



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Estrategias para optimizar el manejo de ramulariosis en cebada mediante el uso de fungicidas

María Cintia Palladino Almada

Doctora en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Febrero 2024

Estrategias para optimizar el manejo de ramulariosis en cebada mediante el uso de fungicidas

María Cintia Palladino Almada

Doctora en Ciencias Agrarias

Opción Ciencias Vegetales

Febrero 2024

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Carolina Leoni, la Dra. Gabriela Garmendia y el Dr. Pedro Mondino el 23 de febrero de 2024. Autora: Ing. Agr. (Mag.) María Cintia Palladino Almada. Directora: Ing. Agr. (MSc. PhD.) Silvia A. Pereyra. Codirector: Ing. Agr. (MSc. PhD.) Carlos A. Pérez.

«Para comenzar un proyecto, hace falta valentía;
para culminar un proyecto, hace falta perseverancia y amor»

Anónimo

Dedico este trabajo a mis hijas y a Wilmar,
a quienes tanto tiempo les robé
en procura de terminar este proyecto.

Agradecimientos

Una tesis no se escribe sola, por lo que quiero agradecer:

A Silvia Pereyra y Carlos Pérez, por ser mis orientadores en este trabajo y, fundamentalmente, por su contribución en mi formación académica y profesional.

A Lucía Pareja, por el compañerismo, el seguimiento y la asesoría en el trabajo de tesis.

A Silvana Vero, por su contribución como asesora de tesis.

Al tribunal de esta tesis, por aceptar este desafío.

A mis compañeros de laboratorio de Fitopatología-EEMAC, Carolina Francia, Nazaret Ramírez, Noelia Benítez, Cintia Tagliani, Mercedes Posadas, Estefany Suárez, Nicolás Vivión, Martín Tejera, Victoria Bartaburu, Juan Loitey, Dahiana Barrientos, María Pérez y Alejandra Zugarramurdi, por la amistad recibida y sus infinitas colaboraciones en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Química del litoral, Florencia Puigvert, Belén Taborda, Agustina Muela y Noel Alonzo, por su compañerismo y sus incontables colaboraciones en el laboratorio.

A mi compañera de oficina, Silvana Abbate, por cada palabra de aliento y por hacerme el aguante que necesitaba.

A los funcionarios no docentes del Laboratorio de Procesamiento Primario de la EEMAC, Richard Arévalo, Yanina Mendieta y Andrés Ferraz, por el compañerismo y apoyo en las actividades de campo.

A los técnicos de campo y laboratorio de INIA La Estanzuela, en especial Néstor González.

A Alberto Casal, Ana Arruabarrena y Gabriela Garmendia, por su ayuda y contribuciones muy valiosas en el camino del qPCR.

A Ana Arruabarrena, Mario Giambiasi y Leticia Rubio, por la pasantía en los laboratorios de Fitopatología y Genética Molecular de INIA Salto Grande.

A mis compañeros de Edificio Iglú-Protección Vegetal EEMAC, en especial a Horacio por sus palabras de aliento.

A mis compañeros del grupo de trabajo «Impactos del uso de fitosanitarios en ambiente y agroalimentos», por el apoyo brindado. En especial a Grisel, por sus sabios consejos.

A mis compañeras de Fitopatología, Elisa Silveira y Pamela Lombardo, por el apoyo brindado.

A los ingenieros y técnicos de las empresas Kilafen y Unicampo Uruguay, por ayudarme en la logística de las chacras de cebada.

A los fondos de financiación Fondo María Viñas FMV-136660 de ANII, *Desarrollo de herramientas para el estudio de Ramulariosis en cebada y alternativas para su manejo*, y Semillero Interdisciplinario 2018 del Espacio Interdisciplinario Udelar sobre la inocuidad en grano de cebada.

A mi familia, especialmente a mis padres, por el apoyo y amor incondicional.

A Wilmar, por su inmensa compañía, por su amor, amistad, confianza, ayuda y sobre todo por su paciencia.

A Maite, por acompañarme en este camino y Sofía por empujarme fuerte en la recta final.

¡¡¡Gracias a cada uno por hacer posible la finalización de este proyecto!!!

TABLA DE CONTENIDO

Página

Página de aprobación.....	III
Agradecimientos	V
Resumen.....	X
Summary.....	XI
 1. <u>Introducción</u>	 1
1.1. Planteo del problema	1
1.2. Hipótesis y objetivos	8
1.2.1. <u>Hipótesis</u>	8
1.2.2. <u>Objetivo general</u>	8
1.2.3. <u>Objetivos específicos (OE)</u>	8
1.3. Estructura de la tesis	9
 2. <u>Cuantificación de <i>Ramularia collo-cygni</i> en lotes de semillas comerciales y su transmisión a plántulas de cebada en Uruguay</u>	 10
2.1. Introducción	12
2.2. Materiales y métodos	15
2.2.1. <u>Validación de PCR-TR</u>	15
2.2.2. <u>Concentración de ADN de Rcc en semilla en dos zafras</u>	16
2.2.3. <u>Transmisión de Rcc a plántula</u>	17
2.2.4 <u>Análisis estadísticos</u>	18
2.3. Resultados	19
2.3.1. <u>Validación de PCR-TR para Rcc</u>	19
2.3.2. <u>Concentración de ADN de Rcc en semilla en dos zafras</u>	20
2.3.3. <u>Transmisión de Rcc a plántula</u>	24
2.4. Discusión	26
2.5. Conclusiones	31
2.7. Referencias	32

3. <u>Application of a straightforward methodology by LC-QqQ-MS/MS and GC-MS to ensure food safety of barley and wheat grain</u>	37
3.1. Introduction	38
3.2. Materials and methods	40
3.2.1. <u>Selection of Compounds</u>	40
3.2.2. <u>Chemicals and Materials</u>	40
3.2.3. <u>Apparatus and Analytical Conditions</u>	40
3.2.4. <u>Identification Requirements of Compounds</u>	43
3.2.5. <u>Field Experimental Layout</u>	43
3.2.6. <u>Sample Collection and Processing</u>	44
3.2.7. <u>Method Comparison</u>	45
3.2.8. <u>Method Performance and Validation</u>	46
3.3. Results and discussion	47
3.3.1. <u>Method comparison</u>	47
3.3.2. <u>Method Validation</u>	48
3.3.3. <u>Sample analysis</u>	52
3.4. References	56
3.5. Supporting information	62
4. <u>Fungicide strategies for Ramularia Leaf Spot control recommended in Uruguay and their residues in barley grains</u>	64
4.1. Introduction	66
4.2. Materials and Methods	68
4.2.1. <u>Field experiments</u>	68
4.2.2. <u>Experimental layout</u>	68
4.2.3. <u>Fungicides and application times</u>	70
4.2.4. <u>RLS control efficiency and plump grain yield</u>	70
4.2.5. <u>Analysis of fungicide residues in barley grain</u>	70
4.2.6. <u>Statistical analysis</u>	73
4.3. Results	73
4.3.1. <u>RLS development</u>	73
4.3.2. <u>Effect of fungicides on AUDPC RLS</u>	75

4.3.3. <u>Effect of fungicides on RLS control efficiency</u>	78
4.3.4. <u>Effect of fungicides on plump grain yield</u>	78
4.3.5. <u>Fungicide residues in barley grain</u>	79
4.4. Discussion	81
4.4.1. <u>Effect of fungicides on AUDPC RLS, CE, and plump grain yield</u>	82
4.4.2. <u>Fungicide residues in barley grain</u>	84
4.5. Conclusion	86
4.6. References	88
5. <u>Discusión general</u>	94
6. <u>Conclusiones generales y perspectivas</u>	98
7. <u>Bibliografía</u>	102

Resumen

Ramularia collo-cygni (Rcc) es el agente causal de ramulariosis. La principal medida para su manejo es la utilización de fungicidas foliares cuyo impacto en la inocuidad del grano es desconocido. Por esta razón, el objetivo de la tesis fue optimizar en base a fungicidas el manejo de ramulariosis en cebada y minimizar el contenido de estos en grano. Los objetivos específicos fueron: i) validar un método de detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula mediante PCR en tiempo real (PCR-TR), ii) determinar la importancia de la semilla como fuente de inóculo de Rcc en el cultivo en sistemas de producción de Uruguay, iii) desarrollar una metodología de determinación de los residuos de fungicidas usados para el control de ramulariosis en grano de cebada y iv) identificar estrategias de aplicación de fungicidas foliares para minimizar ramulariosis y garantizar la inocuidad en relación con fungicidas en el grano producido. Se validó la técnica PCR-TR para la detección y cuantificación de Rcc en semillas y plántulas de cebada. Esta técnica de PCR-TR permitirá determinar el momento óptimo de intervención con fungicidas foliares mediante la detección de Rcc en plántulas. La concentración de ADN de Rcc de lotes comerciales varió dentro y entre zafras, lo que evidencia la importancia de esta herramienta para la cuantificación de la carga fúngica previo a la siembra. Se desarrolló un método para cuantificar residuos de fungicidas en grano de cebada. Esta metodología se amplió para cuantificar fungicidas en grano de trigo y micotoxinas producidas por el género *Fusarium*. Esta metodología analítica podría ser útil para monitorear el cumplimiento de los límites máximos de residuos (LMR) en la producción de cereales de invierno. Se evaluaron estrategias con fungicida foliares para el control de ramulariosis en cinco experimentos durante tres años consecutivos. Se comprobó la eficiencia de los fungicidas en el control de la enfermedad y en garantizar la inocuidad del grano, con niveles de residuos de fungicidas por debajo de los LMR. Los resultados contribuyen al manejo de ramulariosis con herramientas para disminuir el uso de fungicidas y asegurar la inocuidad en los granos de cebada.

Palabras clave: inóculo en semilla, PCR-TR, *Ramularia collo-cygni*, residuos de fungicidas

Strategies to optimise the management of RLS in barley using fungicides

Summary

Ramularia collo-cygni (Rcc) is the causal agent of Ramularia leaf spot (RLS). The main management tool is the use of foliar fungicides, the impact of which on cereal safety is unknown. Therefore, the aim of this thesis was to optimise fungicide-based management of RLS in barley and to minimize fungicide residues in grain. The specific objectives were: (i) to validate a method for the detection and quantification of Rcc in seeds and seedlings by real-time PCR (qPCR), (ii) to determine the importance of seeds as a source of in-crop Rcc inoculum in production systems in Uruguay, (iii) to develop a methodology to determine the residues fungicides used for the control of RLS in barley grain, and (iv) to identify foliar fungicide application strategies to minimize RLS and ensure fungicide safety in the grain produced. The qPCR technique was validated for the detection and quantification of Rcc in barley seeds and seedlings. This qPCR technique will allow the optimal timing of foliar fungicide applications to be determined by detecting Rcc in seedlings. The amount of Rcc DNA in commercial lots varied within and between growing seasons, highlighting the importance of this tool for quantifying fungal load prior to sowing. A method was developed to quantify fungicide residues in barley grain. This method was extended to quantify fungicides in wheat grain and mycotoxins produced by the *Fusarium* species. This analytical methodology could be useful for monitoring compliance with maximum residue limits (MRLs) in winter cereal production. Foliar fungicide strategies for the control of RLS were evaluated in five trials over three consecutive years. The efficacy of fungicides in controlling the disease and ensuring grain safety was tested with fungicide residue levels below MRLs. The results contribute to the management of RLS with tools to reduce fungicide use and ensure barley grain safety.

Keywords: seed-borne, qPCR, *Ramularia collo-cygni*, fungicide residues

1. Introducción

1.1. Planteo del problema

En el mundo los cereales de invierno más cultivados son el trigo (*Triticum aestivum* L.) y la cebada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L.) (FAO, 2022). El nivel de rendimiento y la calidad de los cereales dependen del potencial genético del cultivar y del manejo realizado, pero también de los factores que puedan causar daños a las plantas o una reducción del rendimiento. Entre estos factores, las enfermedades fúngicas pueden ocasionar pérdidas económicas al afectar la calidad física e industrial del grano, incluyendo aspectos como el peso hectolítico, los niveles de proteína y la presencia de micotoxinas (Pereyra, 2013; Pereyra y Germán, 2014; Retman et al., 2022). La importancia de cada enfermedad depende fundamentalmente de la resistencia de los cultivares sembrados, de la cantidad de inóculo virulento y de las condiciones climáticas prevalentes durante el período de crecimiento del cultivo (Pereyra y Germán, 2014).

Muchas enfermedades afectan los cereales, pero ramulariosis o salpicado necrótico causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc) (Sutton y Waller, 1988) es una enfermedad de relevancia (Havis et al., 2015a). Actualmente se considera la principal limitante biótica de la producción de cebada en Uruguay. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en el país en la zafra 2000 por Stewart (2001) y su importancia ha incrementado tanto en la región como en el resto del mundo (Havis et al., 2015a).

En las primeras etapas del cultivo, desde la emergencia hasta principio de espigazón, Rcc se encuentra en una fase asintomática, creciendo dentro de la planta en forma sistémica. Por lo general a partir de espigazón se observan los síntomas típicos de la enfermedad (Havis et al., 2015a). Sin embargo, en Uruguay, estos síntomas pueden observarse tan temprano como a partir de la elongación, dependiendo del ambiente (Pereyra y Pérez, 2017). Las lesiones comienzan como puntos necróticos, de color pardo oscuro, de 1 a 2 mm de longitud, rodeadas por un halo clorótico, esparcidas sobre el haz y el envés de la hoja. Luego estas manchas pueden coalescer, expandirse y cubrir rápidamente toda la superficie de la hoja, lo que genera grandes zonas necróticas (Havis et al., 2015a; Pereyra, 2013).

Esta sintomatología está asociada a un manchado fisiológico de aspecto pardo-rojizo, producto de toxinas denominadas rubelinas que son producidas por Rcc cuando hay gran luminosidad, debido a que son fotosensibles (Havis et al., 2015a; Kaczmarek et al., 2017). Este manchado le agrega complejidad al diagnóstico, ya que los síntomas de la enfermedad pueden confundirse con problemas nutricionales o con otras manchas tanto bióticas como de origen fisiológico (Harvey, 2002).

Ramularia collo-cygni tiene la capacidad de alimentarse y permanecer asociado al rastrojo de cebada (Havis et al., 2012; Pereyra, 2013; Zamani-Noor, 2011), lo que implica que, en sistemas de siembra sin laboreo, la presión de inóculo pueda ser elevada. Sin embargo, aún no se conoce la importancia epidemiológica del rastrojo para esta enfermedad. En cambio, en países con doble cultivo de cebada se observó una relación entre la cantidad de esporas liberadas por Rcc desde el rastrojo en cebada de primavera y la cantidad de enfermedad en el siguiente cultivo de cebada (Havis et al., 2023; Zamani-Noor, 2011). La producción de esporas varía entre ambientes, pero la humedad prolongada en las hojas de los cultivos fue el factor que más se correlacionó con el inicio de la liberación de esporas (Havis et al., 2023). A pesar de que Rcc se disemina mediante esporas entre chacras, el inóculo es la semilla es considerado como la principal fuente de inóculo, tomando vital importancia en el manejo de esta enfermedad (Havis et al., 2015a).

En cuanto al manejo, hasta el momento no hay cultivares con resistencia genética suficiente para minimizar los efectos de esta enfermedad (Brown y Makepeace, 2009; Leistrumaite y Liatukas 2006; Matušinsky et al., 2013; Pereyra, 2013), por lo que las pérdidas provocadas en rendimiento de grano oscilan entre el 20 % y el 70 % (Havis et al., 2020; Havis et al., 2015a). Es importante destacar que las pérdidas en rendimiento de granos mayores a 2,5 mm pueden llegar hasta el 90 %, ya que el tamaño de grano, calibre es uno de los componentes más afectados por la enfermedad (Pereyra, 2013).

Hasta el momento no existe ningún fungicida curasemilla con probada eficiencia en el control de ramulariosis, así como tampoco un tratamiento de semilla, sea físico o químico, que reduzca significativamente el nivel del patógeno (Havis et al., 2020; Pereyra, 2013). 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. Esto se debe a que los métodos estándares como *blotter test*, siembra en medio

de cultivo específico o serológicos, eficientes para la detección de otros patógenos, no han brindado resultados consistentes para el caso de Rcc (Havis et al., 2015a). Estos métodos a menudo presentan niveles inadecuados de sensibilidad, especificidad y precisión, a diferencia de los métodos moleculares de detección.

En países europeos se han desarrollado métodos de análisis moleculares que permiten determinar la presencia (Havis et al., 2006) y cuantificar indirectamente el nivel de infección basado en la concentración de ADN del hongo de Rcc en la semilla (Havis et al., 2015b; Taylor et al., 2010). Si bien estas técnicas mediante PCR en tiempo real (PCR-TR) están siendo actualmente utilizadas en Uruguay para el estudio de otras enfermedades de cultivos, para el caso de Rcc existe limitado desarrollo nacional.

El ajuste de técnicas moleculares para la detección y cuantificación de Rcc sería de gran importancia, tanto para el diagnóstico como para el manejo de la enfermedad. Además, este ajuste ayudaría a evaluar fungicidas curasemillas y aplicar prácticas de manejo de los lotes de semilla según recomendaciones, por ejemplo, de Europa. Estas sugieren la utilización de lotes de semillas que presenten menos de 5 pg de ADN de Rcc en 100 ng de ADN total (el cual incluye ADN de la semilla y demás biota presente en la semilla) y preferiblemente con menos de 1 pg de ADN de Rcc por 100 ng de ADN total (Oxley y Havis, 2010).

La falta de ajuste de este tipo de métodos sumado a la escasa resistencia genética presente en los cultivares comerciales (Havis et al., 2015a, Pereyra, 2013) limitan las medidas de manejo de la ramulariosis y han llevado a que la aplicación foliar de fungicidas sea la principal medida de manejo. A su vez, particularidades de la enfermedad como el desarrollo muy rápido de la sintomatología y la baja eficiencia de los fungicidas cuando los niveles de infección son elevados han llevado a que la intervención con estos se realice, en general, ante la aparición de síntomas (Havis et al., 2015a; Pereyra, 2013).

En Uruguay se utilizan las mezclas de inhibidores de la desmetilación (IDM: ciproconazol, protioconazol, epoxiconazol) e inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa (ISDH: fluxapirad, isopirazam). En general, estas mezclas están formuladas con inhibidores de quinona externa (IQE: azoxistrobin, piraclostrobin, trifloxistrobin). Este último grupo no tiene control de ramulariosis (Pereyra y Germán, 2014). A las mezclas que no contienen ISDH se les recomienda agregar un fungicida multisitio

(clorotalonil) (Pereyra, 2013; Pereyra y González, 2023; Pereyra y Pérez, 2017) para mejorar su rendimiento.

El momento de aplicación es clave para el buen control de ramulariosis (Pereyra y Pérez, 2017). Se recomiendan aplicaciones dependiendo del momento de inicio de la epidemia, luego de la detección de Rcc a campo y considerando las condiciones climáticas favorables para ramulariosis en los días luego de la detección. Además, para efectuar el control se recomienda prestar atención a las detecciones de Rcc zonales o regionales. En el caso de epidemias severas detectadas en las primeras etapas del ciclo del cultivo (elongación del tallo: Z32-Z33, Zadoks et al., 1974), una única aplicación en ese momento no es suficiente para el control de ramulariosis. Por lo tanto, se recomienda realizar una segunda aplicación más adelante en el ciclo del cultivo, antes de la espigazón (Pereyra, 2013; Pereyra y Germán, 2014).

En los países donde ramulariosis está presente las recomendaciones de manejo son similares (Havis et al., 2020), pero en los últimos años en Europa se ha reportado pérdida de sensibilidad de Rcc a IQE, IDM y ISDH (Fountaine y Fraaije, 2009; Havis et al., 2020; Matušinsky et al., 2010; Piotrowska et al., 2017; Rehfus et al., 2019). Además, las poblaciones de Rcc han perdido la sensibilidad a esos grupos de fungicidas incluso cuando eran aplicados en conjunto con un fungicida multisitio, clorotalonil (Havis et al., 2020). Actualmente, el uso de clorotalonil está prohibido en la Unión Europea desde mayo del 2020 por riesgo en la salud humana y el ambiente (European Commission, 2019). Dada esta situación, se están buscando alternativas químicas (Assinger et al., 2022) y biológicas para el control de ramulariosis (Havis et al., 2020).

En la región, específicamente en Argentina, se ha registrado disminución de sensibilidad de Rcc a los grupos de fungicidas IDM, IQE y ISDH. En el caso de las Qols se ha comprobado la existencia de cepas resistentes a este grupo con la mutación del gen *G143A* (Erreguerena et al., 2022). Por esta razón, se debe optimizar el uso los IDM y ISDH para no generar poblaciones de Rcc resistentes a estos grupos químicos.

A pesar de la posible generación de resistencia por parte de Rcc, los fungicidas foliares siguen siendo una herramienta esencial para asegurar rendimiento alto y calidad aceptable de los cultivos de cebada (Assinger et al., 2022). No obstante, es crucial tener presente que el uso de estos fungicidas conlleva impactos negativos tanto sobre el ambiente (Zhang et al.,

2020) como sobre la salud del consumidor final (Bjorling-Poulsen et al., 2008; Sugeng et al., 2013). Cada vez se acumulan más evidencias sobre el impacto del uso de pesticidas sintéticos, destacando la creciente amenaza de poblaciones de patógenos resistentes y los efectos perjudiciales sobre la productividad del suelo, los animales y la salud en general (Juntarawijit y Juntarawijit, 2018; Silva et al., 2019).

Las aplicaciones para el control de enfermedades foliares como la ramulariosis son dirigidas principalmente en la superficie de las hojas del cultivo, y un retraso o exceso en estas podría incrementar las probabilidades de que residuos de fungicidas alcancen el grano y, eventualmente, afecten al producto final (Lozowicka et al., 2014). A pesar de ello, en muchos casos no puede evitarse la presencia de residuos sobre los granos, incluso cuando la aplicación ha seguido los procedimientos recomendados y se han observado las buenas prácticas agrícolas (BPA, Bogliaccini et al., 2013; European Commission, 1997). Por esta razón, es necesario realizar experimentos en condiciones reales de producción para conocer el comportamiento de los residuos en el ambiente y agroalimentos y con esa información establecer los límites máximos permitidos (European Commission, 1997).

Los residuos de pesticidas en los granos impactan negativamente en su calidad, lo que a su vez tiene consecuencias en el valor agregado y en las exportaciones (Mankevičienė et al., 2011). Los mercados internacionales poseen regulaciones cada vez más estrictas en cuanto a los límites máximos de residuos (LMR) de pesticidas en alimentos porque tienen como objetivo preservar la salud de los consumidores. Además, los LMR actúan como barreras no arancelarias (FAO, 2021). El LMR se define como la cantidad máxima de residuo de un determinado pesticida de un determinado producto agrícola, expresado en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (FAO, 2021).

En las regulaciones del mercado también se fiscalizan las toxinas producidas por los hongos. En el caso de cebada y trigo se evalúan principalmente deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) (Dweba et al., 2017) por ser nocivas para la salud animal y humana (Fokunang et al., 2006; Mankevičienė et al., 2011). Estas micotoxinas son producidas por el complejo *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zeae* (Schwein) Petch) cuando ocurre fusariosis de la espiga. Esta enfermedad puede provocar pérdidas económicas severas en todos los eslabones de la cadena agroindustrial como consecuencia de mermas en los rendimientos de grano, disminución de la calidad física e industrial de este y menor

inocuidad en el producto debido a la producción de las micotoxinas antes mencionadas (Dweba et al., 2017).

En Uruguay, la fiscalización de los residuos y micotoxinas en el mercado interno y en la importación se rige por el *Codex Alimentarius* (Decreto n.º 285/009, FAO, 2021). En caso de no contar con LMR establecidos por este organismo, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) tendrá en cuenta las recomendaciones de tolerancias establecidas por organismos regionales o internacionales de reconocida autoridad técnica, tales como las promulgadas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (Senasa), la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (Anvisa), el Ministerio de Salud y la Subsecretaría de Salud Pública de Chile, la Comunidad Europea o el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) (Decreto n.º 285/009).

En la actualidad, los laboratorios de análisis de compuestos traza, como residuos de pesticidas o micotoxinas, cuentan con instrumental que permite realizar experimentos de masas en tándem, cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masas, lo que ha facilitado el desarrollo de metodologías analíticas que permiten la separación, identificación y cuantificación de un gran número de compuestos simultáneamente a concentraciones muy bajas, del orden de partes por billón ($\mu\text{g kg}^{-1}$), como las que exigen los organismos internacionales (Codex Alimentarius, 1995; FAO, 2021).

A pesar de la alta sensibilidad de estos instrumentos, la baja concentración de los contaminantes en los alimentos a menudo requiere ajustar las metodologías de extracción y purificación. Esto es necesario para asegurar los resultados analíticos esperados, lo que implica desarrollar un tratamiento de muestra específico para cada tipo de matriz (Niell et al., 2010).

El desarrollo de metodologías multiresiduo de tratamiento de muestra, que abarcan un número elevado de compuestos, como el método de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (QuEChERS), el método de acetato de etilo miniaturizado (AcOEt) y el método de mini-Luke, son los de preferencia debido a que permiten analizar un gran número de analitos simultáneamente. Estos métodos utilizan una baja cantidad de muestra, de reactivos y solventes, por lo que se considera que son rápidos, sencillos y amigables con el

medioambiente (Agüera et al., 2004; Agüera et al., 2002; Anastassiades et al., 2003; Hans et al., 2007; Kmešár et al., 2008; Luke et al., 1975; Paya et al., 2007; Pihlström et al., 2007).

En los últimos años, el número de aplicaciones para análisis de pesticidas mediante el método QuEChERS ha crecido exponencialmente (Rejczak y Tuzimski, 2015). Este, en general, se basa en la extracción con acetonitrilo mediante el agregado de sales (*salting-out*) de una muestra sólida, seguido por una purificación (*clean up*) dispersiva en fase sólida para remover las posibles interferencias de la matriz. También se han desarrollado algunas variantes de este método con el fin de mejorar la recuperación de compuestos lábiles a pH ácidos o alcalinos a través del uso de sales que actúan como estabilizadores de pH *buffer* (Anastassiades et al., 2003; Kmešár et al., 2008; Paya et al., 2007).

En el mundo, estas metodologías se emplean extensamente para diversas matrices alimentarias, como frutas, hortalizas, productos de origen animal y cereales (Da Silva et al., 2018; Lozowicka et al., 2014). Estos métodos no solo se utilizan para evaluar residuos de pesticidas, sino también para analizar micotoxinas (Da Luz et al., 2017; Zhang et al., 2013). A pesar de que existen estudios regionales sobre la inocuidad de granos de cebada en relación con residuos de fungicidas, es necesario evaluar las estrategias de manejo en cada situación específica (Palladino et al., 2021; Pelocche et al., 2020). Dada la dependencia de cada manejo sanitario de las condiciones climáticas, los cultivares y la población de patógenos en la región, esta evaluación se vuelve esencial.

En resumen, hasta el momento, la principal medida de manejo disponible para ramulariosis es la utilización de fungicidas foliares. La eficacia de esta medida de control está amenazada por la pérdida de eficacia resultante de la evolución de aislados de patógenos insensibles o resistentes a diversos grupos de fungicidas (Fountaine y Fraaije, 2009; Havis et al., 2018; Matušinsky et al., 2010; Piotrowska et al., 2017; Rehfus et al., 2019). Por esta razón, es necesario explorar alternativas de manejo para ramulariosis que minimicen la principal fuente de inóculo con el fin de disminuir el uso de fungicidas foliares en el ciclo de cultivo. Además, se busca que estas aplicaciones no dejen residuos en los granos y/o que estos no superen sus LMR establecidos por las organizaciones internacionales como la Comisión del *Codex Alimentarius* y la Unión Europea.

1.2. Hipótesis y objetivos

1.2.1. Hipótesis

Este trabajo parte de las siguientes hipótesis:

- La semilla es la principal fuente de inóculo de Rcc en los sistemas de producción de Uruguay.
- Semillas con niveles de infección de Rcc bajos son capaces de provocar epidemias severas a campo si ocurren condiciones favorables para el desarrollo de ramulariosis durante el ciclo del cultivo.
- Las metodologías analíticas propuestas permiten cuantificar los fungicidas aquí estudiados en granos de cebada y comparar los resultados de acuerdo a las normativas internacionales.
- Aplicaciones de fungicidas foliares estratégicas logran disminuir el nivel de severidad de ramulariosis.
- Los niveles de residuos de los fungicidas utilizados para el control de ramulariosis, según las estrategias propuestas, son menores a los límites máximos de residuos establecidos por el *Codex Alimentarius* o la Unión Europea.

1.2.2. Objetivo general

El objetivo general de la tesis es ajustar técnicas analíticas para optimizar el manejo de ramulariosis y minimizar el contenido de residuos de fungicidas en granos de cebada.

1.2.3. Objetivos específicos (OE)

OE. 1. Validar un método de detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula mediante PCR en tiempo real.

OE. 2. Determinar el inóculo de Rcc en semillas de cebada en sistemas de producción de Uruguay.

OE. 3. Desarrollar una metodología analítica de determinación de los principales fungicidas registrados en Uruguay para el control de ramulariosis en grano de cebada.

OE. 4. Evaluar estrategias de aplicación de fungicidas foliares recomendados para el control de ramulariosis según tipo de epidemia y garantizar su inocuidad en relación a fungicidas en el grano producido.

