

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

VARIABILIDAD PATOGENICA DE UNA POBLACIÓN URUGUAYA DE
Cochliobolus sativus EN CEBADA

por

Gabriel Alfonso REZZANO VINKERS

Philippe WYAUX SAAVEDRA

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2018

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. PhD. Fernanda Gamba

Ing. Agr. Agustín Giudice

Ing. Agr. Elisa Silvera Pérez (DSc.)

Fecha: 25 de junio de 2018

Autores: -----

Gabriel Alfonso Rezzano Vinkers

Philippe Wyaux Saavedra

AGRADECIMIENTOS

En nombre de los dos autores de la tesis, queremos agradecer a nuestras familias y seres queridos por el apoyo brindado durante este proceso. También a aquellas personas que colaboraron de alguna manera para poder realizar este trabajo. Por último, agradecemos a Fernanda Gamba por la buena energía y voluntad en la elaboración de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES.....	V
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. IMPORTANCIA A NIVEL MUNDIAL.....	2
2.2. IMPORTANCIA A NIVEL NACIONAL.....	3
2.3. CONDICIONES PREDISONENTES.....	4
2.4. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	4
2.5. CICLO BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD.....	5
2.6. RANGO DE HOSPEDEROS.....	6
2.7. SINTOMATOLOGÍA.....	7
2.8. BIOLOGÍA DEL PROCESO DE INFECCIÓN.....	9
2.9. ESPECIALIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL PATÓGENO.....	11
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
3.1. AISLAMIENTOS DE <i>Cochliobolus sativus</i>	14
3.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	16
3.3. GENOTIPOS DE CEBADA.....	16
3.4. PREPARACIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS.....	17
3.5. INOCULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	18
4. <u>RESULTADOS</u>	19
5. <u>DISCUSIÓN</u>	26
6. <u>CONCLUSIONES</u>	28
7. <u>RESUMEN</u>	29
8. <u>SUMMARY</u>	30
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	31
10. <u>ANEXOS</u>	37

LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1. Enfermedades causadas por <i>Cochliobolus sativus</i>	2
2. Distribución de <i>Cochliobolus sativus</i> en el mundo....	3
3. Estructuras reproductivas de <i>Cochliobolus sativus</i>	5
4. Ciclo biológico de <i>Cochliobolus sativus</i>	6
5. Escala de respuesta de infección en plántulas de cebada infectadas con <i>Cochliobolus sativus</i>	8
6. Escala de respuesta a la infección por <i>Cochliobolus sativus</i> en planta adulta para la interacción cebada- <i>Cochliobolus sativus</i>	9
7. Desarrollo de <i>Bipolaris sorokiniana</i> en cebada.....	10
8. Localidades de colecta de los 36 aislamientos de <i>Cochliobolus sativus</i>	14
9. Solución de conidios previo a la inoculación.....	16
10. Cámara de crecimiento con plantas huéspedes.....	18
11. Caracterización de 26 aislados de <i>Cochliobolus sativus</i> , como frecuencia de los diferentes tipos de respuestas de infección.....	21
12. Respuestas de infección de 27 cebadas frente a 26 aislados de <i>Cochliobolus sativus</i>	22
13. Promedio de respuestas de infección inducidas por 26 aislamientos de <i>Cochliobolus sativus</i> sobre 27 genotipos de cebada.....	22

14. Promedio de respuestas de infección de 27 genotipos de cebada.....	23
15. Escala propia de respuestas de infección.....	25

Tabla No.

1. Especies monocotiledóneas huéspedes de <i>Cochliobolus sativus</i>	7
2. Origen de los aislamientos monospóricos de <i>Cochliobolus sativus</i> , variedad de cebada muestreada, caracterización sanitaria, localidad, región y fecha de colecta.....	15
3. Nombre, origen y pedigree de 27 genotipos de cebadas utilizados en la caracterización patogénica de <i>Cochliobolus sativus</i>	17
4. Promedios de respuesta de infección de 27 genotipos de cebada inoculadas con 26 aislamientos de <i>Cochliobolus sativus</i>	20
5. Promedios y frecuencias de respuestas de infección (IR) de 17 genotipos de cebada inoculadas con 10 aislamientos De <i>Cochliobolus sativus</i>	24

1. INTRODUCCIÓN

La cebada en Uruguay es el segundo cultivo en importancia entre las opciones de invierno y el tercer cultivo de secano en cuanto a área (MGAP. DIEA, 2015). Las manchas foliares a hongos son una de las principales limitantes en el logro de rendimientos altos y estables a través de los años, dentro de la cual se destaca la mancha borrosa causada por *Cochliobolus sativus*. La frecuencia y severidad de esta enfermedad en nuestro país podrían explicarse por la carencia de materiales comerciales de buen comportamiento a la enfermedad, la presencia del inóculo en el sistema debido a los grandes volúmenes de rastrojo en superficie y la susceptibilidad del trigo (principal cereal de invierno en el país) a esta enfermedad. Los grandes volúmenes de rastrojo en superficie están explicados principalmente por la adopción de la técnica de siembra directa. La problemática sanitaria de la cebada es aún más importante por su incidencia en la calidad industrial de la malta.

El manejo sanitario integrado debe basarse en la complementación estratégica de medidas de manejo, entre las cuales se encuentran el uso de variedades resistentes, rotaciones con cultivos no hospederos y el correcto uso de fungicidas (Gamba, 2011).

Cochliobolus sativus presenta diversos perfiles de virulencia dependiendo del cultivar con el que interactúe. El reporte nacional más reciente realizado por Gamba y Estramil (2012) sugiere la existencia de altos y muy diversos perfiles de agresividad de los cuarenta y cuatro aislados de *C. sativus* utilizados. Dado que el comportamiento de las resistencias es afectado por las variantes patotípicas del patógeno, la dilucidación del rango de patotipos presentes en la población de *C. sativus* de Uruguay y la estructura poblacional del patógeno son relevantes para el desarrollo de resistencias durables.

El objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad patogénica de una colección de aislamientos nacionales de *Cochliobolus sativus* representativos de dos de las localidades más importantes del cultivo en Uruguay.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Bipolaris sorokiniana (forma teleomorfica: *Cochliobolus sativus*) es un hongo Ascomicete, clase Loculoascomicetes, orden Leosporales y familia Pleosporaceae. Dicho hongo es el agente causal de la mancha borrosa en hojas de trigo y cebada, punta negra en granos y podredumbre de raíz y corona (figura 1), siendo la mancha foliar la que causa mayores pérdidas de rendimiento (Almgren et al. 1999, Kumar et al. 2002). Se diferencia de otros miembros del género *Bipolaris* sobre la base de características morfológicas de conidióforos y conidiosporas. Una clave para distinguir especies de *Bipolaris* fue descrita por Subramanian (1971). Más tarde fue renombrado *Cochliobolus sativus* (Ito&Kuribayashi) Drechsler ex. Dastur, 1942 (Dastur,1942). Bajo condiciones naturales, el estadio perfecto se encontró en Zambia (Raemaekers, 1988).



A) Mancha borrosa en hojas de trigo y cebada. B) punta negra en granos. C) podredumbre de raíz. D) podredumbre de corona.

Figura 1. Enfermedades causadas por *Cochliobolus sativus*.

Fuente: Kumar et al. (2002).

2.1. IMPORTANCIA A NIVEL MUNDIAL

Cochliobolus sativus posee una amplia distribución geográfica en muchos países de Asia, América del Sur, Europa y América del Norte (Kwasna 1995, Pereyra 1996, Steffenson et al. 1996, Pratt 2003, Tekauz et al. 2003). Se han reportado pérdidas de rendimiento entre 7% y 40 % (Van Leur et al. 1997, Ghazvini y Tekauz 2004, Pereyra 2005). Por otra parte, Fetch y Steffenson (1994) reportan pérdidas de rendimiento en grano causadas por esta enfermedad entre 16 y 33% en variedades susceptibles de cebada. Es capaz de infectar una amplia gama de hospedantes siendo económicamente más importante en trigo y cebada (Mathre, 1997). Dado el progreso significativo que se ha logrado en la resistencia a la roya de la hoja, resultando en la ausencia de una gran epidemia de roya en los últimos años, la mancha se ha convertido en una limitación importante de producción en los sistemas de cultivo intensivo de

Asia del Sur, donde se afectan casi 12 000 000 ha (Nagarajan y Kumar 1998, Ruckstuhl 1998, Singh et al. 1998). Debido a los reemplazos de las variedades locales por genotipos de alto rendimiento y resistentes a la roya, la producción de trigo también se ve amenazada en algunas partes de China (Chang y Wu, 1998). El patógeno también ocurre en América del Norte y América Latina (Duczek y Jones-Flory, 1994), Brasil (Mehta et al., 1992) y, con mucha menos frecuencia, en algunas partes de Europa (Kwasna, 1995).



Figura 2. Distribución de *Cochliobolus sativus* en el mundo.

Fuente: tomado de Kumar et al. (2002).

El hongo está presente en zonas donde las condiciones climáticas son cálidas y húmedas (Este de India, Sureste de China, Sureste de Australia y Sureste de Brasil, Kumar et al., 2002).

2.2. IMPORTANCIA A NIVEL NACIONAL

La mancha borrosa en cebada representa una de las principales limitantes para obtener altos rendimientos y calidad de grano en los cultivos de cebada en Uruguay. Se han registrado mermas de 10 a 15 % en el rendimiento pudiendo llegar hasta el 40 % en aquellos casos en que la enfermedad ocurre antes de la espigazón, de esta forma al llegar al estado de grano lechoso la mayoría de las tres últimas hojas mueren. Estas pérdidas se dan tanto por la reducción en el peso como en el tamaño del grano (Pereyra, 1996).

2.3. CONDICIONES PREDISPONENTES

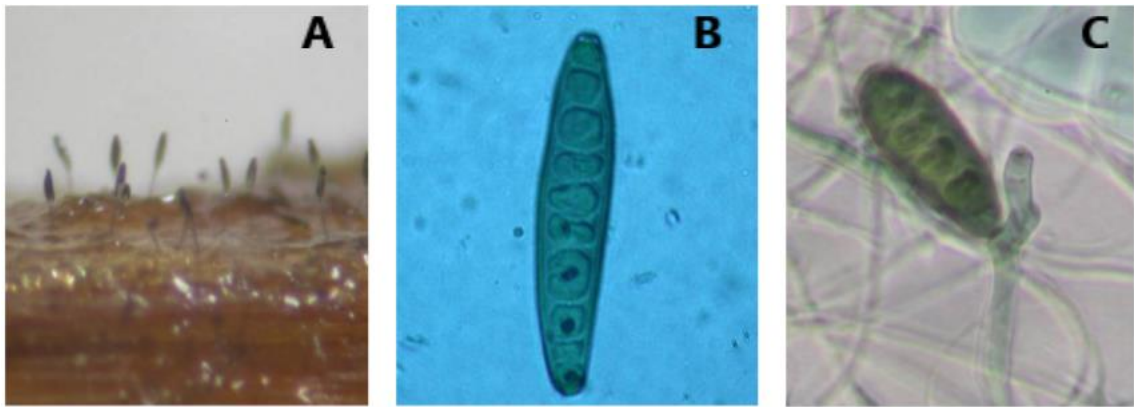
Pereyra et al. (2005) citan que las condiciones favorables para la infección foliar son temperaturas óptimas de 25 a 28 °C y al menos 24 horas de agua libre en la superficie de las hojas. Por otro lado, Kumar et al. (2002) reportan que la susceptibilidad al patógeno aumenta alrededor del estadio fenológico Zadoks 56 (Zadoks et al., 1974), que se corresponde con tres cuartos de la inflorescencia emergida. También mencionan que, en esta etapa, si las condiciones climáticas son favorables, es decir, lluvia continua durante 5-6 días seguido por temperaturas más cálidas (media diaria de 20-30 ° C), la epidemia puede desarrollarse muy rápidamente. Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la mancha borrosa durante una o dos semanas luego de la espigazón, las pérdidas en rendimiento de grano han sido de 10 a 20 %, mientras que, si estas condiciones persisten por tres o cuatro semanas, las mermas son del orden de 20 a 30% (Mathre, 1982). Aunque puede presentarse en estados tempranos del cultivo, la enfermedad se desarrolla generalmente en forma severa desde la espigazón en adelante, donde se presentan las temperaturas más favorables (Pereyra, 1996).

