

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS CURASEMILLA PARA EL
CONTROL DE *Ramularia collo-cygni* EN CEBADA MEDIANTE TÉCNICA DE
qPCR**

por

Rodrigo Nicolás VIVIÁN PARADIZO

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. MSc. Cintia Palladino

Ing. Agr. PhD. Carlos Pérez

Ing. Agr. PhD. Silvia Pereyra

Fecha: 24 de junio de 2019

Autor:

Rodrigo Nicolás Vivián Paradizo

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que sin ellos no hubiese sido posible el trayecto de la carrera.

A mis abuelos que fueron los impulsores para estudiar Agronomía.

A Cintia Palladino por su confianza, paciencia, y apoyo incondicional para que se lleve a cabo este trabajo.

A Alberto Casal “Paco” por su colaboración en el área de laboratorio.

A Carlos Pérez por su colaboración en la corrección del trabajo.

A personal de biblioteca, Carol Guillemintot y Patricia Choca por su ayuda en la búsqueda de material bibliográfico.

A Sully Toledo por su colaboración en la corrección de trabajo de tesis.

A Estefany Suárez por su amistad.

A Mónica Cadenazzi por su colaboración en la parte estadística.

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>	3
2.1. IMPORTANCIA DE LA CEBADA EN URUGUAY.....	3
2.2. IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES EN CEBADA.....	4
2.2.1. <u>Importancia de ramulariosis</u>	6
2.3. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	8
2.3.1. <u>Clasificación taxonómica</u>	8
2.4. SINTOMATOLOGÍA	9
2.5. EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD.....	11
2.6. MEDIDAS DE CONTROL DE RAMULARIOSIS	15
2.6.1. <u>Control cultural</u>	15
2.6.2. <u>Control genético</u>	15
2.6.3. <u>Control químico</u>	17
2.6.3.1. Fungicidas foliares.....	17
2.6.3.2. Resistencia a fungicidas.....	18
2.6.3.3. Fungicidas curasemillas.....	19
2.7. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS CURASEMILLAS MEDIANTE TÉCNICAS DE qPCR	20
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	26
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁNTULA	32

3.1.1.	<u>Cuantificación de ADN de Rcc mediante qPCR</u>	35
3.1.1.1.	Condiciones de amplificación: qPCR.....	35
3.1.1.2.	Influencia de la matriz en la cuantificación de las muestras.....	36
3.1.1.3.	Evaluación de fungicidas curasemillas.....	37
3.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	38
4.1.	EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁNTULA.....	38
4.1.1.	<u>Cuantificación del ADN de Rcc mediante qPCR</u>	39
4.1.1.1.	Condiciones de amplificación: qPCR.....	39
4.1.1.2.	Influencia de la matriz en la cuantificación de las muestras.....	40
4.1.1.3.	Evaluación de fungicidas curasemilla.....	41
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	46
6.	<u>RESUMEN</u>	47
7.	<u>SUMMARY</u>	48
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	49
9.	<u>ANEXOS</u>	57

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Especies huéspedes de <i>Ramularia collo-cygni</i>	12
2. Tratamiento, nivel de infección y fungicida utilizado según el tratamiento evaluado	26
3. Características de fluxapiroxad.....	27
4. Características de triticonazol.....	27
5. Características de carbendazim.....	28
6. Características de thiram	29
7. Características de iprodione	29
8. Comportamiento sanitario de INIA Cronos (CLE 280).....	30
9. Reactivos utilizados en qPCR para la detección y cuantificación de <i>Ramularia collo-cygni</i>	35
10. Efecto matriz: concentración de ADN de <i>Ramularia collo-cygni</i> en el ADN de plántula (matriz).....	36
11. Concentración de ADN total según método CTAB cuantificada en el espectrofotómetro y las relaciones obtenidas, para cada una de las cuatro repeticiones realizadas a cada muestra	38
12. Influencia del efecto matriz plántula en PCR a tiempo real	40

Figura No.

1. Evolución del área de siembra y rendimiento promedio nacional del cultivo de cebada en Uruguay en los últimos 8 años.....	4
2. Pérdidas de rendimiento, peso en grano y calibre (1era. +2da.), causados por daños indirectos de enfermedades foliares	6
3. Distribución geográfica de <i>Ramularia collo-cygni</i> , y año en que fue reportada en cada país.....	7
4. Micrografía de <i>Ramularia collo-cygni</i>	9
5. Síntomas característicos de <i>Ramularia collo-cygni</i> sobre hojas de cebada, con manchas necróticas en la parte del envés de las hojas.....	10
6. Manchas necróticas de ramulariosis dispuestas en la hoja bandera y vainas con un 80% de severidad, en un cultivo de cebada en estado grano acuoso.....	10
7. Pérdida total del área foliar fotosintéticamente activa causada por <i>Ramularia collo-cygni</i>	11
8. Ciclo de <i>Ramularia collo-cygni</i>	13
9. Micrografías microscópicas de barrido de <i>Ramularia collo cygni</i>	14
10. Comportamiento sanitario de cebada frente a <i>Ramularia collo-cygni</i>	17
11. Proceso de qPCR con tecnología TaqMan	22
12. Gráfica de amplificación de ADN	22
13. Curva estándar (puntos rojos) y concentración de ADN del hongo (puntos azules) .	24

14. Germinador con la población objetivo (400 semillas)	31
15. Plántulas de cebada con dos hojas expandidas en condiciones semicontroladas, previo a la cosecha de las mismas.....	32
16. Extracción de ADN total de plántula	34
17. Correlación entre la concentración de ADN (ng/ μ L) y los pg ADN de Rcc/ 100 ng ADN total.....	39
18. Curva estándar de calibración de ADN de Rcc	40
19. Curva estándar de calibración de ADN de Rcc con muestras reales	41
20. Concentración de ADN de Rcc determinado en semilla medido como ADN de Rcc/ ADN total extraído de plántula según tratamiento.....	42
21. Evolución de la enfermedad durante el ciclo del cultivo que dio origen a la semilla utilizada para llevar a cabo el experimento	43

1. INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) en Uruguay es el tercer cultivo de secano en importancia en cuanto a área sembrada. En los últimos años el área ha ido en aumento, con fluctuaciones entre zafra, alcanzando un máximo de 190 mil ha en la zafra 2016/17 con un rendimiento de 3568 kg/ha, mientras que en la zafra 2017/18 hubo un descenso en producción y área sembrada llegando a valores de 2516 kg/ha y 153 mil ha respectivamente.

Las enfermedades foliares son uno de los factores determinantes en pérdidas de rendimiento. Dentro de estas se destaca ramulariosis causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc), la cual se ha convertido en una de las principales restricciones que afronta el cultivo de cebada en los últimos años, dado por las pérdidas en rendimiento que alcanzan hasta un 70% y pérdidas de 90% en 1era. + 2da., afectando así la calidad del grano, teniendo restricción a la hora de comercialización ya que el destino principal del grano es la producción de malta para exportación, lo que hace que la calidad sea un elemento fundamental para la cadena agroindustrial.

A nivel mundial no se ha reportado inmunidad a Rcc, sin embargo, existe variabilidad en el comportamiento de distintos cultivares utilizados. En Europa en los últimos años se inició una liberación de cultivares con niveles moderados de resistencia (Walters et al. 2008, Havis y Gosling 2013). Debido a la problemática mencionada anteriormente, el manejo de ramulariosis depende en gran medida del uso de fungicidas foliares.

Ramularia collo-cygni presenta desventajas para su diagnóstico en etapas tempranas del cultivo (emergencia – principio encañazón), debido a que generalmente en esta fase, a que el hongo se encuentra asintomático creciendo en forma sistémica, y los síntomas iniciales pueden llegar a confundirse con otras enfermedades foliares, deficiencias nutricionales o manchado fisiológico. A pesar de ser un hongo necrotrófico, aún no se conoce la importancia epidemiológica del rastrojo para la ramulariosis, así como tampoco se ha cuantificado la capacidad de diseminación aérea de Rcc. A pesar de que podría diseminarse entre chacras, la principal fuente de inóculo es la semilla, tomando vital importancia en el manejo de esta enfermedad (Havis et al., 2006a, 2006b, 2014).

Hasta el momento no existe ningún fungicida curasemilla registrado con probada eficiencia en el control de la ramulariosis. La principal limitante que ha tenido esta herramienta de manejo es la falta de un método práctico de evaluación de fungicidas curasemilla que permita comparar la eficiencia de distintas moléculas, ya que los métodos estándares, eficientes para la detección de otros patógenos no han brindado resultados consistentes para el caso de Rcc.

En el marco de esta problemática el objetivo general de este trabajo fue contribuir con conocimiento para el manejo de ramulariosis en cebada.

El objetivo específico de este trabajo fue: evaluar el efecto de la inclusión de una carboxamida en el curasemilla para el control de Rcc en semilla de cebada.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTANCIA DE LA CEBADA EN URUGUAY

El cultivo de cebada es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial, cuarto después del trigo, arroz y maíz (Phoelman, 1985). Como características generales, es un cultivo de clima templado, con mayor respuesta en estaciones frías y relativamente secas (Phoelman 1985, Castro 1997). Su principal uso a nivel mundial es la alimentación animal, por su buena calidad tanto en grano como forraje. En Uruguay, el principal destino de la cebada es la producción de malta para exportación, logrando un mayor valor agregado en un menor volumen (Castro, 1997), salvo en años donde la calidad de la cebada se ve afectada, en este caso crece el circuito forrajero dado que no se cumplen las exigencias de calidad para exportación (Donato y Sayas, 2017).

Según MGAP. DIEA (2018) el cultivo de cebada se posicionó dentro de los cultivos de mayor importancia en cuanto a área sembrada en el período comprendido entre las zafas 2010/11 y 2017/18. Esto se debe principalmente a que la cebada les brinda seguridad de comercialización a los productores al realizarse bajo contrato con las industrias, asegurando un precio mínimo de venta (Donato y Sayas, 2017).

A pesar de esto, el área de cebada ha tenido fluctuaciones a lo largo del período analizado, llegando a un máximo en la zafa 2016/17 de 190 mil ha y un mínimo de 61 mil ha en la zafa 2010/11. En cuanto al rendimiento logrado el máximo se dio en la zafa 2015/16 con 3840 kg/ha, alcanzando el máximo de producción del período analizado (Figura No. 1).

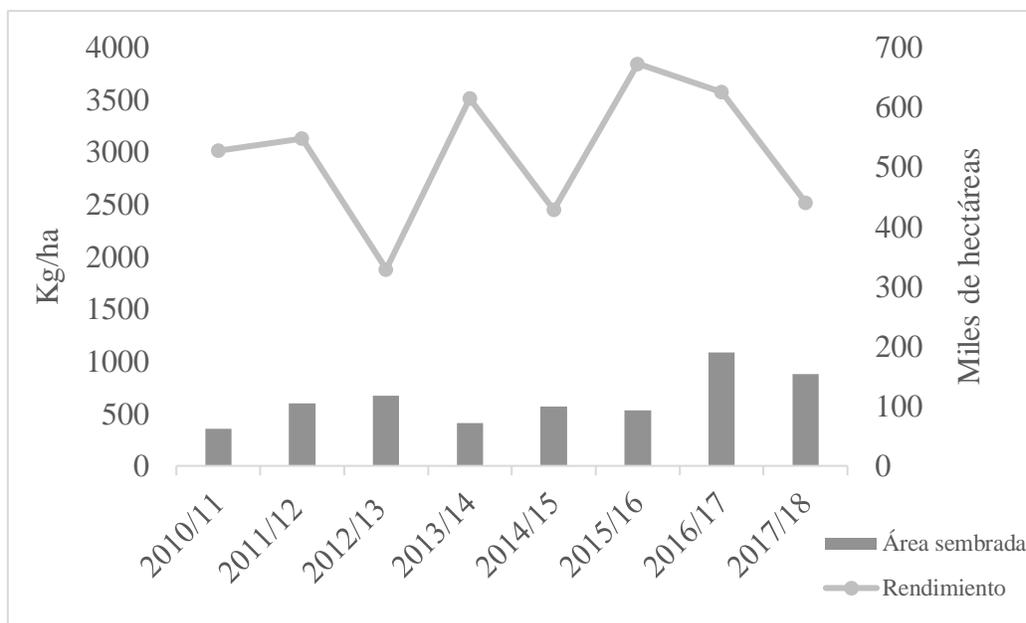


Figura No. 1. Evolución del área de siembra y rendimiento promedio nacional del cultivo de cebada en Uruguay en los últimos 8 años

Fuente: adaptado de MGAP. DIEA (2018).

En la zafra 2012/13 se registró un mínimo en rendimiento de grano promedio (1878 kg/ha). Esto se debió a factores climáticos tales como exceso de lluvias que provocó excesos hídricos, representando así uno de los peores años para el cultivo (Hoffman y Fassana, 2014).

En lo que va del presente siglo, además del descenso en el área, el cultivo de cebada cervecera ha mostrado serias dificultades asociadas con la fuerte variabilidad de los rendimientos (sobre todo en los últimos años). Sin dudas que este tipo de comportamiento, sumado al hecho de que es un cultivo de elevada exigencia en cuanto a calidad de grano, dificultan la inserción actual de la cebada a nivel de producción (Hoffman y Fassana, 2014).

La calidad maltera constituye uno de los factores fundamentales en la producción de cebada cervecera. Según Arias (1991) la calidad maltera está definida por un conjunto de caracteres con importancia para un buen proceso de malteado, dentro de estos los de mayor relevancia son: calibre y peso de grano, porcentaje de extracto de malta, viscosidad del mosto, amonio libre en el mosto, contenido de nitrógeno en el grano malteado, índice de Kolbach, índice Hartong y poder diastático.

Dentro de las causas que pueden afectar la calidad de malta existen factores de origen biótico y abiótico presentes durante el ciclo del cultivo, el proceso de la semilla post cosecha y su almacenamiento. Entre los factores de origen abiótico se pueden mencionar daños mecánicos durante la cosecha, climáticos, físicos y de manejo. Entre los factores de origen biótico el ataque de microorganismos, principalmente hongos (Arias, 1991).

2.2. IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES EN CEBADA

Las condiciones agroclimáticas en Uruguay determinan un ambiente propicio para el desarrollo de epifitias, con temperaturas benignas durante el invierno, frecuente formación de rocío sobre los tejidos vegetales, favoreciendo el establecimiento temprano de patógenos foliares (Pereyra y Germán, 2010).

Las enfermedades foliares se encuentran asociadas a una gran cantidad de microorganismos como hongos, bacterias, levaduras y en menor grado nematodos y virus

(Miles et al., 1989). Los hongos son los principales microorganismos que afectan los cultivos de cebada, tanto rendimiento como en calidad de grano generando daños directos e indirectos. En los daños directos se encuentran enfermedades como manchas foliares como mancha en red común (*Dreschlera teres f. teres*, Carmona et al., 2013), mancha en red tipo spot (*Dreschlera teres f. maculata*, Carmona et al., 2013) y mancha borrosa de la cebada (*Bipolaris sorokiniana*) y fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum*, Miles et al., 1989). Estas enfermedades determinan directamente una disminución en el peso de mil granos y tasa de germinación.

Con respecto a las enfermedades de mayor importancia que causan daños indirectos, las manchas foliares las cuales se caracterizan por producir clorosis y necrosis en las hojas, generando así disminución de radiación interceptada y absorbida. Esta disminución se traduce en menor producción de biomasa por ende menor número de granos, componente principal del rendimiento (Nutter et al., 1985). Dentro de los daños indirectos se encuentra mancha borrosa (causada por *Bipolaris sorokiniana*), escaldadura (causada por *Rhynchosporium secalis*), mancha en red tipo red (causada por *Pyrenophora teres f. teres*), mancha en red tipo spot (causada por *Pyrenophora teres f. maculata*), roya de la hoja (causada por *Puccinia hordei*), oídio (cusada por *Blumeria graminis f. sp. hordei*, Nutter et al., 1985) y ramulariosis (causada por *Ramularía collo- cygni*).

La importancia de cada una de las enfermedades depende fundamentalmente de la resistencia de los cultivares sembrados, de la cantidad de inóculo virulento y de las condiciones climáticas prevalentes. Las pérdidas causadas por estas enfermedades a nivel de rendimiento, peso y calibre de grano (Figura No. 2) presenta fluctuaciones y la magnitud depende del tipo de enfermedad y su nivel de infección (Pereyra y Germán, 2010).