1.3. Estructura de la tesis

La estructura general de la tesis consiste en una introducción general, tres capítulos que corresponden con tres artículos científicos: 1. *Cuantificación de Ramularia collo-cygni en lotes de semillas comerciales de cebada en Uruguay*, 2. *Aplicación de una metodología sencilla mediante LC-QqQ-MS/MS y GC-MS para garantizar la inocuidad del grano de cebada y trigo*; y 3. *Estrategias para el control de ramulariosis con fungicidas recomendadas en Uruguay y sus residuos en granos de cebada*, y dos capítulos de cierre, uno de discusión y otro de conclusiones generales y perspectivas.

En el artículo 1 se realizó un ajuste de una técnica molecular de cuantificación del inóculo en la semilla o plántula para contar con una herramienta de manejo que lleve a un menor uso de fungicidas foliares. Con la implementación de la técnica se realizó una evaluación de dos zafra de cebada para ver la importancia del inóculo en las epidemias a campo. Se relacionaron las variables climáticas y la concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) en semilla y en plántula. Además, se analizó la transmisión de Rcc a plántula a partir de diferentes concentraciones de ADN de Rcc en semilla.

El artículo 2 abordó el desarrollo de un método de cuantificación en granos de trigo y cebada de micotoxinas (deoxinivalenol y zearalenona) y residuos de los principales fungicidas utilizados en el control de fusariosis de la espiga y ramulariosis. En el artículo 3 se utilizó la metodología de determinación de fungicidas para evaluar y optimizar las principales estrategias de manejo con fungicidas foliares para el control de ramulariosis.

2. Cuantificación de *Ramularia collo-cygni* en lotes de semillas comerciales y su transmisión a plántulas de cebada en Uruguay

Cintia Palladino, Carlos A. Pérez, Silvia A. Pereyra. *Agrociencia Uruguay*. 2024

Resumen

Ramulariosis, causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc), es una enfermedad importante en el cultivo de cebada en Uruguay. La capacidad de Rcc para pasar de la semilla a la plántula de manera asintomática dificulta tanto el diagnóstico como el manejo de la enfermedad. En este trabajo se validó una técnica PCR-TR para detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula, y se cuantificó la concentración de ADN de Rcc en semilla colectada durante las zafas 2016-2017 y 2017-2018 en Uruguay. Adicionalmente se estudió la relación entre la concentración de ADN de Rcc en la semilla con las condiciones climáticas y productivas ocurridas en el cultivo que la produjo y se analizó la transmisión de Rcc a plántula a partir de diferentes concentraciones de ADN de Rcc en semillas seleccionadas de las dos zafas estudiadas. Se validó la técnica de PCR-TR con un rango de 0,000128 a 2 ng μl^{-1} de ADN de Rcc en semilla y planta. La zafa 2017-2018 presentó mayor proporción de lotes que con ADN de Rcc en semilla superiores a las concentraciones recomendados para la siembra, en comparación con la zafa anterior. En los experimentos de campo, el hongo se transmitió a la plántula de forma asintomática independientemente del nivel de infección de Rcc en semilla, aunque no se registraron epidemias. Esta técnica de PCR-TR permitirá cuantificar la concentración de ADN de Rcc en la semilla y segregar lotes, lo que contribuirá a un manejo más eficiente de la ramulariosis.

Palabras clave: PCR en tiempo real, ADN, nivel de infección, ramulariosis, salpicado necrótico

Summary

Ramularia leaf spot (RLS), caused by *Ramularia collo-cygni* (Rcc), is an important disease of barley in Uruguay. The ability of Rcc to move asymptotically from seed to

seedling makes both diagnosis and management of the disease difficult. In this work, a qPCR technique for detection and quantification of Rcc in seeds and seedlings was validated and the amount of Rcc DNA in seeds collected during the 2016-2017 and 2017-2018 growing seasons in Uruguay was quantified. In addition, the relationship between the amount of Rcc DNA in the seed and the weather and production conditions that occurred in the crop that produced it was studied, and the transmission of Rcc to the seedling was analyzed from different concentrations of Rcc DNA in selected seeds from the two growing seasons studied. The qPCR technique was validated with a range of 0.000128 to 2 ng μl^{-1} Rcc DNA in seed and plant. The 2017-2018 growing season showed a higher proportion of lots with Rcc DNA in seed above the recommended concentrations for planting. In field trials, the fungus was transferred asymptotically to the seedling regardless of the level of Rcc infection in the seed, although no epidemics were recorded. This qPCR technique will allow quantification of the amount of Rcc DNA in seeds and segregation of lots, which will contribute to more efficient management of RLS.

Key words: real-time PCR, DNA, infection level, ramulariosis, necrotic spattering

Resumo

Ramulariose, causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc), é uma doença importante no cultivo de cevada no Uruguai. A capacidade de Rcc para passar da semente à planta de maneira assintomática dificulta tanto o diagnóstico como o manejo da doença. Neste trabalho foi validada uma técnica PCR-TR para detecção e quantificação de Rcc em semente e planta, e quantificou-se a quantidade de DNA de Rcc em semente coletada durante as safras 2016-2017 e 2017-2018 no Uruguai. Adicionalmente se estudou a relação entre a quantidade de DNA de Rcc na semente com as condições climáticas e produtivas ocorridas no cultivo que a produziu e se analisou a transmissão de Rcc a plântula a partir de diferentes concentrações de DNA de Rcc em sementes seleccionadas das duas safras estudadas. A técnica PCR-TR foi validada com um intervalo de 0,000128 a 2 ng μl^{-1} de DNA de Rcc em semente e planta. A safra 2017-2018 apresentou maior proporção de lotes do que com DNA de Rcc em semente superiores às concentrações recomendadas para semeadura. Nas experiências de campo, o

fungo transmitiu-se à plântula de forma assintomática independentemente do nível de infecção de Rcc em semente, embora não se tenham registado epidemias. Esta técnica de PCR-TR permitirá quantificar a quantidade de DNA de Rcc na semente e segregar lotes, o que contribuirá para um manejo mais eficiente da ramulariose.

Key words: PCR em tempo real, DNA, nível de infecção, ramulariose, respingos necróticos

2.1. Introducción

Ramulariosis o salpicado necrótico causado por el hongo *Ramularia collo-cygni* (Rcc⁽¹⁾) es una de las principales enfermedades que afecta a la cebada en todo el mundo⁽²⁾. Esta enfermedad puede producir pérdidas de hasta 70% en el rendimiento de grano, y afecta la calidad física de este⁽²⁾⁽³⁾. En Uruguay, se han estimado las pérdidas máximas en el rendimiento de granos mayores a 2.5 mm de hasta 90%⁽⁴⁾. Esto incide negativamente en la economía nacional, ya que el principal destino de la producción es la exportación de malta⁽⁵⁾, por lo que la calidad física e industrial del grano es fundamental.

Ramularia collo-cygni tiene la capacidad de permanecer asociado al rastrojo de cebada donde desarrolla una fase espermagonial, *Asteromella* sp.⁽⁴⁾⁽⁶⁾. Sin embargo, aún no se conoce la importancia epidemiológica del rastrojo para esta enfermedad. A pesar de esto, se observó una relación entre la cantidad de esporas liberadas por Rcc cercanas a la cosecha del cultivo y la cantidad de enfermedad en el siguiente cultivo de cebada en condiciones de doble cultivo anual⁽⁷⁾.

Por otra parte, se ha identificado la presencia de Rcc en otros cultivos como trigo, avena y maíz, así como otras gramíneas cultivadas o malezas como *Agrostis* spp., *Apera spica-venti*, *Brachypodium distachyon*, *Bromus catharticus*, *Dactylis glomerata*, *Elymus repens*, *Echinochloa crus-galli*, *Festuca kingii*, *Glyceria fluitans*, *Lolium multiflorum*, *L. perenne* y *Phalaris arundinacea*, que son habituales en el cultivo de cebada en distintas partes del mundo⁽²⁾⁽³⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾. Se ha propuesto que estas especies podrían oficiar como un puente verde al cultivo de cebada⁽⁸⁾⁽¹³⁾.

A pesar de que se han reportado diferentes fuentes de inóculo de Rcc y que aun restan estudios para determinar su importancia, la semilla es considerada como la principal fuente de inóculo. Esta toma vital importancia en el manejo de ramulariosis porque hasta el momento no hay cultivares con resistencia genética suficiente para minimizar los efectos de esta enfermedad⁽¹⁴⁾. Si bien se ha encontrado variabilidad en el comportamiento entre los cultivares, estos presentan una susceptibilidad de intermedia a alta que limita la eficiencia de esta medida de manejo⁽⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾, lo que sugiere una resistencia cuantitativa que involucra muchos genes de resistencia.

En la semilla, Rcc está presente en tejidos como lema, palea, aristas y, en menor medida, en pericarpio y embrión⁽¹⁸⁾. Luego de la siembra, Rcc es capaz de colonizar en forma sistémica en la planta sin causar síntomas, lo que genera gran dificultad en el diagnóstico. Este se complejiza porque en etapas tempranas en el ciclo del cultivo pueden aparecer además manchas asociadas a síntomas de otras enfermedades como manchas foliares o factores abióticos, manchas fisiológicas⁽²⁾.

Los síntomas característicos de la enfermedad en Uruguay se observan generalmente a partir de elongación del tallo⁽¹⁹⁾, mientras que en Europa luego de la emergencia de las espigas⁽²⁾. Sin embargo, en condiciones climáticas muy favorables, los síntomas de ramulariosis pueden detectarse en estadios fenológicos más tempranos⁽²⁾⁽²⁰⁾. Estos son pequeñas manchas necróticas, con un halo clorótico, de aspecto rectangular, siguiendo las nervaduras, y que pueden ser visualizadas tanto en el haz como en el envés de la hoja⁽²⁾⁽⁸⁾. Esta sintomatología está asociada a un manchado fisiológico de aspecto pardo-rojizo, que dificulta aún más la identificación del hongo. Este manchado es producto de toxinas, denominadas rubelinas, las cuales son producidas por Rcc cuando hay gran luminosidad, debido a que son fotosensibles⁽²⁾.

Actualmente se desconocen los factores específicos que desencadenan que Rcc pase de una fase endofítica a una patogénica⁽⁸⁾. Sin embargo, algunos factores que inducen estrés en el cultivo como exceso o déficit hídrico, niveles subóptimos de nutrientes (especialmente nitrógeno), alta intensidad lumínica, temperaturas extremas, entre otras, juegan un rol importante en el desarrollo de ramulariosis⁽¹³⁾⁽¹⁸⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾.

Internacionalmente, se han desarrollado métodos moleculares basados en la técnica de PCR en tiempo real (PCR-TR) que permiten el diagnóstico de ramulariosis por su

sensibilidad, especificidad y precisión. Esta metodología brinda mejores resultados para Rcc que los métodos estándar de detección utilizados comúnmente en otros patógenos⁽²³⁾, como *blotter test*, medios de cultivo, examen visual, entre otros.

Existe una clasificación basada en la cuantificación de ADN de Rcc en la semilla por medio de PCR-TR⁽²⁾⁽²³⁾. De acuerdo a criterios desarrollados en Europa para caracterizar la carga de inóculo de Rcc en la semilla de cebada, contenidos inferiores a 5 pg de ADN Rcc en 100 ng⁻¹ de ADN total sugieren un intermedio a bajo nivel de infección en la semilla, mientras que valores superiores a 5 pg se consideraron altos. Con base en esta clasificación se recomienda mantener los niveles de infección de Rcc lo más bajos posible en las regiones en donde ramulariosis no es endémica y utilizar lotes que contengan menos de 1 pg de ADN Rcc en 100 ng⁻¹ de ADN total para la siembra⁽²⁴⁾.

A pesar de la recomendación de estos rangos de infección en semilla basados en estudios de epidemiología de la enfermedad, no se ha observado una relación directa entre la concentración de ADN de Rcc en semilla, medido como pg de ADN Rcc en 100 ng⁻¹ de ADN total, con los niveles de enfermedad a campo⁽¹⁸⁾. Esto se debe a que la expresión de la enfermedad está fuertemente influenciada por las condiciones climáticas⁽¹³⁾⁽¹⁸⁾⁽²⁰⁾⁽²²⁾.

En Uruguay, ramulariosis ha incrementado en prevalencia e incidencia desde su detección en el 2011, debido a la falta de cultivares resistentes y de herramientas para la detección temprana⁽⁴⁾. Se desconoce el nivel de infección de Rcc en los granos producidos en las condiciones climáticas y productivas del país. Además, no hay reportes en el país de como influyen las condiciones climáticas y diferente carga fúngica de Rcc en la epidemia de ramulariosis. Por esta razón, los objetivos de este trabajo fueron: i) validar la técnica PCR-TR para detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula basada en la técnica de PCR desarrollada previamente por Taylor *et al.*⁽²³⁾, ii) conocer la concentración de ADN de Rcc en semilla colectada durante dos zafras en Uruguay, iii) comprender la relación entre la concentración de ADN de Rcc en la semilla con las condiciones climáticas y productivas ocurridas en el cultivo de origen y iv) cuantificar la concentración de ADN de Rcc en plántulas originadas de semillas con diferentes concentraciones de ADN de Rcc.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Validación de PCR-TR

2.2.1.1. Extracción de ADN de cepa de Rcc

Para la extracción de ADN se utilizó un aislado de Rcc (Rcc3) de la colección del banco de aislados del Laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela. La cepa fue multiplicada en placas de Petri en medio PDA (papa dextrosa agar), con cloranfenicol e incubada a 20 °C durante 10 días con luz cercana a UV permanente.

Se extrajo ADN mediante el método CTAB⁽²⁵⁾. La concentración y pureza del ADN fue determinada por lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.). La integridad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con Good View (Fermentas International Inc., Ontario, Canadá) como indicador de tinción (0,7 µl), a 28 V, 150 mA durante 1 h. Se reveló bajo visualizador de geles (ENDURO GDS Touch, Labnet International, Inc., Nueva Jersey, EE. UU.).

2.2.1.2. Curva estándar y efecto matriz

El método de PCR-TR se realizó en un volumen total de 20 µl. La reacción contenía 10 µl de PCR-TR Universal MIX II (Qiagen, Hilden, Alemania), 1,6 µl de cebador directo y reverso (150 nmol; 10 µl), 0,3 (10 µl) de sonda de Rcc (Qiagen, Hilden, Alemania), 3,1 µl de agua miliQ estéril y 5 µl (20 ng µl⁻¹) de ADN. Los cebadores utilizados fueron RamF6 (CGT CAT TTC ACC ACT CAA G) y RamR6 (CCT CTG CGA ATA GTT GCC). La sonda molecular fue Ram6 (FAM-GCG ATT CCG GCT GAG CGG TTC GTC ATC GCG-BHQ-1) según Taylor *et al.*⁽²³⁾.

Se realizaron tres amplificaciones simultáneas para cada muestra para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Para las reacciones de control negativo (sin ADN), se sustituyó el ADN por agua libre de nucleasas. El ciclo de amplificación consistió en un ciclo inicial de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 55 °C y 20 s a 72 °C, y luego una fase de extensión de 1 min a 95 °C. La emisión de fluorescencia se midió en la fase de hibridación. La reacción se llevó a cabo en un equipo PCR-TR StepOnePlus (Applied

Biosystems, Waltham, EE. UU.). Los ciclos de umbral se calcularon automáticamente con el software StepOnePlus (versión 2.3, Applied Biosystems).

Se desarrolló una curva estándar con diluciones seriadas de uno en cinco de la solución en agua del ADN genómico de Rcc previamente extraído. El rango de concentraciones utilizado fue entre 2 ng a 0,128 pg μl^{-1} de reacción. Para cada caso se determinó el *cycle threshold* (Ct). A partir de los valores de Ct de cada concentración se realizó una curva de calibración graficando Ct en función de la concentración de ADN. Se determinaron la linealidad, la eficiencia y el rango dinámico.

Por otra parte, se realizó el estudio de la influencia de la matriz (semilla y plántula) a partir del ADN total de una muestra de semilla y plántula. Para la extracción de ADN de Rcc en semilla se tomó 150 g de un lote de semilla, se molió con un molino (IKA IKA®-WERKE modelo M20, Wilmington, EE. UU.), hasta obtener una harina de 2 mm. Luego se tomó 0,1 g de la muestra para realizar la extracción de ADN total de la semilla siguiendo la metodología de Arruabarrena *et al.*⁽²⁶⁾. Para la extracción de ADN de plántulas se partió de 10 plántulas con 2 hojas expandidas. Estas se cortaron con tijera a una altura de un centímetro por encima de la semilla. El material vegetal se liofilizó (modelo BW10, China) durante 12 h. Luego se realizó la extracción de ADN de plántulas con el método CTAB adaptado de CIMMYT⁽²⁷⁾. La modificación consistió en partir de 0,1 g de la muestra como lo sugería en el trabajo de Havis *et al.*⁽¹⁴⁾.

Luego de obtenido el ADN de semilla y plántula, se le añadió a cada uno diferentes concentraciones de ADN genómico de Rcc (0,1 ng μl^{-1} y 0,01 ng μl^{-1}) y cada muestra se sometió a la PCR-TR. Además, se incluyeron dos blancos y diluciones hechas con agua para comparar los Ct obtenidos en cada caso y así determinar si existía inhibición de la matriz.

2.2.2. Concentración de ADN de Rcc en semilla en dos zafras

Se evaluaron 47 lotes de semilla de cebada de la zafra 2016-2017 y 103 lotes de la zafra 2017-2018. Las muestras se obtuvieron de la principal zona productora de cebada de Uruguay⁽⁵⁾. Las chacras de donde provinieron los lotes de semillas fueron georreferenciadas y se elaboró una base de datos con información climática y de manejo de cada lote. Los datos de manejo de cada lote (fecha de siembra, variedad y localidad) fueron suministrados por los

productores al momento de la colecta de las muestras de los lotes de semilla. Las fechas de siembra oscilaron entre los meses de mayo a julio en la zafra 2016-2017 y de mayo a agosto de 2017-2018. Las chacras muestreadas estuvieron localizadas en los departamentos de Salto, Paysandú, Colonia, Soriano, Río Negro, San José y Flores. Las variedades relevadas fueron Arcadia, Arrayán, Blondie, Cle280, Cle282, Danielle, Explorer, Grace, Musa 19, Musa 936 y Umbrela. Estas presentan un comportamiento sanitario deficiente frente a Rcc, con susceptibilidad entre intermedia-alta a alta⁽¹⁵⁾.

Para el análisis de los datos climáticos se consideraron tres períodos: la ventana recomendada de aplicación de fungicidas para el control de ramulariosis: entre los estadios de elongación del tallo a anteras visibles (Z30 a Z47)⁽²⁾⁽²⁸⁾, el período anterior (Z30-32) y el posterior a esta (Z47 a cosecha). Las variables climáticas que se consideraron en el análisis fueron: radiación solar (MJ m^{-2}), humedad relativa (%), temperatura media ($^{\circ}\text{C}$) y lluvias acumuladas (mm). La selección de estas variables se debió a la fuerte correlación entre los períodos prolongados de agua libre sobre las hojas, las precipitaciones en los primeros estadios del cultivo y la severidad de ramulariosis⁽¹³⁾⁽²¹⁾⁽²⁹⁾. Además, hay reportes de que pocos días con precipitaciones y altas temperaturas no son favorables para la enfermedad⁽²²⁾.

Los datos de temperatura, humedad relativa y radiación solar fueron obtenidos de las estaciones agrometeorológicas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y Estación Experimental «Dr. Mario A. Cassinoni» (EEMAC). Los datos de lluvias se tomaron de las estaciones meteorológicas de la red del Instituto Nacional de Meteorología (INUMET), INIA o EEMAC más cercana a la chacra.

Para la cuantificación de la concentración de ADN de Rcc en semilla, de cada lote se tomó una muestra representativa de 150 g, y se procedió a realizar la extracción de ADN total de la semilla siguiendo la metodología de Arruabarrena *et al.*⁽²⁶⁾. A partir de la extracción de ADN, se realizó la cuantificación de ADN de Rcc mediante la técnica de PCR-TR (ítem 2.2.1.2).

2.2.3. Transmisión de Rcc a plántula

Se instalaron dos experimentos de campo, uno en Paysandú ($32^{\circ} 37'S$; $58^{\circ} 05'W$) en la zafra 2017-2018 y otro en Young ($32^{\circ} 68'S$; $57^{\circ} 65'W$) en la zafra 2018-2019. Ambos

experimentos presentaron un diseño de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones, en los que los tratamientos fueron los lotes de semilla con diferentes concentraciones de ADN de Rcc. A partir de la cuantificación de la concentración de ADN de Rcc en semilla se seleccionaron 10 lotes de semillas, cuatro de la zafra 2016-2017 y seis de la zafra 2017-2018 para ser evaluados en Paysandú y Young, respectivamente. En cada experimento se evaluaron la mitad de los lotes con concentraciones de ADN de Rcc mayores a 1 pg de ADN / 100 ng de ADN total y la otra mitad menores a ese valor. La unidad experimental en ambos casos consistió en una parcela de 1 x 5 m.

Por otra parte, se instaló un experimento en condiciones controladas de laboratorio con un diseño experimental al azar, en donde los tratamientos fueron los 10 lotes de semilla con diferente concentración de ADN de Rcc. Cada lote se sembró en una bandeja de 28 cm de largo por 15 de ancho, con 400 semillas por bandeja, dispuestas en línea entre pliegues de papel de filtro, metodología adaptada de Clemente *et al.*⁽³⁰⁾. Las bandejas fueron colocadas durante tres semanas en una cámara de germinación a 21 ± 2 °C con ciclos de 12 h de fotoperíodo y humedecidas con 50 ml de agua cada semana.

En ambos experimentos, cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas (Z12), de cada parcela de campo o bandeja se tomaron 10 plántulas al azar y se cortaron con tijera a una altura de un centímetro por encima de la semilla. A partir del material vegetal se realizó la extracción de ADN de plántulas con el método CTAB adaptado de CIMMYT⁽²⁷⁾. Luego se realizó la cuantificación de ADN de Rcc mediante la técnica de PCR-RT (ítem 2.2.1.2).

A su vez, en los experimentos de campo, se realizaron lecturas periódicas de los niveles de ramulariosis a lo largo del ciclo (Z30, Z33, Z47, Z49 y Z73), incidencia (%) y severidad (%) en 10 plantas. Los datos meteorológicos fueron los mismos que el ítem 2.2.2 y tomados de estaciones meteorológicas de la red de INUMET, INIA y EEMAC.

2.2.4 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat® software v. 2020⁽³¹⁾. Se analizaron las correlaciones de Pearson entre la concentración de ADN de Rcc en los lotes de semilla y la concentración de ADN de Rcc en plántula, y entre la concentración de

ADN de Rcc en semilla y la radiación solar, temperatura, humedad relativa y lluvias acumuladas de ambas zafras de estudio en conjunto.

2.3. Resultados

2.3.1. Validación de PCR-TR para Rcc

El rango dinámico se definió entre 2 ng μl^{-1} a 0,128 pg μl^{-1} y el desvío de los C_t de las tres replicas fue bajo (Figura 1A). La curva estándar presento una eficiencia de 99,4% con una pendiente de -3,34 y un coeficiente de correlación de 0,99. En las diferentes diluciones del ADN de Rcc de la curva se observaron amplificaciones, sin embargos no se observó amplificación cuando el ADN de Rcc fue sustituido por agua (control negativo). No se observó inhibición de la reacción de PCR-TR por las distintas matrices, semilla o plántula, ni interferencia en la cuantificación del ADN de las muestras (Figura 1B).

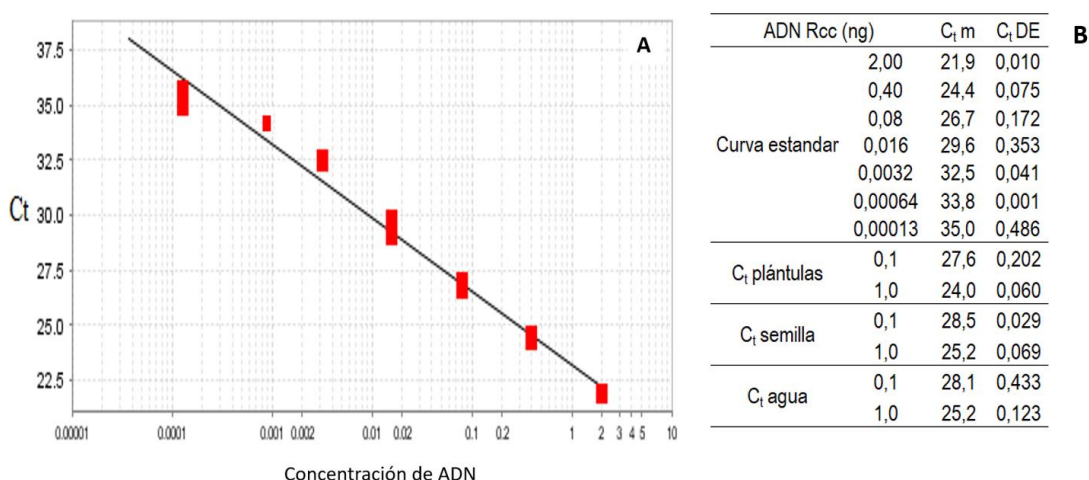


Figura 1. A. Curva estándar de calibración de ADN genómico de *Ramularia collo-cygni* (Rcc), en un rango de concentración de 0,000128 a 2 ng μl^{-1} . Pendiente = -3,34; Y-inter (C_t) = 37,9; R^2 = 0,99; eficiencia % = 99,4. Los puntos corresponden a cada valor de *cycle threshold* (C_t) para cada triplicado. B. Datos de concentraciones de ADN de Rcc, C_t medios, C_t DE de desvío estándar, y efecto matriz en semilla y plántula.

2.3.2. Concentración de ADN de Rcc en semilla en dos zafras

Todos los lotes de semillas analizados de las zafras 2016-2017 y 2017-2018 tenían concentraciones de ADN de Rcc superiores al nivel mínimo establecido por la curva estándar de calibración (0,128 pg). El porcentaje de lotes de la zafra 2016-2017 con niveles de ADN de Rcc por debajo de 1 pg fue mayor que el de la zafra siguiente, 51% y 47%, respectivamente (Figura 2).

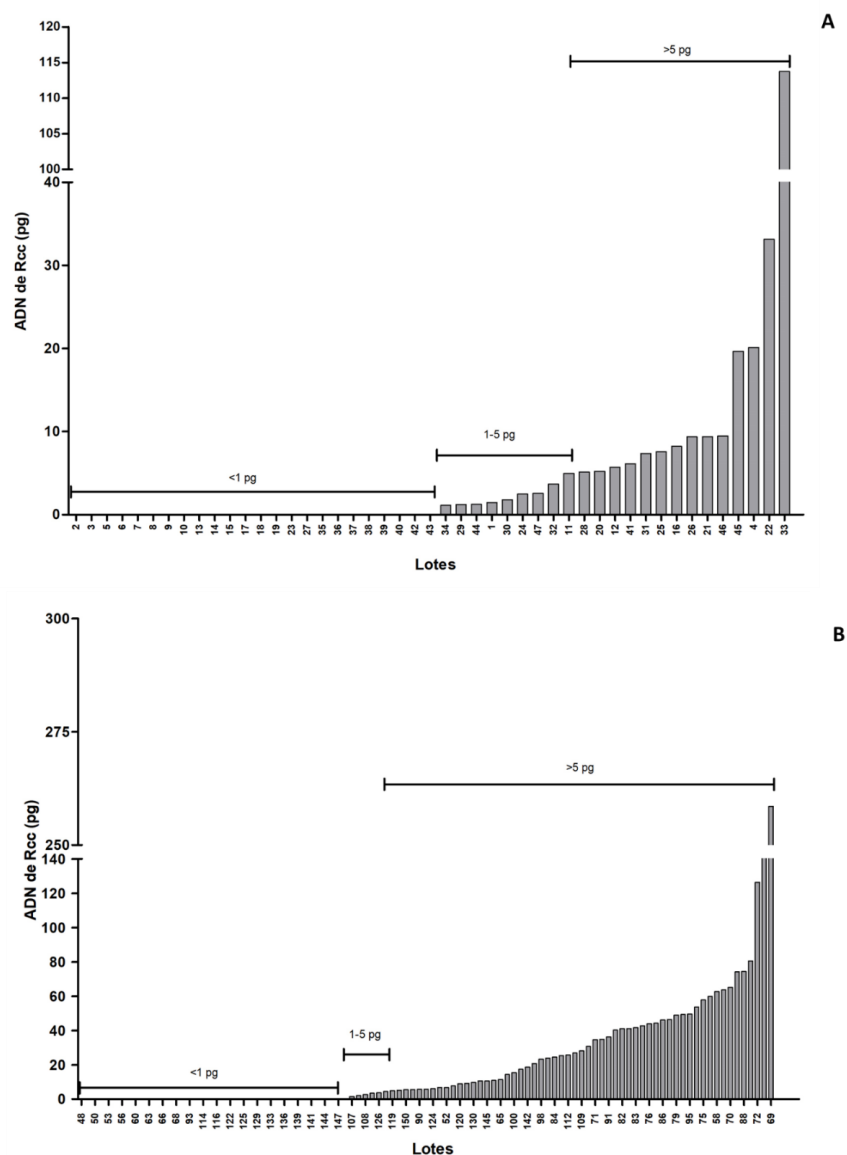
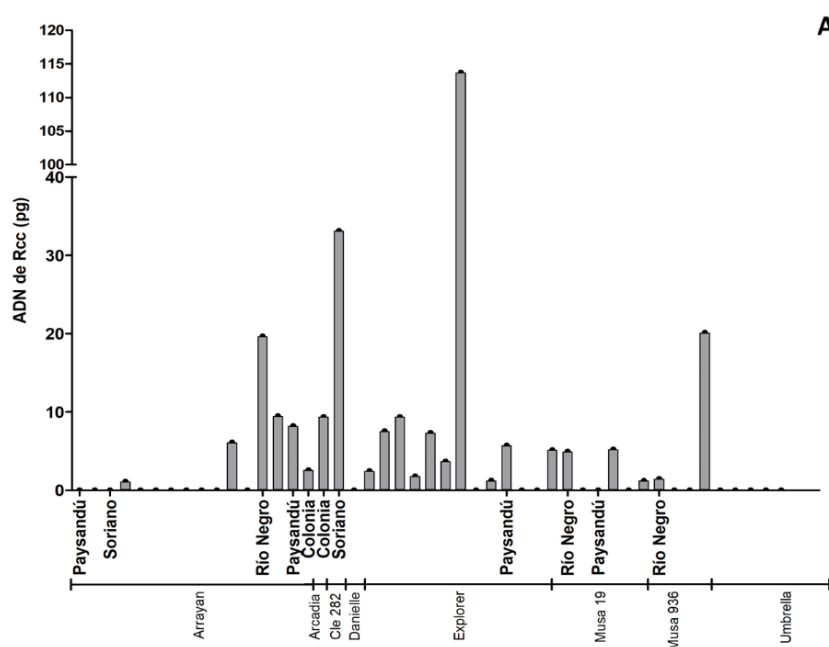


Figura 2. Clasificación de los lotes de semilla de cebada analizados de las zafra 2016-2017 (A, n = 47) y 2017-2018 (B, n = 103) por la concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc, pg / 100 ng ADN extraído de semilla) cuantificado mediante la técnica de PCR en tiempo real y clasificados según rangos sugeridos por Oxley y Havis⁽²⁴⁾.

