

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**AJUSTE DE TÉCNICA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE *Ramularia collo-cygni* EN CEBADA**

por

Estefany Mabel SUAREZ BARRÍA

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

Tesis aprobada por:

Director:

.....
Ing. Agr. MSc. María Cintia Palladino

.....
Ing. Agr. PhD. Carlos Pérez

.....
Ing. Agr. PhD. Silvia Pereyra

Fecha:

19 de agosto de 2019
.....

Autora:

.....
Estefany Mabel Suarez Barría

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a todos aquellos que de alguna manera me han apoyado en la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradezco a mis tutores por darme la posibilidad de realizar esta tesis.

A mi familia por el gran apoyo a lo largo de mi carrera.

A mis hermanas por la confianza, la motivación y el apoyo incondicional.

A "Paco" por su colaboración para llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos por dar fuerzas y apoyo en este trabajo y por su amistad.

A Ana Arruabarrena por compartir sus experiencias en esta temática.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 IMPORTANCIA DE LA CEBADA EN URUGUAY.....	2
2.2 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES EN CEBADA	4
2.2.1 <u>Importancia de <i>Ramularia collo-cygni</i></u>	5
2.3 ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	7
2.3.1 <u>Clasificación taxonómica</u>	7
2.4 SINTOMATOLOGÍA.....	8
2.5 EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD	12
2.6 MANEJO DE LA ENFERMEDAD.....	15
2.6.1 <u>Manejo por resistencia genética del cultivar</u>	15
2.6.2 <u>Manejo con fungicidas</u>	17
2.6.3 <u>Manejo por prácticas culturales</u>	20
2.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y/O CUANTIFICACIÓN	21
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	27
3.1 PUESTA A PUNTO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Ramularia collo-cygni</i>	27
3.1.1 <u>Extracción de ADN desde una cepa de <i>Ramularia collo-cygni</i></u>	27
3.1.2 <u>Curva de calibración</u>	30
3.1.3 <u>Condiciones de amplificación: qPCR</u>	31
3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	32
3.2.1 <u>Selección de lotes de semilla</u>	32
3.2.2 <u>Extracción de ADN de lotes de semilla</u>	33

3.2.3	<u>Influencia de la matriz en la cuantificación de los lotes de semilla</u>	33
3.2.4	<u>Cuantificación del nivel de <i>Ramularia collo-cygni</i> en los lotes de semilla</u>	34
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	35
4.1	<u>AJUSTE DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Ramularia collo-cygni</i></u>	35
4.1.1	<u>Extracción de ADN de la cepa de <i>Ramularia collo-cygni</i></u>	35
4.1.2	<u>Curva de calibración</u>	37
4.2	<u>VALIDACIÓN DEL MÉTODO</u>	39
4.2.1	<u>Extracción de ADN de Rcc a partir de semilla</u>	39
4.2.2	<u>Efecto matriz</u>	39
4.2.3	<u>Cuantificación de ADN de Rcc en lotes de semilla</u>	40
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	47
6.	<u>RESUMEN</u>	48
7.	<u>SUMMARY</u>	49
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	50
9.	<u>ANEXOS</u>	61

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Evolución del área sembrada, producción y rendimiento de cebada para el periodo 2009-2019	2
2. Perdidas máximas porcentuales registradas causadas por las enfermedades más frecuentes de cebada en Uruguay.....	5
3. Condiciones de reacción de PCR para la detección de <i>Ramularia collo-cygni</i>	30
4. Condiciones de reacción para los ensayos en qPCR utilizados para la detección de <i>Ramularia collo-cygni</i>	32
5. procedencia y número de aplicaciones durante la fase de cultivo de los distintos lotes de semilla de INIA Arrayán evaluados por su contenido de ADN de Rcc por qPCR	33
6. Concentración de ADN para el análisis de matriz	34
7. Concentración de ADN y relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 según método de extracción evaluado	36
8. Concentración de ADN total obtenido de cada lote de semilla estudiado	39
9. Influencia de la matriz en qPCR: concentración de ADN, Ct, Ct medio	40
10. Número de aplicación de fungicida, Ct, Ct medio y concentración de ADN de Rcc según lotes	41

Figura No.

1.	Distribucion geográfica y año de primer reporte de <i>Ramularia collo-cygni</i>	6
2.	Micrografía electrónica de la estructura resproductiva de <i>Ramularia collo-cygni</i>	7
3.	Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en un análisis de supermatrix de 1026 proteínas y 30 taxones.....	8
4.	Síntoma típico de Rcc en hoja de cebada en estado de grano acuoso (Z.71).	9
5.	Estructura molecular de rubelinas y tiempo de producción de las mismas en micelio de Rcc	10
6.	Ciclo del cultivo de cebada y las etapas sintomatológicas de ramulariosis.....	11
7.	Ciclo de <i>Ramularia collo-cygni</i>	13
8.	Micrografías microscópicas de <i>Ramularia collo-cygni</i> en la superficie de la hoja de cebada.	14
9.	Proporción de cultivaresde cebada cervecera según el comportamiento sanitario frente a ramulariosis, evaluados en el año 2016	16
10.	Severidad de ramulariosis, area bajo de la curva de progreso de la enfermedad y rendimiento en grano según distintos momentos de aplicación de fungicida mezcla de estrobilurina y carboxamida.	19
11.	Proceso de PCR con tecnología TaqMan.....	23

12.	Gráfica de amplificación de ADN, recolectadas de software de instrumento de qPCR.....	24
13.	Curva estandar de qPCR.	25
14.	Esquema de diluciones de concentración conocida de ADN de Rcc, en un rango de 10 ng. / μ l. y 0.128 pg / μ l.	31
15.	Aislados de <i>Ramularia collo-cygni</i> en placas de Petri en medio PDA	35
16.	Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con GoodView como indicador de tinción.....	37
17.	Gráfica de amplificación y curva estandar de ADN de Rcc	38
18.	Curva estándar de calibración de ADN de <i>Ramularia collo-cygn</i> y muestras reales de ADN de los cuatro lotes evaluados.	41
19.	Temperatura media mensual para el año 2016.....	45
20.	Lluvia acumulada para el periodo junio-noviembre del año 2016.....	46

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay el cultivo de cebada es uno de los principales cultivos de invierno. El área sembrada de cebada ha ido en aumento llegando a 190.000 ha en la zafra 2016/2017. El rendimiento presenta variaciones entre años, con rendimientos elevados como el alcanzado en la zafra 2015, de 3840 kg/ha promedio nacional, y rendimientos relativamente bajos como el alcanzado en la zafra 2017 de 2516 Kg/ha (MGAP. DIEA, 2018).

Las enfermedades son una de las principales limitantes para la producción y capaces de reducir el rendimiento. En este marco, ramulariosis o salpicado necrótico, cuyo agente etiológico es *Ramularia collo-cygni* (Rcc), se ha convertido en una de las principales restricciones que ha afrontado la producción de cebada en estos últimos años. Esta enfermedad ocasiona pérdidas de rendimiento de grano de hasta 70% y pérdidas de hasta 90% cuando considera rendimiento de 1^a + 2^a (Pereyra, 2013a).

La semilla es una de las fuentes de inóculo más importante que presenta esta enfermedad. La detección y cuantificación del inóculo en semilla, presenta varias limitantes, ya que los métodos de diagnóstico tradicionales no son útiles y eficientes. A su vez, a nivel de cultivo también su diagnóstico es complejo, ya que puede no presentar síntomas a pesar de estar presente en la planta y los síntomas iniciales en la planta se pueden confundir con otras enfermedades, deficiencias de otros nutrientes o manchas fisiológicas. Las técnicas convencionales para el diagnóstico no son precisas para este patógeno, por lo que se tiene que recurrir a técnicas serológicas y moleculares para su detección (Carmona et al., 2013).

En el marco de la problemática actual se está trabajando en una línea de investigación INIA-FAGRO, la cual tiene como objetivo proponer alternativas para el manejo integrado de ramulariosis. El objetivo general de este trabajo es contribuir al manejo de ramulariosis mediante el ajuste de la técnica molecular qPCR, teniendo como objetivos específicos el ajuste de dicha técnica para la detección y cuantificación de Rcc en semilla de cebada y la validación del método en lotes de semilla.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DE LA CEBADA EN URUGUAY

En la década del 90 la cebada era uno de los cultivos que crecía en área (junto al arroz). Con el cambio del siglo XXI la cebada ingreso en una fase de estancamiento. En lo que va del presente siglo, además el cultivo de cebada cervecera ha mostrado serias dificultades asociadas con la fuerte variabilidad de los rendimientos de grano, en especial en los últimos años. Esta condición y la elevada exigencia en cuanto a la obtención de grano de alta calidad industrial, dificultan la inserción actual del cultivo a nivel de producción (Hoffman et al., 2015).

La mayor área sembrada con cebada (Cuadro No. 1) en el periodo 2009-2017 fue en la zafra 2016/2017 (190 mil has), llegando a un mínimo en 2010/2011 de 62 mil ha. En los últimos años, la cebada ha mostrado una variación en área, con aumentos y disminuciones durante el periodo (MGAP. DIEA, 2018).

Cuadro No. 1. Evolución del área sembrada, producción y rendimiento de cebada para el periodo 2009-2019

	Área sembrada	Producción	Rendimiento
Zafra	Miles de ha	Miles de toneladas	Kg/ha sembrada
2009/10	140,9	464,1	3294
2010/11	61,9	186,4	3010
2011/12	104,6	326,9	3126
2012/13	117,3	220,3	1878
2013/14	71,9	252,4	3510
2014/15	99,5	243,2	2444
2015/16	92,7	354,8	3840
2016/17	190	678,0	3568
2017/18	153	385,0	2516
2018/19	167	6367	3813

Fuente: MGAP. DIEA (2018, 2019).

El rendimiento de los cultivos en el periodo analizado se ubica por encima de los 3000 kg/ha, siendo excepciones las zafras 2012/13, 2014/15 y 2017/18, las cuales presentaron eventos climáticos desfavorables que llevaron a la disminución de los rendimientos.

El mayor rendimiento en el periodo de estudio se dio en la zafra 2015/16 llegando a 3840 kg/ha, mientras que el rendimiento logrado en la zafra 2016/17 alcanza un 93 % del mismo (MGAP. DIEA, 2018).

La producción en la zafra 2016/17 es de 678 mil toneladas, superando la producción lograda en la zafra 2009/10 de 464,1 mil toneladas, siendo a su vez un 94% de la producción de la pasada zafra, esto no solo se debe a un aumento en la productividad, sino que también por el aumento en el área sembrada la cual es la mayor del periodo de estudio (MGAP. DIEA, 2018, 2019).

La alta producción de la zafra 2016/17 permitió abastecer la capacidad maltera de la industria del país. Como consecuencia se logró una caída de las importaciones de cebada cervecera, llegando solo a unas 10 mil toneladas, siendo un 87 % menos que la zafra anterior (75 mil toneladas). Las exportaciones de malta, por su parte, alcanzaron unas 385 mil toneladas de grano, superando en un 48 % el volumen exportado en la zafra anterior (MGAP. OPYPA, 2017).

La producción de malta en Uruguay durante el 2015 fue exportada en un 92,3 % a Brasil, República Dominicana, Paraguay y Bolivia, mientras que el 7,3 % restante se volcó a satisfacer las necesidades del mercado cervecero interno. Para este mismo año las exportaciones de malta fueron el tercer rubro en importancia de grano detrás de soja y arroz en relación a ingreso de divisas (millones de dólares). Esto muestra la importancia del sector para la economía nacional y el posicionamiento de la cadena cebada-malta como rubro exportador no tradicional trascendente (Donato y Sayas, 2017).

El 6,1 % del Producto Bruto Interno (PBI) total de Uruguay para el año 2016 corresponde a agricultura, ganadería y silvicultura. A su vez un 2,1 % corresponde solamente a la agricultura, considerando la producción de cebada como un factor importante que contribuye a la formación del mismo (Uruguay XXI, 2018).

La cadena agroindustrial de la cebada en Uruguay presenta dos características que lo distinguen del resto del mundo. Casi la totalidad de la cebada sembrada es cebada cervecera, mientras que el circuito forrajero es escaso creciendo solo cuando se dan afecciones serias a la calidad de la cebada (1^a. + 2^a.). Por otro lado, la proporción de malta en Uruguay posee un fuerte carácter industrial-exportador, exportándose un 92% del total producido. Se destaca una fase de industrialización de la cebada previa a su exportación, lo que la hace demandante de mano de obra (Donato y Sayas, 2017).

Debido al gran porcentaje de cebada destinado a exportación de malta, la calidad industrial de la cebada cervecera es de gran interés. En este sentido esta característica general se evalúa a través del índice de calidad maltera, en el cual se tienen en cuenta parámetros tales como extracto fino, poder diastático, contenido de betaglucanos, la atenuación límite aparente y contenido de nitrógeno soluble (Donato y Sayas, 2017).

Existen varias causas que pueden afectar la calidad de la cebada, los más comunes son factores climáticos adversos como las lluvias, que provocan pérdida de

color y brillo, indicadores de las condiciones de maduración, cosecha y manejo de almacenamiento de los granos (Arias, 1991).

La pérdida de color también se debe a factores bióticos, una coloración negruzca en base del grano indica presencia de hongos patógenos que perjudican la germinación y calidad de malteado (Arias, 1991). Por lo que determinar los patógenos presentes en la semilla se ha convertido en un factor muy importante para el manejo de las enfermedades.

2.2 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES EN CEBADA

En Uruguay las características agroecológicas de producción de cebada determinan que las enfermedades sean uno de los factores limitantes más importantes para el logro de rendimientos y calidad adecuados. La ocurrencia de temperatura moderada y humedad alta en el ciclo del cultivo, principalmente desde la espigazón, y la presencia de agua libre en la superficie de las hojas por periodos prolongados, favorecen la infección y desarrollo de múltiples enfermedades de cebada en el país (Pereyra y Germán, 2010).

Las principales enfermedades son las manchas foliares como mancha en red tipo red (causada por *Pyrenophora teres* f. *teres*), mancha en red tipo spot (causada por *Pyrenophora teres* f. *maculata*), mancha borrosa (causada por *Bipolaris sorokiniana*), roya de la hoja (causada por *Puccinia hordei*), fusariosis de la espiga (causada por *Fusarium graminearum*) y oídio (causada por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). En forma esporádica aparecen otras problemáticas como escaldaduras (causada por *Rhynchosporium secalis*), tizón bacteriano (causada por *Pseudomonas* sp.) estrías bacterianas (causada por *Xanthomonas* sp.) y Ramulariosis (causada por *Ramularia collo-cygni*, Pereyra y Germán 2010, Pereyra y Pérez 2017).

Estas enfermedades se presentan en la zafra dependiendo de si se da una combinación de condiciones favorables para su desarrollo: un patógeno virulento, huésped susceptible y condiciones ambientales favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad (Pereyra y Altier, 2011). Las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades dependerán de la interferencia del patógeno en el ciclo del cultivo y en que estadio fenológico se encuentra el mismo. En este sentido se han registrado pérdidas máximas en cebada (Cuadro No. 2) tanto en rendimiento en grano, peso y calibre, dependiendo de la enfermedad.

Cuadro No. 2. Pérdidas máximas porcentuales registradas causadas por las enfermedades más frecuentes de cebada en Uruguay

Enfermedad	Rendimiento en grano (%)	Peso en grano (%)	Calibre (% 1 ^a . + 2 ^a .)
Mancha en red tipo red	33	15	48
Mancha en red tipo spot	20	-	-
Escaladura	30	16	35
Mancha borrosa	30	-	-
Roya de la hoja	60	15	25
Oidio	30	-	-
Ramulariosis	70	35	68
Fusariosis de la espiga	14	-	-

Fuente: Pereyra y Germán (2013c).

Para fusariosis de la espiga, las pérdidas en rendimiento de grano son menores alcanzando un 14 %, sin embargo, su importancia radica además en la disminución de la calidad del grano por la producción de toxinas como DON (deoxinivalenol) nocivas para la salud animal y humana (Pereyra y Stewart, 2004). Entre las manchas foliares, ramulariosis presenta las pérdidas máximas registradas tanto en porcentaje de rendimiento de grano como en peso y calibre de los mismos.

2.2.1 Importancia de *Ramularía collo-cygni*

Los primeros síntomas de ramulariosis (Figura No. 1) fueron reportados hace más de 100 años en Italia (Cavara, 1893). En la actualidad se ha detectado en toda Europa, incluyendo en Escocia, Inglaterra, Irlanda, Francia, Dinamarca, Alemania, etc. así como en Chile, México, Colombia, EEUU (Walters et al. 2007, Havis et al. 2015b).

Las pérdidas en rendimiento ocasionadas por esta enfermedad, reportadas en el Reino Unido en el año 2004 fueron de 400 kg/ha., dichas pérdidas fueron asociadas a pérdidas de calidad de grano (Oxley, citado por Walters, 2007). Por otra parte, Havis et al. (2015a) expresan que ramulariosis reduce el rendimiento en 1000 kg/ha en variedades susceptibles.

En Argentina en el 2002 la enfermedad se reportó por primera vez causando una severa epidemia entre la ciudad de Bragado y Tres Arroyos (Khier et al., 2002). Desde esa fecha la enfermedad creció en importancia y en la zafra 2012/13 presentó gran intensidad y expansión del área geográfica afectada, habiéndose confirmado su presencia en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos (Carmona et al., 2013).

En Uruguay la ramulariosis fue detectada por primera vez en la zafra 2000 (Stewart, citado por Pereyra, 2013a). Su incidencia ha aumentado en la última década y, desde 2011, se ha convertido en una de las limitantes más importantes para la producción de cebada (Pereyra, 2013a).

Las pérdidas registradas en rendimiento de grano a nivel regional son alrededor del 20 % para Argentina, adjudicando las mismas a la aceleración de la senescencia foliar, afectando así el peso y tamaño de los granos (Carmona et al., 2013). Las pérdidas de rendimiento en grano causadas por ramulariosis en Uruguay alcanzan el 70 %, mientras que el componente que se ve más afectado es el tamaño de grano, las pérdidas en rendimiento de 1^a. + 2^a. puede llegar a 90 % (Pereyra, 2013a).