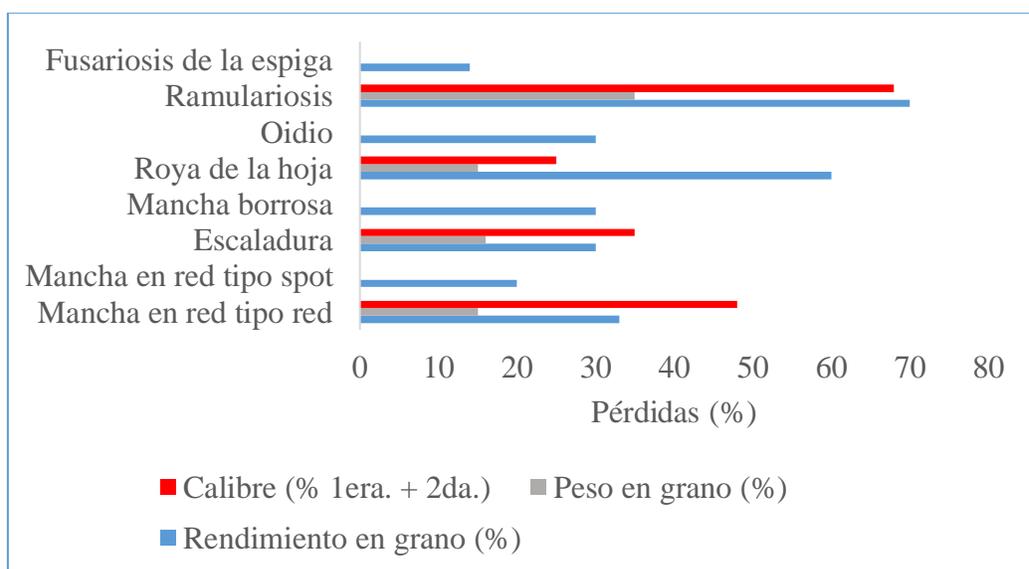


Figura No. 2. Pérdidas de rendimiento, peso en grano y calibre (1era. +2da.), causados por daños indirectos de enfermedades foliares

Fuente: adaptado de Pereyra y Germán (2010).

Dentro de las enfermedades que causan pérdidas de rendimiento, peso y calibre de grano al oídio se lo considera una enfermedad secundaria a nivel nacional, con mayor impacto en zonas húmedas para su óptimo desarrollo (Germán et al., 2005), las pérdidas registradas alcanzan un 30%. Siguiendo con roya de la hoja las pérdidas estimadas en rendimiento llegan a un 60%, afectando también el peso y calibre del grano, estas pérdidas son causadas principalmente por la disminución del área foliar fotosintéticamente activa.

Con respecto a la fusariosis de la espiga, ésta es una enfermedad que además de producir mermas del 14%, su importancia radica en la disminución de la calidad del grano por la producción de micotoxinas como DON (deoxinivalenol) y ZEA (zearalenona), nocivas para la salud animal y humana (Goswami y Kistler, 2004). Lo que refiere a ramulariosis las pérdidas máximas registradas en rendimiento rondan en un 70% (Pereyra, 2013a), mientras que uno de los componentes que más se ve afectado es el tamaño de grano (calibre), las pérdidas en rendimiento de 1era+2da alcanzan valores de 90% (Pereyra, 2013b).

2.2.1. Importancia de ramulariosis

Los primeros reportes de la enfermedad se hicieron hace más de 100 años en Italia (Cavara, 1893). En los últimos años, las epidemias de Rcc se han incrementado a nivel mundial, convirtiéndose en una amenaza grave para la producción de cebada en las regiones templadas de Europa, incluyendo Escocia, Inglaterra, Irlanda, Francia, Dinamarca, Alemania, Austria, Republica Checa y Suiza, así como en Chile, México, Colombia, Estados Unidos y Nueva Zelanda (Havis et al., 2015a). Recientemente se ha identificado la presencia de Rcc en cultivos y muestras de semillas de República Eslovaca, Estonia, Rusia, Islandia, Polonia y España (Havis et al., 2015a), aunque en muchos casos, el diagnóstico de la presencia de Rcc se ha basado en la identificación de estructuras fúngicas características y los síntomas de la enfermedad (Havis et al., 2015a).

Fuera de Europa, Rcc se ha convertido en una fuerte amenaza para la producción de cebada en América del Sur, en Argentina se vio limitada el área típica del cultivo de cebada en el suroeste de la provincia de Buenos Aires, asociándose con una incidencia del 100% y una gravedad de los síntomas entorno de 60 a 100% (Carmona et al., 2013). Una década más tarde, en 2012, se detectó en cultivos de cebada en el norte de la región de la Pampa, en Entre Ríos al sur de la ciudad de Santa Fe, norte y sureste de Buenos Aires, lo

que causó una reducción temprana del área foliar y pérdidas de rendimiento (Carmona et al. 2013, Havis et al. 2014).

Lo que respecta a Uruguay, Rcc ha sido una enfermedad esporádica en el pasado, pero su incidencia ha aumentado en la última década y, desde 2011, se ha convertido en una importante limitante que afronta la producción de cebada a nivel nacional. Se han estimado reducciones en el rendimiento de grano de hasta un 70% en variedades susceptibles durante los años de la epidemia, mientras que la fracción de granos de más de 2,5 mm se redujo en un 90% (Pereyra, 2013a).

Este patógeno no solo se encuentra presente en el cultivo de cebada (Figura No. 3), ya que ha sido reportado en otras especies de gramíneas, lo cual indica que puede distribuirse ampliamente a regiones donde no se siembra cebada o se desconoce la presencia del patógeno (Havis et al., 2015a).

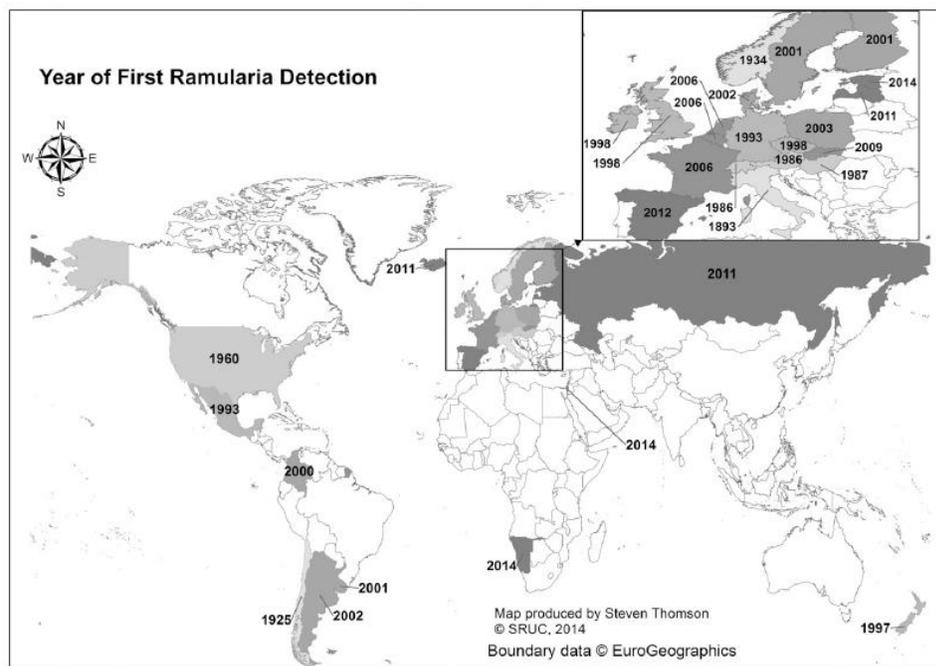


Figura No. 3. Distribución geográfica de *Ramularia collo-cygni*, y año en que fue reportada en cada país

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

Ramularia collo-cygni fue reportado por primera vez a nivel nacional en la zafra del 2000 (Pereyra, 2013a), causando pérdidas de rendimiento de 3000 kg, estimados en un 70% (Pereyra, 2013a). En Argentina el reporte de la enfermedad ocurrió al mismo

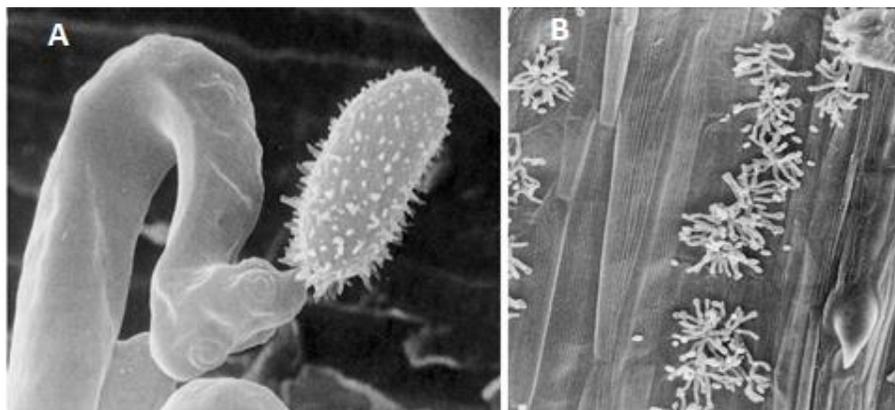
tiempo que en Uruguay, durante la zafra 2000 donde ocurrió una severa epidemia causada por este patógeno provocando pérdidas importantes en rendimiento y peso de granos (Carmona et al., 2013). Durante la zafra 2014/15 se estimaron pérdidas de 750 kg/ha (Carmona y Sautua, 2015). Registros en Europa indican que las pérdidas de rendimiento causadas por este patógeno se vienen incrementando año a año, según Oxley (2004b) las pérdidas de rendimiento estimadas para Rcc fueron de 0.4 tt/ha, sin embargo, años más tardes Havis et al. (2015b) reportan pérdidas de hasta 1 tt/ha en cultivares altamente susceptibles.

Ramulariosis junto con mancha en red tipo red, mancha en red tipo spot y fusariosis de la espiga en la actualidad representan una de las principales limitantes que afrontan los cultivos de invierno para lograr rendimientos y calidad de grano adecuados que exigen las cadenas agroindustriales (Oxley et al., 2008).

2.3. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

2.3.1. Clasificación taxonómica

Cavara (1893) fue el primero en describir el patógeno causante de Rcc como *Ophiocladium hordei*, *Ovularia hordei* y *Ramularia hordeicola*. El hongo ha tenido diferentes nomenclaturas a lo largo del tiempo, según Sutton y Waller (1988) sugieren reclasificar a Rcc en el género *Ramularia*, dentro de la familia *Mycosphaerellaceae* en la clase *Dothideomycetes*, y el nombre “collo-cygni” se debe a la forma que presenta la esporulación del hongo en una vista ampliada de microscopio. La forma del conidióforo, lo que sería un tallo fértil del hongo que produce las esporas, es retorcida y presenta forma de cuello de un cisne (Figura No. 4), y en su extremo se coloca la espora o conidio, de forma ovalada.



A: conidióforo de *Ramularia collo-cygni* en forma de cuello de cisne.

B: disposición de conidióforos sobre hoja de cebada, observado bajo microscopio de barrido de electrones.

Figura No. 4. Micrografía de *Ramularia collo-cygni*

Fuente: tomado de Sutton y Waller (1988).

2.4. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas iniciales de ramulariosis consisten en pequeñas manchas marrones de forma irregular (salpicado) sobre las hojas con un tamaño de 1-3 mm de largo y 0,5 mm de ancho (Havis et al., 2015b). En etapas tempranas (plántulas y hojas recién emergidas – encañazón), es difícil diagnosticar la presencia de ramulariosis dado que el hongo en esta fase generalmente se encuentra asintomático creciendo en forma sistémica y con importante tiempo de latencia, hasta que se visualizan lesiones sobre el tejido foliar (Figura No. 5, Oxley et al., 2008).

Ramularia collo-cygni (Rcc) está relacionado a un componente abiótico (manchado fisiológico), las cuales son más superficiales y solo visibles al lado expuesto a la luz, lo cual permite diferenciar los síntomas causados por el hongo o deficiencias nutricionales dadas por exigencias metabólicas por parte del cultivo (Havis et al., 2015a), manchas fisiológicas de la cebada, y en general aparecen mezcladas con síntomas de otros patógenos como mancha en red (*Drechslera teres*), mancha borrosa (*Bipolaris sorokiniana*) o escaldadura (*Rynchosporium secalis*, Oxley et al., 2008).

El manchado fisiológico depende de las variedades utilizadas, algunas presentan más manchas fisiológicas en las hojas que otras, esto se debe a la capacidad que tienen algunas variedades para producir la enzima superóxido dismutasa (Havis et al., 2015a). Esta enzima produce antioxidantes que absorben los efectos negativos y dañinos de los superóxidos producidos dentro de la planta como consecuencia de la exposición prolongada a la radiación solar (McGrann y Havis, 2017).

La elección varietal es una de las opciones que han optado los mejoradores para minimizar el impacto, logrando variedades menos susceptibles a producir manchas en las hojas (McGrann y Havis, 2017). La nutrición mineral es un factor clave, principalmente el nitrógeno, es muy probable que sea el nutriente más limitante en las variedades que se cultivan en el mercado, sin embargo, para la maltería se exige un límite de este nutriente en los granos (14%, Oxley et al., 2008). Dentro de los micronutrientes, el manganeso es esencial para muchas enzimas vegetales, lo cual deficiencias de este nutriente tienen mayor grado de predisposición al manchado, dado que se limita la capacidad de la planta para producir la enzima superóxido dismutasa, esta controversia se puede revertir a través del tratamiento de semillas y manganeso foliar. Es poco probable que las aplicaciones del nutriente en el suelo sean eficientes, dado que los niveles en el suelo generalmente suelen

ser altos, pero la disponibilidad del mismo está limitada cuando el suelo presenta alto pH (Oxley et al., 2008).



Figura No. 5. Síntomas característicos de *Ramularia collo-cygni* sobre hojas de cebada, con manchas necróticas en la parte del envés de las hojas

Las lesiones causadas por Rcc también se las puede observar en las aristas y las vainas de las hojas en los tallos (Figura No. 6). En éstas, las lesiones son más pequeñas en comparación con los síntomas de la hoja, pero comprenden manchas rectangulares a igual que las causadas en el área foliar, rodeadas por un halo clorótico de color amarillo. Los síntomas tanto en aristas como en vainas continúan siendo visibles luego de alcanzar la senescencia (McGrann y Havis, 2017).



Figura No. 6. Manchas necróticas de ramulariosis dispuestas en la hoja bandera y vainas con un 80% de severidad, en un cultivo de cebada en estado grano acuoso.

En etapas posteriores las lesiones causadas por Rcc permanecen visibles a ambos lados de la hoja (Figura No. 7), las cuales entran en senescencia rápidamente y se pierde

toda el área foliar fotosintéticamente activa, que inicialmente se vuelve amarilla (clorótica) antes de morir por completo (McGrann y Havis, 2017).



Figura No. 7. Pérdida total del área foliar fotosintéticamente activa causada por *Ramularia collo-cygni*

La rápida senescencia foliar se encuentra asociada a la producción de toxinas vegetales, identificadas como rubelinas, que contribuyen al desarrollo y visualización de los síntomas. Las rubelinas pertenecen a un grupo de metabolitos antraquinoides estrechamente relacionados (rubelina A, B, C, D). La rubelina D está relacionada con la formación de los síntomas típicos causados por Rcc, provocando la muerte total de la hoja, ya que se extiende desde la fuente inicial de infección, hasta el resto de la hoja. El daño que provoca la rubelina D es una muerte prematura de la hoja, esto se debe a que la rubelina es activada por la luz para desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno (McGrann y Havis, 2017).

2.5. EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD

Ramulariosis presenta varias fuentes de inóculo, puede persistir en semillas de cebada, esporas en el aire, rastrojo del cultivo y otras especies de gramíneas (Walters et al., 2008).

El rango de hospederos de Rcc es muy amplio. Varias especies son hospederos de este patógeno, aunque cuando se habla en términos económico, se destaca por el daño que causa en el cultivo de cebada principalmente (Cuadro No.1).

Cuadro No. 1. Especies huéspedes de *Ramularia collo-cygni*

Cereales	Forrajeras
<i>Avena fatua</i>	<i>Agropyron repens L. Beauv</i>
<i>Avena sativa L.</i>	<i>Dactylis glomerata</i>
<i>Hordeum murinum</i>	<i>Elymus sp.</i>
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Festuca kingii</i>
<i>Triticum aestivum L.</i>	<i>Lolium multiflorum Lam</i>
<i>Triticum durum Dest.</i>	<i>Lolium perenne L.</i>
<i>Triticum secalim</i>	<i>Phalaris arundinacea</i>
	<i>Poa pratensis L.</i>

Fuente: tomado de Walters et al. (2008), Havis et al. (2015b), Kaczmarek et al. (2016).

