         |
|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Aislado</b>         | <b>Año de colecta</b> | <b>Cultivar</b>      | <b>Lugar de colecta</b> |
| 11.01.A                | 2011                  | NDB 112              | Hoja Inoculada          |
| 11.04.B                | 2011                  | Bowman               | Hoja Inoculada          |
| 11.07.2                | 2011                  | MUSA 936             | ..                      |
| 11.07.3                | 2011                  | MUSA 936             | ..                      |
| 12.01.3                | 2012                  | ..                   | Hoja Inoculada          |
| 12.03.3                | 2012                  | ..                   | Hoja Inoculada          |
| 12.08.3                | 2012                  | ..                   | Hoja Inoculada          |
| 14.02.4                | 2014                  | Umbrella c/fungicida | P. Speranza             |
| 14.03.4                | 2014                  | Irupé                | Young                   |
| 14.04.2                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.04.3                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.04.4                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.04.5                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.04.6                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.05.3                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.5                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.6                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.7                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.8                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.06.1                | 2014                  | Umbrella             | San Félix               |
| 14.06.2                | 2014                  | Umbrella             | San Félix               |
| 14.06.3                | 2014                  | Umbrella             | San Félix               |
| <b>SET DIFERENCIAL</b> |                       |                      |                         |
| 14.03.4                | 2014                  | Irupé                | Young                   |
| 14.04.2                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.04.6                | 2014                  | INIA Arrayán         | Porvenir                |
| 14.05.3                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.5                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.05.8                | 2014                  | MUSA 19              | La Tentación            |
| 14.06.1                | 2014                  | Umbrella             | San Félix               |
| 14.06.2                | 2014                  | Umbrella             | San Félix               |

..: sin dato

### 3.4 INOCULACIÓN

El momento de inoculación de las plántulas fue al comienzo del desarrollo de la segunda hoja, Z 12. Se realizó previamente un raleo, aquellas que presentaban algún fallo en su crecimiento o que tenían algún síntoma provenientes de la semilla fueron eliminadas.

Para preparar el concentrado, los conidios producidos se colectaron raspando la colonia superficialmente con agua destilada estéril, se agregaron a una licuadora, y luego se filtró el preparado mediante dos capas de gasa, para que quede libre de micelio. Se ajustó la concentración a 5000 conidios/ml usando un hematocitómetro Hausser Scientific Horsham. Para asegurar una completa dispersión del inóculo se agregó 25  $\mu$ l de Tween 20 cada 250 ml de solución.

La inoculación se realizó con un atomizador De Vilbis con presión constante de 10 lb/in<sup>2</sup>, después las plántulas permanecieron 18 hs a 100% de humedad relativa y oscuridad, y luego fueron regresadas a las condiciones anteriormente mencionadas dentro de la cámara de crecimiento.

### 3.5 REGISTRO DE LAS RESPUESTAS DE INFECCIÓN

8 a 10 días post-inoculación se observó en la segunda hoja las respuestas de infección (RI) y se registraron de acuerdo a la escala cualitativa de 9 dígitos desarrollada por Fetch y Steffenson (1999). Estas lecturas (anexo IX) fueron promediadas de tal forma que se obtuviera un solo valor redondeado en un número entero para cada interacción genotipo por aislado.

Luego se agruparon en tres categorías generales: de 1 a 3 (color verde asignado) se consideraron indicativas de baja compatibilidad huésped-parásito (resistencia/avirulencia), mientras que respuestas entre 4 y 5 (color amarillo) de compatibilidad media y de 6 a 9 (color rojo) alta compatibilidad (susceptibilidad/virulencia).

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, se utilizó diseño en bloques completos al azar, ya que el material experimental con el que se contó fue heterogéneo, pero puede ser agrupado según determinada característica. Los tratamientos incluyeron un testigo inoculado con agua.

Para poder tener mayor control de la variabilidad y para caracterizarlos más fácilmente se agruparon las unidades experimentales con sus parecidas, por lo tanto, se generaron bloques, es decir conjuntos de unidades experimentales razonablemente homogéneas entre sí y más heterogéneas frente a otro conjunto (UdelaR. FA, 2017).

Para poder realizarlo los aislamientos se clasificaron en diferentes grupos de virulencia siguiendo el sistema de código de triple nomenclatura desarrollado por Limpert y Müller (1994). En este sistema, doce genotipos están ordenados en subgrupos de tres. Para cada reacción de una línea diferencial con cada aislamiento del patógeno se le asignó un valor binario, donde 1 y 0 representaron reacciones susceptibles (S) y de resistencia (R), respectivamente. Si el valor binario resultante fue 1 (reacción susceptible) luego se convierten en valores decenarios por los factores de conversión:  $2^0$  (igual a 1),  $2^1$  (igual a 2), y  $2^2$  (igual a 4) para el primer, segundo, y tercer genotipo de cebada de cada subgrupo, respectivamente, mientras que un valor binario de 0 (reacción de resistencia) no es convertido. Se sumaron todos los valores decenarios en cada subconjunto y se separaron los dígitos por puntos. Cada doce cebadas se ordenaron cuatro subgrupos de tres genotipos, alfabéticamente resultando en un código de cuatro dígitos para cada subgrupo (por ejemplo, R, R, R, S, R, R, R, S, R, S, S, R puede ser designado como 0.1.2.3 y R, R, S, S, R, S; R, S, S, S, S, S puede ser designado como 4.5.6.7). Los aislamientos que presentaron un código de cuatro dígitos común se agruparon en el mismo grupo de virulencia (Limpert y Müller, 1994).

Para conformar las tripletas de los genotipos del set diferencial se utilizó el orden alfabético de aquellos que presentaron la totalidad de los datos, y luego se utilizó solamente el subgrupo constituido por los tres diferenciales ND 5883, Bowman y NDB 112 usados por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997), para estudiar la variabilidad de patotipos. En cuanto a los genotipos de INIA-INASE los doce genotipos con mayor cantidad de datos fueron los elegidos y se organizaron alfabéticamente en tripletas: Ambev 329-Blondie-CLE 232 (I. Timbó), CLE 295-MOSA/09/312-MOSA/10/508, MOSA/11/277-MOSA/12/143-MOSA/13/113, MOSA/13/123-MOSA/14/276-N. Daymán.

Para ingresar al programa estadístico los datos obtenidos en un archivo Excel, se organizaron de la siguiente manera: a cada columna se le asignó una variable (respuesta de infección (RI), cultivar y aislado). En la primera columna se mantuvo el aislado hasta que se combinó con todos los genotipos utilizados (columna dos) y en la última columna cada uno obtuvo un valor de RI, resultado de cada interacción genotipo por aislado. Se utilizó el programa informático InfoStat (Di Rienzo et al., 2016) para realizar el análisis de varianza a partir de tabla ANOVA y pruebas de comparación múltiple de medias para saber cuál o cuáles eran diferentes. Se eligió Tukey al 0,5 de probabilidad de error, por ser más de dos medias en los tratamientos y se corrió con una sola variable dependiente, la cual fue la RI y dos variables de clasificación: cultivar y aislado. Estas tablas no fueron utilizadas en la mayoría de los análisis de resultados, dada la cantidad de datos faltantes para algunas de las interacciones.

Con el objetivo de identificar el agrupamiento natural de las observaciones (aislados) de acuerdo a sus niveles de virulencia se utilizó el análisis de conglomerados, a partir de los valores de RI promedios por genotipo, se calcularon las distancias euclidianas entre pares de aislamientos y se aplicó el método de agrupamiento jerárquico, utilizando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

La asignación de los patotipos se realizó para poder agrupar aislamientos con comportamientos similares, teniendo en cuenta los diferentes métodos ya explicados y en base a criterio propio.

#### 4. RESULTADOS

Los resultados se analizaron por separado para los distintos genotipos de cebada, comenzando por los veintiocho genotipos entre cultivares y líneas experimentales que conforman el grupo de INIA-INASE, inoculados con veintidós aislados diferentes.

Luego se trabajó con los resultados de los otros veintiocho genotipos también conformado entre cultivares y líneas experimentales que forman un posible set diferencial internacional, y que se inocularon con ocho aislados diferentes, en dos repeticiones que fueron idénticos en cuanto a los materiales utilizados. Para este grupo de cebadas existen, como ya se mencionaron, un buen número de antecedentes que aportaron para la conformación del set diferencial internacional.

Casi la totalidad de los aislados utilizados en los experimentos, provocaron síntomas de mancha borrosa. Los síntomas que se expresaron fueron variados: se logró observar la mancha borrosa “tipo”, la cual se desarrolla en forma de mancha necrótica ovoide, con un punto oscuro en el centro, rodeado de un halo clorótico marginal de tamaño variable según el tamaño de la mancha (ver anexo IV). Asimismo, se observaron otros tipos de manchas, las cuales no son descritas como mancha borrosa. Una de ellas similar a la mancha en red (anexo V), otra con una necrosis alargada y que respeta las nervaduras de las hojas (anexo VI), también se relevaron manchas redondeadas, con el borde de color blanco. Un aislado (14.02.4) presentó una sola mancha por hoja (anexo VII) y otro (14.05.3) manchas marrón claro, pequeñas y abundantes (anexo VIII).

Los valores de RI registrados en las cebadas inoculadas con los diferentes aislados de *C. sativus*, si bien presentaron cierta heterogeneidad, existió una clara tendencia hacia valores altos de RI (entre 6 y 9). Algunas interacciones presentaron falta de datos por lo que no fueron utilizadas. Para una mayor claridad de los resultados las RI fueron promediadas y redondeadas.

#### 4.1 RESULTADOS DE LOS GENOTIPOS INIA-INASE.

Cuadro 5. Promedios redondeados de las RI de veintiún aislados de *C. sativus* en veintiocho cebadas.

|             | 14.05.5 | 14.05.6 | 14.04.3 | 12.03.3 | 14.03.4 | 14.04.4 | 14.05.7 | 14.05.3 | 14.05.8 | 14.04.5 | 14.04.2 | 11.04.B | 11.07.2 | 14.04.6 | 14.06.1 | 12.01.3 | 11.07.3 | 14.06.3 | 11.01.A | 14.06.2 | 14.02.4 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| MOSA/09/312 | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 5       | 9       | 9       | 9       | 4       | 8       | 9       | 9       | 6       | 9       | 8       | ..      | 1       |
| MOSA/10/489 | 7       | 7       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 2       | 8       | 3       | 5       | 1       | 3       | ..      |
| Blondie     | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 8       | 6       | 3       | 4       | 1       | 2       | 5       | 1       | 4       | 1       |
| MOSA/10/508 | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 9       | 7       | 9       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 5       | 7       | 5       | 1       |
| MOSA/11/213 | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 5       | 8       | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 2       | 4       | 8       | ..      | 4       | 1       |
| MOSA/11/277 | 8       | 8       | 9       | 9       | 9       | 6       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 8       | 9       | 1       | 1       |
| MOSA/12/284 | 7       | 9       | ..      | ..      | 9       | 5       | 7       | ..      | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 9       | ..      | 8       | 6       | 8       | ..      | 1       | 1       |
| MOSA/13/123 | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 8       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 8       | 7       | 8       | 9       | 9       | 8       | 2       |
| MOSA/13/113 | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 8       | 9       | 9       | 5       | 6       | 8       | 8       | 9       | 6       | 5       | 5       | 9       | 8       |
| MOSA/14/276 | 8       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 5       | 9       | 9       | 8       | 9       | 4       | 4       | 9       | 8       | 9       | 7       | 5       | 1       | 5       | 2       |
| MOSA/12/143 | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 5       | 7       | 7       | 8       | 9       | 9       | 4       | 3       | 2       |
| CLE 232     | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 2       | 8       | 7       | 2       | 4       | 6       | 4       | 2       | 1       |
| CLE 233     | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 9       | ..      | 9       | 5       | 9       | 9       | 9       | 7       | 8       | 3       | 1       | 3       | 1       | ..      |
| CLE 280     | 7       | 9       | 7       | 4       | 9       | 4       | 9       | 3       | 9       | 5       | 9       | 8       | 9       | 5       | 5       | 3       | 4       | 5       | ..      | 2       | 2       |
| CLE 295     | 7       | 9       | 6       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 8       | 5       | 3       | 3       | 6       | 2       | 9       | 1       |
| CLE 300     | 7       | 8       | 9       | ..      | 9       | 8       | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 7       | 3       | 5       | ..      | 4       | 1       |
| CLE 301     | 8       | 8       | 9       | ..      | 9       | 9       | 7       | 9       | 8       | 7       | 8       | ..      | 9       | 9       | 9       | ..      | 2       | 5       | 2       | ..      | 1       |
| CLE 302     | 9       | 9       | 9       | 9       | 3       | 9       | 8       | 8       | 7       | 6       | 9       | 4       | 9       | 4       | 9       | 9       | 4       | 9       | 7       | ..      | 1       |
| N. Daymán   | 7       | 9       | 9       | 8       | 9       | 6       | 9       | 9       | 9       | 8       | 5       | 8       | 9       | 6       | 5       | 4       | 9       | 3       | 3       | 2       | 1       |
| Umbrella    | 9       | ..      | 9       | 9       | 9       | 9       | 7       | 8       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 7       | ..      | 9       | 5       | 8       | 3       | 1       |
| Explorer    | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 6       | ..      | 7       | ..      | 9       | ..      | 9       | 6       | 3       | 7       | 9       | 1       | 8       | 2       | 1       |
| Ambev 303   | 7       | 8       | 7       | 9       | 9       | 7       | 1       | ..      | 8       | 7       | 5       | 9       | 4       | 3       | 5       | 7       | 4       | 6       | ..      | 6       | 1       |
| MUSA 31     | 6       | 8       | 8       | 8       | 4       | 5       | 9       | 3       | 4       | 7       | 3       | 7       | 9       | 3       | 8       | ..      | 7       | 2       | 2       | 5       | 1       |
| Carumbe     | 6       | 8       | 8       | 9       | 9       | 8       | 8       | ..      | 5       | 7       | 3       | 4       | 8       | 3       | 4       | ..      | 9       | 3       | 4       | 2       | 1       |
| MUSA 19     | 6       | 9       | ..      | 9       | 9       | 8       | 8       | 3       | 8       | 5       | 9       | 4       | 3       | 5       | 4       | 3       | 9       | 5       | 3       | 8       | 1       |
| Ambev 328   | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 6       | 9       | 8       | 2       | 2       | 3       | 6       | ..      | 2       | 1       |
| Ambev 329   | 7       | 8       | 7       | 9       | 8       | 7       | 9       | 8       | 9       | 5       | 9       | 9       | 9       | 5       | 8       | 5       | 9       | 6       | 2       | 9       | 1       |
| Ambev 312   | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 8       | ..      | 5       | 9       | 4       | 5       | 8       | 9       | 2       | 3       | 1       | 5       | 6       | 1       |

..: sin dato, rojo: RI alta, amarillo: RI media, verde: RI baja.

Según escala de Fetch y Steffenson (1999).

En el cuadro 5 se identificaron ocho aislados incluidos el 11.04.B, 14.04.5, 14.05.8, 14.04.4, 12.03.3, 14.04.3, 14.05.6 y 14.05.5, con ausencia de baja RI, pero diferentes entre ellos en cuanto a los otros dos tipos de respuesta. Los últimos tres presentaron el 100% de sus respuestas altas.

Todos los aislados obtuvieron al menos un dato de RI alta, que fue el tipo de respuesta más encontrado. El aislado 14.02.4 se destaca por diferir con la mayoría, ya que fue el menos virulento, exhibiendo un 96% de baja respuesta a la infección correspondiente a un bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito. Su único dato diferente no fue de respuesta media como se esperaba, sino que fue alta.

En la figura 4 se muestra el comportamiento de los veintitrés aislados de *Cochliobolus sativus*, ordenados por virulencia creciente y por las respuestas de infección de las cebadas estudiadas. Los aislados que mostraron menor virulencia fueron los siguientes: 11.01.A, 14.06.2 y 14.02.4 que mostraron baja compatibilidad hospedante-parásito en una frecuencia de 45%, 48% y 96% respectivamente. Mostrando que los perfiles de virulencia de *C. sativus* son muy variables, y que la mayoría de los utilizados para la realización del experimento mostraron altos niveles de virulencia.

El aislado 12.08.3 se eliminó del análisis estadístico, ya que hay solo un dato del mismo.

En cuanto a las cebadas (figura 5) se identificaron variaciones de RI baja entre 30% (MUSA 31) y 0% (MOSA/13/113) teniendo un amplio rango de comportamientos, frente al grupo de aislados. Las RI altas variaron entre 45% (CLE 280) y 95% (MOSA/13/123), por lo que las cebadas que mostraron mejor comportamiento fueron la línea experimental CLE 280 con frecuencias de respuesta a la infección de 20%, 35% y 45% (bajas, intermedias y altas respectivamente), los cultivares MUSA 19 cuya frecuencias de las respuestas de infección fueron 25%, 25% y 50% (bajas, intermedias y altas respectivamente) y MUSA 31 con frecuencias de las respuestas de infección de 30%, 20% y 50% (bajas, intermedias y altas respectivamente). Por otro lado, cuatro cebadas obtuvieron datos de respuesta alta y baja pero no presentaron respuesta a la infección intermedia, siendo Explorer y Ambev 328 las de mayor porcentaje de datos de RI baja (22% y 25% respectivamente). Las otras dos exhibieron menos datos de RI baja, MOSA/11/277 (10%) y el cultivar MOSA/13/123 fue el que mostró mayor frecuencia de infección alta (95%); y su restante dato (5%) fue de RI baja y se corresponde con el aislado 14.02.4, el cual obtuvo baja respuesta en la mayoría de los genotipos.

Además de los extremos hay un grupo de cebadas con comportamiento diferencial donde se encontraron los cultivares: Umbrella, MOSA/12/284, MOSA/13/113, MOSA/10/508, MOSA/09/312, MOSA/11/277. En estos

genotipos las respuestas bajas oscilaron entre 5% (el genotipo con menor RI baja) y 13% (el de mayor RI baja), las respuestas intermedias entre 5% a 14% y las respuestas altas oscilaron entre 81% y 95%.



Figura 4. Caracterización de veintiún aislados de *Cochliobolus sativus*, como frecuencia de los diferentes tipos de respuesta de infección (alta, media y baja).