En la zafra 2017-2018, la proporción de lotes con concentraciones de ADN de Rcc superiores a 1 pg fue un 14% mayor que la zafra anterior. La concentración promedio también fue más alta con 36,2 pg, siendo tres veces mayor que la determinada en la zafra anterior (Figura 2). No obstante, al eliminar las tres concentraciones más elevadas de ADN de Rcc en

la semilla de la zafra 2017-2018 (126,5; 217,9 y 258,5 pg), el promedio registrado es de 28 pg (n = 60); aun así, sigue siendo su concentración dos veces superior a la zafra 2016-2017.

En cuanto a las variedades de cebada evaluadas en este estudio, presentan diferente concentración de ADN de Rcc en semilla dependiendo de la localización de la chacra y de la zafra (Figura 3, A y B). Sin importar el comportamiento sanitario frente a ramulariosis, las variedades presentaron entre ellas diferentes promedios de concentraciones de ADN de Rcc en semilla y dentro en una misma variedad los lotes también difirieron en su concentración (Figura 3C).



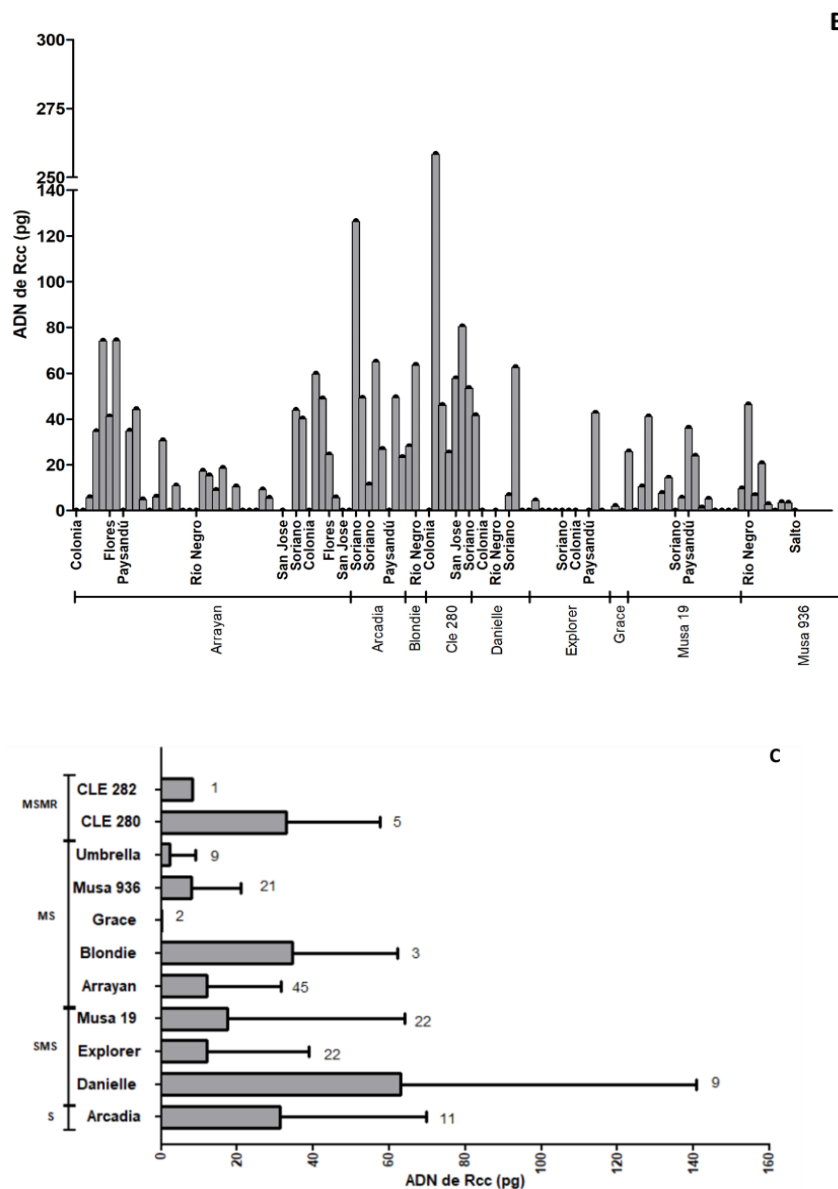


Figura 3. Concentración promedio de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc, pg / 100 ng ADN extraído de semilla) en lotes de semillas de las zafras 2016-2017 (A) y 2017-2018 (B) cuantificadas mediante PCR en tiempo real⁽²³⁾ y clasificadas por variedad de cebada y departamento de la chacra, y por comportamiento sanitario a Rcc (C). Susceptibilidad a Rcc según Castro et al.⁽¹⁵⁾: S: alta; SMS: alto-intermedio-alta; MS: intermedia-alta y MSMR: intermedia-alta-intermedia. El valor al costado de las barras es el número evaluado de cada variedad.

La humedad relativa promedio presentó una correlación positiva con la concentración de ADN de Rcc en semilla en todo el ciclo del cultivo (Cuadro 1). Los mayores niveles de ADN de Rcc están asociados positivamente a la radiación solar y lluvias acumuladas desde Z47 a cosecha. En cambio, la temperatura en el mismo período está relacionada negativamente a la concentración de ADN de Rcc en semilla. Las correlaciones fueron bajas ($r < 0.30$) a pesar de su significancia.

Cuadro 1. Correlación (r , coeficiente de Pearson) entre la concentración de ADN de *Ramularia collo cygni* en los lotes cuantificados mediante PCR en tiempo real⁽²³⁾, obtenidos de las zafas 2016-2017 y 2017-2018 con las variables climáticas en diferentes momentos del ciclo del cultivo de cebada.

Período	Variable $r / \bar{x}$			
	Radiación solar (MJ m^{-2})	Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)	Humedad relativa (%)	Lluvias acumuladas (mm)
Siembra - Z30-32	-0,22* / 686	0,09 / 13	0,28** / 83	0,02 / 228
Z30 - Z47	-0,20* / 413	-0,04 / 15	0,27** / 82	0,06 / 144
Z47 - cosecha	0,24* / 1133	-0,16* / 18	0,26** / 75	0,18* / 155

Media ($\bar{x}$) de cada variable para las dos zafas en estudio. El nivel de significancia fue * $p < 0,05$ y ** $p \leq 0,001$.

2.3.3. Transmisión de Rcc a plántula

En condiciones de campo, detectó ADN de Rcc en las plántulas (Z12) de todos los lotes de semilla evaluados. A los lotes en lo que su concentración estaba por debajo del límite inferior de la curva estándar se les asignó el valor de $<0,128$ pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total. Los lotes evaluados en la zafra 2017-2018 presentaron una concentración que osciló entre $<0,128 - 4,2$ pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total. En cambio, los lotes evaluados en la zafra siguiente su concentración osciló entre $<0,128 - 17$ pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total (Figura 4).

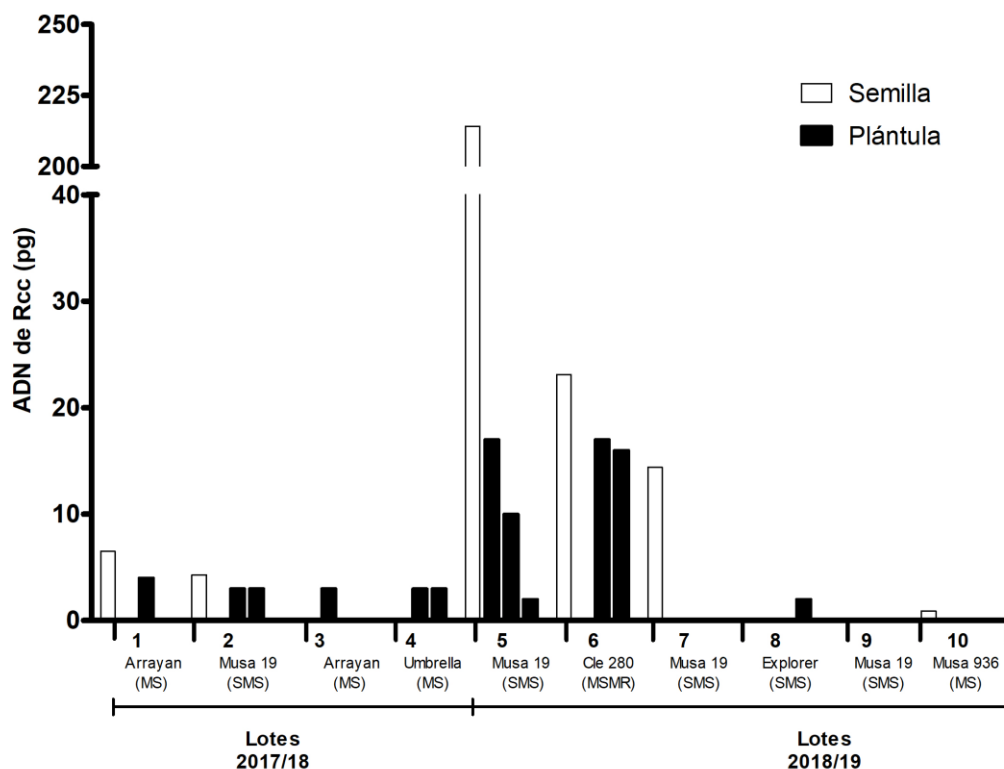


Figura 4. Concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) en cada lote de semillas y en tres muestras de plántulas al momento de dos hojas expandidas (Zadoks 12) en los experimentos de campo, expresado en pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total para cuatro lotes sembrados en la zafra 2017-2018 y seis lotes de la zafra siguiente. Debajo de cada lote se presenta el nombre de la variedad de cebada y su susceptibilidad a ramulariosis según Castro et al.⁽¹⁵⁾ (SMS: alto-intermedio-alta, MS: intermedia-alta y MSMR: intermedia-alta-intermedia).

En los experimentos de campo, se constó la presencia de Rcc en pequeñas manchas de muestras de hojas basales del cultivo en Z30. En la zafra 2017-2018 se detectó la presencia de Rcc mediante la técnica de PCR o cámara húmeda, mientras que en la zafra 2018-2019 se detectó únicamente mediante cámara húmeda porque no se realizó PCR. Estas se observaron mediante microscopía óptica y se lograron identificar estructuras del hongo, como conidióforos característicos emergiendo desde estomas y micelio dispuesto longitudinalmente sobre las nervaduras de la hoja. A pesar de la detección de Rcc y de que

las condiciones ambientales en ambas zafras fueron moderadamente favorables para la enfermedad, no se observaron epidemias de ramulariosis (datos no mostrados).

Se constató una correlación positiva entre la concentración de ADN de Rcc en semilla y en plántula (coeficiente de Pearson r : 0,66; p -valor = 0,0361). A partir de lotes de semilla con valores de ADN de Rcc < 1 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total se obtuvieron concentraciones de ADN de Rcc de $< 0,128$ -3,2 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total en el estadio de plántula (Z12). Los lotes de semilla 3, 4 y 8, a pesar de tener concentraciones < 1 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total en semilla, presentaron concentraciones de ADN superiores en plántulas, mientras que lotes de semilla con > 1 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total en semilla resultaron en niveles de Rcc en plántulas que variaron entre $< 0,128$ y 17 pg (Figura 4).

El comportamiento sanitario de las variedades de cebada utilizadas en este estudio no presentó una clara relación con la concentración de ADN de Rcc en plántula. A pesar de que algunas variedades presentaran una alta susceptibilidad a la enfermedad, como es el caso de Musa 19, la concentración de ADN de Rcc en plántula varió entre y dentro de los años de estudio (Figura 4).

En el experimento de laboratorio, todas las plántulas provenientes de los lotes en estudio fueron asintomáticas al estadio de Z12. Se logró detectar Rcc en todos los lotes evaluados; sin embargo, solo fue posible cuantificar en el lote cinco. Los demás lotes se encontraban por debajo del límite inferior de cuantificación de la curva estándar, por lo que se les asignó el valor de $< 0,128$ pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total. El lote cinco presentó 44 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total en plántulas en el estadio de Z12 y esta concentración fue superior a la obtenida en condiciones de campo.

2.4. Discusión

En este estudio, se validó el método de PCR-TR y se confirmó lo estudiado por Taylor *et al.*⁽²³⁾ y Zamani-Noor⁽⁶⁾, que es posible detectar el ADN de Rcc en semilla y en hojas sin síntomas de ramulariosis. La cuantificación de la concentración de ADN de Rcc de los lotes de semilla de dos zafras de cebada en Uruguay permitió conocer la presencia de lotes con concentraciones de ADN de Rcc que no debieran ser considerados para la siembra según la

clasificación europea⁽²⁴⁾. Además, se confirmó que la concentración de ADN de Rcc en los lotes de semillas fue afectada por las condiciones climáticas durante su producción.

El método de PCR-TR presentó 99,4% eficiencia de amplificación, lo que indica que es válido, ya que los valores de referencia están entre 90% y 110%⁽³²⁾. Con respecto al rango dinámico de la curva $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ a $0,128 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$. La pendiente de la curva estándar (-3,34) indica que la eficiencia de amplificación se encontró dentro del rango de lo esperado. El coeficiente de correlación (0,99) muestra una gran proximidad de ajuste entre la línea de regresión y los puntos Ct individuales de la reacción estándar. Por último, este método no presenta inhibición ya que el desvío estándar está por debajo de 0,5%⁽³³⁾. La fluorescencia generada en presencia de extracto de semilla o plántula es la misma que en presencia de agua, por lo que se trata de un método que podría ser aplicable para la cuantificación de Rcc en dichas matrices. Estos datos concuerdan con Taylor *et al.*⁽²³⁾ y Zamani-Noor⁽⁶⁾.

La implementación de este método de diagnóstico puede contribuir al manejo más eficiente de ramulariosis. Previo a la siembra, podría asistir a definir el uso diferencial de lotes de semilla considerando los valores de referencia mencionados por Oxley y Havis⁽²⁴⁾. Con base en ellos se podrían utilizar lotes que presenten menos de 5 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total como semilla. Lotes con alta carga de ADN de Rcc (>5 pg) podrían utilizarse para otros fines como industria o alimento animal. En el caso de que la concentración de ADN de Rcc en semilla esté entre 1 y 5 pg de ADN de Rcc / 100 ng ADN total, se deberían acoplar otras medidas de manejo para minimizar el riesgo de epidemia de ramulariosis. La concentración de ADN de Rcc en semilla no necesariamente implica una relación directa con el nivel de ramulariosis en tanto hay factores ambientales que favorecen el estrés en el cultivo y este predispone a que se exprese la enfermedad. A pesar de esta relación, hay un desconocimiento de cuales factores son los que desencadenan que Rcc pase de endófito a parásito⁽⁸⁾ pero se sabe que están relacionados con estrés ambiental, por ejemplo: déficit nutricional, anegamiento, déficit nutricional, alternancia de días húmedos y secos entre otros⁽⁸⁾⁽¹³⁾⁽³⁴⁾. Estos hacen que la planta acumule especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Rcc los censa la acumulación de (H_2O_2) y comienza a liberar toxinas, entre ellas Rubelinas D, lo que desencadena la sintomatología típica de la enfermedad⁽²¹⁾.

Una posible medida a integrar al manejo podría ser el uso de fungicidas curasemillas. Actualmente hay trabajos preliminares⁽²⁹⁾⁽³⁵⁾ que indican que el uso de algunos curasemillas conteniendo fluxapiraxad y triticonazol presentaron menor concentración de ADN de Rcc en plántulas en Z12 en relación con el testigo sin curasemillas. Es necesario validar esto a campo y ver si se traduce en una reducción de la infección con Rcc, al menos en etapas iniciales del cultivo. De esta manera, permitiría contar con datos validados de eficiencia de fungicidas curasemilla y poder sumar ese conocimiento al manejo de la enfermedad.

La metodología PCR-TR validada en este trabajo podría ser utilizada como una herramienta para realizar una detección temprana de la enfermedad en cultivos asintomáticos (Z20-30), ya que métodos tradicionales de identificación como la cámara húmeda no son eficientes porque muchas veces Rcc no logra esporular. Además, la técnica permitirá confirmar síntomas confusos de Rcc, que no se pueden diferenciar de agentes abióticos u otros patógenos. En Uruguay, los síntomas pueden aparecer en las hojas senescentes o en las plantas estresadas durante el crecimiento vegetativo⁽⁴⁾, pero los síntomas típicos de la enfermedad generalmente se expresan más adelante en el ciclo del cultivo⁽²⁾⁽⁴⁾.

La detección temprana de Rcc en plántula con la técnica de PCR-TR podrá asistir en la definición del momento óptimo para la aplicación de fungicidas. Debido a que las recomendaciones, hasta el momento, incluyen considerar el control químico en caso de detección y ante pronóstico de condiciones climáticas predisponentes para ramulariosis⁽²⁾⁽¹⁹⁾⁽³⁶⁾. Este método podría evitar aplicaciones preventivas sin tener presente la enfermedad o una aplicación tardía cuando la concentración de ADN de Rcc sea muy elevada. Estas aplicaciones limitan la eficiencia y residualidad del fungicida⁽⁶⁾⁽¹⁹⁾.

La técnica de PCR-TR ayudaría a conocer la concentración de ADN de Rcc asociado a condiciones prevalentes y pronosticadas, lo que representa una herramienta adicional de manejo. Además, esta herramienta podría ser utilizada para estudios epidemiológicos de ramulariosis en Uruguay y la región como los realizados por Havis *et al.*⁽³⁷⁾. También, podría ser aplicada para el control fitosanitario de lotes y evitar la diseminación de Rcc en otros cultivos de cebada y en otras plantas que pueden ser reservorios del patógeno en nuestro país como trigo, avena⁽⁹⁾, centeno, maíz⁽¹¹⁾ o malezas⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾. Esta técnica ayudaría al seguimiento de Rcc en otros hospederos como gramíneas, ya que se ha detectado a Rcc, aunque no se ha observado que cause epidemias.

Otro uso podría ser utilizarla para el estudio del aporte epidemiológico del inóculo de Rcc de los huéspedes alternativos antes mencionados con el desarrollo de ramulariosis. Además, podría utilizarse para el control fitosanitario de semilla de cebada que se exportar del país.

Además, la validación de este método podría asistir en el ajuste de *real-time loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) para la detección de Rcc a campo y poder tomar decisiones de manera inmediata, especialmente útil en situaciones de pronóstico de lluvia, donde, de lo contrario, sería necesario posponer la aplicación de fungicidas. LAMP es una técnica rápida y, fiable de amplificación de secuencias de ADN específicas y de bajo costo en comparación con la técnica PCR-TR⁽³⁸⁾.

A pesar de que una de las limitantes de este estudio es el número de muestras tomadas por zafra, estas presentaron diferente concentración de ADN de Rcc en semillas. Las condiciones climáticas ocurridas en la producción de los lotes de semilla evaluados fueron las que condicionaron la expresión de ramulariosis. Sin embargo, no se observó una relación entre la concentración de ADN de Rcc los lotes evaluados, los sitios de muestreo y las variedades utilizadas. Esto concuerda con trabajos que mencionan que la concentración de ADN de Rcc en semillas varía significativamente de una zafra a la siguiente y de una zona geográfica a otra⁽¹⁴⁾⁽²⁴⁾. Semillas con un mismo nivel de inóculo de Rcc sembradas en diferentes ambientes resultan en diferentes niveles de ramulariosis a campo⁽¹⁸⁾, destacando la importancia de las condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad.

La concentración de ADN de Rcc en semilla cuantificado en este estudio fue similar a la obtenida por Havis *et al.*⁽¹⁴⁾, pero superior a la observada en otros estudios⁽¹⁸⁾. En estudios epidemiológicos reportados por Havis *et al.*⁽¹⁴⁾ no se encontró relación entre la concentración de ADN de Rcc en la semilla y la susceptibilidad del genotipo de cebada. Al momento no se ha reportado resistencia genética total a ramulariosis en cebada⁽²⁾⁽²²⁾. Sin embargo, hay reportes de comportamiento diferencial de variedades frente a ramulariosis cuando el cultivo se encuentra bajo estrés hídrico por déficit⁽¹³⁾. En otros estudios se observaron algunas interacciones específicas entre genotipo de cebada y ambiente, en el desarrollo y propagación de Rcc en diferentes cultivares de cebada de invierno⁽²²⁾.

En este estudio, la humedad relativa presentó un efecto positivo en la concentración de ADN de Rcc en semilla en todo el ciclo del cultivo. Havis *et al.*⁽³⁹⁾ mencionan que la humedad

relativa juega un rol fundamental en las epidemias de ramulariosis. Hay una correlación positiva entre la humedad relativa en los estadios iniciales del cultivo (Z30-31) y el nivel de ramulariosis a campo⁽²⁷⁾. Esto concuerda con Havis *et al.*⁽⁷⁾, que mencionan que la humedad en superficie es determinante de la liberación de esporas de Rcc, lo que generaría infecciones secundarias.

Por otro lado, la cantidad de lluvia acumulada y la radiación solar en el período desde Z47 a cosecha resultaron en las mayores concentraciones de ADN de Rcc en la semilla cosechada. La expresión de ramulariosis estuvo relacionada con los días de lluvia luego de emergidas las espigas del cultivo⁽²²⁾. Por otra parte, la intensidad de la luz puede tener un rol adicional en la severidad de ramulariosis⁽³⁴⁾.

En cambio, la temperatura en el mismo período se correlaciona levemente de forma negativa, en concordancia con Mařík *et al.*⁽²²⁾, quienes mencionan que pocos días con lluvias y altas temperaturas no son favorables para el desarrollo de ramulariosis. Las condiciones climáticas desde Z47 a fin del ciclo de la cebada condicionan la concentración de ADN de Rcc en semilla, por lo que se hace un llamado de atención al sector para evaluar la concentración de ADN de Rcc de lotes provenientes de esas condiciones.

En este estudio, se demostró el pasaje de Rcc desde semilla a plántula mediante la cuantificación de ADN de Rcc en concordancia con otros autores⁽⁶⁾⁽¹⁴⁾. Sin embargo, independientemente de la concentración de ADN de Rcc en semilla se observaron diferentes transmisiones de Rcc a plántula. Incluso hay semillas que sembradas a campo presentaron mayor concentración de ADN de Rcc en las plántulas obtenidas en el estadio Z12. Esta variación podría atribuirse a la presencia de inóculo externo, como mencionan en su trabajo Havis *et al.*⁽¹⁴⁾ y Nyman⁽⁴⁰⁾. Esto sugiere que se deben realizar estudios más exhaustivos y con mayor número de repeticiones para determinar la eficiencia de transmisión de Rcc a plántula.

Si bien se constató transmisión de Rcc desde semillas a plántulas en Z12, no se observaron síntomas de la enfermedad ni a campo ni en condiciones controladas. Estos resultados concuerdan con estudios previos en semilla, que indican que Rcc puede ser transmitido de una generación de semillas a la siguiente sin manifestar síntomas de la enfermedad⁽¹⁴⁾⁽¹⁸⁾.

En los experimentos de campo en Z30 se logró detectar Rcc en hojas con manchas foliares con síntomas asociados a ramulariosis, pero luego no se observó epidemia en ninguna de las parcelas. La detección de Rcc en el cultivo no indica necesariamente una epidemia⁽⁷⁾. Rcc se comporta como un endófito; sin embargo, bajo condiciones de estrés, puede transformarse en un patógeno⁽⁸⁾⁽²¹⁾.

2.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo brindan una herramienta molecular para la toma de decisiones en el manejo de ramulariosis. La validación de la técnica PCR-TR provee una metodología rápida, precisa y segura de detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula que podrá ser adoptada por los laboratorios de análisis de semilla privados o gubernamentales como el Instituto Nacional de Semillas. Esta técnica permitirá realizar un *screening* de los lotes de semilla, facilitar la selección de lotes a sembrar y reducir así el inóculo inicial de Rcc en el cultivo. Además, en las etapas iniciales del cultivo asistirá a la detección y diagnóstico temprano de la enfermedad. La detección temprana de Rcc en el ciclo del cultivo contribuirá a controlar de forma más eficiente la tasa de desarrollo de ramulariosis y, por consiguiente, en la concentración final de ADN de Rcc en la semilla.

La variabilidad en la concentración de ADN de Rcc de los lotes evaluados en este estudio remarcan la importancia de cuantificar la carga fúngica de la semilla antes de la siembra. La siembra de lotes de semilla con una concentración de ADN de Rcc inferior a 5 pg ayudará a reducir la diseminación de la enfermedad en nuevas regiones y contribuirá a un menor desarrollo de ramulariosis, dado que está fuertemente condicionado por el ambiente.

Agradecimientos

Agradecemos a ANII, al fondo María Viñas 2017_1_136660 por la financiación, y al Dr. A. Casal, la Lic. A. Arruabarrena y la Dra. G. Garmendia por el apoyo técnico recibido. Además, a los ingenieros agrónomos E. Suárez y N. Vivían por la asistencia en actividades de campo o laboratorio.

Transparency of data

Available data: The entire data set that supports the results of this study was published in the article itself.