No se cuenta con información nacional respecto a la importancia de la semilla como fuente de inóculo. Sin embargo la ocurrencia de epifitias en chacras sin presencia de rastrojo de cebada y sin cultivos vecinos, indica que la semilla sería una importante fuente de inóculo de esta enfermedad (Havis et al., 2014) Contar con un valor mínimo de referencia para el uso comercial de la semilla es de suma importancia, ya que, al ser la principal fuente de inóculo, me permite evitar la enfermedad en zonas donde no ha sido introducida (Havis et al., 2014).

El hongo presenta una gran capacidad de esporulación. Se calcula una masa de 3×10^{12} conidios/ha desde un campo severamente afectado por la enfermedad (Oxley et al., 2008). Los conidios son secos, pequeños y livianos por lo que pueden ser transportados por el viento a largas distancias (Havis et al., 2014). La esporulación ocurre principalmente sobre el tejido necrótico.

En el caso de la dispersión de esporas, la humedad sobre las hojas es un factor importante para la dispersión de la misma y posterior infección. El tiempo que permanece la humedad sobre las hojas en primavera está relacionada con la gravedad de los síntomas de ramulariosis que se producen luego de floración. Esta observación se puede utilizar como un método para pronosticar el riesgo potencial de la mancha de la hoja causada por el hongo (McGrann y Havis, 2017).

Al igual que los demás patógenos, las condiciones ambientales juegan un rol importante para el desarrollo de ramulariosis. Dentro de las condiciones ambientales las

lluvias favorecen la infección, sumado a las horas de mojado para la germinación y desarrollo temprano de la enfermedad (Figura No. 8, Havis et al., 2006b). Los primeros síntomas descritos anteriormente se pueden detectar a la salida del invierno, consistiendo en pequeñas manchas necróticas en las hojas. A propósito, se encontró que en condiciones de rocío en la superficie de las hojas son suficientes para desencadenar la germinación de los conidios y posterior desarrollo (Havis et al., 2006b).

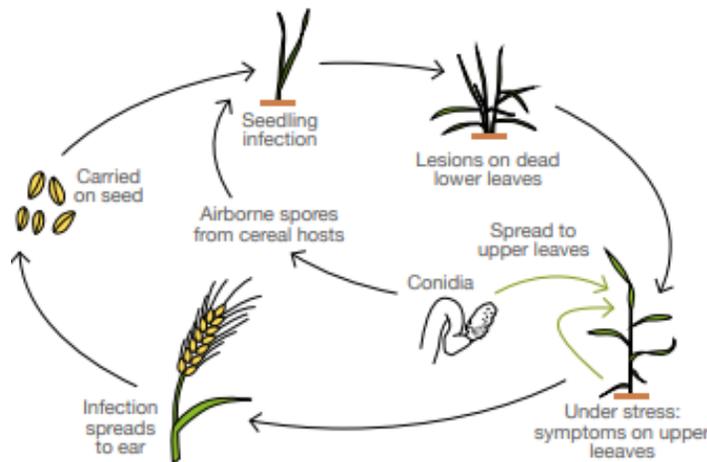


Figura No. 8. Ciclo de *Ramularia collo-cygni*

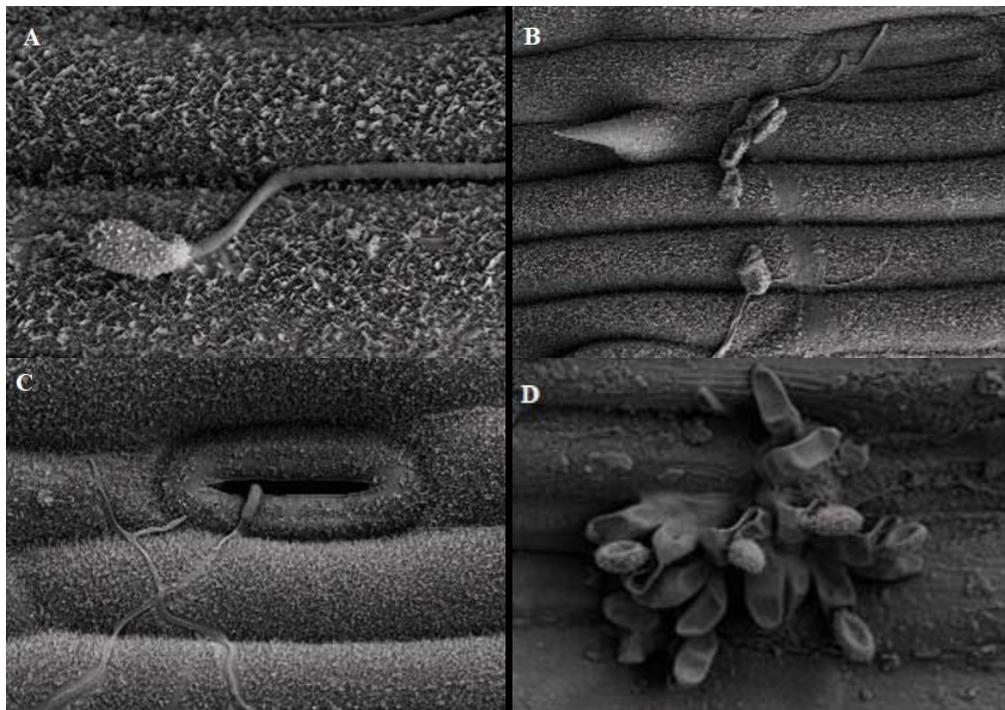
Fuente: tomado de AHBD (2018).

La germinación y crecimiento del micelio ocurre de forma rápida a través de los estomas de las hojas, en un lapso de 24 h, formando hifas intercelulares ocupando un área importante de tejido foliar (Sutton y Waller, 1988). La fase sintomática o visible que presente Rcc ocurre cuando las hojas comienzan a morir ya sea como consecuencia del envejecimiento natural, el clima o el estrés nutricional, provocando cambios en el hongo dentro de la hoja. Los síntomas en las hojas se van incrementando desde las hojas basales hacia las superiores, independiente del ciclo fenológico del cultivo (Sutton y Waller, 1988).

Las esporas son liberadas fácilmente con ambiente favorable, es decir lluvias y temperaturas óptimas que favorezcan la liberación. La liberación del inóculo depende de la humedad de las hojas siendo más importante que la lluvia. Las esporas se liberan en el aire 24-48 horas después de un período prolongado de humedad en las hojas de varias horas. La infección secundaria ocurre a través de los estomas de las hojas (Figura No. 9, Carmona y Sautua, 2015).

Las hojas infectadas van senesciendo, por lo que el hongo pasa a su fase saprofítica y sobrevive en el rastrojo presente en el suelo. En situaciones de estrés, es decir exceso o déficit hídrico, o temperaturas anormales en el período crítico del cultivo (Z32-33- Z65-70), los efectos de la enfermedad logran acentuarse aún más (McGrann y Havis, 2017).

Los efectos provocados por la enfermedad se producen sobre la calidad y cantidad de grano, el peso específico y la producción final. Estos efectos comienzan con el nacimiento de las plantas de cebada, si la semilla está infectada, durando todo el ciclo del cultivo, pero son más marcados a partir de la primavera (McGrann y Havis, 2017).



A: se observa la espóra germinada sobre la superficie de la hoja.

B: germinación de esporas en la superficie de la hoja.

C: infección causada por el hongo a través de los estomas.

D: conidióforos y esporas de Rcc sobre la superficie de la hoja.

Figura No. 9. Micrografías microscópicas de barrido de *Ramularia collo cygni*

Fuente: tomado de Oxley et al. (2008).

2.6. MEDIDAS DE CONTROL DE RAMULARIOSIS

2.6.1. Control cultural

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

Estudios realizados en Europa (Escocia y Dinamarca), en cuatro localidades para cada región, determinaron que la distribución alélica en ambas poblaciones fue muy similar aunque estén separadas a cientos de kilómetros, determinando que la principal fuente de dispersión del patógeno es la semilla, trasladándose a largas distancias (Hjortshøj et al., 2013). A su vez concluyeron que la implementación de monocultivo puede promover la permanencia del patógeno sobre el rastrojo, pero no fue significativo como para afirmar la permanencia del mismo en ambas regiones (Hjortshøj et al., 2013).

Se han examinado controles de Rcc en semillas mediante tratamientos de agua caliente, en el cual se probaron diferentes temperaturas (48-52 °C) con un tiempo de 5-30 min, logrando disminuir la concentración de ADN del hongo, pero reducía significativamente el porcentaje de germinación entre un 50-80%, lo cual se descartó ya que causaba daños en el embrión (Zamani-Noor, 2011).

2.6.2. Control genético

Con respecto a la incorporación de resistencia, el mejoramiento genético local se ha basado en la introducción de germoplasma de Europa (según características de interés), con el objetivo de combinar la resistencia a las enfermedades causadas por diferentes patógenos con el germoplasma local, introduciendo alelos de resistencia a cultivares que presentan buena adaptación climática pero presentan un nivel de susceptibilidad alto frente a un patógeno (Castro, 2002). Las fuentes de resistencia se identifican a nivel de planta adulta caracterizándose su comportamiento, para el caso de manchas foliares se busca incorporar resistencia a materiales con buena adaptación y calidad maltera mediante retrocruzas (Castro, 2002).

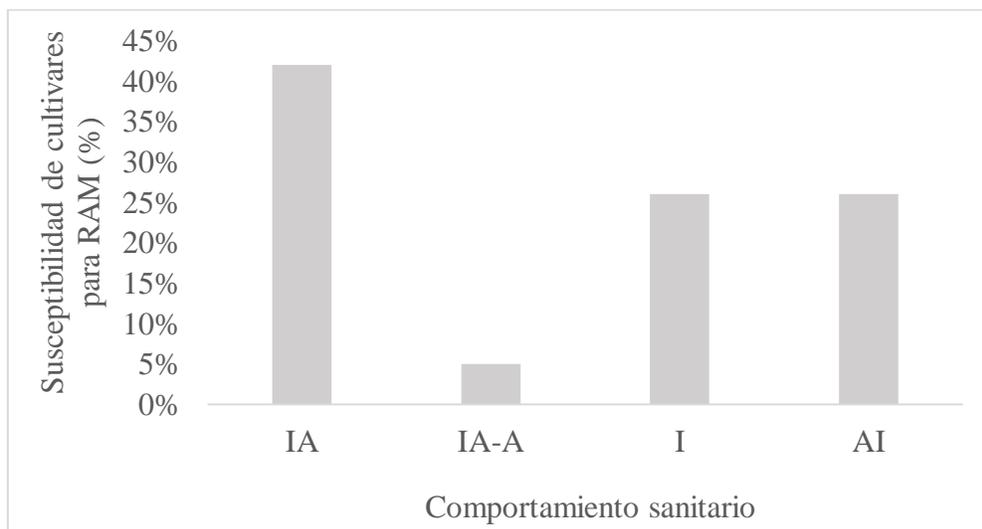
Investigaciones llevadas a cabo en Noruega en los cuales se evaluó la resistencia genética en diferentes variedades de cebada se concluyó que aún no existen resistencia completa para ramulariosis (Reitan y Salamanti, 2006). Continuando con la misma línea de investigación propuesta por Reitan y Salamanti (2006) se realizaron ensayos a campo en los cuales se evaluó la interacción genotipo por ambiente de los individuos evaluados y el comportamiento frente a la enfermedad. Los resultados obtenidos en esta línea de investigación, determinaron que los peores resultados frente a ramulariosis se obtuvieron

de aquellos genotipos que tienen el gen MLO (resistente al oídio) caso contrario se observó en aquellos con mejor comportamiento frente a la enfermedad (Bistrich et al., 2007).

El gen MLO por sí solo no es el causante del incremento de la enfermedad en los genotipos evaluados, esto se debe a lo mencionado anteriormente, al someter a los individuos bajo condiciones ambientales diferentes, previo a la ocurrencia de la infección, favorece el desarrollo de la epifítia, observándose la interacción genotipo por ambiente, esto replantea el efecto que tiene el ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad para el mismo individuo evaluado (Oxley et al., 2008).

En Uruguay hay una creciente introducción de material genético europeo el cual representa un 60% de los materiales estudiados según la Evaluación Nacional de Cultivares. La incorporación del material genético, como ya se mencionó anteriormente, es principalmente por exigencias de la industria maltera las cuales exigen mayor calidad y potencial de rendimiento. Sin embargo pese al interés por mejorar dichos cultivares las limitantes que presentaron los genotipos introducidos a nivel nacional estuvieron asociados principalmente a fenología, clasificación de granos y sanidad. Estas características se lograron observar luego de evaluados los genotipos en diferentes ambientes (Castro et al., 1997).

El comportamiento de los genotipos evaluados en la zafra 2017/18 presentan una susceptibilidad intermedia-alta frente a Rcc (Figura No. 10, Castro et al., 2017).



Comportamiento sanitario de 19 cultivares de cebada cervecera frente a *Ramularia collo-cygni* evaluados en el año 2018.

IA: Susceptibilidad Intermedia-alta

IA-A: Susceptibilidad Intermedia alta- alta

I.: Susceptibilidad Intermedia

AI: Susceptibilidad Alta – intermedia.

Figura No. 10. Comportamiento sanitario de cebada frente a *Ramularia collo-cygni*

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

2.6.3. Control químico

2.6.3.1. Fungicidas foliares

Actualmente en Uruguay el control de ramulariosis presenta limitantes, la cual depende del uso de fungicidas. Dada la alta – media susceptibilidad que presentan los cultivares utilizados frente al patógeno, la elección del producto a utilizar y el momento de aplicación son fundamentales para lograr un control efectivo (Pereyra, 2013a).

Entre los productos que han tenido mayor eficiencia de control de ramulariosis en nuestras condiciones, se encuentran: mezclas de triazoles +estrobirulinas +clorotalonil, y mezclas de triazol + estrobirulinas + boscalid (Pereyra, 2013b).

Según Pereyra y Pérez (2017) el manejo efectivo frente a ramulariosis dependerá de cuan eficiente es la detección del patógeno, dado que el hongo está estrechamente relacionado a las condiciones climáticas en las cuales se encuentre expuesto. Es de suma importancia monitorear las chacras, para lograr evitar aplicaciones tempranas, sin presencia del hongo, o aplicaciones tardías (con niveles de infección elevados). La aplicación en el momento justo permite un uso eficiente de los fungicidas, y reducir el riesgo de aparición de resistencia a fungicidas por aplicaciones innecesarias.

Se recomienda hacer una intervención química ante la presencia de primeros síntomas de la enfermedad (Pereyra y Pérez, 2017). Incluso en años donde las condiciones favorecen a la enfermedad en primeras etapas de crecimiento, se logra respuesta a la doble aplicación, dado que una aplicación previa a Z47 difícilmente logre un periodo de acción del control químico que le permita completar el llenado, lo cual quedaría susceptible frente al ataque del patógeno si se ve favorecido.

A nivel internacional Jorgensen y Christiansen (2006) continuando con la línea de investigación realizada por Oxley et al. (2006), determinaron un momento óptimo de

control para ramulariosis, siendo el momento más efectivo entre Z37 y Z55 correspondiente a la aparición de la hoja bandera hasta la mitad de espigazón, siendo los productos más efectivos protioconazol, clorotalonil y boscalid. Aplicaciones posteriores a floración, la respuesta fue menos significativa pudiendo comprometer el rendimiento del cultivo.

Los productos utilizados presentan diferentes sitios de acción, por lo que la rotación de los mismos puede evitar resistencia por parte del patógeno, aunque existen situaciones donde la sensibilidad de algunos productos ya se ha disminuido (Fountaine y Fraaije 2009, Matusinsky et al. 2010).

2.6.3.2. Resistencia a fungicidas

En la actualidad debido al incremento del uso de fungicidas, las principales causas que originan resistencia a dichos productos son causados por alteraciones genéticas que modifican el sitio de acción del fungicida en la célula del patógeno objetivo de control. Esta modificación está determinada por un cambio genético heredable en el genoma. El desarrollo de resistencia de los patógenos para diferentes productos químicos está relacionada con la biología del patógeno y su variabilidad intrínseca, sumado al sitio de acción del fungicida en la célula fúngica (Brent y Hollomon, 2007).

Conocer el sitio de acción de un principio activo puede indicar cuál es el riesgo de generar resistencia por parte de los hongos patógenos, a su vez el proceso de resistencia está regulado por la cantidad de genes que gobiernan las enzimas y sus rutas metabólicas involucradas en dicho proceso. El sitio de acción como ya se mencionó anteriormente (único sitio de acción en la célula donde actúa), en comparación con otros multi-sitios (varios sitios de control) es indicador de mayor riesgo de generar resistencia (Steffens et al. 1996, Brent y Hollomon 1998).