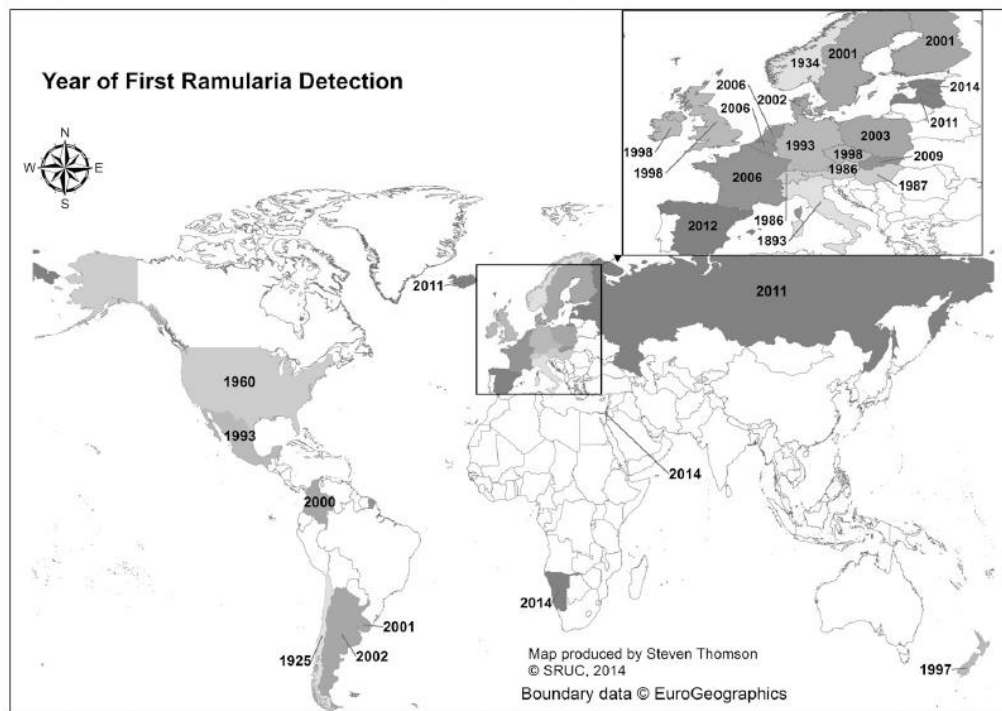


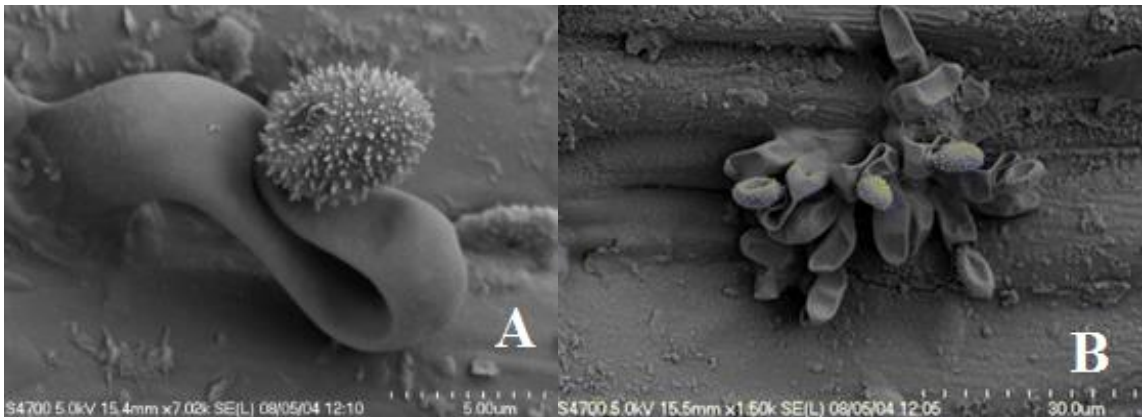
Figura No. 1. Distribución geográfica y año de primer reporte de *Ramularia collo-cygni*

Fuente: Havis et al. (2015b).

2.3 ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

2.3.1 Clasificación taxonómica

El patógeno causante del salpicado necrótico o ramulariosis en cebada fue descrito por primera vez como *Ophiocladium hordei* (Cavara, 1893). En 1988 Sutton y Waller reclasificaron al patógeno en el género *Ramularia*, dentro de la familia *Mycosphaerellaceae* en la clase *Dothideomycetes*, y propusieron el nombre de la especie como *Ramularia collo-cygni* (Rcc) debido a la forma de cuello de cisne de los conidióforos (Figura No. 2).



A= estructura de conidióforo de Rcc en forma de cuello de cisne, en su extremo se dispone el conidio de forma ovoide y superficie verrugosa.

B= disposición de conidióforos en fascículos dispuestos en líneas a lo largo de las nervaduras, que emergen en los estomas.

Figura No. 2. a) Micrografía electrónica de la estructura reproductiva de *Ramularia collo-cygni* sobre una hoja de cebada (fuente: Walters et al., 2007);

Figura No. 2 b) Micrografía electrónica de la estructura reproductiva de *Ramularia collo-cygni*, sobre estoma de una hoja de cebada (fuente: McGrann, 2016).

Crous et al. (2000), reportaron resultados de análisis filogenéticos, donde se analizaron 46 especies de *Mycosphaerella*, incluyendo tres especies del anamórfo de Rcc, respaldando así lo propuesto por Sutton y Waller (1988). Este estudio tiene soporte además en otros trabajos más recientes, los cuales presentan igual resultado como los realizados por Salamati y Reitan (2006).

Recientemente McGrann et al. (2016) en sus estudios demostraron las relaciones filogenéticas de Rcc con otros *Dothideomycetes*. Este análisis filogenético

posicionó a *Rcc* dentro del orden capnodiales en *Mycosphaerellaceae* (Figura No. 3), al igual que *Zymoseptoria tritici*, respaldando una vez más la reclasificación realizada por Sutton y Waller (1988).

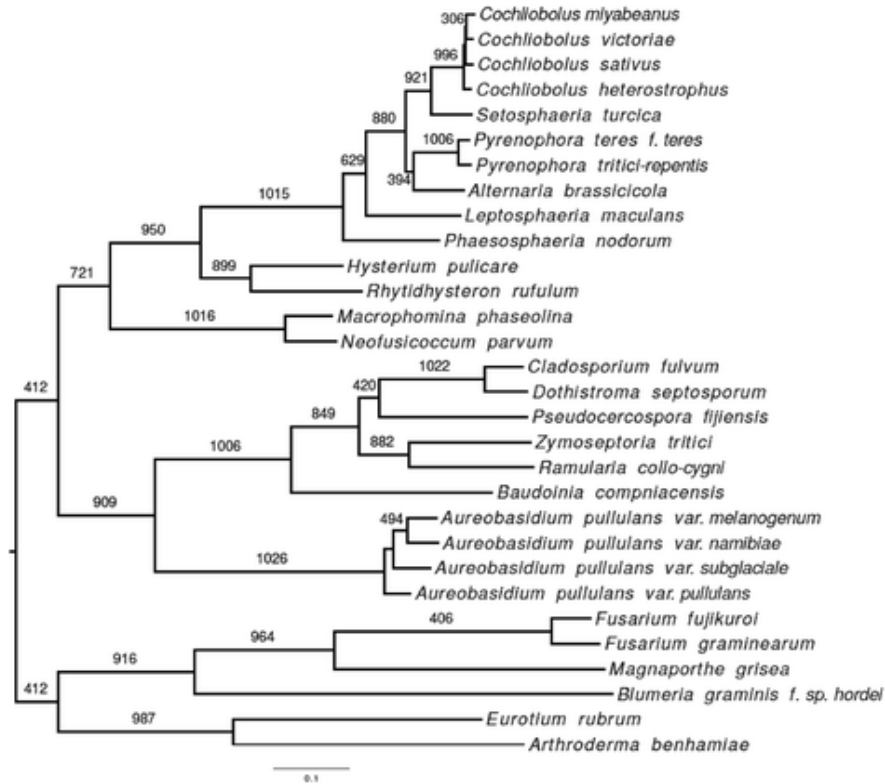


Figura No. 3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en un análisis de supermatrix de 1026 proteínas y 30 taxones

Fuente: McGrann (2016).

2.4 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas iniciales de ramulariosis consisten en manchas pequeñas de coloración marrón a negruzco, de 0,8-1,4 mm de longitud y 0,6-0,7 mm de ancho, por lo general están delimitadas por las nervaduras de las hojas. Las manchas desarrollan un halo clorótico pudiendo formar una región necrótica más grande. La pérdida de área de hoja verde provocada por las manchas conduce a efectos negativos sobre calidad y cantidad del rendimiento (Walters et al. 2007, Stabentheiner et al. 2009, Oxley, citado por Taylor et al. 2010, Carmona et al. 2013).

En la etapa de aparición de los primeros síntomas el diagnóstico mediante observación visual es difícil, debido a que se puede confundir con el inicio de síntomas causados por otros patógenos como los causantes de mancha en red (ambos tipos), mancha borrosa, escaldadura; o abióticos como deficiencias nutricionales y manchado fisiológico. Es posible descartar estos últimos debido a que las manchas causadas por Rcc son visibles en ambos lados de las hojas, además se puede observar en tallos, vainas y aristas (Figura No. 4), mientras que las manchas de origen fisiológico se constatan generalmente en hojas, observándose solo en el haz o en el envés de las hojas (Carmona et al., 2013).



A= manchas necróticas dispuestas en hojas viejas de cebada, alcanzando hasta 70% de severidad.

B= hoja bandera con manchas de Rcc con 40% de severidad.

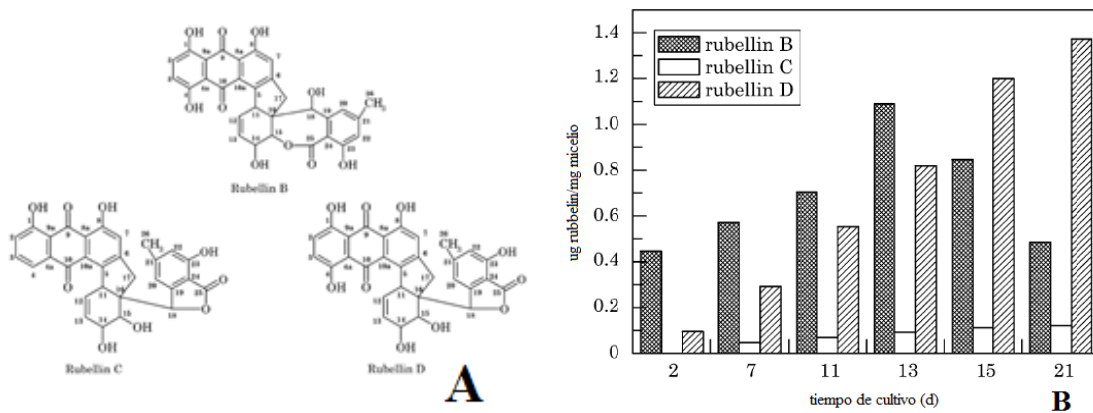
Figura No. 4. Síntoma típico de Rcc en hoja de cebada en estado de grano acuoso (Z.71)

Ramulariosis en cebada causa una rápida senescencia foliar, asociado a la producción de toxinas, que se activan con la luz (fotoactivas), y pertenecen al grupo de las Rubelinas (Figura No. 5a, Carmona et al., 2013).

En Munich, Alemania se realizaron una serie de ensayos para el estudio de rubelinas en los que se demostró que Rcc produce una serie de fitotoxinas (antraquinonas) como rubelina B, C, D (Heiser et al., 2004). Estos estudios comprobaron que la rubelina D induce la peroxidación de ácidos grasos como el linoléico y la cooxidación de pigmentos, estrictamente dependiente de luz. También se identificaron rubelinas B y C como derivados de antraquinonas de Rcc. Además, se realizó una comparación de las tres rubelinas, indicando que presentan una actividad similar entre ellas. Al realizar la fermentación de micelio de Rcc, se observó que rubelina B es la fitotoxina predominante hasta cerca de dos semanas de incubación, pasado el tiempo

rubelina D pasa a ser la fototoxina principal, mientras que rubelina C se forma en pequeñas cantidades a partir de la primera semana (Figura No. 5b).

Al realizar los estudios simultáneamente con hojas de cebada (*Hordeum vulgare* L. cv. Gunda) y hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel B) se probó que rubelina D es huésped no específico, debido a la inducción de síntomas además en hojas de tabaco (Heiser et al., 2004). En la misma línea de investigación, Miethbauer et al. (2006) también aislaron rubelinas B, C y D, sumado a esto se aisló rubelina A, a partir de micelio de Rcc.



A= Estructura molecular de Rubelina B, C y D.

B= Tiempo de producción de rubelina B, C y D en micelio de Rcc, mediante proceso de fermentación in vitro.

Figura No. 5. Estructura molecular de rubelinas y tiempo de producción de las mismas en micelio de Rcc

Fuente: Heiser et al. (2004).

El modo de acción las rubelinas está dado por la intervención en las reacciones enzimáticas, actividad de la fitohormona o la destrucción de la semipermeabilidad de la membrana formando poros en la membrana plasmática de la planta. Estas fitotoxinas ejercen su toxicidad mediante la activación del oxígeno que conduce a la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) en la célula vegetal, las ROS reaccionan con la mayoría de las moléculas orgánicas, como los ácidos grasos, las proteínas y los ácidos nucleicos causando así muerte del tejido vegetal afectado (Heiser et al., citados por Heiser y Liebermann, 2006).

Ramularia collo-cygni se dispone en diferentes sitios dependiendo en qué etapa del ciclo ontogénico se encuentre el cultivo (Figura No. 6). En estadios de plántula es inusual encontrar síntomas de ramulariosis como también en hojas nuevas recién emergidas, debido a la fase asintomática que presenta la enfermedad; por lo que un monitoreo de la misma basado en la observación de síntomas, podría llevar a una subestimación del nivel real de enfermedad presente en el cultivo (Carmona y Sautua, 2015).

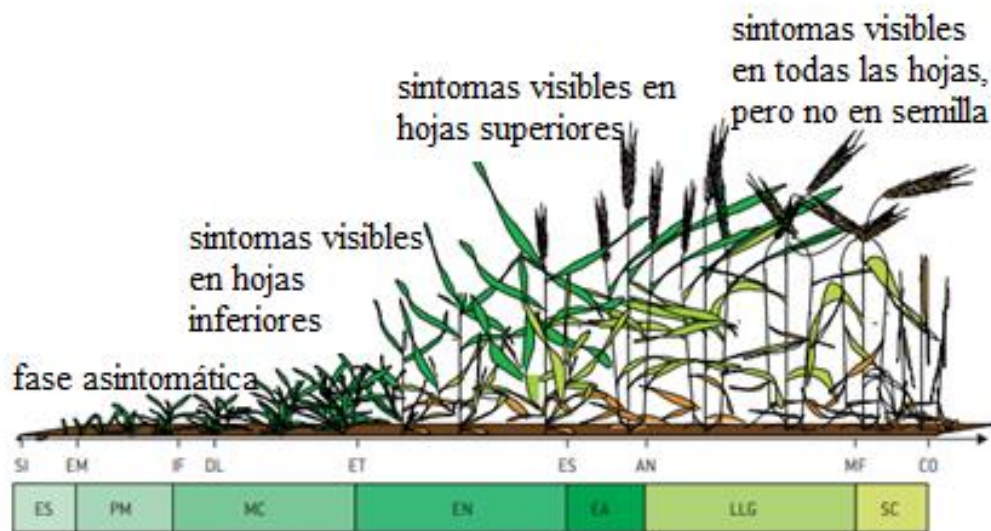


Figura No. 6. Ciclo del cultivo de cebada y las etapas sintomatológicas de ramulariosis

Fuente: adaptado de Miralles et al. (2014).

En macollaje suele ubicarse en las hojas inferiores que mueren de forma natural o como consecuencia de estrés. En floración dado el ciclo del cultivo se produce un importante estrés natural para las plantas, generando condiciones propicias para el desencadenamiento de la producción de rubelinas que contribuyen al desarrollo de los síntomas de ramulariosis, teniendo así las condiciones ideales para el desarrollo de la epifítia, los síntomas son evidentes en las hojas superiores (Figura No. 6, Carmona y Sautua 2015, Havis et al. 2015b).

En el caso de la etapa semilla no es posible detectar la presencia del patógeno con los métodos tradicionales por lo que se debe recurrir a métodos moleculares (Carmona y Sautua 2015, Pereyra y Pérez 2017). Rcc infecta todas las capas de la semilla, en etapas iniciales de la infección se encuentra entre el pericarpio y aleurona, luego infecta al embrión, colonizado el coleóptilo y primera hoja, en esta etapa el

crecimiento de Rcc es endófito, en el micelio endofítico se produce el crecimiento masivo de hifas, las que esporulan a través de estomas, induciendo así un colapso masivo de tejido del mesófilo y posterior expresión de síntomas (Kaczmarek et al., 2016).

2.5 EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD

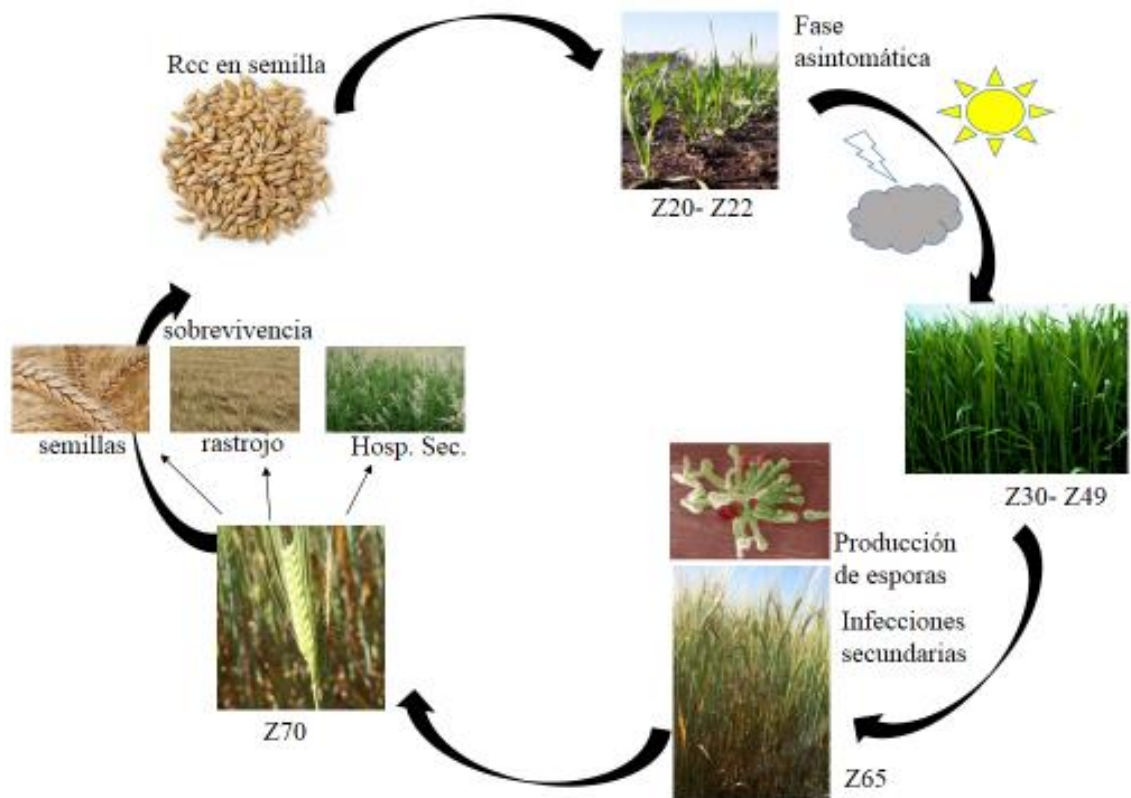
En Uruguay, pese a la poca información nacional, se puede suponer que el inóculo en la semilla es la fuente principal de Rcc (Figura No. 7), debido a la ocurrencia de epifitias en zonas donde no hay cultivos cercanos ni presencia de rastrojo (Pereyra et al., 2017). Considerando esto la introducción de Rcc a nuevas áreas depende de la infección en las semillas, por lo que es fundamental y de gran utilidad la detección y cuantificación del patógeno en la misma.