Author contribution statement

Cintia Palladino: Conceptualization; Methodology; Investigation; Writing – original draft

Carlos A. Pérez: Conceptualization; Methodology; Writing – review & editing

Silvia Pereyra: Conceptualization; Methodology; Writing – review & editing

2.6. Referencias

- (1). Sutton B, Waller J. Taxonomy of *Ophicladium hordei* causing leaf lesions on Triticale and other Graminae. Trans Br Mycol Soc.1988;90:55-61.
- (2). Havis ND, Brown JK, Clemente G, Frei P, Jedryczka M, Kaczmarek J, Matušinsky P, McGrann GR, Pereyra S, Piotrowska M, Sghyer H, Tellier A, Hess M. *Ramularia collo-cygni*: an emerging pathogen of barley crops. Phytopathol. 2015;105:895-904. Doi: 10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI.
- (3). Walters D, Havis ND, Oxley S. *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. FEMS Microbiol. Lett. 2007;279:1-7. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x
- (4). Pereyra S. Herramientas disponibles para el manejo de dos enfermedades relevantes de la pasada zafra: fusariosis de la espiga en trigo y Ramulariosis en cebada. In: Jornada de Cultivos de Invierno: herramientas para un manejo inteligente de trigos y cebadas. Montevideo: INIA; 2013. pp. 33-41.
- (5). Oficina de Programación y Política Agropecuaria-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo: OPYPA-MGAP. Resultados de la Encuesta Agrícola Nacional [cited 2021 Mar 11]. Available from: www.mgap.gub.uy/opypa
- (6). Zamani-Noor N. Studies on ramularia leaf spots on barley- resistance phenotyping, epidemiology and pathogenicity [doctoral's thesis]. Göttingen (DE): Georg-August-University Göttingen, Faculty of Agricultural Sciences; 2011. 146 p. Doi: 10.53846/goediss-4115

- (7). Havis ND, Kaczmarek J, Jedryczka M, Hess M, Fang Z. Spore dispersal patterns of the ascomycete fungus *Ramularia collo-cygni* and their influence on disease epidemics. *Aerobiologia*, 2023;39:105-18. Doi: 10.1007/s10453-022-09778-z.
- (8). Kaczmarek M, Piotrowska MJ, Fountaine JM, Gorniak K, McGrann GRD, Armstrong A, Wright KM, Newton AC, Havis ND. Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of ramularia leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. *Plant Pathol.* 2016;66:45-55. Doi: 10.1111/ppa.12552.
- (9). Frei P, Gindro K. *Ramularia collo-cygni* – un nouveau champignon pathogène de l'orge. *Agrarforschung Schweiz.* 2015;6(5):210–217.
- (10). Peraldi A, Griffe LL, Burt C, McGrann GRD, Nicholson P. *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathol.* 2014;63:544-62. Doi: 10.1111/ppa.12114
- (11). Huss H. The biology of *Ramularia collo-cygni*. En: Yahyaoui AH, Brader L, Tekauz A, Wallwork H, Steffenson B, editores. Meeting the Challenges of Barley Blights. Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights; pp. 321-328. ICARDA, Aleppo, Syria; abril de 2002.
- (12). Sprague R. Diseases of cereals and grasses in North America. New York: Ronald Press Company; 1950. 538p.
- (13). Hoheneder F, Groth J, Herz M, Hückelhoven R. Artificially applied late-terminal drought stress in the field differentially affects *Ramularia* leaf spot disease in winter barley. *J Plant Dis Prot.* 2023;130:1357-70. Doi: 10.1007/s41348-023-00790-0.
- (14). Havis ND, Nyman M, Oxley S. Evidence for seed transmission and asymptomatic growth of *Ramularia collo-cygni* in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Pathol.* 2014;63:929-936. Doi: 10.1111/ppa.12162
- (15). Castro M, Pereyra S, German S. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera de los tres últimos años: período 2018-2019-2020. La Estanzuela: INIA, 2021 [cited 2023 Dec 18]. 79p. Available from: http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2020/JornadaInvierno2020.pdf

- (16). Brown J, Makepeace J. The effect of genetic variation in barley on responses to *Ramularia collo-cygni*. *Asp. Appl. Biol.* 2009;92:43-47.
- (17). Leistrumaite A, Liatukas Z. Resistance of spring barley cultivars to the new disease *Ramularia* leaf spot, caused by *Ramularia collo-cygni*. *Agron. Res.* 2006;4:251—255.
- (18). Matušinsky P, Svobodova-Leisova L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V, Vysohlidova M, Spiter T. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to Qol fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. *J Plant Dis Prot.* 2010;117(6):248-52. Doi: 10.1007/BF03356369.
- (19). Pereyra S, Pérez C. Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. *Rev Cangüé.* 2017;38:13-8.
- (20). McGrann GRD, Havis ND. *Ramularia* leaf spot: A newly important threat to barley production. *Outlooks on Pest Manag.* 2017;28:65-70. Doi: 10.1564/v28_apr_05
- (21). McGrann GRD, Brown JKM. The role of reactive oxygen in the development of *Ramularia* leaf spot disease in barley seedlings. *Ann Bot.* 2018;121(3):415-30. Doi: 10.1093/aob/mcx170.
- (22). Marik P, Snejdar Z, Matušinsky P. Expression of resistance to *Ramularia* leaf spot in winter barley cultivars grown in conditions of the Czech Republic. *Czech J Genet Plant Breed.* 2011;47:37-40. Doi: 10.17221/34/2010-CJGPB.
- (23). Taylor J, Paterson L, Havis N. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). *Lett Appl Microbiol.* 2010;50:493-99.
- (24). Oxley SJP, Havis ND. Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting, HGCA Project Rep. 463. 2010 Nov 10. Available from: www.hgca.com/media/267653/pr463.pdf
- (25). Cerda-Granados D, Díaz V. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro.* 2013;94:82-92. Doi: 10.5377/encuentro.v0i94.1089.
- (26). Arruabarrena A, Benítez-Galeano MJ, Giambiasi M, Bertalmío A, Colina R, Hernández-Rodríguez L. Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *J Virol Methods.* 2016;237:14-17. Doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.011

- (27). CIMMYT. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. (Third Edition). 2005. Available from: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1333/91195.pdf>
- (28). Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 1974;14:415-21.
- (29). Salamati S, Reitan L. *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. En: Proceedings 1st European Ramularia Workshop; p. 19. Georg-August-Univ. 2006.
- (30). Clemente G, Quintana S, Aguirre N, Rosso A, Cordi N, Havis ND. State of art of *Ramularia collo-cygni* (leaf spot of barley) in Argentina and detection and quantification of *R. collo-cygni* by real-time PCR in barley plantlets and seeds treated with fungicide. En: Proceeding of the 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology; p. 116. University of Agriculture in Krakow. 2014.
- (31). Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [Internet]. Version 2020. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2020 [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://bit.ly/3dDvlyu>.
- (32). Rebrikov DV, Trofimov DY. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Appl Biochem Microbiol.* 2006;42(5):455-463. Doi: 10.1134/S0003683806050024
- (33). Lance, R.F.; Guan X. Variation in Inhibitor Effects on qPCR Assays and Implications for eDNA Surveys Environmental Laboratory; 2021 [cited 2023 Dec 1]. Available from: <https://erdc-library.erdcdren.mil/jspui/bitstream/11681/41740/1/ERDC-EL%20MP-21-9.pdf>
- (34). Makepeace JC, Havis ND, Burke JI, Oxley SPJ, Brown JKM. A method of inoculating barley seedlings with *Ramularia collo-cygni*. *Plant Pathol.* 2008;57(6):991-999. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01892.x
- (35). Vivian N, Pérez CA, Pereyra SA, Palladino C. Optimizando la evaluación de curasemillas para el control de *Ramularia collo-cygni* en cebada mediante técnicas moleculares. *Rev Cangüé.* 2020;43:7-13.
- (36). Erreguerena IA, Carpaneto B, Couretot L, Faberi AJ, Gonzalez G, Montoya MRA, Moreyra F, Samoiloff A, Storm A, Gimenez F. Red de protección de cebada cervecera: Campana 2020/2021. 2021 Nov 11. Available from: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9436>

- (37). Havis ND, Oxley S, Piper S, Langrell S. Rapid nested PCR –based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. FEMS Microbiol Lett. 2006;256:217-23.
- (38). Okiro LA, Tancos MA, Nyanjom SG, Smart CD, Parker ML. Comparative evaluation of LAMP, qPCR, conventional PCR, and ELISA to detect *Ralstonia solanacearum* in Kenyan potato fields. Plant Dis. 2019;103(5):959-965. Doi: 10.1094/PDIS-03-18-0489-RE
- (39). Havis ND, Oxley SJP, Burnett FJ. Advance in control of *Ramularia collo-cygni*. In: Proceedings Crop Protection in Northern Britain. 2012; pp. 111-124.
- (40). Nyman M. Evaluating the Importance of a Seed Borne Stage in the Life Cycle of the Barley Pathogen *Ramularia collo-cygni*. [Tesis de maestría]. Universidad de Edimburgo. 2009.

3. Application of a straightforward methodology by LC-QqQ-MS/MS and GC-MS to ensure food safety of barley and wheat grain

Cintia Palladino, Agustina Muela, Belén Taborda, Florencia Puigvert, Andrés Pérez-Parada, Marcos Colazzo, Carlos A. Pérez, Silvia A. Pereyra, Lucia Pareja. *ACS Agricultural Science and Technology*. 2022;2(2):371–380.

Resumen

Se optimizó y validó una metodología multiresiduo para determinar deoxinivalenol, zearalenona y 13 fungicidas ampliamente utilizados para controlar las principales enfermedades en los cultivos de cebada y trigo. Se compararon tres métodos QuEChERS en términos de recuperación y repetibilidad. Las recuperaciones del método validado se situaron en el rango de 67-128% para los compuestos seleccionados y las desviaciones estándar relativas fueron inferiores al 20% según el documento SANTE No. 12682/2019. Los límites de cuantificación (LOQs) estaban entre 10 y 100 µg kg⁻¹. El método se aplicó para el análisis de granos de cebada y trigo obtenidos en condiciones experimentales de campo. Estas muestras contenían micotoxinas y residuos de fungicidas en concentraciones inferiores a los LOQs, excepto carbendazim en el trigo, que excedía los niveles máximos de residuos del *Codex*. Los resultados de este estudio proporcionan una herramienta analítica rápida y sencilla para evaluar la inocuidad en la producción de los granos e identificar posibles riesgos para la salud humana.

Palabras claves: *cereales, inocuidad de los alimentos, micotoxinas, residuos de fungicidas, técnicas cromatográficas.*

Abstract

A multiclass methodology to determine deoxynivalenol, zearalenone, and 13 widely used fungicides to control the main diseases in barley and wheat crops was optimized and validated. Three QuEChERS methods were compared in terms of recovery and repeatability. The recoveries of the validated method were in the 67–128% range for the selected compounds

and relative standard deviations were below 20% according to Document SANTE No. 12682/2019. The limits of quantification (LOQs) were between 10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method was applied for the analysis of barley and wheat grains obtained under production conditions. These samples contained mycotoxins and fungicide residues at concentrations below the LOQs, except for carbendazim in wheat, which exceeded the *Codex* maximum residue levels. The results of this study provide a fast and simple analytical tool to evaluate the primary production of these grains and to identify possible risks to human health.

Keywords: *cereals, food safety, mycotoxins, fungicide residues, hyphenated chromatographic techniques*

3.1. Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) are two of the most important cereal crops worldwide. These crops are susceptible to several pathogens, especially fungi. Leaf spots and head diseases cause significant economic losses in these crops.¹ In barley, Ramularia leaf spot (RLS) caused by the fungus *Ramularia collo-cygni*² is one of the most economically relevant foliar diseases.³ RLS causes losses of up to 70% of the grain yield potential through a significant decrease in grain size and quality. Chemical control of RLS depends on the pathogen's detection and the predictions of risk disease before crop flowering.⁴ In the last decades, different mixtures including triazoles (prothioconazole or epoxiconazole) with strobilurins (mainly azoxystrobin) and multisite fungicides like chlorothalonil are used. Triazoles with strobilurins and succinate dehydrogenase inhibitors such as fluxapyroxad or isopyrazam have also been recommended worldwide.^{3,5}

Nowadays, there have been reports of resistance to the major groups of fungicides used to control RLS.⁶⁻⁹ In addition, until 2020, RLS control with fungicides in Europe, heavily relied on chlorothalonil.⁴ However, the European Union (EU), in May 2020, banned this active ingredient, and therefore new management alternatives are considered.¹⁰

Additionally, *Fusarium* head blight (FHB), caused by *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zeae* (Schwein) Petch) is a devastating disease that leads to extensive grain yield and quality losses in wheat and barley production.^{11,12} FHB may lead to the

presence of mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN), in the final product, resulting in a threat to human and animal health.¹³

The best strategy for the control of FHB is an integrated use of moderately resistant cultivars with a preventive application of fungicides at anthesis (Zadoks growth stage scale GS 61^{4,14-5}) based on weather forecasts or prediction systems.¹⁴ Different studies report that metconazole and prothioconazole are the most effective fungicides to reduce FHB incidence and DON accumulation.¹⁶ Fungicide treatments containing mixtures with strobilurins have been demonstrated to produce DON levels in the grain similar to the nonapplied treatments.^{17,18}

Inappropriate use of fungicides to control wheat and barley diseases may have a negative impact on food safety due to the presence of fungicide residues and/or mycotoxins. Therefore, safety issues in agricultural products and subproducts have emerged as serious constraints to producers and consumers. In addition, due to the increased regulation of markets, food industries demand fast and cheap analysis technologies for different food contaminants. To accomplish the different requirements of grain quality, the development of multiresidue methodologies for the simultaneous determination of different types of organic contaminants is the best option to ensure food safety.¹⁹ The most widely employed techniques are QuEChERS, miniaturized ethyl acetate (SweEt), and mini-Luke methods combined with gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry.¹⁹⁻²² These methods are characterized by the use of a low amount of samples, reagents, and solvents, making them straightforward and environmentally friendly.^{19,21,23}

Although there are reports of multiresidue methodologies for simultaneous determination of a wide number of pesticides and mycotoxins in cereals,²⁴⁻²⁶ few of them are fit for purpose as the technological package used in each region depends on the cultivar susceptibility, weather conditions, and susceptibility of the pathogen population. Therefore, the objective of this study was to optimize and validate an easy and cheap method for the simultaneous analysis of two mycotoxins and 13 widely used fungicides in barley and wheat grain obtained in a field experiment under the fungicide application strategies used in Uruguay. Moreover, evaluating the compliance of each management strategy with the maximum residue levels (MRLs) to ensure food safety was also the aim.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Selection of Compounds

Thirteen of the most common fungicides used to control RLS and FHB were used in this study: azoxystrobin, carbendazim, chlorothalonil, cyproconazole, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, metconazole, prothioconazole, pyraclostrobin, tebuconazole, trifloxystrobin, and triticonazole.^{3,15} In addition, the two most relevant FHB-related mycotoxins (deoxynivalenol and zearalenone) in terms of their occurrence and human and animal risk health were included.²⁷

3.2.2. Chemicals and Materials

Standard fungicides (azoxystrobin, carbendazim, chlorothalonil, cyproconazole, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, metconazole, prothioconazole, pyraclostrobin, tebuconazole, trifloxystrobin, and triticonazole) were purchased from HPC Standards (Bosdorf, Germany). Standard mycotoxins (DON and ZEN) were obtained from Fermentek (Jerusalem, Israel). The purity of all the standards was higher than 98%.

Acetonitrile (MeCN), ethyl acetate (EtAc), methanol (MeOH), and formic acid (98–100%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate and formate were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Sodium chloride (NaCl), anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄), sodium citrate tribasic dehydrate (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O), and sodium citrate dibasic sesquihydrate (C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O) were from Scharlab (Barcelona, Spain). Deionized water was purified by a Direct-Q3 ultrapure water system from Millipore (Billerica, MA).

Individual stock standard solutions (1000 mg L⁻¹) were prepared in pure MeOH or MeCN and stored at -18 °C. Working standard mixtures (1 and 10 mg L⁻¹) were prepared and used as spiking solutions and for matrix-matched calibration curves.

3.2.3. Apparatus and Analytical Conditions

A hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (4000 QTRAP LC-MS/MS, SCIEX Instruments, Foster City, CA) was used for the analysis of the LC amenable compounds. The system was equipped with a Turbo V ion source operating in both positive and negative

electrospray (ESI) ionization modes. Chromatographic separation was carried out using an LC system (Agilent Series 1200) provided with a ZORBAX Eclipse XDB-C-18 150 length $\times$ 4.5 mm i.d. and 5 μ m particle size column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) at 25 °C.

The mobile phase consisted of 0.1% acetic acid and 5 mM ammonium acetate in water (solvent A) and 5 mM ammonium acetate in MeOH/H₂O/acetic acid (95:4.9:0.1, v/v) (solvent B). The initial gradient conditions were set to 10% of solvent B held for 1 min before incorporating a linear gradient increasing to 100% B at 8 min during 5 min. At 13 min, a linear gradient decreasing to 10% B was programmed for 15 min. Finally, the initial conditions were maintained for 4 min (total run times for both modes were 19 min). The injection volume was 5 μ L and the flow rate was kept constant at 0.6 mL min⁻¹ in both modes.

The ionization voltage was 5500/-4500 V for the positive and negative ionization modes, the nebulizer gas was synthetic air at 50 psi, and the curtain gas was nitrogen at 20 psi. The solvent evaporation was assisted in the source by a drying gas (heated synthetic air at 500 °C). The analyzed parameters, declustering potential (DP), entrance potentials (EP) for precursor ions, and collision energy (CE) for product ions, were obtained by manual optimization by infusion of a 100 μ g L⁻¹ solution of each compound separately. For all of the compounds, the protonated molecular ion [M + H]⁺ was the most abundant in the positive mode, and so it was chosen as the precursor ion. For the negative mode, prothioconazole presented the deprotonated molecular ion [M - H]⁻, while DON presented the acetate adduct (Table 1). Scheduled MRM was used as an algorithm for the analysis, so there was no need to set the dwell time for each transition. Analyst software v 1.7 (SCIEX) was used for data acquisition and processing.

Table 1. Precursor and Product Ions, Ion Ratios, Retention Times, and Mass Spectrometry Parameters of the Selected Compounds Optimized in LC-QqQ-MS/MS*

compound name	precursor ion	product ion	ion ratio ^a barley	ion ratio ^a wheat	tR ^b (min)	DP ^c (V)	EP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)
azoxystrobin	404.1	344 372.1	0.15	0.16	11.5	72	10	31 19	10 10
carbendazim	192.2	132 160.1	0.15	0.19	9.9	56	10	43 25	22 10
cyproconazole	292.1	125.1 70.2	0.42	0.34	11.94	16	10	35 35	10 10
epoxiconazole	330.1	101.2 121.3	0.16	0.22	12.3	36	10	63 27	10 10
fluxapyroxad	382.3	362 342.3	0.5	0.71	11.4	70	10	20.08 30.82	20.7 18
isopyrazam	360.3	244.3 340.2	0.95	0.99	13	88	9.8	32.2 20	12.4 17.7
metconazole	320.1	125.1 70	0.3	0.33	12.5	31 36	10 10	53 55	8 12
pyraclostrobin	388.1	163.1 194.2	0.37	0.45	12.8	67	10	39 17	10 10
tebuconazole	308.1	125 70.3	0.13	0.1	12.3	85	10	45 40	10 10
trifloxystrobin	409.3	206.1 186	0.45	0.47	12.9	50	10	18 22	10 15
triticonazole	318.2	125.1 70	0.04	0.05	12.2	66	10	53 33	10 12
zearalenone	319.2	283.1 301	0.72	0.75	12.2	71.5	5.8	16.18 13.92	15.4 17
deoxynivalenol	355	295.3 59	0.33	0.37	7.78	-40	-3	-14.9 -48	-4 -7
prothioconazole	342	124.7 99.7	0.81	0.92	12.47	-89	-10	-36 -34	-19 -15

*Bold letters represent the compounds analyzed by LC-QqQ-MS/MS in the negative mode.

The first transition was used for identification and the second one for quantification. ^aSRM: selected reaction monitoring. ^btR: retention time. ^cDP: declustering potential. ^dEP: entrance potential. ^eCE: collision energy. ^fCXP: collision cell exit potential

Chlorothalonil analysis was performed on Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 7890 with a 5977B MS system equipped with an HP5-MS column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m) and operated under a negative chemical ionization (NCI) mode. Helium was used as a carrier gas at a constant flow of 1 mL min⁻¹. Methane gas with a purity of 99.999% or higher was used as a reaction gas. Default values of 40% methane flow rate and filament current were set. The GC oven temperature program was as follows: 90 °C for 1 min, raised to 300 °C at a rate of 20 °C min⁻¹, and held for 5 min. The injection temperature of the port and transfer line was 250 °C. Splitless injection volume was 1 μ L with a solvent delay time of 5 min. The ion source temperature was 150 °C; the MS quadrupole temperature was 150 °C; the electron multiplier voltage was 1800 V; and the ion source energy was 70 eV. The analysis was performed in the selected ion monitoring (SIM) mode looking for *m/z* 266 for quantification, while 264 and 268 for confirmation purposes, with the dwell time of 50 ms. The retention time obtained under these conditions was 13.12 min and the ion ratio were 0.82 and 0.50 for the 264/266 and 268/ 266, respectively.

3.2.4. Identification Requirements of Compounds

The identification of the analytes was carried out based on the ion ratio and the retention times recommended by SANTE guidelines. LC-QqQ-MS/MS confirmation was performed by acquiring two MS/MS transitions. The most abundant were selected for quantification, while the others were used for confirmation purposes. For GC-MS, the confirmation of chlorothalonil was made by the selection of three ions. The most intense was selected for quantification, while the two others were used for confirmation. The compliance with the ion ratio from the sample extracts was checked to be within $\pm 30\%$ (relative) of the average of calibration standards from the same sequence (Table1).^{28,29}

3.2.5. Field Experimental Layout

3.2.5.1. Barley

The trial was carried out in the northwest of Uruguay (33°02'S, 57°24'W) using the cultivar RLS moderately susceptible cultivar Arcadia during one growing season (2016). Before experiment establishment, *R. collo- cygni* presence was confirmed by a microscope in the laboratory. The experiment was a randomized complete block design with four replicates.

Each replicate consisted of 3 m × 5 m plots in a total area of 15 m². Fungicide treatments included different commercial mixtures of active ingredients in the recommended doses applied at Zadoks growth stages scale,¹⁴ GS 33 (stem elongation) and GS 47 (awns appearance). Five chemical treatments and one control (without fungicides) were performed (Table S1 in the Supporting Information). Foliar treatments were applied using a CO₂-pressurized backpack sprayer (D201 S, Spraytec, Argentina) equipped with a four- nozzle flat fan (TeeJet 11002). The application volume was 115 L ha⁻¹.

3.2.5.2. Wheat

The experiment was carried out in the northwest of Uruguay (32°22'S, 58°03'W) in 2016 using Baguette 9 (FHB susceptible cultivar) and Fuste (FHB resistant cultivar) varieties. The experimental design was a complete block randomized with four replicates. Each experimental unit was 1.5 m × 5 m (7.5 m²) area. Fungicide treatments included different commercial mixtures of active ingredients in the recommended doses applied at Zadoks growth stages¹⁴ GS 61 (beginning of flowering) and GS 65 (mid-flowering). In total, three treatments and one control without fungicides were assayed (Table S2 in the Supporting Information). Fungicides were applied using a manual backpack sprayer (Jacto HD, Jacto Uruguay) equipped with two TwinJet nozzles (TwinJet 060) at 110 L ha⁻¹.

3.2.5.3. Experiment Assessment

Barley and wheat samples were obtained from the field experiments and analyzed with the validated method to check the compliance with the EU and *Codex* MRLs and ensure grain safety.^{30–33}

3.2.6. Sample Collection and Processing

Wheat grain was harvested from all of the experimental plots, whereas barley grain samples were collected in four central rows of each plot, both at the end of the crop cycle and considering the preharvest intervals recommended by each commercial fungicide. Once in the laboratory, a representative 1 kg of each sample (15% moisture) was ground in IKA-WERKE model M20 (Wilmington) to obtain flour and stored in a freezer at -80 °C until analysis. Before the analysis, a subsample was obtained by the quartering sampling method to get around 2.0

g of the sample following the European Union recommendations.²⁹ A total of 24 and 16 samples were obtained from the barley and wheat experiments, respectively. The total number of analyses for the determination of fungicide residues in the samples varied, depending on the fungicide treatment carried out in each plot.

3.2.7. Method Comparison

For the analysis of the studied compounds, three different methods were compared in terms of recovery percentage and relative standard deviation at 100 µg kg⁻¹ by quintuplicate for nine fungicides (azoxystrobin, carbendazim, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, prothioconazole, pyraclostrobin, trifloxystrobin, and triticonazole) and two mycotoxins (DON and ZEN) in the barley matrix (Figure 1). Method 1 was based on a simple dilute and shoot procedure with MeCN/H₂O/formic acid (80:19:1; v/v) mixture.^{26–34} Methods 2 and 3 used the same extraction mixture as Method 1, followed by a salting-out step with citrate salts. In the case of Method 3, an additional clean-up step was performed.^{35–37}

3.2.7.1. Sample Preparation

Method 1 (M1): 10 mL of the MeCN/H₂O/formic acid (80:19:1, v/v) mixture was added to 2 g of the barley sample. The tubes were shaken for 2 min and subsequently centrifuged for 5 min at 3500 rpm. An aliquot of the supernatant was filtered through a 0.22 µm poly (vinylidene difluoride) (PVDF) filter and transferred into a 2 mL vial for LC-QqQ-MS/MS analysis. For GC-MS, a 3 mL extract was concentrated to dryness and dissolved in 0.1 mL of EtAc for analysis.

Method 2 (M2): 10 mL of the MeCN/H₂O/formic acid (80:19:1, v/v) mixture was added to 2.0 g of barley flour. The tubes were shaken for 1 min. Afterward, anhydrous MgSO₄ (3.6 g), NaCl (0.9 g), C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (0.9 g), and C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O (0.45 g) were added. Next, tubes were hand-shaken for 3 min and then immediately horizontally shaken in an orbital shaker at 250 rpm for 15 min. Then, they were centrifuged for 5 min at 3500 rpm. The vials for the analysis in LC-QqQ-MS/MS and GC-MS were prepared as M1.

Method 3 (M3): same extraction method as M2, but after the centrifugation, a 4 mL aliquot was cleaned-up with 10 mg of C18 and 600 mg of anhydrous MgSO₄. The vials for analysis in LC-QqQ-MS/MS and GC-MS were prepared as M1.

3.2.8. Method Performance and Validation

The method that presented the best performance was selected for validation in wheat and barley matrix and expanded to the analysis of four other widely used fungicides in cereal crops (chorothalonil, cyproconazole, metconazole, and tebuconazole). Finally, 13 fungicides and two mycotoxins were validated with the selected method at different concentration levels for both matrices following Document SANTE No. 12682/2019 and No. 12089/2016 criteria.^{28,29} Parameters used for validation included trueness (expressed as a percentage of recovery, %Rec), precision (repeatability, RSD_r, and reproducibility, RSD_{WR}), the limit of quantification (LOQ), linearity evaluation through solvent and matrix-matched calibrations, and matrix effect.

Recovery percentages were evaluated by comparing the real concentration of each compound measured by performing the selected method with spiked blank samples at different concentration levels; 10, 100, and 1000 µg kg⁻¹ for barley and 10, 100, 250, and 1000 µg kg⁻¹ for wheat. The 10 µg kg⁻¹ level was chosen based on EU legislation,³⁸ which is the most restrictive regulation, whereas the other spiking levels comply with the criteria of selecting the 2–10× targeted LOQ or the MRL.²⁸ Intraday precision (RSD_r) was evaluated at different fortification levels in five replicates for each concentration.

Interday precision (RSD_{WR}) was assayed by two analysts on different days at the spike levels. The RSD_r and RSD_{WR} were evaluated by calculating the relative standard deviation (%RSD) for different concentrations.

Solvent and matrix-matched calibration curves were used for linearity evaluation. Residual percentages expressed as the deviation of back-calculated concentrations of the calibration standards from the true concentrations (BCC) $\leq \pm 20\%$ were considered acceptable.

Matrix effects (%EM) were determined for each compound based on the slopes of the calibration curves obtained from standard solutions prepared in blank extract (wheat and barley) and in solvent as described in equation 1.²⁸ LOQs were established as the lowest concentration tested that provided acceptable recoveries (70–120%) and precision (RSD_{WR} $\leq 20\%$).

$$\% EM = \left[\frac{\text{slope standard in matrix}}{\text{slope standard in solvent}} - 1 \right] \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

The uncertainty of the method was calculated with the intra-laboratory quality control data (%Rec and RSD_{WR}), for the two matrices individually, considering the concentration range validated (LOQ-1000 µg kg⁻¹). A coverage factor (k)= 2 was used to calculate the expanded uncertainty (U') (Equation 2).

$$U' = k \times u' \quad (\text{Equation 2}).$$

$$u' = \sqrt{\text{mean}^2_{\text{bias}} + \text{SD.P}^2_{\text{bias}} + \text{RSD}_{\text{WR}}^2}$$

$$\text{Mean bias} = \frac{\text{mean of (measured concentration - spiked concentration)}}{\text{spiked concentration for each of the target analyte}} \times 100$$

SD.P_{bias}: the population standard deviation of the relative bias

3.3. Results and discussion

3.3.1. Method comparison

The selection of the methods to be compared was based on previous reported QuEChERS methodologies^{26,34-37,39}. Firstly, as some works described the use of different solvent mixtures during the extraction, the type of solvent was changed from the original QuEChERS version, choosing a mixture of ACN:H₂O:formic acid.^{26,34,39}

Secondly, the addition of citrate salts for the salting-out step was evaluated with and without clean-up (M2 and M3) based on reports that describe that citrate buffer offers an adequate pH for the extraction of polar substances as DON and ZEN mycotoxins,^{37,40} The use of primary and secondary amine sorbent (PSA) in the clean-up step of M3, was avoided as several reports describe that in QuEChERS procedure the use of PSA is the most critical step for chlorothalonil losses as it causes a considerable pH increment.⁴¹ However, the C18 was included as it is a good option when dealing with matrices that present a high amount of lipophilic compounds.^{35, 40}

The recovery results showed that M1 and M2 presented an acceptable performance for the nine analyzed fungicides (azoxystrobin, carbendazim, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, prothioconazole, pyraclostrobin, trifloxystrobin, and triticonazole) and both

mycotoxins. M3 presented good results for all the compounds except for pyraclostrobin and trifloxystrobin which showed recoveries out of the acceptable range (higher than 120%, Figure 1). Therefore, it was discarded for validation.

Despite the fact M1 is faster than M2, because it avoids the salting out step, allowing the analysis of a high number of samples per day and reducing the cost of analysis, M2 was selected for validation as the recovery average was 102% versus 92% of M1. Also, the pH obtained using the citrate buffer salts would be a nice solution when enlarging the scope of the method to other commonly used pesticides or other types of crops ^{35-36, 39}.