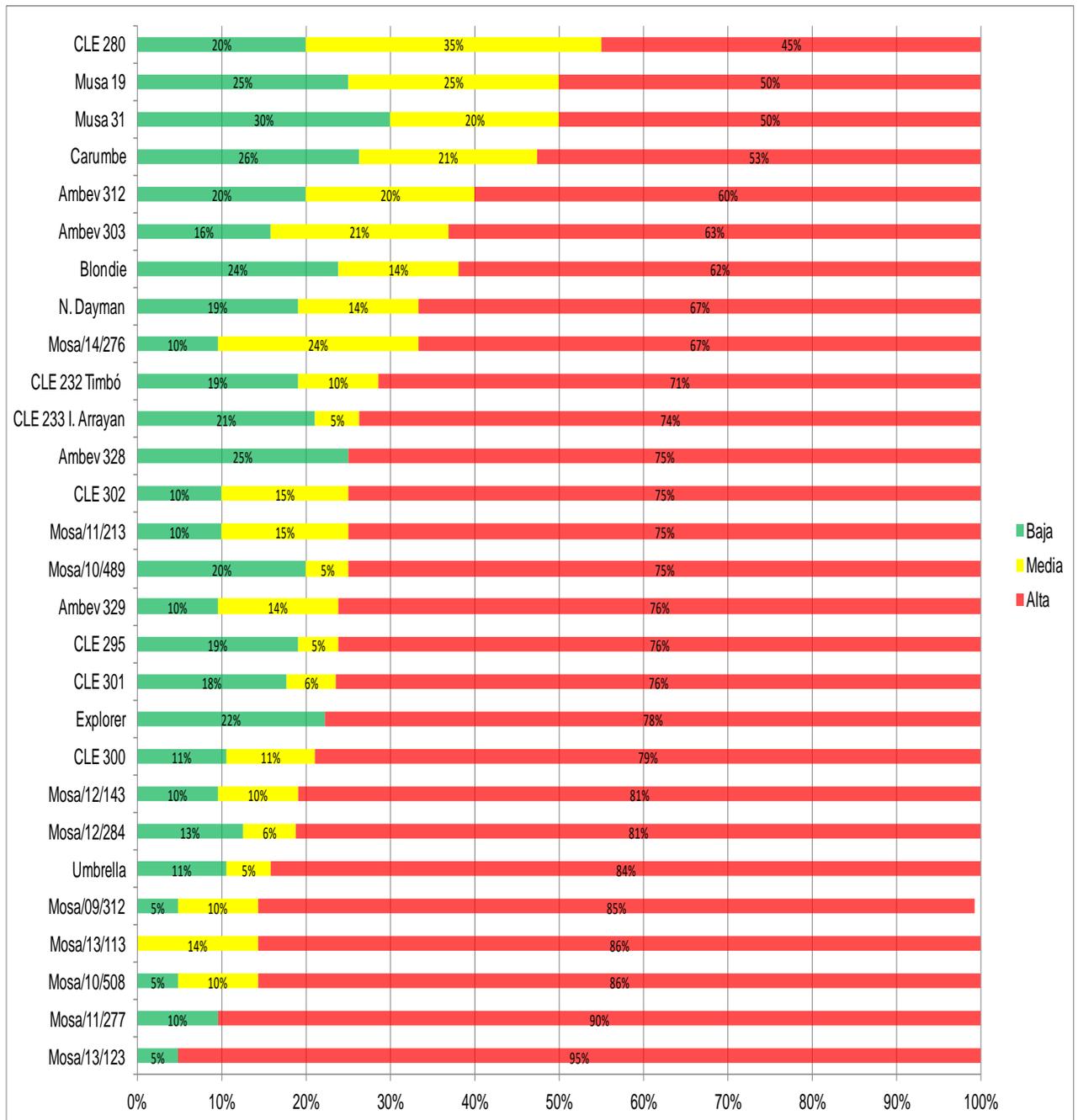


Figura 5. Respuestas de infección (alta, media y baja) de veintiocho genotipos de cebada frente a veintiún aislados de *Cochliobolus sativus*.

También se muestra el comportamiento de las interacciones en el análisis de conglomerados, para poder relevar el agrupamiento natural tanto de los genotipos como de los aislados y poder asignar los distintos patotipos a estos últimos. Para lograr el agrupamiento se debe decidir un punto de corte en el análisis de conglomerados, a partir del cual se generan los clústeres, este se hace mediante “inspección subjetiva” (López, 2017), logrando así que se generen grupos de similar respuesta huésped-patógeno.

Para los genotipos (figura 6), se distinguieron tres grupos de comportamientos similares, dos grupos extremos, el de mejor comportamiento compuesto por: Ambev 303, CLE 280, MUSA 19, MUSA 31, Ambev 312, Blondie y Carumbe y el de peor comportamiento formado por: MOSA/13/123, MOSA/11/277, MOSA/11/213, Umbrella, MOSA/13/113, MOSA/10/508, MOSA/12/284 y MOSA/09/312. Entre los extremos se encuentran el grupo de cebadas de comportamiento similar intermedio integrado por: Ambev 328, Explorer, Ambev 329, CLE 232 Timbo, CLE 233 I. Arrayán, CLE 295, MOSA/10/489, MOSA/12/143, CLE 300, CLE 302, MOSA/14/276, CLE 301 y N. Daymán.

Estos agrupamientos naturales se correlacionan en gran medida con lo observado en la figura 5, salvo para el genotipo MOSA/11/213 el cual tendría que haberse agrupado con los de comportamiento intermedio, dados sus porcentajes de RI.

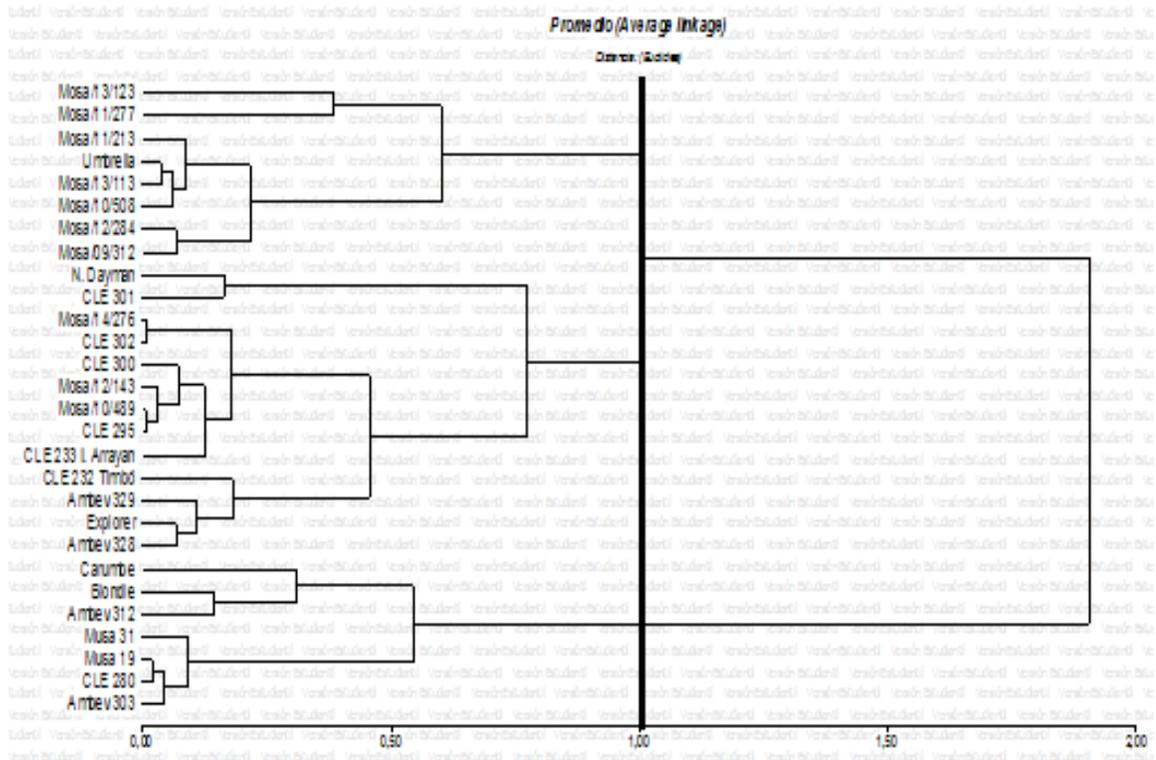


Figura 6. Análisis de conglomerado realizado utilizando distancias euclidianas para los veintiocho genotipos INIA-INASE.

Un dendrograma con las distancias entre los veintidós aislados (incluido el 12.08.3 que posteriormente fue eliminado) se realizó para poder agruparlos, mostrando varios grupos de comportamiento similar, pero no pudiendo determinar con exactitud patotipos para todos los casos, ya que la variabilidad existente dificultó el agrupamiento de los mismos. Se construyó entonces una supuesta asignación de patotipos que posteriormente fue reordenada.

A él aislado de menor virulencia, 14.02.4, se le asignó el patotipo 0 por más que su código fuera 0.0.4.0. Los aislados agrupados de mayor virulencia fueron 14.05.5, 14.05.3, 14.04.4, 14.05.8, 14.05.7, 14.04.2, 14.05.6, 14.04.3, 14.03.4 y 12.03.3 pertenecieron al patotipo 4. También posiblemente integren este patotipo los aislados 14.04.6, 14.04.5 y 11.04.B, pero esto no se pudo definir por existir diferencias en el código de triple nomenclatura, y como caso inverso aparece el aislado 14.06.3 que tiene igual código, pero no se agrupó con los aislados de su patotipo. Con una reacción intermedia se agruparon el 14.06.2, 12.01.3 y 11.07.3 pertenecientes al patotipo 2, el aislado 14.06.1 también entró dentro de este grupo, pero teniendo un diferente código de triple

nomenclatura por ser más virulento. El aislado 12.08.3 no fue utilizado por falta de datos, y por último al 11.01.A se comportó de manera única pero fue también clasificado dentro del patotipo 2, ya que no mostró las características necesarias para clasificarlo dentro del patotipo 1 por ser de virulencia intermedia (ver anexo I).

Basado en la RI inducida por veintiún aislamientos de *C. sativus* sobre las líneas diferenciales de cebada, y por un nuevo dendograma realizado únicamente con los genotipos que componen las tripletas, fue que se reclasificó los distintos grupos de aislamientos. Se separaron 10 grupos de virulencia de acuerdo al código de triple nomenclatura (Limpert y Müller, 1994).

Los valores promedio de respuesta a la infección de mancha borrosa variaron entre 1,04 y 8,92, siendo el menos virulento el aislado 14.02.4 y el más virulento el 12.03.3.

Siguiendo con la re clasificación expuesta anteriormente, diez de los veintiún aislados analizados (47,6%) correspondieron al grupo 7.7.7.7, ya que indujeron una reacción compatible en todas las líneas de cebada, por lo tanto, estos aislados son los de mayor virulencia. En la misma línea, los grupos 5.7.7.7 y 7.7.7.5 agrupan dos aislados cada uno, mientras que el grupo 7.7.7.3 contiene un solo aislamiento. En conjunto, los tres grupos presentaron reacción compatible con todas las líneas de cebada excepto con una, sumando el 24% de los aislados y siendo de los grupos más virulentos. Como contrapartida, el grupo 0.0.4.0, quien lo integra únicamente un aislado, indujo reacción de resistencia en todas las líneas diferenciales de cebada excepto en dos, siendo el grupo más avirulento. El tercio excluido de los datos se distribuye entre los grupos restantes y solamente agruparon un dato por grupo, 1.6.7.7, 3.5.7.5, 0.6.5.1, 1.6.7.3, 1.5.4.3; si bien dichos grupos no presentan una virulencia tan acentuada como los primeros, indujeron reacción de sensibilidad en varias líneas de cebada.

Con el fin de reducir el error y lograr un agrupamiento más claro de los aislados, dado la gran cantidad de datos utilizada en la asignación de patotipos explicada anteriormente, fue que se realizó un nuevo análisis de conglomerados (figura 7). Para su elaboración se utilizó el promedio de respuesta de infección para los diez grupos de virulencia.

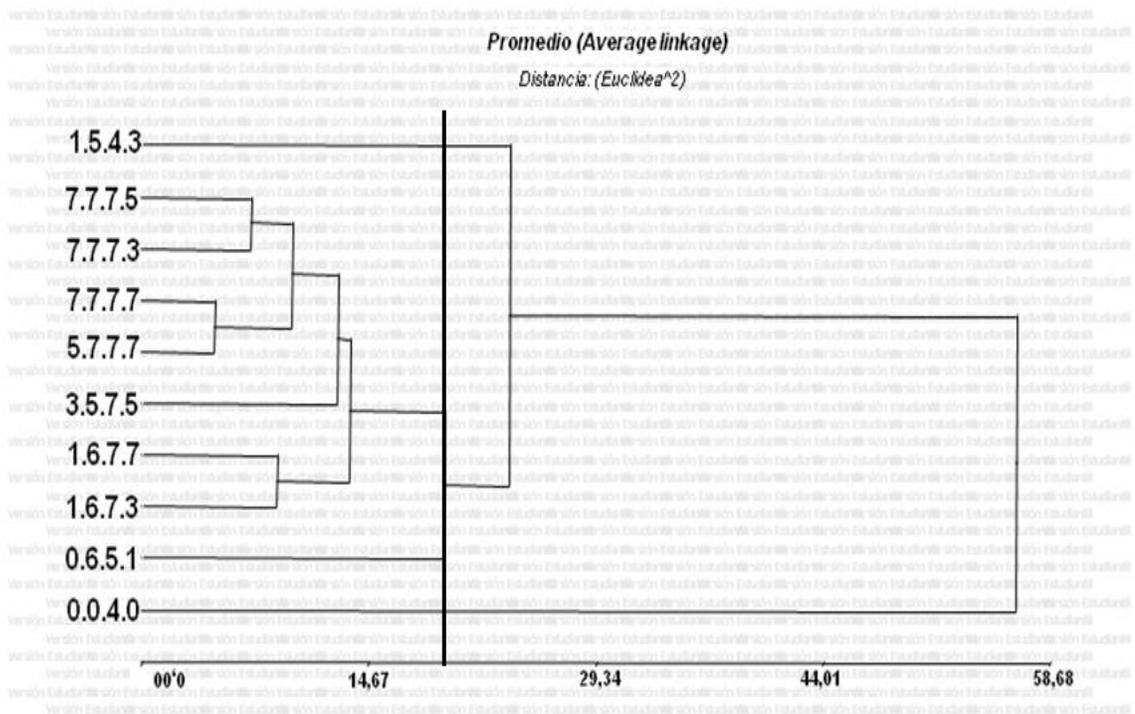


Figura 7. Dendrograma de las similitudes en el promedio de respuestas de infección a mancha borrosa de los veintiún aislados de *C. sativus*, agrupados en tripletas con sus respectivos grupos de virulencia, sobre doce líneas de cebada, utilizando distancias euclidianas elevadas al cuadrado.

Los grupos de virulencia formaron cuatro clústeres de patogenicidad principales. El clúster 1 fue el único que se caracterizó por presentar muy baja patogenicidad y estuvo representado únicamente por el grupo de virulencia 0.0.4.0, coincidiendo con la asignación de patotipos que se expuso anteriormente. El clúster 2 agrupó los grupos de mayor virulencia: 7.7.7.7, 7.7.7.3, 5.7.7.7, 7.7.7.5, 3.5.7.5, 1.6.7.7 y 1.6.7.3. Si bien este grupo es el que alberga mayor cantidad de aislados y también es cierto que todos son altamente virulentos, no todos presentan la misma magnitud de virulencia. En tercer lugar, el clúster 3, integrado únicamente por el grupo de virulencia 1.5.4.3. Por último, pero no menos importante, se encuentra el grupo de virulencia 0.6.5.1, que presenta moderada virulencia. Por lo tanto no todas las asignaciones de patotipos se correspondieron con esta nueva agrupación mostrada en la figura 7.

#### 4.2 RESULTADOS DE LOS GENOTIPOS DEL SET DIFERENCIAL

A continuación, en el cuadro 6 se presentan las respuestas de infección de ocho aislados de *C. sativus* inoculados en los genotipos candidatos a integrar el set diferencial internacional. De los veintiocho genotipos, dos fueron eliminados por falta de datos, ND 23122 y ND 17293.

Cuadro 6. Promedios ajustados de las RI de veintiséis genotipos con ocho aislados de *C. sativus*.

|            | 14.05.5 | 14.05.3 | 14.06.1 | 14.05.8 | 14.04.6 | 14.04.2 | 14.03.4 | 14.06.2 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Delta      | 9       | 9       | 7       | 8       | 8       | 9       | 6       | 8       |
| Gilbert    | 9       | 8       | 7       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       |
| Skiff      | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       | 9       |
| Stirling   | 9       | 6       | 8       | 9       | 7       | 8       | 6       | 8       |
| Lindwall   | 9       | 9       | 6       | 9       | 7       | 6       | 7       | 2       |
| ND 5883    | 9       | 7       | 9       | 8       | 9       | 9       | 9       | 4       |
| CLE 253    | 9       | 8       | 7       | ..      | 9       | 9       | 9       | 3       |
| CIHO 1227  | 9       | 9       | 9       | 7       | 9       | ..      | ..      | 5       |
| I. Ceibo   | 9       | 9       | 8       | ..      | ..      | ..      | 9       | 2       |
| ND 23180   | 9       | 6       | ..      | 7       | 4       | ..      | 6       | ..      |
| Conlon     | 9       | 6       | 7       | 8       | 6       | 7       | 3       | 5       |
| I. Guaviyú | 8       | 9       | 8       | 9       | 6       | 3       | 8       | 3       |
| N. Daymán  | 8       | 8       | 7       | 8       | 8       | 7       | 3       | 4       |
| TR 251     | 9       | 8       | 8       | 9       | 4       | 3       | 9       | 6       |
| CI 9214    | 1       | 9       | 8       | 7       | 5       | 9       | 6       | 8       |
| CIHO 6311  | 9       | 9       | 9       | 8       | ..      | 9       | 5       | 4       |
| Conquest   | 9       | 9       | 9       | 5       | 9       | 7       | 3       | 1       |
| NRB 091084 | 6       | 8       | 6       | 5       | 6       | 9       | 2       | 4       |
| Tolar      | ..      | 9       | 6       | 9       | ..      | 4       | ..      | 2       |
| TX 7934    | 7       | 8       | 4       | 9       | 5       | 6       | ..      | 2       |
| A. Madi    | ..      | 8       | ..      | 4       | 7       | 3       | ..      | ..      |
| Bowman     | 9       | 4       | 5       | 5       | 9       | 6       | 7       | 3       |
| CI 5791    | ..      | ..      | 8       | 3       | 8       | ..      | 5       | ..      |
| Perún      | 8       | 8       | 5       | 7       | 5       | 5       | 5       | 3       |
| NDB 112    | 9       | 4       | 2       | 5       | 3       | 2       | 2       | ..      |
| 12 IBYT#25 | ..      | 4       | 4       | 3       | ..      | ..      | ..      | 2       |

..: sin dato, rojo: RI alta, amarillo: RI media, verde: RI baja.