Los fungicidas pueden ser sitio específicos, es decir afectan enzimas específicas de cada patógeno, resultando en una rápida evolución de la resistencia en los patógenos como es el caso de las estrobirulinas (Gisi et al. 2002, Fisher y Meunier 2008). Este fungicida fue efectivo hasta el 2002 en el cual comenzaron las primeras “fallas” de este producto y su consecuente disminución en el uso del mismo (Oxley y Hunter, 2004).

Investigaciones llevadas a cabo en Europa afirmaron que las pérdidas de efectividad de control de ramulariosis se debían a la existencia de cepas o razas del hongo resistentes a las estrobirulinas, desarrolladas en el Reino Unido durante el período 2001-2002 (Fountaine y Fraaije, 2009).

El desarrollo de resistencia de Rcc frente a este producto se debió simplemente a la sustitución de un aminoácido (glicina por alanina en la posición número 143 del gen que codifica para el citocromo b, el cual conforma el complejo enzimático III, ubicado en la membrana mitocondrial, participando de la cadena de transporte de e⁻ para generar

energía en forma de ATP), siendo el causante del incremento y quiebre de resistencia a nivel cualitativo (Avenot y Michailides 2010, Scalliet et al. 2012).

La azoxistrobina fue uno de los productos mayormente utilizados y recomendada como tratamiento fungicida efectivo frente a ramulariosis; pero durante el 2001-2002 y debido a su uso generalizado se detectaron las primeras cepas resistentes a Rcc desarrolladas en el campo (Avenot y Michailides 2010, Scalliet et al. 2012).

Debido al incremento de cepas resistentes detectadas en Reino Unido, en la actualidad no se utilizan más las estrobirulinas para el control de ramulariosis, siendo que fue uno de los primeros fungicidas que logro control sobre el patógeno. El uso de las estrobirulinas disminuyó rápidamente entre 2003 y 2005, y ya para el 2006 eran completamente ineficaces. Mediante un análisis se comprobó que todos los aislados del Reino Unido examinados llevaban la mutación que confiere resistencia a las estrobirulinas, utilizando mezcla de inhibidores de la succinato deshidrogenasa como las carboxamidas (Avenot y Michailides 2010, Scalliet et al. 2012), y un fungicida con mecanismo de acción multi-sitio con muy bajo riesgo de generar resistencia como es el caso del clorotalonil.

A nivel nacional estudios llevados a campo durante el año 2012, la azoxistrobina en mezcla con carboxamida brindó un óptimo control frente a ramulariosis, logrando mayor rendimiento en grano en comparación con aplicaciones solo en base a carboxamidas (Pereyra 2013a, Carmona et al. 2013). En Argentina se utilizan mezclas de triazoles + estrobirulinas, durante la zafra 2000/01 esta mezcla controló ramulariosis en el cultivo con aplicaciones ante la detección de los primeros síntomas reportados (Carmona et al., 2013).

2.6.3.3. Fungicidas curasemillas

En la actualidad el interés por fungicidas curasemillas se ha incrementado dado que permite un control efectivo desde implantación del cultivo (González, 2015). Estratégicamente es de suma importancia para el país disponer de productos curasemillas como instrumento fundamental para disminuir el uso de fitosanitarios de aplicación foliar, dado que presentan menor costo de producción e impacto ambiental (González, 2015).

A pesar de ser la semilla la principal fuente de inóculo de Rcc, hasta el momento no se conocen fungicidas cursemillas que presenten una probada eficiencia para el control de la misma, por lo que contar con estos sería un avance para la agricultura (Pereyra, 2013a).

En Alemania Zamani-Noor (2011), evaluó diferentes fungicidas curasemillas en cebada para el control de ramulariosis en el cual se aplicaron tres fungicidas comerciales

con los siguientes principios activos: 1) fluxastrobina, tebuconazol, protioconazol, triazóxido 2) ciprodinil, fludioxinil, tebuconazol y 3) ciproconazol + imazalil, siendo esta última mezcla la más eficiente frente al control de ramulariosis. Sin embargo se determinó que no elimina el hongo por completo sino que lo reduce en 0,3 ng de ADN del hongo /100 mg de ADN total con respecto al testigo sin tratar (0,4 ng de ADN del hongo/ 100 mg de ADN total).

En Escocia durante el 2010/11 se realizaron una serie de ensayos en las variedades Cocktail, Optic y Decanter probando una mezcla de fungicida curasemilla para el control de ramulariosis. La mezcla estaba integrada por: protioconazol + triazóxido + tebuconazol. Los resultados obtenidos para los diferentes ensayos de las variedades evaluadas determinaron una disminución significativa de la ramulariosis, medida como área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (Havis et al., 2012).

2.7. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS CURASEMILLAS MEDIANTE TÉCNICAS DE qPCR

En la actualidad, se ha desarrollado una nueva tecnología basada en la reacción de cadena de la polimerasa. La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), ha brindado mayor eficiencia, rapidez, cuantificación y detección del material genético de variados microorganismos patógenos incluyendo bacterias, virus y hongos, que la PCR convencional (Zipper et al., 2004).

En los últimos años, se ha comenzado a aplicar esta tecnología para la detección de Rcc, dada las ventajas sobre la PCR convencional que garantizan su utilidad para el análisis de semilla y plántula, ya que presenta mayor sensibilidad y especificidad para su detección (Taylor et al., 2010).

Existen varias estrategias utilizadas para la generación de fluorescencia en reacciones de qPCR. Las más conocidas son el uso de agentes intercalantes (SYBR[®] Green I) y las sondas de hidrólisis (TaqMan[®]). Cada método en si tiene sus características únicas, sin embargo la estrategia general es simple: debe haber un vínculo entre la emisión de fluorescencia y la amplificación del ADN (Zipper et al., 2004).

Los reactivos de SYBR[®] Green I son uno de los marcadores de ADN de mayor utilización en qPCR dado que presenta un alto grado de sensibilidad. El mecanismo de unión del SYBR[®] Green I al ADN (intercalante vs. unión al surco menor del ADN) aún no es muy claro (Zipper et al., 2004), dado que se une preferentemente al ADN de cadena

doble, detectando productos de PCR cuando se acumulan durante los ciclos de PCR (Zipper et al., 2004).

La tecnología TaqMan®, es específica para la amplificación de determinada secuencia blanco, se basa en la hibridación específica del producto PCR con una sonda (oligonucleótido de 20-24 bases). La sonda presenta en su extremo 5' un colorante fluorescente indicador, y en el extremo 3' un colorante extintor (Sharma y Carlson, 2000). Mientras que la sonda se encuentre intacta, la proximidad del extintor reduce de manera importante la fluorescencia emitida por el fluorocromo indicador.

Si la secuencia diana está presente, la sonda es degradada por la acción de la ADN Taq polimerasa. La partición de la sonda TaqMan® libera el colorante indicador del extintor, logrando un aumento en la emisión de la luz por parte del indicador. Al transcurrir los ciclos de amplificación se va generando el producto de PCR y como resultado, se produce un aumento en la intensidad de la fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de amplicón producido (Figura No. 11, Sharma y Carlson, 2000).

La qPCR adiciona las ventajas del uso de las sondas TaqMan®, específicas para Rcc, lo cual dada su fase asintomática limita su detección por técnicas convencionales, debido a que se combina la sensibilidad de PCR con la generación de una señal fluorescente específica, proporcionando un análisis en tiempo real de la cinética de la reacción, permitiendo la cuantificación de dianas específicas de ADN.

Esta particularidad que presenta la Taq polimerasa utilizada en la qPCR reduce de manera notable el tiempo de análisis, permitiendo analizar un mayor número de muestras. Otra ventaja frente a la PCR convencional, es que presenta mayor sensibilidad y de esa forma evita el riesgo de falsos positivos, a su vez la concentración de ADN de Rcc se mide en cada ciclo amplificado, de esa forma se obtiene una relación proporcional entre la concentración del ADN de Rcc y el número de ciclos de amplificación sin necesidad de hacer algún tipo de intervención adicional posterior a la amplificación (Zipper et al., 2004).

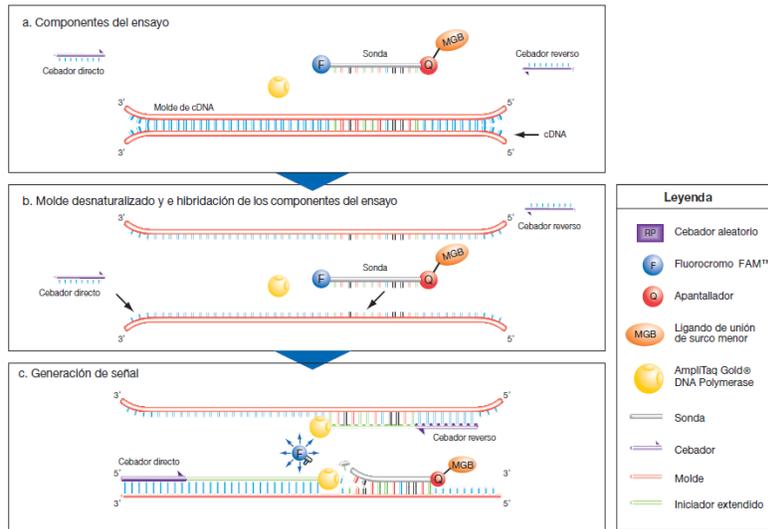
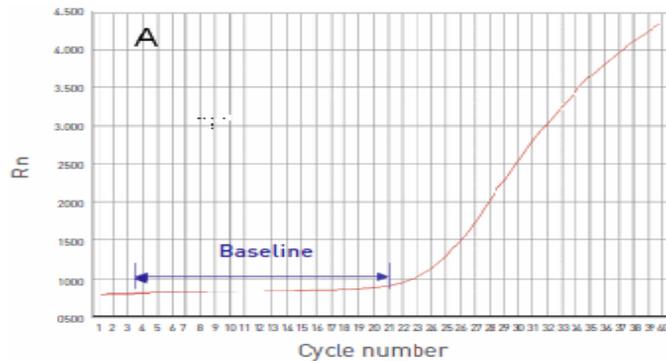


Figura No. 11. Proceso de qPCR con tecnología TaqMan

Fuente: tomado de Applied Biosystem (2010).

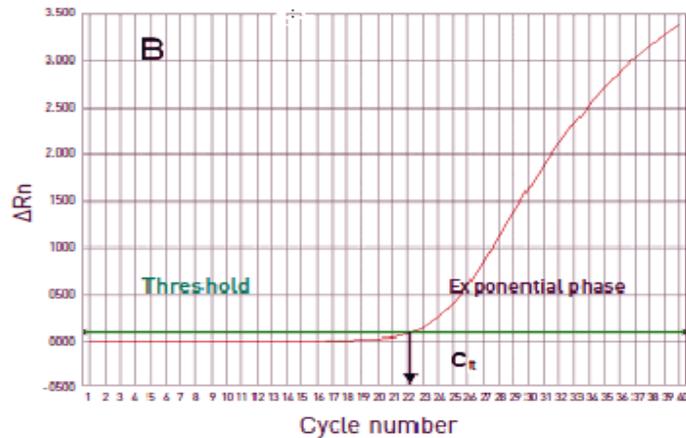
Para evaluar la reacción de qPCR son varios los aspectos a considerar, esta tecnología muestra la cantidad de secuencias de ADN que está presente en las muestras mediante gráficas de análisis de datos (Figuras No. 12 A y 12 B)



A: Rn en función del número de ciclo de PCR.

Figura No. 12. Gráfica de amplificación de ADN

Fuente: tomado de Applied Biosystem (2010).



B: ΔR_n en función del número de ciclos de PCR.

Fuente: tomado de Applied Biosystem (2010).

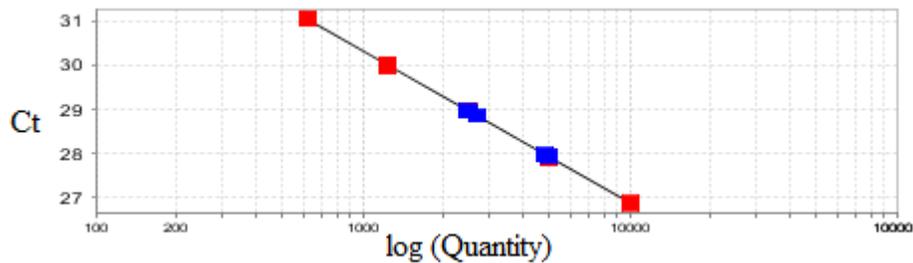
Las gráficas de amplificación permiten visualizar las muestras en la medida que se colectan los datos de fluorescencia durante el proceso. El R_n es la fluorescencia de fluorocromo del indicador (Figura No. 12A) en función del número de ciclo de PCR, la cual tiene como función identificar y examinar las amplificaciones defectuosas.

Se representa ΔR_n (valor de R_n en un ciclo dado después de sustraerle la medida de la fluorescencia basal) en función del número de ciclos (Lockey et al., 1998, Figura No. 12 B). Es la magnitud de la señal de fluorescencia normalizada la cual genera un proceso de PCR, datos con los cuales se calcula el C_t , permitiendo la identificación de amplificaciones defectuosas y observar los valores de la línea umbral y línea base del proceso.

La C_t se define como el número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia supere un cierto umbral de detección y se refleje en un resultado positivo. Los valores esperados de C_t son mayores a 8 y menores a 35. La cantidad de ADN presente en una muestra se logra interpolando el valor de C_t obtenido en la curva de valores de C_t generados a partir de cantidades de ADN ya conocidos. A mayor C_t indica que menor será la cantidad de ADN presente en la muestra, dado que con menor cantidad de ADN se requerirán mayor número de ciclos de PCR para lograr superar el umbral de detección, caso contrario C_t con valores menores a 8 la reacción presenta demasiado molde (Figura No. 12B).

De esta forma en el análisis de qPCR permite observar C_t en función de la concentración de ADN de la muestra analizada mediante una curva estándar. La curva estándar depende de tres parámetros para su correcto análisis: coeficiente de correlación (R^2), eficiencia de amplificación y la pendiente de la curva. El valor R^2 mide cual es la

proximidad del ajuste entre la recta de regresión y cada valor Ct analizado. Si se obtiene un valor de 1,00 significa que el ajuste obtenido entre la recta de regresión y cada valor Ct fue óptimo, se considera un valor esperado mayor a 0,99. Cuando la pendiente es próxima a -3,32 indica una eficiencia en amplificación de PCR óptima del 100% calculada a partir de la pendiente de la recta de regresión de la curva estándar. Por último, el valor Y-inter representa el valor en donde se cruza la línea de regresión en el eje Y, indicando ese valor el ciclo umbral esperado para cada muestra (Figura No. 13).



Valor Ct en función de la concentración de ADN del hongo en la semilla mediante curva estándar expresado en microlitros u obtenida por dilución decimal estándar.

Figura No. 13. Curva estándar (puntos rojos) y concentración de ADN del hongo (puntos azules)

Fuente: tomado de Applied Biosystem (2010).

La qPCR es una excelente herramienta para el diagnóstico de Rcc dado que su utilización permite detectar con precisión la colonización y desarrollo del hongo en plántulas y semillas de cebada, ya que presenta una particularidad con respecto a otras enfermedades foliares, una fase asintomática que impide un correcto diagnóstico pudiendo confundirse con otras enfermedades o manchado fisiológico (Havis et al., 2006a).

Taylor et al. (2010) desarrollaron una prueba de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación de los niveles de ADN de Rcc a nivel de plántula, afirmando una relación entre los síntomas de las plántulas y la concentración de ADN del hongo mediante qPCR. De esa forma indicó que los niveles de Rcc pueden ser medidos en las plántulas en crecimiento para su detección.

En República Checa mediante un análisis de qPCR revelaron la presencia de Rcc en las capas de la cubierta de la semilla y la lema, aunque no se detectó ADN del hongo

en el endospermo (Leisova-Svobodova y Matusinsky, 2012). Dichos autores destacan que los niveles de infección de semilla fueron bajos comparados a las realizadas en Reino Unido y América del Sur (Havis et al., 2015a). Sin embargo determinaron que la ubicación del hongo en diferentes partes de la semilla se podría explicar por la variación de los niveles de infección en plantas cosechadas a campo en comparación con las plantas inoculadas artificialmente.

Un número de estudios han demostrado que Rcc se trasloca desde la semilla infectada hacia plántula, tanto en ambientes controlados como a campo, lo que confirma la transmisión vertical del hongo independiente del ambiente (Havis et al., 2015a).