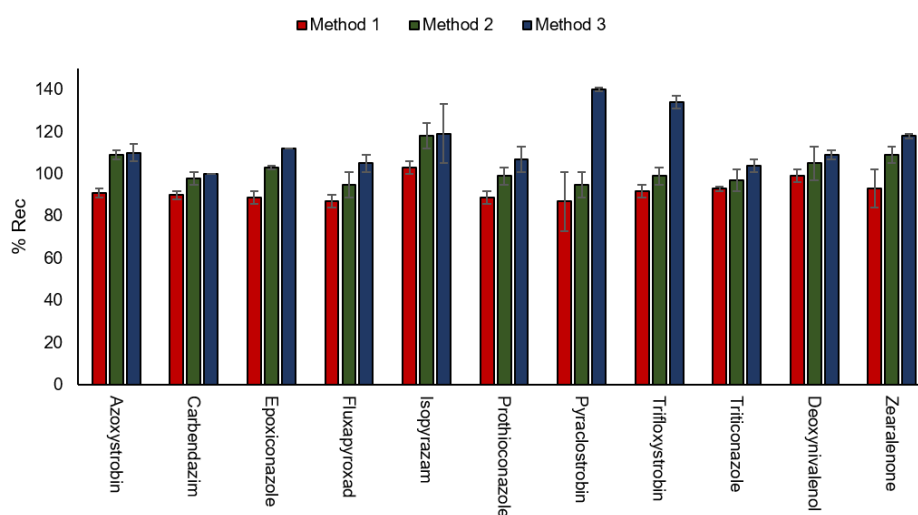


Figure 1. Comparison of the recovery percentages (%Rec) of the studied compounds and their relative standard deviations (%RSD, $n=3$) at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the three tested methods for barley matrix. *Note RSD showed as error bar

3.3.2. Method Validation

Fungicide recoveries obtained with the validated method (M2), ranged from 75 to 128% for barley and 67-122% for wheat at the evaluated fortification levels (Table 2), with satisfactory RSD_{WR} for all of the selected compounds. Prothioconazole presented recovery problems at the lowest spiking level in both matrices. At $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ level, some fungicides presented recovery problems, triticonazole and chlorothalonil in wheat and epoxiconazole and tebuconazole in barley.

The results suggest differences in the behavior of each compound/matrix combination; and therefore, highlights the importance of studying each matrix individually in contrast to the suggestion of SANTE guidelines that recommend the validation of one representative matrix for each group of commodities.²⁸

It is crucial to notice the acceptable results obtained for chlorothalonil, as it is reported to be a challenging compound from an analytical point of view. The complexity lies in its high instability and tendency to exhibit losses during sample preparation, storage of sample extracts and standard solutions as well as GC measurements.⁴¹⁻⁴² Most authors reported the degradation of chlorothalonil to polar and volatile metabolites which are difficult to determine by GC, and might explain the low recoveries (below 70%) and high RSD_{WR} values (higher than 25%) normally reported when this fungicide is included in multi-residue pesticide methods.⁴³⁻⁴⁵

Regarding mycotoxins, the determination of DON presented some problems during validation because it was difficult to find a blank sample. Therefore, the fortification levels studied were selected based on the lowest concentration of DON found in each of the studied matrices. For barley, both mycotoxins presented recovery rates according to the European legislation, between 77 and 94%, at 100 and 1000 µg kg⁻¹,⁴⁶ while the recoveries in wheat were in the range of 74-116% at the three spiked levels: 100, 250 and 1000 µg kg⁻¹. In the absence of blank material and in order to evaluate the method at a lower concentration level, a possible strategy could be to perform the ongoing validation with DON reference material for the cereal matrix.

Based on these results, and besides the fact that some of the compounds presented recovery problems at the lowest validated level, the LOQs were set from 10 to 100 µg kg⁻¹, complying with their corresponding EU or Codex MRL for each matrix (Table 2).³⁰⁻³³

Table 2. Validation Parameters^a

compound	Barley					wheat					
	10 (µg kg ⁻¹)	100 (µg kg ⁻¹)	1000 (µg kg ⁻¹)	^c U'	LOQ (µg kg ⁻¹)	10 (µg kg ⁻¹)	100 (µg kg ⁻¹)	250 (µg kg ⁻¹)	1000 (µg kg ⁻¹)	^c U'	LOQ (µg kg ⁻¹)
	%Rec (%RSD _{WR})	%Rec (%RSD _{WR})	%Rec (%RSD _{WR})			%Rec (%RSD _{WR})	%Rec (%RSD _{WR})	%Rec (%RSD _{WR})	%Rec (%RSD _{WR})		
azoxystrobin	93 (4)	88 (4)	107 (3)	32	10	119 (10)	83 (1)	96 (3)	95 (2)	21	10
carbendazim	84 (18)	75 (2)	75 (3)	35	10	94 (8)	71 (3)	84 (3)	88 (2)	42	10
chlorothalonil	112 (8)	128 (4)	128 (7)	44	10	^b ND	67 (10)	69 (20)	81 (10)	104	100
cyproconazole	126 (2)	79 (4)	112 (5)	44	10	105 (3)	86 (4)	87 (4)	97 (2)	31	10
epoxiconazole	139 (34)	86 (5)	105 (4)	28	100	109 (6)	117 (8)	104 (5)	94 (5)	23	10
fluxapyroxad	86 (18)	86 (3)	94 (4)	42	10	77 (14)	100 (3)	95 (4)	91 (2)	23	10
isopyrazam	86 (18)	85 (7)	94 (4)	32	10	83 (5)	71 (8)	82 (5)	86 (1)	41	10
metconazole	116 (12)	104 (6)	100 (12)	35	10	104 (6)	86 (8)	91 (6)	94 (3)	28	10
pyraclostrobin	98 (5)	87 (8)	103 (2)	27	10	94 (7)	92 (5)	90 (6)	91 (4)	29	10
prothioconazole	179 (46)	109 (2)	91 (3)	28	100	58 (16)	118 (2)	122 (3)	94 (5)	31	100
tebuconazole	^b ND	79 (18)	86 (13)	42	100	91 (3)	85 (5)	86 (8)	91 (3)	27	10
trifloxystrobin	94 (4)	101 (4)	106 (2)	29	10	99 (4)	74 (5)	93 (3)	92 (3)	28	10
triticonazole	86 (8)	86 (9)	98 (5)	33	10	^b ND	83 (11)	92 (6)	97 (5)	29	100
deoxynivalenol	^a NA	77 (6)	85 (1)	45	100	^a NA	74 (8)	102 (3)	109 (5)	26	100
zearalenone	^a NA	94 (11)	94 (6)	35	100	^a NA	116 (7)	83 (12)	98 (7)	35	100

^aTrueness measures as percentage of recovery (%Rec), precision estimated as reproducibility (RSD_{WR}), expanded uncertainty (*U'*) calculated for all of the fortification levels, and limits of quantification (LOQs, µg kg⁻¹), for all of the studied compounds in barley and wheat matrices. ^bNA: not analyzed.

^cND: not detected. ^d $U' = k(2) \times u' (\sqrt{\text{mean}_{\text{bias}}^2 + \text{SD} \cdot P_{\text{bias}}^2 + \text{RSD}_{\text{WR}}^2})$.

As regards to ME, LC-analysis presented signal suppression for all the compounds in both matrices while chlorothalonil showed signal enhancement. Moreover, for the majority of the compounds, the wheat matrix resulted in higher ME than barley. According to the classification of the type of ME reported by Pareja et al. ⁴⁷, chlorothalonil presented a strong matrix enhancement of 84 and 197% in barley and wheat, respectively, being a possible reason for the recovery problems, at the lowest studied level. Other compounds (i.e., DON and ZEN) presented medium ME in both matrices (ME=30%) (Figure 2). Based on these results, different approaches are used to compensate for the matrix effect during the quantification process, standard addition, isotopically labeled internal standards, or matrix-matched calibration. In this work, matrix-matched calibration was used (Figure 2).

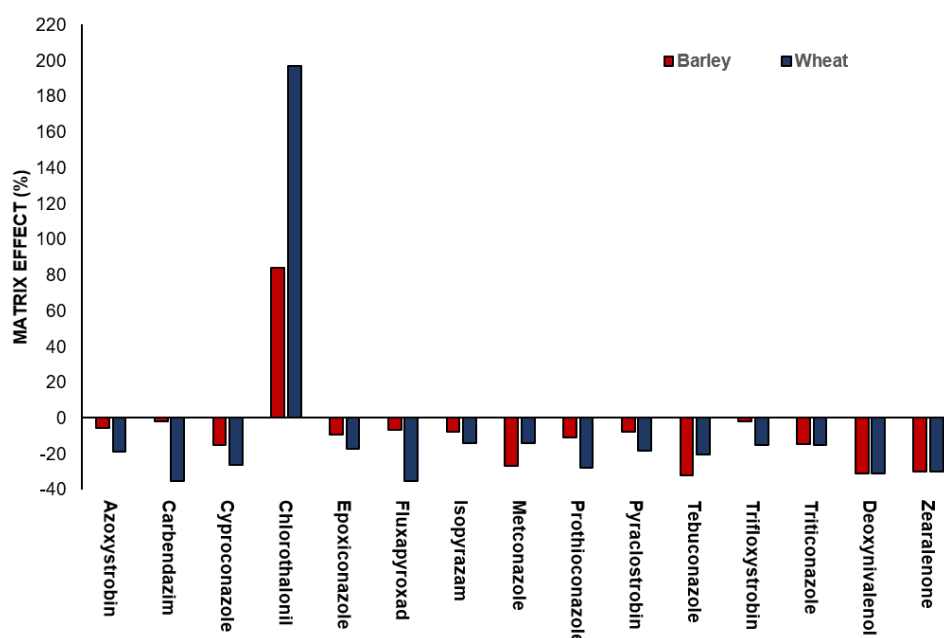


Figure 2. Comparison of matrix effect (ME%) for 13 fungicides and two mycotoxins in barley and wheat samples.

The linearity was studied in both, solvent and matrix-matched calibration, in the range of LOQ–1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for both instrumental systems. Linearity values, calculated as determination coefficients (R^2) were higher than 0.99, and the back-calculated concentrations (BCC) were below $\pm 20\%$ in all cases.

The measurement uncertainty is a quantitative indicator of the confidence in the analytical data that describes the range around an experimental result within the true value that can be expected to lie within a defined probability level.⁴⁸

The uncertainty values obtained for the validated method ranged from 28 to 44%, with an average of 21 and 104% for barley and wheat, respectively (Table 2). In wheat, chlorothalonil presented the highest expanded uncertainty (104%), these values were attributed to the high RSD levels or low recovery rates obtained for this fungicide which might have occurred due to instability and interactions with the co-extracted matrix components.

Although is important to evaluate U' in detail for each commodity/compound at different concentration levels, in multi-residue analysis, the goal is to obtain an overall and realistic estimate for a wide variety of matrices and analyte levels covered by the validated scope.⁴⁹ Therefore, the overall expanded and uncertainty of the method is 34.5% and 35.4% for wheat and barley, respectively.

As reported by Christensen et al.⁵⁰, the advantage of using method validation data for the uncertainty estimation is that the number of contributions to the uncertainty can be reduced to a minimum. Medina et al.⁵¹ suggest that the U' should be revised during the on-going validation of the method, as the longer the data is obtained, the more realistic the result will be.

3.3.3. Sample analysis

3.3.3.1. Barley experiment

The validated method was applied to the analysis of barley obtained under field conditions. Despite the fact the samples were harvested following the pre-harvest interval of the fungicides, some of them were detected in the samples; azoxystrobin, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, and pyraclostrobin (Table 3). However, none of these fungicides exceeded the EU and Codex MRL³⁰⁻³³. The most frequently detected were azoxystrobin and isopyrazam while fluxapyroxad was found at the highest concentration (Figure 3, Table 3). Prothioconazole, chlorothalonil, and trifloxystrobin were not detected at concentrations higher than their LOQs. The results show that the management strategies adopted for RLS in this trial may ensure grain safety in terms of fungicides. In addition, the evaluated treatments were efficient for RLS control (see Figure S1-SM in the Supporting Information).

Table 3. Summary of the main results in the barley experiment: number of analyzed samples, positive samples, concentrations range detected, number of samples below the limit of quantification (LOQ), and *Codex Alimentarius* and EU maximum residue levels (MRLs, $\mu\text{g kg}^{-1}$).

contaminants	number of analyzed samples	positive samples	concentration range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	number of samples < LOQ	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$) <i>Codex</i> / <i>EU</i>
azoxystrobin	12	8	10.0 - 43.0	5	1500 / 1500
epoxiconazole	20	1	-	1	- / 1500
fluxapyroxad	16	6	37.0 - 111.0	0	2000 / 3000
Isopyrazam	12	8	17.0 - 68.0	0	600 / 600
pyraclostrobin	20	6	11.0 - 69.0	0	1000 / 1000

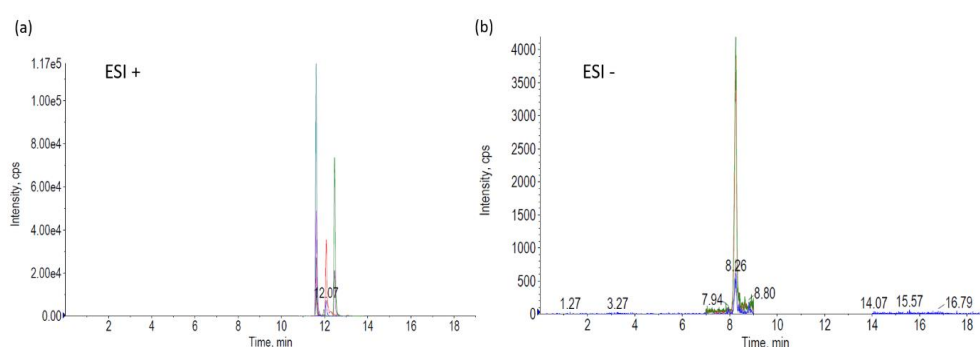


Figure 3. Extracted total ion chromatogram for barley: (a) real sample containing fluxapyroxad, pyraclostrobin and epoxiconazole at 578, 227 and 142 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively in positive mode and, (b) deoxynivalenol in negative mode at a concentration below the limit of quantification.

Although the focus of the barley field experiment was on the control of RLS and not FHB, all the analyzed samples showed DON at a concentration range between <LOQ and 590 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figure 4). These low DON concentrations agreed with the null visual incidence of FHB in the crop and the non-conducive climatic conditions of the growing season studied. Zearalenone was not detected in the analyzed samples.

3.3.3.2. Wheat experiment

All wheat samples were harvested following the pre-harvest interval criteria of the fungicides. Except for the controls, all the samples contained residues at different concentration levels (Table 4). Carbendazim was found in seven out of the 16 analyzed samples. Based on the

concentration detected and considering U' of carbendazim none of the samples complied with the Codex MRL.³⁰ However, all met the EU MRL.³¹

Table 4. Summary of the main results in the wheat experiment: number of analyzed samples, positive samples, range of concentrations detected and number of samples below the limit of quantification (LOQ), *Codex Alimentarius* and EU maximum residue levels (MRLs, $\mu\text{g kg}^{-1}$).¹⁾

contaminants	number of analyzed samples	positive samples	concentration range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	number of samples < LOQ	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$) <i>Codex</i> / EU
Carbendazim	16	7	37.1 – 63.3	0	50 / 100
tebuconazole	16	8	21.2 - 31.0	2	150 / 300
epoxiconazole	16	8	23.2 - 42.0	4	- / 600
metconazole	6	6	-	6	- / 150

Concerning mycotoxin contents, all the samples contained DON at concentrations below the MRL, while ZEN was not found. DON concentration varied depending on the fungicide treatment (Figure 4).

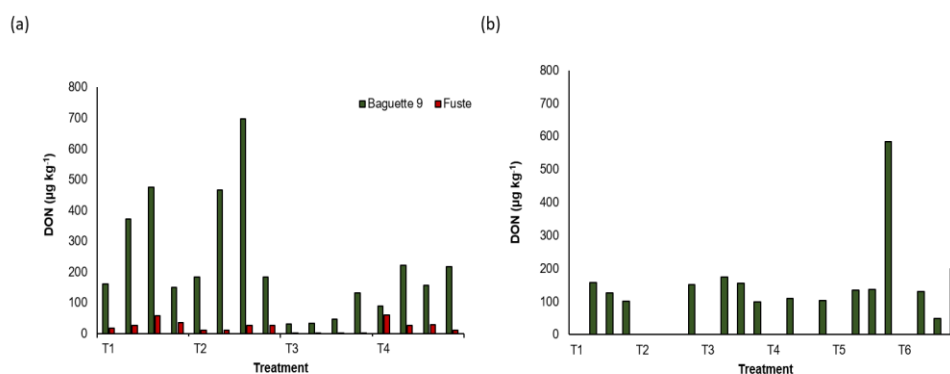


Figure 4. a) Deoxynivalenol (DON; $\mu\text{g kg}^{-1}$) concentration in two wheat varieties (Fuste and Baguette 9) in a field experiment. Reference: Treatment: T1 carbendazim, T2 tebuconazole, T3 metconazole + epoxiconazole, and T4 control (no-fungicide). b) Deoxynivalenol (DON; $\mu\text{g kg}^{-1}$) concentration in barley in a field experiment. Reference: Treatment: T1 prothioconazole + trifloxystrobin, and fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole; T2 pyraclostrobin + epoxiconazole + prothioconazole + trifloxystrobin + fluxapyroxad; T3 pyraclostrobin + epoxiconazole + chlorothalonil, and fluxapyroxad, and pyraclostrobin + epoxiconazole; T4 pyraclostrobin + epoxiconazole + chlorothalonil, and isopyrazam + azoxystrobin; T5 prothioconazole + trifloxystrobin, and isopyrazam + azoxystrobin; and T6 control (no-fungicide).

As well as the results obtained in barley, low DON concentrations in wheat were associated with low FHB incidence. The FHB index obtained in the control treatment was very low, Fuste 0.01% and Baguette-9 0.13% (Table S2-SM in the Supporting Information). Once again, the weather conditions were not optimal for this disease ⁵²⁻⁵⁴ (Figure S1-SM in the Supporting Information). These results are supported by the DONcast forecasting system adapted by INIA GRAS and the University of Guelph to Uruguayan conditions. ⁵⁵ This software indicates a low risk of obtaining DON levels higher than $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the harvested wheat grain at heading (28-10-2016) in Paysandú.

In summary, a simple, fast, cheap, and sensitive method for the simultaneous determination of 13 fungicides and two *fusarium* mycotoxins in wheat and barley was validated. The validation parameters indicate a fit for purpose method for the large majority of the examined compounds and opportunities for the expansion of the methods' scope according to the need that may arise in the field of food safety

The method was applied for the determination of fungicides in wheat and barley grains harvested from field trials with different fungicides treatments. Such treatments included the most

commonly used active ingredients to control RLS and FHB. Although different compounds were detected in the samples, the concentration levels were below the MRL either from the EU or Codex ³⁰⁻³³, except for carbendazim in wheat that exceeded the Codex MRL in 44% of the positive samples.

Even though these results correspond to one particular growing season, the results show that the primary food production sector should implement other measures for the control of these diseases avoiding or reducing the fungicides and/or the application moments to prevent and reduce contamination, in order to protect public health.

Moreover, as several fungicides and DON were found positive, it would be necessary to develop a monitoring and risk assessment program to identified potential health hazards. Also, it would be interesting to determine in the future fungicide residues in straw which are an important feed and fodders for livestock and other vertebrates.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge PhD. Carmen Ferrer and PhD. Paula Medina-Pastor for their help during uncertainty estimation.

Funding

Estudio interdisciplinario sobre la inocuidad en grano de cebada, Programa Semillero de Iniciativas Interdisciplinarias 2018, Espacio interdisciplinario, Universidad de la República, Uruguay.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

3.4. References

- (1) Kirby, E.; Paulitz, T.; Murray, T.; Schroeder, K.; Chen. X. In *Advances in Dryland Production Systems in the Pacific Northwest*; Yorgey, G., Kruger, C., Eds.; Pullman: Washington State University Extension, WA, 2017; Chapter 10, pp 399-467.
- (2) Sutton, B.; Waller, J. Taxonomy of *Ophicladium hordei* Causing Leaf Lesions on *Triticale* and Other *Graminutesae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1988**, 90, 55-61.
- (3) Havis, N. D.; Brown, J. K. M.; Clemente, G.; Frei, P.; Jedryczka, M.; Kaczmarek, J.; Kaczmarek, M.; Matušinsky, P.; McGrann, G. R. D.; Pereyra, S.; Piotrowska, M.; Sghyer, H.;

Tellier, A.; Hess, M. *Ramularia collo-cygni* - an Emerging Pathogen of Barley Crops. *Phytopathol.* **2015**, *105*, 895–904.

(4) Havis, N. D.; Gorniak, K.; Taylor, J.; Stanisiz-Migal, M.; Burnett, F. J. Controlling *Ramularia* Leaf Spot in Barley Crops, pp.91-96 ref.12. Presented at the Dundee Conference, Crop Production in Northern Britain, Dundee, UK. February 27-28, 2018

(5) Pereyra. Herramientas Disponibles Para el Manejo de Dos Enfermedades Relevantes de la Pasada Zafra: Fusariosis de la Espiga en Trigo y *Ramularia* en Cebada. *INIA La Estanzuela Serie Actividades de Difusión*, **2013**, *720*, 33-41.

(6) Fountaine, J.; Fraaije, B. A. Development of QoI Resistant Alleles in Populations of *Ramularia collo-cygni*. *Asp. Appl. Biol.* **2009**, *92*, 123-126.

(7) Matušinsky, P.; Leisova-Svobodova, L.; Marik, P.; Tvaruzek, L.; Stemberkova, L.; Hanusova, M.; Minarikova, V.; Vysohlidova, M.; Spitzer, T. Frequency of a Mutant Allele of Cytochrome b Conferring Resistance to QoI Fungicides in the Czech Population of *Ramularia collo-cygni*. *J. Plant Dis. Prot.* **2010**, *117*, 248-252.

(8) Piotrowska, M. J.; Fountaine, J. M.; Ennos, R. A.; Kaczmarek, M.; Burnett, F. J. Characterisation of *Ramularia collo-cygni* Laboratory Mutants Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 1187–1196.

(9) Taylor, M.; Tsai, P.; Anfang, N.; Ross, H.; Goddard, M. Pyrosequencing Reveals Regional Differences in Fruit-Associated Fungal Communities. *Environ Microbiol.* **2014**, *16*, 2848–2858.

(10) Commission Implementing Regulation (EU) 2019/677 of 29 April 2019 Concerning the Non-Renewal of the Approval of the Active Substance Chlorothalonil in Accordance with Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market, and Amending Commission Implementing Regulation (EU) No. 540/2011. Official Journal of the European Union, L114, 15-17

(11) Cowger, C.; Arellano, C. *Fusarium graminearum* Infection and Deoxynivalenol Concentrations During Development of Wheat Spikes. *Phytopathol.* **2013**, *103*, 460-471.

(12) Mills, K.; Salgado, J. D.; Pierce, A. P. 2016. *Fusarium* Head Blight or Head Scab of Wheat, Barley and Other Small Grain Crops – Ohioline; <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-cer-06> (accessed 2021-12-15)

(13) Reverberi, M.; Ricelli, A.; Zjalic, S.; Fabbri, A. A.; Fanelli, C. Natural Functions of Mycotoxins and Control of their Biosynthesis in Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 899-911.

- (14) Zadoks, J. C.; Chang, T. T.; Konzak, C. F. A. Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Res.* **1974**, 14, 415-421.
- (15) Mazzilli, S.; Pérez, C. A.; Ernst, O. Una Alternativa para Optimizar el Uso de Fungicidas para Controlar Fusariosis de Espiga en Trigo. *Agrociencia Uruguay.* **2011**, 15, 60-68.
- (16) Mesterházy, Á.; Tóth, B.; Varga, M.; Bartók, T.; Szabó-Hevér, Á.; Farády, L.; Lehoczki-Krsjak, S. Role of Fungicides, Application of Nozzle Types, and the Resistance Level of Wheat Varieties in the Control of Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol. *J. Toxins.* **2011**, 3, 1453-1483.
- (17) Mesterházy, A.; Bartok, T.; Lamper, C. Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium*, and Isolate Aggressiveness on the Efficacy of Fungicides for Control of Fusarium Head Blight. *Plant Dis.* **2003**, 87, 1107–1115.
- (18) Pirgozliev, S. R.; Edwards, S. G.; Hare, M. C.; Jenkinson, P. Effect of Dose Rate of Azoxystrobin and Metconazole on the Development of Fusarium Head Blight and the Accumulation of Deoxynivalenol (DON) in Wheat Grain. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, 108, 469-478.
- (19) Mol, H. G. J.; Rooseboom, A.; van Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sunarto, S. Modification and Re-Validation of the Ethyl Acetate-Based Multi-Residue Method for Pesticides in Produce. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 389, 1715-1754.
- (20) Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O. D. Method Validation and Comparison of Acetonitrile and Acetone Extraction for the Analysis of 169 Pesticides in Soya Grain by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr A.* **2009**, 1216, 1873-3778.
- (21) Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J AOAC Int.* **2003**, 86, 412-431.
- (22) Luke, M.; Froberg, J. E.; Masumoto, H. T. Extraction and Clean-up of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination by Gas-Liquid Chromatography. *J Assoc Off Anal Chem.* **1975**, 54, 513-514.
- (23) Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Osterdahl, B. G. Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables with Ethyl Acetate Extraction Using Gas and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 389, 1773-1789.
- (24) Zhang, J.; Wu, Y.; Lu, Y. Simultaneous Determination of Carbamate Insecticides and Mycotoxins in Cereals by Reversed Phase Liquid Chromatography Tandem Mass

Spectrometry Using a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe extraction procedure. *J Chromatogr B*. **2013**, 915–916, 13-20.

(25) Da Luz, S. R.; Pazdiora, P. C.; Dallagnol, L. J.; Dors, G. C.; Chaves, F. C. Mycotoxin and Fungicide Residues in Wheat Grains from Fungicide-Treated Plants Measured by a Validated LC/MS Method. *Food Chem*. **2017**, 220, 510-516.

(26) Da Silva, L. P.; Madureira, F.; de Azevedo Vargas, E.; Faria, A. F.; Augusti, R. Development and Validation of a Multianalyte Method for Quantification of Mycotoxins and Pesticides in Rice Using a Simple Dilute and Shoot Procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chem*. **2018**, 270, 420-427.

(27) Pleadin, J.; Vahčić, N.; Perši, N.; Sevelj, D.; Markov, K.; Frece, J. “*Fusarium* Mycotoxins” Occurrence in Cereals Harvested from Croatian Fields. *Food Control*. **2013**, 32, 49-54.

(28) The European Commission. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis. Sante/12682/2019; 2020; pp 1-49.

(29) The European Commission. Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed. Sante/12089/2016; 2017; pp 1-5.

(30) Codex Alimentarius Commission. Residuos de Plaguicidas en Alimentos y Piensos, 2018; <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/es/> (accessed 2022-01-01).

(31) Commission Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union* **2005**, L 70, 1.

(32) Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 20 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L364, 5–24.

(33) Codex Alimentarius Commission. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, CXS 193-1995, 1995.

(34) Marschik, S.; Hepperle, J.; Lauber, U.; Schnauffer, R.; Maier, S.; Kühn, C.; Schwab-Bohnert, G. Extracting Fumonisin from Maize: Efficiency of Different Extraction Solvents in Multi-Mycotoxin Analytics. *Mycotoxin Res*. **2013**, 29, 119–129.

(35) European Committee for Standardization (CEN). EN 15662:2008. Food of Plant Origin – Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE – QuEChERS-Method, 2008.

- (36) Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N. Evaluation of a Modified QuEChERS Method for Analysis of Mycotoxins in Rice. *Food Chem.* **2014**, 153, 44-51.
- (37) Oueslati, S.; Romero-González, R.; Lasram, S.; Garrido, A.; Martínez, J. L. Multi-mycotoxin Determination in Cereals and Derived Products Marketed in Tunisia Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Chem Toxicol.* **2012**, 50, 2376-2381.
- (38) European Parliament and Council. Directive 2003/13/EC of 14 February 2003 amending Directive 96/5/EC on Processed Cereal-Based Baby Foods for Infants and Young Children. *Off. J. Eur. Communities* **2003**, L41, 33–35.
- (39) Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Tsdelen, B.; Stajnbaher, D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds) *Pesticide Chemistry. Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007
- (40) Desmarchelier, A.; Oberson, J.M.; Tella, P.; Gremaud, E.; Seefelder, W.; Mottier, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* **2010**, 58, 7510-7519.
- (41) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Modified QuEChERS-Method for the Analysis of Chlorothalonil in Fruits and Vegetables. https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuEChERSforChlorothalonil_2010.PDF (accessed 2022-01-23).
- (42) Rejczak, T.; Tuzimski, T. A Review of Recent Developments and Trends in the QuEChERS Sample Preparation Approach. *Open Chem.* **2015**, 13, 980-1010.
- (43) Lehotay, E. J.; Son, K. A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatpiboon, N. Comparison of QuEChERS Sample Preparation Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *J Chromatogr A.* **2010**, 1217, 2548-2560.
- (44) Walorczyk, S.; Drozdynski, D. Development and Validation of a Routine Multiresidue Method for Determining 140 Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography/Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *J AOAC Int.* **2011**, 94, 1625-1642.
- (45) Lehotay, S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *J AOAC Int.* **2007**, 90, 485-520.