2.4. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

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

El patógeno en estudio, como todo ascomiceto, posee una fase asexual o imperfecta (*B. sorokiniana*) y otra sexual o perfecta (*C. sativus*). Las estructuras que se presentan en la fase asexual son denominadas conidióforos, es decir, estructuras que soportan esporas asexuales o conidios (figura 3). Los conidios se caracterizan por su forma elíptica (60-120 µm × 12-20 µm), paredes gruesas y presentar entre cinco a nueve células. Los conidios se consideran la principal estructura de infección y supervivencia del hongo y pueden permanecer viable por un período aproximado de dos años (Reis, 1984), siendo estas estructuras las causantes de las lesiones foliares iniciales en la primavera, desarrollándose mejor bajo condiciones de calor y humedad (Mathre 1982, Leoni 1996, Pereyra 1996). La fase sexual o teleomórfica (*C. sativus*), raramente se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, es posible favorecer su desarrollo y mantenimiento en condiciones de laboratorio (Zhong y Steffenson, 2002). *Cochliobolus sativus* es un hongo heterotálico, para la cual se han descrito dos tipos de apareamiento (mating types) denominados A y a. Por lo tanto, para el inicio de la fase sexual exitosa, núcleos haploides de hifas de tipo

de apareamiento A y a se fusionan y desarrollan pseudotecios, ascas y por meiosis ascosporas (Tinline, 1988).



A) Esporulación de *Bipolaris sorokiniana* en cámara húmeda. B) Conidio de *Bipolaris sorokiniana*. C) Conidióforo y formación de conidio.

Figura 3. Estructuras reproductivas de *Cochliobolus sativus*.

Fuente: tomado de MAPAMA (s.f.).

2.5. CICLO BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD

La mancha borrosa se desarrolla en hojas y vainas en todos los estados de desarrollo de la planta, si bien afecta de forma severa desde la espigazón en adelante, donde se presentan las temperaturas más favorables (Pereyra, 1996).

Las principales fuentes de inóculo son las semillas, las lesiones necróticas en plantas del cultivo, plantas voluntarias, residuos culturales de huéspedes y conidios durmientes en el suelo (figura 4, Pereyra, 1996). Stewart et al. (2005) mencionan que, en los últimos años con el desarrollo de prácticas conservacionistas de suelo como siembra directa, la fuente de inóculo más importante han sido los residuos de los cultivos en la superficie. Las infecciones iniciales en las hojas en primavera ocurren generalmente de conidios llevados por el viento producidos en el rastrojo de cebada, en el suelo o en otros huéspedes, bajo condiciones de temperaturas cálidas y alta humedad. Luego, con la ocurrencia de lluvias en la primavera se suceden los ciclos secundarios cada 10-14 días (Pereyra 1996, Pereyra et al. 2005).

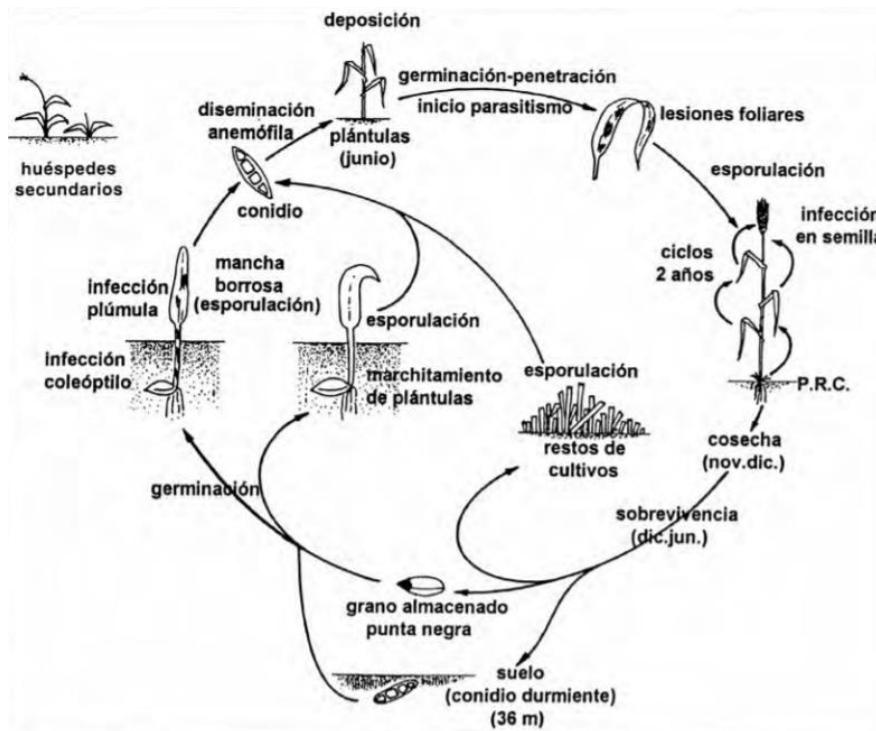


Figura 4. Ciclo biológico de *Cochliobolus sativus*.

Fuente: Pereyra (1996).

2.6. RANGO DE HOSPEDEROS

Cochliobolus sativus posee un amplio rango de hospederos. En la tabla 1 se resume, como ejemplo, el rango de hospedadores en plantas monocotiledóneas evaluadas en el Oeste de Hungría (Bakonyi et al., 1997). La enfermedad causada por este hongo probablemente reduce el rendimiento de trigo y cebada en áreas subtropicales más que cualquier otro patógeno (Zillinsky, 1983).

Tabla 1. Especies monocotiledóneas huéspedes de *Cochliobolus sativus*.

Monocotiledóneas Huéspedes

Cereales

Triticum aestivum

Secale cereale

Hordeum vulgare

Hordeum murinum

Avena sativa

Forrajeras

Agropyron pectinatum

Agropyron repens

Alopecurus pratensis

Beckmannia eruciformis

Bromus erectus

Bromus inermis

Dactylis glomerata

Festuca heterophylla

Festuca ovina

Lolium perenne

Pennisetum villosum

Poa pratensis

Setaria viridis

Fuente: Bakonyi et al. (1997).

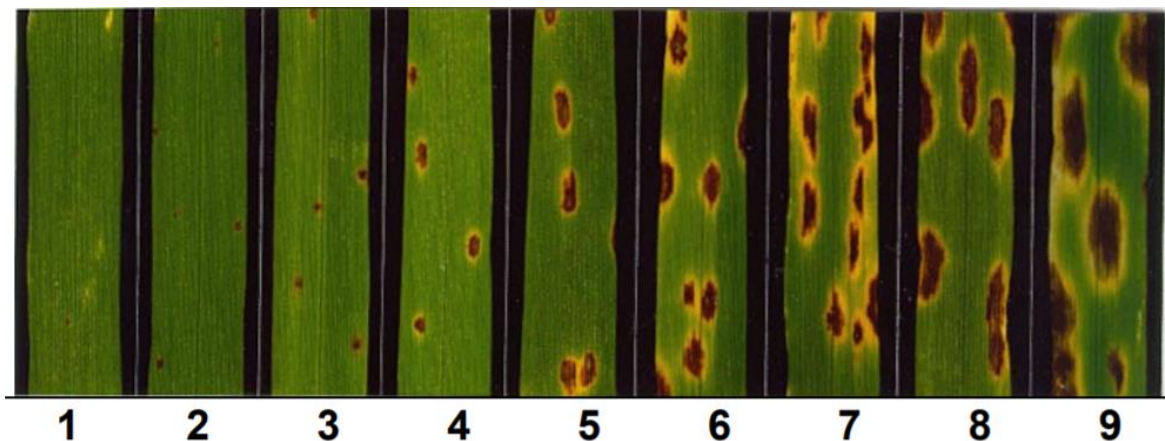
2.7. SINTOMATOLOGÍA

La mancha borrosa se desarrolla en hojas y vainas en todos los estados de desarrollo de la planta. 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. Los síntomas de la enfermedad suelen ser evidentes en las hojas de cebada como lesiones ovaladas necróticas rodeadas por halos cloróticos amarillos (Fetch y Steffenson, 1994). Estas lesiones dan como resultado la reducción del área fotosintética, pudiéndose llegar a la senescencia prematura de las hojas, así como la muerte de la planta.

La resistencia se evalúa a menudo en los estadios de plántula y planta adulta. Fetch y Steffenson (1999), a partir de una evaluación diversa de germoplasma de cebada y aislados de *C. sativus*, desarrollaron una escala del 1 al 9 (niveles de infección) basada en el tipo (presencia de necrosis y clorosis) y el tamaño relativo de las lesiones de mancha borrosa observadas en las segundas hojas de plántulas de cebada (figura 5). Los niveles de infección bajos consisten en lesiones necróticas pequeñas (0,3 a 1,3 mm y 0,3 a 0,7 de largo y ancho respectivamente) con clorosis marginal difusa o muy pequeña,

mientras que los intermedios consisten en lesiones necróticas de tamaño mediano (1,4 a 3,9 mm de largo y 0,7 a 1,3 mm de ancho) con un margen clorótico distinto pero restringido. En tanto los niveles de infección altos consisten en lesiones necróticas grandes (4 a 8 mm y 1,4 a 3,2 de largo y ancho respectivamente) con márgenes cloróticos distintos y grados variables de clorosis difusa en expansión. Los nueve niveles de infección fueron clasificados por Fetch y Steffenson (1999) en tres categorías generales de bajo (1 a 3), intermedio (4 y 5), y alta (6 a 9) compatibilidad con el huésped de parásito.