En la figura 8 se presentan los datos del comportamiento de ocho aislados de *Cochliobolus sativus*, ordenados por virulencia creciente y por las respuestas de infección de las cebadas estudiadas. Todos los aislados en estudio mostraron por lo menos un 5% de compatibilidad baja hospedante-parásito, salvo el 14.05.3.

El aislado más virulento fue el 14.05.5 con un 95% de frecuencia de compatibilidad alta y un promedio de 8 en su RI. En el otro extremo se ubicó el aislado de menor compatibilidad hospedante-parásito que es el 14.06.2 con un promedio 4.

Algo no menor es que todos los aislados (14.05.5, 14.05.3, 14.06.1, 14.05.8, 14.04.6, 14.04.2 y 14.03.4) menos el 14.06.2 presentaron respuesta alta en frecuencias mayores al 60%, mostrando así la alta virulencia de los mismos. Este último fue el aislado que mostró menor virulencia, exhibiendo un 72% de la respuesta a la infección que corresponde a bajo e intermedio nivel de compatibilidad hospedante-parásito.

En cuanto a las cebadas en estudio se identificaron variaciones de RI baja entre 57% (NDB 112) y 0% (Skiff, Stirling, Gilbert y Delta) mostrando un amplio rango de comportamientos frente al grupo de aislados. Esto muestra una alta variabilidad en el comportamiento entre los cultivares de cebada y los aislados.

El genotipo de cebada con mejor comportamiento fue el cultivar 12 IBYT#25 con frecuencias de respuesta a la infección de 50%, 50% y 0% (bajas, intermedias y altas respectivamente), pero teniendo solo el 50% de los datos. Por lo que se considera que NDB 112 tuvo una mejor respuesta que el anterior.

En el otro extremo los cultivares de peor comportamiento fueron: Delta, Gilbert, Skiff y Stirling, con un promedio de RI de 8,5.

Además de los extremos se puede diferenciar un grupo de genotipos con mal comportamiento frente a los aislados que mostraron frecuencias de alta respuesta a la infección mayores a 70% (CIHO 6311, CI 9214, TR 251 N. Daymán, I. Guaviyú, Conlon, ND 23180, I. Ceibo, CIHO 1227, CLE 253, ND 5883 y Lindwall).

Luego se observó otro grupo con alta respuesta entre 50% y 63% (CI 5791, Bowman, A. Madi, TX 7934, Tolar, NRB 09108 y Conquest) y por último un grupo con mejor comportamiento frente a *C. sativus* integrado por los siguientes cultivares: 12IBYT#25, NDB 112 y Perún. Estos últimos tuvieron una variabilidad muy grande entre bajas e intermedias frecuencias de respuesta (figura 9).

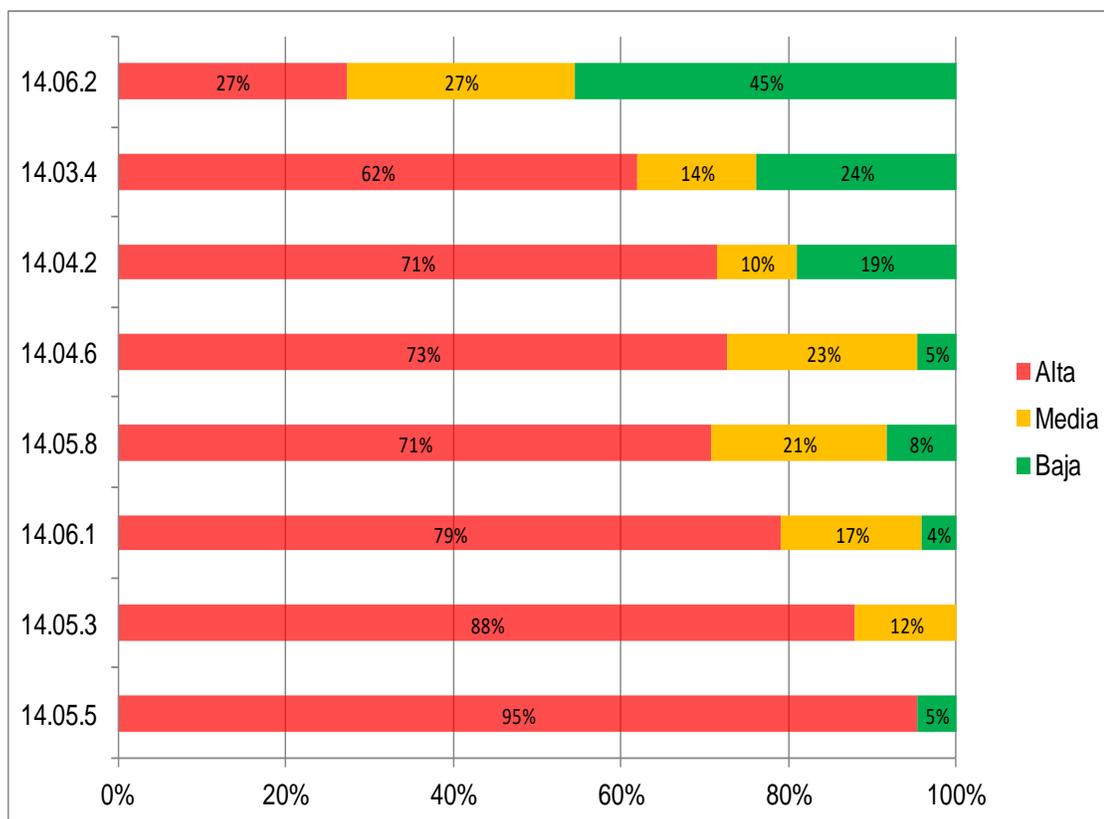


Figura 8. Comportamiento de ocho aislados de *C. sativus* en los genotipos del set diferencial, según la respuesta a la infección (alta, media y baja).

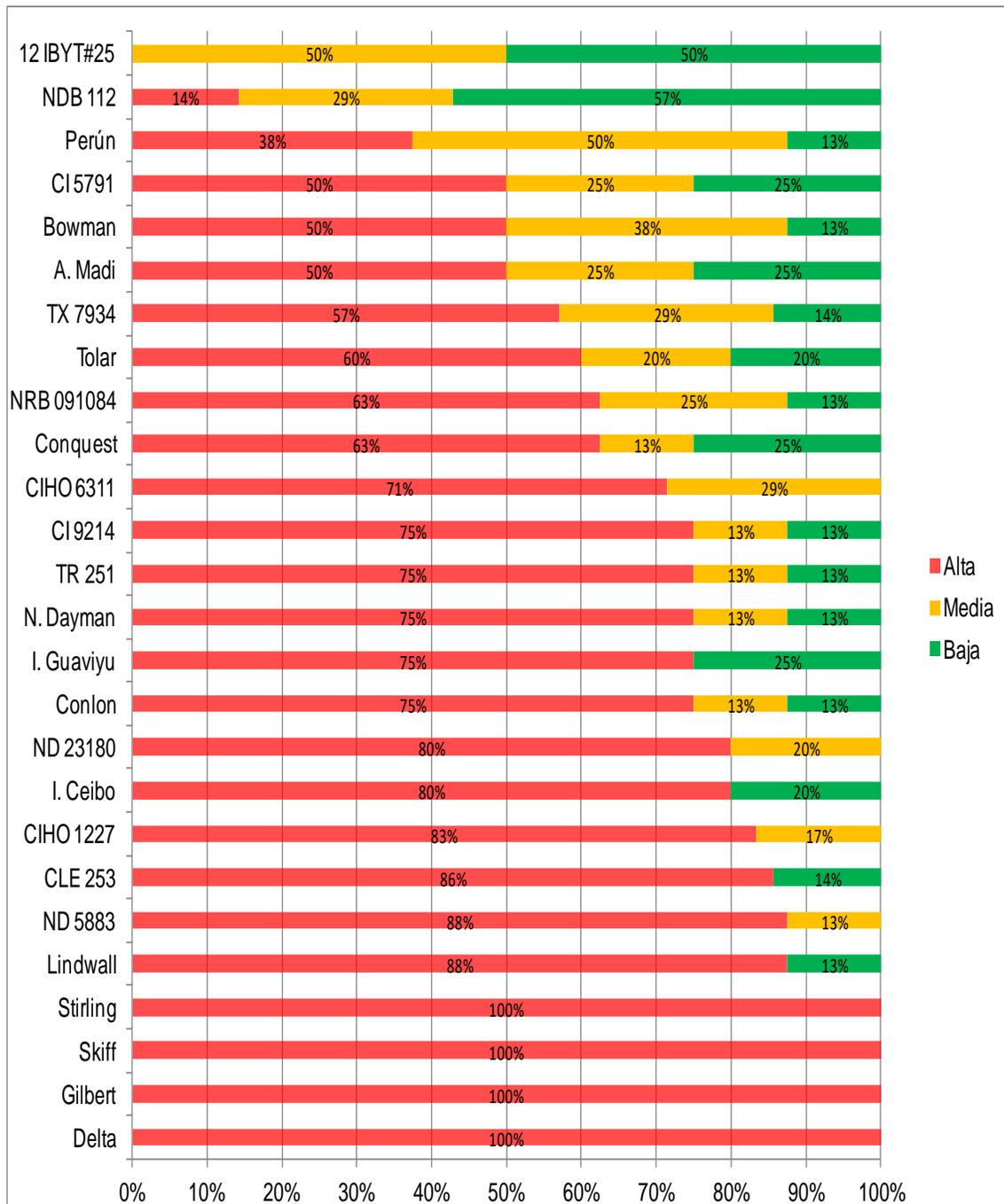


Figura 9. Respuesta de infección (alta, media y baja) de veintiséis genotipos candidatos a integrar el set internacional diferencial inoculados con ocho aislados de *Cochliobolus sativus*.

En cuanto al análisis de conglomerados para las veintiocho cebadas, en la figura 10 se observan cinco grupos de parecido comportamiento. Agrupadas en los extremos están Skiff y Gilbert como las peores y NDB 112 y 12 IBYT#25 como las mejores. Luego de los genotipos mencionados, el grupo de mejor comportamiento entre los intermedios lo integran Tolar, Perún, CI 5791, TX 7934, ND 17293 (posteriormente eliminado), ND 23122 (posteriormente eliminado), Bowman, NRB 091084 y A. Madi, los siguen el tercer mejor grupo que es el de I. Guaviyú, TR 251, Conquest, Conlon, ND 23180, N. Daymán, Lindwall y CI 9214. Por último, el segundo grupo con peor comportamiento está compuesto por los genotipos ND 5883, Delta, CLE 253, I. Ceibo, Stirling, CIHO 6311 y CIHO 1227. Estos agrupamientos no ocurrieron como era de esperar, ya que existieron genotipos que no se ubicaron junto a sus respectivos de similar comportamiento. El ejemplo más claro se da en las cuatro cebadas con peor comportamiento (100% de RI alta), que no estuvieron agrupadas naturalmente juntas en el dendograma. Para los grupos con promedios de RI más bajo el agrupamiento natural fue más acertado.

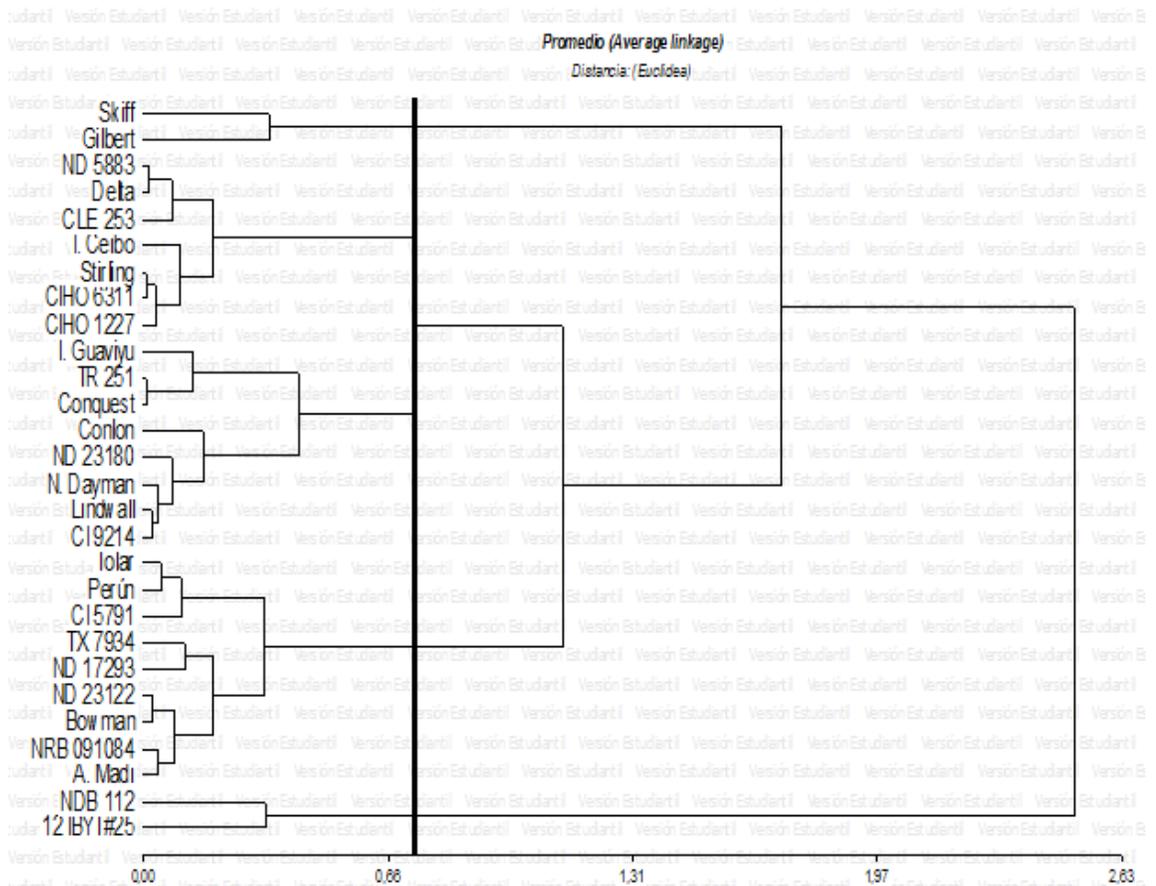


Figura 10. Análisis de conglomerados con distancias euclidianas para los veintiochos genotipos del set diferencial.

En el dendograma de la figura 11 no se logró determinar el punto de corte ya que no se generaban los grupos deseados. Se utilizó de manera informativa para formar patotipos, permitiendo así comparar este estudio con estudios pasados, los cuales utilizan los patotipos como forma de evaluar el comportamiento de los genotipos de cebada y aislados del hongo. Los aislados mostraron grupos de comportamiento similar, siendo el aislado de menor virulencia (0.4.0.0) el 14.06.2, incluido en el patotipo 0. Un solo aislado perteneció al patotipo 1 que fue el 14.05.3. Dentro del patotipo 3 se agruparon los aislados 14.06.1, 14.04.6, 14.04.2 y 14.03.4, y como grupo de mayor virulencia, clasificado como patotipo 4 se encuentra el que contiene al aislado 14.05.5 y al 14.05.8, aunque su agrupación no fue tan evidente.

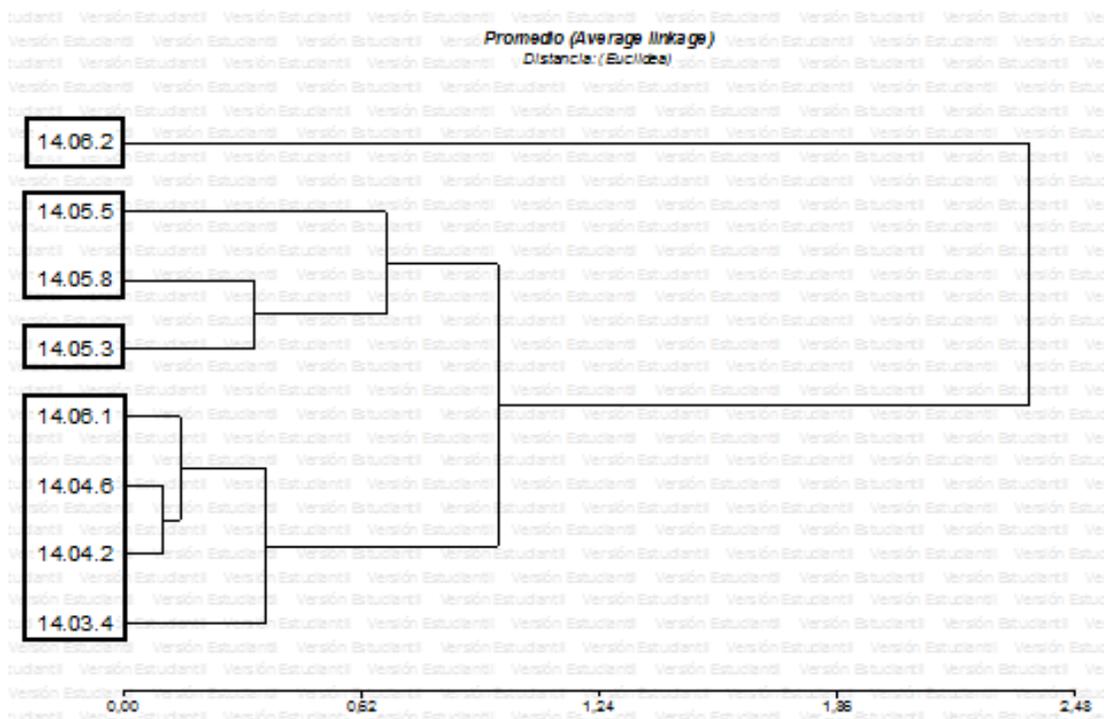


Figura 11. Análisis de conglomerados utilizando el promedio de respuesta a la infección de ocho aislados de *C. sativus* en veintiocho genotipos de cebada.

Otro método de clasificación que se utilizó, se basa exclusivamente en las lecturas de RI para ND 5882, Bowman y NDB 112, utilizados como genotipos diferenciales por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997). Permite diferenciar los patotipos 0 (R, R, R), 1 (S, R, R), 2 (R, S, R), 3 (S, S, R),

mediante un único dígito y no grupos de virulencia. En este caso también se constató la presencia de un patotipo de mayor virulencia (S, S, S) que se lo denominó patotipo 4. El aislado 14.06.2 no se clasificó, por falta de datos. Como se puede observar en el cuadro 7, los diferentes aislados se correspondieron con los patotipos propuestos anteriormente, no constatándose ninguno perteneciente al patotipo 2.