- (46) Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L70, 2006, 12-34.
- (47) Pareja, L.; Martínez-Bueno, M. J.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A. R. Trace Analysis of Pesticides in Paddy Field Water by Direct Injection Using Liquid Chromatography–Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 4790–4798.
- (48) Codex Alimentarius Commission. Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results, CAC/GL59-2006, 2006.
- (49) EURACHEM / CITAC guide CG4 (QUAM:2012.P1), quantifying uncertainty in analytical measurement. <http://www.eurachem.org>. (accessed 2022-01-27).
- (50) Christensen, H. B.; Poulsen, M. E.; Pedersen, M. Estimation of the Uncertainty in a Multiresidue Method for the Determination of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables. *Food Addit Contam.* **2003**, 20, 764-775.
- (51) Medina-Pastor, P.; Valverde, A.; Pihlstrom, T.; Masselter, S.; Gamon, M.; Mezcuá, M.; Rodríguez-Torreblanca, C.; Fernández-Alba, A. R. Comparative Study of the Main Top-Down Approaches for the Estimation of Measurement Uncertainty in Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables. *J Agric Food Chem.* **2011**, 59, 7609-7619.
- (52) Moschini, R. C.; Fortugno, C. Predicting Wheat Head Blight Incidence Using Models Based on Meteorological Factors in Pergamino, Argentina. *Eur J Plant Pathol.* **1996**, 102, 211–218.
- (53) De Wolf, E.; Madden, L. V.; Lipps, P. E. Risk Assessment Models for Wheat Fusarium Head Blight Epidemics Based on Within-Season Weather Data. *Phytopathology*. **2003**, 93, 428-435.
- (54) Hooker, D. C.; Shaafsma, A. W.; Tamburic-Ilincic, L. Using Weather Variables Pre-and Post-Heading to Predict Deoxynivalenol Content in Winter Wheat. *Plant Dis.* **2002**, 86, 611–619.
- (55) INIA.GRAS (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Unidad de Agroclima y Sistemas de Información, UY). s.f. Sigras app. Montevideo. s.p. <http://inia.uy/gras/Alertas-y-herramientas/Pron%C3%B3stico-DON-para-trigo-> (accessed 2021-12-03).

3.5. Supporting information

Table S1. Description of the different fungicides treatments and application moments used for barley experiments and the area under disease progress curve of *Ramularia* leaf spot (AUDPC RLSS).

Treatment	GS33	GS47	AUDPC RLSS ^a
T1	Cripton® ^b (0.7 L/ha)	Xantho® ^c (1.5 L/ha)	246 a
T2	Xantho® ^c (1.5 L/ha)	Cripton® ^b (0.7 L/ha)	326 a
T3	Abacus® ^d (0.5 L/ha) + Zeta® ^e (2 L/ha)	Xantho® ^c (1.5 L/ha)	262 a
T4	Abacus® ^d (0.5 L/ha) + Zeta® ^e (2 L/ha)	Reflect Xtra® ^f (0.4 L/ha)	296 a
T5	Cripton® ^b (0.7 L/ha)	Reflect Xtra® ^f (0.4 L/ha)	282 a
T6	Control (non-fungicide)		722 b

^a AUDPC RLSS values were calculated according to Campbell and Madden (1990). Means followed by different letters in the column are significantly different according to Tukey test at $p < 0.005$; CV: 20.3 coefficient of variation.

^b 175 g/L prothioconazole and 150 g/L trifloxystrobin

^c 50 g/L fluxapyroxad, 81 g/L pyraclostrobin and, 50 g/L epoxiconazole

^d 260 g/L pyraclostrobin and 160 g/L epoxiconazole

^e 500 g/L chlorothalonil

^f 12.5 g/L isopyrazam and, 20 g/L azoxystrobin

Table S2. Description of the different fungicides treatments used for wheat experiment and the disease level of Fusarium head blight (FHB).

Treatment	Commercial product	Active substance	Chemical group	g L ⁻¹	Dose (L ha ⁻¹)	FHB Index ^a (Fuste)	FHB Index (Baguette 9)
T1	Carbem 50 ®	Carbendazim	Benzimidazole	500	0.5	0.01 a	0.06 a
T2	Tebuzol 25®	Tebuconazole	Triazole	250	0.5	0.005 a	0.05 a
T3	Swing plus ®	Metconazole Epoxiconazole		27.5 37.5	1.5	0.00 a	0.03 b
T4	Control (no-fungicide)	-	-	-	-	0.01 a	0.13 a

^a Disease Index values were calculated based on: $([\text{incidence} \times \text{severity}]/100)$. Means followed by different letters in the column are significantly different according to Tukey test at $p < 0.005$; Fuste: 165% CV (coefficient of variation) and Baguette 9: 67% CV.

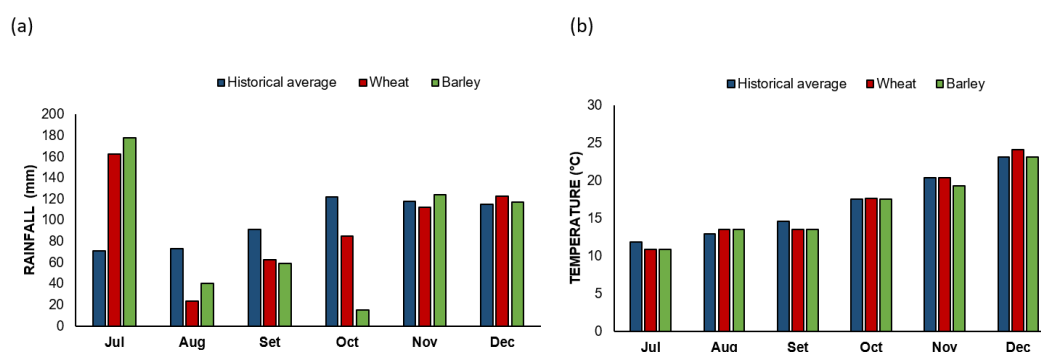


Figure S1. (a) Accumulated rainfall and (b) average temperature during the experiment compared to the historical average obtained during 2002-2014. In the barley crop, fungicide treatments were applied on September 26th and October 3rd, 2016 at Zadoks growth stages scale, GS 33 and GS 47. While in the wheat crop, chemical treatments were applied on October 28th, 2016 and on November 7th at Zadoks growth stages scale, GS 61 and GS 65.

4. Fungicide strategies for Ramularia Leaf Spot control recommended in Uruguay and their residues in barley grains

Cintia Palladino, Carlos A. Pérez, Lucia Pareja, Andrés Pérez-Parada, Jorge Franco, Silvia A. Pereyra. *Agrociencia Uruguay*. 2024;28:e1262. Doi: 10.31285/AGRO.28.1262

Abstract

Ramularia leaf spot (RLS) is primarily managed by foliar fungicide spraying, which can result in residues in the grain. In recent years, increasing attention has been paid to the risks these residues pose to consumers. This study aimed to evaluate the efficacy of fungicide management used for RLS control and their fungicide residues in barley grain. Four different alternatives of fungicide mixtures: fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole; pyraclostrobin + epoxiconazole + chlorothalonil; prothioconazole + trifloxystrobin, and isopyrazam + azoxystrobin, in three spray timings: GS33, GS47 and GS33+GS47, were evaluated in five field experiments. An untreated and a fully protected treatment were included. Fungicide residues, disease severity, control efficacy, area under the disease progress curve, and plump grain yield were calculated. All fungicide strategies adhered to food safety, complying with the Maximum Residue Limits established by Codex and the European Union. Effectiveness varied based on RLS development, application time, and number of applications. Fungicide treatments applied at GS33+GS47 were the most effective as the highest severity levels were observed at the stage after GS47 under the conditions studied. Plump grain yield only showed minimal differences in the late epidemic. The study emphasized the low risk of fungicide presence in grains, favoring efficacy when selecting RLS management options. Any changes in management or regulations should be carefully reviewed to maintain findings. The research underscored the compatibility of recommended fungicide treatments with food safety standards, highlighting the balance between disease control efficacy and consumer safety.

Keywords: *Ramularia collo-cygni*, *Hordeum vulgare*, food safety, pesticide residues control efficacy

Estrategias de fungicidas recomendadas para el control de ramulariosis en Uruguay y sus residuos en granos de cebada

Resumen

El control de ramulariosis se realiza principalmente con fungicidas foliares, lo que puede resultar en residuos en el grano. El objetivo fue evaluar la eficacia del manejo de fungicidas utilizados para el control de ramulariosis y sus residuos en grano de cebada. Se evaluaron cuatro mezclas de fungicidas: fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazol, piraclostrobina + epoxiconazol + clorotalonil, prothioconazol + trifloxistrobina, e isopyrazam + azoxistrobina, en tres momentos de aplicación: GS33, GS47 y GS33+GS47, en cinco experimentos de campo. Se incluyó un testigo sin aplicación y un tratamiento protegido. Se determinaron los residuos de fungicidas, la severidad de la enfermedad, la eficacia de control, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad y el rendimiento de granos mayores a 2,5 mm. Todas las estrategias de fungicidas cumplieron con los límites máximos de residuos establecidos por el *Codex* y la Unión Europea. La efectividad de control varió según el desarrollo de ramulariosis, el momento de aplicación y el número de aplicaciones. Los tratamientos con fungicidas aplicados en GS33+GS47 fueron los más efectivos, ya que los mayores niveles de severidad se observaron en las etapas posteriores a GS47 bajo las condiciones estudiadas. El rendimiento de granos mayores a 2,5 mm solo mostró diferencias mínimas en la epidemia tardía. La investigación resaltó la compatibilidad de los tratamientos recomendados de fungicidas con los estándares de seguridad alimentaria, destacando el equilibrio entre la eficacia en el control de enfermedades y la seguridad del consumidor.

Palabras clave: *Ramularia collo-cygni*, *Hordeum vulgare*, inocuidad, residuos de pesticidas, eficiencia de control

Estratégias de fungicidas para o controle da ramulariose recomendadas no Uruguai e respectivos resíduos nos grãos de cevada

Resumo

Ramulariose é principalmente controlada por pulverização de fungicidas foliares, o que pode resultar em resíduos nos grãos. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do manejo de fungicidas utilizado para o controle de ramulariose e seus resíduos nos grãos de cevada. Foram avaliadas quatro misturas de fungicidas: fluxapyroxad + piraclostrobina + epoxiconazol, piraclostrobina + epoxiconazol + clorotalonil, prothioconazol + trifloxistrobina e isopyrazam + azoxistrobina, em três momentos de pulverização: GS33, GS47 e GS33+GS47, em cinco experimentos de campo. Foram incluídos tratamentos não tratados e completamente

protegidos. Foram calculados os resíduos de fungicidas, a severidade da doença, a eficácia de controle, a área sob a curva de progresso da doença e o rendimento de grãos cheios. Todas as estratégias de fungicidas estavam de acordo com a segurança alimentar, cumprindo com os Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pelo Codex e pela União Européia. A eficácia variou de acordo com o desenvolvimento da ramulariose, o momento da aplicação e o número de aplicações. Os tratamentos com fungicidas aplicados em GS33+GS47 foram os mais eficazes, uma vez que os níveis mais altos de severidade foram observados na fase após GS47 nas condições estudadas. O rendimento de grãos cheios mostrou apenas diferenças mínimas na epidemia tardia. Qualquer mudança no manejo ou regulamentação deve ser cuidadosamente revisada para manter os resultados. A pesquisa destacou a compatibilidade dos tratamentos recomendados de fungicidas com os padrões de segurança alimentar, destacando o equilíbrio entre a eficácia no controle de doenças e a segurança do consumidor.

Palavras-chave: *Ramularia collo-cygni*, *Hordeum vulgare*, segurança alimentar, resíduos de pesticida, eficácia do controle

4.1. Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important cereal crops in the world. It is mainly used for feed, food, malting, and brewing⁽¹⁾. In Uruguay, it represents the second most cultivated cereal and is mostly exported as malt⁽²⁾. Ramularia leaf spot (RLS), characterized by reddish brown, rectangular lesions on both sides of the leaf, often surrounded by a chlorotic halo⁽³⁾, is caused by *Ramularia collo-cygni* (Rcc⁽⁴⁾). RLS is a major constraint to production in most barley growing regions, especially in the southern cone of South America⁽⁵⁾. RLS causes significant losses in both grain yield and quality⁽³⁾⁽⁵⁾ with yield reductions up to 70%⁽⁶⁾.

In-field diagnosis in early crop stages is problematic because RLS has an asymptomatic phase. RLS lesions on leaves may be visible earlier in the growing season if environmental conditions have been conducted⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾. Factors such as alternating wet and dry days, high light intensity, waterlogging, drought, nutrient deficiencies, and prolonged leaf-wetness contribute to varying incidence and severity of RLS⁽⁷⁾⁽⁸⁾. However, typical symptoms are commonly visualized under field conditions after the awns peeping stage (GS47-49)⁽³⁾⁽⁹⁾.

Rcc is a fungus with the ability to feed on and remain associated with barley stubble⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. The epidemiological significance of stubble in relation to this disease remains uncertain. While barley seeds represent a primary source of inoculum for RLS⁽¹²⁾, quantifying seed-borne inoculum in commercial seed batches faces limitations due to reliance on qPCR techniques⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾. So far,

most barley varieties cultivated globally are susceptible or moderately susceptible to RLS⁽⁵⁾. Despite efforts, no commercially available fungicide seed treatment has proven efficacy against RLS⁽⁵⁾. While various elicitor combinations have been explored for their impact on RLS, their effectiveness remains limited⁽¹⁵⁾.

As a result, fungicides are currently the only corrective management available to control RLS in barley crops⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾. Effective control has been achieved using three single-site fungicide classes, including succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), demethylation inhibitors (DMIs), the quinone outside inhibitors (QoIs), as well as multi-site inhibitors, such as chlorothalonil or folpet⁽¹⁷⁾. However, the problem of RLS management has been exacerbated by shifts in Rcc populations' sensitivity to these fungicide groups in Europe⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾. The European Food Safety Authority decision not to renew the approval for chlorothalonil due to environmental and health risks has further complicated the situation⁽²¹⁾.

Meanwhile, in South America, resistance to QoI was reported in Argentinean populations of Rcc. In addition, some isolates of Rcc showed a sensitivity reduction in mixtures including SDHI or DMI⁽¹⁶⁾. Under Uruguayan field conditions, lower or no efficacy of QoI on Rcc has been documented⁽⁶⁾. Mixtures containing SDHI, DMI and/or chlorothalonil are recommended at disease onset when environmental conditions are conducive to RLS⁽¹⁰⁾. Continued favorable conditions post Rcc detection at GS30-33 might need a second application during the awns peeping stage (GS47-49)⁽⁶⁾⁽¹⁰⁾⁽¹⁶⁾. However, under less conducive conditions, single applications in the period from elongation (GS31) to booting (GS49) have shown acceptable efficiency control⁽⁶⁾⁽¹⁰⁾.

Chemical control strategies can result in pesticide residues on and in plants, even when applied following Good Agricultural Practices (GAPs)⁽²²⁾. Experiments on residue behavior are necessary to determine their levels and to assess their impact on human and animal health⁽²³⁾. To assure food and feed safety, international organizations such as the European Union⁽²⁴⁾ and the *Codex Alimentarius*⁽²⁵⁾ have established Maximum Residue Limits (MRLs) for pesticides in cereal grains, which are regularly evaluated and adjusted. Many studies have focused on the development and validation of methods for the determination of pesticide residue in grains, on residue dissipation, and also on the dietary risk assessment of these compounds in grains⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾. However, only few works have tested the compliance between pesticides use and MRLs in crops under commercial field conditions⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾ or have assessed the impact of different management alternatives. Thus, striking a balance between effective pest management and ensuring food safety remains a critical challenge.

This study aimed to evaluate the efficacy of recommended fungicide management practices used for RLS control and their fungicide residues in barley grain. There is an important

challenge to jointly evaluate and discuss the effectiveness of fungicide management for RLS control and the levels of residues associated with these strategies.

Nowadays, very limited information is available on fungicide residues in cereals grain and food safety, and this is rarely taken into account by farmers when deciding on chemical control programs. In addition, international regulations are becoming more restrictive, so this information would contribute to the management of RLS considering the upcoming commercial scenarios.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Field experiments

Five field experiments were carried out from 2016 to 2018 under different environments in barley production regions of Uruguay. The experimental sites were selected to be representative of barley production, considering factors such as climatic differences among areas.

Two trials were located in the departments of Rio Negro and Colonia in 2016 (EXP1: 33°02'S, 57°24'W and EXP2: 34°20'S, 57°55'W, respectively); two in the departments of Colonia and Paysandú in 2017 (EXP3: 33°49'S, 58°02'W and EXP4: 32°32'S, 57°48'W, respectively), and one in Paysandú during 2018 (EXP5: 32°32'S, 57°91'W). The experimental sites were selected based on confirmed Rcc presence in barley crops. Rcc was confirmed by sporulation on symptomatic barley leaves in moist chambers. These were observed by optical microscopy and it was possible to identify Rcc by typical morphology of conidiophores and mycelium arranged longitudinally along the leaf veins⁽⁸⁾.

Experimental cultivars encompassed Arcadia (EXP1, highly susceptible to RLS), INIA Arrayán (EXP4, moderately susceptible to susceptible to RLS), Musa 19 (EXP3 and EXP5, moderately susceptible to susceptible to RLS), and Danielle (EXP2, susceptible to RLS), as classified by Castro and others⁽³¹⁾. Crops were managed following standard agricultural practices in Uruguay⁽²²⁾. Weather data including average temperature (°C), relative humidity (%), accumulated rainfall (mm) and rain events (number) during the crop growing cycle were obtained from records available at the experimental sites and/or nearby automatic weather stations in Dr. Mario A. Cassinoni Experimental Station, National Meteorology Institute, and National Agricultural Research Institute.

4.2.2. Experimental layout

The experimental design was a randomized complete block design with four replicates with 14 treatments. Twelve treatments were based on four fungicide mixtures: Abacus® + Zeta®, Cripton®, Xantho®, and Reflex Xtra® (**Table 1**, a) and three application moments⁽³²⁾: GS33,

GS47 and GS33+47 (**Table 1**, b). In addition, two treatments were included as controls: untreated (without fungicides, T1), and fully protected (T14), that consisted of three applications of Xantho® at GS33, GS47, and GS61. The experimental units were 3 × 5 m. All assessments were carried out in the four central rows to avoid border effects.

Fungicide treatments were applied using a CO₂ pressurized backpack sprayer (D201 S, Spraytec, Argentina), equipped with four flat fan nozzles (TeeJet 11002, TEEJET, United States), at 300 kPa pressure, delivering a volume of 115 L ha⁻¹. Fungicide doses corresponded to label recommendations.

Table 1. A. Commercial fungicides used in this study, including active ingredients, concentrations, application rates and pre-harvest interval.

Code	Commercial product	Supplier	Active ingredient (a.i)	Chemical group	Concentration of a.i (g·L ⁻¹)	Application rate (L·ha ⁻¹)	Pre-harvest interval (days)
A	Abacus® ^a	BASF	Epoxiconazole Pyraclostrobin	DMI ^d QoI ^e	160 260	0.5	35
B	Cripton® ^b	Bayer	Prothioconazole Trifloxystrobin	DMIs QoI	175 150	0.7	30
C	Reflect Xtra® ^c	Syngenta	Azoxystrobin Isopyrazam	QoI SDHI ^f	20 12.5	0.4	30
D	Xantho®	BASF	Epoxiconazole Fluxapyroxad Pyraclostrobin	DMI SDHI QoI	50 50 81	1.2	60
E	Zeta® ^a	Proquimur	Chlorothalonil	Benzonitrile	500	2	30

B. Treatments applied.

Application time	Treatment													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
GS33 ^g	-	B	D	A + E	-	-	-	-	B	D	A + E	A + E	B	D
GS47	-	-	-	-	B	D	A + E	C	D	B	D	C	C	D
GS61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D

^a used with Dash (37.5 g, methyl oleate and methyl palmitate); ^b used with Optimizer (76.5 g, methylated vegetable oil); ^c used with Nimbus (42.8 g, paraffinic mineral oil); ^d DMI: demethylation inhibitors, ^e QoI: the quinone outside inhibitors; ^f SDHI: succinate dehydrogenase inhibitors; ^g Growth stage (GS), Zadoks and others⁽³²⁾.

4.2.3. Fungicides and application times

Fungicides were selected based on their high efficiency to control RLS, previous field experiments across years and locations, and their commercial use and availability in Uruguay⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽³³⁾. The timing of fungicide application was determined by considering different potential types of RLS epidemics: at stem elongation (GS32-38) as a response to early disease onset, at awns-peeping (GS47-49) for a late disease onset, and at both application times for continuous conducive conditions for RLS development throughout the crop growth cycle⁽¹⁰⁾, under the assumption that the conditions for the development of RLS epidemics were optimal and that the inoculum of *Rcc* was not limiting. It should be worth noting that recommendations for fungicide applications in Uruguay consider other variables in addition to the crop growth stage, such as environmental conditions, inoculum pressure, disease onset, and crop potential⁽⁶⁾.

4.2.4. RLS control efficiency and plump grain yield

Ramularia leaf spot severity was determined for each plot and was expressed as the mean value for all leaves evaluated in 10 main stems, which were randomly selected from the central four rows. RLS assessments were performed prior to each fungicide application and then every 10-15 days depending on RLS pressure and development. Based on the disease severity values, the area under the disease progress curve (AUDPC) was estimated according to Campbell and Madden⁽³⁴⁾. In addition, control efficiency (CE) was calculated based on AUDPC values⁽³⁵⁾, as follows:

$$\% \text{ CE} = ([\text{AUDPC untreated control} - \text{AUDPC treatment}] / \text{AUDPC untreated control}) * 100.$$

Grain yield was determined by manually harvesting all spikes in the four central rows of each experimental plot, once the grain had reached its physiological maturity. Subsequently, grains were collected in paper bags, labeled accordingly by plot, and taken to the laboratory for moisture correction to 15% to determine grain yield and plumpness (percentage of grains > 2.5 mm) in C480988 Weg Motores SA (SC, Brazil). Plump grain yield (kg ha⁻¹) was estimated by the multiplication of grain yield (kg ha⁻¹) and grain plumpness. Samples were then kept in a freezer (Thermo Scientific, Asheville, NC, US) at -80 °C for the subsequent analysis of fungicide residues.

4.2.5. Analysis of fungicide residues in barley grain

Field experiments were designed to meet the constraints of the GAPs, while considering the highest likely residue levels. Since repeated and late applications during the crop cycle most probably affect pesticide residue content in the grain⁽²¹⁾, grain samples from treatments with

double application (GS33 and GS47) were selected to evaluate fungicide residues (T9, T10, T11, T12, and T13). These treatments would allow the evaluation of fungicide residues from both applications moments, GS33 and GS47.

Residue experiments should reflect the proposed critical GAPs (number of applications, interval between applications) to cover the worst case residue scenario⁽²³⁾. Therefore, the triple application was included in the evaluation (T14). However, the third application at GS61 is not recommended as it would not comply with the pre-harvest interval (60 days) indicated on the Xantho® label. It should be noted that all other applications evaluated in this study complied with the labelled pre-harvest intervals.

Hence, we evaluated six treatments totalizing twenty-four samples in four replicates in each experiment. From the field sample of each plot, a total of 150 g of grain were ground in an IKA®-WERKE Model M20 (Wilmington, USA). Samples were analyzed according to the QuEChERS method reported by Palladino and others⁽³⁶⁾. The analysis of epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, pyraclostrobin, trifloxystrobin, azoxystrobin, and prothioconazole was done by a hybrid Triple Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometer (4000 QTRAP® LC/MS-MS, SCIEX Instruments, Foster City, CA, USA). Chlorothalonil was analyzed by Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 7890 with a 5977B MS system equipped with an HP5-MS column (30 × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm) and operated under NCI mode. The instrumental parameters and the limits of quantification used were based on Palladino and others⁽³⁶⁾.

Data were analyzed by frequency of samples testing positive, which was calculated as the absolute frequency of fungicide residue detections and quantifications over the total number of samples evaluated. This was calculated using 24 samples for each experiment, and 20 samples for the double and triple treatments.

The persistence of residues on or in the plant is influenced by the physicochemical properties of the active ingredient⁽²³⁾. For this reason, the detection frequencies of fungicide residues were compared with their physicochemical properties (**Table 2**). Moreover, the values of fungicide residues were compared with the MLR settled by the European Union⁽²⁴⁾ and the *Codex Alimentarius*⁽²⁵⁾.

Table 2. Fungicide properties, limits of quantification, and Maximum Residue Limits (MRLs) established by the European Union (EU) and *Codex Alimentarius* for each of the active ingredients studied.

Fungicide	Log P _{ow} ^a	Dissipation RL ₅₀ (day) ^b	Water solubility (mg l ⁻¹) ^c	Vapour pressure (mPa) ^d	Aqueous photolysis DT ₅₀ (days) ^e	Soil degradation DT ₅₀ (days) ^f	Limit of quantification (mg kg ⁻¹) ^g	MRLs (mg kg ⁻¹)	
								EU ^h	<i>Codex</i> ⁱ
Azoxystrobin	2.5	8.0	6.7	1.1x10 ^{-0.7}	8.7	180.7	0.01	1.50	1.50
Chlorothalonil	2.9	5.5	0.81	0.076	0.72	17.9	0.01	0.01	-
Epoxiconazole	3.3	11.8	7.1	3.5x10 ^{-0.4}	53	353.5	0.02	1.50	-
Fluxapyroxad	3.1	10.0	3.44	2.7x10 ^{-0.6}	-	183	0.02	3.00	2.00
Isopyrazam	4.3	-	0.55	1.3x10 ^{-0.4}	54.3	317.6	0.01	0.60	0.60
Prothioconazole	2.0	-	22.5	7.4x10 ^{-0.6}	2.1	4.71	0.01	0.20	0.20
Pyraclostrobin	4.0	7.1	1.9	2.6x10 ^{-0.5}	0.06	234	0.01	1.00	1.00
Trifloxystrobin	4.5	5.0	0.61	3.4x10 ^{-0.3}	2.7	20.9	0.01	0.50	0.50

^a Log P_{ow}: Octanol-water partition coefficient at pH 7.20 °C⁽³⁷⁾; ^b Dissipation rate residual lifetime (RL₅₀) of the pesticide on the specified plant matrix⁽³⁷⁾; ^c

Solubility - In water at 20 °C (mg l⁻¹)⁽³⁷⁾; ^d Vapour pressure at 20 °C (mPa)⁽³⁷⁾; ^e Aqueous photolysis DT₅₀ (days) at pH 7⁽³⁷⁾; ^f Soil degradation DT₅₀ in the field (days)⁽³⁷⁾; ^g Limit of quantification⁽³⁶⁾; ^h European Union⁽²⁴⁾; ⁱ *Codex Alimentarius*⁽²⁵⁾.

4.2.6. Statistical analysis

Data were analyzed separately by field experiment due to differences in weather conditions, RLS onset and severity. Statistical analysis was conducted using InfoStat® software v. 2020⁽³⁸⁾. RLS severity data in the untreated control was transformed to fit the logarithmic model in order to estimate disease progression from each experiment. Thus, $\text{Log } Y_{\text{RLS}} = a + bx$, x = days, a = the intercept of the line, and b = rate of disease increase (slope of the line).

Analysis of variance (ANOVA) was used in the general linear models (GLM), where the F statistics were significant ($P < 0.01$). Tukey's protected least significant differences at $\alpha = 0.05$ were used to determine the significance difference between treatments mean. ANOVA was used to evaluate the effect of different fungicide treatments on AUDPC, CE, and plump grain yield of EXP1, EXP3, and EXP5.

In EXP5, Pearson correlation coefficient (r) and /or regression analysis were used to evaluate the relationship among RLS AUDPC and plump grain yield; the application rate, and concentration of fungicide residues. In addition, differences in RLS severity in the flag leaf of GS83 were tested using orthogonal contrast.

4.3. Results

4.3.1. RLS development

RLS epidemics developed differentially among experiments (**Figure 1**, a). Weather conditions at the beginning of the crop cycle (sowing to GS33) in terms of total rainfall (230-323 mm), rainfall events (18-53 days), temperature (11-14 °C), and relative humidity (80-87%) were conducive to RLS development across all experiments (**Figure 1**, b). However, disparities between the experiments became evident from GS33 until harvest. EXP1 and EXP5 displayed the lowest total rainfall amounts compared to EXP2 and EXP4 (43 mm, 119 mm, 196 mm, and 259 mm, respectively). Conversely, EXP3 recorded the highest total rainfall (532 mm) and the greatest number of rainy days (37 days). However, the average temperature increased in all cases, reaching an average of 18 °C.

Ramularia collo-cygni was detected in all five experiments; however, due to poor RLS development in EXP2 and EXP4, these were discarded from further analysis. An early onset of RLS was observed in EXP1, reaching 8% of severity in GS33 with a disease rate of 0.052 in the untreated control. Regarding EXP3 and EXP5, RLS developed late in the growing cycle and showed mean severity levels of 5% and 9% in GS47, respectively. The disease rate in both epidemics was similar: 0.087% and 0.078% of RLS severity, respectively. However, the time to disease development from GS33 to GS83 was shorter in EXP3 than in EXP5 (43 and 58 days, respectively). This resulted in a lower level of AUDPC in the untreated control in EXP3. Independently of RLS epidemics, the highest severity values were observed soon after GS47. The mean severity ranged 70-100% in GS83, with a maximum in EXP1 (96%), while it was similar in EXP3 and EXP5 (83% and 85%, respectively).