La detección del patógeno en lotes de semillas permite determinar la calidad de los mismos y programar la intervención con las prácticas que utilizan fungicidas curasemillas para su control en caso de ser necesarios. Conocer la carga fúngica permite determinar si las semillas están en condiciones de utilización, tomando como referencia límites máximos de ADN de Rcc recomendados en Inglaterra siendo de 1pg de ADN Rcc/ng de ADN total (Havis et al., 2015a). En casos donde la enfermedad no se encuentra instalada se aceptan valores de hasta 5 pg de ADN Rcc/ng de ADN total (Oxley y Havis, 2010). Por otra parte en cultivos ya establecidos, la detección de Rcc por qPCR permite confirmar su presencia cuando aún pueden no observarse síntomas en el cultivo

Siguiendo con los estudios realizados por Taylor et al. (2010), en el presente trabajo se utilizaron semillas con diferentes niveles de infección de Rcc que afectaron el cultivo de cebada en Uruguay, provenientes de la zafra 2016/17.

Con el objetivo general de este trabajo de contribuir en el manejo de ramulariosis, las hipótesis planteadas fueron:

- el método adaptado de cuantificación de Rcc mediante qPCR es eficiente para evaluar la eficiencia de control de Rcc con fungicida curasemilla.
- la inclusión de una carboxamida en el fungicida curasemilla mejora el control de Rcc en semilla de cebada en relación a un fungicida curasemilla sin carboxamida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el efecto del fungicida curasemilla sobre el inóculo de Rcc en la semilla, se seleccionaron dos lotes de cebada con nivel de infección alto y muy alto, y se evaluaron tres tratamientos: i) testigo, ii) curasemilla mezcla con carboxamida, y iii) curasemilla sin carboxamidas. Dicho estudio se realizó con un diseño factorial completo (Cuadro No.2):

- Nivel de infección de Rcc
 - Muy Alto
 - Alto
- Curasemilla
 - Testigo sin fungicida curasemilla
 - Mezcla con carboxamidas: (fluxapiraxad + triticonazol)
 - Mezcla sin carboxamidas: (carbendazim + thiram + iprodione)

Cuadro No. 2. Tratamiento, nivel de infección y fungicida utilizado según el tratamiento evaluado

Tratamiento	Nivel de infección	Fungicida	Principio activo
1	Muy Alto	Sin fungicida	
2		Mezcla sin carboxamidas	carbendazim + thiram + iprodione
3		Mezcla con carboxamidas	fluxapiraxad + triticonazol
4	Alto	Sin fungicida	
5		Mezcla sin carboxamidas	carbendazim + thiram + iprodione
6		Mezcla con carboxamidas	fluxapiraxad + triticonazol

Se evaluaron dos mezclas de fungicidas, una mezcla con carboxamidas, que contiene como principio activo fluxapiraxad + triticonazol perteneciente al grupo químico de las carboxamidas y triazoles respectivamente (Cuadros No. 3 y 4). En términos generales se ha visto mayor eficiencia de control y residualidad con las carboxamidas (fluxapiraxad), y un término medio con los triazoles, sin embargo es preciso combinar alternativas para no incrementar el riesgo de resistencia por parte del hongo (Pereyra y

Pérez, 2017). A su vez la AHDB (2018), entre las formulaciones más efectivas para el control de ramulariosis destaca los fungicidas pertenecientes al grupo químico de carboxamidas y triazoles respectivamente.

Cuadro No. 3. Características de fluxapiroxad

Principio activo	Fluxapiroxad
Grupo químico	Carboxamidas
Acción	Preventiva y curativa
Modo de acción	Sistémico de amplio espectro. Inhibe la succinato deshidrogenasa en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, inhibiendo la germinación de esporas, el crecimiento de los tubos germinales y los micelios de las especies de hongo objetivo.
Toxicidad	Clase III (Ligeramente peligroso) Poco tóxico para aves, altamente tóxico para peces y ligeramente tóxico para abejas.
Tiempo de espera	60 días
Otras características	No contaminar fuentes o corrientes de agua con restos de producto hacia fuentes de agua. En caso de derrame de producto contener y absorber el derrame con material inerte (arena, aserrín, tierra) y depositar el material impregnado en un envase para que no haya riesgo de derrame para fuentes de agua.
Persistencia	6-8 semanas

Fuente: tomado de SATA (2018)

Cuadro No. 4. Características de triticonazol

Principio activo	Triticonazol
Grupo químico	Triazol
Acción	Sistémico, contacto
Modo de acción	Sistémico de amplio espectro Inhibición de la síntesis de esteroides

Toxicidad	Clase III (Ligeramente peligroso) Baja en mamíferos, moderadamente tóxico para aves, abejas, lombrices y la mayoría de organismos acuáticos.
Solubilidad en agua	Baja
Otras características	No usar en granos destinados a la alimentación animal o humana ni para la industrialización. El lavado de la semilla no elimina el tóxico ⁷
Persistencia	42 días

Fuente: tomado de SATA (2018).

La segunda mezcla utilizada sin carboxamidas contiene como principio activo carbendazim + thiram + iprodione perteneciente al grupo químico de los benzimidazoles, ditio-carbamatos, dicarboxamidas respectivamente (Cuadros No. 5, 6 y 7). Según González (2015) la mezcla de estos fungicidas es la más utilizada, presentando un control mayor a 90% en enfermedades provocadas por manchas foliares, particularmente *Pyrenophora teres* en cebada, dado estos datos se optó por esta mezcla dado su uso comercial.

Cuadro No. 5. Características de carbendazim

Principio activo	Carbendazim
Grupo químico	Benzimidazoles
Acción	Preventiva y curativa
Modo de acción	Sistémico. Inhibición de la mitosis y la división celular
Toxicidad	Clase IV (Peligroso) Poco tóxico para aves, altamente tóxico para peces y ligeramente tóxico para abejas.
Solubilidad en agua	Baja
Tiempo de espera	56 días
Otras características	Alternar o combinar la aplicación de este producto con fungicidas de diferente modo de acción, pueden evitar o demorar la aparición o el desarrollo de resistencia.
Persistencia	2-3 semanas (poco persistente)

Fuente: tomado de SATA (2018).

Cuadro No. 6. Características de thiram

Principio activo	Thiram
Grupo químico	Ditio-carbamatos
Acción	Contacto
Modo de acción	Inhibe el crecimiento de las esporas y el crecimiento del micelio ínter definido con varias enzimas involucradas en la respiración, esta propiedad de actuar en varios lugares del proceso bioquímica asegura que el producto no posea problemas de resistencia y es efectivo contra muchos hongos.
Toxicidad	Clase III (Ligeramente peligroso) Moderadamente tóxico para aves, altamente tóxico para peces y ligeramente tóxico para abejas.
Otras características	En suelo permanece prácticamente inmóvil, ya que se absorbe fácilmente a las partículas. En este medio puede ser degradado por acción microbiana o por hidrólisis bajo condiciones ácidas. La volatilización no es un destino ambiental importante para este producto.

Fuente: tomado de SATA (2018).

Cuadro No. 7. Características de iprodione

Principio activo	Iprodione
Grupo químico	Dicarboxamidas
Acción	Contacto (no penetrante)
Modo de acción	Actúa inhibiendo la acción de esporas y bloqueando el micelio que invade los tejidos sanos.
Toxicidad	Poco tóxico para aves, moderadamente tóxico para peces y ligeramente tóxico para abejas.

Solubilidad en agua	Baja
Tiempo de espera	24 hs
Otras características	No brinda protección a tejidos nuevos producidos luego de la aplicación. Afecta el metabolismo de lípidos y la respiración celular, interfiere la biosíntesis de ADN. Evitar la aplicación del producto próximo a cursos de agua.

Fuente: tomado de SATA (2018).

Se utilizaron semillas de cebada de la variedad INIA Cronos (CLE 280) cosechadas durante la zafra 2016/17. La variedad utilizada fue seleccionada por su comportamiento frente a ramulariosis (Cuadro No. 8), presentando una susceptibilidad intermedia frente al patógeno (Castro et al., 2017). Como ya se mencionó anteriormente en la Figura No. 11 los cultivares evaluados según la ENC (Evaluación Nacional de Cultivares), hasta el momento no cuentan con buen comportamiento frente a ramulariosis. Las semillas fueron cosechadas de diferentes parcelas con un nivel diferente de severidad frente al hongo, con niveles de infección altos (alto y muy alto respectivamente).

Cuadro No. 8. Comportamiento sanitario de INIA Cronos (CLE 280)

Cultivar	ESC	MRTR	MRTS	MB	RAM	RH	OIDIO	RT	FUS
INIA Cronos	BI	BI	I	I	I	IB	I	B	I

Comportamiento sanitario: susceptibilidad A-Alto, I-Intermedio, B-Bajo.

ESC=escaldadura

MRTR= mancha en red tipo red

MRTS= mancha en red tipo spot

MB= mancha borrosa

RAM= ramulariosis

RH= roya de la hoja

OIDIO= oídio

RT= roya del tallo

FUS= fusariosis de la espiga

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

El nivel de infección, medido como la concentración de ADN de Rcc en ambos casos según Havis et al. (2014) se clasifican como altos para ambos lotes, siendo la concentración de los mismos:

- Lote 1: 48,9 pg/ 100 ng ADN total
- Lote 2: 22,6 pg/ 100 ng ADN total

El experimento se conformó por 24 UE (unidades experimentales). Cada unidad experimental consistió en bandejas de 28 cm de largo por 15 cm de ancho, con una población objetivo 400 semillas por bandeja (Figura No. 14), dispuestas en línea y entre pliegues de papel de filtro humedecidos con agua, de modo tal de permanecer constantemente humedecidos, proveyendo de agua a las semillas y posteriormente a las plántulas. El experimento se llevó a cabo en germinadores y condiciones semicontroladas para descartar el efecto ambiente sobre la variedad utilizada. La siembra se realizó el 10/8/2018 y se incubó en condiciones semicontroladas en cámaras de crecimiento a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ en ciclos de 12 h de luz.



Figura No. 14. Germinador con la población objetivo (400 semillas)

Luego de tres semanas de incubación y habiendo las plantas alcanzado la expansión de 2 hojas, se procedió a la cosecha. La misma se realizó el 30/08/2018, las muestras fueron colectadas utilizando una tijera, cortando a un centímetro por encima de la semilla (Figura No. 15). Las muestras recolectadas no presentaban síntomas visibles de ningún agente patogénico.



Figura No. 15. Plántulas de cebada con dos hojas expandidas en condiciones semicontroladas, previo a la cosecha de las mismas

Una vez que se colectaron las muestras, se separó con bolsas de nylon a cada tratamiento y se almacenaron en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific, 88300V). Luego el material vegetal congelado se liofilizó por un día en el liofilizador (BW10) y luego fueron almacenados a temperatura ambiente entre 15 y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una conservadora hermética hasta su posterior utilización.

La liofilización permitió la eliminación del agua del material vegetal en condiciones de baja presión y temperatura lo que favorecen la deshidratación de los tejidos, para que mantengan todas sus propiedades estables. El agua es la variable responsable en gran medida de los daños microbiológicos que se producen en los materiales vegetales, al obtener productos con baja actividad del agua, se prolonga la vida útil del material vegetal en cuestión. El agua se elimina por congelación del producto y posterior sublimación del hielo en condiciones de temperatura y vacío. Al suministrar calor, el hielo pasa de su fase sólida a la gaseosa (sublimación), sin tener que alcanzar el punto de ebullición del agua, y de esa forma se evita el pasaje por la fase líquida.

3.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁNTULA

Las muestras vegetales ya liofilizadas fueron reducidas individualmente mediante un molino doméstico (HOMETECH, ST-702), para facilitar el proceso de extracción. Las mismas fueron reducidas a un tamaño aproximado de 2 mm . Se realizó un lavado con alcohol 70% entre muestra y muestra con el fin de evitar contaminación de las mismas.

Luego de la reducción del material y la homogeneización del mismo, se procedió a pesar 0,1g de cada una de las muestras en tubos eppendorf de 1,5 mL (Figura No. 16), en una balanza de precisión (SARTORIUS, LC6215). Para el pesado de las mismas se utilizó material estéril y limpieza del instrumental entre una muestra y otra. Para la extracción del ADN total de las plántulas se utilizó el método CTAB descrito por INIA (2014), con algunas modificaciones para obtener mejores resultados.

A cada muestra pesada en el tubo eppendorf se le agregan 2 bolillas de vidrio de 2 mm de diámetro y se colocan en el homogeneizador de tejidos (QIAGEN[®], TissueLyser II) durante 1 min a 30 rpm. Luego de la homogeneización se le agregó 800 µl de buffer CTAB, el cual previamente es calentado a baño maría (J.P. SELECTA, Precistern). Una vez agregada la solución se pasa por 1 min en el vortex (Benchmark Scientific Inc, BV1000), para lograr una mezcla entre la solución y el material vegetal. Luego se colocan en baño seco (Labnet Dry Bath a 65 °C, 250 VAC) durante 40 min.

Luego se retiraron las muestras y se dejan por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionan 600 µl de Chloroformo/ Phenol (24/1 v/ v) y son invertidas por 2 min para luego ser colocadas en la centrífuga (Labnet International Inc. SPECTRAFUGE 24 D) por 20 min a 13300 rpm de esa forma se logra separar la parte acuosa del material vegetal y las soluciones de lo sólido.

Transcurridos 20 min 2/3 de la fase acuosa de la solución se remueve y transfiere a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 µl con micropipetas de 200µl. Luego se le adiciona 600 µl de Isopropanol (100%) frío, inviertendos. Luego de invertir las muestras por 2 min se las coloca en frío a 4 °C para que precipiten por 20 min.

El precipitado resultante se centrifuga por 10 min y 10000 rpm, y se retira el líquido sobrante de las muestras, obteniéndose el pellet, y dejándolo secar por unos minutos. Al pellet resultante se le adiciona 500 µl de la solución buffer de lavado (360 etanol + 120 acetato de amonio 7,5 M) el cual limpia y purifica el pellet de la muestra.

Se invierten nuevamente por 2 min y se colocan en la centrífuga (Labnet International Inc. SPECTRAFUGE 24 D) por 10 min y 7000 rpm, dejándolas secar por 30 min en la mesada. Una vez retirado el buffer del lavado, se resuspendió en 50 µl de TE (ph-8) con RNAase. Para que el pellet se disuelva se dejan las muestras en el baño seco (Labnet Dry Bath a 65 °C, 250VAC) a 37°C por 1 hora. Finalizada la extracción del ADN se conserva en frezeer (-20°C) para su posterior utilización (Figura No. 16).

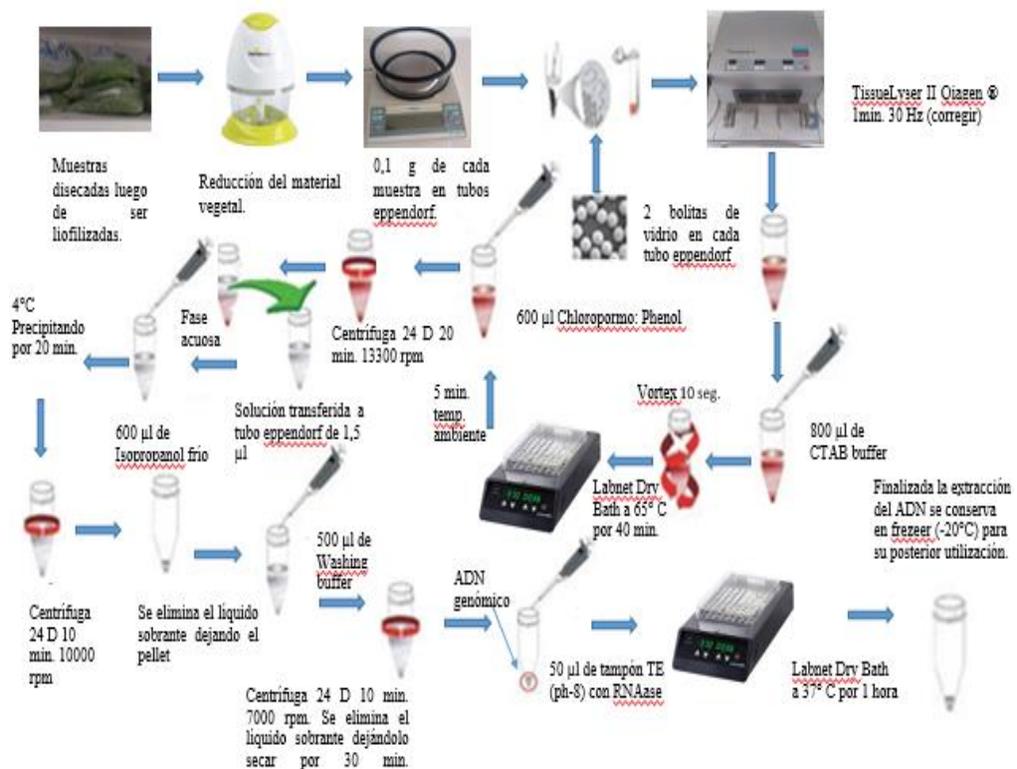


Figura No. 16. Extracción de ADN total de plántula

Una vez extraído el ADN de las muestras, se prosiguió a la cuantificación de las mismas mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific NANODROP 2000 Spectrophotometer, B582). El espectrofotómetro presenta una gran variabilidad, como análisis cualitativo de pureza de las muestras, cuantificación del ADN, proteínas u otros reactivos, análisis de espectros de absorción, etc. El funcionamiento de éste se justifica debido a que muchos de los compuestos absorben o dispersan luz de determinadas longitudes de onda, en el espectro ultravioleta (200-400nm), el visible (400-700nm), o el infrarrojo cercano (700-900nm).