El rastrojo es una importante fuente de inóculo para algunas manchas foliares, sin embargo, en el caso de Rcc no se conoce su importancia epidemiológica (Walters et al. 2008, Pereyra 2013a). En relación a sus hospederos Sprague (1950), menciona que además de estar presente en *Hordeum* spp., también se ha detectado en gramíneas como *Triticum* spp. *Secalis* spp., *Phalaris arundinacea*, *Festuca kingii*, *Lolium multiflorum* Lam y *Lolium perenne* L. En Suiza Rcc fue aislada de *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Dest., *Avena sativa* L., *Poa pratensis* L., *Lolium perenne* L., y en *Agropyron repens* L. Beauv. (Frei y Gindro, 2015). Stabentheiner et al. (2009) mencionan que Rcc coloniza las hojas muertas de maíz, además confirmaron la infección en material verde del mismo cultivo (Figura No. 7).

Las condiciones ambientales son un factor muy importante, junto con la presencia del patógeno y huésped, los que conforman el triángulo de la enfermedad (patógeno virulento, huésped susceptible y ambiente favorable para el patógeno (Agrios, 2011). Dentro de las condiciones ambientales las lluvias juegan un rol importante en la dispersión de las esporas (Carmona y Sautua, 2015).

Además, proporciona las horas de mojado foliar para completar las etapas del ciclo del patógeno (germinación, penetración y establecimiento del hongo); la duración del mojado foliar está asociado a la severidad alcanzada por la enfermedad (Carmona y Sautua 2015, Havis et al. 2015b).

Generalmente ramulariosis se presenta formando parte de un complejo asociado a un componente abiótico, como lo es sequía, exceso hídrico, alternancia de periodos de secado-mojado, calor, frio, deficiencias nutricionales, etc. causando estrés en la planta. La alternancia de períodos de mojado foliar seguido de días secos y soleados son las condiciones más predisponentes para esta enfermedad (Pereyra, 2013a).



Las flechas en negrita marcan el ciclo del patógeno, mientras que las flechas negras continuas muestran las relaciones entre las etapas del ciclo del patógeno y del cultivo. La escala utilizada para mostrar las etapas del ciclo del cultivo es la escala propuesta por Zadoks et al. (1974).

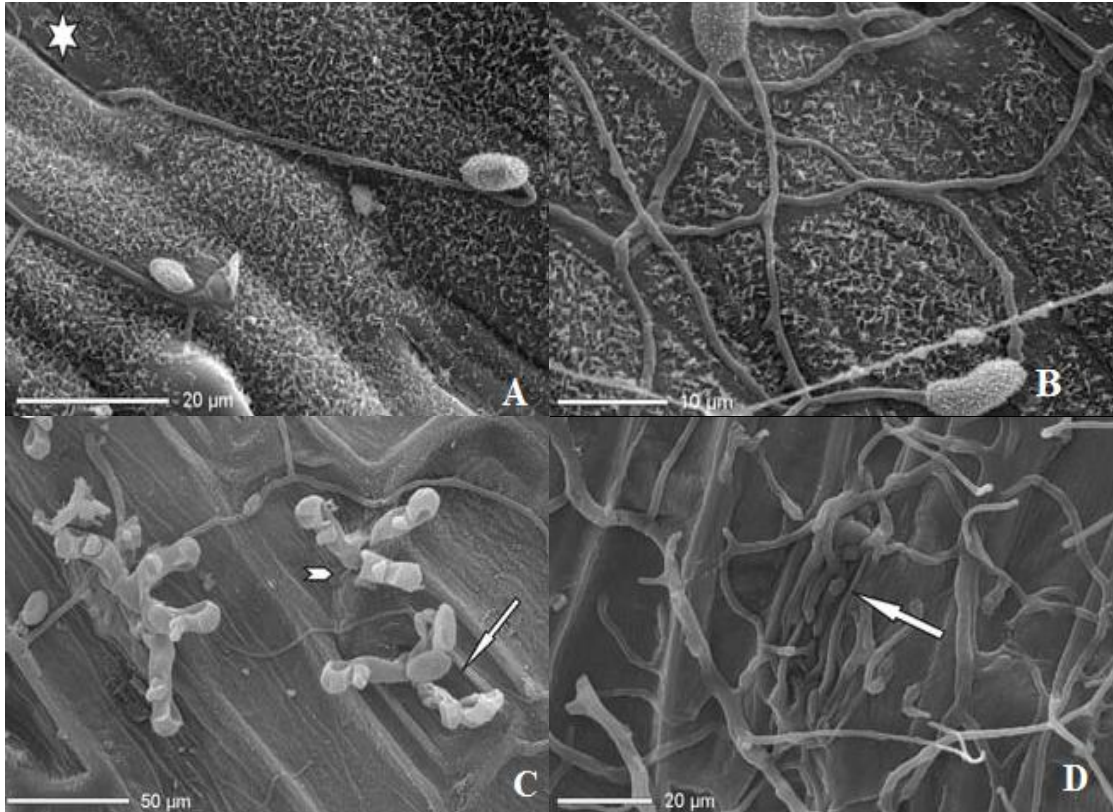
Figura No. 7. Ciclo de *Ramularia collo-cygni*

Fuente: adaptado de Havis et al. (2015a).

Para la germinación de los conidios de Rcc se requiere agua libre como la mayoría de los hongos. Estos conidios en presencia de un huésped adecuado germinan y se desarrollan rápidamente con la entrada a la hoja a través de estomas abiertos, iniciando así el proceso de infección del patógeno (Figura No. 8a, Havis et al., 2014).

Dentro de la hoja el patógeno crece intercelularmente formando hifas ramificadas produciendo así una red densa que coloniza el mesófilo (Figura No. 8b y 8d). La esporulación se da en el tejido necrótico, con conidióforos emergentes a través de los estomas (Figura No. 8c), además Rcc crece preferentemente en la superficie abaxial de las hojas (Sutton y Waller, 1988). Al final del ciclo de vida de la planta los conidióforos pueden surgir de entre las células epidérmicas (Stabentheiner et al. 2009, Havis et al. 2014). Estos presentan en su extremo conidios (esporas). Los conidios son de color claro, presentando de 3 a más células (Agrios, 2011), mientras que su forma es ovoide a elipsoide, con una superficie verrugosa. En estudio realizado por Stabentheiner

et al. (2009) se encontraron 4.05×10^6 conidios en una planta severamente afectada, los cuales se estimaron contando los mismos en diferentes niveles de la planta (HB= hoja bandera, HB-1= hoja bandera menos 1, HB-2= hoja bandera menos 2, HB-3= hoja bandera menos 3). Estos también encontraron que en la superficie inferior de las hojas la producción de conidios era mayor en comparación con la superficie superior, además en las hojas más viejas (HB-3) se encontraron menos conidios que en las hojas más nuevas.



A= hifas creciendo en el estoma (estrella).

B= germinación de conidios, formando una red densa de hifas en la hoja.

C= grupos de conidios emergiendo de la superficie de la hoja (punta de flecha), y a través de los estomas (flecha).

D= red de hifas en lado interno de la hoja, concentradas en el estoma.

Figura No. 8. Micrografías microscópicas de *Ramularia collo-cygni* en la superficie de la hoja de cebada

Fuente: Stabentheiner et al. (2009).

2.6 MANEJO DE LA ENFERMEDAD

En la actualidad, el manejo de las enfermedades en cultivos requiere la integración de diferentes medidas de control, debido a que el cultivo está expuesto a varios patógenos simultáneamente (Agrios, 2011). La integración de varias medidas de manejo, hace al manejo integrado de las enfermedades, lo que resulta eficiente y a su vez más económico que la implementación de dichas medidas de forma aisladas (Pérez y Gepp, 2002).

2.6.1 Manejo por resistencia genética del cultivar

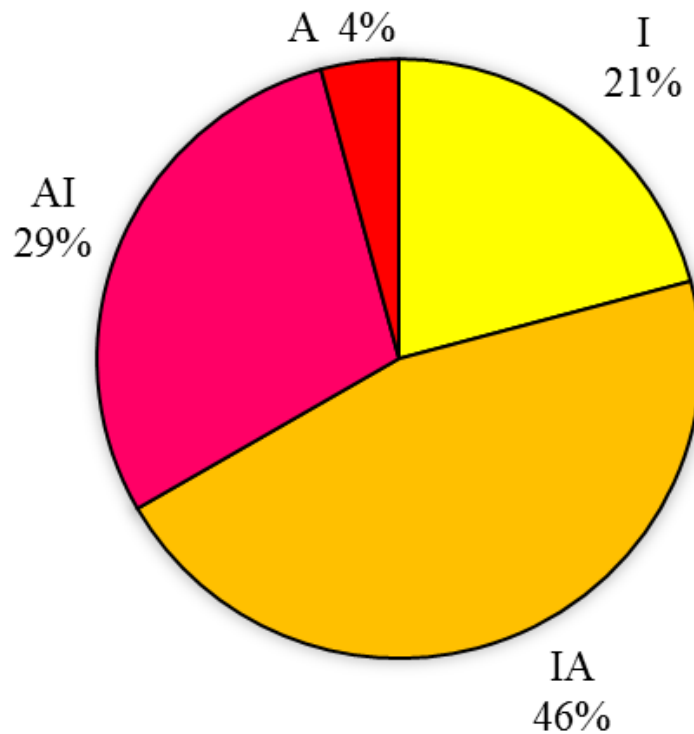
A nivel mundial no se ha reportado inmunidad frente a ramulariosis, existiendo variabilidad en el comportamiento de los cultivares evaluados. A pesar de que existe evidencia que posiciona la resistencia genética como una medida eficaz para lograr un control eficiente frente a ramulariosis, trabajos realizados por Leistrumaité y Liatukas (2006), muestran la variabilidad en la susceptibilidad de algunos cultivares, y que algunos son más afectados que otros, concluyendo que la mayor severidad se desarrolló en años secos y soleados, consecuencia de la influencia de la alta radiación solar sobre la actividad de la toxina rubelina y una menor competencia con otras enfermedades.

Ensayos realizados en Noruega por Reitan y Salamati (2006), en los cuales se evaluó la resistencia genética de las variedades de cebada, se llegó a la conclusión de que no se había encontrado hasta ese momento una resistencia completa frente a ramulariosis. Continuando con la misma línea de investigación Bistrich et al. (2006), realizaron ensayos de campo en los que evaluó tanto genotipos, como líneas avanzadas de cría, así como también más de 1200 accesiones del banco de genes; los resultados mostraron que los peores comportamientos frente a ramulariosis se observaron en los cultivares que tienen el gen *mlo* (con resistencia a oídio), mientras que los cultivares con un mejor comportamiento no tenían este gen. Se encontraron resultados similares por parte de Pinnschmidt y Sindberg (2006), Makepeace et al. (2006), respecto al comportamiento de los cultivares con el gen *mlo*.

En esta misma línea de investigación Oxley et al. (2008) concluyen que la presencia del gen *mlo* con resistencia a oídio tiene un efecto importante sobre el aumento de la expresión de ramulariosis dependiendo de las condiciones ambientales.

Matusinsky et al. (2013) testearon 144 cultivares de cebada en tres localidades de la República Checa durante tres años (2009-2011), con este trabajo concluyeron que no había resistencia frente a Rcc, observando variación entre los cultivares, además concluyen que la intensidad de la infección por parte de Rcc fue influenciada por la ubicación y el año.

En Uruguay todos los años se realizan ensayos de caracterización de cultivares, llevados a cabo en el marco del convenio INASE-INIA, en los que se analiza el comportamiento sanitario de los cultivares que se encuentran en producción y los que están en evaluación. Ésta es una herramienta útil a la hora de la selección de cultivares para la siembra. Los cultivares evaluados presentan en general una susceptibilidad intermedia-alta frente a ramulariosis, lo que lleva a un control genético ineficiente (Figura No. 9).



Susceptibilidad A= alta, AI= alta-intermedia, IA=intermedia-alta I= intermedia. Porcentaje calculado en base a un total de 24 cultivares. Cultivares que presentan por ejemplo susceptibilidad IA-A, fueron asignados al nivel superior (A).

Figura No. 9. Proporción de cultivares de cebada cervecera según el comportamiento sanitario frente a ramulariosis, evaluados en el año 2016

Fuente: adaptado de Castro et al. (2017).

2.6.2 Manejo con fungicidas

En la actualidad hay limitantes en herramientas para el control de Rcc, siendo el manejo muy dependiente del uso de fungicidas. En este sentido tanto la elección del producto como el momento de aplicación son claves para maximizar la eficiencia de control (Pereyra, 2013b).

Aplicación de fungicidas en la etapa de semilla es esencial para reducir el inóculo en la semilla. En este marco Zamani-Noor (2011), probó diferentes fungicidas curasemillas en el cual se aplicaron tres fungicidas comerciales con los siguientes principios activos: 1- fluoxastrobina + tebuconazol + protioconazol + triazóxido; 2- cyprodinil + fludioxonil + tebuconazole y 3- ciproconazol + imazalil. Los resultados mostraron que esta última mezcla fue la más eficiente, aunque no logró eliminar al hongo por completo.

En Escocia en los años 2010/2011 se realizaron ensayos probando diferentes tratamientos de semillas, uno de los cuales estaba basado en el control de Rcc mediante curasemillas: protioconazol + triazóxido + tebuconazol, en tres variedades Cocktail, Optic y Decanter dando como resultado una disminución significativa de la enfermedad, medida como área de bajo de la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC, Havis et al., 2012).

Dada la importancia de la semilla como fuente de inóculo de Rcc en Europa se han recomendado niveles de concentración de ADN de Rcc de riesgo de desarrollo de epifitía, según la concentración del ADN del hongo en la semilla. Se recomienda que los niveles de infección se mantengan lo más bajo posibles en las regiones donde la enfermedad no es endémica, debido a que la sanidad de la semilla es un factor importante para evitar la propagación de la enfermedad (Oxley y Havis, 2010).

En el caso de Inglaterra se recomiendan niveles por debajo de 1 pg ADN de Rcc/100 ng de ADN total. Mientras que para el Norte y Oeste del Reino Unido se recomiendan niveles por debajo de los 5 pg ADN de Rcc/100ng de ADN total. (Oxley y Havis, 2010).

Havis et al. (2015b) realizaron la cuantificación de ADN de Rcc en muestras de semillas archivadas desde 1958 al 2007, las que fueron segregadas según un nivel de 1 pg. ADN de Rcc/100 ng de ADN total. Los resultados indican que Rcc estaba presente en en Reino Unido antes de la primera descripción botánica. Además, los niveles de infección han aumentado desde principios de siglo.

En relación a los fungicidas curasemillas en Uruguay, actualmente se están realizando experimentos por parte de Facultad de Agronomía conjunto con INIA, con el fin de evaluar dos fungicidas comerciales para el control de ramulariosis en cebada, en dos lotes de semillas con nivel de infección contrastantes -bajo y alto- estos se llevarán a

cabo en campo y condiciones controladas. Con el objetivo de cuantificar el nivel de enfermedad tanto en semilla como en plántula mediante qPCR, hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, y el rendimiento en grano en ambas condiciones (Palladino et al., 2017).

En cuanto al producto foliar a utilizar, en Escocia, se evaluaron diferentes fungicidas, de los cuales prothioconazol y clorotalonil, fueron los más eficaces para el control, mientras que epoxiconazol proporciona niveles moderados de control, y las quinonas (ej: azoxistrobin) han perdido eficiencia cuando se las compara con experiencias anteriores (Oxley et al., 2006).

En esta misma línea de investigación en Dinamarca Jorgensen y Christiansen (2006) evaluaron distintos fungicidas foliares y momentos de control, y concluyeron que el control más efectivo se logra con aplicaciones entre encañazón y mitad de espigazón, mientras que aplicaciones después de floración mostro un menor control; siendo los fungicidas más eficientes prothioconazol, clorotalonil y boscalid (anilidas). Resultados similares fueron reportados por Christiansen et al. (2006). Mientras que en Francia Laurent (2006), confirmó la eficacia de la mezcla de triazol + clorotalonil.

Los resultados obtenidos en experimentos nacionales dan como resultado que aplicaciones tempranas, en Z33 (encañazón, cuando se detecta temprano la enfermedad), marcan una gran diferencia en el control de la enfermedad en comparación con el testigo sin aplicación (Figura No. 10), dada la poca residualidad de los productos si se realiza una segunda aplicación se genera, así un mayor control por ejemplo en Z47 (embuche). Una aplicación temprana o una tarde en el ciclo del cultivo no aseguran un control eficaz (Figura No. 10), ya sea por residualidad del producto o por nivel de infección del cultivo (Pereyra y Pérez, 2017), por lo cual el estado fenológico no es un correcto indicador del momento de aplicación.