Cuadro 7. Patotipos asignados según los diferenciales utilizados por Valjavec-Gratian y Steffenson.

|                | <b>ND 5883</b> | <b>Bowman</b> | <b>NDB 112</b> | <b>Patotipo</b> |
|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| <b>14.05.5</b> | S              | S             | S              | 4               |
| <b>14.05.3</b> | S              | R             | R              | 1               |
| <b>14.06.1</b> | S              | S             | R              | 3               |
| <b>14.05.8</b> | S              | S             | S              | 4               |
| <b>14.04.6</b> | S              | S             | R              | 3               |
| <b>14.04.2</b> | S              | S             | R              | 3               |
| <b>14.03.4</b> | S              | S             | R              | 3               |

## 5. DISCUSIÓN

En anteriores estudios también se mostraron altos niveles de virulencia con otras poblaciones patogénicas en la mayoría del germoplasma de cebada analizado (Gamba et al. 2000, Gamba y Estramil 2002, 2012). En el estudio realizado por Meldrum et al. (2004), se sugiere la utilización de una mayor concentración de conidios/ml (10.000) que la usada en este ensayo. Los aislados y las cebadas utilizadas en este estudio permitieron separar algunos de los grupos con comportamiento de virulencia diferencial, esto difiere de otros estudios realizados previamente (Valjavec-Gratian y Steffenson 1997, Gamba y Estramil 2002) en los que se sugirió la existencia clara de tres grupos de aislados.

En Uruguay, varios trabajos encontraron altos niveles de virulencia diferencial (Gamba et al., 2000) y estudios posteriores sugirieron la existencia de tres grupos de aislamientos con diferentes perfiles de virulencia (Gamba y Estramil, 2002). En otro reporte nacional más reciente se sugiere la existencia de una alta variabilidad de la población local de *C. sativus*, así como niveles muy bajos de resistencia genética de las cebadas estudiadas (Gamba, 2010b). Esto coincide con los resultados de nuestro estudio en los que se reportaron altos niveles de virulencia para la mayoría del germoplasma de cebada estudiado. Uno de los supuestos que puede explicar este hecho, sostiene que con el paso del tiempo la resistencia se haya ido quebrando como consecuencia de la aparición de nuevas cepas del hongo, aumentando su compatibilidad con la planta hospedera.

En cuanto a los ocho aislados locales de *C. sativus*, utilizados por Ghazvini y Tekauz (2007) en su experimento de estudio de la diversidad de virulencia, siete (87,5%) pertenecieron a los grupos 5.7.0.0 y 5.7.4.0, mientras que el restante (12,5%) perteneció al grupo 0.0.0.0. Este último mostró baja RI en todas las cebadas que fue inoculado y se le asignó el patotipo 0. Por su parte, los aislamientos del grupo 5.7.0.0 indujeron altas RI en varios genotipos incluidos Conlon y ND 5883, y bajas respuestas en otros como Bowman, NDB 112 y TR 251. Los aislados del grupo 5.7.4.0 fueron similares a los aislados del grupo anterior, por lo que ambos fueron agrupados dentro del patotipo 1. Los datos obtenidos en esta tesis para los aislados utilizados en el set diferencial no coinciden con los ya mencionados, dado que fueron agrupados mayoritariamente en patotipo 3 (50%) y patotipo 4 (25%), observándose solamente un aislado del patotipo 1 (12,5%) y otro que no se pudo caracterizar por falta de datos, pero que mostró baja RI en los genotipos más susceptibles. Esto no hace más que afirmar la alta diversidad en virulencia existente en las poblaciones uruguayas del hongo.

Silva (2011), no encontró el patotipo 2 de acuerdo a Valjavec-Gratian y Steffenson (1997), o sea, inductor de reacción incompatible en NDB 112 y ND 5883 pero compatible en Bowman, esto coincidió con los resultados obtenidos en los aislados del set diferencial que fueron evaluados en este estudio. Para Silva (2011) el 66,6% de los aislados fueron asignados con el patotipo 3, los genotipos susceptibles según reportes previos, A. Madi, CLE253, INIA Arrayán (este se incluye dentro de los genotipos INIA-INASE en este trabajo) e INIA Ceibo, mostraron reacción de susceptibilidad para varios aislamientos de ese grupo, la mayoría de los aislados fueron clasificados dentro del patotipos 3. Los genotipos medianamente resistentes, se comportaron como se esperaba y el único genotipo que expresó reacción incompatible con la totalidad de los aislamientos fue NDB 112 (Silva, 2011); sin embargo en este trabajo las mismas cebadas utilizadas no fueron tan resistentes, y NDB 112 manifestó susceptibilidad frente a un aislados del patotipo 4. Es importante destacar que el otro aislado (14.05.8) perteneciente al patotipo 4 no fue igual de virulento, ya que obtuvo 71% de RI alta (diecisiete datos) y no 96% como el 14.05.5.

Esta variabilidad dentro de un mismo patotipo lleva a cuestionar el método elegido para la asignación de los aislados a determinado patotipo. Una de las críticas que se le puede hacer al método de las tripletas (Limpert y Muller, 1994), es que puede existir una tendencia engañosa a creer que valores numéricos mayores implican aislados más virulentos, sin embargo esto no es necesariamente cierto, ya que los valores de los factores de conversión varían en función del orden de agrupamiento que el experimentador haya decidido darle y en general ese orden no está relacionado a la virulencia, si no a un orden alfabético o al criterio que cada experimentador decida utilizar.

## 5.1 GENOTIPOS INIA-INASE

En el cuadro 3 se muestran los antecedentes de los comportamientos sanitarios frente a mancha borrosa de algunos de los genotipos de cebada (INIA-INASE) en los años 2013, 2014 y 2015. En estos ensayos las condiciones climáticas reportadas no favorecieron la aparición de mancha borrosa, debido a los bajos niveles de temperatura y humedad para los distintos años.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en este estudio con los antecedentes mencionados (cuadro 8) y con el comportamiento sanitario de los cultivares de cebada cervecera, evaluados en el año 2014, publicados por INIA e INASE (2015) se puede destacar que los genotipos con mayor número de respuestas de infección baja para este trabajo se corresponden con los de comportamiento intermedio a campo. Es el caso de CLE 280 con cuatro datos de baja RI (20%), MUSA 19 con cinco (25%), MUSA 31 con seis (30%) y N. Carumbé con una RI baja de 26% (cinco aislados). De estas cuatro cebadas las

tres primeras tienen al menos un 50% de los datos entre respuestas bajas e intermedias, lo que permite afirmar que los antecedentes se corresponden.

Por su parte las cebadas CLE 232 (I. Timbó) y MOSA 10/489 consideradas con comportamiento intermedio a bajo y Umbrella de bajo a intermedio, no obtuvieron los resultados esperados, presentando más del 70% de las respuestas de infección altas.

Es importante destacar que además de ser realizados a campo, los criterios utilizados de estimación y cuantificación de la enfermedad son diferentes a los realizados en este estudio y que se realizan en estados más avanzados del cultivo. Por lo que al ser comparados exhiben una clara diferencia, demostrando una menor respuesta a la infección que puede ser explicada por la alta virulencia de la mayoría de los aislados utilizados en este trabajo.

Para este grupo de cebadas hacen falta más experimentos, con más aislados tanto locales como internacionales y con varias repeticiones de estos, para así poder seguir comparando y evaluando las respuestas de infección y los comportamientos diferenciales de los mismos. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser un buen punto de partida para la proyección de trabajos futuros.

Cuadro 8. Comparación de antecedentes y resultados para trece genotipos INIA-INASE.

| CULTIVAR    | Comportamiento según INIA-INASE |      |      | RI (%) 2017 |            |      |
|-------------|---------------------------------|------|------|-------------|------------|------|
|             | 2013                            | 2014 | 2015 | Baja        | Intermedia | Alta |
| MOSA/09/312 | ..                              | IA   | IA   | 5           | 10         | 85   |
| MOSA/10/489 | ..                              | IB   | IB   | 20          | 5          | 75   |
| BLONDIE     | ..                              | I    | I    | 24          | 14         | 62   |
| MOSA/10/508 | ..                              | ..   | IA   | 5           | 10         | 85   |
| CLE 232     | ..                              | IB   | IB   | 19          | 10         | 71   |
| CLE 233     | I                               | I    | I    | 21          | 5          | 74   |
| CLE 280     | ..                              | I    | I    | 20          | 35         | 45   |
| N. DAYMAN   | I                               | I    | I    | 19          | 14         | 67   |
| UMBRELLA    | BI                              | ..   | I    | 11          | 5          | 84   |
| EXPLORER    | ..                              | ..   | AI   | 22          | 0          | 78   |
| MUSA 31     | ..                              | ..   | I    | 30          | 20         | 50   |
| N. CARUMBÉ  | I                               | I    | I    | 26          | 21         | 53   |
| MUSA 19     | I                               | ..   | I    | 25          | 25         | 50   |

B: bajo nivel de infección, I: intermedio nivel de infección, A: alto nivel de infección, ..: sin dato

## 5.2 GENOTIPOS SET DIFERENCIAL

A partir de los resultados obtenidos en nuestro experimento, se puede trazar ciertas líneas que coinciden con resultados obtenidos en estudios precedentes.

En el caso del genotipo NDB 112, línea diferencial que ha sido utilizada en múltiples estudios, Valjavec-Gratian y Steffenson (1997) afirman que dicho genotipo exhibió baja relación de virulencia con todos los aislados que evaluaron. Ghazvini y Tekauz (2007) estudiaron distintos genotipos a través de 127 aislados; NDB 112 mostró reacción resistente a ochentaisiete aislados (68,5 %) y susceptible a cuarenta (31,5%). Si bien tuvo un elevado nivel de resistencia, su comportamiento fue más errático respecto al experimento anterior. Sus muestras de resistencia en Dakota del Norte, promovió a que Meldrum et al. (2004) decidieran incluir el material en su trabajo, en el cual demostró un comportamiento resistente frente a los 34 aislados australianos con los que fue evaluado. Frente a la población uruguaya este genotipo se comportó de similar manera, evidenciando resistencia al hongo (Rodríguez, 2011) y mostrando 100% de resistencia a los doce aislados uruguayos (Silva, 2011). En cuanto a nuestro estudio, el genotipo presentó uno de los

comportamientos más destacados del experimento, presentando un solo dato de alta respuesta de infección (14%), dos de media (29%) y cuatro de baja (57%).

Distinto es el caso del genotipo ND 5883 el cual ha mostrado mayor reacción de susceptibilidad en el trabajo de Ghazvini y Tekauz (2007); el genotipo mostró reacción susceptible frente a ochenta y nueve aislados (70%), mientras que fue resistente a los treinta y ocho aislados restantes (30%). En el trabajo de Valjavec-Gratian y Steffenson (1997), ND 5883 solamente mostró reacción de susceptibilidad al patotipo 1, el cual agrupaba el menor número de aislados (10%). Para el patotipo 0 el cual agrupaba el 65% de los aislados, y para el patotipo 2 que agrupaba el 25%, la reacción fue de baja compatibilidad. Por otra parte, de los seis diferentes patotipos encontrados por Meldrum et al. (2004), ND 5883 tuvo alta compatibilidad con tres de ellos que agrupaban el 59% de los datos y baja compatibilidad con los restantes tres patotipos (41%). En estudios locales anteriores este genotipo denotó alta RI para diez aislados uruguayos (83%) y solo un dato de respuesta media y otro de baja (Silva, 2011). Para nuestro experimento, el genotipo también fue altamente susceptible a la población local de *C. sativus*, presentando siete datos de alta respuesta de infección para el 87,5% de los aislados y solo una respuesta media (12,5%). Mostrando ser un genotipo que presenta variabilidad de respuestas, sesgada hacia la susceptibilidad, como demostró Rodríguez (2011). Estudiar aislados utilizados por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997) sería de importancia ya que son los que mostraron diferente resultado a los demás trabajos realizados.

La línea Bowman, en el trabajo realizado por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997), presentó alta compatibilidad huésped-parásito en el patotipo 2 (25% de los aislados) siendo baja en los restantes patotipos, 0 y 1. En el trabajo de Ghazvini y Tekauz (2007), Bowman mostró baja compatibilidad en ochenta y cuatro aislados (66%) y alta en cuarenta y tres (34%). Finalmente, para Meldrum et al. (2004) resultó resistente al total de los aislados. En nuestro trabajo, el genotipo demostró una mayor susceptibilidad comparado con los experimentos realizados por Silva (2011), en los que había obtenido 33% de baja respuesta a cuatro aislados y 42% de alta (cinco aislados). Para este estudio la cantidad de respuestas medias y altas sumaron siete, y obtuvo una sola interacción baja. Según Rodríguez (2011), este genotipo es de comportamiento intermedio, por lo que demuestra que esta línea no mantiene un tipo de reacción, sino que tiene alta variabilidad de resistencia según el tipo de aislado, mostrando respuestas de infección de 3 a 9; esto se puede explicar por las características de las diferentes poblaciones locales.

Ghazvini y Tekauz (2007), además de trabajar con los genotipos ya mencionados, utilizaron otras líneas, algunas de las cuales también

conformaron nuestro set diferencial. Algo a destacar en su trabajo, es el genotipo TR 251. Dicha línea mostró reacción resistente para los ciento veintisiete aislados totales con los que fue evaluada, mostrando sin dudas, un comportamiento diferencial frente al resto de los genotipos. Sin embargo, para las poblaciones uruguayas del patógeno, el mismo genotipo exhibió alta compatibilidad para seis aislados (75%), y solo dos mostraron respuesta media (12,5%) y baja (12,5%) respectivamente, exponiendo claramente la variabilidad patogénica existente entre las distintas poblaciones del hongo. En el trabajo antes mencionado, también se incluyó el material Conlon, el cual fue susceptible en noventa y dos aislados (72%) y resistente en treinta y cinco (28%). Para nuestras poblaciones, este material no mostró ninguna reacción de baja compatibilidad, pero si tuvo cinco reacciones de alta (83%) y una de media (17%).

En la misma línea, Meldrum et al. (2004) también utilizaron otros genotipos que se incluyen en el set diferencial. El material Skiff fue incluido por haber manifestado previamente reacciones susceptibles en Australia. En este estudio, mostró resistencia en trece aislados, doce de los cuales estaban agrupados bajo el patotipo 000, que fue avirulento para todos los genotipos estudiados. Para el resto de los cuatro patotipos (veintiún aislados) fue susceptible, siendo una de las líneas diferenciales en haber mostrado mayor infección. Para nuestras poblaciones estudiadas, este material también denotó alta susceptibilidad para los 8 aislados (100%) con los que fue evaluado.

El genotipo Lindwall mostró un comportamiento similar a Skiff en Australia. Sin embargo, en nuestro estudio mostró un comportamiento algo más resistente respecto al anterior, ya que al menos tuvo una interacción de baja compatibilidad (16,5%) siendo alta en las restantes siete (85%).

Uno de los resultados más contradictorios, fue el ocurrido con la línea diferencial Stirling. Mientras que para nuestras poblaciones no mostró ninguna reacción de baja ni media RI y si ocho reacciones de alta (100%), en los estudios realizados por Meldrum et al. (2004) fue resistente a cuatro de los seis patotipos (treinta y dos de los treinta y cuatro aislados, 94%), a excepción de los dos aislados que conforman cada uno un patotipo diferente. Este material ya había mostrado moderada resistencia en Australia, lo que motivó a incluirla en su experimento; sin embargo, los aislados de poblaciones uruguayas resultaron altamente virulentos para este material.

Por su parte, Gilbert, genotipo que en Australia presentó resistencia en dieciocho aislados (agrupados en cuatro patotipos) y susceptibilidad a otros dieciséis aislados (agrupados en dos patotipos, Meldrum et al., 2004) resultó ser altamente susceptible a nuestras poblaciones del hongo, presentando ocho interacciones altas.

Los cuatro materiales australianos utilizados, que presentaron alta variabilidad en su respuesta de infección frente a poblaciones australianas de *C. sativus*, resultaron altamente susceptibles (alta compatibilidad hospedante-parásito) frente a las poblaciones uruguayas.

Meldrum et al. (2004) decidieron también incluir dos genotipos originarios de Estados Unidos, los cuales se habían comportado como resistentes en Dakota del Norte. Sin embargo, frente a la población australiana expresaron reacciones de susceptibilidad que fueron aún más graves frente a las poblaciones uruguayas. El genotipo CIHO 6311, no tuvo reacciones de baja compatibilidad con ningún aislado de la población local, cinco fueron altas (71%) y dos medias (29%). Pero con las poblaciones australianas, se mostró susceptible a dos patotipos que agrupaban diecinueve aislados (56%). Por su parte, el genotipo CIHO 1227 exhibió mayor susceptibilidad que el anterior a las poblaciones australianas como también ocurrió con las poblaciones de *C. sativus* locales, donde cinco respuestas fueron altas (83%) y solo una media (13%).

El cultivar INIA Ceibo, solo obtuvo cinco interacciones genotipo por aislado, Gamba (2010b) obtuvo treinta y una respuestas de alta infección (77,5%), seis medias (15%) y tres bajas (7,5%), similar respuesta se reportó en las poblaciones de esta tesis, donde cuatro respuestas fueron altas (80%) y la restante baja (20%). Por otra parte, en los resultados obtenidos por Silva (2011), las poblaciones del patógeno fueron menos virulentas, presentando cinco respuestas de alta infección (42%), cuatro de media (33%) y tres de baja (25%).

Con respecto al cultivar A. Madi, la información obtenida también fue escasa, solo se pudieron evaluar cuatro interacciones, en donde dos (50%) resultaron de alta compatibilidad, una media (25%) y otra baja (25%). A pesar de lo mencionado anteriormente, y que el hecho de evaluar un mayor número de interacciones hubiera aportado información más precisa, los resultados obtenidos mantienen cierta tendencia con los reportados por Gamba (2010b), donde diecisiete respuestas resultaron altas (45%), catorce media (37%) y siete bajas (18%). Sin embargo, los datos presentados por Silva (2011), se contraponen fuertemente, ya que en su experimento no se encontraron respuestas de alta infección, pero sí seis respuestas medias (50%) y seis bajas (50%).

Norteña Daymán presenta los datos con mayor variabilidad patogénica entre experimentos. Mientras Gamba (2010b), reportó veintiún respuestas de infección altas (48%), siete medias (16%), y dieciséis bajas (36%), en los resultados de este experimento, expresó mayor susceptibilidad: alta respuesta de infección en seis aislados (75%), media en uno (12,5%) y baja en otro

(12,5%). Sin embargo, en otro trabajo no se encontró ninguna respuesta de infección alta (0%), seis fueron medias (50%) y otras seis bajas (50%, Silva, 2011).