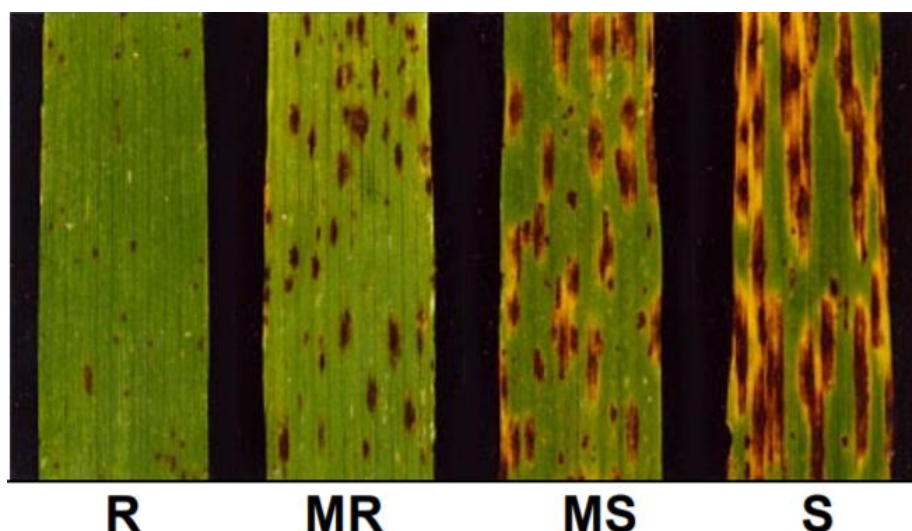
En cuanto a la evaluación en planta adulta, desarrollaron una escala de niveles de infección de cuatro plantas (R=resistente, MR= moderadamente resistente, MS=moderadamente susceptible y S=susceptible) basada en el tipo y tamaño relativo de las lesiones presentes en las hojas (figura 6).



Los niveles se basaron en el tipo (presencia de necrosis y clorosis) y el tamaño relativo de las lesiones observadas en las segundas hojas de las plántulas de cebada.

Figura 5. Escala de respuesta de infección en plántulas de cebada infectadas con *Cochliobolus sativus*.

Fuente: tomado de Fetch y Steffenson (1999).



R=resistente, MR=moderadamente resistente, MS=moderadamente susceptible y S=susceptible.

Figura 6. Escala de respuesta a la infección por *Cochliobolus sativus* en planta adulta para la interacción cebada-*Cochliobolus sativus*.

Fuente: tomado de Fetch y Steffenson (1999).

2.8. BIOLOGÍA DEL PROCESO DE INFECCIÓN

Como patógeno hemibiotrófico, *Bipolaris sorokiniana* posee una fase de crecimiento biotrófica seguida por una necrotrófica. El análisis microscópico del desarrollo del hongo en las hojas de un cultivar de cebada susceptible (cv. Ingrid) ha mostrado claramente las distintas fases de crecimiento sucesivas caracterizadas por: (i) penetración de la cutícula y pared celular, seguida por el desarrollo de hifas dentro de la célula huésped epidérmica viva invadida (fase biotrófica, figura 7C); y ii) invasión de hifas en la capa de mesófilo, acompañada de muerte celular epidérmica y mesofílica (fase necrotrófica) (figura 7D). Rara vez el patógeno penetra a través de las estomas (figura 7E). El colapso celular es provocado por la secreción de toxinas porque las células mueren sin contacto directo con las hifas de hongos y la infiltración de toxinas en las hojas provoca una respuesta necrótica indistinguible del huésped (Kumar et al., 2001).

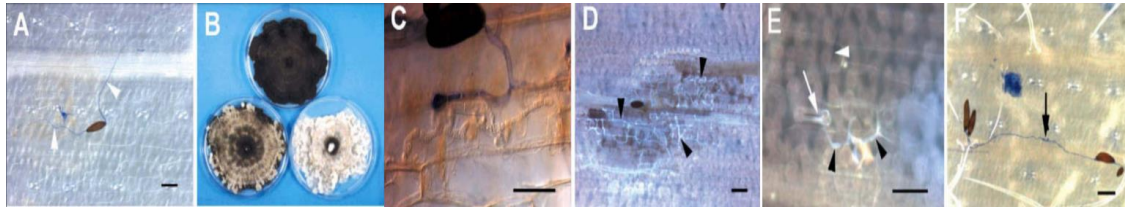


Figura 7. Desarrollo de *Bipolaris sorokiniana* (forma teleomórfica: *Cochliobolus sativus*) en cebada.

Fuente: tomado de Kumar et al. (2002).

Existiría una correlación positiva entre la susceptibilidad del huésped a mancha borrosa y la cantidad de H₂O₂ producida en las lesiones foliares. Esta hipótesis está de acuerdo con informes anteriores que demostraron la asociación del crecimiento exitoso de los patógenos necrotróficos *Botrytis cinerea* y *Sclerotium sclerotiorum* con la producción de H₂O₂ por la planta huésped (Govrin y Levine, 2000). La acumulación de peróxido de hidrógeno, la formación de papilas y la muerte celular hipersensible son respuestas tempranas bien conocidas de defensa de plantas a patógenos biotróficos, como por ejemplo *Blumeria graminis* (Görlach et al. 1996, Thordal-Christensen et al. 1997). Por lo tanto, en las primeras etapas de la interacción, la cebada parece ejercer mecanismos de defensa similares que son eficaces contra los patógenos hemibiotróficos y biotróficos.

Existen varios estudios sobre la presencia de toxinas, siendo las más estudiadas las de la familia helminthosporal. Estas toxinas afectan la permeabilidad de la membrana, inhibiendo así la fosforilación oxidativa mitocondrial, la fotofosforilación en los cloroplastos y el bombeo de protones a través de la membrana plasmática. Los datos sugieren que las toxinas actúan como desacopladores clásicos a través de una interacción específica con un receptor en la membrana del huésped (Kumar et al., 2002).

Existen en estos organismos mecanismos que generan variabilidad genética además de la reproducción sexual. Entre ellos se encuentra la heterocariosis y el parasexualismo. Dado que existe un único reporte de la fase sexual (*Cochliobolus sativus*) en Zambia (Raemaekers, 1988), y no ha sido encontrada en otra área en la que el patógeno prevalece, se podría pensar que la variabilidad está generada principalmente por los procesos semejantes a la sexualidad mencionados anteriormente. De acuerdo con Agrios (2011): "El parasexualismo es el proceso mediante el cual pueden producirse recombinaciones genéticas dentro de los heterocariones de los hongos. Esto sucede debido a la fusión ocasional de los dos núcleos y la formación de un núcleo diploide. Durante la multiplicación se produce entrecruzamiento en

algunas divisiones mitóticas y, como consecuencia, aparecen recombinantes genéticos por la separación fortuita del núcleo diploide en sus componentes haploides”.

En poblaciones asexuales de hongos patógenos de plantas, los aislamientos del mismo patotipo pueden tener mayor similitud genética que aislamientos de diferente patotipo dada su reproducción clonal (Burdon et al., Levy et al., citados por Zhong y Steffenson, 2001). Levy et al. (1993) encontraron que en *Magnaporthe grisea* (un hongo que se reproduce asexualmente en la naturaleza) aislamientos genéticamente relacionados en la base de marcadores moleculares, también lo estaban en virulencia. Sin embargo, en un estudio realizado por Zhong y Steffenson (2001) reportan baja correlación entre virulencia y marcadores moleculares AFLP en aislamientos de *C. sativus*. Esto podría deberse a la ocurrencia de recombinación parasexual, que ha sido demostrado que ocurre en *C. sativus* in vitro (Tinline, 1988).

2.9. ESPECIALIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL PATÓGENO

En el estudio de la especialización fisiológica de un patógeno se distinguen tres conceptos importantes: patogenicidad, virulencia y agresividad. La patogenicidad se refiere a la capacidad o incapacidad de un microorganismo para producir enfermedad. La virulencia indica el grado de patogenicidad de un patógeno. Ambos caracteres no dependen únicamente del genotipo del patógeno sino también del genotipo del hospedero (Shaner et al., 1992). En cuanto a la agresividad, Bos y Parlevliet (1995) la describieron como el grado en que un patógeno puede atacar un organismo y Andrivon (1993) definió la agresividad como las interacciones cuantitativas e inespecíficas entre los aislamientos de patógenos y los genotipos del huésped.

Existen diversos antecedentes a nivel mundial que reportan diferencias en virulencia de poblaciones locales de *C. sativus*. El primer estudio que reportó especialización fisiológica entre aislados fue Christensen (1926), quien demostró que los aislados fúngicos variaban considerablemente en virulencia al trigo y a la cebada. Nelson, citado por Kumar et al. (2002), encontró diferentes tipos de reacción en especies forrajeras al utilizar como inóculo las progenies de cruas entre aislamientos que mostraron diferente nivel de virulencia. De acuerdo con estos resultados, el carácter virulencia tendría una herencia compleja, determinada por muchos genes. Posteriormente Valjavek-Gratian y Steffenson (1997) identificaron tres patotipos de una colección de 36 aislados de North Dakota (EE.UU.) sobre la base de fenotipos de la infección con tres cebadas diferenciales. Fetch y Steffenson (1994) compararon el patrón de virulencia de dos aislados de *C. sativus*, de origen en North Dakota sobre cinco genotipos de cebada. Los aislamientos ND90Pr y ND85F exhibieron patrones

de virulencia diferencial en los genotipos de cebada ND5883, ND12437, ND12720, ND12721 y Bowman. El aislamiento ND90Pr presentó alta virulencia en ND12720, ND12721 y Bowman, y baja virulencia en ND5883 y ND12437. Por el contrario, el aislado ND85F presentó alta virulencia en ND5883 y ND12437 y baja virulencia en ND12720, ND12721 y Bowman. Ambos aislamientos expresaron baja virulencia en el genotipo NDB112, la principal fuente de resistencia a *C. sativus* en el germoplasma comercial de cebada de seis hileras. Estudios posteriores realizados con un grupo de 34 aislados australianos, identificaron seis patotipos usando un grupo de 20 cultivares de cebada (Meldrum et al., 2004). Tekauz (2002) encontró virulencia diferencial en cuatro aislamientos canadienses estudiados en 19 cebadas al estadio de plántula y de planta adulta. En Siria, Arabi y Jawar (2004) reportaron la presencia de tres grupos de virulencia en 11 aislados con 10 cebadas diferenciales. Ghazvini y Tekauz (2008), utilizando 127 aislamientos de *B. sorokiniana* de los cuales 92 fueron colectados en Canadá (Manitoba, Saskatchewan, Alberta, Ontario y Quebec) y los 35 restantes provenientes de Australia, Uruguay, Polonia, Brasil, Estados Unidos y México, un juego de 12 genotipos diferenciales de cebada y la nomenclatura de tripletas (Limpert, 1994), reportaron ocho grupos de virulencia de *C. sativus*. Estos ocho grupos a su vez se agruparon de acuerdo a su nivel de agresividad en tres grupos mayores o clusters definidos por baja virulencia o agresividad (0.0.0.0), virulencia diferencial (6.0.0.0) y virulencia con niveles variados de agresividad (6.3.5.0, 7.7.5.1, 7.7.7.5, 7.7.5.4, 5.7.4.0 y 5.7.0.0). Entre ellos, se destaca la identificación de los grupos de virulencia 7.7.7.5 y 7.7.5.1 los cuales fueron altamente virulentos sobre los genotipos de seis hileras de América del Norte, considerados hasta el 2008 con resistencia durable, entre ellos NDB112. Sin embargo, uno de los grandes aportes de este trabajo fue poner en duda la utilidad del método clásico de designación de patotipos tal como se utiliza en la mayoría de los hongos biotróficos. Lo que plantean estos autores es la importancia de considerar la variación en virulencia presente entre aislamientos de cada patotipo, más allá de que la población de *B. sorokiniana* pueda ser clasificada en diferentes patotipos. Proponen el término agresividad para describir el rango continuo de virulencia presente entre aislamientos de cada patotipo. De esta forma proponen que el sistema gen por gen probablemente no sea el principal operando en el patosistema *H. vulgare*-*B. sorokiniana*.