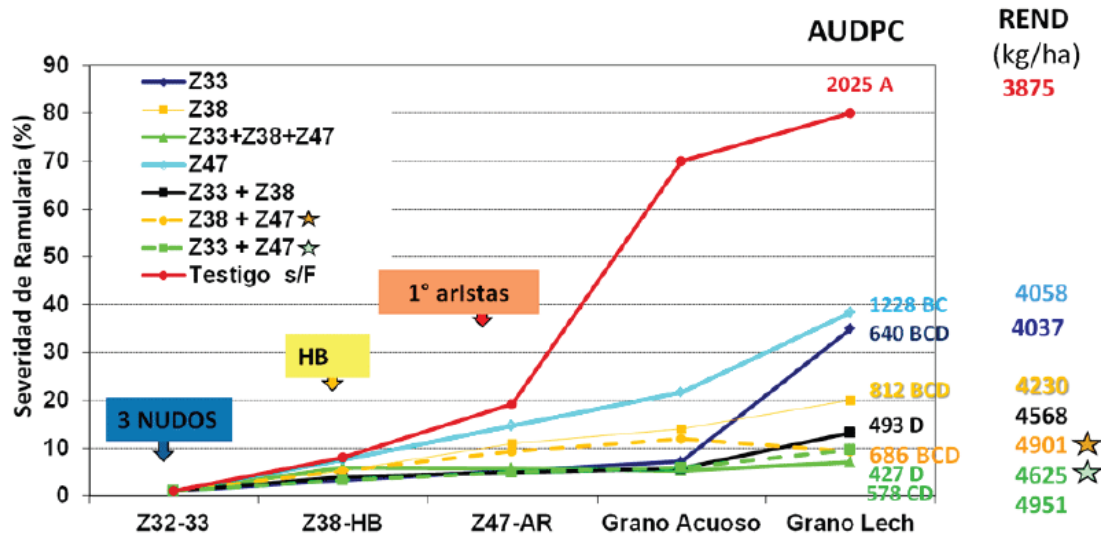


Figura No. 30. Severidad de ramulariosis, área bajo la curva de progreso de la enfermedad y rendimiento en grano según distintos momentos de aplicación de fungicida mezcla de estrobilurina y carboxamida

Fuente: Pereyra y Pérez (2017).

El momento de aplicación para el manejo de ramulariosis dependerá del momento de detección de la enfermedad y de las condiciones climáticas, ya que el cultivar presenta gran susceptibilidad frente a la enfermedad. Además, actualmente no hay una estrategia fija para su manejo, este debe ajustarse en cada situación productiva (Pereyra y Pérez, 2017).

En general a nivel nacional, el manejo de las enfermedades de los cereales de invierno se realiza mediante monitoreo y uso de niveles críticos. Sin embargo, debido a que Rcc presenta una etapa asintomática, la utilización de niveles críticos es de alto riesgo, por lo que el momento de intervención estará definido por el monitoreo luego de elongación del tallo (Z31) y aplicación ante la aparición de los primeros síntomas para lograr la mayor eficiencia de control y la menor interferencia de la enfermedad con el cultivo. Siendo los fungicidas más eficientes en los ensayos experimentales las carboxamidas, protioconazol y clorotalonil, estos son utilizados por otros países y son recomendados para Uruguay (Pereyra 2013b, Pereyra y Pérez 2017).

En los sistemas agrícolas tanto a nivel mundial, y nacional se utilizan fungicidas para controlar las enfermedades problemas en cada zona, para reducir la interferencia de las enfermedades fúngicas sobre el rendimiento y la calidad del grano. Debido a la aplicación de fungicidas en exceso con el tiempo algunos patógenos se han vuelto resistentes a muchos de los fungicidas efectivos, afectando así el control de las enfermedades. La mutación es el mecanismo por el cual un hongo adquiere resistencia a

un fungicida, que está dada por la capacidad de sobrevivir y reproducirse en presencia de un fungicida (Beckerman 2013, Lucas et al. 2015).

Los principios activos utilizados para el control de ramulariosis a nivel mundial presentan diferentes sitios de acción por lo que la rotación de estos puede disminuir el riesgo de generación de resistencia, aunque ya existen casos probados de disminución de sensibilidad a principios activos como el caso de los fungicidas Qol (inhibidores de quinona, Fountaine y Fraaije 2009, Matusinsky et al. 2010).

En vista de la no respuesta al agregado de fungicidas como las estrobilurinas, en estos últimos años, se realizaron una serie de experimentos para determinar si Rcc adquirió resistencia a este tipo de fungicidas, ya que éstos eran los fungicidas más utilizados para su control. En este sentido Fountaine y Fraaije (2009), concluyeron que en Escocia el control de ramulariosis estaba basado principalmente en aplicaciones de azoxistrobin, pero a partir del año 2002 hubo una fuerte disminución de la eficacia de estos fungicidas. Estudios realizados en el año 2009 demostraron que hubo un desarrollo de resistencia a los fungicidas Qol por parte de Rcc, debido a una mutación en el codón 143, resultante en la sustitución de una glicina por una alanina (G143A), confiriéndole así al hongo una resistencia completa a estos fungicidas.

A su vez en República Checa también se realizaron experimentos por parte de Matusinsky et al. (2010), quienes recolectaron y aislaron 302 cepas de Rcc provenientes de 12 localidades, encontrando que el 47 % de los aislados presentaron alelos de resistencia a las estrobilurinas. Este trabajo concluyó que la frecuencia de la mutación de G143A por localidad depende de la frecuencia de aplicación de estrobilurinas para el control de las enfermedades en cebada, llegando a un máximo de 100 %, mientras que en lugares donde no se aplicaba estrobilurinas la frecuencia de los alelos mutantes fue del 5 %.

2.6.3 Manejo por prácticas culturales

Se sugiere la eliminación de plantas guachas u hospedantes susceptibles (ej. *Lolium spp.*), como una medida cultura efectiva, aunque en los sistemas de producción de cultivos continuos es poco práctico dada la necesidad de la implementación de herramientas como el arado para enterrar el rastrojo (Carmona et al. 2013, Koric et al., citados por Havis et al. 2015b).

La rotación de cultivos es una de las técnicas principales para el manejo de patógenos que sobreviven en el rastrojo, basándose en la muerte de estos por inanición (Pérez y Gepp, 2002), pero para ramulariosis actualmente no se conoce la importancia epidemiológica del rastrojo (Walters et al. 2008, Pereyra 2013a).

Para la disminución del inóculo en semilla se han propuesto tratamientos tales como la utilización de tratamientos de calor, en esta línea de investigación, Zamani-Noor (2011) realizó experimentos de agua caliente, probando diferentes temperaturas (48, 50 y 52 °C) y duración del tratamiento (5, 10, 15, 20,25 y 30 minutos), mostrando como resultado que se reduce el nivel de ADN del hongo pero que el porcentaje de germinación se reduce de 80 % a 54 % con el pasaje de 48 °C a 52 °C, además disminuye a 5 % de germinación si la duración pasa de 5 a 30 min en 52°C, el aumento de la duración disminuye la germinación independientemente de la temperatura, la temperatura y duración del tratamiento más satisfactorio fue a 48 °C por 5 min.

Otros reportes también utilizan agua caliente (2 horas a 52 °C seguido de 72 horas a 25 °C) o microondas (por 25 o 30 segundos) para la disminución del ADN del hongo en la semilla, aunque hasta ahora no hay respuesta significativa en rendimiento con la utilización de los mismos, se observó una disminución significativa de la enfermedad medida como AUDPC en las variedades Cocktail, Optic y Decanter en el 2010/2011 (Havis et al., 2012).

2.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los síntomas y signos muchas veces son insuficientes para el diagnóstico de determinadas enfermedades (Riley et al., 2002), en el caso de ramulariosis dado que los síntomas se confunden con otras enfermedades (Carmona et al., 2013), sumado a la presencia de una etapa asintomática (Carmona y Sautua, 2015), es necesario acudir a técnicas de laboratorio.

Entre estas técnicas se encuentra la incubación de material vegetal mediante placas de Petri, esta técnica consiste en colocar una muestra de material vegetal junto con papel filtro humedecido, formando una cámara húmeda lo cual permite el crecimiento del patógeno induciendo así la esporulación del mismo (Riley et al., 2002). Otra técnica es el aislamiento e identificación del patógeno, que requiere la colocación de material vegetal infectado en diferentes medios de nutrientes, o en medios específicos si se sospecha de un patógeno en particular, el objetivo es obtener un cultivo puro para la identificación del mismo (Riley et al., 2002). Dado que Rcc es un hongo de crecimiento lento in vitro, estas técnicas podrían generar resultados erróneos (Walters et al., 2007).

Otros métodos a utilizar para el diagnóstico pueden ser serológicos como el test denominado Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), y técnica molecular como Polymerase Chain Reaction (PCR) y Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR, Riley et al., 2002).

Las técnicas moleculares como PCR son utilizadas actualmente porque con ella ha sido posible la amplificación de fragmentos particulares de ADN, con capacidad de

amplificar muchas muestras en simultáneo (Lee, 2017). Schena et al. (2004), argumentan que con qPCR aumenta las oportunidades para detectar y estudiar hongos fitopatógenos, debido a que se combina la sensibilidad de PCR, con la generación de una señal fluorescente específica, lo que proporciona un análisis en tiempo real de la cinética de la reacción, permitiendo la cuantificación de dianas específicas de ADN.

Para el análisis de PCR se desarrollaron dos tipos de productos químicos que detectan productos de PCR, TaqMan y SYBR. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica para permitir la detección de un producto de PCR específico a medida que se acumula durante los ciclos de PCR. Mientras que los reactivos SYBR Green utilizan el fluorocromo SYBR® Green I, que es un fluorocromo de unión a DNA bicatenario que sirve para detectar productos de PCR cuando se acumulan durante los ciclos de PCR (ThermoFisher scientific, 2019).

TaqMan funciona construyendo una sonda oligonucleotídica que contiene un colorante fluorescente indicador en el extremo 5' y un colorante extintor en el extremo 3', mientras estos estén próximos el colorante extintor inhibe la fluorescencia del colorante indicador. En caso de estar presente la secuencia objetivo, la sonda es degradada por la acción del ADN polimerasa Taq. Esta escisión de la sonda separa el colorante indicador del extintor, aumentando así la fluorescencia del indicador. Con cada ciclo las moléculas del colorante se escinden de sus sondas, como resultado se produce un aumento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido (Figura No. 11, Thermo Fisher scientific, 2019).

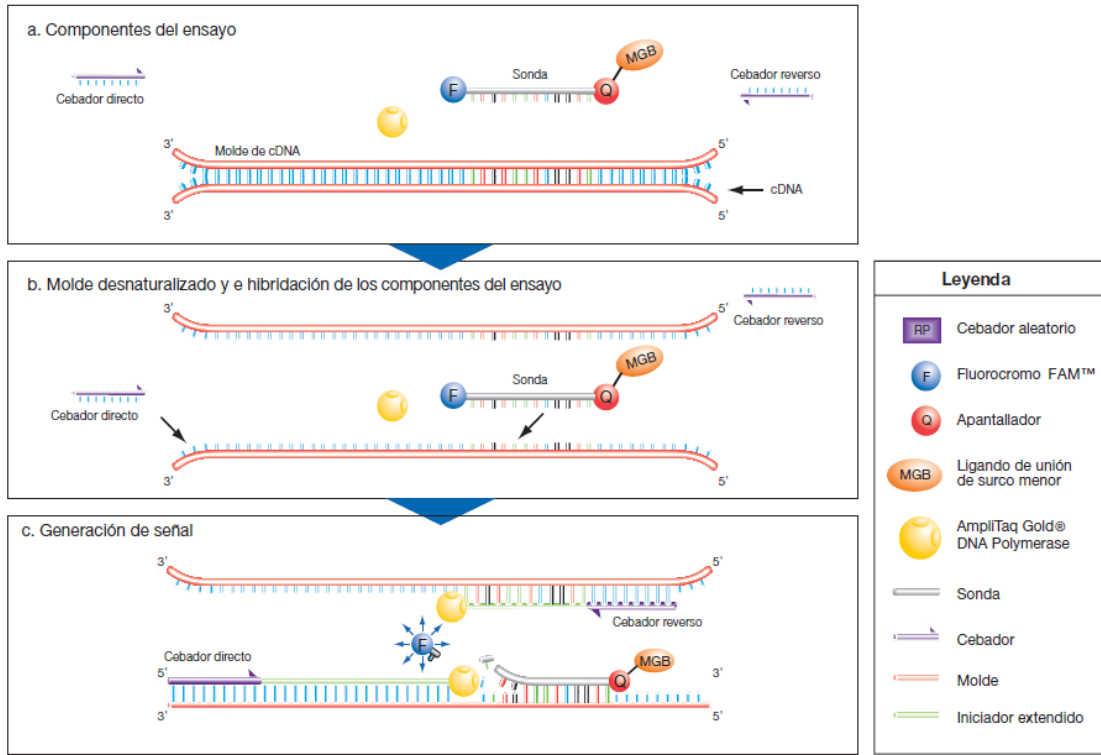
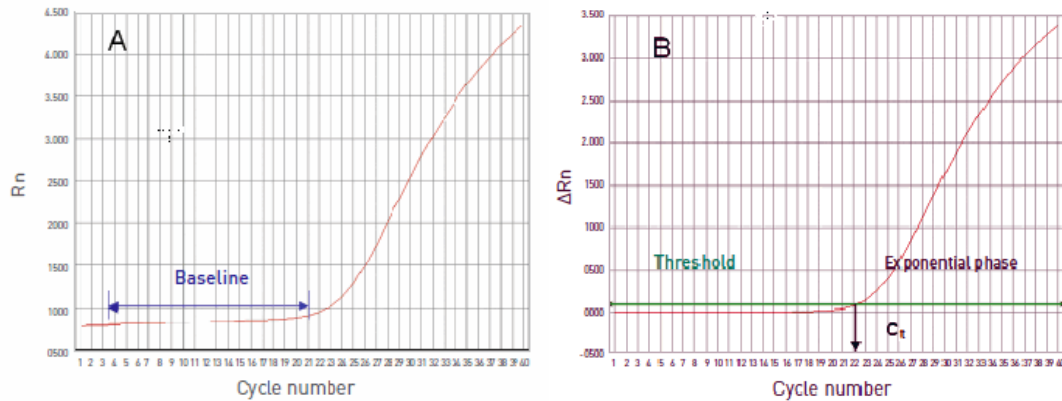


Figura No. 11. Proceso de PCR con tecnología TaqMan

Fuente: Applied Biosystem (2010).

Para la evaluación de una reacción de qPCR hay que considerar varios aspectos de la qPCR, esta tecnología muestra la cantidad de secuencias de ADN que está presente en una muestra de una manera sencilla mediante gráficas (Figura No. 12) y cuadro de datos.



A= R_n (fluorescencia del fluorocromo normalizada), en función del número de ciclo de PCR.

B= ΔR_n (magnitud de la señal de fluorescencia normalizada), en función del número de ciclos de PCR.

Figura No. 12. Gráfica de amplificación de ADN, recolectadas de software de instrumento de qPCR

Fuente: Thermo Fisher scientific (2019).

Las gráficas de amplificación permiten ver la amplificación de las muestras a medida que el instrumento recoge datos de fluorescencia durante un proceso. En la que R_n (Figura No. 12a) es la fluorescencia de fluorocromo del indicador normalizada, R_n en función del número de ciclo de PCR sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares. ΔR_n (Figura No. 12b) es la magnitud de la señal de fluorescencia normalizada que genera el proceso de PCR, y son los datos a partir de los cuales se calcula C_t (ciclo umbral), esta gráfica es útil para identificar las amplificaciones irregulares y para ver los valores de línea umbral y de la línea base del proceso (Thermo Fisher scientific, 2019).

C_t (Figura No. 12b) es la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral, es una medida relativa de la concentración de objetivo en la reacción de PCR, o sea es el número de ciclos de PCR en el que el nivel de fluorescencia alcanza la línea umbral. Los valores deseables de C_t son > 8 y < 35 . Si el valor C_t es < 8 , eso indica que en la reacción hay demasiado molde. Si el valor C_t es > 35 , eso indica que en la reacción hay poca cantidad de diana; si los valores C_t son > 35 , es de esperar que haya una desviación estándar mayor (Applied Biosystem 2010, Thermo Fisher scientific 2019).

El análisis de qPCR brinda la posibilidad de observar C_t en función de concentración de ADN medida como \log_{10} , mediante una curva estándar (Figura No. 13).

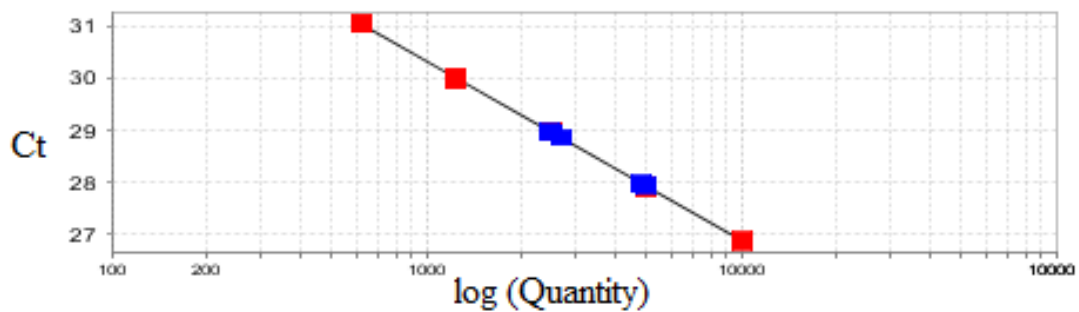


Figura No. 13. Curva estándar de qPCR

Fuente: Applied Biosystem (2010).

Para el análisis de la curva estándar, se deben tener en cuenta parámetros tales como pendiente de la curva, eficiencia de amplificación, coeficiente de correlación (R^2).

Una pendiente próxima al $-3,32$ indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%, la eficiencia de la amplificación se calcula utilizando la pendiente de la recta de regresión en la curva estándar. El valor R^2 mide la proximidad del ajuste entre la recta de regresión y los puntos de datos Ct individuales de las reacciones estándar. El valor 1,00 indica un ajuste perfecto entre la recta de regresión y los puntos de datos, es deseable que el valor R^2 sea $> 0,99$. Y-inter, muestra el valor en donde la línea de regresión cruza el eje Y, la intersección con el eje Y indica el ciclo umbral esperado para una muestra con una cantidad igual a 1 (Applied Biosystem, 2010).

La técnica de PCR ha permitido realizar investigaciones para la comprensión de la epidemiología de Rcc (Walters et al., 2007). Havis y Oxley (2006a) en su trabajo realizaron estudios para la mejor comprensión del ciclo de vida del patógeno, llegando a la conclusión que el hongo se puede detectar antes la aparición de los síntomas, con un intervalo máximo de 28 días ante la aparición de los mismos. También en sus experimentos se encontraron resultados positivos en todas las variedades analizadas en los 60 días post/siembra, además se detecta la presencia del patógeno en la semilla, lo que da pie a nuevas investigaciones en esta área.