El genotipo Perún presentó la particularidad de haber tenido respuestas de infección más altas en el trabajo de Gamba (2010b), que en este trabajo. Según Gamba (2010b), tuvo dieciocho respuestas altas (45%), catorce medias (35%) y ocho bajas (20%), en cambio el cultivar mostró tres respuestas altas (37,5%), cuatro medias (50%) y una baja (12,5%), siendo de los genotipos con mejor comportamiento frente a las poblaciones locales de *C. sativus* de este estudio.

Tal como se mencionó con anterioridad, las poblaciones locales de *C. sativus* presentan variabilidad patogénica, que se ve acentuada cuando se comparan con las utilizadas por Silva (2011), pero esto no ocurre con los aislados de Gamba (2010b).

Según los resultados, el genotipo CLE 253 se muestra como altamente susceptible, exhibiendo siete respuestas de alta infección (86%) y solo una baja (14%). Sin embargo, los datos aportados por Silva (2011) apuntan a una resistencia intermedia, con cuatro respuestas altas (33%), cuatro medias (33%) y cuatro bajas (33%).

En la misma línea, del cultivar ND 23180 se obtuvieron cuatro respuestas de alta infección (80%) y solo una de media (20%). Silva (2011) por su parte, no obtuvo ninguna respuesta alta (0%), pero sí 7 medias (58%) y 5 bajas (42%) marcando nuevamente una dicotomía entre experimentos.

Con respecto a la línea experimental I. Guaviyú seis respuestas fueron de alta infección (75%) y dos de baja (25%), mientras que Silva (2011) reportó seis respuestas medias (50%) y seis bajas (50%), y otra vez no obtuvo ninguna respuesta alta de infección.

Finalmente, el genotipo TX 7934 mostró cuatro respuestas de alta infección (57%), dos respuestas de media (29%) y una de baja (14%) mientras que los datos reportados por Silva (2011) fueron seis respuestas de media (50%) y seis respuestas de baja (50%), nuevamente hubo ausencia de respuestas de infección altas.

### 5.3 COMPARACIÓN SET DIFERENCIAL CON INIA-INASE

Los aislados utilizados con el set diferencial, también se inocularon en los genotipos INIA-INASE, permitiendo comparar la virulencia de estos ocho aislados en cincuenta y tres genotipos de cebada.

Los aislados presentaron un comportamiento similar en cuanto a su variación de RI, con porcentajes semejantes de respuestas altas, medias y bajas (figura 4 y 9). El 14.05.5 demostró en ambos casos ser el más virulento con 100% de RI alta para INIA-INASE y 95% en el set diferencial. En el otro extremo el aislado 14.06.2 fue el de menor compatibilidad hospedante-parásito con 45% de baja RI en el set diferencial, cosa que se correspondió con los resultados de INIA-INASE donde obtuvo 48% de respuestas bajas.

En cuanto al agrupamiento generado en los análisis realizados (figura 8 y figura 12), se puede observar que el 14.04.2, 14.03.4, 14.04.6 y 14.06.1 pertenecieron en ambos casos a un mismo grupo de virulencia, siendo más evidente su agrupamiento natural en el estudio realizado con el set diferencial, donde se les asignó el patotipo 3.

Comparando las cebadas con menores RI de los dos grupos de genotipos se observa un promedio menor (3) en las candidatas a integrar el set diferencial, mientras que en las INIA-INASE las que tienen mejor comportamiento frente a *C. sativus* tienden a tener valores de respuesta intermedios (5). Lo contrario sucede con las cebadas que tienen mayor RI, donde las del set tienen un promedio de 9 y las de INIA-INASE 8, siendo en ambas la RI alta.

El genotipo Norteña Daymán fue el único que se inoculó con la totalidad de los aislados utilizados en esta tesis, ya que integró los dos grupos de cebadas seleccionados. Sus RI fueron variadas (del 1 al 9 según la escala de Fetch y Steffenson, 1999), cuando formó parte del set diferencial obtuvo 75%, 13% y 13% (respuestas altas, intermedias y bajas respectivamente), y en INIA-INASE 67%, 14% y 19% (respuestas altas, intermedias y bajas respectivamente); mostrando similitud en las frecuencias, tomando en cuenta el número de datos en cada caso.

En cuanto al coeficiente de variación de los análisis estadísticos (anexo II y anexo III) los valores fueron de 31,39% para el set diferencial y de 31,76% en INIA-INASE. Esta similitud se puede explicar dado a que ambos grupos de interacciones tienen una media entorno a 7 de RI, tanto para los aislados como para los genotipos.

## 6. CONCLUSIONES

El objetivo de la tesis se cumplió, generando información de las interacciones entre los aislados uruguayos de *C. sativus* y las cebadas seleccionadas para el estudio. Concluyendo que se debería poner especial atención en el alto nivel de virulencia que demostró el hongo y en la falta de resistencia por parte de los genotipos.

Como ya fue reportado en trabajos previos, existe una alta variabilidad en las poblaciones uruguayas de *C. sativus*. La población de aislados utilizados en este trabajo mostraron una alta virulencia sobre los genotipos de cebada, tanto para los genotipos de INIA-INASE como para los genotipos del set diferencial. En ambos casos la media fue de 7 en la escala cualitativa de 9 dígitos desarrollada por Fetch y Steffenson (1999), exhibiendo entonces una alta compatibilidad entre el patógeno y las cebadas. Esto demuestra que los genotipos de cebada son muy susceptibles a *C. sativus*, tratándose de un verdadero problema ya que la mejor manera de controlar esta enfermedad es a través de la resistencia genética de las cebadas (ver anexos I, II y III). Esta alta virulencia del patógeno incluso afectó a genotipos que comúnmente son fuente de resistencia como la línea diferencial NDB 112. Pese a haber tenido respuestas altas de infección, el material impuso su comportamiento diferencial y logró destacarse respecto a las otras cebadas. El hecho de haber encontrado aislados con alta RI en NDB 112 ya había sido reportado con anterioridad en nuestro país (Silva, 2011), sin embargo, es un hecho de suma importancia ya que es una línea que se utiliza como fuente de resistencia, por lo que el quiebre de su resistencia podría implicar la pérdida de esta también en sus líneas descendientes. No sería bueno incluirla como fuente de resistencia en nuestras condiciones.

El estudio mostró máximos y mínimos extremos de 9 y 1 respectivamente en ambos grupos de cebadas, demostrando que las cebadas fueron muy susceptibles en su mayoría, pero que hay una amplia gama de respuestas. Los resultados de los genotipos utilizados de INIA-INASE, obedecen con el reporte de Gamba et al. (2010a), donde se sugiere la existencia de niveles muy bajos de resistencia genética de las cebadas estudiadas. Los aislados fueron agrupados en diversos grupos de virulencia, pero la tendencia hacia los valores altos de RI fue evidente. Para este grupo de aislados existió cierta incertidumbre en la conformación de dichos grupos de virulencia, un claro ejemplo es lo ocurrido con los aislados 14.06.2 y 11.01.A, los cuales no pudieron ser claramente agrupados mediante los métodos que se utilizaron.

En este orden para los ocho aislados inoculados en el set diferencial, se logró una agrupación más clara, demostrando que las cebadas que lo integran tienen una amplia gama de respuestas, las cuales permiten caracterizar mejor los aislados. Cabe destacar que no hubieron reportes del patotipo 0 (resistente a las tres líneas diferenciales), que el 50% de los aislados fueron agrupados bajo el patotipo 3 (susceptible para ND 5883 y Bowman) y que se le asignó a dos aislados el patotipo 4, el cual es el primer reporte en Uruguay de su existencia, ya que expresaron reacción susceptible en las tres líneas diferenciales. De todas formas, es importante reafirmar que el análisis cualitativo de patotipos no es suficiente para un correcto análisis de la virulencia de los aislados, y que para estas interacciones en estudio los análisis cuantitativos serían más acertados (Silva, 2011).

En muchos casos no se obtuvieron las repeticiones suficientes para las interacciones entre los genotipos y los aislados. Esto genera poca confiabilidad de algunos de los resultados. Además otras posibles fuentes de error experimental pueden ser: la tierra de campo que se utilizó para sembrar las semillas de la cual no se conoce el origen, ni si estaba libre de inóculo; los posibles problemas en cuanto a la suspensión de conidios; las variaciones en el procedimiento de el filtrado y de la inoculación; los redondeos de las lecturas en algunos casos; el desbalance en el número de repeticiones; el error del lector de la escala de 9 dígitos de Fetch y Steffenson (1999), dependiente del criterio del observador.

Es importante tener en cuenta que la caracterización de los genotipos en este estudio fue solamente fenotípica. Sería conveniente realizar un análisis a nivel genético, con marcadores moleculares como los realizados por Rodríguez (2011), Silva (2011).

Teniendo en cuenta que el actual sistema de producción agrícola se realiza mayoritariamente con siembra directa, que las principales alternativas como cultivos de invierno en nuestro país son trigo y cebada, que el tiempo de descomposición de rastrojo oscila entre dos a cuatro años para lograr bajos niveles de inóculo inicial. Son muchas las probabilidades de sembrar cebada en una chacra con alto inóculo inicial. Además que el patógeno sea necrotrófico y que ataque trigo y cebada, agrava la situación. Para vencer esta limitante es importante seguir colectando muestras y generando nuevos aislados, y utilizar otros genotipos de cebada que ayuden a generar más información sobre la composición de la población de *C. sativus*, complementando con estudios genéticos. Esto contribuiría a mejorar la información necesaria para el desarrollo de estrategias de manejo y de mejoramiento genético adecuadas al tipo de resistencia encontrada en el complejo cebada-*C. sativus*, con la cual se lograría reducir las pérdidas en rendimiento y reducir el uso de fungicidas.

## 7. RESUMEN

La mancha borrosa, causada por *Cochliobolus sativus* es una de las manchas foliares ocasionada por hongos de mayor importancia en los cultivos de cebada de nuestro país, pudiendo provocar disminución de hasta 30% del rendimiento y afectando sensiblemente la calidad maltera del grano, al afectar su peso y capacidad germinativa. En la actualidad, no existe un control químico eficaz de la enfermedad. Adicionalmente, el uso de nuevas tecnologías como la siembra directa y la implementación de sistemas de monocultivo han empeorado las perspectivas a futuro en la importancia de la mancha borrosa; es por eso que el uso de materiales con buenos niveles de resistencia genética resulta una medida de control eficaz desde el punto de vista ambiental. Si bien el experimento se basó en dos grupos de germoplasmas que vienen siendo estudiados y caracterizados desde hace tiempo; uno por INIA-INASE y otro por investigadores que trabajan en la conformación de un “set internacional diferencial” de cebadas, es valioso contribuir con estudios que aporten nueva información y así trabajar en la elaboración de nuevos materiales resistentes. Se evaluó la respuesta de infección en estado de plántula (Z1.2) de veintiocho genotipos INIA-INASE y otros veintiocho genotipos pertenecientes al “set diferencial”. Para el primero, se utilizó un grupo de veintidós aislados colectados principalmente del litoral Oeste del territorio nacional y se utilizó la prueba de Tuckey para comparar los distintos germoplasmas y aislados. Los resultados arrojaron que existen diferencias significativas entre genotipos y aislados: Ambev 303, MUSA 19 y CLE 280 se presentan como los genotipos con mejor comportamiento, mientras que en el otro extremo MOSA/13/123 presento el peor comportamiento. En cuanto a los aislados, se destaca el 14.02.4 como el más avirulento, una clase debajo el 11.01.A y aún menos avirulento el 14.06.3. Los restantes dieciocho aislados, en distintos grados todos presentaron altos valores de virulencia. Para la evaluación del set diferencial se utilizó un grupo más pequeño de aislados, el cultivar que mostró mejor comportamiento fue el NDB 112 mientras que al igual que para INIA-INASE gran cantidad de cultivares fueron designados como poco resistentes o susceptibles. En cuanto a los aislados, el 14.06.2 pese a ser el mas avirulento obtuvo una media mucho más alta respecto al experimento anterior y el 14.05.5 se destaco por su virulencia. Un mayor grupo de aislados hubiese permitido un mejor análisis de este grupo. Es importante continuar realizando trabajos de esta índole para evaluar año a año la resistencia de cada cultivar, así como para generar nueva información al respecto.

Palabras clave: Cebada; Mancha borrosa; Virulencia.

## 8. SUMMARY

Spot blotch, caused by *Cochliobolus sativus* is one of the foliar pathogens with major importance in the cultivation of barley of our country, being able to decrease up to 30 % of the yield and affecting perceptibly the mallet quality of the grain, and affecting its weight and germinative capacity. In the present, there is no effective chemical control of the illness. Additionally, the use of new technologies as the direct seeding and the system implementation of monoculture have worsened the perspectives to future in the importance of spot blotch; that's why the use of good levels of genetic resistance materials turns out to be an effective control from the environmental point of view. Although the experiment was based on two groups of germplasm that have been studied and characterized for a while; one by INIA-INASE and other by several investigators that are working in the conformation of an "international differential set" of barleys, is valuable to contribute with this studies adding new information that can be employed in the generation of new resistant materials. It was evaluated the infection answer in the state seedling (Z1.2) of twenty eight genotypes from INIA-INASE and another twenty eight genotypes belonging to the "differential set". For the first one, a group of twenty two isolated collected principally of the coastal West of the national territory were used and the Tuckey test was choose for compare the different barley and isolated. The results threw that significant differences exist between genotypes and isolated: Ambev 303, MUSA 19 and CLE 280 present themselves as the genotypes with better behavior, while in the other extreme MOSA/13/123 present the worst behavior. In terms of the isolates 14.02.4 stands out as the most avirulent, a class below is 11.01.A, and even less is 14.06.3. The eighteen remaining isolated, in different grades, they all presented high values of virulence. For the evaluation of the differential set, a smaller group of isolated was used. The genotype that showed better response was NDB 112; while as for INIA-INASE a large number of cultivars were designated as low resistant. For the isolates, 14.06.2 despite being more avirulent, it obtained a much higher average with regard to the previous experiment, and 14.05.5 stand out for its virulence. A major group of isolates would have allowed a better analysis of this group. It is important to keep on doing works of this nature to evaluate year by year, the resistance of every barley genotypes, as well as to generate new information on this matter.

Keywords: Barley; Spot blotch; Virulence.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Acharya, K.; Dutta, A.; Pradhan, P. 2011. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shom.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. Australian Journal of Crop Science. 5 (9): 1064-1071.
2. Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. ed. Gainesville, Academic Press. 955 p.
3. AgroAtlas; interactive agricultural ecological atlas of Russia and neighboring countries. s.f. Diseases. *Bipolaris sorokiniana* - Spot blotch of barley. (en línea). s.l. s.p. Consultado 01 abr. 2016. Disponible en [http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Hordei/Hordei\\_Bipolaris\\_sorokiniana/](http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Hordei/Hordei_Bipolaris_sorokiniana/)
4. Akar, T.; Avci, M.; Dusunceli, F. 2014. Barley; post-harvest operations. (en línea). Rome, FAO. 64 p. Consultado 04 abr. 2016. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-au997e.pdf>
5. Altier, N.; Pereyra, S. 2011. Desarrollo de epidemias en cultivos; análisis de sus componentes para un manejo integrado. In: Pereyra, S.; Díaz de Ackermann, M.; German, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 19-32 (Serie Técnica no. 189).
6. Antoniazzi, N.; Deschamps, C. 2007. Controle de *Bipolaris sorokiniana* rendimento de grãos em cevada após aplicação de elicitores e fungicida. Acta Scientiarum. Agronomy. 29: 695-700.
7. Arabi, M. I. E.; Jawhar, M. 2003. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) on barley in Syria. Journal of Plant Pathology. 85: 193-196.

8. Arias, G. 1991. Calidad industrial de la cebada cervecera. Montevideo, INIA. pp. 10-19 (Serie Técnica no. 18).
9. Briquet, M.; Eloy, M.C.; Goblet, P.; Mesa, M.; Vilret, D. 1998. Plant cell membranes as biochemical targets of the phytotoxin helminthosporol. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 30: 285-295.
10. Carlson, H., Jansson, H. B.; Nilsson, P.; Odham, G. 1991. Characterization and determination of prehelminthosporol, a toxin from the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*, using liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 13: 259-269.
11. Carmona, M. 2003. Manejo integrado de enfermedades (MIE) en el cultivo de trigo; información técnica de trigo, campaña 2003. (en línea). Rafaela, INTA. 6 p. Consultado 25 mar. 2016. Disponible en [http://rafaela.inta.gov.ar/info/documentos/miscelaneas/099/misc99\\_6.pdf](http://rafaela.inta.gov.ar/info/documentos/miscelaneas/099/misc99_6.pdf)
12. \_\_\_\_\_. 2008. Manejo integrado de las principales enfermedades de la cebada cervecera; el caso de la manchas foliares. *In*: Congreso de AAPRESID (16°. , 2008, Rosario). Trabajos presentados. Rosario, VADIS. p. 304.
13. Castro, M.; Germán, S.; Pereyra, S. 2014. Resultados experimentales de la evaluación de cultivares de cebada cervecera período 2011-2012-2013. *In*: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigo, cebada, colza; triticale, centeno y trigo doble propósito de los tres últimos años. Colonia, INIA. 33 p. (Resultados Experimentales no. 14).
14. Chinn, S. H. F.; Tinline, R. D. 1964. Inherent germinability and survival of spores of *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*. 54: 349-352.

15. Cook, R. J.; Baker, K. F. 1983. The nature and practices of biological control of plant pathogens. St. Paul, MN, APS. 539 p.
16. Dehne, H. W.; Oerke, E. C. 1985. Investigations on the occurrence of *Cochliobolus sativus* on barley and wheat: Infection, colonization and damage of stems and leaves. *Pflanzenk.* 92: 606-17.
17. Díaz de Ackermann, M.; Pereyra, S.; Stewart, S. 2004. Manejo de enfermedades en trigo. (en línea). *In*: Jornada Técnica Cultivos de Invierno (2004, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 12-18 (Actividades de Difusión no. 357). Consultado 12 abr. 2016. Disponible en [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad\\_357.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad_357.pdf)
18. Di Rienzo, J. A.; Balzarini, M. G.; Casanoves, F.; González, L.; Robledo, C. W.; Tablada, M. 2016. InfoStat. Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. Grupo InfoStat. s.p.
19. Fetch, T. G.; Steffenson, B. J. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease.* 83: 213-217.
20. Gamba, F.; Estramil, E.; Ilardía, L. 2000. Pathogenic variability of *Cochliobolus sativus* in Uruguay. *In*: International Barley Genetics Symposium (8th., 2000, Adelaide). Proceedings. Adelaide, s.e. pp. 115-116.
21. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2002. Variation in virulence within an Uruguayan population of *Cochliobolus sativus*. *In*: International Workshop on Barley Leaf Blights (2<sup>nd</sup>., 2004, Aleppo). Proceedings. Aleppo, s.e. pp. 59-62.