Un estudio reciente con aislamientos de *C. sativus* de Dakota del Norte (Gyawali, 2010) utilizando 12 genotipos diferenciales reportó cuatro grupos de virulencia, en donde dos de ellos, los grupos 7.7.3.6 y 7.3.3.6, similar a la virulencia reportada por Ghazvini y Tekauz (2008), también causaron síntomas severos de mancha borrosa en NDB112.

Por su parte Knight et al. (2010) estudiando la variabilidad patogénica de 31 aislamientos de *C. sativus* en 12 genotipos de cebada de Australia, reportaron 11 patotipos los cuales se agruparon en tres grupos mayores de patogenicidad, PC1: baja patogenicidad, PC2: alta patogenicidad y PC3: patogenicidad intermedia.

En el primer estudio exploratorio realizado en Uruguay, se sugirió la existencia de tres perfiles de virulencia diferencial, en un grupo de 37 aislados y 15 genotipos de cebada (Gamba et al., 2000). Trabajos posteriores encontraron tres cebadas uruguayas que permitieron distinguir dos grupos de virulencia diferencial, entre 30 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 26 aislados uruguayos que fueron inoculados en las tres cebadas diferenciales (ND5883, Bowman y NDB112) usadas por Valjavec-Gratian y Steffenson (1997). Se identificaron dos grupos de aislados, uno de igual comportamiento al patotipo 1 y el otro al patotipo 2. No se encontró ningún aislado con patrón de virulencia similar al patotipo 0 (Gamba y Estramil, 2002). Posteriormente Gamba et al. (2010) sugirieron la existencia de una alta variabilidad de la población local de *C. sativus*, así como niveles muy bajos de resistencia genética de la cebada. Estos datos fueron consistentes con una alta variabilidad genética de los aislados locales detectada con marcadores moleculares RAPDs (Pritsch et al., 2006).

En el trabajo nacional más reciente realizado por Gamba y Estramil (2012), se evaluó la diversidad en agresividad de 44 aislados de *C. sativus* en 28 genotipos de cebada. Se identificaron ocho aislados que solamente indujeron respuestas de infección indicativas de una alta compatibilidad hospedante-parásito, pero diferentes entre sí considerando los otros dos tipos de respuestas de infección. El nivel de resistencia de las cebadas varió entre 63,6% y 0% con un importante rango de comportamientos diferentes frente a este grupo de aislados. Estos resultados indicarían la existencia de altos y muy diversos perfiles de agresividad de estos aislados de *C. sativus*. Se destacó la alta variabilidad intrínseca de la interacción entre los aislados y las cebadas estudiadas.

Una caracterización más completa de la composición de la población de *C. sativus* permitiría el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético con el fin de obtener cultivares de cebada con resistencia genética más efectiva y durable, ya que es la medida de control económica y ambientalmente más efectiva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTOS DE *C. sativus*

Los aislamientos monospóricos se obtuvieron a partir de trozos de 15-20 mm de hojas con síntomas de mancha borrosa colectadas en el campo, y de hojas inoculadas con aislamientos conocidos. Las muestras de campo se colectaron de diferentes variedades de cebada procedentes de dos localidades de cultivo en Uruguay: Colonia y Río Negro (figura 8). Las muestras, luego de ser desecadas y esterilizadas superficialmente (alcohol (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito (2%) por 15 segundos, y enjuague final con agua esterilizada), se colocaron en placas de Petri de 9 cm con papel de filtro humedecido. La esporulación fue promovida incubándolas por 2-3 días a 21 °C, luego de lo cual, cada conidio fue transferido a una placa de petri conteniendo medio sólido PDA (15 g de Potato Dextrose Agar Oxoid CM0139, 3 g de Ca CO₃ y 1 L de agua estéril). Las placas se incubaron a 23°C con un régimen de 12h /12h, luz/oscuridad durante 7 días.



Figura 8. Localidades de colecta de los 36 aislamientos de *Cochliobolus sativus*.

Tabla 2. Origen de los aislamientos monospóricos de *Cochliobolus sativus*, variedad de cebada muestreada, caracterización sanitaria, localidad, región y fecha de colecta.

<u>Aislamiento</u>	<u>Cv muestreado</u>	<u>C. Sanitaria***</u>	<u>Localidad</u>	<u>Fecha de colecta</u>
12.10.1	Kalena	s/i	Parcela Exp. INIA Young	2012
12.11.1	KWS Bambina	Intermedio-Alto	Parcela Exp. INIA Young	2012
17.01.1	CLE 307	s/i	EELE**	2017
17.01.2	CLE 307	s/i	EELE**	2017
17.01.4	CLE 307	s/i	CCLC**	2017
17.01.5	CLE 307	s/i	EELE**	2017
17.03.2	Sin Dato	s/i	EELE**	2017
17.07.3	CI F 232	Intermedio-Bajo	FFI F**	2017
17.07.4	CLE 232	Intermedio-Bajo	EELE**	2017
17.09.1	MUSA 936	Intermedio-Alto	EELE**	2017
17.10.1	CLE 267	Alto	EELE**	2017
17.34.1	MOSA 13-113 C/F*	s/i	Young	2017
17.35.1	CLE 306 C/F*	s/i	Young	2017
17.38.2	CLE 282	Intermedio Alto	Young	2017
17.39.1	MOSA 12-143 C/F*	Intermedio-Bajo	Young	2017
17.39.3	MOSA 12-143 C/F*	Intermedio-Bajo	Young	2017
17.40.1	MOSA 14-36	s/i	Young	2017
17.40.2	MOSA 14-36	s/i	Young	2017
17.41.1	Sin dato	s/i	Young	2017
17.41.2	Sin dato	s/i	Young	2017
17.41.3	Sin dato	s/i	Young	2017
17.44.4	CLE 304	s/i	Young	2017
17.51.1	CI F 316 C/F*	s/i	Young	2017
17.51.2	CLE 316 C/F*	s/i	Young	2017
17.54.3	INIA Arrayán C/F*	Intermedio	Young	2017
17.57.1	Sin dato	s/i	Young	2017
17.57.2	Sin dato	s/i	Young	2017
17.57.3	Sin dato	s/i	Young	2017
17.58.1	PGWS 18 A171	s/i	Young	2017
17.58.2	PGWS 18-A171	s/i	Young	2017
17.58.7	PGWS 18-A171	s/i	Young	2017
17.62.1	CLE 314 C/F*	s/i	Young	2017
17.62.2	CLE 314 C/F*	s/i	Young	2017
17.62.3	CLE 314 C/F*	s/i	Young	2017
17.63.1	Sin dato	s/i	Young	2017
17.63.2	Sin dato	s/i	Young	2017

* Con Fungicida ** Estación Experimental La Estanzuela *** Fuente: Castro et al., 2018
s/i: Sin Información

Fuente: adaptado de Castro et al. (2018).

3.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Previo a la preparación del inóculo se procedió a multiplicar el mismo colocando 4-6 trozos de la colonia en diferentes placas de Petri conteniendo el mismo medio e incubándolos en las mismas condiciones anteriores por 6-8 días. Los conidios producidos fueron colectados raspando la colonia superficialmente con agua destilada estéril, procesados en una licuadora (con el fin de desagregar los mismos) y luego filtrados con gasa a los efectos de eliminar el micelio del hongo. La concentración se ajustó a 5000 conidios/ml de acuerdo al protocolo utilizado por Fetch y Steffenson (1999) usando un hematocitómetro Hauser Scientific Horsham. Para asegurar una completa dispersión del inóculo se agregó a esta solución 25 ml de Tween 20 (polioxietileno-20-sorbitán) cada 250 ml. En la figura 9 se observa la solución de conidios previo a la inoculación.



Figura 9. Solución de conidios previo a la inoculación.

3.3. GENOTIPOS DE CEBADA

Tabla 3. Nombre, origen y pedigree de 27 genotipos de cebadas utilizados en la caracterización patogénica de *Cochliobolus sativus*.

<u>Material</u>	<u>Origen</u>	<u>Pedigree</u>
CLHO 6311	Alemania	Collected in Germany 1937.
Delta	Holanda	Kenia //H. laevigatum / Gull
Gilbert	Qld, Australia	Armelle / Lud // Luke
I. Ceibo	Uruguay	FNCI 22/Defra
Conlon	N. Dakota, USA	Bowman*2/Brigitta mutant//ND10232
N. Daymán	N. Dakota, USA	ND7015 // TR215 / Bowman sib /3/ ND7085 / Bowman sib
NDB 112	N. Dakota, USA	selection from Kindred CI 6969/CI 7117-77
ND 5883	N. Dakota, USA	Clipper /6/ Betzes // Clho 5791 /2* Parkland /3/ Betzes / Piroline /4/ Akka /5/ Centennial
ND 17293	N. Dakota, USA	ND14651/ND15062
Perún	República Checa	HE 1728 / Karat
Skiff	SA, Australia	Abed Deba /3/ Proctor / CI 3576 // GPI 18197 / Beka /4/ Clipper / Diamant // Proctor / CI 3576
Stirling	WA, Australia	Dampier // A14 Prior / Ymer /3/ Piroline
Tolar	República Checa	HE-4710/HWS-78267-83
Blondie	Uruguay	-
I. Timbó (CLE 232)	Uruguay	-
MOSA 12-273	Uruguay	-
Arcadia (CLE 267)	Uruguay	-
I. Cronos (CLE 280)	Uruguay	-
MUSA 936	Uruguay	-
Grace	Uruguay	-
Umbrella	Uruguay	-
Explorer	Uruguay	-
N. Carumbé	Uruguay	-
MOSA 09-312	Uruguay	-
MUSA 31	Uruguay	-
AMBEV 306	Uruguay	-
MOSA 12-53	Uruguay	-

Veintisiete genotipos de cebada con diferentes niveles de resistencia a mancha borrosa fueron utilizados para evaluar la variabilidad patogénica de *C. sativus*. Los primeros 13 materiales presentados en la tabla 3 corresponden a genotipos propuestos para un set diferencial internacional, mientras que los restantes 14 materiales son variedades comerciales utilizados en Uruguay.

3.4. PREPARACIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS

Las cebadas se sembraron dos semanas antes de la inoculación, en macetas de 10 cm de diámetro con una mezcla en proporciones 1:1 tierra/arena. Las macetas permanecieron en una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperiodo de 18h y 70 % de humedad relativa. Los 27 genotipos se plantaron a razón de cuatro genotipos por maceta. Se sembraron cuatro semillas por genotipo. A continuación, se observa la cámara de crecimiento con las plantas huéspedes (figura 10).



Figura 10. Cámara de crecimiento con plantas huéspedes.