Dada la importancia de conocer la carga fúngica de Rcc, Taylor et al. (2010) han realizado el ajuste de la técnica de qPCR para la detección de Rcc en semilla, la cual permite medir de manera indirecta la concentración de ADN del hongo en la semilla.

El ajuste de esta herramienta permitió conocer la transferencia del patógeno de semilla a plántula y determinar la ubicación del hongo en la semilla, se llegó a la conclusión que el patógeno se puede transmitir de semilla a plántula y se ubica en la semilla tanto en tejido embrionario como en tejido no embrionario (Matusinsky et al. 2011, Havis et al. 2014).

En cambio, a nivel nacional no hay antecedentes respecto a la detección y cuantificación de Rcc en semilla de cebada cervecera, mediante qPCR, por lo tanto este trabajo pretende validar la técnica propuesta por Taylor et al. (2010) y los ajustes realizados por Havis et al. (2015a), considerando los cultivares utilizados, el inóculo y las condiciones ambientales de Uruguay. Se plantean dos hipótesis: 1) es posible cuantificar el nivel de infección de Rcc en la semilla de cebada mediante qPCR; 2) existen diferencias en el nivel de infección de Rcc en semilla bajo diferente número de aplicación de fungicida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PUESTA A PUNTO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Ramularia collo-cygni*

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y de Biología Molecular de la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, ubicado en Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay.

3.1.1 Extracción de ADN desde una cepa de *Ramularia collo-cygni*

Para la extracción de ADN se utilizó una cepa de Rcc (Rcc3), que fue aislada a partir de hojas de cebada con síntomas típicos de la enfermedad que forma parte de la colección de INIA La Estanzuela. La cepa fue multiplicada en placas de Petri con PDA (Papa dextrosa agar, Anexo No. 1), con cloranfenicol (34 mg/ml), e incubadas a 20 °C durante 10 días con luz cercana a UV permanente.

Se evaluaron diferentes métodos, dos protocolos convencionales y dos kits comerciales: i) Método CTAB modificado, ii) Protocolo de extracción de ADN adaptado de Arruabarrena et al. (2016), iii) ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™, y iv) Plant DNAZOL (Qiagen).

El Método CTAB se basa en el protocolo descrito por Cerda-Granados y Díaz (2013) al cual se le realizaron modificaciones, el método ajustado se detalla a continuación. Luego de tomar un trozo de 2 cm² de micelio del hongo desde la placa de Petri, y colocarlo en un tubo Eppendorf (1,5 ml, Tarson, India), se agregaron cinco bolillas de vidrio (1 mm, HEINZ HERENZ, Alemania) y tierra de diatomaceous (Celite® 500 fine), luego se procedió a homogenizar las muestras por 1 min a 30 Hz en TissueLyser II (QIAGEN®). A esta mezcla se le agregó 375 µl de TES Buffer y 25 µl de Proteinasa K, homogeneizando nuevamente a 1 min a 30 Hz en TissueLyser II (QIAGEN®) para luego incubar a baño maría (J.P. SELECTA, Precistern) por 60 min a 60 °C.

Posteriormente se agregó 135 µl de 5 M NaCl (0,3 volumen) y 60 µl de 10 % CTAB (0,1 volumen), luego se procedió a incubar nuevamente a baño maría (J.P. SELECTA, Precistern) a 65 °C por 10 min. A la mezcla se le agregó 645 µl de cloroformo: isoamylalcohol (24:1, 1 volumen) invirtiendo varias veces el tubo para mezclar, incubando el tubo en hielo por 30 min.

Se colocó el tubo Eppendorf en una centrífuga (Labnet International Inc. SPECTRAFUGE 24 D), por 10 min a 10.000 rpm. Se obtuvo así un sobrenadante, el

mismo fue transferido (400 µl) a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml con micro pipetas de 200 µl agregando 200 µl de isopropanol (0,55 volumen), e invirtiendo varias veces. Se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm retirando el sobrenadante y se lavó el pellet con 750 µl de etanol 70 %, centrifugando a 10.000 rpm por 30 s para fijar el pellet al tubo y descartar sobrenadante. El lavado se repitió centrifugando a 10.000 rpm por 5 s y retirando el etanol con pipetas de 20 µl y luego los tubos se dejaron secar por 15 min. Finalmente se agregó 50 µl de TE Buffer para disolver el pellet dejando 12 h a temperatura ambiente. Luego de pasado el tiempo, el ADN extraído se conservó en la heladera para su posterior utilización.

El segundo protocolo convencional se basó en el descrito por Arruabarrena et al. (2016). En este caso también se parte de 2 cm² de micelio del hongo el cual se molió con nitrógeno líquido (N₂) obteniendo un polvo fino, al que se le agregó 600 µl de “Cell lysis solution” (Anexo No. 2). Luego se homogeneizó rápidamente e incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 200 µl de “Protein DNA precipitation solution” (Anexo No. 2) procediendo a homogeneizar (invirtiendo el tubo varias veces) e incubó en hielo durante 10 min.

Pasado el período se colocó en una centrifuga (Labnet International Inc. SPECTRAFUGE 24 D) a 16000 g durante 16 min. Obteniendo un sobrenadante, el que se transfirió a un tubo nuevo (600 µl aprox.), repitiendo la misma centrifugación para limpiar nuevamente el pellet. Seguido se agregó 600 µl de isopropanol invirtiendo el tubo para homogeneizar, posteriormente se centrifugó a 16000 g durante 5 min descartando el sobrenadante, luego se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 16000 g durante 3 min, descartando nuevamente el sobrenadante. El pellet se dejó secar durante 5-10 min. Finalmente, se re suspendió en 50 µl de TE-RNAsa (concentración final de RNAsa en buffer TE: 0,05 mg/ml, 10 µl en 2 ml de TE), y se dejó toda la noche a 4 °C en heladera.

Para los protocolos comerciales se utilizó una diferente medida (g) de micelio del hongo, en la extracción de ADN mediante ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ se utilizó 100 mg de micelio, luego se siguieron las indicaciones del proveedor. Mientras que en el kit Plant DNAzol (QIAGEN), se partió de una muestra de micelio del hongo de 0,5 g, previamente molida con N₂ como sugieren las indicaciones del proveedor.

Luego de la extracción, se estimó la concentración de ADN por los diferentes métodos, mediante espectrofotometría (espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific) determinando la concentración y la pureza de la muestra de ADN. La ley de Lambert-Beer indica que la concentración de una molécula en la solución depende de la cantidad de luz absorbida por las moléculas presentes. Una característica del ADN es que absorbe la luz UV a 260 nm, permitiendo estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica, en el caso de ADN genómico una densidad óptica equivale a 50 µl/ml (Lehninger, 1979).

La concentración de ADN de las muestras se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la calidad de las muestras se examinaron mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, el rango de dichas relaciones que son aceptadas como ADN de buena calidad son 260/280= 1,8 y 260/230= 1,8-2,2. Para la relación 260/280 un valor menor indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, mientras que un valor mayor puede deberse a la presencia de ARN. Para la relación 260/230 un valor menor indica presencia de contaminantes como fenoles (Thermo Fisher scientific, 2009).

Se seleccionó la muestra de ADN con la mayor concentración y mejor calidad. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con GoodView como indicador de tinción, a 28 V, 150 mA durante 1 h. Se reveló bajo visualizador de geles (ENDURO GDS TOUCH Labnet International, Inc.).

Para confirmar que efectivamente el ADN extraído correspondía a Rcc se realizó la amplificación mediante PCR en Labnet (Labnet International, Inc.). Los cebadores utilizados para la amplificación fueron: Rcc1 5'ACTGAGTGAGGGAGCAATCC '3 y Rcc5 5' GCAGAGGAGTTCGAGTCGTCGC '3 (Havis et al., 2006b). La reacción presentó un volumen final de 25 µl (Cuadro No. 3). El programa de termociclado fue: 4 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min., 72 °C durante 1 min y una extensión final de 10 min a 72 °C (Havis et al., 2006b). Posteriormente la muestra fue almacenada en freezer para su utilización.

Cuadro No. 3. Condiciones de reacción de PCR para la detección de *Ramularia collo-cygni*

Reactivos	Concentración	Volumen (µl)
DNTPs	10 µM	2,5
Cebador Rcc1	10 µM	1
Cebador Rcc5	10 µM	1
Taq. polimerasa (QIAGEN)	5 µ /µl	0,1
Agua miliQ estéril	-	13,9
MgCl ₂	25 mM	2
Buffer	10 x	2,5
ADN muestra	25 ng /µl	2
Total		25

Fuente: Havis et al. (2006b).

3.1.2 Curva de calibración

Se partió de una extracción de ADN que presentó buena calidad e integridad, con una concentración de 507 ng/µl, con relaciones de absorbancia de 260/280= 1,8; 260/230= 1,8. A partir de esta muestra se realizó una dilución con una concentración final de 10 ng/µl (los cálculos se realizan con la formula volumen inicial* concentración inicial= volumen final* concentración final).

Seguidamente se realizaron diluciones en base 5 partiendo de la solución de 10 ng/µl, de la cual se tomó 100 µl y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf (1,5 ml, Tarson, India) al que se le agregó previamente 400 µl de agua miliQ estéril para obtener un volumen final de 500 µl. A partir de esta última, se obtuvo otra dilución, se retiró de la misma 100 µl y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf con 400 µl de agua miliQ estéril, los pasos se repiten hasta obtener 8 diluciones (Figura No. 14). El rango de diluciones utilizado para la curva estándar fue entre la dilución 3 = 0,4 ng/µl a la dilución 9= 0,0256 pg/µl.

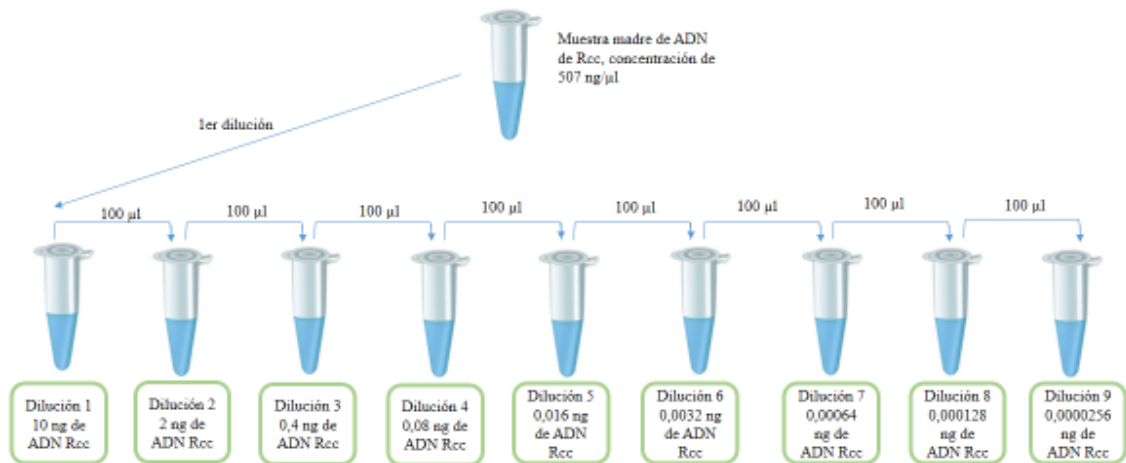


Figura No. 14. Esquema de diluciones de concentración conocida de ADN de Rcc, en un rango de 10 ng/μl y 0,0256 pg/μl

3.1.3 Condiciones de amplificación: qPCR

El método de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo a Taylor et al. (2010). Los cebadores utilizados fueron RamF6 (CGT CAT TTC ACC ACT CAA G), RamR6 (CCT CTG CGA ATA GTT GCC) y la sonda Ram6 (FAM-GCG ATT CCG GCT GAG CGG TTC GTC ATC GCG-BHQ-1, Taylor et al. 2010, Havis et al. 2015a), sintetizada por SBS Genetech Co. Ltd. (Beijing, China).

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems, siguiendo las condiciones establecidas por Taylor et al. (2010) y los proveedores del mismo. La reacción presentó un volumen final de 25 μl (Cuadro No. 4) y el programa de termociclado utilizado fue: un arranque caliente de 10 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s. Con una extensión final de 1 minuto a 95 °C (Taylor et al., 2010).

Cuadro No. 4. Condiciones de reacción para los ensayos en qPCR utilizados para la detección de *Ramularia collo-cygni*

Reactivos	Concentración	Volumen (μ l)
Mezcla madre de qPCR Universal MMIX II (Qiagen, Alemania)	2 x	12,5
Cebador RamF6	10 μ l	1
Cebador RamR6	10 μ l	1
Sonda	10 μ M	0,375
Agua miliQ estéril		5,125
ADN muestra	20 ng	5
Total		25

Fuente: Havis et al. (2015a).

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.2.1 Selección de lotes de semilla

La validación se realizó con 4 lotes de semilla de la variedad INIA Arrayán, caracterizada como de susceptibilidad intermedia- alta frente a ramulariosis (Cuadro No. 5, Castro et al., 2017). Las muestras de lotes de semilla provinieron de cultivos con diferentes momentos / números de aplicaciones de fungicidas para el control de ramulariosis. Los mismos fueron seleccionados sobre la hipótesis de que un mayor número de aplicaciones pudo haber resultado en un menor nivel de enfermedad en el cultivo y por lo tanto menor nivel de infección en la semilla.

Cuadro No. 5. Procedencia y número de aplicaciones durante la fase de cultivo de los distintos lotes de semilla de INIA Arrayán

Lote	Localidad	No. aplicación fungicidas
1	Paysandú	0
2	Paysandú	1
3	Paysandú	2
4	Soriano	0

3.2.2 Extracción de ADN de lotes de semilla

Para la extracción de ADN total en semilla se testearon los dos métodos convencionales y un kit comercial (Plant DNAzol, QIAGEN), descriptos anteriormente. Además, se evaluó ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™.

Se tomó una muestra de 150 g de cada lote de semilla y cada uno se molió con un molino universal (IKA M20). A partir de cada muestra molida se extrajo 0,1 g para luego realizar las extracciones de ADN según el método a evaluar.

Luego de la extracción de ADN total de semilla se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher scientific), siguiendo las instrucciones suministradas por el proveedor. Se seleccionó la extracción que presentó mayor concentración y relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 dentro del rango considerados como ADN de calidad.

3.2.3 Influencia de la matriz en la cuantificación de los lotes de semilla

Para el estudio de la influencia de la matriz se partió de la extracción de ADN total de una muestra de 0,1 g de semilla, la cual se sometió a dos diluciones con una concentración final de 0,2 ng/μl. A las mismas se le agregó una solución de ADN de Rcc con una concentración de 0,2 ng/μl y otra de 0,02 ng/μl (Cuadro No. 6).

Estas diluciones se corrieron junto con dos diluciones de ADN de Rcc con 0,2 y 0,02 ng/μl y dos blancos de agua miliQ estéril como control negativo. De esta forma se determinó si la matriz (ADN de semilla + reactivos de la extracción) tenía efecto en la capacidad del método en detectar las distintas concentraciones de ADN del hongo. Este

análisis se realizó también en el termociclador Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR.

Cuadro No. 6. Concentración de ADN para el análisis de matriz

ADN semilla cebada (ng)	ADN <i>Ramularia collo-cygni</i> (ng)
0	0,02
0	0,2
0,2	0
0,2	0,02
0,2	0,2

3.2.4 Cuantificación del nivel de *Ramularia collo-cygni* en los lotes de semilla

La cuantificación del nivel de infección de Rcc en los distintos lotes fue inferida a partir de la cuantificación de ADN fúngico en la semilla, asumiendo que la concentración de ADN de Rcc en el total de ADN extraído en la semilla se relaciona con el nivel de infección de Rcc en semilla.

Para estimar la concentración de ADN fúngico se utilizó la curva estándar antes descrita con las diluciones entre 0,4 ng/μl y 0,0256 pg/μl. Cada concentración de ADN de Rcc comprendida en la curva estándar, se ensayó por triplicado, mientras que las muestras con ADN de semilla se repiten dos veces por cada muestra. Se suma a esto dos blancos como muestras negativas, los cuales contienen agua miliQ estéril.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems, siguiendo las condiciones establecidas por Taylor et al. (2010) y los proveedores del mismo. Las condiciones de la reacción se detallan en el apartado de condiciones de amplificación de qPCR y el programa de temperatura utilizado fue: un arranque caliente de 10 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s. Con una extensión final de 1 minuto a 95 °C (Taylor et al., 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AJUSTE DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Ramularia collo-cygni*

4.1.1 Extracción de ADN de la cepa de *Ramularia collo-cygni*

En cuanto al crecimiento de la cepa de Rcc, se constató que es un hongo difícil de cultivar, de crecimiento lento, el cual comenzó a ser notorio luego de una semana en luz negra (cercana a UV, Zamani-Noor, 2011). Su desarrollo fue de 1-2 cm de diámetro en 10 días (Figura No. 15). Esto coincide con lo mencionado por Walters et al. (2007). La colonia presentó una coloración amarillo blanquecino, tal como lo describieron Salamati y Reitan (2006).



Figura No. 15. Aislados de *Ramularia collo-cygni* en placas de Petri en medio PDA

Con relación a los métodos de extracción de ADN, los kits comerciales ofrecieron ventajas sobre los métodos convencionales, dado que facilitaron la extracción

del ADN en menor número de pasos, lo que implicó una disminución en el tiempo de manipulación y se minimizó el riesgo de contaminación de las muestras durante la extracción y reduciendo el número de equipos utilizados. Por otro lado, estos kits son de alto costos lo que representa una desventaja.

El uso de los kits resultó en menor concentración de ADN medida mediante espectrofotómetro, comparados con los métodos convencionales. La calidad de la extracción del producto obtenido con los kits (analizada mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230), estuvieron por fuera del rango establecido como ADN de calidad (Cuadro No. 7).

Por el contrario, el método tradicional CTAB modificado aumenta el número de pasos del proceso, el tiempo de manipulación y el número de equipos utilizados. Además, utilizan sustancias tóxicas de alto riesgo para la salud como fenol y cloroformo. También se destaca que los desechos de este procedimiento son de difícil manejo, dadas las normas de laboratorio con relación a estos residuos.

Mientras que el protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016) no utiliza sustancias tóxicas como el fenol y el cloroformo, siendo esto más amigable con el medio ambiente. Éste representa un método sencillo, lo que se realiza en un periodo más corto en comparación con CTAB modificado. Además, utiliza menos reactivos, lo que hace que la implementación tenga un menor costo económico.

Mediante el uso del método CTAB modificado y el protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016) se obtuvo mayor concentración de ADN (Cuadro No. 7). Comparando las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 los valores obtenidos se ubicaron en el rango aceptado como ADN de calidad.