22. \_\_\_\_\_.; Pritsch, C.; Ziminov, M.; Alonso, O. 2010a. Fenotipos de infección al estadio de plántula frente a diferentes aislamientos de *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* y *Cochliobolus sativus*. In: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera; período 2009. Colonia, INIA. pp. 32-34.
23. \_\_\_\_\_. 2010b. La variabilidad de los patógenos causantes de manchas foliares en cebada y su implicancia en el manejo. In: Pereyra, S.; Díaz de Ackermann, M.; German, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 129-138 (Serie Técnica no. 189).
24. \_\_\_\_\_.; Estramil, E. 2012. Agresividad diferencial en una población uruguaya de *Cochliobolus sativus* en cebada. Agrociencia (Montevideo). 16 (1) 108-114.
25. Ghazvini, H.; Tekauz, A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. Plant Disease. 91: 814-821.
26. Gilchrist-Saavedra, L.; Atilano, R. M.; Duveiller, E.; Fuentes-Dávila, G.; García, I.; Henry, M.; López- Singh, R. P.; Martínez-Cano, C. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2ª. ed. México, D. F., CIMMYT. pp. 26 - 27.
27. González, S. 2010. Patología de semillas en trigo y cebada. In: Pereyra, S.; Díaz de Ackermann, M.; German, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 13-18 (Serie Técnica no. 189).

28. INIA; INASE (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY; Instituto Nacional de Semillas, UY). 2015. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera; período 2014. (en línea). Colonia. 64 p. Consultado 20 mar. 2016. Disponible en [http://www.inia.org.uy/convenio\\_inase\\_inia/Evaluacion\\_CI/Ano2014/PubCebadaPeriodo2014.pdf](http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2014/PubCebadaPeriodo2014.pdf)
29. Jordan, V. W. L.; Allen, E. C. 1984. Barley net blotch; influence of straw disposal and cultivation methods on inoculum potencial, and on incidence and severity of autumn disease. *Plant Pathology*. 33: 547-559.
30. Karov, I.; Kostadinovska, E.; Mitrev, S. 2009. *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph *Cochliobolus sativus*), causer of barley leaf lesions and root rot in Macedonia. University "Goce Delčev" Štip. ЗБОРНИК. Department of Plant Protection. 116: 167-174.
31. Khan, A. R.; Ashrafuzzaman, M.; Khanam, N. A. 1992. Primary stage of infection of *Drechslera sorokiniana* on wheat. *Journal of Agricultural Sciences*. 19: 135-139.
32. Khan, T. N. 1988. Effects of stubble-borne fungal inoculum on incidence of leaf diseases and yield of barley in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 28: 529-32.
33. Kiesling, R. L. 1985. The diseases of barley. In: Rasmusso, D. C. ed. *Barley*. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy. pp. 269-312.
34. Kumar, J.; Hüchelhoven, R.; Kogel, K. H.; Nagarajan, S.; Baltruschat, H.; Langen, G.; Schäfer, P.; Stein, E. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern; cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*. 3: 185-195.

35. Lamari, L. 2008. Assess 2.0 image analysis software for plant disease quantification. St. Paul, MN, APS. s.p.
36. Larenz, C. R.; Freeman, T. P.; Hosford, R. 1986. Infections of wheat and oats by *Pyrenophora tritici repentis* and initial characterization of resistance. *Phytopathology*. 76 (9): 931-938.
37. Limpert, E.; Muller, K. 1994. Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology*. 140: 346-358.
38. López, A. M. 2017. Análisis de conglomerados (cluster analysis). Sevilla, Área de Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Departamento de Psicología Experimental. 40 p.
39. Luz, W. C. 1982. Diagnose das doenças da cevada no Brasil. Passo Fundo, EMBRAPA Trigo. 23 p. (Circular Técnica no.2).
40. Mc Donald, B. 2010. How can we achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems? *New Phytologist*. 185: 3-5.
41. Mathre, D. E. 1982. Compendium of barley diseases. St. Paul, MN, APS. 78 p.
42. \_\_\_\_\_. 1997. Compendium of barley Disease. 2<sup>nd</sup>. ed. St. Paul, MN, APS. 90 p.
43. Meldrum, S. I.; Ogle, H. J.; Platz, G. J. 2004. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia. *Plant Pathology*. 33: 109-114.
44. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2016. Anuario estadístico 2016. Montevideo. p.73.

45. Nakajima, H.; Hamasaki, T.; Ichinoe, M.; Isomi, K. 1994. Sorokinianin: a novel phytotoxin produced by the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. Tetrahedron Letters. 35: 9597-9600.
46. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Fujii, Y.; Ichinoe, M.; Toratsu, Y. 1998. Biosynthesis of sorokinianin, a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*: evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathways. Tetrahedron Letters. 39: 1013-1016.
47. Nutter, F. 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 Science. 25: 933-938.
48. OEC (Observatory of Economic Complexity, US). 2016. Where does Uruguay export Malta to? (en línea). Boston, Massachusetts. s.p. Consultado 7 oct. 2017. Disponible en [http://atlas.media.mit.edu/es/visualize/tree\\_map/hs92/export/ury/show/1107/2016/](http://atlas.media.mit.edu/es/visualize/tree_map/hs92/export/ury/show/1107/2016/)
49. Olbe, M.; Gustafsson, M.; Lundborg, T.; Sommarin, M. 1995. Effect of the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* toxin pre-helminthosporol on barley root plasma membrane vesicles. Plant Pathology. 44: 625-635.
50. Pereyra, S. 1996a. Enfermedades de cebada en Uruguay. In: Díaz, M. ed. Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo, INIA. pp. 105-123 (Serie Técnica no.74).
51. \_\_\_\_\_. 1996b. Estrategias para el control químico de enfermedades en cebada. Montevideo, INIA. pp. 14-15 (Boletín de Divulgación no. 57).

52. \_\_\_\_\_.; Stewart, S.; Díaz de Ackermann, M. 2002. Manchas foliares de trigo y cebada bajo siembra directa; conceptos y estrategias de control. (en línea). Montevideo, INIA. s.p. Consultado 15 abr. 2016. Disponible en <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/pol/2002/informe-32.pdf>
53. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Abadie, T. 2003. Efecto de la rotación de cultivos en la población de *Bipolaris sorokiniana* en el suelo. In: Seminario 40 Años de Rotaciones Agrícolas-Ganaderas (4°, 2000, Colonia, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 81-84 (Serie Técnica no. 134).
54. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Díaz, M. 2005a. Manual para la identificación de enfermedades en cereales de invierno. 2a. ed. Montevideo, INIA. pp. 50-51 (Boletín de Divulgación no. 61).
55. \_\_\_\_\_. 2005b. Uso de fungicidas en cebada. In: Jornada Técnica de Cultivos de Invierno (2005, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 4-9 (Actividades de Difusión no. 404).
56. \_\_\_\_\_.; Germán, S. 2011. Manchas foliares en cebada: reconocimiento, epidemiología y estrategias de manejo. In: Pereyra, S.; Díaz de Ackermann, M.; German, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 139-158 (Serie Técnica no. 189).
57. Possamai, E.; Ferrari, J. T. 2015. Incidência de *Bipolaris sorokiniana* nas sementes e transmissão para plantas de cevada. (en línea). Revista de Ciências Agrárias. 38 (3): s.p. Consultado 13 abr. 2016. Disponible en [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0871-018X2015000300006](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2015000300006).

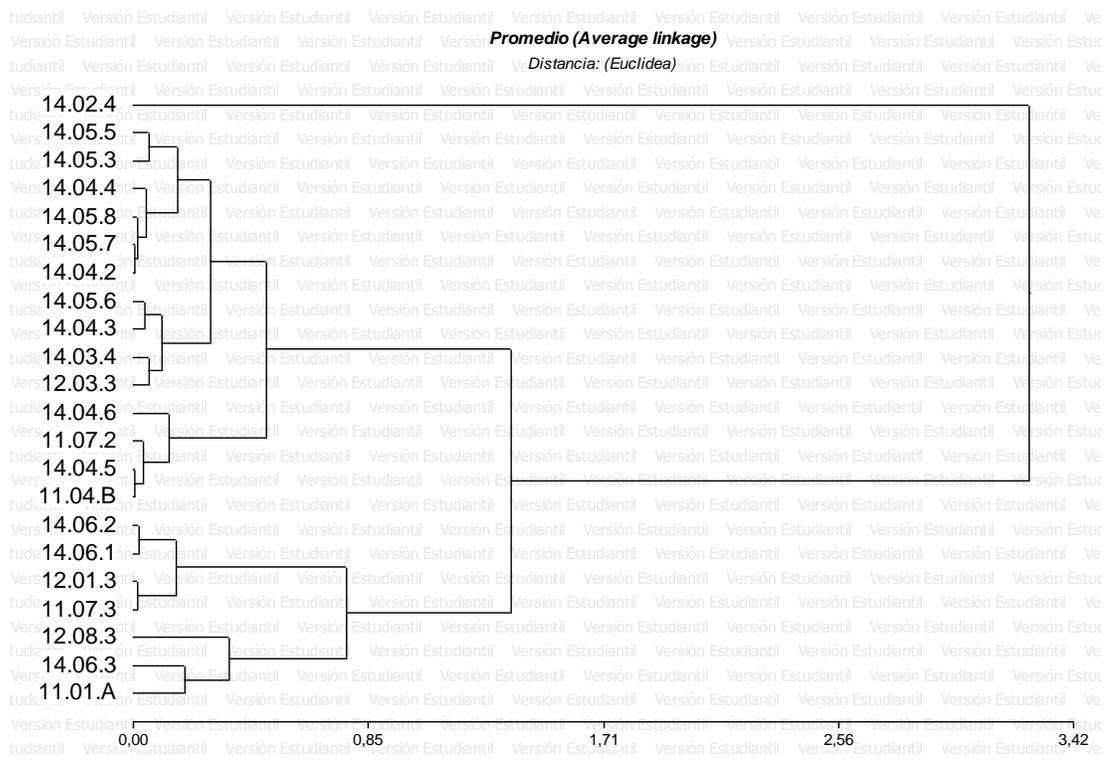
58. Rees, R. G.; Platz, G. J. 1987. Effects of tillage practices on foliar diseases. In: Cornish, P. S.; Partley, J. E. eds. Tillage. Melbourne, Inkata. pp. 318-334.
59. Reis, A. C.; Reis, E. M. 1994. Comparação de métodos para a recuperação de fungos patogênicos, agentes causais de manchas foliares, associados a sementes de cereais de inverno. Fitopatologia Brasileira (suplemento 19): 335.
60. Reis, E. M. 1985. Doenças do trigo; podridão comum de raízes. San Pablo, CNDA. 43 p.
61. Rodríguez, S. 2011. Diversidad genética y funcional en la resistencia de la cebada a la mancha borrosa. Tesis Magister Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad Agronomía. 100 p.
62. Shoemaker, R. A. 1959. Nomenclature of *Dreschlera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from "Helmithosporium." Canadian Journal of Botany. 37: 879-887.
63. Silva, M. P. 2011. Variabilidad patogénica, diversidad genética y estructura poblacional de *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada. Tesina Lic. Ciencias Agrícolas. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 103 p.
64. SINAVIMO (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, AR). 2016. *Bipolaris sorokiniana*. (en línea). Buenos Aires. s.p. Consultado 30 oct. 2017. Disponible en <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/bipolaris-sorokiniana>

65. Stubbs, R. 1986. Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales. México, CIMMYT. 55 p.
66. Tekauz, A.; Beyene, M.; Ghazvini, H.; Gilbert Mueller, E.; Morgan, K.; Reverchon, F.; Stulzer, M. 2003. Survey for foliar diseases of barley in Manitoba in 2002. *Plant Disease*. 83: 60-61.
67. Tomerlin, J. R.; Howell, T. A. 1988. Distrain: a computer program for training people to estimate severity on cereal leaves. *Plant Disease*. 72: 455-459.
68. UdelaR. FA (Universidad de la Republica. Facultad de Agronomía, UY). 2017. Métodos cuantitativos II, teóricos; clases 16 y 17. Montevideo. s.p.
69. Valjavec-Gratian, M.; Steffenson, B. J. 1997. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on Barley in North Dakota. *Plant Disease*. 81: 1275-1278.
70. Van Leur, J. G. 1991. Testing barley for resistance to *Cochliobolus sativus* at ICARDA, Syria. In: International Workshop on Common Root Rot of Cereals (1<sup>st</sup>., 1991, Saskatoon). Proceedings. Saskatoon, s.e. pp. 128-134.
71. Wiewióra, B. 2006 . Pathogenic ability of *Bipolaris sorokiniana* in relation to spring barley (*Hordeum vulgare*). *Phytopathology*. 41: 5-14.

72. Wilcoxson, R. D.; Miles, M. R.; Rasmusson, D. C. 1990. Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance. *Plant Disease*. 74: 207-210.
73. Zadoks, J. C.; Chang, T. T.; Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14: 415-421.
74. Zillinsky, F. J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. El Batán, México, CIMMYT. 157 p.

## 10. ANEXOS

Anexo I. Dendograma de las distancias euclidianas de veintidós aislados de *Cochliobolus sativus* de acuerdo al promedio en la respuesta de infección.



Anexo II. Análisis de varianza realizado con el programa InfoStat para los resultados de respuesta a la infección (RI) obtenidos en los genotipos INIA-INASE.

| Variable | N   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| RI       | 820 | 0,51           | 0,48              | 31,76 |

| F.V.     | SC      | gl  | CM     | F     | p-valor |
|----------|---------|-----|--------|-------|---------|
| Modelo   | 3660,86 | 48  | 76,27  | 16,46 | <0,0001 |
| Aislados | 3107,56 | 21  | 147,98 | 31,93 | <0,0001 |
| Genotipo | 553,30  | 27  | 20,49  | 4,42  | <0,0001 |
| Error    | 3573,16 | 771 | 4,63   |       |         |
| Total    | 7234,03 | 819 |        |       |         |

**(SC tipo I)**

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,96698**

Error: 4,6345 gl: 771

| Aislados | Medias | n  | E.E. |         |
|----------|--------|----|------|---------|
| 14.02.4  | 0,80   | 54 | 0,29 | A       |
| 12.08.3  | 4,00   | 1  | 2,15 | B       |
| 11.01.A  | 4,49   | 22 | 0,46 | B C     |
| 14.06.3  | 4,88   | 49 | 0,31 | B C D   |
| 11.07.3  | 5,77   | 28 | 0,41 | B C D E |
| 12.01.3  | 5,80   | 24 | 0,44 | B C D E |
| 14.06.2  | 6,09   | 44 | 0,33 | B C D E |
| 14.06.1  | 6,15   | 53 | 0,30 | B C D E |
| 14.04.6  | 7,08   | 52 | 0,30 | C D E   |
| 11.07.2  | 7,39   | 28 | 0,41 | C D E   |
| 11.04.B  | 7,39   | 43 | 0,33 | C D E   |
| 14.04.5  | 7,42   | 60 | 0,28 | C D E   |
| 14.05.5  | 7,81   | 71 | 0,26 | D E     |
| 14.05.3  | 7,85   | 24 | 0,44 | D E     |
| 14.05.8  | 8,06   | 26 | 0,42 | E       |
| 14.04.2  | 8,09   | 28 | 0,41 | E       |
| 14.05.7  | 8,12   | 46 | 0,32 | E       |
| 14.04.4  | 8,17   | 45 | 0,32 | E       |
| 14.05.6  | 8,41   | 43 | 0,33 | E       |
| 14.04.3  | 8,49   | 26 | 0,42 | E       |
| 14.03.4  | 8,59   | 28 | 0,41 | E       |
| 12.03.3  | 8,70   | 25 | 0,43 | E       |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,10319**

Error: 4,6345 gl: 771

| <u>Genotipo</u>    | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> |           |
|--------------------|---------------|----------|-------------|-----------|
| Ambev 303          | 5,50          | 32       | 0,38        | A         |
| MUSA 19            | 5,53          | 32       | 0,38        | A         |
| CLE 280            | 5,55          | 31       | 0,39        | A         |
| MUSA 31            | 5,68          | 31       | 0,39        | A B       |
| Carumbe            | 5,85          | 28       | 0,41        | A B C     |
| Ambev 312          | 6,11          | 29       | 0,40        | A B C D   |
| Blondie            | 6,11          | 29       | 0,40        | A B C D   |
| N. Daymán          | 6,42          | 31       | 0,39        | A B C D E |
| CLE 301            | 6,58          | 26       | 0,42        | A B C D E |
| Ambev 329          | 6,77          | 34       | 0,37        | A B C D E |
| Explorer           | 6,84          | 25       | 0,43        | A B C D E |
| Ambev 328          | 6,85          | 31       | 0,39        | A B C D E |
| CLE 232 Timbó      | 6,93          | 31       | 0,39        | A B C D E |
| CLE 233 I. Arrayán | 7,05          | 28       | 0,41        | A B C D E |
| CLE 302            | 7,07          | 29       | 0,40        | A B C D E |
| MOSA/10/489        | 7,14          | 27       | 0,42        | A B C D E |
| MOSA/14/276        | 7,15          | 32       | 0,38        | A B C D E |
| CLE 295            | 7,24          | 32       | 0,38        | A B C D E |
| CLE 300            | 7,28          | 28       | 0,41        | A B C D E |
| MOSA/12/143        | 7,30          | 27       | 0,42        | A B C D E |
| MOSA/11/213        | 7,60          | 30       | 0,39        | A B C D E |
| Umbrella           | 7,69          | 28       | 0,41        | B C D E   |
| MOSA/12/284        | 7,69          | 24       | 0,44        | B C D E   |
| MOSA/13/113        | 7,77          | 28       | 0,41        | B C D E   |
| MOSA/10/508        | 7,80          | 29       | 0,40        | C D E     |
| MOSA/09/312        | 7,90          | 26       | 0,42        | C D E     |
| MOSA/11/277        | 8,06          | 30       | 0,39        | D E       |
| MOSA/13/123        | 8,37          | 32       | 0,38        | E         |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Anexo III. Resultados del programa InfoStat para el análisis de la varianza realizado con los resultados de respuesta a la infección (RI) en los genotipos del set diferencial.

| Variable | N   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| RI       | 267 | 0,40           | 0,31              | 31,39 |

| F.V.     | SC      | gl  | CM    | F    | p-valor |
|----------|---------|-----|-------|------|---------|
| Modelo.  | 670,40  | 34  | 19,72 | 4,51 | <0,0001 |
| Aislado  | 296,75  | 7   | 42,39 | 9,69 | <0,0001 |
| Genotipo | 373,65  | 27  | 13,84 | 3,16 | <0,0001 |
| Error    | 1015,31 | 232 | 4,38  |      |         |
| Total    | 1685,71 | 266 |       |      |         |