3.5. INOCULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La inoculación se realizó en estado de plántula (Z 1.2, Zadoks et al., 1974) con un atomizador a presión constante de 10 lb/in², posteriormente las plántulas permanecieron a 100% de humedad relativa y oscuridad, transcurridas 18 h fueron regresadas a las condiciones anteriores. Los niveles de respuesta de infección (RI) fueron registrados 5-7 días post-inoculación con la escala cualitativa de Fetch y Steffenson (1999) en cada una de las 4 plántulas por cada genotipo de cebada. El análisis cualitativo se basó en el tipo (presencia de necrosis y clorosis) y el tamaño relativo de las lesiones de mancha borrosa observadas en las segundas hojas de plántulas de cebada. Se calculó el promedio de RI para cada combinación aislamiento-cebada. Posteriormente con la información de las RI promedio se procedió a la elaboración de gráficas con su correspondiente desvío estándar.

4. RESULTADOS

Los resultados se dividen en dos experimentos debido a que en uno de ellos se utilizó una menor cantidad de genotipos. Se procedió de esta manera a los efectos de realizar un análisis más preciso.

Los resultados del experimento 1 aparecen en la tabla 4 en el cual los aislamientos y las cebadas fueron ordenados de manera decreciente de las respuestas de infección (RI) altas hasta bajas.

Los aislados 17.41.3 y 17.44.4 fueron los menos agresivos sobre el mayor número de cebadas, ya que exhibieron 91.3% y 95% respectivamente, de las RI correspondientes a un bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito (figura 11).

Los aislados 17.39.3 y 17.41.2 presentaron únicamente RI alta, siendo el 100% de las cebadas estudiadas susceptibles a dichos aislamientos.

Se identificaron 7 aislados con ausencia de RI de baja compatibilidad, pero diferentes entre sí teniendo en cuenta los otros dos tipos de reacción.

Los aislados que mostraron menor agresividad fueron los siguientes: 17.41.3, 17.44.4, 17.54.3 y 17.10.2 que indujeron RI bajas en una frecuencia desde 91.3% a 30%. Entre los aislados más agresivos que solo indujeron respuestas de infección altas e intermedias se encontraron los siguientes: 17.34.1, 17.39.1, 17.40.1, 17.41.2, 17.51.1, 17.57.3 y 17.58.7. Estos resultados aparecen en las figuras 11 y 13 e indicarían la existencia de altos y muy diversos perfiles de agresividad de estos aislados de *C. sativus*.

Tabla 4. Promedios de respuesta de infección (RI) de 27 genotipos de cebada inoculadas con 26 aislamientos de *Cochliobolus sativus*.

Cebadas	17.39.3	17.58.7	17.41.2	17.41.1	17.63.2	17.40.1	17.39.1	17.40.2	17.63.1	17.51.1	17.34.1	17.62.3	17.58.1	17.62.2	17.38.2	17.57.1	17.57.3	17.56.2	17.62.1	17.35.1	17.57.2	17.51.2	17.54.3	17.40.1	17.44.4	17.41.3	MEDIA	R	
Grace	80	88	87	88	80	80	73	80	80	75	88	80	70	80	88	60	47	87	99	65	83	78	85	73	40	30	7.7		
MOSA 08-312	87	85	80	88	88	60	80	90	SD	70	75	SD	90	80	80	60	83	80	90	75	80	75	SD	40	67	25	7.6		
Umbrela	88	85	83	88	80	83	80	73	85	85	88	75	85	SD	80	65	75	83	90	73	78	53	87	70	38	38	7.6		
MOSA 12-83	87	85	77	90	SD	SD	SD	88	80	70	70	SD	75	83	SD	SD	67	80	85	58	85	SD	60	40	35	SD	7.4		
Explorer	80	87	85	87	90	85	70	87	83	80	77	77	88	85	70	80	50	65	73	70	83	67	73	35	70	25	7.4		
MOSA 12-273	87	90	85	SD	83	80	SD	SD	80	75	75	87	80	65	SD	SD	50	SD	90	77	83	67	SD	53	25	48	7.3		
Strifing	80	80	80	80	87	87	87	85	83	60	63	77	SD	73	80	80	65	88	70	53	80	60	27	40	SD	25	7.2		
ND 17293	90	90	SD	SD	83	85	67	90	SD	70	63	70	SD	SD	SD	SD	55	80	SD	SD	53	75	SD	20	20	20	6.5		
MUSA 306	85	60	80	85	88	80	75	75	78	75	80	70	60	47	SD	40	60	65	43	53	30	50	77	50	20	20	6.2		
Tolar	90	90	85	88	63	75	80	85	80	55	83	88	80	50	80	85	33	28	28	28	53	38	60	45	35	15	10	6.2	
Arcadia (CLE 267)	88	80	80	70	80	85	58	63	68	70	43	73	55	73	58	65	57	37	68	48	33	57	60	30	30	13	6.0		
N. Daymán	90	80	88	85	65	78	83	80	70	68	58	75	47	40	55	60	50	43	50	45	38	38	50	38	25	13	5.8		
I. Timbo (CLE 232)	80	68	80	75	80	75	53	65	53	60	48	35	55	80	50	23	50	75	35	48	38	60	37	SD	17	10	5.4		
MUSA 31	83	SD	73	60	65	63	68	73	70	SD	53	60	43	35	55	33	80	27	45	45	40	40	35	35	17	10	5.0		
Gilbert	65	SD	75	60	SD	SD	67	SD	75	55	53	SD	45	SD	43	73	SD	SD	40	43	SD	15	35	35	SD	13	5.0		
AMBEV 306	SD	90	57	65	75	65	SD	SD	53	35	55	65	40	70	60	30	SD	40	30	50	40	SD	43	37	15	15	4.9		
I. Celibo	85	80	67	48	50	45	50	48	63	45	73	63	38	53	20	70	40	53	38	53	47	40	17	35	15	20	4.8		
Perun	67	80	75	45	SD	40	73	35	60	38	60	80	45	SD	55	43	80	25	28	50	30	30	20	40	SD	13	4.8		
Skiff	70	75	75	50	67	SD	70	60	40	SD	37	45	SD	40	58	80	35	25	20	30	33	SD	SD	25	17	SD	4.8		
CLHO 8311	83	80	68	40	45	37	SD	55	45	SD	68	45	55	57	40	70	40	45	50	20	43	SD	SD	23	13	18	4.7		
Delta	SD	88	SD	58	55	SD	53	SD	SD	60	55	73	37	60	SD	SD	35	35	43	25	35	45	25	30	20	SD	4.6		
Blondie	73	SD	55	68	57	40	38	40	40	35	38	30	48	57	60	23	43	SD	37	43	28	40	30	63	17	10	4.2		
Conlon	SD	75	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	40	35	SD	25	40	SD	15	4.1			
I. Cronos (CLE 280)	60	SD	SD	55	SD	SD	SD	SD	SD	SD	43	SD	SD	SD	45	SD	65	20	SD	35	SD	15	30	40	SD	15	3.9		
N. Carumbé	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	40	SD	SD	SD	SD	35	SD	30	SD	10	3.4		
ND 5883	83	38	55	40	33	33	40	25	33	SD	45	23	15	30	33	38	43	15	15	37	20	15	38	40	10	10	3.2		
NDB 112	55	35	SD	SD	27	SD	SD	35	25	SD	SD	20	SD	SD	SD	15	SD	20	13	SD	13	SD	SD	SD	SD	SD	2.6		
MEDIA	8.1	7.9	7.6	7.0	7.0	6.8	6.6	6.5	6.4	6.2	6.2	6.1	6.0	5.9	5.8	5.5	5.4	5.1	5.0	4.9	4.8	4.8	4.6	4.0	2.6	1.8			

sin dato (SD) de acuerdo a la escala de Fitchy Steffenson (1989). Los tipos de infección entre 1 y 3 son indicativos de bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito, los tipos de infección 4 y 5 de nivel intermedio y los tipos de infección entre 6 y 9 son indicativos de alto nivel de compatibilidad hospedante-parásito.

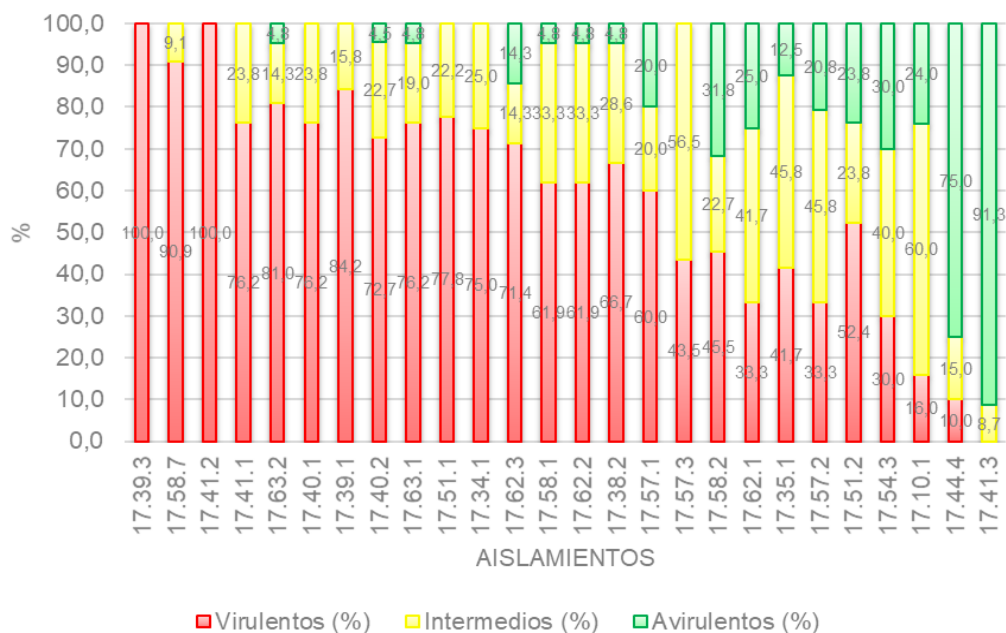


Figura 11. Caracterización de 26 aislados de *Cochliobolus sativus*, como frecuencia de los diferentes tipos de respuestas de infección.

En cuanto al comportamiento de las cebadas, el nivel de resistencia varió entre 70% (NDB112), resistente al mayor número de aislamientos y 0% (Umbrella y MOSA 12-53). Los otros materiales presentaron un importante rango de comportamientos diferentes frente a este grupo de aislamientos (figura 12).

Las cebadas que mostraron el mejor comportamiento fueron NDB 112 con frecuencias de RI de 70%, 20% y 10% (bajas, intermedias y altas respectivamente), y ND 5883 cuyas frecuencias de respuestas de infección fueron 40%, 52% y 8% (bajas, intermedias y altas respectivamente). En el otro extremo, se destacaron los cultivares Umbrella y MOSA 12-53 porque no solo no exhibieron ninguna RI baja, sino que mostraron la mayor frecuencia de RI alta (92% y 89.5% respectivamente). Además de los dos cultivares mencionados anteriormente, entre el grupo de las cebadas de peor comportamiento se encontraron los siguientes materiales: N. Daymán, ND 17293, Stirling, Tolar, I. Timbó (CLE 232), Arcadia (CLE 267), MUSA 936, Grace, Explorer, MOSA 09-312 y MOSA 12-273. Las frecuencias de las RI bajas de este grupo de cebadas variaron desde 3.8% a 17.6%; las respuestas intermedias fueron desde 0% a 38.5% mientras que las respuestas altas variaron desde 53.8% a 91.3%.