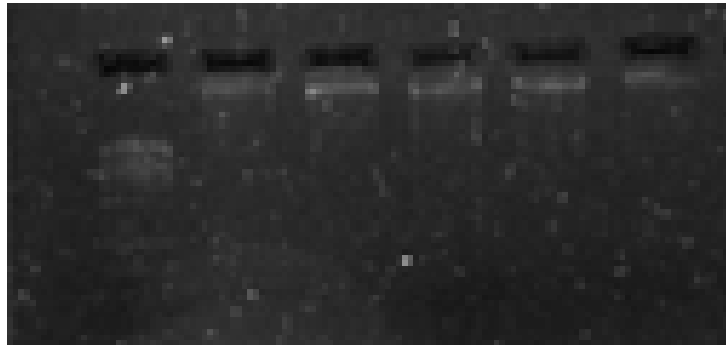
De los métodos de extracción de ADN evaluados, el método elegido para extracción de ADN genómico de Rcc fue el método CTAB modificado dando los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de ADN.

Cuadro No. 7. Concentración de ADN y relaciones 260/280 y 260/230 según método de extracción

Método de extracción	Concentración ADN (ng/μl)	Relación 260/280	Relación 260/230	Relación esperada 260/280 - 260/230	
CTAB modificado	507	1,8	1,8	1,8	1,8- 2,2
Arruabarrena et al. (2016)	403	1,8	1,8	1,8	1,8- 2,2
ZRFungal/Bacterial DNA	390	1,7	0,48	1,8	1,8- 2,2
Plant DNAZOL	385	1,6	0,85	1,8	1,8- 2,2

Cuantificada en NanoDrop™.

Al analizar la integridad del ADN los kits comerciales no obtuvieron los resultados deseados dada la calidad del ADN; en el gel de electroforesis del producto obtenido mediante el protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016, datos no mostrados) se observó la integridad del ADN, al igual que con el método CTAB (Figura No. 16), con bandas claras, definidas que indican mínima o inapreciable degradación de ADN durante la extracción.



En el primer carril se observa la escalera molecular (1000pb) y en los siguientes 5 carriles una banda bien definida de ADN extraído de Rcc mediante método CTAB.

Figura No. 16. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con GoodView como indicador de tinción

Mediante PCR se logró la amplificación de la región genómica de interés con los cebadores Rcc1 y Rcc5. Se corroboró el tamaño de amplicón obtenido (426 pb) mediante electroforesis, lo que permitió confirmar que correspondía al tamaño esperado para Rcc (Havis et al. 2006b, Zamani-Noor 2011).

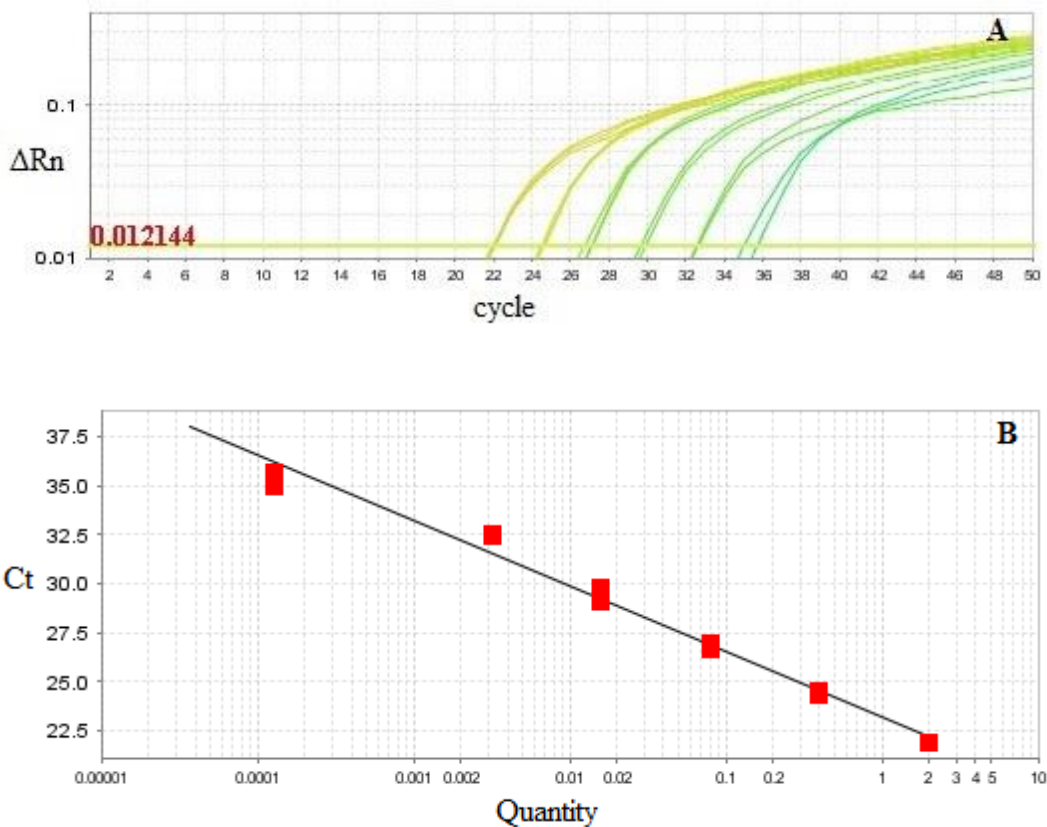
4.1.2 Curva de calibración

Cada concentración de ADN de Rcc fue analizada por triplicado, para la reproducibilidad de los datos del ensayo, encontrando que la variación de los Ct de las muestras replicadas era baja. Resultados similares fueron encontrado por Taylor et al. (2010, Anexo No. 3). La pendiente de la curva estándar que muestra la eficiencia de la amplificación fue de -3,336, lo que indica que la eficiencia de amplificación fue muy buena (Figura No. 17 b, Applied Biosystem, 2010). Zamani-Noor, (2011) en su curva estándar obtuvo una pendiente similar (-3,345).

El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99 lo que muestra una gran proximidad de ajuste entre la línea de regresión y los puntos Ct individuales de la reacción estándar. A su vez, la eficiencia de amplificación fue muy buena, de 0,99404

cuando se requiere que sea superior a 0,99. Zamani-Noor (2011) obtuvo resultados similares siendo de 0,994 y 0,99 para el coeficiente de correlación y la eficiencia de amplificación respectivamente. Taylor et al. (2010) calcularon una eficiencia de amplificación similar al valor de eficiencia de amplificación calculado por este ensayo.

La intercepción con el eje y (Y-inter), en este caso es de 23,192. Esos resultados coinciden con los resultados mencionados por Taylor et al. (2010), e indican que el ensayo cumplió con los requisitos de calidad necesarios para alcanzar confiabilidad del resultado.



A= Gráfica de amplificación, muestras ensayadas por triplicado.

B= Curva estándar de calibración de ADN de Rcc, en un rango de concentración de 2 ng/ μ l a 0.128 pg/ μ l. Pendiente = -3,336; Y-inter= 23,192; $R^2 = 0,99$; Eff % = 99,404. Los puntos corresponden a cada valor de Ct para cada triplicado, los valores se muestran en Anexo No. 3.

Figura No. 17. Gráfica de amplificación y curva estándar de ADN de Rcc

4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.2.1 Extracción de ADN de Rcc a partir de semilla

Luego de realizada la evaluación de concentración y calidad de ADN obtenido de cada método se concluyó que el protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016) fue el mejor. Este método presentó mayor concentración de ADN total extraído de semilla, con buena calidad e integridad (Cuadro No. 8). El método CTAB modificado si bien presento una alta concentración de ADN (mayor a 800 ng/μl), y relaciones de absorbancia similares no supero al protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016). Los kits comerciales evaluados presentaron valores inferiores a 500 ng/μl, mostraron también una baja relación de absorbancia 260/230 del ADN total de semilla extraído (datos no mostrados). De acuerdo a estos resultados, se seleccionó al protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016) para las extracciones de ADN total de los lotes en estudio.

Cuadro No. 8. Concentración de ADN total obtenido de cada lote de semilla estudiado

Muestra	ADN ng/μl	Relación 260/280	Relación 260/230
1	1743,9	1,8	1,9
2	4038,5	1,9	1,9
3	1619,8	1,9	1,9
4	2372,5	1,8	1,9

ADN extraído mediante protocolo adaptado de Arruabarrena et al. (2016), cuantificado mediante espectrofotómetro (NanoDrop™)

4.2.2 Efecto matriz

No se observó inhibición del qPCR por la matriz, ni interferencia en la cuantificación del ADN de las muestras (Figura No. 18). Esto indica que la sensibilidad del ensayo no se vio afectada por la presencia del ADN del cultivo, el Ct obtenido fue similar e presencia de ADN de semilla y en ausencia de la misma (Cuadro No. 8). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Taylor et al. (2010), Zamani-Noor (2011), quienes no encontraron efecto matriz.

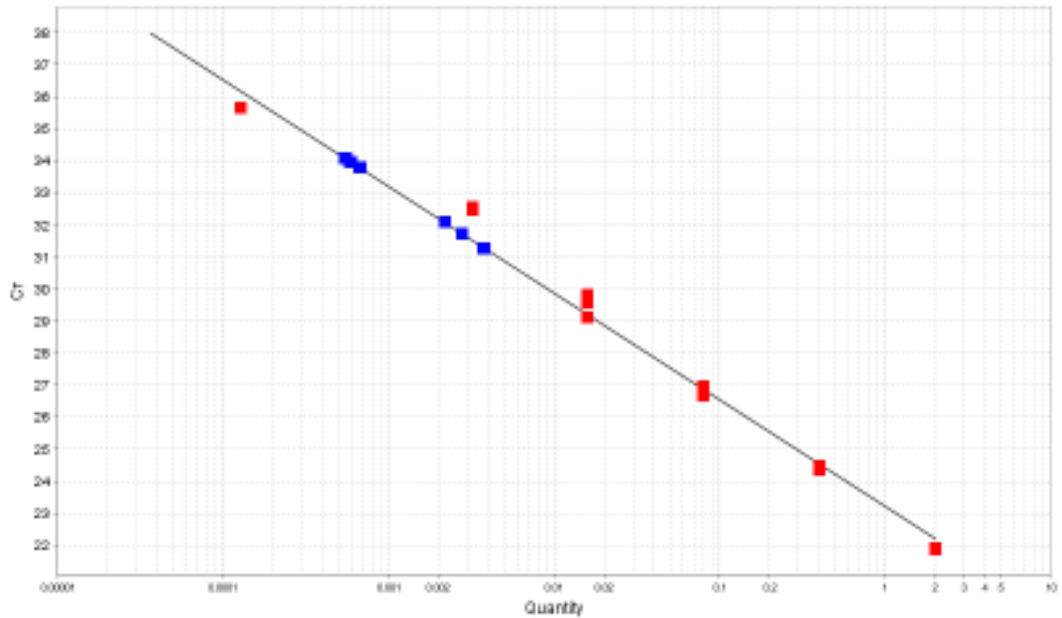
El no presentar efecto inhibitorio es lo mismo que decir que, la fluorescencia generada en presencia de la semilla es la misma que en presencia de agua, por lo que el método podría ser aplicable para la cuantificación de Rcc, generando resultados fiables de la cuantificación de ADN.

Cuadro No. 9. Influencia de la matriz en qPCR: concentración de ADN, Ct, Ct medio

ADN semilla cebada (ng)	ADN Rcc (ng)	Ct	Ct medio
0	0,02	26,4	26,4
0	0,2	22,8	22,8
0,2	0	35,0	35,0
0,2	0,02	26,3	26,3
0,2	0,2	23,0	23,0

4.2.3 Cuantificación de ADN de Rcc en lotes de semilla

Los resultados de la concentración de ADN de Rcc obtenidos de las muestras de los cuatro lotes de semilla analizados por qPCR se ubicaron dentro del rango de la curva de calibración (Figura No. 18). Estas se analizaron por duplicado para observar la reproducibilidad de los datos, el Ct obtenido de cada muestra de los lotes presentaron baja variación (Anexo No.4).



Pendiente = -3,336; Y-inter= 23,192; R2 = 0,99; Eff % = 99,404. Los puntos corresponden a cada valor de Ct para cada triplicado. Puntos rojos= diluciones conocidas de Rcc, puntos azules= muestras de semilla, con dos repeticiones por muestra. Los valores se muestran en Anexo No. 4.

Figura No. 18. Curva estándar de calibración de ADN de *Ramularia collo-cygni*, en un rango de concentración de 2 ng/μl a 0,128 pg/μl y muestras de ADN de los cuatro lotes evaluados

En cuanto a las muestras de semilla evaluadas (Cuadro No. 9) se observaron diferencias en las concentraciones de ADN de Rcc para cada uno (medida como concentración ADN de Rcc en el total de ADN de la muestra).

Cuadro No. 10. Número de aplicación de fungicida, Ct, Ct medio y concentración de ADN de Rcc según lotes

Lote	No. de aplic. fungicida	Ct	Ct medio	pg de ADN Rcc/100ng ADN total
1	0	31,3	31,26	18,99
2	1	31,9	31,89	12,41
3	2	34,0	34,01	2,84
4	0	33,8	33,77	3,35

En Escocia e Inglaterra se cuantificó el nivel de contaminación de ADN de Rcc en semilla de 28 variedades de cebada cosechadas en 2006 y 2007 (Oxley y Havis, 2010). Los niveles de ADN de Rcc variaron entre 0,08 a 90 pg de ADN Rcc/100ng

ADN total los niveles de contaminación más altos se encontraron en las muestras provenientes de Escocia, con un promedio de 32,68 pg de ADN Rcc/100ng ADN total, mientras que para Inglaterra el promedio fue de 6,2 pg de ADN Rcc/100ng ADN total.

Havis et al. (2014), también analizaron muestras de semilla provenientes de Escocia e Inglaterra en los años 2007 a 2011, mediante qPCR, encontrando también una gran variación en la concentración de ADN de Rcc. Los autores, registraron valores medios mínimos de 0,8 y valores medios máximos 25,8 pg de ADN Rcc/100ng ADN total. Estas concentraciones son menores a los reportados por Oxley y Havis (2010), para los mismos países.

Comparando los valores obtenidos en este trabajo (Cuadro No. 10), en relación a lo reportado por Oxley y Havis (2010), Havis et al. (2014), se observa que la contaminación máxima de semilla de cebada en dichos países fue superior. Sin embargo los datos encontrados en este trabajo se aproximan más a las reportadas por Havis et al. (2014), posicionándose entre los valores obtenidos por dichos autores.

En Escocia se realizó un análisis de huéspedes alternativos para Rcc, incluyendo trigo (Kaczmarek et al., 2016). Los autores reportaron que Rcc presentó el mismo comportamiento tanto en trigo como en cebada, logrando la esporulación, por tanto completar el ciclo de vida. Dado que esto confirma que el trigo puede ser una fuente de inoculo potencial muy importante para Rcc, se analizaron muestras de semilla de trigo de dos años consecutivos (2009, 2010), donde se detectó la presencia del hongo en la semilla. Ello podría sugerir que Rcc puede ser transmitido por semilla en trigo.

Los valores medios registrados mediante la cuantificación de la concentración de ADN de Rcc en semilla de trigo, mediante qPCR estuvieron en el rango entre 0,002 y 0,68 pg de ADN Rcc/100ng ADN total y entre 0,38 y 14,32 pg de ADN Rcc/100ng ADN total para los años 2009 y 2010 respectivamente (Kaczmarek et al., 2016). Si bien la concentración de ADN para el año 2009 fue baja comparada con los resultados en cebada encontrados en este trabajo (Cuadro No. 10) y los reportados por Havis et al. (2014), la concentración de ADN para el año 2010 si se encontraron entre los valores reportados para cebada. Esto podría tener implicancias graves para la producción de trigo a nivel mundial (Kaczmarek et al., 2016), por lo que se podría utilizar esta metodología para el estudio adicional de Rcc en el cultivo de trigo.

Considerando los límites de concentración de ADN de Rcc en semilla de cebada recomendados en Europa, se podrían agrupar los lotes de semilla evaluados, de acuerdo al nivel de contaminación de Rcc, como de bajo o alto riesgo de desarrollo de epifitias dependiendo del límite máximo recomendado.

Teniendo en cuenta el límite propuesto por Oxley y Havis (2010), donde los lotes de semilla que presentan menos de 5 pg de ADN Rcc/ng de ADN total son considerados de bajo riesgo, mientras que los lotes que superan dicho límite se consideran de alto riesgo de generar una epifitias, los lotes 3 y 4 serían considerados de

bajo riesgo debido a que no superan el límite establecido. Por otra parte, los lotes 1 y 2 serán considerados de alto riesgo de desarrollo de epifitía.

Sin embargo, si se considera el límite máximo de concentración ADN de Rcc en el ADN total recomendados para semilla en Inglaterra donde el límite es de 1 pg de ADN Rcc/ng de ADN total (Havis et al., 2015b), los lotes analizados presentan concentración superiores a dicho límite, el cual los caracteriza de alto riesgo para su siembra.

Aunque estos límites son una referencia del nivel de ADN de Rcc presente en la semilla, no significa que el tener alto nivel de ADN del hongo, va a expresar mayores síntomas. Existen estudios realizados en dos localidades de la Republica Checa, en dos años consecutivos en los que se demuestra que, aunque la semilla tenga bajo nivel de ADN de Rcc, no garantiza que el cultivo exprese menos enfermedad en comparación con semillas con alto nivel de ADN de Rcc, dado que la expresión de la enfermedad no está únicamente relacionado al nivel de ADN del hongo en semilla (Matusinsky et al., 2011).

Esto puede ser debido a que para el desarrollo de la enfermedad se necesita además de huésped susceptible y presencia de patógeno virulento, condiciones ambientales propicias para el desencadenamiento de la enfermedad. (Agrios, 2011).

Estudios realizados utilizando esta metodología basada en qPCR en planta por Taylor et al. (2010), encontraron una relación entre los síntomas visuales de la enfermedad y el nivel de ADN del Rcc en la planta ($R^2=0,79$), medido mediante qPCR. Del mismo modo en otros estudios (Pinnschmidt y Justensen, citados por Matusinsky et al., 2011) obtuvieron resultados similares, en los que se indica una relación positiva y significativa entre la evolución de la severidad de la enfermedad y la cantidad de ADN de Rcc determinados por qPCR.

Zamani-Noor (2011) también encontró una relación entre el desarrollo de los síntomas de ramulariosis y el nivel de ADN de Rcc, con una correlacion del 0,85. Además, Havis et al. (2014) en ensayos de campo en los que se sembraron tres variedades Cocktail, Decanter y Optic, encontraron una correlación lineal entre los síntomas visuales de la enfermedad y el nivel de ADN de Rcc, de 0,89 y 0,69 para el año 2008 y 2009 respectivamente.