Dado que las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos presentan la capacidad de absorber luz ultravioleta, llegando a un máximo de 260nm, esto permite calcular la concentración y pureza de los mismos.

Lo que respecta al ADN bicatenario una unidad de absorción de 260nm ($A_{260nm} = 1,0$) equivale a una concentración de 50 µg/ml. Una solución de ADN puro con doble cadena presenta una relación $A_{260}/A_{280} = 1,8$ mientras que la presencia de fenol o proteínas pueden disminuir esta relación dado que: las proteínas absorben a 280nm

debido a la presencia de los anillos aromáticos. La presencia de ARN en una preparación de ADN hace que se incremente la relación A260/A280 con valores por encima de 1,8 debido al efecto hipercrómico, es decir dos cadenas sencillas presentan mayor absorción que una cadena doble, de forma que la relación A260/A280 para el ARN puro es de 2,0 (Schena et al., 2004).

Cuando el ADN y ARN están contaminados de nucleótidos, por ejemplo debido a la degradación, la relación A260/A280 se incrementa llegando a valores de 2,3, lo cual indica que se debe purificar la muestra (Schena et al., 2004).

Luego de verificadas las concentraciones y las relaciones antes mencionadas se verificó la calidad del ADN mediante gel de agarosa. En caso de presentar mala calidad o cantidad del ADN extraído de plántula, la muestra fue sometida a una nueva extracción hasta obtener ADN de buena calidad y cantidad para posterior análisis.

3.1.1. Cuantificación de ADN de Rcc mediante qPCR

3.1.1.1. Condiciones de amplificación: qPCR

El método de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo a Taylor et al. (2010). Los cebadores utilizados para la corroboración de la misma 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), sintetizados por invitrogen (California, EEUU). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems, siguiendo las condiciones preestablecidas por Taylor et al. (2010) y proveedores.

Las condiciones de reacción se llevaron a cabo con un volumen final de 25 µl (Cuadro No. 9). El programa de temperatura utilizado fue: 10 min a 95 °C, 50 ciclos de 95 °C durante 20s, 55 °C durante 20s, 72 °C durante 20s y una extensión final de 1 min a 95 °C (Taylor et al., 2010).

Cuadro No. 9. Reactivos utilizados en qPCR para la detección y cuantificación de *Ramularia collo-cygni*

Reactivos	Concentración	Volumen (µl)
Mezcla madre qPCR Universal MMIX II (Qiagen, Alemania)	2x	12,5
Primer RamF6	10µl	1

Primer RamR6	10µl	1
Taq polimerasa 5,0 U7 (Qiagen)	10Mm	0,4
Agua miliQ estéril		5,1
ADN muestra	20 ng	5
Total		25

El ADN genómico de Rcc fue obtenido de la cepa Rcc3. La misma fue aislada de hojas de cebada con síntomas típicos de la enfermedad, y es mantenida en la colección perteneciente al laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela. Con dicho ADN, se realizaron diluciones seriadas en base cinco para la realización de la curva de calibración. La misma presentó el rango de concentración de 0,4 ng/ µL y 0,064 pg/µL. Para la reproducibilidad de los datos de la curva se realizaron dos réplicas de cada punto. Además se colocaron dos blancos conteniendo agua miliQ estéril.

Para cada caso se determinó el Cycle threshold (Ct), y a partir de los valores de Ct logrados en cada concentración se realizó una curva de calibración graficando Ct en función del logaritmo de la concentración de ADN. En los cuales se determinó la pendiente de la curva, la linealidad, eficiencia, y rango dinámico a partir de Software de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR.

3.1.1.2. Influencia de la matriz en la cuantificación de las muestras

Para analizar la influencia del matriz se partió de la extracción de ADN total de una muestra de 0,1 g a partir de plántulas de cebada. Al extracto obtenido de la muestra se le añadió diferente cantidad de ADN genómico de Rcc y se sometió a PCR en tiempo real (qPCR, Cuadro No. 10). En paralelo se incluyeron dos blancos y diluciones realizadas con agua de forma de comparar los Ct resultantes en cada caso y de esa forma determinar si existe inhibición por cada matriz analizada mediante Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR.

Cuadro No. 10. Efecto matriz: concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* en el ADN de plántula (matriz)

ADN de plántula (ng/ µL)	ADN Rcc (ng/ µL)
1	1
1	0,1
1	0

3.1.1.3. Evaluación de fungicidas curasemillas

Una vez extraído y cuantificado el ADN total de las muestras, estas fueron pre-diluidas para lograr una cantidad de 20 ng/ μL total en la reacción de qPCR. Esto permitió un equilibrio entre las concentraciones y evitó la sobrestimación de las muestras. La reacción del qPCR se realizó siguiendo los parámetros indicados en el ítem “Condiciones de amplificación: qPCR”.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental para el ensayo fue en parcelas completamente aleatorizadas (PCA), con arreglo factorial con dos factores (nivel de infección inicial y fungicidas utilizados) con 6 tratamientos y 4 repeticiones correspondientes a cada tratamiento. El Nivel de infección alto o bajo esta considerado según la mayor o menor concentración de ADN genómico de Rcc en plántula. Dada estas condiciones se trabajó con el siguiente modelo estadístico para la variedad utilizada:

$$Y_{ij} = \mu + M_{fi} + N_{ij} + (MFN)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

μ : media general

M_{fi} : efecto de la i-ésima mezcla de fungicidas

N_{ij} : efecto del j-ésimo nivel de infección

$MF*N_i$: interacción mezcla de fungicidas y nivel de infección

ϵ_{ij} : variable no observable o variable residual. Error experimental

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa InfoStat versión libre 2008.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁNTULA

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN total de plántula mediante el espectrofotómetro (NanoDrop™), mostraron la eficiencia del método CTAB, presentando alta concentración y buenas relaciones de ADN 260/280 y 260/230 (Cuadro No. 11).

Cuadro No. 11. Concentración de ADN total (plántula + microorganismos en general) según método CTAB cuantificada en el espectrofotómetro y las relaciones obtenidas, para cada una de las cuatro repeticiones realizadas a cada muestra

Lote	Tratamiento curasemilla	Repeticiones	Concentración de ADN total de plántula + microorganismos (ng/μl)	pg ADN/100 ng ADN total	Rel 260/280	Rel 230/260
1	Testigo	1	2198,0	1,5614107	1,9	1,9
		2	2238,7	1,3462024	1,8	1,9
		3	2244,1	1,423232	1,7	1,6
		4	5734,1	1,6266213	1,8	1,6
	Sin Carboxamidas	1	2787,9	2,4743909	1,9	1,8
		2	4986,9	5,8892408	1,9	2,0
		3	1615,7	3,7056753	1,9	1,9
		4	3321,3	2,4383896	1,8	1,7
	Con Carboxamidas	1	1574,0	0	1,8	1,8
		2	3775,0	0	1,9	1,8
		3	1664,0	0	1,8	1,9
		4	1103,4	0	1,9	2,0
2	Testigo	1	215,7	1,30016275	1,8	1,9
		2	2275,5	1,21910515	1,9	2,0
		3	589,5	1,61919085	1,9	1,9
		4	1042,6	1,76861719	2,0	2,0
	Sin carboxamidas	1	2679,0	2,88102543	1,8	1,9
		2	2330,8	2,1673335	1,9	1,9
		3	2623,1	5,60722174	1,7	1,5
		4	3919,2	5,86401299	1,8	1,5
	Con carboxamidas	1	3633,4	1,10491831	1,8	1,9
		2	1407,4	1,40836334	1,8	1,9
		3	401,8	1,32809323	1,9	1,8
		4	1643,3	0	1,9	1,8

Estas relaciones fueron corroboradas con las relaciones utilizadas como ADN de buena calidad (260/280: 1,8; 260/230: 1,8-2,2), las variaciones encontradas en dichas relaciones, como ya se mencionó anteriormente pueden deberse a la presencia de reactivos utilizados al momento de purificar las muestras o bien a proteínas o fenoles que afectan las relaciones al momento de la cuantificación (Zipper et al., 2004).

Al analizar la relación entre la concentración de ADN total (incluye el ADN de plántula + microorganismos) (ng/μl) y la de ADN Rcc la correlación fue baja ($r=0,36$) y no significativa entre ambas variables. El coeficiente de determinación fue 0,1295, lo cual significa que la cuantificación de ADN de Rcc no está asociada a la concentración de ADN total lograda en la extracción (Figura No. 17).

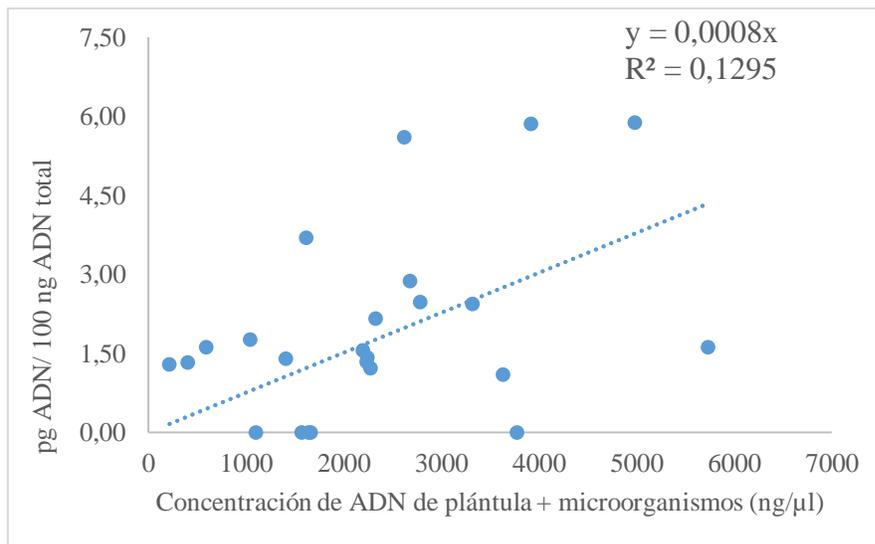
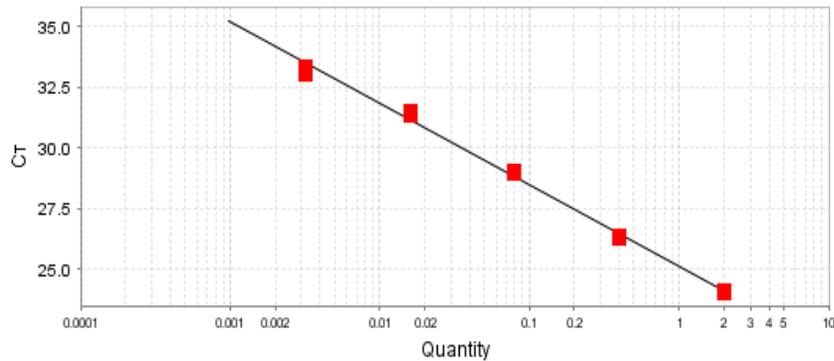


Figura No. 17. Correlación entre la concentración de ADN (ng/ μL) y los pg ADN de Rcc/ 100 ng ADN total.

4.1.1. Cuantificación del ADN de Rcc mediante qPCR

4.1.1.1. Condiciones de amplificación: qPCR

Dada las condiciones de amplificación se observa linealidad en la curva, permitiendo una cuantificación más precisa para Rcc, tomando un valor de la pendiente de -3,335. Tanto para el coeficiente de correlación y la eficiencia de amplificación se lograron buenos resultados, siendo similares a los reportados por Taylor et al. (2010).



Curva estándar de calibración de ADN de Rcc, con el rango de concentración correspondiente de de 0,4 ng/ μ L y 0,064 pg/ μ l. Siendo la pendiente = -3,335; Y-inter= 25,225; $R^2 = 0,98$; Eff % = 99,47. Los puntos corresponden a cada valor de Ct para cada réplica.

Figura No. 18. Curva estándar de calibración de ADN de Rcc

4.1.1.2. Influencia de la matriz en la cuantificación de las muestras

No se observó inhibición por la matriz en estudio en las condiciones de ensayo para plántula, dado que el Ct obtenido en presencia de extracto de plántula fue similar al Ct obtenido en presencia de agua, las pequeñas diferencias de Ct se encontraron dentro del error del método (Zipper et al., 2004). Estos resultados determinan que la presencia de ADN de plántula no interfiere en la cuantificación de Rcc, por lo tanto no hay efecto matriz (Cuadro No. 12).

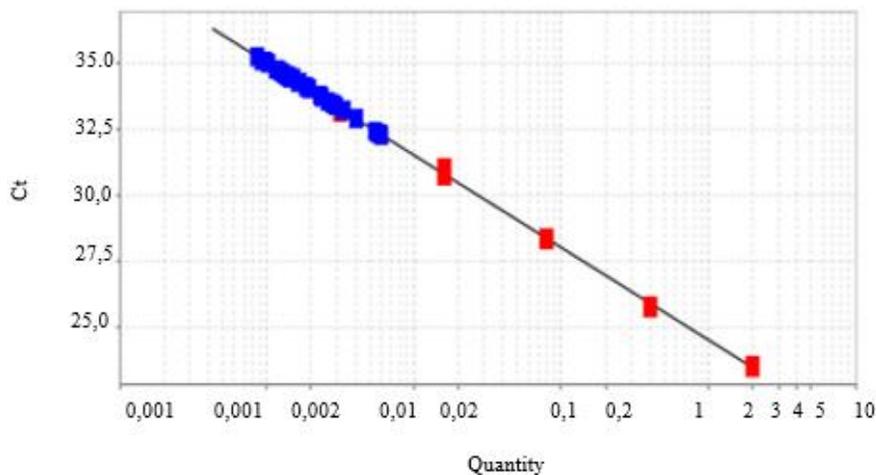
Cuadro No. 12. Influencia del efecto matriz plántula en PCR a tiempo real

ng ADN Rcc	Ct plántula	Ct agua
1	24	24
0,1	28	28
0	34	35

Estos resultados determinan que la presencia de ADN de plántula no interfiere en la cuantificación de Rcc, por lo tanto no hay efecto matriz.

4.1.1.3. Evaluación de fungicidas curasemilla

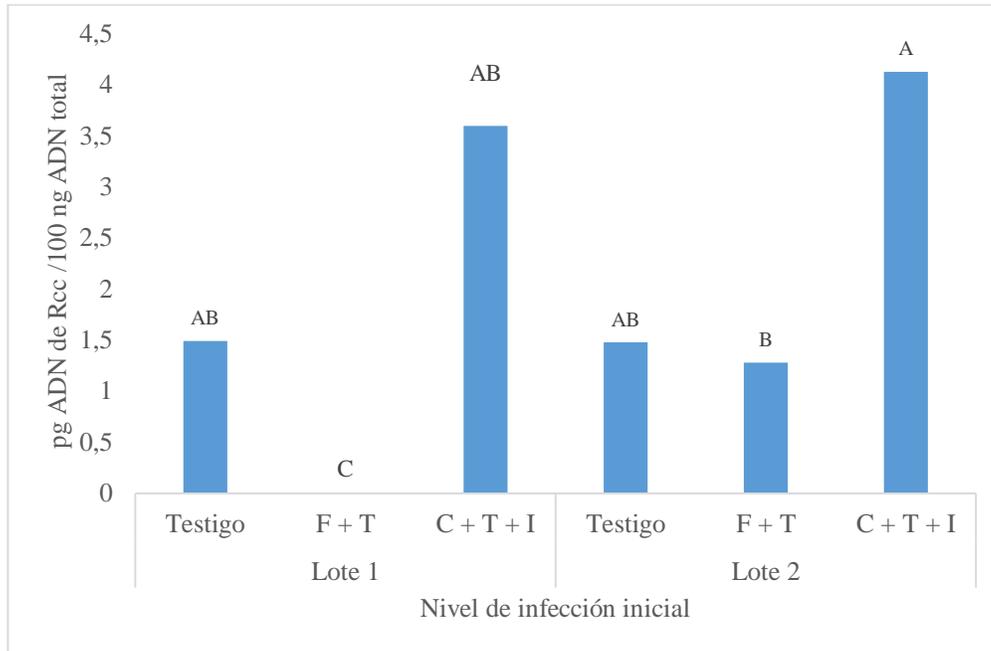
En los resultados obtenidos en la corrida de qPCR con las muestras de ADN total de plántulas, muchas de las muestras presentaron una concentración por debajo del límite de detección de esta curva (Figura No. 19).