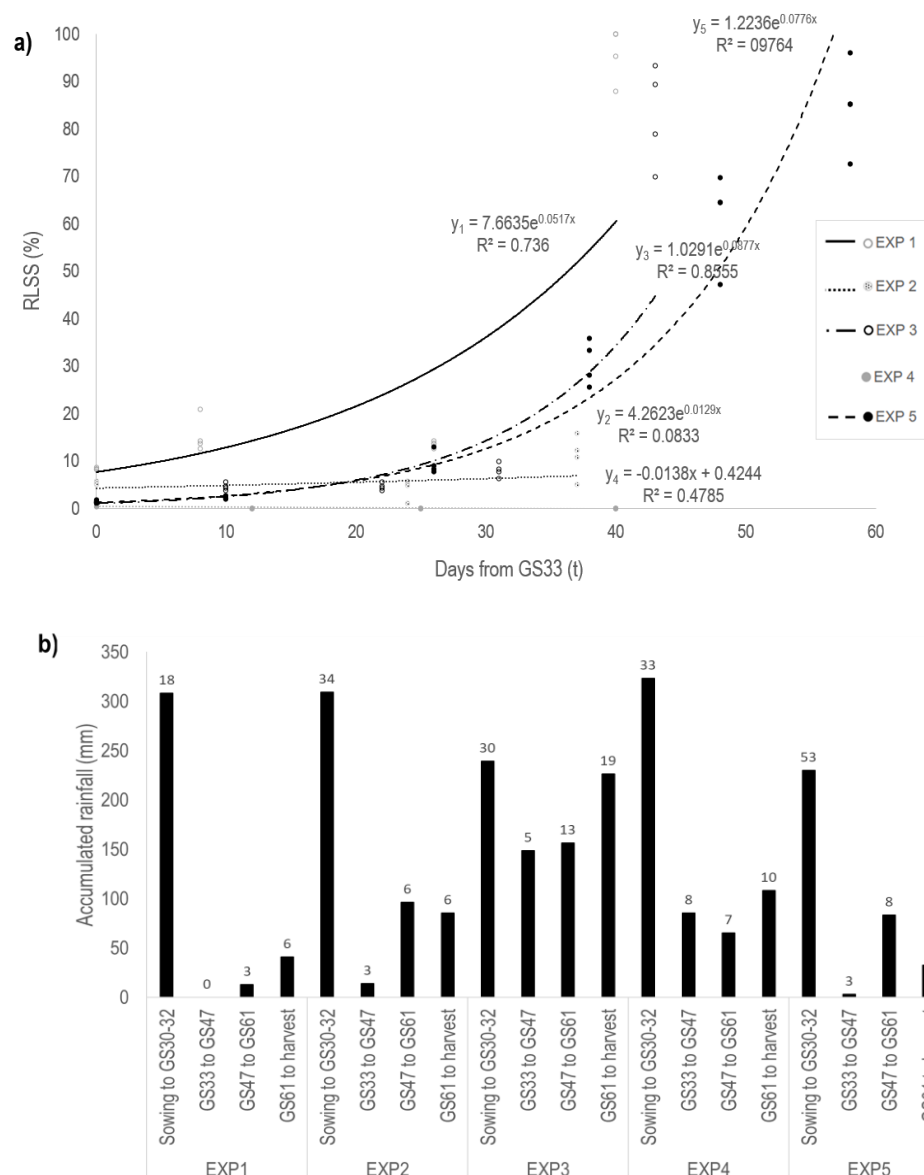


Fig. 1 a) Evolution of Ramularia leaf spot severity (RLSS) in the untreated control in each experiment: EXP1: Río Negro 2016, EXP2: Colonia 2016, EXP3: Paysandú 2017, EXP4: Colonia 2017, and EXP5: Paysandú 2018. b) Accumulated rainfall and rainy days (values on accumulated rainfall bars, rains > 1 mm) registered in four crop phenological periods: i) from sowing to stem elongation (GS30-32), ii) from stem elongation (GS33) to first awns visible (GS47), iii) from GS47 to first anthers visible (GS61), and iv) GS61 to harvest.

4.3.2 Effect of fungicides on AUDPC RLS

Only in EXP5, all fungicide treatments significantly reduced AUDPC values compared to the untreated control (ANOVA, $p < 0.0001$). In EXP1 and EXP3, treatments were able to reduce AUDPC depending on the application time and the fungicide mixture used (Table 3).

The late RLS epidemic was observed in EXP3, where only the double treatments (T10 and T13) with epoxiconazole + fluxapyroxad + pyraclostrobin or azoxystrobin + isopyrazam at GS33 and prothioconazole + trifloxystrobin at GS47 were able to reduce severity to the same extent as the fully protected treatment (ANOVA, $p < 0.0001$). In contrast, in the case of EXP1, where an early development of RLS occurred, fungicides applied both at GS47 and at GS33 and GS47 reduced RLS severity regardless of the fungicide mixture used (ANOVA, $p < 0.0001$).

Table 3 Effect of different fungicide treatments on the area under the disease progress curve (AUDPC) of *Ramularia* leaf spot (RLS), control efficiency (CE), and plump grain yield of EXP1, EXP3, and EXP5.

Treatment	Application time		AUDPC ^b RLS						CE ^c						Plump grain yield ^d			
	GS ^a 33	GS47	EXP1		EXP3		EXP5		EXP1		EXP3		EXP5		EXP1	EXP3	EXP5	
1	Untreated control		722	e	449	c	1908	g	-	-	-	-	-	-	3053	2057	2401	a
2	Cripton ^e	-	623	de	379	bc	1227	f	14	a	16	ab	36	a	3656	2277	2708	ab
3	Xantho ^f	-	510	cd	371	bc	1043	ef	29	ab	17	ab	45	ab	3237	2177	2838	ab
4	Zeta ^g + Abacus ^h	-	499	bcd	428	c	1248	f	31	ab	6	a	35	a	3353	2320	2745	ab
5	-	Cripton	378	abc	374	bc	851	cde	48	bc	17	ab	55	bc	3575	2168	2832	ab
6	-	Xantho	321	ab	333	bc	503	abc	56	bc	26	ab	74	cde	3305	2173	2783	ab
7	-	Zeta + Abacus	257	a	371	bc	906	bcd	64	c	17	ab	53	ab	3764	2194	2838	ab
8	-	Reflect Xtra ⁱ	294	a	307	abc	663	ab	59	c	32	abc	65	bcd	3596	1836	2707	ab
9	Cripton	Xantho	246	a	281	abc	385	ab	66	c	37	abc	80	de	3825	2063	3450	b
10	Xantho	Cripton	326	ab	223	ab	259	a	55	bc	50	bc	86	e	3497	2482	3161	ab
11	Zeta + Abacus	Xantho	262	a	280	abc	257	a	64	c	38	abc	87	e	3796	2200	2863	ab
12	Zeta + Abacus	Reflect Xtra	296	a	298	abc	356	ab	59	c	34	abc	81	de	3383	2110	3187	ab
13	Cripton	Reflect Xtra	282	a	253	ab	339	ab	61	c	44	abc	82	de	3223	2252	2811	ab
14	Three applications ^j		227	a	144	a	156	a	68	c	68	c	92	e	3309	2475	3392	b
	<i>p-value</i>		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001		0.0003		<0.0001		0.2231	0.4579	0.0035	
	CV		19.46		21.02		20.55		20.09		54.55		12.32		11.89	15.06	11.25	

^a Growth stage (GS), Zadoks et al. (32); ^b Area under disease progress curve (AUDPC) values were calculated according to Campbell and Madden(32); ^c CE was calculated based on AUDPCs values according to Abbott(33); ^d Plump grain yield (kg ha⁻¹) was estimated by the multiplication of grain yield values and grain plumpness (percentage weight of grains retained over a 2.5 mm sieve); ^e Cripton (prothioconazole + trifloxystrobin); ^f Xantho (epoxiconazole + pyraclostrobin + fluxapyroxad); ^g Zeta (chlorothalonil); ^h Abacus (pyraclostrobin + epoxiconazole); ⁱ Reflect Xtra (isopyrazam + azoxystrobin) ^j Xantho sprayed at GS33, GS47 and GS61. Means followed by different letters in columns are significantly different according to Tukey's HD test at p<0.05; CV: coefficient of variation (%).

4.3.3. Effect of fungicides on RLS control efficiency

Fungicide treatments provided CE ranges from 14 to 68% in EXP1, 5 to 68% in EXP3, and 35 to 92% in EXP5 (**Table 3**). Despite these variations and differences in RLS epidemic, the CEs of the treatments applied at GS33 were low (<45%). On the other hand, treatments with double applications had similar CE compared to the three applications treatment (T9-T13 vs. T14). In the early epidemic (EXP1), treatments applied at GS47 had similar CE to double applications and the fully protected treatment. However, in late epidemics at the same time of application, the CE differs depending on the fungicide. Isopyrazam + azoxystrobin (T8) in EXP3 and fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin (T6) in EXP5 applied at GS47 showed high CE values, similar to the fully protected treatment (**Table 3**).

4.3.4. Effect of fungicides on plump grain yield

Significant differences in plump grain yields were observed among treatments in EXP5 (ANOVA, $p = 0.0035$, **Table 3**). The only treatment with significantly higher plump grain yield than the untreated control was prothioconazole + trifloxystrobin at GS33 and epoxiconazole + pyraclostrobin + fluxapyroxad at GS47 (T9). All other treatments did not significantly increase plump grain yield in response to fungicide application.

Plump grain yield showed a negative and moderate correlation with the RLS AUDPC in EXP5 (Pearson $r = -0.50$, $p = 0.0001$). However, regression analysis results from EXP5 revealed that RLS AUDPC had a significant relationship with plump grain yields ($y = -0,6431x + 2591,5$, $R^2 = 0,2518$; $p < 0.001$). AUDPC contributed 25% to the observed variation in plump grain yield.

When analyzing the remaining green tissue amount at GS83 in EXP5, expressed as the number of live leaves minus the percentage of diseased tissue (severity), differences between treatments were observed (ANOVA, $p < 0.0001$). The treatments applied at GS33 had 0.27 mean green tissue and did not differ from the untreated control, 0.2 mean green tissue. The double applications and treatments T5 (chlorothalonil + pyraclostrobin + epoxiconazole) showed the same amount of live tissue as the fully protected treatment (2.2 mean green tissue). In line with this, when only the severity of the flag leaf (mean 19.5%) was analyzed at the same phenological stage, some differences between treatments were observed (ANOVA, $p = 0.0184$). When the timing of applications was statistically contrasted, GS33 applications

had a higher level of flag leaf severity than GS47 applications (contrasted, 31.43, $p = 0.0056$). In addition, GS33 and GS47 applications had a higher level of severity than double applications (contrasted, 32.60, $p = 0.0007$).

4.3.5. Fungicide residues in barley grain

The number of samples with fungicide residues at or above the limit of quantification differed among experiments. EXP1 had the highest detection frequency, with 71% of the evaluated samples showing residues, whereas no residues were detected in EXP3. The other experiments showed a variation in the percentage of fungicide residues detected (EXP4 42% > EXP5 33% > EXP2 25%). There was no clear relationship between the percentage of detection in the northern (EXP1, EXP3, and EXP5) and southern (EXP2 and EXP4) production areas of the country, or among the different growing seasons studied (2016, 2017, and 2018). However, the percentage of residues detected in grains was influenced by weather conditions. There was a negative relationship between accumulated rainfall and rainy days in each experiment and the percentage of residue detected. The experiments with the most contrasting in terms of fungicide concentration were EXP1 and EXP3. Despite the fact that EXP3 had the highest accumulative rainfall (531 mm on 37 rainy days) from GS33 to harvest, no fungicide residues were detected. In addition, at EXP3 rainfall occurred on the fourth and fifth days after applications at GS33 (7 mm and 11 mm, respectively), and 42 mm on the fifth day after applications at GS47. On the contrary, during the same period, EXP1, which had the lowest accumulated rainfall (43 mm on 8 rainy days), presented the highest number of fungicide detections in the grain.

In all cases, the highest percentage of fungicide residues detected was associated with applications at GS47 (**Figure 2**, a). Only trifloxystrobin was detected in barley grains that received a single application at GS33, whereas applications at GS47 resulted in the detection of azoxystrobin, epoxiconazole, fluxapyroxad, isopyrazam, and pyraclostrobin. Interestingly, prothioconazole and chlorothalonil were not detected on barley grains in any of the samples.

EXP1, EXP2, EXP3, EXP4, and EXP5 showed different durations of the period from last application to harvest (43, 44, 53, 53, 48, and 46 days, respectively). Furthermore, they did not show a clear relationship with the percentage of detection of residues found at T14 (75, 75, 0, 42, and 17%, respectively).

When analyzing the results from the triple applications (T14) separately by fungicide, fluxapyroxad was detected in the range 0.020-0.578 mg kg⁻¹ in all experiments. Pyraclostrobin was detected in three experiments, EXP1, EXP2, and EXP4, in the range 0.028-0.227 mg kg⁻¹. Epoxiconazole was only detected in EXP1 and EXP2 in the range 0.082-0.148 mg kg⁻¹. Only in EXP1 and EXP2 all fungicides were detected and with the highest detection frequency. This may be related to the lowest total rainfall and rainy days from GS61 to harvest in EXP1. However, in the other experiments, there was no clear relationship between rainfall or rain events and the percentage or concentration of residue detections (**Figure 1**, b).

The application rate of each active ingredient had no direct relationship with the concentration of fungicide residues found (Pearson r: -0.07, p-value = 0.1579). For example, chlorothalonil had the highest rate of application whereas was not detected in the grains. Finally, the fungicides doses and timing of applications that were used in this study resulted in residue concentrations below the MRLs established by the European Union⁽²²⁾ and the *Codex Alimentarius*⁽²³⁾ (**Figure 2**, b; **Table 2**).

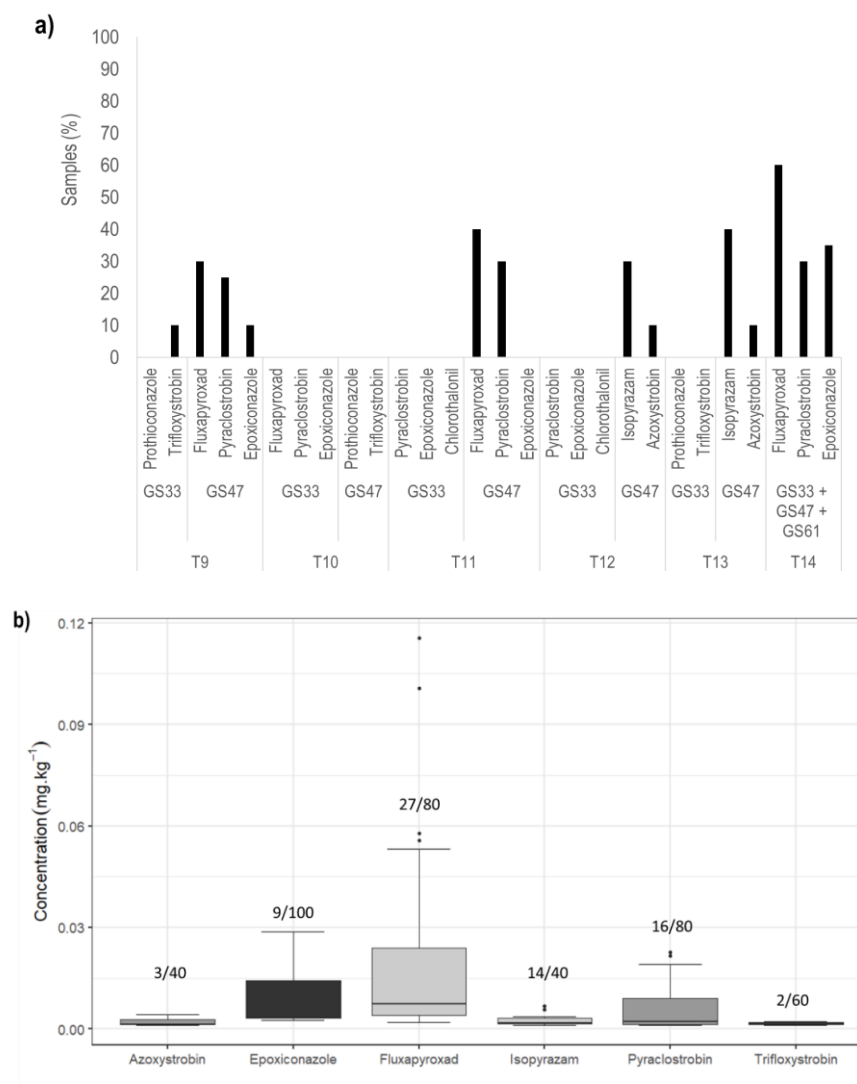


Fig. 2 a. Percentage of frequency of samples with fungicide residues detected at or above the limits of quantification⁽³⁷⁾ in treatments with double or triple application of fungicides in all experiments. Frequency was estimated based on the analysis of 20 samples per treatment. **b.** The concentration of fungicide residues detected was expressed in mg kg⁻¹ for each of the active ingredients studied. The values in the bars represent the number of samples at or above the limit of quantification⁽³⁷⁾ out of the total number of samples that could have contained that fungicide.

4.4. Discussion

Results from this study revealed that all fungicide management strategies evaluated to control RLS of barley complied with the MRLs as established by *Codex Alimentarius*⁽²⁵⁾ and the European Union⁽²⁴⁾. This work involved strategies based on the most effective fungicides

for RLS control used for the different types of RLS epidemics registered under Uruguayan conditions: early and late onset, and early, continued epidemic throughout the crop growing cycle, where environmental conditions were highly favorable for RLS development. The results showed that the efficiency of the fungicides to control RLS was conditioned by the disease development, the time, and the number of applications, and this agrees with vast information from Europe⁽⁵⁾, Argentina⁽¹⁶⁾, and Uruguay⁽⁶⁾. All the fungicide mixtures tested at GS33 + GS47 were effective in controlling RLS under the assayed conditions. However, at GS33 or GS47, the efficacy of the mixtures depended on the epidemic type.

4.4.1. Effect of fungicides on AUDPC RLS, CE, and plump grain yield

Ramularia collo-cygni was detected in all the experiments at early crop stages (GS33), but RLS did not develop further in EXP2 and EXP4. Rcc behaves as an endophyte and may become a pathogen causing symptoms under certain stress⁽⁸⁾⁽³⁹⁾. In addition, in UK and Poland some studies reported that detected airborne Rcc in areas where symptoms are rarely observed⁽⁴⁰⁾. For this reason, the detection of Rcc in the crop does not necessarily indicate an epidemic.

Once Rcc has been identified, the crop should be fully monitored, taking into account climatic conditions. In EXP2 and EXP4, environmental conditions from GS33 to GS47 were not conducive to epidemics of RLS. Furthermore, no significant crop stress factors were recorded during this period, such as scarce water availability, sequence of wet and dry days, high light intensity, waterlogging, nutrient deficiency, and prolonged leaf-wetness duration⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽³⁹⁾ that might have triggered RLS development. Moreover, the barley varieties used in the field experiments (Musa 19, and Danielle) had the lowest susceptibility to Rcc compared to the other varieties tested in this study. Interactions between the genotype of the barley varieties⁽³⁹⁾ and environmental conditions⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽³⁹⁾ appear to play an important role in the expression of RLS.

In EXP1, EXP3, and EXP5 the onset of RLS epidemics differed, with earlier development in EXP1 than in the others. This could be due to differences on cultivars' susceptibility, which are highly susceptible in EXP1 and moderately susceptible in the other experiments. The high conduciveness of weather conditions for RLS after GS33 in the experiments might have resulted in high RLS severity at the end of the cycle. Adverse

environmental conditions, such as prolonged drought or heavy rains, accentuate the interactions between host/pathogens⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾. From a physiological point of view, abiotically stressed plants are in an unbalanced state, which could affect host resistance, leading to an increase in epidemic severity⁽⁷⁾⁽⁴²⁾. Moreover, in EXP1 and EXP5, water deficiency during a critical period in the crop could have further enhanced the effects of RLS⁽³⁾⁽⁵⁾⁽³⁹⁾. According to other reports, warm and dry conditions suggest that dew formation and single rain events may still have been sufficient for significant outbreaks of RLS⁽⁷⁾. On the other hand, in EXP3 the variable pattern of rainfall after flowering may be related to an increase in RLS severity⁽⁴³⁾.

In EXP1, EXP3 and EXP5, the typical symptoms of RLS were observed after GS47, in agreement with Pereyra and Pérez⁽⁶⁾, who reported the detection of typical symptoms before GS51 in those years favorable for RLS. In Europe, typical symptoms are usually developed in the crop after spike emergence⁽³⁾. However, under conducive weather conditions, symptoms can be detected even earlier. Diagnosis of RLS, before the typical symptoms are observed, is very difficult, as the spots are confused with symptoms of other leaf spot pathogens or biotic agents⁽⁵⁾. Therefore, correct detection is essential for management. A nice strategy could be identification of Rcc by microscopy, but requires trained personnel to select the correct technique and leaf material. Also, it can only be performed when symptoms are visible in barley leaves⁽¹⁴⁾ or implementing the wet chamber incubation. Despite the training of technicians, wet chamber incubation does not provide accurate diagnosis, being the most efficient techniques for detection and identification of Rcc the PCR techniques⁽¹³⁾.

Regarding CE in early or late epidemics, treatments with a single application at GS33 did not control RLS significantly, because the disease outbreak occurred later in the season (after GS47). The CE in applications at GS33 might have been conditioned by the limited period of action of the treatments. Moreover, in the case of an early epidemic, the CE was also conditioned by the high severity of RLS at the application moment.

In the early epidemic, fungicide treatments including applications at GS47 (single GS47 and double GS33+GS47) were efficient for RLS control without the need for a third application (fully protected), although weather conditions remained favorable for RLS after GS47. Applications after the recommended application window (GS31-GS49) did not show an acceptable CE and are considered late applications for RLS control⁽⁶⁾.

On the other hand, in the late epidemics, CE at GS47 was dependent on the fungicide used, and better control was achieved using mixtures containing a SDHI (fluxapyroxad or isopyrazam). This is aligned with the literature that mentions that SDHI is one of the most efficient fungicide groups for RLS control⁽⁵⁾. However, treatments with double applications (GS33+GS47) were the most efficient, probably due to the disease development under the studied conditions that appeared at the end of the barley cycle. However, the double application treatment did not differ from the fully protected treatment in terms of RLS control. This underlines the importance of applying on time, as this improves efficiency, reducing the number of applications.

Resistance or decreases in sensitivity of Rcc are being reported worldwide to the DMI's, SDHI's⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾, and Qols fungicide groups⁽⁶⁾⁽¹⁶⁾⁽²⁰⁾. Although the sensitivity of the DMI's and SDHI's groups was not assessed in this study, the fungicide mixtures containing these types of fungicides were efficient against RLS under the studied conditions.

Regarding plump grain yield, there were no differences in plump grain yield except in EXP5, with the latest and longest RLS epidemic. A negative correlation between plump grain yield and RLS AUDPC was observed in EXP5. However, the regression model indicates that losses in plump grain yield may not only be correlated directly with the level of RLS. Plant health was not the main limiting factor in achieving yield, as only RLS was detected in the crop. Despite the fact that the amount of green tissue remaining in the plant at the end of the growing cycle (GS83) differed between treatments and in the flag leaf, no differences in grain yield were observed. This may be due to the fact that the time at which epidemic RLS levels were recorded in all experiments coincided with the critical stage for determining the final grain yield.

4.4.2. Fungicide residues in barley grain

As mentioned above, all the fungicide management strategies evaluated to control RLS, even the one that aimed a fully protected treatment (T14), complied with the MRLs set by *Codex Alimentarius*⁽²⁵⁾ and the European Union⁽²⁴⁾. These results were consistent with those observed in our previous report, in which the residues of the most commonly used fungicides to control RLS in barley grains collected from commercial fields in 2017 were evaluated⁽³⁰⁾.

The presence of fungicide residues in the grain obtained in the experiments can be attributed to a combination of factors, such as weather conditions (e. g., air temperature, relative humidity, sunlight intensity, accumulated rainfall, rainy days), spray application technology (e. g., droplet size, volume rate, ground speed), fungicide rates, physicochemical properties of the fungicides (e. g., Log P_{OW}, dissipation rates on plant, vapor pressure, water solubility, soil degradation), and the compliance with pre-harvest interval recommendations⁽²⁹⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. These interrelated factors contribute to the complex landscape of the fungicide residues found in the evaluated treatments.

In this research, fungicide residues in grain were conditioned by the different experimental environments and not by locations or growing seasons. The number of rainy days and the accumulated rainfall in each experiment could have influenced the frequency or the concentration level of each fungicide residue in the harvested grain. Interestingly, a greater amount of total rainfall and rainy days from GS33 to harvest correlated with fewer residues detected in the grain. Weather conditions significantly impact residue behavior in and on plants, especially immediately after application⁽²³⁾⁽⁴⁶⁾.

Another factor affecting the residue frequency in grains was the period of time between the application and harvest, notably at growth stages GS47 and GS61. Late applications had less time for degradation compared to GS33, leading to the presence of residues in the grain. Applications at GS61 exceeded the 60-day pre-harvest interval specified on the Xantho® label, resulting in anticipated grain residues. This emphasizes the importance of following the label recommendations. The results obtained highlight the necessity for local studies to establish national pre-harvest intervals. The period from the last application to harvest and the environmental conditions such as accumulated rainfall, rainy days, and timing of rainfall may have influenced the presence and concentration of residues. Rain is considered the biggest detractor of fungicide deposits on the leaf surface⁽⁴⁷⁾.

The application rate of each active ingredient is different, although no direct relationship with its concentration was found in grains. Fungicides' detection and concentration might be conditioned by their physicochemical properties. For instance, the dissipation rate lifetime (RL50) on and in the plant is an additional parameter that provides valuable information to explain the degradation of pesticide residues⁽³⁷⁾. Accordingly, we found that fungicides with higher RL50 were more frequently detected in grains than those with lower RL50.

Trifloxystrobin was only detected at GS33 in EXP2 and EXP5, which may be due to limited rain post-application (GS33 to GS47). Its absence in residues after GS47 application could be attributed to its high vapor pressure, leading to volatilization. In addition, an increase in average temperature from GS47 to harvest across all trials contributed to pesticide disappearance from plants through its influence on pesticide vapor pressure and volatility⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁸⁾. In addition, trifloxystrobin is considered non-persistent in soil.

The log P_{OW} , known as the octanol-water partition coefficient⁽³⁷⁾, informs about the lipophilicity of molecules, and is commonly used to explain the presence of pesticide residues in certain products. Our results showed that all fungicides with $\log P_{OW} > 2$ were detected in grains, except chlorothalonil, which was not detected in this study. Although they are detected at low-level concentrations, what happens to these fungicides in malt should be investigated. Several studies⁽²⁵⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾ mention that pesticides with $\log P_{OW}$ values > 2 may remain on malt.

On the other hand, prothiconazole presented $\log P_{OW}$ values = 2, also one of the most water-soluble fungicides in this study and not persistent in soil, which may have contributed to the non-detection of this active ingredient in grains in this study.

For chlorothalonil, the absence of residues in the samples could be explained by several factors. Firstly, this fungicide was applied at early stages of the crop (GS33) and complied with the pre-harvest interval established on the fungicide label. Applications at GS33 had a longer period from application to harvest than applications at GS47, thus decreasing the probability of detecting residues in grains. Moreover, chlorothalonil is a contact fungicide that may remain on the plant surface and thus undergo several biochemical processes such as photodegradation and volatilization that may lead to its dissipation in the environment⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾. From the selected fungicides, chlorothalonil has the fastest photodegradation, a few days of dissipation RL_{50} , and the highest vapor pressure. These events may result in a reduced likelihood of chlorothalonil presence in the harvested grain.

4.5. Conclusion

These results confirm that the main fungicide management strategies recommended for RLS control in Uruguay are aligned with both national and international regulations. However, the efficacy of the evaluated fungicide mixtures was found to be influenced by several factors such as RLS development, timing, and number of applications. This highlights the lack of a

single approach to control and the need for adaptability on a case-by-case basis. Particularly, the choice of an RLS management strategy from the proposed options is based solely on its efficacy, as it poses no risks in terms of the presence of fungicide residues in barley grain.

Based on the results of this study, it can be assumed that the fungicides tested would not be transferred to the wort and consequently to the beer, as they comply with internationally recognized MRLs. However, if there are changes in fungicide management practices, it is advisable to reevaluate fungicide residues in grain. Furthermore, it is crucial to understand that MRLs are subjected to continuous assessment by global organizations, thereby having the potential to change. In the event that the MRLs of certain fungicides are lowered, stakeholders could encounter marketing challenges due to non-compliance concerns.

The complexity of the interactions between the presence of fungicide residues in grains, the environmental conditions, the timing of applications and the physicochemical properties of the active ingredients highlights the importance for local studies to establish pre-harvest intervals at national level.

Acknowledgements

This research was funded by Espacio Interdisciplinario, Semillero Interdisciplinario-2018 (Universidad de la República) and Fondo María Viñas 2017_1_136660 (Agencia Nacional de Investigación e Innovación). We also acknowledge E. Suárez, N. Vivían, M. Posadas, C. Tagliani, B. Taborda, A. Muela and F. Puigvert for their technical support.

Transparency of data

Available data: The entire data set that supports the results of this study was published in the article itself.