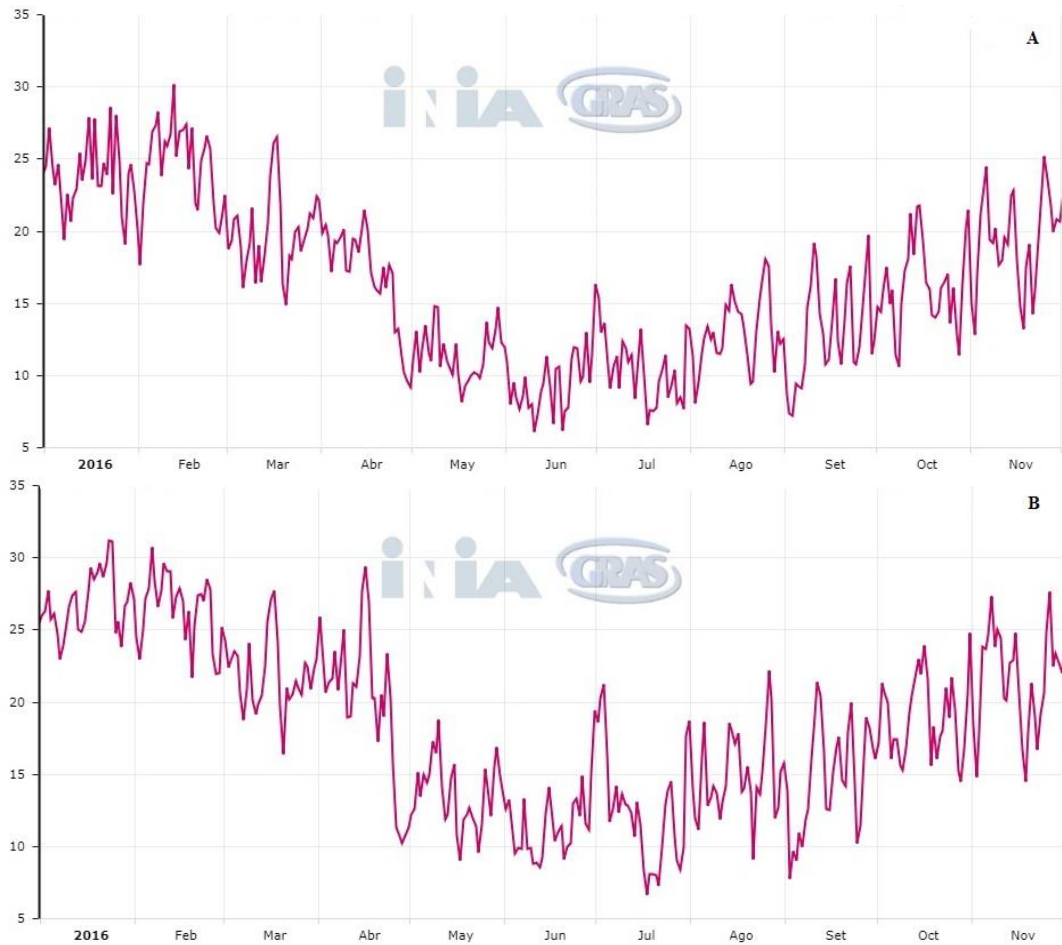
Considerando el número de aplicación de fungicidas de los lotes de semilla evaluados (Cuadro No. 10), se observó una gran variación en el nivel de contaminación de ADN de Rcc. Los menores niveles de ADN de Rcc obtenidos en semilla estuvieron asociados a mayor cantidad de aplicaciones de fungicida.

El lote de semilla 1 no tuvo aplicaciones de fungicidas y fue el que presentó mayor concentración de ADN de Rcc, mientras que el lote con menor concentración de ADN de Rcc fue el que provino de un cultivo con dos aplicaciones. Esto confirmaría la

hipótesis de que un mayor número de aplicaciones resultaría en un menor nivel de enfermedad en el cultivo y por lo tanto, en menor nivel de infección en la semilla.

Teniendo en cuenta la concentración de ADN de Rcc de los lotes de semilla provenientes de cultivos sin aplicación de fungicidas se observó una gran diferencia que se pueden adjudicar a las condiciones ambientales que se dieron en las localidades de procedencia de las mismas. Los lotes 1 y 4 presentan concentración de ADN de Rcc muy distintas, el lote 1 tiene seis veces mayor concentración de ADN de Rcc que el lote 4. Ambos lotes provienen de cultivos sin aplicación de fungicidas, por lo cual las diferencias podrían estar explicadas por los niveles de enfermedad durante el cultivo.

Si bien no se cuenta con información sobre el desarrollo de la enfermedad en cada cultivo, al analizar las condiciones climáticas en cada localidad, se observó que la localidad de Paysandú presentó mayor temperatura y nivel de precipitaciones que la localidad de Soriano, lo cual probablemente favoreció el desarrollo de mayores niveles de la enfermedad en Paysandú respecto a Soriano (Figuras No. 19, 20).

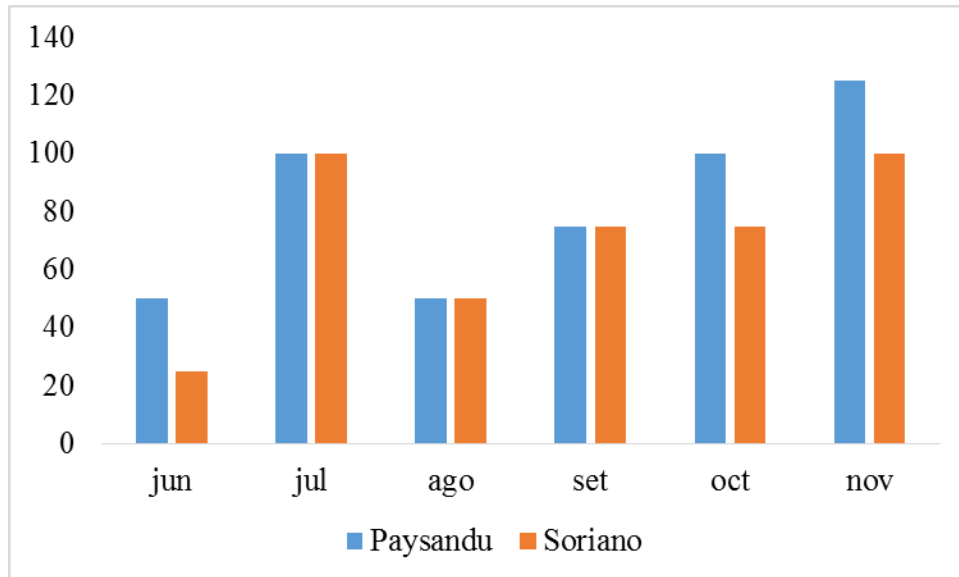


A= INIA La Estanzuela (zona Sur).

B= INIA Salto Grande (zona Norte).

Figura No.19. Temperatura media mensual para el año 2016

Fuente: INIA. GRAS (2019a).



Los valores corresponden al total acumulado durante el mes en mm, para el periodo comprendido entre junio-noviembre del año 2016. Extraídos de mapas de precipitación acumulada para cada departamento, en el cual se extrajo el valor mayor de las isolíneas de precipitación.

Figura No. 20. Lluvia acumulada para el periodo junio- noviembre del año 2016

Fuente: adaptado de INIA. GRAS (2019b).

Esta metodología de qPCR para la detección y cuantificación de Rcc, permite conocer la concentración de ADN del hongo existente en las muestras de semilla a analizar mediante interpolación con la curva estándar correspondiente (Zamani-Noor, 2011), sobre la base que un mayor nivel de infección en la semilla está asociado a una mayor biomasa del hongo en la misma y por lo tanto a mayor concentración de ADN del mismo. Esta metodología, basada en esta inferencia podría representar una importante herramienta para la toma de decisiones de manejo como la aplicación de curasemillas, o si realizar la siembra del lote de semilla evaluado o descartar el mismo.

Además, este método basado en qPCR abre un abanico de investigaciones, dado que puede ser empleado en la detección y estimación de la concentración de ADN de otros hongos patógenos, comprobando así la resistencia o susceptibilidad del cultivo y monitorear el progreso de la enfermedad tanto en condiciones controladas como a campo (Zamani-Noor, 2011).

5. CONCLUSIONES

Los protocolos para extracción de ADN, tanto para Rcc desde cultivo puro como la extracción de la semilla de cebada fueron ajustados con éxito, habiéndose obtenido ADN con buena concentración y calidad. Para la extracción de ADN de Rcc se destacó el método CTAB modificado, mientras que método de extracción de Arruabarrena et al. (2016) se destacó en la extracción de ADN en semilla. El cual se realiza en un menor periodo de tiempo y se utilizan menos reactivos. Ello implicaría que la implementación tenga un menor costo económico.

A partir del protocolo de Taylor et al. (2010), se ajustó una técnica basada en qPCR para la detección y cuantificación de Rcc en semilla de cebada, sin presentar inhibición por la matriz semilla.

Con este método se cuantificó la concentración de ADN de Rcc de los lotes de semilla de cebada evaluados, dando como resultado gran variación entre los mismos. Sin embargo la concentración de ADN fue alta, comparado con el límite máximo recomendado por Havis et al. (2015b), lo que los caracteriza como semilla de alto riesgo de generar una epifitía.

Este método ajustado es de suma importancia ya que permitirá el diagnóstico temprano de la enfermedad, dado que se puede detectar en la semilla. La metodología propuesta podrá ser utilizada como rutina para evaluar lotes destinados a semilla, para aplicar medidas de manejo correspondientes, contribuyendo así al manejo de ramulariosis en Uruguay.

6. RESUMEN

En Uruguay el cultivo de cebada es uno de los más importantes cultivos de invierno, en su desarrollo es atacado por varias enfermedades, entre ellas se encuentra ramulariosis cuyo agente causal es *Ramularia collo-cygni* (Rcc). En los últimos años es reconocida como una de las enfermedades más importante a nivel nacional y mundial, dado por las pérdidas en rendimiento, causando afecciones tanto en calidad como en cantidad de grano cosechado. La detección de ramulariosis en estadios iniciales del cultivo es difícil, dada su fase asintomática y su confusión con síntomas de otras enfermedades. La principal fuente de inóculo de Rcc es la semilla, lo que implica la necesidad de contar con métodos precisos y confiables para su detección. Debido a esta situación el objetivo fue ajustar un método basado en qPCR para detectar y cuantificar el nivel de infección de Rcc en semilla. Para esto se cultivó una cepa de Rcc, se ajustó un método de extracción de ADN, se realizaron diluciones de mismo y se construyó una curva estándar con un rango de 2 ng/μl - 0,128 pg/μl. Para validar esta curva se evaluaron cuatro lotes de semilla comercial, provenientes de dos localidades y con distinto número de aplicación de fungicidas foliares. Se ajustó la técnica y se logró establecer una relación entre los niveles de ADN de Rcc y el número de aplicaciones de fungicidas. Esta técnica permitirá evaluar lotes de semillas con cantidades desconocidas de ADN de Rcc. Además, esta herramienta de diagnóstico y cuantificación será un aporte significativo al conocimiento del patosistema en los sistemas de producción nacional y para el manejo de la enfermedad en el país.

Palabras clave: Cebada; *Ramularia collo-cygni*; ADN; qPCR.

7. SUMMARY

In Uruguay, barley is one of the most important winter crops. Many diseases may constrain production at the commercial level. One of these diseases is Ramularia leaf spot whose causal agent is *Ramularia collo-cygni* (Rcc). In recent years it is recognized as one of the most important diseases at national and global level, due to losses in yield, causing effects both in quality and quantity of grain harvested. The detection of ramulariosis in the early stages of the culture is difficult, given its asymptomatic phase and its confusion with symptoms of other diseases. The main source of inoculum of Rcc is the seed, which implies the need for precise and reliable methods for its detection. Due to this situation, the objective was to adjust a method based on qPCR to detect and quantify the level of Rcc infection in seed. For this, a strain of Rcc was cultured, a DNA extraction method was adjusted, dilutions were made and a standard curve was constructed with a range of 2 ng / μ l - 0.128 pg / μ l. To validate this curve, four batches of commercial seed were evaluated, from two locations and with different number of foliar fungicides. The technique was adjusted and a relationship between the levels of Rcc DNA and the number of fungicide applications was established. This technique will allow you to evaluate batches of seeds with unknown amounts of Rcc DNA. In addition, this diagnostic and quantification tool will be a significant contribution to the knowledge of the patosystem in national production systems and for the management of the disease in the country.

Keywords: Barley; *Ramularia collo-cygni*; DNA; qPCR

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 2011. Fitopatología. 2a. ed. México, Limusa. 838 p.
2. Applied Biosystem, 2010. Real-Time PCR Sistem, Experiments of curve standard. (en línea). Foster City, California, Applied Biosystem Step One. 136 p. Consultado 05 may. 2019. Disponible en <https://studylib.es/doc/4922317/applied-biosystems-stepone%E2%84%A2-real>
3. Arias, G. 1991. Calidad industrial de la cebada cervecera. Montevideo, INIA. 54 p. (Serie Técnica no. 18).
4. Arruabarrena, A.; Benítez-Galeano, M. J.; Giambiasi, M.; Bertalmío, A.; Colina, R.; and Hernández-Rodríguez, L. 2016. Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. (en línea). Journal of Virological Methods. 237:14–17. Consultado 20 jul. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2016.08.011>
5. Beckerman, J. L. 2013. Detection of fungicide resistance. (en línea). In: Mizuho, N. ed. Fungicides –Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World. Rijeka, InTech. pp. 281-310. Consultado 04 oct. 2018. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/fungicides-showcases-of-integrated-plant-disease-management-from-around-the-world/detection-of-fungicide-resistance>
6. Bistrich, H.; Breun, J.; Emmert, G.; Fleck, A.; Jaiser, H.; Kempe, H.; Lemmens, M. 2006. Screening for leaf spot resistance- results and impact on practical breeding. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. pp. 83-84. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
7. Carmona, M.; Scandini, M.; Formento, A.; Luque, A. 2013. Epidemias de *Ramularia collo-cygni*, organismo causal del salpicado necrótico de la cebada, campaña 2012/13. (en línea). Siembra Directa. 20:44-47. Consultado 14 mar. 2019. Disponible en <https://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2018/03/Cultivos-Invernales-2013.pdf>

8. _____.; Sautua, M. S. 2015. Manual práctico para el diagnóstico de enfermedades foliares y su control con fungicidas en los cultivos de trigo y cebada. (en línea). Buenos Aires, UBA. Facultad de Agronomía. 88 p. Consultado 20 jun. 2018. Disponible en <http://cebadacervecera.com.ar/wp-content/uploads/2018/09/enfermedades-Trigo-Cebada-FAUBA-BASF.pdf>
9. Castro, M.; Germán, S.; Pereyra, S.; Azzimonti, G. 2017. Resultados experimentales de evaluación de cultivares de cebada cervecera periodo 2014-2015-2016. (en línea). In: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigo, cebada y colza de los tres últimos años periodo 2014-2015-2016. Montevideo, INIA. pp. 36-66. (Resultados experimentales no. 17). Consultado 13 jun. 2018. Disponible en http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2016/JornadaInvierno2017.pdf
10. Cavara, F. 1893. Ueber einige parasitische Pilze auf dem Getreide. (en línea). Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten. 3(1):16-26. Consultado 23 set. 2018. Disponible en <https://www.jstor.org/stable/43217899>
11. Cerda-Granados, D.; Díaz, V. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para Pinus tecunumanii. (en línea). Encuentro. 94: 82-92. Consultado 20 feb. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/237011968_Optimizacion_de_un_protocolo_de_extraccion_de_ADN_genomico_para_Pinus_tecunumanii
12. Christiansen, A.; Wollenweber, B.; Jorgensen, N. 2006. Fungicide impact on Ramularia Leaf Spot in barley as analysed by chlorophyll fluorescence imaging. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. pp. 123-130. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
13. Donato, S.; Sayas, M. 2017. Desde la industria: importancia de la calidad de la cebada cervecera para el malteo. (en línea). Cangüé. no. 38:30-38. Consultado 14 jun. 2017. Disponible en http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue_38/Cangue38_industria.pdf

14. Fountaine, J. M.; Fraaije, B. A. 2009. Development of QoI resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni* (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (2nd., 2009, Edinburgh, United Kingdom). Proceedings. Edinburgh, United Kingdom. p. 123. Consultado 29 jul. 2018. Disponible en <https://www.research.ed.ac.uk/portal/files/10848585/FountaineAndFraaije2009.pdf>

15. Frei, P.; Gindro, K. 2015. *Ramularia collo-cygni*: un nouveau champignon pathogène de l'orge. (en línea). *Agrarforschung Schweiz*. 6(5):210-217. Consultado 30 set. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/281237771_Ramularia_collo-cygni_-_un_nouveau_champignon_pathogene_de_l'orge

16. Havis, N. D.; Oxley, S. J. P. 2006a. Investigating the life of *Ramularia collo-cygni* using a PCR based diagnostic. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. pp. 39-44. Consultado 4 may. 2019. Disponible en <https://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>

17. _____.; _____.; Langrell, S. 2006b. Rapid nested PCR: based detection of Rcc direct from barley. *FEMS Microbiology Letters*. 256(2): 217-223.