Curva estándar de calibración de ADN de Rcc (puntos rojos), en un rango de concentración de 0,4 ng/ μ l, a 0,064 pg/ μ l. Y muestras de ADN de los lotes evaluados (puntos azules). Siendo la pendiente = -3,51; Y-inter= 24,456; $R^2 = 0,999$; Eff % = 92,708. Los puntos corresponden a cada valor de Ct para cada réplica.

Figura No. 19. Curva estándar de calibración de ADN de Rcc con muestras reales

La cuantificación de ADN de Rcc en ambos lotes de semilla, arrojó resultados similares en el tratamiento testigo, lo cual indica que a pesar de haberse caracterizado un lote como muy alto nivel de infección y otro con alto nivel de infección, ambos presentaron contenido de Rcc similar (Figura No.20).



*Barras con letras distintas difieren significativamente entre sí, Tukey ($p > 0, 05$).

F + T= fluxapirixad + triticonazol

C + T + I= carbendazim + tirám + iprodione

Figura No. 20. Concentración de ADN de Rcc determinado en semilla medido como ADN de Rcc/ ADN total extraído de plántula según tratamiento

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ambos lotes de semilla, concuerdan con la evolución de ramulariosis durante el ciclo del cultivo que dio origen a la semilla utilizada para llevar a cabo el experimento. Como era de esperar las muestras con mayor porcentaje de severidad de ramulariosis arrojaron valores superiores de contenido de ADN de Rcc en el lote 1 (sin aplicaciones), durante el ciclo del cultivo, sin embargo, el lote 2 en el cual se realizaron aplicaciones foliares cada 20 días utilizando carboxamidas, el porcentaje de severidad fue menor (Figura No. 21).

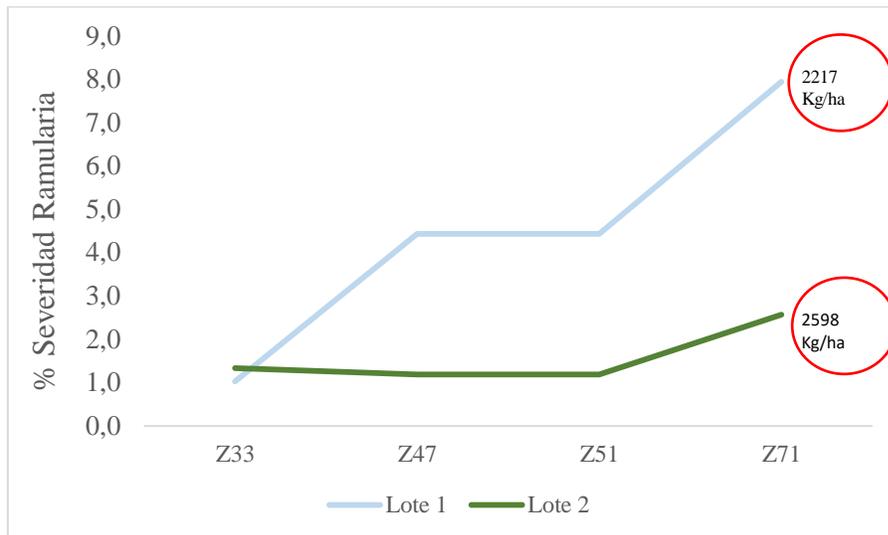


Figura No. 21. Evolución de la enfermedad durante el ciclo del cultivo que dio origen a la semilla utilizada para llevar a cabo el experimento

De acuerdo a los resultados obtenidos, sólo el tratamiento de mezcla con carboxamidas logró reducir significativamente la cantidad de ADN de Rcc en la semilla del lote 1 con mayor nivel de infección inicial.

Estudios llevados a cabo por Havis et al. (2014), al momento de la cuantificación del ADN de Rcc, determinaron la presencia de ADN de Rcc en el ADN extraído de plántulas obtenidas de semillas infectadas y cultivadas en una cámara de ambiente controlado. A su vez, los fungicidas curasemillas utilizados (tebuconazol y triazóxido) no detuvo el movimiento del hongo hacia las plántulas, arrojando valores de 25,89 y 10,09 pg ADN/ 100 ng ADN total. Al comparar estos resultados, con los obtenidos en el presente estudio, los niveles de ADN del hongo están muy por debajo de los mencionados por dichos autores. A su vez los experimentos en ambas situaciones se llevaron a cabo en ambiente controlado, por lo tanto no había interferencia de inóculo externo que pudiese afectar los resultados y favorecer la enfermedad.

A su vez Zamani-Noor (2011), analizaron por qPCR semillas cosechadas de un campo de cebada con alto nivel de infección, en Alemania, y encontraron una alta incidencia de infección latente. Estas semillas se sembraron en macetas bajo condiciones controladas y las plantas obtenidas se analizaron en diferentes etapas de crecimiento, revelando que el hongo fue transmitido de las semillas a las plantas emergentes. A su vez, encontraron que la combinación de las semillas infectadas más la inoculación externa,

conducen a un aumento significativo de la enfermedad respecto al observado en plantas obtenidas a partir de semillas infectadas sin inoculación posterior, o en plantas inoculadas artificialmente, obtenidas a partir de semillas libres de Rcc. Deduciendo que la presión combinada de las fuentes de inóculo en comparación con una sola fuente, da como resultado una concentración mucho mayor de ADN fúngico.

Los estudios realizados por Zamani-Noor (2011), coinciden con lo reportado por Oxley y Havis (2006), quienes indicaron la presencia de ADN de Rcc en hojas emergentes de plántulas obtenidas de semilla infectada, confirmando que Rcc puede ser transmitido por semillas, y el ADN fúngico es detectable por qPCR cuando los síntomas visibles se encuentran ausentes, y su contenido en las hojas no corresponde necesariamente con la severidad de síntomas del hongo (Havis et al., 2006a), demostrando que un aumento del ADN de Rcc no está correlacionado con la gravedad de los síntomas en las hojas.

A su vez Havis et al. (2015a) llevaron a cabo experimentos con semillas infectadas en dos sitios de República Checa, y no encontraron ninguna relación entre los niveles bajos de ADN de Rcc en la semilla y la enfermedad durante el ciclo del cultivo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio (Figura No. 21), donde el lote 2 proviene de un cultivo con menor porcentaje de severidad durante el ciclo del cultivo, pero al momento de la cuantificación de ADN de Rcc, no difirió del lote 1 que presentó mayor nivel de infección. La falta de correlación entre ambas variables (severidad en el cultivo e inóculo en la semilla), podría estar explicada por las condiciones ambientales, las cuales pudieron favorecer la llegada del hongo a la espiga aún con menores niveles de severidad en la hoja del cultivo que dio origen a la semilla.

Investigaciones llevadas a cabo por Taylor et al. (2010), en un lote de semillas sembrado en 2009 con una concentración promedio de 0,000055 pg ADN/ 100 ng ADN total, resultó en un cultivo con un nivel de severidad alto. En contraste en el año 2010 no observaron síntomas en hojas de cebada, siendo que la semilla presentaba una concentración de Rcc más alta que la del año anterior. Estos resultados dan la pauta que en el 2010 a pesar de la presencia del hongo en la semilla y la plántula, no tuvo condiciones favorables para causar enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, Havis et al. (2012), informaron que Rcc puede pasar de una generación de semillas a la siguiente sin producir síntomas de enfermedad. Experimentos llevados a cabo en dos localidades de República Checa (Luzany y Kromeriz), durante el 2009 se sembraron semillas con el mismo nivel de infección, con alta severidad y se detectó una mayor concentración de ADN de Rcc en el

grano cosechado. Cuando ese grano fue utilizado como semilla en el año siguiente (Luzany 2010), la severidad fue menor en comparación al año anterior.

Estos resultados indican que el nivel de infección de las semillas no es decisivo para la expresión de la enfermedad, y que varía significativamente según el año y la zona geográfica. En Europa se considera que semillas con concentraciones de Rcc por debajo de 1 pg ADN/ 100 ng ADN total, presentan bajo riesgo de problemas de la enfermedad en el cultivo (Oxley y Havis, 2010), y valores menores de 5 pg ADN /100 ng ADN total, en sitios donde la enfermedad no se encuentra instalada. Tomando en cuenta los valores de referencia en Europa por dichos autores, los resultados obtenidos en dicho experimento se encuentran por debajo de los establecidos para la comercialización de la semilla.

Haciendo un análisis comparativo de los grupos químicos del fungicida curasemilla y el nivel de infección tanto para el lote 1 como el lote 2 por contrastes se evaluó la interacción entre ambos factores (nivel de infección inicial* mezcla de fungicida), obteniéndose ausencia de interacción entre ambos, es decir que la eficiencia de ambos fungicidas no varía según el nivel de infección de la semilla (Anexo 1, 2 y 3).

Es llamativo que el tratamiento con carbendazim + thiram + iprodione presentó mayor nivel de infección que el tratamiento testigo sin curasemilla. ¹Sin embargo estudios llevados a cabo en Argentina afirman que cuando los fungicidas no son eficientes para un determinado patógeno, pero controla a otros microorganismos presentes en la semilla, la infección del patógeno target puede aumentar. El incremento de la concentración del patógeno target se debe a que la mezcla de fungicidas utilizada eliminó otros hongos y patógenos que no interesaban dejando mayor grado de posibilidades a que el patógeno target se exprese en mayor medida, provocando mayor concentración de ADN de Rcc en los tratamientos con agregado de fungicida con respecto a los testigos sin tratar.

Estas diferencias entre los tratamientos testigos con respecto a los tratamientos con agregado de carboxamidas, se puede observar que esta mezcla de fungicidas tiene control sobre Rcc tanto a nivel foliar como curasemilla, siendo la mezcla más eficiente, lo cual concuerda con Pereyra y Pérez (2017), quienes utilizaron carboxamidas como fungicida de aplicación foliar con probada eficiencia para el control de Rcc, por lo tanto se cuenta con una herramienta más para el patógeno, ya que brinda la posibilidad de contar con un fungicida curasemilla con probada eficiencia para el control.

¹ Carmona, M. 2019. Com. personal.

5. CONCLUSIONES

Se logró ajustar un método de qPCR para evaluar la eficiencia de fungicidas curasemilla utilizados en el control de ramulariosis en semillas de cebada. Esta técnica ha alcanzado niveles de detección confiables y de manera rápida, permitiendo la detección asintomática, como es el caso de Rcc.

El ajuste de esta metodología permitió contar con un método sencillo, rápido y fácil para la evaluación de fungicidas curasemillas, lo que facilitó la evaluación de nuevas moléculas en el control de ramulariosis. Además, servirá como base para futuras investigaciones en otros patosistemas.

Con dicha metodología se logró evaluar dos fungicidas curasemillas, mezcla sin carboxamidas (carbendazim + thiram + iprodione) y mezcla con carboxamidas (fluxaproxad + triticonazol) para el control de Rcc mediante qPCR en cebada, la mezcla sin agregado de carboxamidas no resultó eficiente para el control de Rcc, en comparación con el tratamiento con agregado de carboxamidas el cual redujo el nivel de infección inicial en comparación con los demás tratamientos analizados.

El fungicida curasemilla con agregado de carboxamidas logró reducir los niveles de Rcc en uno de los lotes analizados, podrá ser utilizado como una herramienta potente para disminuir los niveles de Rcc, y contribuir al manejo de esta enfermedad en el cultivo de cebada.

6. RESUMEN

Ramulariosis causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc) es una de las enfermedades foliares que se ha convertido en una de las principales restricciones que afronta el cultivo de cebada en los últimos años. Las pérdidas de rendimiento causadas por este patógeno alcanzan hasta el 70% y pérdidas de 90% en 1era.+ 2da., afectando de esta forma la calidad del grano. La resistencia genética para esta enfermedad es limitada en los cultivares comerciales utilizados a nivel nacional, a su vez se desconoce el nivel de inóculo en la semilla, por lo cual el manejo de ramulariosis depende en gran medida del uso de fungicidas foliares. No está clara la importancia epidemiológica del rastrojo, por lo cual se asume que la principal fuente de inóculo es la semilla. Hasta el momento no se cuenta con información sobre la eficiencia de curasemillas para el control de esta enfermedad, por lo cual el objetivo de este estudio fue ajustar un método eficiente para la evaluación de diferentes fungicidas curasemillas para el control de Rcc. En este marco, se instaló un experimento en condiciones controladas en el año 2018 con un cultivar de cebada de comportamiento sanitario susceptible frente a ramulariosis. Se evaluaron tres tratamientos curasemillas: i) testigo sin curasemilla, ii) fluxapiroxad + triticonazol, y iii) carbendazim + thiram + iprodione. Luego de aplicados, las plántulas fueron cosechadas al tener dos hojas expandidas. Se realizó extracción de ADN, se cuantificó la concentración de ADN total y su calidad, y mediante la técnica qPCR se determinó la concentración de ADN de Rcc en relación al ADN total. El uso de fluxapiroxad + triticonazol redujo la concentración de ADN de Rcc en la semilla respecto al tratamiento con carbendazim + thiram + iprodione. Estos resultados sugieren que la inclusión de carboxamidas en el curasemilla podría contribuir a reducir el inóculo de Rcc en la semilla. Es necesario repetir estos ensayos para confirmar la repetibilidad de los resultados obtenidos, siendo el principal aporte de este estudio, la validación del método, el cual aún no había sido validado a nivel nacional.

Palabras clave: Cebada; *Ramularia collo-cygni*; Fungicida curasemilla.

7. SUMMARY

Ramulariosis caused by *Ramularia collo-cygni* (Rcc) is one of the foliar diseases that has become one of the main restrictions facing the cultivation of barley in recent years. The losses of yield caused by this pathogen reach up to 70% and losses of 90% in 1st. + 2nd., thus affecting the quality of the grain. The genetic resistance for this disease is limited in the commercial cultivars used at the national level, in turn the level of inoculum in the seed is unknown, for which the management of ramulariosis depends to a great extent on the use of foliar fungicides. The epidemiological importance of the stubble is not clear, which is why it is assumed that the main source of inoculum is the seed. So far there is no information on the efficiency of seed cure for the control of this disease, so the objective of this study was to adjust an efficient method for the evaluation of different fungicides curasemillas for the control of Rcc. In this context, an experiment was installed under controlled conditions in 2018 with a barley cultivar of susceptible health behavior against ramulariosis. Three curasemilla treatments were evaluated: i) control without curasemilla, ii) fluxaproxad + triticonazole, and iii) carbendazim + thiram + iprodione. After applied, the seedlings were harvested by having two expanded leaves. DNA extraction was performed, the total DNA concentration and its quality were quantified, and by means of the qPCR technique, the DNA concentration of Rcc was determined in relation to the total DNA. The use of fluxaproxad + triticonazole reduced the concentration of Rcc DNA in the seed compared to the treatment with carbendazim + thiram + iprodione. These results suggest that the inclusion of carboxamides in the curasemilla could contribute to reduce the inoculum of Rcc in the seed. It is necessary to repeat these tests to confirm the repeatability of the results obtained, the main contribution of this study being the validation of the method, which had not yet been validated at the national level.