**(SC tipo I)**

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,56089**

Error: 4,3763 gl: 232

| Aislado | Medias | n  | E.E. |     |
|---------|--------|----|------|-----|
| 14.06.2 | 4,38   | 32 | 0,37 | A   |
| 14.03.4 | 6,01   | 30 | 0,39 | B   |
| 14.04.6 | 6,47   | 32 | 0,37 | B   |
| 14.04.2 | 6,53   | 31 | 0,38 | B   |
| 14.06.1 | 6,74   | 34 | 0,36 | B C |
| 14.05.8 | 7,07   | 38 | 0,34 | B C |
| 14.05.3 | 7,46   | 38 | 0,34 | B C |
| 14.05.5 | 8,14   | 32 | 0,37 | C   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,10884**

Error: 4,3763 gl: 232

Genotipo Medias n E.E.

|            |      |    |      |       |
|------------|------|----|------|-------|
| 12 IBYT#25 | 3,25 | 4  | 1,05 | A     |
| NDB 112    | 3,68 | 7  | 0,79 | A B   |
| ND 17293   | 5,25 | 3  | 1,21 | A B C |
| ND 23122   | 5,50 | 2  | 1,48 | A B C |
| Bowman     | 5,53 | 15 | 0,54 | A B C |
| NRB 091084 | 5,60 | 14 | 0,56 | A B C |
| A. Madi    | 5,69 | 5  | 0,94 | A B C |
| TX 7934    | 5,71 | 8  | 0,74 | A B C |
| Tolar      | 5,79 | 6  | 0,86 | A B C |
| Perún      | 5,90 | 16 | 0,52 | A B C |
| CI 5791    | 6,00 | 4  | 1,05 | A B C |
| Conlon     | 6,16 | 13 | 0,58 | A B C |
| ND 23180   | 6,39 | 6  | 0,86 | A B C |
| N. Daymán  | 6,48 | 15 | 0,54 | A B C |
| Lindwall   | 6,60 | 12 | 0,61 | A B C |
| CI 9214    | 6,62 | 12 | 0,61 | A B C |
| Conquest   | 6,67 | 12 | 0,61 | A B C |
| I. Guaviyú | 6,96 | 11 | 0,63 | A B C |
| TR 251     | 7,05 | 14 | 0,56 | A B C |
| I. Ceibo   | 7,40 | 5  | 0,94 | B C   |
| Stirling   | 7,44 | 13 | 0,58 | B C   |
| CIHO 6311  | 7,48 | 8  | 0,74 | B C   |
| Delta      | 7,62 | 13 | 0,58 | B C   |
| CIHO 1227  | 7,63 | 9  | 0,70 | B C   |
| ND 5883    | 7,79 | 11 | 0,63 | B C   |
| CLE 253    | 7,90 | 8  | 0,74 | C     |
| Gilbert    | 8,55 | 12 | 0,61 | C     |
| Skiff      | 9,08 | 9  | 0,70 | C     |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Anexo IV. Fotografía de hoja inoculada, con síntoma de mancha borrosa "tipo".



Anexo V. Mancha borrosa con síntoma similar a mancha en red.



Anexo VI. Síntoma con necrosis alargada que respeta las nervaduras.



Anexo VII. Fotografía del síntoma causado por el aislado 14.02.4.



Anexo VIII. Fotografía del síntoma causado por el aislado 14.05.3.



Anexo IX. Lecturas originales.

|                   | <b>Aislado I<br/>14.03.4</b> | <b>Aislado II<br/>14.04.2</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado IV<br/>14.05.3</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.8</b> | <b>Aislado VII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.2</b> |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>A. Madi</b>    | ..                           | ..                            | 9                              | 8                             | 4-9*                         | 4                             | ..                             | ..                              |
| <b>Bowman</b>     | 5/4/*..                      | 9/9/8                         | 9-4/9-5/                       | 5/4/5                         | 9/9/9/5                      | 5/5/3                         | 4-9/9/9                        | 4/A                             |
| <b>CLE 253</b>    | 9                            | 9/9                           | */9                            | 8                             | *                            | 7*                            | 7                              | ..                              |
| <b>CIHO1227</b>   | *..                          | *9*/9                         | 9/9/9                          | 9/7*                          | *                            | 8/7/9/4-7                     | 9/9*/8                         | 6/6*                            |
| <b>CIHO6311</b>   | *3/*3/*3/<br>*3              | *                             | 7*/8*                          | 9*/9*/9*/9*                   | 9*                           | 6*/4*/7/6*                    | 9*/9*/9*/<br>9*                | 6*/7*/9*/9*                     |
| <b>Conlon</b>     | 2/3/..                       | 5/5/9/9                       | 7/8-5/5                        | 4/9*                          | 8*/*                         | 7/8/7                         | 9*/5/6/9*                      | 5-9*/5-3                        |
| <b>Conquest</b>   | *..                          | 9-3/8-3/9                     | 8/9/*                          | 9                             | 9                            | 3-7                           | 9                              | 9*/9*                           |
| <b>Delta</b>      | 3/2/4/4                      | 8/9/8                         | 7/8/9/9                        | 7*/8*/1*/8                    | 9*/9/*                       | 6/8/6                         | 8/7/4-9                        | 6*/6*                           |
| <b>Gilbert</b>    | 8/8/*../7                    | 9/9                           | 8*/9/9/9                       | 7/8/7/9*                      | 9*/9*/9*                     | 6*/6*/7*/8*                   | 9*/7/7/7                       | 6*/8*/7*/7*                     |
| <b>I. Ceibo</b>   | 8/..../                      | *                             | 9*/9*/9*                       | 9*/7*/7*                      | 9*/9*/9*                     | 8*/9*/8*                      | 9*/9*                          | 7*/8-2*/<br>7-3*                |
| <b>I. Guaviyu</b> | 8/7                          | 9*/9*/9*/<br>9*               | 9*/9*/9                        | 9/9*/9*                       | 9/7                          | 9*/9*/9/9                     | 8/8/8/7                        | 9*/6*/7*/7*                     |
| <b>12IBYT#25</b>  | ..                           | ..                            | ..                             | ..                            | ..                           | ..                            | ..                             | ..                              |
| <b>Lindwall</b>   | 7/7-4                        | 9/2-8/9/9                     | 9/9/8-3/7                      | 5*/4*/5*/4*                   | 9-6/7/9/9                    | 9/8-4/9/9*                    | ..                             | 2/4*/3*                         |
| <b>N. Dayman</b>  | 4-7/3-7                      | 6/6/6                         | 9-5/8/9/6                      | 6/9/9*/6*                     | 5/8                          | 6/9*/8*/7                     | 8/9/8/8                        | 8*/7*/7/7*                      |
| <b>NDB 112</b>    | ..                           | ..                            | ..                             | ..                            | ..                           | ..                            | ..                             | ..                              |
| <b>ND 5883</b>    | 8-9/<br>8/9/9                | 9/*                           | 9/9                            | 7/8/7                         | 9/9/8                        | 9/8/7/9/9                     | 9/9/9                          | 9/8/7                           |
| <b>ND 17293</b>   | ..                           | ..                            | 6-4/3/<br>8-3/2                | *                             | 8/4-9*                       | ..                            | ..                             | ..                              |
| <b>ND 23122</b>   | ..                           | ..                            | ..                             | 2                             | ..                           | ..                            | ..                             | */2*                            |

|                  | <b>Aislado I<br/>14.03.4</b> | <b>Aislado II<br/>14.04.2</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado IV<br/>14.05.3</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.8</b> | <b>Aislado VII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.2</b> |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>ND 23180</b>  | 3-6/8-4                      | ..                            | *3/*9                          | 8-4/4                         | 9                            | 5-8                           | 9*                             | ..                              |
| <b>NRB091084</b> | ..                           | 9/9/9-4                       | 9/8/8                          | 6/*/*                         | 3                            | 7/9*/9*                       | 8/9/8                          | 8*/4-9/8-4                      |
| <b>Perún</b>     | 7-3/8/<br>7-2/7              | 6/8/8-4                       | 9/6/*                          | 6/9*/6*                       | 7/8/8*/9*/<br>8              | 9*/5/9*                       | 5/7-3/8/7                      | 7/5*                            |
| <b>Skiff</b>     | 9/9/9                        | *9*/9*/9                      | */*/*                          | 9*/9*/9*/9*                   | 9*/9*/9*                     | 9*/9*/9*/9*                   | 9*/9*/9*/<br>9*/9*             | 9*/9*/9*                        |
| <b>Stirling</b>  | 8/9                          | 7/6/7/5                       | 9/9/9                          | 8/5/6/8/5-8                   | 9*/9/9*                      | 9/7/9                         | 7/9*/8                         | 8*/8*/9*/9*                     |
| <b>Tolar</b>     | ..                           | ..                            | *                              | ..                            | ..                           | ..                            | 6                              | *                               |
| <b>TR 251</b>    | 9/9/9/9                      | *9*/9*/9                      | 3*/9*/9                        | 8/9*/9*/9*                    | ..                           | 9*/9*/9/7                     | 9*/7/9*/7                      | 7/6/9*                          |
| <b>TX 7934</b>   | ..                           | ..                            | 4-9/3-8/9                      | 8                             | M                            | ..                            | ..                             | 6*/5/4/4                        |
| <b>CI 9214</b>   | 7/5/9/2/<br>5-3              | *6                            | 7/6/6/*9/<br>*9                | 7/9/9/9*                      | M                            | 6/4/6/5/4                     | 9*/M/M/9*                      | 8/9*/7/7                        |
| <b>CI 5791</b>   | 4-2/6-2                      | */*                           | 8/*/*                          | ..                            | M                            | 3                             | 8/8                            | 5*                              |

..: sin dato, \*: planta chica, M: marchita, A: anomalía, /: separación entre plantas

|                  | <b>Aislado<br/>I<br/>14.03.4</b> | <b>Aislado<br/>II<br/>14.04.2</b> | <b>Aislado<br/>III<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado<br/>IV<br/>14.05.3</b> | <b>Aislado<br/>V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado<br/>VI<br/>14.05.8</b> | <b>Aislado<br/>VII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado<br/>VIII<br/>14.06.2</b> | <b>Testigo</b> |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| <b>A. Madi</b>   | ..                               | 3-9                               | 4-2-6/<br>4-2-6/<br>5-2-6          | ..                                | ..                               | ..                                | ..                                 | ..                                  | ..             |
| <b>Bowman</b>    | 9/9                              | 4/5/2/2/<br>2                     | ..                                 | 3/3-4/<br>2/9-2                   | 9/9/9/8/<br>9                    | 6-2/2-6/<br>6-3                   | 1/2                                | 2/2/0/0                             | 0/0/0/0        |
| <b>CLE 253</b>   | 9/9/8                            | ..                                | ..                                 | ..                                | 9                                | ..                                | ..                                 | 5/0                                 | ..             |
| <b>CIHO1227</b>  | ..                               | ..                                | ..                                 | 9-5                               | 9                                | 5-8/9                             | ..                                 | 3-2/3                               | 0/0            |
| <b>CIHO6311</b>  | 5/5/6/<br>3-9                    | 9-6/9-5/<br>9                     | ..                                 | 9-2                               | 9                                | 9                                 | 9/9                                | 1/5/5-3                             | 0/0/0/0        |
| <b>Conlon</b>    | ..                               | 4-6/8/<br>6-2                     | 3-6/4-6/<br>4-5                    | 7/9                               | 9                                | 9/9/9                             | 8-6                                | ..                                  | 0              |
| <b>Conquest</b>  | 3/3/4-3                          | 5-9                               | ..                                 | 9                                 | 9-3                              | 9/9-2                             | ..                                 | 0/2                                 | 0/0            |
| <b>Delta</b>     | 7/8/9                            | 9/9-2                             | ..                                 | 9/9/9-3                           | 9/9-3                            | 8/9/9/<br>2-8                     | 8                                  | 8/7/8                               | 0/0            |
| <b>Gilbert</b>   | 9/9/9                            | 9-5/9-6/<br>9-4/2-8               | 9/9                                | 9/9/9/9                           | 9                                | 9-3/9/8                           | ..                                 | 9                                   | 0/0/0/0        |
| <b>I. Ceibo</b>  | 9/9/9/6                          | ..                                | ..                                 | 9/9                               | 9/9                              | ..                                | 3-6/9/9                            | 1/3                                 | ..             |
| <b>I.Guaviyu</b> | ..                               | 3-8/2-9                           | 6/6                                | 9/9/9                             | ..                               | 9-5                               | 7/9/9                              | 2/3                                 | 0/0            |
| <b>12IBYT#25</b> | ..                               | ..                                | ..                                 | 4                                 | ..                               | 3-9/9-3                           | 4/4-5                              | 2                                   | ..             |
| <b>Lindwall</b>  | ..                               | 6-3/3-9/<br>7-2                   | 6/5-6                              | 9/9/9/                            | 9/9                              | ..                                | 6-3/6-3                            | 1/0/2/2/0                           | 0/0/0          |
| <b>N. Dayman</b> | 1/2/3/5                          | 9/6/9/                            | ..                                 | 9/9/9/9                           | 9/9/8                            | 9/9/9                             | 9/4                                | 0/2/0/0                             | 0/0/0/0        |

|                  | <b>Aislado I<br/>14.03.4</b> | <b>Aislado II<br/>14.04.2</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado IV<br/>14.05.3</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.8</b> | <b>Aislado VII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.2</b> | <b>Testigo</b> |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>NDB 112</b>   | 1/1/2/3/<br>3                | 3-4/2/2/                      | 2/2/2-4/<br>3/3                | 4/5/4/2                       | 8/9/9-3                      | 5/5-9/<br>9/5-9/<br>5-9       | 2/2-3/<br>2/4/3                | ..                              | 0/0/0          |
| <b>ND 5883</b>   | ..                           | ..                            | ..                             | ..                            | 9                            | ..                            | 8                              | 0                               | ..             |
| <b>ND 17293</b>  | ..                           | 5-2                           | ..                             | ..                            | ..                           | ..                            | ..                             | ..                              | ..             |
| <b>ND 23122</b>  | ..                           | ..                            | ..                             | ..                            | 9-3                          | ..                            | ..                             | ..                              | ..             |
| <b>ND 23180</b>  | ..                           | ..                            | 4-5                            | ..                            | ..                           | 9-3                           | ..                             | ..                              | 0              |
| <b>NRB091084</b> | 2                            | ..                            | 3-8                            | 9                             | 9/8                          | 4-9/3-9/<br>9                 | 3                              | 2/2/2/2/5                       | 0              |
| <b>Perún</b>     | 3/3/3/<br>3-5                | 2/2-4/<br>2/4                 | 3/3/3-5                        | 9/9-3/<br>5-8/8               | 9/9/7                        | 9/9-3/<br>9/9-2/9             | 4/3/3-4                        | 0/1/1/0                         | 0/0            |
| <b>Skiff</b>     | 9/9/9                        | 9/9/9/9                       | 9/9/9                          | 9/8/9/9                       | 9/9/9/9                      | 9/9/9/9                       | 9                              | 9                               | 0/0/0          |
| <b>Stirling</b>  | 3/4/6                        | 9-4/9-4/<br>9-2/9-3           | 4/4-2/<br>4-3/4                | pm                            | 9/9/9/9/                     | 9-4/9-2/<br>9/9-3             | ..                             | 8-3                             | 0/0/0          |
| <b>Tolar</b>     |                              | 4                             | ..                             | 9/9                           | ..                           | 9-3                           | 5                              | 2                               | 0              |
| <b>TR 251</b>    | 6/9/9-3                      | 4-2-9/<br>9-3/3-8             | 2-4/<br>3/5/7                  | 9/9/7/9                       | 9/9/9/                       | 9/9-3/<br>9-2                 | 9/6/9                          | 6*/6-3/<br>6-5                  | 0/0/0/0        |
| <b>TX 7934</b>   | ..                           | 6-3                           | ..                             | ..                            | 6/7                          | 9-6/8-2                       | 5/4-5/3                        | 0/1                             | 0              |
| <b>CI 9214</b>   | ..                           | 9-8-2/<br>9-2/<br>8-2/9-3     | 2-3/3/<br>3-1/6                | 8/9                           | 8-3/<br>0/0/0                | 9/9-4                         | 6/6-7/9/9                      | 9/9/                            | 0/0/0/0/<br>0  |
| <b>CI 5791</b>   | ..                           | ..                            | ..                             | ..                            | ..                           | ..                            | ..                             | ..                              | ..             |