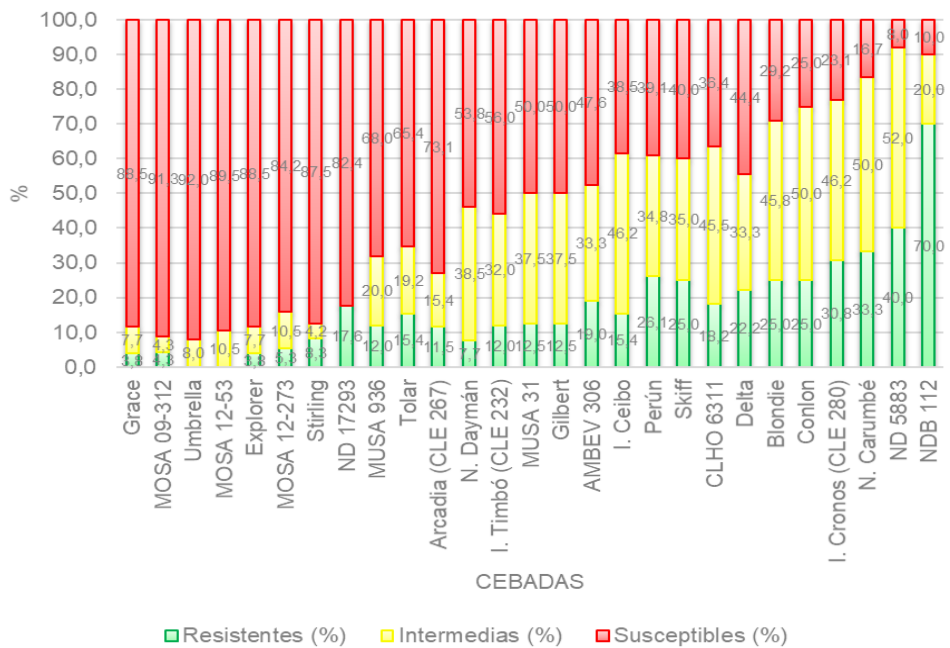
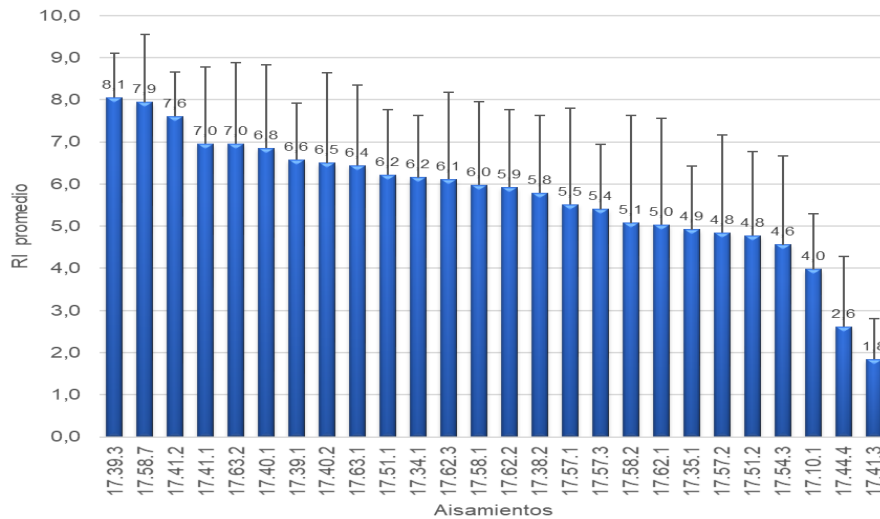


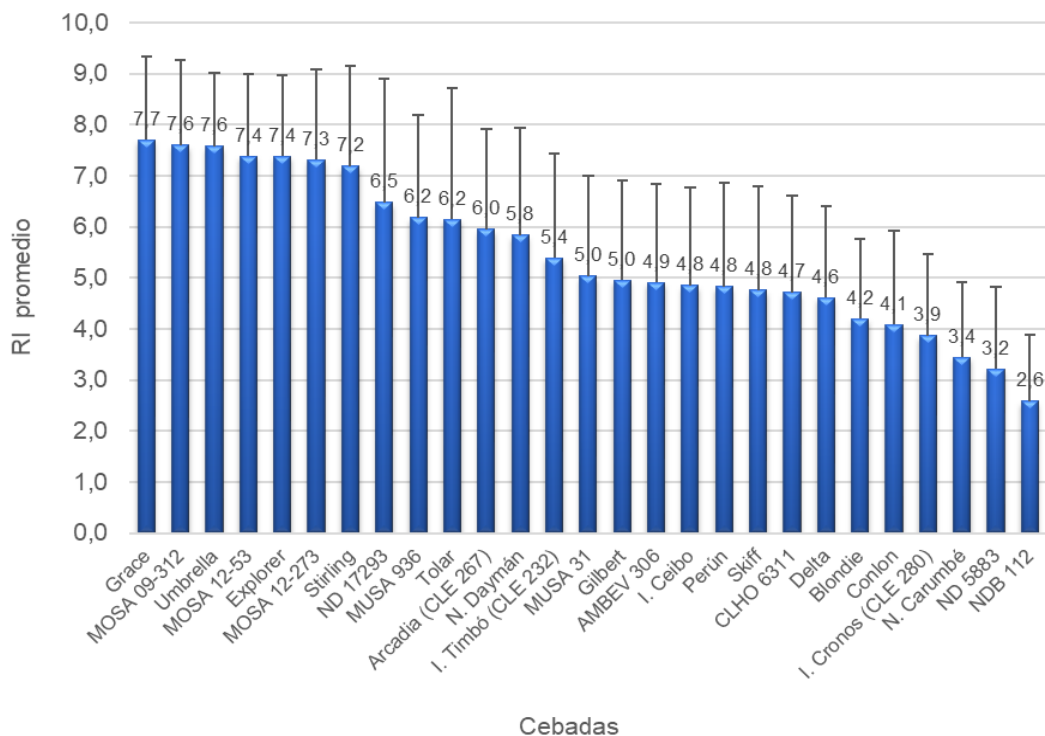
Figura 12. Respuestas de infección de 27 cebadas frente a 26 aislados de *Cochliobolus sativus*.



Las barras representan el desvío estándar.

Figura 13. Promedio de Respuestas de infección inducidas por 26 aislamientos de *Cochliobolus sativus* sobre 27 genotipos de cebada.

Los valores promedio de RI variaron entre 1.8 y 8.1, siendo el menos agresivo el aislamiento 17.41.3 y el más agresivo el 17.39.3 (tabla 4 y figura 13). Los resultados fenotípicos presentaron una baja variación entre las repeticiones dentro del experimento, con diferencias en la puntuación que variaron desde 1 hasta 2.6.



Las barras representan el desvío estándar.

Figura 14. Promedio de respuestas de infección de 27 genotipos de cebada.

De la figura anterior es importante destacar el amplio rango de variabilidad presente en los RI promedio de las cebadas estudiadas. Los valores promedio de RI variaron entre 2.6 y 7.7, siendo NDB 112 el material que presentó mayores niveles de resistencia y Grace el de mayores niveles de susceptibilidad. También se destaca una baja variación entre las repeticiones del experimento, con diferencias en la puntuación que variaron desde 1.4 a 2.4.

En cuanto al experimento 2 los resultados son presentados en la tabla 5, en el que de igual manera que en el experimento 1, los aislamientos y las cebadas fueron ordenados de manera decreciente de las RI altas hasta bajas.

Los aislados 17.01.4 y 17.01.2 fueron los menos agresivos sobre el mayor número de cebadas. El primero presentó 31,3% y 31,3% de RI intermedia y baja compatibilidad hospedante-parásito respectivamente, mientras que el segundo presentó 76,5% de respuestas de infección intermedia.

Los aislados 17.01.1, 17.01.5, 17.07.3, 17.07.4 y 17.09.1 presentaron únicamente RI alta, siendo el 100% de las cebadas estudiadas susceptibles a dichos aislamientos.

Por último, los aislados 12.10.1, 12.11.1 y 17.03.2 presentaron RI altas e intermedias, variando dichas respuestas de 64,7% a 75% y de 25% a 35,3% respectivamente.

Tabla 5. Promedios y frecuencias de respuesta de infección (RI) de 17 genotipos de cebada inoculadas con 10 aislamientos de *Cochliobolus sativus*.

Cebadas	17.01.5	17.09.1	17.07.4	17.07.3	17.01.1	12.10.1	12.11.1	17.03.2	17.01.2	17.01.4	MEDIA	Resistentes (%)	Intermedias (%)	Susceptibles (%)
MOSA 09-312	9.0	7.7	8.3	9.0	8.5	9.0	9.0	8.5	5.3	7.3	8.2	0.0	0.0	100.0
Explorer	8.3	8.3	8.3	7.3	8.0	8.5	8.0	7.8	7.7	7.7	8.0	0.0	0.0	100.0
MUSA 936	8.3	8.8	9.0	7.5	9.0	8.3	8.3	7.7	4.5	6.3	7.8	0.0	10.0	90.0
MOSA 12-273	9.0	8.0	8.5	9.0	8.0	8.3	7.7	5.5	4.7	SD	7.6	0.0	11.1	88.9
I. Cronos (CLE 280)	7.3	SD	8.0	8.0	8.5	9.0	SD	8.0	4.0	SD	7.5	0.0	14.3	85.7
Grace	7.8	9.0	8.0	8.0	8.3	8.8	9.0	5.5	6.0	3.3	7.4	0.0	10.0	90.0
N. Carumbé	9.0	SD	8.0	SD	9.0	SD	5.8	9.0	5.0	5.3	7.3	0.0	14.3	85.7
MOSA 12-53	8.8	8.5	8.3	9.0	7.0	7.0	7.0	7.5	4.0	4.5	7.2	0.0	20.0	80.0
Umbrella	6.8	9.0	7.0	8.0	8.8	9.0	9.0	5.7	4.8	3.5	7.1	0.0	20.0	80.0
MUSA 31	8.7	8.3	8.0	7.5	7.8	SD	3.8	8.0	5.0	5.3	6.9	0.0	22.2	77.8
I. Timbó (CLE 232)	7.5	8.3	8.8	7.0	9.0	9.0	8.3	4.3	4.3	2.0	6.8	10.0	20.0	70.0
Blondie	8.5	8.7	8.3	8.5	7.0	5.0	5.0	SD	5.3	4.0	6.7	0.0	33.3	66.7
Arcadia (CLE 267)	7.8	9.0	8.8	9.0	9.0	4.5	7.3	4.5	3.5	3.0	6.6	10.0	30.0	60.0
N. Daymán	SD	6.7	SD	8.5	9.0	5.0	5.0	4.7	SD	SD	6.5	0.0	50.0	50.0
AMBEV 306	6.5	6.7	7.3	6.7	5.5	9.0	5.0	SD	5.0	3.5	6.1	0.0	33.3	66.7
I. Celbo	8.3	8.0	7.5	6.7	6.3	5.3	5.3	6.0	3.3	2.5	5.9	10.0	10.0	80.0
NDB 112	8.3	5.8	6.3	6.0	SD	3.3	3.5	4.0	3.7	2.3	4.8	11.1	44.4	44.4
MEDIA	8.1	8.0	8.0	7.9	8.0	7.2	6.7	6.5	4.8	4.3				
Virulenos (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	64.7	72.2	75.0	23.5	37.5				
Intermedios (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35.3	27.8	25.0	76.5	31.3				
Avirulentos (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	31.3				

sin dato (SD) de acuerdo a la escala de Fetch y Steffenson (1999). Los tipos de infección entre 1 y 3 son indicativos de bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito, los tipos de infección 4 y 5 de nivel intermedio y los tipos de infección entre 6 y 9 son indicativos de alto nivel de compatibilidad hospedante-parásito.