Key words: Barley; *Ramularia collo-cygni*; Fungicide seedcure.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AHBD (Agriculture and Horticulture Development Board, UK). 2018. Ramularia leaf spot in barley. (en línea). Warwickshire. 2 p. Consultado 19 dic. 2018. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/1340585/is60a-ramularia-factsheet-january-2018-.pdf>
2. Applied Biosystem. 2010. Real-Time PCR Sistem, Experiments of curve standard. (en línea). Foster City, CA, 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. 55 p. (Serie Técnica no. 18).
4. Avenot, H. F.; Michailides, T. J. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. (en línea). Crop Protection. 29 (7): 643-651. Consultado 28 dic. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219410000554>
5. Bistrich, H.; Breun, J.; Emmert, G.; Fleck, A.; Jaiser, H.; Kempe, H.; Lemmens, M. 2007. 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. Gottingen, Georg- August- University. pp. 83-84. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
6. Brent, K. J.; Hollomon, D.W. 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. (en línea). FRAC Monograph. no. 2. 53 p. Consultado 30 jul. 2018. Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf>
7. _____.; _____.2007. Fungicide resistance in crop protection, how can it be managed. (en línea). FRAC Monograph. no. 1. 60 p. Consultado 30 jul. 2018. Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.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, FAUBA. 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, A.; Ernst, O.; Hoffman, E.; Bentancur, O. 1997. Caracterización mediante variables agronómicas y de calidad del germoplasma de cebada en Uruguay. (en línea). *Agrociencia* (Uruguay). 1(1): 80-87. Consultado 21 dic. 2018. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/631/532>
10. _____. 2002. Análisis de la coancestría en el germoplasma utilizado en el mejoramiento de cebada en Uruguay. *Agrociencia* (Uruguay). 6 (1): 27-39.
11. Castro, M.; German, S.; Pereyra, S.; Azzimonti, G. 2017. Resultados experimentales de evaluación de cultivares de cebada cervecera período 2014-2015-2016. (en línea) *In: Jornada Invierno 2017* (2017, La Estanzuela, Colonia). Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigo, cebada y colza de los tres últimos años período 2014-2015-2016. Montevideo, INIA. pp. 39 - 69. (Resultados Experimentales no. 17). Consultado 13 jun. 2018. Disponible en http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2016/JornadaInvierno2017.pdf
12. 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 <http://www.jstor.org/stable/43217899>
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 dic. 2018. Disponible en http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue_38/Cangue38_industria.pdf
14. Fisher, N.; Meunier, B. 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. (en línea). *FEMS Yeast Research*. 8(2): 183-192. Consultado 27 dic. 2018. Disponible en DOI: [10.1111/j.1567-1364.2007.00328.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00328.x)
15. Fountaine, J. M.; Fraaije, B. A. 2009. Development of QoI resistant alleles in populations of Rcc. (en línea). *In: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop* (2nd., 2009, Edinburgh, SCO). Papers presented. Edinburgh, SCO, The University of

Edinburgh. pp. 1-5. Consultado 29 jul. 2018. Disponible en <https://www.research.ed.ac.uk/portal/files/10848585/FontaineAndFraaije2009.pdf>

16. Germán, S.; Diaz, M.; Pereyra, S.; Castro, M. 2005. Roya de la hoja y oidio de trigo y cebada. In: Jornada Técnica de Cultivos de Invierno (2005, Colonia, Uruguay). Memorias. Montevideo, INIA. pp. 10-21.
17. Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; Mccaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. (en línea). *Pest Management Science*. 58(9): 859–867. Consultado 23 dic. 2018. Disponible en DOI: [10.1002/ps.565](https://doi.org/10.1002/ps.565)
18. Goswami, R.; Kistler, H. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5(6): 515-525.
19. Havis, N.; Pastok, M.; Pyzalski, S.; Oxley, S. 2006a. Investigating the Life Cycle of Rcc. In: Rcc, a New Disease and Challenge in Barley Production (12 - 14th., 2006, Göttingen, Germany). Proceedings. Ciudad, Scotland, Creative Commons. pp. 39-44.
20. _____; Oxley, S.; Piper, S.; Langrell, S. 2006b. Rapid nested PCR –based detection of Rcc direct from barley. *FEMS Microbiology Letters*. 256(2): 217–223.
21. _____; Oxley, S. J. P.; Burnett, F. J. 2012. Advances in control of Rcc. *The Association for Crop Protection in Northern Britain*. 22(3): 125–130.
22. _____; Gosling, P. 2013. Ramularia leaf spot in barley. HGCA Information Sheet 21. 2 p.
23. _____; Nyman, M.; Oxley, S. J. P. 2014. Evidence for seed transmission and symptomless growth of Rcc in barley (*Hordeum vulgare*). (en línea). *Plant Pathology*. 63(4): 929-936. Consultado 17 set. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1111/ppa.12162>
24. _____; Fontaine, J.; Gorniak, K.; Paterson, L.; Taylor, J. 2015a. Diagnosis of Ramularia collo - cygni and Rhynchosporium spp. in Barley. *Plant Pathology: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1302: 29-36.

25. _____.; 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. Rcc - an emerging pathogen of barley crops. *Phytopathology*. 105(7): 895-904.
26. Hjortshøj, R. L.; Ravnshøj, A. R.; Nyman, M. 2013. High levels of genetic and genotypic diversity in field populations of the barley pathogen Rcc. (en línea). *European Journal of Plant Pathology*. 136(1): 51-60. Consultado 20 ene. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0137-8>
27. Hoffman, E.; Fassana, N. 2015. Caracterización de cultivares de cebada. (en línea). In: Caracterización de cultivares de cebada 2015 (2015, Paysandú). Caracterización de cultivares de cebada 2015: evaluación año 2014. Paysandú, Facultad de Agronomía. 23 p. Consultado 25 ago. 2018. Disponible en <http://www.eemac.edu.uy/index.php/jornadas-tecnicas/jornada-de-cultivos-de-invierno/informes-caracterizacion-trigo-y-cebada/caracterizacion-de-cultivares-de-cebada/417-informe-caracterizacion-cebada-2014-fagro-2015/file>
28. INIA; CALISTER (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY; Calister, UY). 2015. Eficiencia de cuatro fungicidas curasemillas para el control de *Pyrenophora teres*, *Bipolaris sorokiniana* en semillas de cebada y *Fusarium* spp en semillas de trigo y cebada y su efecto en la germinación. (en línea). Canelones, Uruguay. 6 p. Consultado 19 mar. 2019. Disponible en <http://www.calister.com.uy/wp-content/uploads/2017/02/INIA-Calister-Resultado-Invierno-2015.pdf>
29. _____.; INASE (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY; Instituto Nacional de Semillas, UY). 2016. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigo, cebada y colza de los tres últimos años, período 2014-2015-2016. Colonia, Uruguay. 84 p.
30. 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. Gottingen, Georg- August- University. pp. 113-119. Consultado 27 jul. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>

31. 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 Rcc and development of *Ramularia* leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. *Plant Pathology*. 66(1): 45-55.
32. Leisova-Svobodova, L.; Matusinsky, P.; Kucera, L. 2012. Variability of the *Ramularia collo-cygni* population in Central Europe. *Journal of Phytopathology*. 160: 701-709.
33. Lockey, C.; Otto, E.; Long, Z. 1998. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques* 24(5): 744-746.
34. McGrann, G.R. D.; Havis, N.D. 2017. *Ramularia* leaf spot: A newly important threat to barley production. (en línea). *Outlooks on Pest Management*. 28 (5): 65-69. Consultado 20 mar. 2019. Disponible en https://doi.org/10.1564/v28_apr_05
35. Matusinsky, P.; Leisova-Svobodova, L.; Marik, P.; Tvaruzek, L.; Stemberkova, L.; Hanusova, M.; Minarikova, V.; Vysohlidova, M. And Spitzer, T. 2010. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of Rcc. (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>
36. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2018. Anuario estadístico agropecuario 2018. (en línea). Montevideo. 211 p. Consultado set. 2018. Disponible en https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf
37. Miles, M. R.; Wilcoxson, R. D.; Rasmusson, D. C. 1989. Inheritance of resistance to kernel discoloration of barley. *Plant Disease*. 73: 711-715.
38. Nutter, E. W.; Pederson, V. D.; Foster, A. E. 1985. Effect of inoculations with *Cochliobolus sativus* at specific growth stages on grain yield and quality of malting barley. *Crop Science*. 25: 933-938
39. Oxley, S.; Hunter, E. A. 2004a. Appropriate fungicide doses on winter barley: producing dose-response data for a decision guide. (en línea). HGCA

Project Report. no. 366. 94 p. Consultado 28 oct. 2018. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/267862/pr455.pdf>

40. _____. 2004b. Barley Disease Control. (en línea). SAC Technical Note. no. 558: 16 p. Consultado 23 set. 2018. Disponible en <http://adlib.eversite.co.uk/resources/000/099/259/Tn558.pdf>
41. _____.; Havis, N.; Hunter, T.; Hackett, R. 2006. Impact of fungicides and varietal resistance on Rcc in spring barley. (en línea). *In*: A New Disease and Challenge in Barley Production European Ramularia Workshop. (1st., 2006, Gottingen, Germany). Proceedings. Gottingen, Georg-August-University. pp. 103-112. Consultado 18 sept. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
42. _____.; _____.; Brown, J.; Makepeace, J.; Fountaine, J. 2008. Impact and interactions of Rcc and oxidative stress in barley. (en línea). HGCA Project Report. no. 431. 100 p. Consultado 30 sept. 2018. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/269137/pr431-summary.pdf>
43. _____.; _____. 2010. Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting. (en línea). HGCA Project Report no. 463. 59 p. Consultado 13 mar. 2019. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/267653/pr463.pdf>
44. Pereyra, S. 1996. Enfermedades de cebada en Uruguay: reconocimiento, epidemiología y estrategia de manejo. *In*: Díaz de Ackermann, M. ed. Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo, INIA. pp. 105-123 (Serie Técnica no. 74).
45. _____.; 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 30 jun. 2018. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/582/1/112761220910153559.pdf>
46. _____. 2013a. Herramientas disponibles para el manejo de dos enfermedades relevantes de la pasada zafra: fusariosis de la espiga en trigo y ramularia en cebada. (en línea). *In*: Jornada de Cultivos de Invierno (2013, Young, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 33-41 (Actividades de Difusión no. 720). Consultado 11 jun. 2018. Disponible

en

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761220413093940.pdf>

47. _____.; Germán, S. 2013b. Relevancia y manejo de enfermedades en cebada en Uruguay. (en línea). In: Congreso Latinoamericano de Cebada (4º., 2013, Bahía Blanca, Argentina). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. s.p. Consultado 23 set. 2018. Disponible en <https://congresocebada.files.wordpress.com/2012/10/30-10-13-7-congreso-latinoam-cebada-arg-2013.pdf>
48. _____.; 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
49. Poehlman, J. M. 1985. Adaptation and distribution. In: Rasmusson, D. C. ed. Barley. Madison, WI, American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/ Soil Science Society of America. pp. 35-44 (Agronomy no. 26).
50. Reitan, L.; Salamanti, S. 2006. Rcc 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. Gottingen, Georg- August- University. pp. 19-35. Consultado 1 jun. 2018. Disponible en <http://webdoc.sub.gwdg.de/pub/mon/2007/koopmann.pdf>
51. Scalliet, G.; Bowler, J.; Luksch, T.; Kirchhofer-Allan, L.; Steinhauer, D.; Ward, K.; Niklaus, M.; Verras, A.; Csukai, M.; Daina, A.; Fonné-Pfister, R. 2012. Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. (en línea). PLoS One 7(4): e35429. Consultado 29 dic. 2018. Disponible en [doi:10.1371/journal.pone.0035429](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429)
52. Sharma, V. K.; Carlson, S. A. 2000. Simultaneous detection of Salmonella strains and Escherichia coli O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. Applied Environmental Microbiology. 66(12): 5472-5476.
53. 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>

54. Steffens, J. J.; Pell, E. J.; Tien, M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. (en línea). Current Opinion in Biotechnology. 7(3): 348-355. Consultado 23 jul. 2018. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80043-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80043-7)
55. Sutton, B. C.; Waller, J. 1988. Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. Transactions of the British Mycological Society. 90(1): 55-61.
56. Taylor, J.; Paterson, L.; Havis, N. 2010. A quantitative real-time PCR assay for the detection of Rcc from barley (*Hordeum vulgare*). Letters in Applied Microbiology. 50(5): 493–499.
57. Walters, D. R.; Havis, N. D.; Oxley, S. J. P. 2008. Rcc: the biology of an emerging pathogen of barley. (en línea). FEMS Microbiology Letters. 279(1): 1–7. Consultado 6 mar. 2018. Disponible en DOI:[10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x)
58. Zamani-Noor, N. 2011. Studies on Ramularia leaf spots on Barley- Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity. (en línea). PhD. Degree of Agricultural Sciences. Göttingen, Germany. Georg-August-University Göttingen. Faculty of Agricultural Sciences. 146 p. Consultado 20 dic. 2018. Disponible en <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0001-BC13-F?locale-attribute=en>
59. Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. 2004 Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I: its structure determination and methodological implications. (en línea). Nucleic Acids Res. 32(12):e103. Consultado 20 ene. 2019. Disponible en doi: [10.1093/nar/gnh101](https://doi.org/10.1093/nar/gnh101)

9. ANEXOS

Anexo No. 1. Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
pg ADN 24 0,58 0,47 71,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	41,54	5	8,31	5,03	0,0047
Fungicida	35,61	2	17,80	10,79	0,0008
N.Infección	3,77	1	3,77	2,28	0,1482
Fungicida*N.Infección	2,16	2	1,08	0,66	0,5312
Error	29,71	18	1,65		
<u>Total</u>	<u>71,25</u>	<u>23</u>			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,63951

Error: 1,6507 gl: 18

Fungicida Medias n E.E.

s/C 3,42 8 0,45 A

Testigo 1,48 8 0,45 B

c/C 0,48 8 0,45 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,10197

Error: 1,6507 gl: 18

N.Infección Medias n E.E.

B 2,19 12 0,37 A

A 1,40 12 0,37 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,88721

Error: 1,6507 gl: 18

Fungicida N.Infección Medias n E.E.

s/C B 4,13 4 0,64 A

s/C A 2,70 4 0,64 A B

Testigo A 1,49 4 0,64 A B

Testigo B 1,48 4 0,64 A B

c/C B 0,96 4 0,64 B

c/C A 0,00 4 0,64 B

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

Anexo No. 2. Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
pg ADN 24 0,58 0,47 71,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	41,54	5	8,31	5,03	0,0047
Tratamiento	41,54	5	8,31	5,03	0,0047
Error	29,71	18	1,65		
<u>Total</u>	<u>71,25</u>	<u>23</u>			

Contrastes

<u>Tratamiento</u>	<u>Contraste</u>	<u>E.E.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Contraste1	-2,39	1,28	5,71	1	5,71	3,46	0,0793
Contraste2	5,87	1,28	34,46	1	34,46	20,87	0,0002
Contraste3	-0,47	1,28	0,22	1	0,22	0,13	0,7193
<u>Total</u>		<u>40,39</u>	<u>3</u>	<u>13,46</u>	<u>8,16</u>	<u>0,0012</u>	

Coefficientes de los contrastes

<u>Tratamiento</u>	<u>Ct.1</u>	<u>Ct.2</u>	<u>Ct.3</u>
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00
3	1,00	1,00	1,00
4	-1,00	1,00	-1,00
5	1,00	-1,00	-1,00
<u>6</u>	<u>-1,00</u>	<u>-1,00</u>	<u>1,00</u>

Test:Tukey Alfa=0,10 DMS=2,55903

Error: 1,6507 gl: 18

Tratamiento Medias n E.E.

4	4,13	4	0,64	A
3	2,70	4	0,64	A B
1	1,49	4	0,64	B C
2	1,48	4	0,64	B C
6	0,96	4	0,64	B C
<u>5</u>	<u>0,00</u>	<u>4</u>	<u>0,64</u>	<u>C</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,10$)

Anexo No. 3. Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
pg ADN 24 0,58 0,47 71,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	41,54	5	8,31	5,03	0,0047
Tratamiento	41,54	5	8,31	5,03	0,0047
Error	29,71	18	1,65		
<u>Total</u>	<u>71,25</u>	<u>23</u>			

Contrastes

<u>Tratamiento</u>	<u>Contraste</u>	<u>E.E.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Contraste1	2,01	1,28	4,02	1	4,02	2,44	0,1359
<u>Total</u>			<u>4,02</u>	<u>1</u>	<u>4,02</u>	<u>2,44</u>	<u>0,1359</u>

Coefficientes de los contrastes

Tratamiento Ct.1

1	1,00
2	1,00
3	0,00
4	0,00
5	-1,00
<u>6</u>	<u>-1,00</u>

Test:Tukey Alfa=0,10 DMS=2,55903

Error: 1,6507 gl: 18

Tratamiento Medias n E.E.

4	4,13	4 0,64	A
3	2,70	4 0,64	A B
1	1,49	4 0,64	B C
2	1,48	4 0,64	B C
6	0,96	4 0,64	B C
<u>5</u>	<u>0,00</u>	<u>4 0,64</u>	<u>C</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,10$)