18. _____.; _____.; Burnett, F. J. 2012. Advances in control of *Ramularia collo-cygni*. (en línea). In: Crop Protection in Northern Britain (2012, Dundee, UK.). Proceedings. s.n.t pp. 125–130. Consultado 29 jul 2018. Disponible en <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143111115>

19. _____.; Nyman, M.; Oxley, S. J. P. 2014. Evidence for seed transmission and symptomless growth of *Ramularia collo-cygni* in barley (*Hordeum vulgare*). (en línea). *Plant Pathology*. 63(4): 929-936. Consultado 25 jun. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1111/ppa.12162>

20. _____.; Fountaine, J.; Gorniak, K.; Paterson, L.; Taylor, J. 2015a. Diagnosis of *Ramularia collo-cygni* and *Rhynchosporium* spp. in Barley. (en línea). In: Lacomme, C. ed. Plant Pathology. New York, NY, Springer. pp. 29-36 (Methods in Molecular Biology v.1302). Consultado 25 jun. 2017. Disponible en https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2620-6_3

21. _____.; Brown, J.; Clemente, G.; Frei, P.; Jedryczka, M.; Kaczmarek, J.; Kaczmarek, M.; Matusinsky, P.; McGrann, G.; Pereyra, S.; Piotrowska, M.; Sghyer, H.; Tellier, A.; Hess, M. 2015b. *Ramularia collo-cygni*: an emerging pathogen of barley crops. (en línea). *Phytopathology*. 105(7):895-904. Consultado 25 jun. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI>
22. Heiser, I.; Heß, M.; Schmidtke, K. U.; Vogler, U.; Miethbauer, S.; Liebermann, B. 2004. Fatty acid peroxidation by rubellin B, C and D, phytotoxins produced by *Ramularia collo-cygni* (Sutton et Waller). (en línea). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 64(3):135–143. Consultado 28 set. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.08.002>
23. _____.; Liebermann, B. 2006. Phytotoxins from *Ramularia collo-cygni*: mode of action and contribution to pathogenicity. (en línea). *In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st, 2006, Gottingen, Germany)*. Proceedings. s.n.t. pp. 57-62. Consultado 1 jun. 2017. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
24. Hoffman, E.; Arbeleche, P.; Fassana, N.; Locatelli, A.; Gutierrez, G.; Viega, L.; Castro, A. 2015. Relevamiento de cultivos de invierno, Estudio del posicionamiento tecnológico y estratégico de la cebada cervecera. (en línea). Montevideo, UdelaR. Facultad de Agronomía. 42 p. Consultado 14 jun. 2017. Disponible en http://www.camaramercantil.com.uy/uploads/cms_news_docs/Relevamiento%20de%20Cebada%20FAGRO-MNECC%20Estudio%20del%20posicionamiento%20tecnol%C3%B3gico%20y%20estrat%C3%A9gico.pdf
25. INIA. GRAS (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Unidad de Agro-clima y Sistemas de Información, UY). 2019a. Banco agroclimático. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 8 mar. 2019. Disponible en <http://www.inia.uy/GRAS>
26. _____. _____. 2019b. Precipitación acumulada para el año 2016. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 5 mar. 2019. Disponible en http://www.inia.org.uy/gras/agroclima/ppt_mapas/2016.html
27. Jorgensen, L. N.; Christiansen, A. 2006. Control of *Ramularia* in winter barley and spring barley using different fungicides- Experience from Denmark. (en línea). *In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st, 2006, Gottingen, Germany)*.

Proceedings. s.n.t. pp 113-119. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>

28. Kaczmarek, M.; Piotrowska, M. J.; Fountaine, J. M.; Gorniak, K.; McGrann, G. R. D.; Armstrong, A.; Wright, K. M.; Newton, A. C.; Havis, N. D. 2016. Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of ramularia leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. (en línea). *Plant Pathology*. 66(1):45-55. Consultado 13 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1111/ppa.12552>
29. Khier, M.; Carmona, M.; Sachs, E.; Delhey, R.; Frayssinet, S.; Barreto, D. 2002. Salpicado necrótico, nueva enfermedad de la cebada en Argentina causada por *Ramularia collo-cygni*. In: Jornadas Fitosanitarias Argentinas (11^{as}., 2002, Río Cuarto, Córdoba). Resúmenes. s.n.t. pp. 1-47.
30. Laurent, D. 2006. Benefits of triazole + chlorothalonil for the control of *Ramularia collo cygni*, a new problem in Barley in France. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Göttingen, Germany). Proceedings. s.n.t. p.131. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
31. Lee, P. 2017. DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP. (en línea). *Molecular Ecology Resources*. 17(2):138-141. Consultado 15 feb. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/313800265_DNA_amplification_in_the_field_move_over_PCR_here_comes_LAMP
32. Lehninger, A. 1979. *Bioquímica*. 2a. ed. Barcelona, OMEGA. 1117 p.
33. Leistrumaitė, A.; Liatukas, Ž. 2006. Resistance of spring barley cultivars to the new disease Ramularia leaf spot, caused by *Ramularia collo-cygni*. (en línea). *Agronomy Research*. no. 4:251–255. Consultado 31 may. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/258704958_Resistance_of_spring_barley_cultivars_to_the_new_disease_Ramularia_leaf_spot_caused_by_Ramularia_collo-cygni
34. Lucas, J. A.; Hawkins, N. J.; Fraaije, B. A. 2015. The Evolution of Fungicide Resistance. (en línea). *Advances in Applied Microbiology*. 90:29-91. Consultado 04 oct. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

35. McGrann, G. R. D.; Andongabo, A.; Sjökvist, E.; Trivedi, U.; Dussart, F.; Kaczmarek, M.; Havis, N. D. 2016. The genome of the emerging barley pathogen *Ramularia collo-cygni*. (en línea). BMC Genomics. 17(584):1-17. Consultado 31 may. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2928-3>
36. Makepeace, J. C.; Brown J. K. M.; Oxley, S.; Burke, J. I. 2006. Does the mlo resistance gen increase the susceptibility of spring barley to spotting diseases? (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. p. 95. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
37. _____; Havis, N. D.; Burke, J. I.; Oxley, S. J. P.; Brown, J. K. M. 2008. A method of inoculating barley seedlings with *Ramularia collo-cygni*. (en línea). Plant Pathology. 57:991-999. Consultado 1 jun. 2018. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2008.01892.x>
38. Matusinsky, P.; Leisova-Svobodova, L.; Marik, P.; Tvaruzek, L.; Stemberkova, L.; Hanusova, M.; Minarikova, V.; Vysohlidova, M.; Spitzer, T. 2010. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. (en línea). Journal of Plant Diseases and Protection. 117(6):248–252. Consultado 04 oct. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03356369>
39. _____; _____; Gubis, J.; Hudcovicova, M.; Klcova, L.; Gubisova, M.; Marik, P.; Tvaruzek, L.; Minarikova, V. 2011. Impact of the seed-borne stage of *Ramularia collo-cygni* in barley seed. (en línea). Journal of Plant Pathology. 93(3):679-689. Consultado 07 may. 2019. Disponible en https://www.jstor.org/stable/41999044?seq=1#page_scan_tab_contents
40. _____; Mařík, P.; Hanusova, M.; Stemberkova, L.; Minarikova, V.; Tvaruzek, L.; Spitzer, T.; Langer, I. 2013. Response of Spring Barley Cultivars to Ramularia Leaf Spot in Conditions of the Czech Republic. (en línea). Cereal Research Communications. 41 (1): 126-132. Consultado 01 ago. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/263587211_Response_of_Spring_Barley_Cultivars_to_Ramularia_Leaf_Spot_in_Conditions_of_the_Czech_Republic

41. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2018. Anuario estadístico agropecuario 2018. Montevideo. 211 p.
42. _____. _____. 2019. Encuesta agrícola primavera 2018. (en línea) Montevideo. 23 p. (Serie Encuestas no. 354). Consultado 29 jul. 2019. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/enc_agrprima18.pdf
43. _____. OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, UY). 2017. Anuario 2017: análisis sectorial y cadenas productivas. (en línea). Montevideo. 690 p. Consultado 13 ago. 2018. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2017.pdf
44. Miethbauer, S.; Haase, S.; Schmidtke, K. U.; Günther, W.; Heiser, I.; Liebermann, B. 2006. Biosynthesis of photodynamically active rubellins and structure elucidation of new anthraquinone derivatives produced by *Ramularia collo-cygni*. (en línea). *Phytochemistry*. 67(12):1206-1213. Consultado 6 oct. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.003>
45. Miralles, D. J.; Abeledo, L. G.; Serrago, R. A.; Alzueta, I. 2014. Manual de trigo y cebada para el cono Sur: procesos fisiológicos y base de manejo. (en línea). Buenos Aires, Argentina, Orientación Grafica. 36 p. Consultado 29 set. 2018. Disponible en https://www.agroconsultasonline.com.ar/ticket.html/Miralles%20-%20Manual%20de%20Trigo%20-%20press.pdf?op=d&ticket_id=9972&evento_id=20750
46. Oxley, S.; Havis, N.; Sutherland, K. G.; Nuttall, M. 2002. Development of a Rationale to Identify the Causal Agent of Necrotic Lesions in Spring Barley and to Identify Control Mechanisms. (en línea). London, UK, HGCA. 104 p. (Project Report no. 282). Consultado 28 set. 2018. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/274181/pr282.pdf>
47. _____. _____.; Hunter, T.; Hackett, R. 2006. Impact of fungicides and varietal resistance on *Ramularia collo-cygni* in spring barley. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European *Ramularia* Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings.

s.n.t. pp. 103-112. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>

48. _____.; _____.; Brown, J. K. M.; Makepeace, J. C.; Fountaine, J. 2008. Impact and interactions of *Ramularia collo-cygni* and oxidative stress in barley. (en línea). London, UK, HGCA. 14 p. (Project Report no. 431). Consultado 10 jun. 2018. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/269137/pr431-summary.pdf>
49. _____.; _____. 2010. Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting. (en línea). London, UK, HGCA. 59 p. (Project Report no. 463). Consultado 13 mar. 2019. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/267653/pr463.pdf>
50. Palladino, M. C.; Pérez, C.; Pereyra, S. 2017. Alternativas para el manejo de integrado de ramulariosis en cebada, y sus efectos en el residuo de fungicidas en grano. In: Simposio Nacional de Agricultura (5°. , 2017, Paysandú, Uruguay). Al futuro, no alcanza con llegar. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 145-152.
51. Pereyra, S.; Stewart, S. 2004. Manejo de enfermedades en cebada. (en línea). In: Jornada Técnica Cultivos de Invierno (2004, Colonia, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 2-11 (Actividades de Difusión no. 357). Consultado 23 set. 2018. Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad_357.pdf
52. _____.; Germán, S. 2010. Manchas foliares en cebada: reconocimiento, epidemiología y estrategias de manejo. (en línea). In: Seminario de Actualización: Manejo de Enfermedades en Trigo y Cebada (2010, Colonia, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 121-137 (Actividades de Difusión no. 618). Consultado 10 jun. 2017. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/582/1/112761220910153559.pdf>
53. _____.; Altier, D. 2011. Desarrollo de epidemias en cultivos: análisis de sus componentes para un manejo integrado. (en línea). In: Pereyra, S.; Díaz, M.; Germán, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 19-35 (Serie Técnica no. 189). Consultado 23 set. 2018. Disponible en

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429160911193955.pdf>

54. _____. 2013a. Herramientas disponibles para el manejo de dos enfermedades relevantes de la pasada zafra: fusariosis de la espiga y ramularia en cebada. (en línea). *In*: Jornada de Cultivos de Invierno. Herramientas para un Manejo Inteligente en Trigos y Cebadas (2013, Young, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 33-41 (Actividades de Difusión no. 720). Consultado 11 jun. 2017. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761220413093940.pdf>
55. _____. 2013b. Nuevos desafíos para el manejo de enfermedades en cereales de invierno. *In*: Simposio Nacional de Agricultura (3^o., 2013, Paysandú, Uruguay). No se llega, si no se sabe a dónde ir. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 93-105.
56. _____.; Germán, S. 2013c. Relevancia y manejo de enfermedades en cebada en Uruguay. (en línea). *In*: Congreso Latinoamericano de Cebada (4^o., 2013, Bahía Blanca, Argentina). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 1-48. Consultado 23 set. 2018. Disponible en <https://congresocebada.files.wordpress.com/2012/10/30-10-13-7-congreso-latinoam-cebada-arg-2013.pdf>
57. _____.; Pérez, C. 2017. Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. (en línea). Cangüé. no. 38: 13-18. Consultado 14 jun. 2017. Disponible en http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue_38/Cangue38_ramulariosis.pdf
58. Pérez, C.; Gepp, V. 2002. Principios generales de control. Montevideo, Facultad de Agronomía. 19 p.
59. Pinnschmidt, H.; Sindberg, S. 2006. Expression of resistance of barley varieties to Ramularia leaf spot and the status of the disease in Denmark. (en línea). *In*: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. pp. 85-93. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
60. Riley, M. B.; Williamson, M. R.; Maloy, O. 2002. Plant disease diagnosis. (en línea). The Plant Health Instructor. s.n.t. s.p. Consultado 15 feb. 2019.

Disponible en

<https://www.apsnet.org/edcenter/diseasediagnostics/topcasestudies/Pages/PlantDiseaseDiagnosis.aspx>

61. Salamati, S.; Reitan, L. 2006. *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. (en línea). In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop (1st, 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. s.n.t. pp. 19-35. Consultado 1 jun. 2017. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
62. Schena, L.; Nigro, F.; Ippolito, A.; Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. (en línea). European Journal of Plant Pathology. 110(09): 893-908. Consultado 15 feb. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4842-9>
63. Sprague, R. 1950. Diseases of Cereals and Grasses in North America. New York, Ronald. 538 p.
64. Stabentheiner, E.; Minihofer, T.; Huss, H. 2009. Infection of barley by *Ramularia collo-cygni*: Scanning electron microscopic investigations. (en línea). Mycopathologia. 168(3):135-143. Consultado 13 jun. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11046-009-9206-8>
65. Sutton, B. C.; Waller, J. M. 1988. Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. (en línea). Transactions of the British Mycological Society. 90:55-61. Consultado 02 oct. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153688801803?via%3Dihub>
66. Taylor, J. M. G.; Paterson, L. J.; Havis, N. D. 2010. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). (en línea). Letters in Applied Microbiology. 50(5):493-499. Consultado 10 jun. 2017. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2010.02826.x>
67. ThermoFisher scientific. 2009. User manual of NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. (en línea). Wilmington, USA. 97 p. Consultado 28

feb. 2019. Disponible en <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>

68. _____. 2019. Essentials of Real Time PCR. (en línea). Massachusetts, USA. 8 p. Consultado 28 feb. 2019. Disponible en <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf>
69. Uruguay XXI. 2018. Oportunidades de inversión. (en línea). Agronegocios. mar. 2018. 46 p. Consultado 5 feb. 2019. Disponible en <https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/b5eb6050ca43af07330c66ca7fb7ba70f0cd8189.pdf>
70. Walters, D. R.; Havis, N. D.; Oxley, S. J. P. 2007. *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. (en línea). FEMS Microbiology Letters. 279(1):1-7. Consultado 30 oct. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x>
71. Zadoks, J. C; Chang T. T.; Konzak, C. F. 1974. A De-cimal Code for the Growth Stages of Cereals. (en línea). Weed Research. 14:415-421. Consultado 06 feb. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
72. Zamani-Noor, N. 2011. Studies on Ramularia Leaf Spots on Barley - Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity. (en línea). PhD. thesis. Göttingen, Germany, Georg-August-University Göttingen. Faculty of Agricultural Sciences. 139 p. Consultado 16 feb. 2019. Disponible en <https://ediss.uni-goettingen.de/bitstream/handle/11858/00-1735-0000-0001-BC13-F/2011-Thesis-Zamani-Noor%2c%20Nazanin-.pdf?sequence=1>

9. ANEXOS

Anexo No. 1. Medio PDA para Rcc

Para hacer medio PDA se utiliza Difco™ Potato Dextrose Agar, se siguen las indicaciones de proveedor. Luego se coloca en autoclave (modelo LS-B75L-I), al finalizar el autoclave cuando el medio presente una temperatura de 50-60 ° C, se agregó 0,5 ml. de la siguiente solución madre usando una unidad de filtro accionada por jeringa de 0,20 micrómetros, 25 mm (es decir: Millipore PTPE 0,2 micrómetros certificados por HPLC).

Solución madre: 3.4 g de cloranfenicol en 100 ml de calidad de HPLC de metanol absoluto (generalmente se prepara 1,7 g / 50 ml de metanol absoluto). Esta solución madre puede guardarse en el congelador para su uso posterior.

Anexo No. 2. Protocolo de extracción de ADN

Cell lysis solution.

2% SDS	2 mL (10% stock pH7,2) #
69mM citrato de sodio	1,36mL (0,5M stock) #
132mM ácido cítrico	1,32mL (1M stock) #
1mM EDTA	20µL (0,5M stock) #
completar con agua	5,3mL de agua MQ estéril
El pH debe de quedar entre 4 y 4,5 para inactivar RNAsas y DNAsas.	

Protein-DNA precipitation solution (10mL).

4M NaCl	8mL (5M stock) #
16Mm citrato de sodio	0,32mL (0,5M stock) #
32mM ácido cítrico	0,32mL (1M stock) #
completar con agua	1,36mL agua MQ estéril

Soluciones stock

1M ácido cítrico (PM 192,124 g/mol)	29,22g en 100mL de agua
0,5M citrato de (tri) sodio (PM 294,10 g/mol)	14,706g en 100mL de agua
5M cloruro de sodio (PM 54,44 g/mol)	29,22g en 100mL de agua

Fuente: adaptado de Arrabaruenaa et al. (2016).

Anexo No. 3. Datos curva de calibración

	Ct	Ct SD	Cuantificación
Dilución 2	21,9	0,0103127	2,000
Dilución 2	21,9	0,0103127	2,000
Dilución 2	21,9	0,0103127	2,000
Dilución 3	24,3	0,0753946	0,400
Dilución 3	24,5	0,0753946	0,400
Dilución 3	24,4	0,0753946	0,400
Dilución 4	26,9	0,1726772	0,080
Dilución 4	26,7	0,1726772	0,080
Dilución 4	27,0	0,1726772	0,080
Dilución 5	29,1	0,3535345	0,016
Dilución 5	29,8	0,3535345	0,016
Dilución 5	29,6	0,3535345	0,016
Dilución 6	32,5	0,0417422	0,0032
Dilución 6	32,5	0,0417422	0,0032
Dilución 6	32,5	0,0417422	0,0032
Dilución 7	33,8	0,001	0,0064
Dilución 7	33,8	0,001	0,0064
Dilución 7	33,8	0,001	0,0064
Dilución 8	35,0	0,4868183	0,000128
Dilución 8	35,6	0,4868183	0,000128
Dilución 8	35,6	0,4868183	0,000128

Anexo No. 4. Datos de validación de curva estándar

	Ct	Ct SD	Quantity	ng/100 ng ADN total	pg/100 ng ADN total
Lote 1 R1	31,3	0,0170273	0,004	0,019150242	19,150242
Lote 1 R2	31,3	0,0170273	0,004	0,01883461	18,83461
Lote 2 R1	31,7	0,2524846	0,003	0,01393243	13,93243
Lote 2 R2	32,1	0,2524846	0,002	0,010889351	10,889351
Lote 3 R1	34,0	0,0749634	0,001	0,002951558	2,9515577
Lote 3 R2	34,1	0,0749634	0,001	0,002743313	2,7433125
Lote 4 R1	33,8	0,001	0,001	0,003358178	3,3581784
Lote 4 R2	33,8	0,001	0,001	0,003358178	3,3581784