..: sin dato, \*: planta chica, pm: planta muerta, /: separación entre plantas

|                    | <b>Aislado I<br/>11.07.2</b> | <b>Aislado II<br/>12.01.3</b> | <b>Aislado III<br/>12.03.3</b> | <b>Aislado IV<br/>12.08.3</b> | <b>Aislado V<br/>11.07.3</b> | <b>Aislado VI<br/>14.04.3</b> | <b>Aislado VII<br/>14.04.4</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.04.5</b> | <b>Aislado IX<br/>14.05.5</b> | <b>Testigo</b> |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>Mosa/09/312</b> | 2-8/5-9/<br>9-2/2-7          | 9/9/9/9                       | 9*/9*/9/<br>9*                 | 9*/9*/9*                      | 5-9/9-2/<br>4-9              | 9/9/9                         | 9*/9*/9/<br>9*                 | 9*/9*                           | 9*/9*/7*                      | 0              |
| <b>Mosa/10/489</b> | 9/9/4-9                      | 9/9/7                         | 9/9-2/<br>9-5                  | 9*/9*                         | 2/4/3                        | 9/6                           | 9-2*/<br>9-2*                  | 9*/9*                           | 9*/9*/9*                      | 0/0            |
| <b>Blondie</b>     | 6p                           | 1/2/0/2                       | 9-2/9                          | 7*                            | 2-9/1-9/<br>3-9              | 9/9/9/9/<br>9                 | 3-9*/<br>2-9*/<br>2-9*         | 9*/9/9/                         | 9*/9*/9/<br>9*                | 0              |
| <b>Mosa/10/508</b> | 2-9/7-2                      | 9/9/9/9                       | 9/9-2/<br>9/9-5/9              | 9*/9*/9*/<br>9*               | 9-5/9-5/<br>9/9              | 9/9/9/9                       | 9*/9-2*/<br>9*/9*              | 9-6*/9*/<br>9*/5-2              | 9*/9*/9*                      | 0              |
| <b>Mosa/11/213</b> | 9/9/9-3/<br>2-9              | 3/1/1                         | 9/9/9-2                        | 9*/9*/6*/<br>9*               | 2-4/4-9/<br>5-8              | 9*/9*/9/<br>9-7*              | 9/0                            | 9/7                             | 9*/9*/9*                      | 0/0            |
| <b>Mosa/11/277</b> | 9/9                          | 9/9/7                         | 9-6/9-7/<br>9-5/9-4            | 7*/9*                         | 9/9-4/9                      | 9/9*/<br>9-5*                 | 9/0                            | 9/9*/<br>7-5*/9                 | 9*/9*/9*/<br>9*/9*            | 0              |
| <b>Mosa/12/284</b> | 7/6-8/<br>7/9                | 9/9/9/9                       | ..                             | 9*/9*                         | 5-9/7-9                      | 9-2*/<br>9*/9-4*              | 0/0/9                          | 9-4*/<br>9*/9*                  | 9*/9*/9*/<br>9*               | 0/0            |
| <b>Mosa/13/123</b> | 9-4/9-6/<br>9-3              | 9g/7-9/<br>6-4                | 9-2/9/9                        | 9*/9*/9*/<br>8*               | 8/9/9/<br>7-9*               | 9/9/8/9                       | 9*                             | 9-4/9-2                         | 9*/9*/                        | 0              |
| <b>Mosa/13/113</b> | 7/5                          | 9/8/9/9                       | 9/9-6/9                        | 5*/5*/9*/<br>7*               | 6-2*/<br>8-4*/7/<br>9-4*/5-9 | 9-2*/<br>9/9-5*               | 9*                             | ..                              | 9*/9*/9*                      | 0              |
| <b>Mosa/14/276</b> | 4                            | 9/9/9-6                       | 9-2/9-3                        | 9*/9*/8*/                     | 9-7*/<br>7/2-7*              | 9-3*/<br>4-9/9-4              | 9/9-2*/9                       | 9/9/9*                          | 9*/9*/9*                      | 0/0            |
| <b>Mosa/12/143</b> | 7-5/6-2/<br>3-5              | 8-2/8/<br>9-3/8-4             | 9-2*/<br>9-2*                  |                               | 9*/<br>3-9*/9                | 9/9/9-3                       |                                | 9-5*/8/<br>9-6*/<br>9-6-7*      |                               | 0              |

|                               | <b>Aislado I<br/>11.07.2</b> | <b>Aislado II<br/>12.01.3</b> | <b>Aislado III<br/>12.03.3</b> | <b>Aislado IV<br/>12.08.3</b> | <b>Aislado V<br/>11.07.3</b> | <b>Aislado VI<br/>14.04.3</b> | <b>Aislado VII<br/>14.04.4</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.04.5</b> | <b>Aislado IX<br/>14.05.5</b> | <b>Testigo</b> |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>CLE 232<br/>Timbó</b>      | 2-5/6-2/<br>2-5              | 3/1/1                         | 9-1/9-1/<br>9-1/9              | 9-3*/<br>9-3*/<br>9-3*        | 9-2*/<br>9-3*/<br>2-4*/4-2   | 9-2/9-3/<br>9-4               | 9/9/9-3*                       | 9-3*/<br>9*/9*/9*               | 9/9/9                         | 0              |
| <b>CLE 233 I.<br/>Arrayán</b> | 9/9                          | 9g/7g/<br>7g                  | 9-2/9/9/<br>9-2/9-3            | 6*/8*                         | 3-5/2                        | 5-9/9/<br>9/8                 | 9/9*                           | 8*/9/<br>8-4*                   | 9/9/9                         | 0/0            |
| <b>CLE 280</b>                | 9/9/9                        | 2/3                           | 6/5-2/<br>2-6/2-5              | 3*/2*/1*/<br>4*               | 2-4/2-6/<br>6-1/4-1          | 8-2/5-8                       | ..                             | 4/4-6/<br>4-7                   | 9/9/9/9/<br>9*                | 0              |
| <b>CLE 295</b>                | 9-7/9/9                      | 2/3/3                         | 9/9/9                          | 9*/5*/6*/<br>5-9*             | 3-2                          | 5/9-4*/<br>7-2                | 9-2*/9/<br>2-9/9               | 8/9*/<br>9-2/9-3*               | 9/9/9                         | 0              |
| <b>CLE 300</b>                | 9/9/9                        | 6/7/9                         | ..                             | ..                            | 3-6/2-5/<br>5-3/3-6          | 9/9/9/9/<br>9-4               | 9*/5/9*/<br>8*/9-3*            | 9*/9-2*/<br>9-6*/9              | 9/9/9/9                       | 0              |
| <b>CLE 301</b>                | 9                            | ..                            | ..                             | 3*/9*                         | 2-5*/<br>2-9/2               | 9-5/9/9                       | 8-2*/<br>9*/9*                 | 9*/9*/9*/<br>9*/                | 9/9/9/9                       | 0              |
| <b>CLE 302</b>                | 9/9/9                        | 9/9                           | 8-3/9                          | 3-8*/<br>4-8*/9*              | 3/5-1                        | 9/9/8/9*                      | 9-2*/9                         | 6/9*/6                          | 9/9/9                         | 0              |
| <b>N. Daymán</b>              | 9/9/9-5                      | 3g/5g/<br>5g                  | 2-9/9-2/<br>9-2/4-9/<br>9-2    | 4*/2*/<br>3-6*                | 9/2-9*/<br>3-9*              | 9-3*/9/<br>9/8/9              | 8*/9-6*/<br>6/7                | ..                              | 9                             | 0              |
| <b>Umbrella</b>               | 9-7/9-8/<br>9/9-8            |                               | 9-5/9-1                        | 9*/9*/9*/                     | 9-3/9/<br>7/9                | 9/9/9-7                       | 9/9/9*                         | 9*/7-9*/<br>7                   | 9/9/9/9                       | 0              |
| <b>Explorer</b>               | 9/9-7                        | 6/7/9-6                       | 9-4/9-6/<br>9-2                | 9*/9*                         | 8-3*/9/<br>9/8               | 9/9/9/9                       | 9*/9*/9*/<br>9*                | 9*/9*/9*/                       | 9/9/9/9                       | 0              |

|                  | <b>Aislado I<br/>11.07.2</b> | <b>Aislado II<br/>12.01.3</b> | <b>Aislado III<br/>12.03.3</b> | <b>Aislado IV<br/>12.08.3</b> | <b>Aislado V<br/>11.07.3</b> | <b>Aislado VI<br/>14.04.3</b> | <b>Aislado VII<br/>14.04.4</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.04.5</b> | <b>Aislado IX<br/>14.05.5</b> | <b>Testigo</b> |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>Ambev 303</b> | 4-9/                         | 7-5/7-4/<br>9                 | 9-6/9/<br>9-2/9                | 4/5*/<br>3-7*/3*              | 3-5/9*/8                     | 3/7-2/<br>9/9-4               | 6*/2/<br>5/6*                  | 6/8-2/<br>6-2                   | 9/9                           | 0              |
| <b>Musa 31</b>   | 9/9-2/<br>9-4                | ..                            | 8-2/9-3/<br>8-3/9-4            | 4*/4-6*                       | 9/8-2/5                      | 6-2/9/<br>9-4/9               | 9-3*/<br>4-2*                  | 9/9-2/6                         | 9/9/9                         | 0/0            |
| <b>Ca-rumbé</b>  | 6-9/9-2/<br>9-1/9            |                               | 3-9/9/<br>9-3/9-4              | 3*/3*/3*                      | 9-2/9/<br>7/9                | 6-2/8/<br>9-2/9               | 3-9*/9/<br>5*                  | 9*/6-2/<br>8-4                  | 9/9/9/9                       | 0              |
| <b>Musa 19</b>   | 3/4/2/3                      | 3-5                           | 4/9/9-2/<br>9-2                | ..                            | 2-9*/9/<br>4-9/9-4           | ..                            | 7/8/6/5                        | 5                               | 9/9/9                         | 0              |
| <b>Ambev 328</b> | 4-9/9/9                      | 3/0/2/3g                      | 9/9/9-3                        | 6/9*/6                        | 7*/2-9/<br>2-9/9-4           | 6-9/9/<br>9/9/                | 9/2-9/<br>9-6                  | 9                               | 9/9/9                         | 0              |
| <b>Ambev 329</b> | 9-2/9-2/<br>9-1              | 5/5-8/<br>5-8/3               | 9-3/9/<br>9-5-2                | 6*/7*/                        | 9/9/3-9                      | 9*/9-4/<br>9-3/3-9            | 8/5/8-3*                       | 9*/<br>9-3*/8                   | 9/9/9                         | 0/0            |
| <b>Ambev 312</b> | 4/6-9/<br>5-9                | 3/2/4                         | 9-6/9/<br>5-9/9                | 3*/3*                         | 8-3/2-9/<br>4-9              | 9-3/2-9                       | 9/8                            | ..                              | 9/9/9/9/                      | 0              |

...: sin dato, \*: planta chica, g: planta grande, /: separación entre plantas

|                         | <b>Aislado I<br/>11.04.B</b> | <b>Aislado II<br/>14.02.4</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.5</b>  | <b>Aislado IV<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.6</b> | <b>Aislado VII<br/>14.05.7</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado IX<br/>14.06.2</b> | <b>Aislado X<br/>14.06.3</b> |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Mosa/<br/>09/312</b> | 9-2*/                        | 0/0/0/0                       | 9*/9-3*/<br>9*                  | 9*/9*/9*/<br>6                | 9/9*/9/<br>9-5*              | 9*/9*/9*                      | 9*/9-4*/<br>9*/9-6*            | 9/9/8/9*                        | 9-3*/9*                       | 9-3*                         |
| <b>Mosa/<br/>10/489</b> | 2-9*/<br>2-9*/4*             | ..                            | 9-2/9-4/<br>9/9-3*              | 9/9/9/                        | 9*/9-2*/<br>9/9-2*           | ..                            | 9/9-5*/<br>9/9-7*              | 9*/9*                           | 9/9-4*                        | 0/5*                         |
| <b>Blondie</b>          | 4/3*/3*                      | 0/0/0                         | 9-3*/<br>9-5*/<br>9-2*/<br>3-9* | ..                            | 3-9*/<br>4-9*                | 9/7/9                         | 9/9*                           | 3/4/<br>2-5*/5                  | 4*/2/7                        | 0/3*/0                       |
| <b>Mosa/<br/>10/508</b> | 7*/9-7*/<br>9*               | 9*/9*/0/<br>0                 | 9*/9                            | 9/9/9                         | 9/9/9                        | 9*/9/6/<br>9*                 | 9*/9*/9*/<br>9*/9*             | 9/9/9*/<br>9*                   | 9/9*/9*/<br>9*                | 0/0                          |
| <b>Mosa/<br/>11/213</b> | 9/9-3*/<br>2-9*              | 0/0/0                         | 9*/9*                           | 9/9/9/9*                      | 9/9/9*/9                     | 9/9/9/9                       | 9*/9*/9                        | 9*/9*/9                         | 9*/9*/9*/<br>9*               | 3                            |
| <b>Mosa/<br/>11/277</b> | 9/9/9*                       | 0/0                           | 9/9-2*                          | 9/9*/9*                       | 9/9                          | ..                            | 8/2-9*/<br>9/8/7-9*            | 7-9*/9*/<br>9-7*/9              | 9-4*/<br>0/3*                 | 9-6-2*/<br>9/8*/9*           |
| <b>Mosa/<br/>12/284</b> | 9*/9*/9                      | 0/0/0/0                       | 9*/9                            | 9*/9/9                        | 9/9-2/<br>9/9                | 9/9                           | 7/7                            | ..                              | 8*/0*/3*                      | 9-<br>3*/9*/9*/              |
| <b>Mosa/<br/>13/123</b> | 9*/9/9                       | 2                             | 9/8                             | 9/9-6/<br>9*/9/9              | 9/9/9                        | 9/9/9                         | 9*/9/9*                        | 9/9/9/7                         | 7/9-6*/<br>9/9*               | 9*/7*/9                      |
| <b>Mosa/<br/>13/113</b> | 4/5                          | 9/9/6                         | 9/9-4*                          | 9-5/9/<br>9-7                 | 9/9/9/9                      | 9/9*/9*/                      | 9*/9                           | 9-3*/<br>8/9-2*                 | 9*/9*/9                       | 6/9*/9*                      |
| <b>Mosa/<br/>14/276</b> | 4-9/9*/<br>8*                | 0/0/0/2                       | 9                               | 9/9/9/9                       | 9/9                          | 9/7-5/<br>9/9*                | 9/9*/9                         | 9/9*/<br>9-3/7-3                | 8/9*/9                        | 9/0/2                        |
| <b>Mosa/<br/>12/143</b> | 8*/9*/<br>9-2*/9*            | 0/0/0/8                       | ..                              | 8/7/6                         | 9/9                          | 9/9/9                         | 9*/9*/<br>9-3*                 | 8/2-8                           | ..                            | 8-5*/9*                      |

|                               | <b>Aislado I<br/>11.04.B</b> | <b>Aislado II<br/>14.02.4</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.5</b> | <b>Aislado IV<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.6</b> | <b>Aislado VII<br/>14.05.7</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado IX<br/>14.06.2</b> | <b>Aislado X<br/>14.06.3</b> |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>CLE 232<br/>Timbó</b>      | 2*/3*/<br>4-8*               | 0/0/0/0/<br>0                 | 9/9/<br>3-9*/9                 | 9*/9-7/<br>9*/                | 8-4/7/9                      | 9/9-2                         | 9-4                            | 9/8/9-3/<br>9-6*                | ..                            | 9*/9-4*/<br>9*/0             |
| <b>CLE 233 I.<br/>Arrayán</b> | ..                           | 3*/3*                         | 8/9*/<br>8/8-6                 | 9/9-6                         | 9/9                          | ..                            | 9/9/9/9                        | 7-3/8/<br>8-3/8-2               | 9*/9*                         | 0/0                          |
| <b>CLE 280</b>                | 2                            | 0/7/0                         | 9-4/9/<br>3-6                  | 3/3-6-9/<br>7-3/9-3/<br>3-9   | 9/6/9/5/<br>9-2              | 9/9-3/9                       | 9/9                            | 9/4/2                           | ..                            | 0/0                          |
| <b>CLE 295</b>                | 7*/9-2/<br>2-4               | 0/0/0                         | 9*/9*/                         | 6/9-6/7                       | 5/9/9/9                      | 9/9/9                         | 9/9/9                          | 9/9-3/<br>9-2                   | 9                             | 9-6*/<br>9-2*/0              |
| <b>CLE 300</b>                | 4/5*                         | 0/2*/0                        | 9/9/9*                         | ..                            | 9*/9-6                       | 9*/9*                         | 9/9/9*                         | 9/9-4/<br>9*/9*/9*              | 9*/9*/9*/<br>7-3              | 0/9*/9*/<br>0                |
| <b>CLE 301</b>                | 2-5*/<br>3-7*                | 9*/0/0                        | 0/2*                           | 9/9/9                         | 9/9/9*/9                     | 9/9/9/9*                      | ..                             | 9/                              | 9*/9*                         | 0/0/9*/<br>9*                |
| <b>CLE 302</b>                | 3/2                          | 1*/0                          | 9*/9-2*/<br>9*                 | 9/9/9                         | 9/9/9                        | 9*/9/9/<br>9-5/9              | 9*/9/9                         | 9/9*/9/9                        | ..                            | 9*                           |
| <b>N. Daymán</b>              | ..                           | 0/0/0                         | 7/8                            | 9-3/9-3/<br>9-3/              | 9-2/9/<br>9-2                | 9/9                           | 9*/9-4*/<br>9-6*               | 3-9/9-3/<br>3-9                 | 2/3-9*/<br>2-4*               | 9-6*/0/<br>0/0               |
| <b>Umbrella</b>               | 8/9/9/<br>9-7                | 9*/9*/0/<br>9*/0              | 9/9                            | 9*/9*/9*                      | 9/9                          | 9*/9*/9*/<br>9*               | 9-7*/9*                        | 9/9/                            | 9*/9*/9*                      | 9*/9-4*/<br>0                |

|                       | <b>Aislado I<br/>11.04.B</b> | <b>Aislado II<br/>14.02.4</b> | <b>Aislado III<br/>14.04.5</b> | <b>Aislado IV<br/>14.04.6</b> | <b>Aislado V<br/>14.05.5</b> | <b>Aislado VI<br/>14.05.6</b> | <b>Aislado VII<br/>14.05.7</b> | <b>Aislado VIII<br/>14.06.1</b> | <b>Aislado IX<br/>14.06.2</b> | <b>Aislado X<br/>14.06.3</b> |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Explor-<br/>er</b> | 9*/9-7*                      | 0/0/0                         | ..                             | 3*/0                          | 9/9/9/9*                     | 9*/9*/9*/<br>9-4              | 9*/9*                          | 0/3                             | 9*/9/9*                       | 0/0/0                        |
| <b>Ambev<br/>303</b>  | 8                            | 0/0/0/0                       | 9*/8-3                         | 5/0/0                         | 8-2/9/9                      | 3*/9/<br>4-8*                 | 0/0/                           | 2-4/4/<br>5-3                   | 5/5/9*                        | 0                            |
| <b>Musa<br/>31</b>    | 4/7*/8*                      | 0/0/0/0                       | 2-9/2-4/<br>9-2                | 3/4-9/<br>3-9*                | 9/9/6-2                      | ..                            | 9*/9-6*/<br>9                  | 9-3/8/<br>7-3                   | 4-8/4/9*                      | 0/0/0/0                      |
| <b>Ca-<br/>rumbé</b>  | 2-8/2-9/<br>2-8*             | 3*/0/0/0                      | ..                             | ..                            | 8/2-9                        | 9/9*                          | 8/9-2/6*                       | 3-9                             | 5-8-3*/<br>9*/9*              | 0/0/0                        |
| <b>Musa<br/>19</b>    | 2-8/3/5                      | 0/0/0                         | 0/0                            | 5-9/9/7                       | 9                            | 9*/9*                         | 9/8/3-9/<br>9                  | 0/0/0                           | 9/9                           | 0/0/0/9*                     |
| <b>Ambev<br/>328</b>  | 7/3-6/9                      | 0/0/0/0                       | 8*/9/9                         | 6/9/9-6                       | 9/9/9                        | 9/9/9*                        | 9/9/8/9                        | 0/0                             | ..                            | 3*/0/4*                      |
| <b>Ambev<br/>329</b>  | 9-2                          | 0/0/0                         | 0/0/2-6*                       | 4-2/5-9/<br>5-6/4-9           | 9/8                          | 6-9-3/<br>9/9*                | 9                              | 9-3/9-4*                        | 9/9                           | 2*/0/6*                      |
| <b>Ambev<br/>312</b>  | 2-7*/2/2                     | 0/0/0/0                       | 0/1*                           | 5/7                           | ..                           | 9*/9/<br>9-3*                 | ..                             | 9/8*                            | 9-4*/6                        | 0                            |

..: sin dato, \*: planta chica, /: separación entre plantas