Con respecto al comportamiento de las cebadas, se observaron niveles de resistencia muy bajos, ya que la mayoría de las cebadas exhibieron niveles de RI intermedio y altos. La cebada que mostró el mejor comportamiento fue NDB 112 con frecuencia de RI de 11,1%, 44,4% y 44,4% (bajas, intermedias y altas respectivamente). En el otro extremo los cultivares MOSA 09-312 y Explorer exhibieron únicamente respuestas de infección alta.

Los materiales MUSA 936, MOSA 12-273, INIA Cronos (CLE 280), Norteña Carumbé, Grace, MOSA 12-53, Umbrella, MUSA 31, Blondie, Norteña Daymán y Ambev 306 exhibieron RI intermedias y altas, con frecuencia que varían de 10% a 50% y 50% a 90% respectivamente. Estos resultados reflejan comportamientos altamente variables en cuanto a niveles de resistencia.

Luego de realizar ambos experimentos, se procedió a elaborar una escala de respuestas de infección propia, tal como la realizada por Fetch y Steffenson (1999, figura 5), a partir de fotografías tomadas en los experimentos. Dicha escala se presenta a continuación (figura 15).

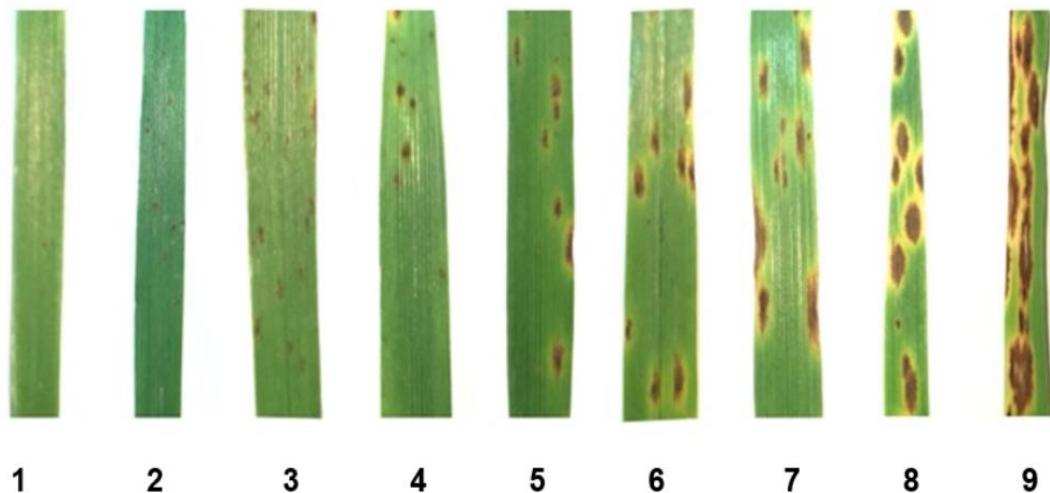


Figura 15. Escala propia de respuestas de infección (RI) realizada a partir de Fetch y Steffenson (1999).

5. DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad patogénica de una colección de aislamientos nacionales de *Cochliobolus sativus* colectados durante el año 2017 en Colonia y Río Negro.

Este estudio reporta los patrones de virulencia de 36 aislamientos de *C. sativus*, utilizando un juego de 27 genotipos de cebada. Los resultados obtenidos indican una gran variabilidad patogénica, como también altos niveles de agresividad entre los aislamientos.

Estos resultados coinciden con estudios anteriores, los cuales también reportaron altos niveles de agresividad en otra población patogénica para la mayoría del germoplasma de cebada estudiado, así como también la existencia de una alta variabilidad de la población uruguaya de *C. sativus* y niveles muy bajos de resistencia genética de la cebada (Gamba et al. 2000, 2010, Gamba y Estramil 2012). Resultados similares fueron obtenidos por Ghazvini y Tekauz (2007) para aislamientos pertenecientes a Canadá y otras partes del mundo y Knight et al. (2010) para Australia.

Estos resultados difieren de otros estudios realizados previamente en los que se sugirió la existencia de tres grupos de aislados (Gamba y Estramil, 2002) y tres patotipos (Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997).

La variabilidad en agresividad presente en los resultados sugiere la existencia de interacciones complejas en el patosistema *H. vulgare*-*B. sorokiniana*. Esto pone en duda la utilidad del método clásico de designación de patotipos de acuerdo a lo sugerido inicialmente por Ghazvini y Tekauz (2008), tal como se utiliza en hongos biotróficos, sugiriendo que el sistema gen por gen no es el principal operando en el patosistema *H. vulgare*-*B. sorokiniana*.

Un aspecto interesante a mencionar es la posible relación entre el comportamiento sanitario de los cultivares que dan origen a los aislamientos y los resultados obtenidos en este trabajo. Son ocho los aislamientos que cuentan con caracterización sanitaria del cultivar del que se tomó la muestra. Los aislamientos 12.11.1, 17.09.1 y 17.38.2 provienen de materiales con un nivel de infección intermedio-alto, el aislamiento 17.34.3 proviene de un cultivar con un nivel de infección intermedio, mientras que los aislamientos 17.07.3, 17.07.4, 17.39.1, 17.39.3 provienen de cultivares con nivel de infección intermedio-bajo. Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que los cuatro aislamientos provenientes de materiales con niveles de infección intermedios-bajos, fueron muy agresivos (tres de los cuatro aislamientos presentaron alta agresividad sobre el 100% de las cebadas estudiadas). Por otro lado, en los aislamientos provenientes de cultivares con un nivel de infección intermedio-alto

se observa mayor variabilidad en la agresividad, donde aparece un porcentaje de cebadas con un nivel intermedio de RI. Trabajos posteriores con mayor información acerca del comportamiento sanitario del cultivar muestreado son necesarios para poder hacer un análisis más profundo y detallado.

Otro aspecto que resulta muy interesante destacar es que nueve de los treinta y seis aislamientos estudiados provienen de cultivares que habían sido tratados con tres aplicaciones de fungicidas previo al muestreo. Los aislamientos son los siguientes: 17.34.1, 17.35.1, 17.39.1, 17.39.3, 17.51.1, 17.51.2, 17.62.1, 17.62.2, 17.62.3, indujeron una gran diversidad en agresividad, con niveles de RI que van desde 4,8 hasta 8,1. No existen trabajos publicados sobre el efecto del fungicida en *C. sativus*, a diferencia de otros patógenos. Se han reportado efectos estimuladores con tiabendazol en la germinación de las esporas de *Penicillium expansum* (Baraldi et al., 2003), propamocarb y cyazofamid en el crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* (Flores y Garzón, 2013), metalaxil en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* (Zhang et al., 1997), y mefenoxam sobre el crecimiento micelial así como en la virulencia de *P. aphanidermatum* (Moorman y Kim 2004, Garzón et al. 2011). En *Sclerotinia sclerotiorum*, se reportaron también efectos estimulantes sobre la virulencia con dimetacona, carbendazima, y trifloxistrobina (Zhou et al. 2014, Di et al. 2015).

Estudios posteriores con un mayor número de aislamientos y mayor cobertura territorial son necesarios para lograr una caracterización más profunda y detallada de la estructura de *C. sativus* en Uruguay. Continuar con muestreos periódicos en cebadas con síntomas de mancha borrosa permitiría una caracterización más completa de la composición de la población de *Cochliobolus sativus*. Este conocimiento podrá ser útil en el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético más dirigidas que permitan la obtención de cultivares de cebada con resistencia genética más efectiva y durable.

6. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad patogénica de una colección de aislamientos nacionales de *Cochliobolus sativus* representativos de dos de las localidades más importantes del cultivo en Uruguay.

En el estudio de variabilidad patogénica de 36 aislamientos de *C. sativus*, frente a un juego de 27 genotipos de cebada, se concluye la existencia de una gran variabilidad patogénica del grupo de aislamientos y un bajo nivel de resistencia genética de las cebadas estudiadas. Estudios adicionales incluyendo un mayor número de aislamientos y cebadas son necesarios para continuar profundizando en el conocimiento de la estructura de *C. sativus*.

Muestreos más exhaustivos en años y localidades permitirán una caracterización más completa de la población local de *C. sativus*, así como la profundización en el comportamiento de otros genotipos de cebada.

Es importante disponer de planes específicos de manejo integrado para esta enfermedad que provean niveles aceptables de control debido a que se considera que el manejo integrado es el abordaje que permite minimizar las pérdidas que esta enfermedad puede ocasionar.

7. RESUMEN

Bipolaris sorokiniana es el agente causal de mancha borrosa en hojas de cebada y es considerada una de las enfermedades foliares más importantes por las mermas que la misma puede causar en rendimiento y calidad. Para desarrollar estrategias de mejoramiento genético que permitan la obtención de cultivares con resistencia efectiva y durable, es necesario conocer la diversidad en agresividad presente en la población local del patógeno. En este estudio se evaluó la variabilidad patogénica de una colección de treinta y seis aislamientos nacionales de *Cochliobolus sativus* en veintisiete genotipos de cebada, en condiciones de temperatura y fotoperiodo controlados. Se identificaron 14 aislados con ausencia de tipos de reacción de baja compatibilidad, pero diferentes entre sí teniendo en cuenta los otros dos tipos de reacción. Los aislados 17.41.3 y 17.44.4 fueron los menos agresivos sobre el mayor número de cebadas, ya que exhibieron 91.3% y 95% respectivamente, de las respuestas de infección correspondientes a un bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito. El nivel de resistencia de las cebadas varió entre 70% y 0% con un importante rango de comportamiento diferencial frente a este grupo de aislados. Los resultados obtenidos indican la existencia de una alta y muy variable agresividad en esta población local. Estudios posteriores con un mayor número de aislamientos y cebadas permitiría una caracterización más completa de la composición de la población nacional de *Cochliobolus sativus*, así como el comportamiento de otros genotipos de cebada.

Palabras clave: *Cochliobolus sativus*; Agresividad; Uruguay.

8. SUMMARY

Bipolaris sorokiniana is the causal agent of the spot blotch on the barley leaves and is considered one of the most important foliar diseases in terms of loss of yield and quality. To develop genetic improvement strategies that allows to obtain cultivars with effective and lasting resistance, it is necessary to know the diversity of aggressiveness present in the local population of the pathogen. In this study, the pathogenic variability of a collection of thirty-six national isolates of *Cochliobolus sativus* in twenty-seven genotypes of barley was evaluated under controlled conditions of temperature and photoperiod. Fourteen isolates were identified with the absence of low compatibility types, but different from each other, taking into account the other two types of reaction. Isolates 17.41.3 and 17.44.4 were the least aggressive in most of the barleys, since they exhibited 91.3% and 95%, respectively, of the infection responses corresponding to a low level of parasite-host compatibility. The level of resistance of the barleys varied between 70% and 0% with an important range of differential behavior in facing of the group of isolates. The results indicate the existence of a high and very variable aggressiveness in this local population. Subsequent studies with a greater number of isolates and barleys would allow a more complete characterization of the national population composition of *Cochliobolus sativus* as well as behavior of other genotypes of barley.

Keywords: *Cochliobolus sativus*; Aggressiveness; Uruguay.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 2011. Fitopatología. 2ª. ed. México, Limusa. 838 p.
2. Almgren, I.; Gustafsson, M.; Falt, A. S.; Lindgren, H.; Lijeroth, E. 1999. Interactions between root and leaf disease development in barley cultivars after inoculations with different isolates of *Bipolaris sorokiniana*. Journal of Phytopathology. 147: 331 - 337.
3. Andrivon, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. Phytopathology. 83: 889–890.
4. Arabi, M. I. E.; Jawhar, M. 2003. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) on barley in Syria. Journal of Plant Pathology. 85: 193-196.
5. Bakonyi, J.; Aponyi, I.; Fischl, G. 1997. Diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici repentis* in Hungary. In: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab A. eds. Helminthosporium Blights of Wheat: spot Blotch and Tan Spot. México, D. F., CIMMYT. pp. 80– 85.
6. Baraldi, E.; Mari, M.; Chierici, E.; Pondrelli, M.; Bertolini, P.; Pratella, G. C. 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. Plant Pathology. 52: 362-370.
7. Chang, N.; Wu, Y. 1998. Incidence and current management of spot blotch of wheat in China. In: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab A. eds. *Helminthosporium* Blights of Wheat: spot Blotch and Tan Spot. México, D. F., CIMMYT. pp. 119–133.
8. Christensen, J. J. 1926. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. Phytopathology. 15: 785–795.
9. Di, Y. L.; Zhu, Z. Q.; Lu, X. M.; Zhu, F. X. 2015. Pathogenicity stimulation of *Sclerotinia sclerotiorum* by subtoxic doses of carbendazim. Plant Disease. 99: 1342-1346.
10. Duczek, L. J.; Jones-Flory, L. L. 1994. Relationship between common root rot, tillering and yield loss in spring wheat and barley. Canadian Journal of Plant Pathology. 15: 153–158.

11. Fetch, T. G, Jr.; Steffenson, B. J. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 16: 202–206.
12. _____; _____. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease*. 83: 213–217.
13. Flores, F. J.; Garzón, C. D. 2013. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth in vitro of oomycetes and fungal plant pathogens. *Dose Response*. 11: 361-373.
14. Gamba, F.; Estramil, E.; Ilardía, L. 2000. Pathogenic variability of *Cochliobolus sativus* in Uruguay. *In: International Barley Genetics Symposium (8th, 2000, Adelaide, South Australia)*. Proceedings. Adelaide, South Australia, Libraries Australia. pp. 115 - 116.
15. _____; _____. 2002. Variation in virulence within an Uruguayan population of *Cochliobolus sativus*. *In: International Workshop on Barley Leaf Blights (2nd, 2002, Aleppo, Syria)*. Proceedings. Aleppo, Syria, ICARDA. pp. 59 - 62.
16. _____; _____. 2012. Agresividad diferencial en una población uruguaya de *Cochliobolus sativus* en cebada. *Agrociencia (Uruguay)*. 16: 108-114.
17. Garzón, C. D.; Molineros, J. E.; Yanez, J. M.; Flores, F. J.; Jimenez-Gasco, M. M.; Moorman, G. W. 2011. Sublethal doses of mefenoxam enhance Pythium damping-off of geranium. *Plant Disease*. 95: 1233-1238.
18. Ghazvini, H.; Tekauz A. 2008. Host-pathogen interactions among barley genotypes and *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Plant Disease*. 92: 225–233.
19. Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K.-H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*. 8: 629–643.

20. Govrin, E. M.; Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*. 10: 751–757.
21. Gyawali, S. 2010. Association mapping of resistance to common root rot and spot blotch in barley, and population genetics of *Cochliobolus sativus*. Thesis PhD. Fargo, North Dakota, United States of America. North Dakota State University. 346 p.
22. Knight, N.; Platz, G.; Lehmsiek, A.; Sutherland, M. W. 2010. An investigation of genetic variation among Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* from different cereal tissues and comparison of their ability to cause spot blotch on barley. *Australasian Plant Pathology*. 39 (3): 207-216.
23. Kumar, J.; Hückelhoven, R.; Beckhove, U.; Nagarajan, S.; Kogel, K.-H. 2001. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Phytopathology*. 91: 127–133.
24. _____; Schafer P.; Huckelhoven R.; Langen G.; Baltruschat H.; Stein E.; Nagarajan S.; Kogel, K. H. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*. 3: 185–195.
25. Kwasna, H. 1995. Ecology, taxonomy and nomenclature of Helminthosporia history and actual situation. In: Chelkowski, J. ed. Helminthosporia—Metabolites, Biology, Plant Diseases: *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum*. Poznan, Poland, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Science. pp. 27–60.
26. Leoni, C. 1996. Incidencia de mancha en red, mancha borrosa y roya de la hoja sobre el rendimiento y la calidad de la cebada y la malta, en cuatro cultivares de cebada cervecera. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 112 p.
27. Levy, M.; Correa-Victoria, F. J.; Zeigler, R. S.; Xu, S.; Hamer, J. E. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Columbia. *Phytopathology*. 83: 1427-1433.
28. Limpert, E.; Müller, K. 1994. Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology*. 140: 346–358.

29. MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, ES). s.f. Ficha 359. (en línea). Albacete. 2 p. Consultado feb. 2018. Disponible en http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/fichas/pdf/fd_359.pdf
30. Mathre, D. 1982. Compendium of barley diseases. St. Paul, Minnesota, APS. 78 p.
31. _____. 1997. Compendium of Barley Disease. 2nd. ed. St. Paul, Minnesota, APS. 90 p.
32. Mehta, Y. R.; Riede, C. R.; Campos, L. A. C.; Kohli, M. M. 1992. Integrated management of major diseases in Brazil: an example for the Southern cone region of Latin America. *Crop Protection*. 11(6): 517–524.
33. Meldrum, S. I.; Platz, G. J.; Ogle, H. J. 2004. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 33: 109–114.
34. Moorman, G. W.; Kim, S. H. 2004. Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. *Plant Disease*. 88: 630-632.
35. Nagarajan, S.; Kumar, J. 1998. Foliar blights of wheat in India: germplasm improvement and future challenges for sustainable, high yielding wheat production. In: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab A. eds. *Helminthosporium Blights of Wheat: spot Blotch and Tan Spot*. México, D. F., CIMMYT. pp. 52–58.
36. Pereyra, S. 1996. Estrategias para el control químico de enfermedades en cebada. Montevideo, INIA. 4 p (Boletín de Divulgación no. 57).
37. _____.; Díaz, M.; Stewart, S. 2005. Manual de identificación de enfermedades en cereales de invierno. Montevideo, INIA. 50 p. (Boletín de Divulgación no. 61).
38. Pratt, R. G. 2003. First report of infection by *Bipolaris sorokiniana* in the South Eastern United States. *Plant Disease*. 87: 1265.

39. Raemaekers, R. H. 1988. *Helminthosporium sativum*: Disease complex on wheat and sources of resistance in Zambia. In: Klatt, A. R. ed. Wheat Production Constraints in Tropical Environments. México, D. F., CIMMYT. pp. 175–185.
40. Reis, E. M. 1985. Doenças do trigo; podridão comum de raízes. Sao Paulo, CNDA. 43 p.
41. Ruckstuhl, M. 1998. Population structure and epidemiology of *Bipolaris sorokiniana* in the rice–wheat cropping pattern of Nepal. In: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab, A. eds. *Helminthosporium* Blights of Wheat: spot Blotch and Tan Spot. México, D. F., CIMMYT. pp. 88–106.
42. Silva, M. P. 2011. Variabilidad patogénica, diversidad genética y estructura poblacional de *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada. Tesina para optar por el grado de Lic. en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 101 p.
43. Singh, R. V.; Singh, A. K.; Singh, S. P. 1998. Distribution of pathogens causing foliar blights of wheat in India and neighboring countries. In: Duveiller, E.; Dubin, H. J.; Reeves, J.; McNab A. eds. *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. México, D.F., CIMMYT. pp. 59–62.
44. Steffenson, B. J.; Hayes, P. M.; Kleinhofs, A. 1996. Genetic of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres f. sp. teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in Barley. Theoretical Applied Genetics. 92: 552 - 558.
45. Stewart, S.; Pereyra, S.; Díaz, M. 2005. Manchas foliares en trigo y cebada bajo siembra directa: conceptos y estrategias de control. (en línea). Montevideo, INIA. 30 p. (Documento on line no. 36). Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219230807115634.pdf>
46. Tekauz, A.; Gilbert Mueller, E.; Stulzer, M.; Beyene, M.; Ghazvini, H.; Morgan, K.; Reverchon, F. 2003. Survey for foliar diseases of barley in Manitoba in 2002. Canadian Plant Disease. 83: 60 - 61.

47. Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant Journal*. 11: 1187–1194.
48. Tinline, R. D. 1988. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. In: Ingram, D. S.; Williams, P. A. eds. *Advances in Plant Pathology*. London, Academic Press. v.6, pp. 113-122.
49. Valjavec-Gratian, M.; Steffenson, B. J. 1997. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Disease*. 81:1275-1278.
50. Van Leur, J. G.; Alamdar, M. Z.; Khawatmi, S. 1997. Effects of *Cochliobolus sativus* on yield of barley under experimental conditions in Northern Syria. *Australian Journal of Agriculture Research*. 48: 1-7.
51. Zadoks, J. C.; Chang, T. T.; Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14: 415-421.
52. Zhang, S.; Panaccione, S. G.; Gallegly, M. E. 1997. Metalaxyl stimulation of growth of isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycologia*. 89: 289-292.
53. Zhong, S.; Steffenson, B. J. 2001. Virulence and Molecular Diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*. 91(5): 469-476.
54. Zhou, F.; Liang, H. J.; Di, Y. L.; You, H.; Zhu, F. X. 2014. Stimulatory effects of sublethal doses of dimethachlon on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*. 98: 1364-1370.
55. Zillinsky, F. J. 1983. *Common diseases of small grain cereals: a guide to identification*. México, D. F., CIMMYT. 156 p.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I. Repique de una colonia de *Cochliobolus sativus*.