Author contribution statement

Cintia Palladino: Conceptualization; Methodology; Investigation; Writing – original draft

Carlos A. Pérez: Conceptualization; Methodology; Writing – review & editing

Silvia Pereyra: Conceptualization; Methodology; Writing – review & editing

Lucia Pareja: Conceptualization; Methodology; Writing – review & editing

Andrés Pérez-Parada: Methodology; Formal analysis

Jorge Franco: Methodology; Formal analysis

4.6. References

1. FAO. FAOSTAT [Internet]. Rome: FAO; 2017 [cited 2023 Dec 18]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/FBS>
2. Rava C. Cebada cervecera y malta: situación y perspectivas. In: Anuario OPYPA 2020 [Internet]. Montevideo: MGAP; 2020 [cited 2023 Dec 18]. pp. 153-174. Available from: <https://bit.ly/3uzZyAJ>
3. McGrann GRD, Havis ND. Ramularia leaf spot: a newly important threat to barley production. *Outlooks Pest Manag.* 2017;28:65-69. Doi: 10.1564/v28_apr_05.
4. Sutton B, Waller J. Taxonomy of *Ophiocladium hordei* causing leaf lesions on Triticale and other Graminae. *Trans Br Mycol Soc.* 1988;90:55-61.
5. Havis ND, Brown JK, Clemente G, Frei P, Jedryczka M, Kaczmarek J, Matušinsky P, McGrann GR, Pereyra S, Piotrowska M, Sghyer H, Tellier A, Hess M. *Ramularia collo-cygni*: an emerging pathogen of barley crops. *Phytopathology.* 2015;105:895-904. Doi: 10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI.
6. Pereyra S, Pérez C. Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. *Cangüe.* 2017;38:13-8.
7. Hoheneder F, Hofer K, Groth J, Herz M, Heß M, Hückelhoven R. Ramularia leaf spot disease of barley is highly host genotype-dependent and suppressed by continuous drought stress in the field. *J Plant Dis Prot.* 2021;128:749-67. Doi: 10.1007/s41348-020-00420-z.
8. Kaczmarek M, Piotrowska MJ, Fountaine JM, Gorniak K, McGrann GRD, Armstrong A, Wright KM, Newton AC, Havis ND. Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of ramularia leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. *Plant Pathol.* 2016;66:45-55. Doi: 10.1111/ppa.12552.
9. Harvey I. Epidemiology and control of leaf and awn spot of barley caused by *Ramularia collo-cygni*. *N Z Plant Prot.* 2002;55:331-5.

10. Pereyra S. Herramientas disponibles para el manejo de dos enfermedades relevantes de la pasada zafra: fusariosis de la espiga en trigo y *Ramularia* en cebada. In: Jornada de Cultivos de Invierno: herramientas para un manejo inteligente de trigos y cebadas. Montevideo: INIA; 2013. pp. 33-41.
11. Zamani-Noor N. Studies on ramularia leaf spots on barley- resistance phenotyping, epidemiology and pathogenicity [doctoral's thesis]. Göttingen (DE): Georg-August-University Göttingen, Faculty of Agricultural Sciences; 2011. 146 p. Doi: 10.53846/goediss-4115
12. Matušinsky P, Svobodova-Leisova L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V, Vysohlidova M, Spiter T. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to Qol fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. J Plant Dis Prot. 2010;117(6):248-52. Doi: 10.1007/BF03356369.
13. Havis ND, Oxley S, Piper S, Langrell S. Rapid nested PCR –based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. FEMS Microbiol Lett. 2006;256:217-23.
14. Taylor J, Paterson L, Havis N. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). Lett Appl Microbiol. 2010;50:493-99.
15. Walters DR, Havis ND, Sablou C, Walsh DJ. Possible trade-off associated with use of a combination of resistance elicitors. Physiol Mol Plant Pathol. 2011;75:188-92. Doi: 10.1016/j.pmpp.2011.02.001.
16. Erreguerena IA, Havis ND, Heick TM, Gorniak K, Quiroz F, Carmona MA. Characterization of DMI, Qol and SDHI fungicides sensitivity of *Ramularia collo-cygni* isolates in Argentina. J Plant Dis Prot. 2022;129:1343-53. Doi: 10.1007/s41348-022-00645-0.
17. Havis ND, Gorniak K, Stanisz-Migal M, Creissen HE, Burnett F. Controlling *Ramularia* leaf spot post chlorothalonil. In: The Dundee Conference: Crop Production in Northern Britain 2020. Dundee: Bayer; 2020. pp. 87-92.
18. Rehfus A, Matušinsky P, Strobel D, Bryson R, Stammli G. Mutations in target genes of succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors in *Ramularia collo-cygni* in Europe. J Plant Dis Prot 2019;126(5):447-59. Doi: 10.1007/s41348-019-00246-4.

19. Piotrowska MJ, Fountaine JM, Ennos RA, Kaczmarek M, Burnett FJ. Characterisation of *Ramularia collo-cygni* laboratory mutants resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Pest Manag Sci*. 2017;73:1187-96. Doi: 10.1002/ps.4442.
20. Fountaine JM, Fraaije BA. Development of QoI resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni*. Paper presented at The Second European Ramularia (Workshop). 2009, Edinburgh, United Kingdom.
21. European Commission. Commission implementing regulation (EU) 2019/677 of 29 April 2019 concerning the non-renewal of the approval of the active substance chlorothalonil, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. *Official Journal of the European Communities* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 18]; L 114:15-17. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0677&from=EN>
22. Bidegain MP, Bogliaccini A, Chiaravalle W, Ernst O, Fernández G, Martínez I, Pereyra S, Pippolo D, Sawchik J, Cantou G. Guía de buenas prácticas agrícolas para sistemas con agricultura de secano en Uruguay. Montevideo: MGAP; 2013. 53p.
23. Commission of the European Communities, Directorate General for Agriculture. Appendix B: General recommendations for the design, preparation and realization of residue trials [Internet]. 1997 [cited 2023 Dec 18]. 72p. 7029/VI/95 rev.5. Available from: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/pesticides_mrl_guidelines_app-b.pdf
24. European Parliament, Council of the European Union. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Communities* [Internet]. 2005 [cited 2023 Dec 18]; L 70:1. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>

25. FAO. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. In: Codex Alimentarius: normas internacionales de los alimentos [Internet]. Rome: FAO; 2021 [cited 2023 Dec 18]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
26. Da Luz SR, Pazdiora PC, Dallagnol LJ, Dors GC, Chaves FC. Mycotoxin and fungicide residues in wheat grains from fungicide-treated plants measured by a validated LC-MS method. *Food Chem.* 2017;220:510-6. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.180.
27. Dušek M, Běláková S, Piacentini KC, Jandovská V. Fate and behavior of field-applied pesticides during malting and mashing processes. *J Agric Food Chem.* 2021;69(31):8649-59. Doi: 10.1021/acs.jafc.1c01120.
28. Lozowicka B, Kaczynski P, Paritova A, Kuzembekova G, Abzhaliyeva A, Sarsembayeva NB, Alihan K. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. *Food Chem Toxicol.* 2014;64:238-48. Doi: 10.1016/j.fct.2013.11.038.
29. Malinowska E, Jankowski K, Sosnowski J, Wiśniewska-Kadżajan B. Pesticide residues in cereal crop grains in Poland in 2013. *Environ Monit Assess.* 2015;187(6):329. Doi: 10.1007/s10661-015-4566-7.
30. Palladino C, Puigvert F, Muela A, Taborda B, Pérez CA, Pérez-Parada A, Pareja L. Evaluation of Fusarium mycotoxins and fungicide residues in barley grain produced in Uruguay. *J Agric Food Res.* 2021;3:100092. Doi: 10.1016/j.jafr.2020.100092.
31. Castro M, Pereyra S, German S. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de cebada cervecera de los tres últimos años: período 2018-2019-2020. La Estanzuela: INIA, 2021 [cited 2023 Dec 18]. 79p. Available from: http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2020/JornadaInvierno2020.pdf
32. Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 1974;14:415-21.

33. Pereyra S, González N. Caracterización de fungicidas evaluados por INIA según su eficiencia para el control de distintas enfermedades en trigo y cebada [Internet]. Montevideo: INIA; [cited 2023 Dec 18]. 2p. Available from: <https://bit.ly/4arQDBv>
34. Campbell CL, Madden LV. Introduction to Plant Disease epidemiology. New York: Willey; 1990. 532p.
35. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol. 1925;18:265-7.
36. Palladino C, Muela A, Taborda B, Puigvert F, Pérez-Parada A, Collazo M, Collazo M, Pérez C A., Pereyra S, Pareja L. Application of a straightforward methodology by LC-QqQ-MS/MS and GC-MS to ensure food safety of barley and wheat grain. Agric Sci Technol. 2022;2(2):371-80. Doi: 10.1021/acsagscitech.1c00263.
37. PPDB: Pesticide Properties Database [Internet]. Hertfordshire: University of Hertfordshire; [cited 2023 Dec 19]. Available from: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>
38. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [Internet]. Version 2020. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2020 [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://bit.ly/3dDvlyu>.
39. McGrann GRD, Brown JKM. The role of reactive oxygen in the development of *Ramularia* leaf spot disease in barley seedlings. Ann Bot. 2018;121(3):415-30. Doi: 10.1093/aob/mcx170.
40. Havis ND, Kaczmarek J, Jedryczka M, Hess M, Fang Z. Spore dispersal patterns of the ascomycete fungus *Ramularia collo-cygni* and their influence on disease epidemics. Aerobiologia, 2023;39:105-18. Doi: 10.1007/s10453-022-09778-z.
41. West JS, Townsend JA, Stevens M, Fitt BDL. Comparative biology of different plant pathogens to estimate effects of climate change on crop diseases in Europe. Eur J Plant Pathol. 2012;133(1):315-31. Doi: 10.1007/s10658-011-9932-x.
42. Hoheneder F, Groth J, Herz M, Hüchelhoven R. Artificially applied late-terminal drought stress in the field differentially affects *Ramularia* leaf spot disease in winter barley. J Plant Dis Prot. 2023;130:1357-70. Doi: 10.1007/s41348-023-00790-0.

43. Marik P, Snejdar Z, Matušinsky P. Expression of resistance to *Ramularia* leaf spot in winter barley cultivars grown in conditions of the Czech Republic. *Czech J Genet Plant Breed*. 2011;47:37-40. Doi: 10.17221/34/2010-CJGPB.
44. Komárek M, Cadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int*. 2010;36:138-51. Doi: 10.1016/j.envint.2009.10.005.
45. Bajwa U, Sandhu KS. Effect of handling and processing on pesticide residues in food- a review. *J Food Sci Technol*. 2014;51:201-20. Doi: 10.1007/s13197-011-0499-5.
46. Willis GH, McDowell LL. Pesticide persistence on foliage. In: Ware GW, editor. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. New York: Springer; 1987. pp. 23-73. Doi: 10.1007/978-1-4612-4804-0_2.
47. Oliva Ortiz J, Payá Peñalver P, Barba Navarro A. Influence of Fungicide residues in wine quality. In: Odile Carise, editor. *Fungicides*. Croatia: InTech; 2010. pp. 431-548.
48. Bedos C, Cellier P, Calvet R, Barriuso E, Gabrielle BT. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie*. 2002;1:21-33. Doi: 10.1051/agro:2001003.
49. Miyake Y, Hashimoto K, Matsuki H, Ono M, Tajima R. Fate of insecticide and fungicide residues on barley during storage and malting. *J Am Soc Brew Chem*. 2002; 60:110-5. Doi: 10.1094/ASBCJ-60-0110.
50. Pérez-Lucas G, Navarro G, Navarro S. Comprehensive review on monitoring, behavior, and impact of pesticide residues during beer-making. *J Agric Food Chem*. 2023;71(4):1820-36. Doi: 10.1021/acs.jafc.2c07830.
51. Laskowski DA. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2002;174:49-170. Doi: 10.1007/978-1-4757-4260-2_3.
52. Garrido Frenich A, Martínez Salvador I, Martínez Vidal JL, López-López T. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2005;383(7-8):1106-18. Doi: 10.1007/s00216-005-0139-x.

5. Discusión general

Esta tesis se centró en el ajuste de técnicas analíticas para optimizar el manejo de ramulariosis con el fin de reducir el uso de fungicidas foliares y prevenir efectos negativos de las aplicaciones. Se ajustó el método de detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula basado en la técnica de PCR-TR descrita por Taylor et al. (2010). Esta herramienta brinda un manejo cultural de ramulariosis, ya que permite cuantificar la concentración de ADN de Rcc en semilla y poder de esta forma identificar lotes de semilla con la menor concentración de ADN de Rcc.

En los experimentos de campo se constató la transmisión asintomática de Rcc de semillas a plántulas en los primeros estadios fenológicos (Z12), independientemente de la concentración de ADN de Rcc presente en semilla. A pesar de detectarse diferentes concentraciones de ADN en plántula, no se registraron epidemias. Estos resultados remarcán que, incluso al sembrar semilla con el menor nivel de infección de Rcc, la ocurrencia de la enfermedad estará sujeta a las condiciones climáticas favorables (Havis et al., 2012; Hoheneder et al., 2021; Mařík et al., 2011; Salamati y Reitan, 2006).

La cuantificación de ADN de Rcc en lotes de semillas comerciales indicó la ocurrencia de lotes con diferentes concentraciones y esta se vio afectada por las condiciones climáticas durante su producción. Estos resultados concuerdan con trabajos que mencionan que la concentración de ADN de Rcc en semillas varía significativamente de una zafra a la siguiente y de una zona geográfica a otra (Oxley y Havis, 2010), y que hay interacciones específicas entre genotipo y ambiente en el desarrollo y diseminación de Rcc (Hoheneder et al., 2021; Mařík et al., 2011). Por esa razón, se sugiere conocer la carga fúngica de la semilla y seleccionar aquellos lotes con la menor concentración de ADN de Rcc, para disminuir el inóculo inicial, dada la importancia de la semilla como fuente de inóculo.

Además, la detección temprana de Rcc en plántula con la técnica de PCR-TR permitirá definir el momento de intervención con fungicidas foliares. Esta detección podría evitar una aplicación de forma preventiva en ausencia de la enfermedad, o una aplicación tardía, con niveles de infección muy elevados, que limitan la respuesta al tratamiento y condicionan tanto su eficiencia como residualidad (Pereyra y Pérez, 2017). A pesar de esto, la aplicabilidad de

la detección en plántula mediante PCR-TR no es tan sencilla debido a los tiempos de procesamiento de la muestra en el laboratorio.

El otro método analítico para optimizar el manejo de ramulariosis fue el desarrollo de la metodología para la determinación simultánea de fungicidas y micotoxinas en grano de trigo y cebada. Esta resultó ser rápida, sencilla y de bajo costo debido a que no presenta etapa de limpieza y purificación de la muestra.

Este método puede ser una herramienta útil para la evaluación de la inocuidad de los diferentes tratamientos químicos realizados para el control de ramulariosis en cebada y fusariosis de la espiga en trigo y cebada. Para esta última enfermedad, el método podría evaluar las micotoxinas DON y ZEA. La evaluación del cumplimiento de los LMR de fungicidas para asegurar la inocuidad de los granos producidos contribuye a elevar la competitividad del sector cerealero exportador.

Por otra parte, los datos de validación de esta metodología analítica podían ser la base que permitan expandir el rango de pesticidas o micotoxinas a determinar en trigo y cebada. Asimismo, estos podrían facilitar la aplicación en matrices con características similares.

Las estrategias de uso de fungicidas foliares evaluadas para el control de ramulariosis combinaron diferentes ingredientes activos, provenientes de distintos grupos de fungicidas, momentos de aplicación simulando diferentes tipos de epidemias, y número de aplicaciones adoptadas ampliamente por el sector (Erreguerena et al., 2022; Havis et al., 2015; Pereyra y González, 2023). La eficacia de las mezclas fungicidas evaluadas estuvo condicionada por el desarrollo de la ramulariosis, el momento de aplicación y la cantidad de aplicaciones realizadas.

En epidemias que comienzan tempranamente en el ciclo del cultivo, una sola aplicación al inicio de la epidemia no fue suficiente para el control de ramulariosis. En este caso, las aplicaciones dobles en encañazón y aparición de aristas fueron eficientes en el control de la enfermedad sin necesidad de una tercera aplicación, aunque las condiciones climáticas continuaron siendo favorables para el desarrollo de ramulariosis después de la última aplicación. Por otra parte, una sola aplicación más adelante en el ciclo tampoco fue eficiente en el control de la enfermedad debido al nivel de infección elevado. Sin embargo, en esas situaciones, la utilización de las mezclas fluxapiraxad + epoxiconazol + piraclostrobin y isopirazam + azoxistrobin presentaron el mejor control para ramulariosis.

El momento de la aplicación en relación al inicio de la epidemia es fundamental para el control de ramulariosis. Por ejemplo, en epidemias tardías una única aplicación puede ser suficiente para su control. Las mezclas de fungicidas y las dosis utilizadas en este trabajo fueron eficientes para controlar ramulariosis bajo las condiciones estudiadas, a pesar de que en la región y el mundo se ha reportado pérdida de sensibilidad de Rcc a los grupos IDM, ISDH y IQE (Erreguerena et al., 2022; Fountaine y Fraaije, 2009; Havis et al., 2020; Matušinsky et al., 2010; Piotrowska et al., 2017; Rehfus et al., 2019). Dado estos resultados, se deben enfatizar en la adopción de medidas anti-resistencia para el control de ramulariosis, en el marco de un programa de manejo integrado de la enfermedad.

Todas las estrategias evaluadas garantizaron la seguridad del producto final en relación con la presencia de residuos de fungicidas en los granos, cumpliendo con los LMR establecidos por los organismos mundiales (European Union, 2005; FAO, 2021). Por lo tanto, los principios activos aplicados a las dosis y momentos recomendados no presentarían riesgos respecto a la presencia de residuos de fungicidas en granos de cebada.

Los resultados obtenidos de los residuos de fungicida en granos concuerdan con los datos de prospecciones de inocuidad realizadas en granos de cebada en chacras comerciales del litoral norte de Uruguay (Palladino et al., 2021; Pelocche et al., 2020). A pesar de que las concentraciones de fungicidas no superaron los LMR, se observó su presencia en el grano cosechado. Por esta razón y porque muchas veces no se respeta el tiempo de espera del producto, es fundamental el monitoreo constante para evaluar el cumplimiento de los LMR, no solo en función de las exigencias del mercado, sino también en resguardo de la salud del consumidor final.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis las recomendaciones para el manejo de ramulariosis deberían estar basadas en partir de semilla con la menor carga fúngica de Rcc y realizar seguimiento del cultivo para detectar al patógeno. En caso de observar síntomas asociados a ramulariosis, confirmar estos y si hay pronóstico de condiciones favorables para la enfermedad realizar aplicación de fungicidas foliares. En el caso de no observarse síntomas de la enfermedad y están dadas las condiciones ambientales se podría realizar la detección en plántula mediante la técnica de PCR-RT. En caso de detección de Rcc se recomienda la aplicación fungicidas. Las mezclas a utilizar podrían ser las evaluadas en este trabajo que resultaron con grano con residuos por debajo de los LMR.

La transferencia de los resultados de esta tesis es fundamental para optimizar el uso de fungicidas foliares utilizados en el control de ramulariosis y, por ende, minimizar la probabilidad de generar residuos de estos en grano. En el transcurso de este trabajo se llevaron a cabo presentaciones en congresos y jornadas técnicas (Palladino et al., 2023; Palladino et al., 2019a; Palladino et al., 2019b; Palladino et al., 2017; Pereyra et al., 2021). Por otra parte, las metodologías ajustadas servirán como punto de partida para monitoreos o controles sanitarios o de inocuidad en los granos. La difusión de los datos contribuirá a sensibilizar a los actores del sector productivo sobre el tema residuos de pesticidas en agroalimentos.

6. Conclusiones generales y perspectivas

A partir de la realización de esta tesis, el sector dispone de técnicas analíticas para detectar y cuantificar el inóculo de Rcc en semilla y plántula, y para determinar la inocuidad con respecto a fungicidas en granos de cebada y trigo. Además, los productores disponen de estrategias de manejo eficientes para el control de ramulariosis mediante el uso de fungicidas foliares e inocuas con respecto a residuos de fungicidas en granos. Estas herramientas y alternativas de manejo mejoran la sustentabilidad del sistema de producción de cebada de Uruguay.

En este sentido, la implementación de la técnica de PCR-TR por laboratorios nacionales permitirá el conocimiento del nivel de infección de Rcc en la semilla y realizar detecciones de Rcc desde síntomas no definidos de ramulariosis. A partir de la información del nivel de infección de Rcc se podrá decidir en relación con su uso con base en un umbral sugerido por Oxley y Havis (2010). Actualmente no se cuenta con parámetros de referencia nacional y ajustados al ambiente de producción local; sin embargo, este trabajo permite sentar las bases para poder en un futuro establecerlos.

En el caso que el nivel de infección de Rcc supere los 5 pg de ADN de Rcc en 100 ng de ADN en semilla, esta podría ser descartada para la siembra y utilizada para consumo animal o malteo. En el caso de usar lotes de semilla con concentraciones de ADN de Rcc en semilla menores a 5 pg se podría acoplar otra medida de manejo.

Además, se podrá definir el momento de intervención con fungicidas foliares mediante la detección de Rcc en síntomas no definidos de ramulariosis usando la técnica de PCR-TR. De esta manera se podrían evitar aplicaciones preventivas sin tener presente la enfermedad, o una aplicación tardía cuando la concentración de ADN de Rcc sea muy elevada. Estas aplicaciones restringen la respuesta del fungicida (Pereyra y Pérez, 2017; Zamani-Noor, 2011). Las mezclas de fungicidas a utilizar podrían ser las evaluadas en este trabajo, ya que lograron ser efectivas en el control de ramulariosis y en la obtención de un grano inocuo con respecto a estos fungicidas. Actualmente se cuenta con pocas formulaciones de fungicidas registradas para cebada en Uruguay que no sean presentados en mezclas de grupos químicos. Debido a esto, es difícil realizar manejos anti-resistencia o no utilizar ingredientes activos en los que Rcc perdió sensibilidad como las estrobirulinas.

La metodología analítica desarrollada para determinar los residuos de fungicidas en grano podría utilizarse para el monitoreo de los lotes de trigo y cebada. Además, esta metodología podría ser útil para optimizar el manejo de fungicidas de otras enfermedades de los cereales. En el caso de ramulariosis, se podría reevaluar la inocuidad respecto a fungicidas si ocurren cambios en el manejo de la enfermedad.

La ampliación de la metodología analítica para evaluar micotoxinas y fungicidas utilizados en el control de la fusariosis de la espiga en granos de trigo y cebada le agrega un valor extra al método. Este puede ser adoptado por laboratorios privados o gubernamentales dado que es simple, rápido y determina ambos contaminantes en un solo análisis.

En tanto el patosistema ramulariosis-cebada presenta múltiples limitaciones para el manejo, destacando la baja resistencia genética de las variedades para minimizar los efectos de la enfermedad (Brown y Makepeace, 2009; Leistrumaite y Liatukas 2006; Pereyra, 2013), es importante buscar estrategias y métodos de mejoramiento genético innovadores y rápidos (Mäe y Kiiker, 2022).

Otra limitante es que Rcc presenta un alto riesgo de perder la sensibilidad a los fungicidas utilizados para su control (FRAC, 2020; Stam et al., 2019). En países europeos y en Argentina hay reportes de cepas de Rcc insensibles a ISDH, IQE y IDM (Erreguerena et al., 2022; Fountaine y Fraaije, 2009; Havis et al., 2020; Rehfus et al., 2019; Piotrowska et al., 2017; Matušinsky et al., 2010). En Uruguay, si bien no se han reportado poblaciones resistentes a Rcc para los principales grupos de fungicidas utilizados, hay reportes de menor sensibilidad de las poblaciones de Rcc a IQE (Pereyra y Germán, 2014). Actualmente, el control de la ramulariosis se logra utilizando mezclas de dos clases de fungicidas de sitio de acción único, ISDH y IDM, con o sin el agregado de clorotalonil, que actúa en múltiples sitios. Los fungicidas utilizados presentan grandes riesgos en cuanto a resistencia: el uso reiterado de ISDH y IDM podría generar mayor presión de selección en las poblaciones y generar individuos/poblaciones resistentes (FRAC, 2020). En cuanto al clorotalonil, su utilización no presenta riesgo de generación de resistencia en las poblaciones de Rcc, pero tiene problemas ambientales y alta toxicidad para anfibios y peces, lo que ha llevado a su prohibición por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Commission, 2019). Por estas razones y a pesar de su efectividad en el control de ramulariosis se desestimula su uso en el país.

Por lo tanto, el principal desafío que enfrenta este patosistema es la búsqueda de nuevas estrategias para su control. Se han incorporado al mercado nuevas moléculas de fungicidas como el azol mefentrifluconazol (IDM) (Havis et al., 2020) y la carboxamida benzovindiflupyr (ISDH) (Avenot y Michailides, 2010) que son utilizadas para el control de ramulariosis. A pesar de los esfuerzos de las empresas de fitosanitarios en la generación de nuevas moléculas, existe la probabilidad de que las poblaciones de Rcc pierdan sensibilidad a estas moléculas. Este riesgo se acentúa en caso de que las poblaciones de Rcc se vuelvan insensibles a alguna molécula perteneciente al mismo grupo químico de los utilizados para el control de ramulariosis (FRAC, 2020).

Otra opción de control podría ser la sustitución de ingredientes activos que estaban en desuso o que son utilizados en otros patosistemas. En el Reino Unido, debido a la prohibición de clorotalonil para el control de ramulariosis, se ha reemplazado su uso por folpet, otro fungicida multisitio. Esta adopción no es tan efectiva en variedades moderadas a susceptibles en un año favorable para la enfermedad (Kildea et al., 2019). Además, cabe destacar que las características referidas a parámetros ecotoxicológicos y de destino ambiental del folpet son similares a las del clorotalonil (PPDB, 2020), lo que genera preocupación en el sector por la utilización de este activo.

Otro desafío para el control de ramulariosis podría ser la utilización de bioestimulantes, biológicos y/o sintéticos. Estos reducen el estrés en el cultivo y los síntomas de la enfermedad, basándose en la relación del estrés en el cultivo y la aparición de síntomas de la enfermedad (Havis et al., 2015b). Hasta el momento el uso de inductores de resistencia para el control de ramulariosis han tenido resultados con un éxito limitado (Havis et al., 2020; Walters et al., 2012). Afrontar estos desafíos de búsqueda de alternativas de manejo de ramulariosis no solo contribuirá a mejorar la eficacia del control, sino que también fortalecerá la sustentabilidad del sistema de producción de cebada en Uruguay.

Las metodologías ajustadas y utilizadas en esta tesis podrían ser extrapolables a otros patosistemas con características similares como por ejemplo una fase asintomática. A partir de los resultados generados en este trabajo y los desafíos que presenta el patosistema ramulariosis-cebada y el sector maltero, se plantean las siguientes propuestas de investigación:

- Estudiar la importancia del rastrojo y hospederos alternativos de cebada como fuente de inóculo para ramulariosis en las condiciones de Uruguay.
- Ajustar una metodología para la detección en Rcc en plántulas mediante técnicas rápidas ej: «Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP)».
- Evaluación de fungicidas curasemilla.
- Monitorear el cumplimiento de los LMR de los fungicidas utilizados en el manejo de enfermedades en trigo y cebada.

7. Bibliografía

- Agüera, A., Contreras, M., Crespo, J. y Fernández-Alba, A. (2002). Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 127(3), 347-354. <https://doi.org/10.1039/b109499h>
- Agüera, A., López, S., Fernández-Alba, A., Contreras, M., Crespo, J. y Piedra, L. (2004). One-year routine application of a new method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of 16 multiclass pesticides in vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 1045, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.039>
- Anastassiades, S., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. y Schenck, J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Assinger, T., Fountaine, J., Torriani, S., Accardo, S., Bernhard Frey, R., Gottula, J. y Steinkellner, S. (2022). Detection of *Ramularia collo cygni* DMI and SDHI resistant field populations in Austria and the effect of fungicides on the population and genetic diversity. *European Journal of Plant Pathology*, 162, 575-594. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02422-5>
- Avenot, H. F. y Michailides, T. J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29, 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>
- Bjorling-Poulsen, M., Andersen, H. R. y Grandjean, P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*, 7, 1-22. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-50>
- Bogliaccini, A., Chiaravalle, W., Ernst, O., Fernández, G., Martínez, I., Pereyra, S. A., Pérez, M., Pippolo, D. y Sawchil, J. (2013). *Guía de buenas prácticas agrícolas para sistemas con agricultura de secano en Uruguay*. (MGAP).

<http://www.inia.uy/Documentos/p%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estandueta/Mesa%20de%20Trigo/Gu%C3%ADa%20BPA%20secano.pdf>

Brown, J. y Makepeace, J. (2009). The effect of genetic variation in barley on responses to *Ramularia collo-cygni*. *Aspects of Applied Biology*, 92, 43-47.

Codex Alimentarius. (1995). CXS 193-1995: Norma del Codex para los Alimentos para Lactantes y Niños de Corta Edad. Recuperado de [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf]

Da Luz, S. R., Pazdiora, P. C., Dallagnol, L. J., Dors, G. C. y Chaves, F. C. (2017). Mycotoxin and Fungicide Residues in Wheat Grains from Fungicide-Treated Plants Measured by a Validated LC/MS Method. *Food Chemical*, 220, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.180>

Da Silva, L. P., Madureira, F., de Azevedo Vargas, E., Faria, A. F. y Augusti, R. (2018). Development and Validation of a Multianalyte Method for Quantification of Mycotoxins and Pesticides in Rice Using a Simple Dilute and Shoot Procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chemical*, 270, 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07>

Decreto n.º 285/009 (2009, 23 de noviembre). *Diario Oficial*, (27.758),1470. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/285-2009>

Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L. y Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>

Erreguerena, I. A., Havis, N. D., Heick, T. M., Gorniak, K., Quiroz, F. y Carmona, M. A. (2022). Characterization of DMI, Qol and SDHI fungicides sensitivity of *Ramularia collo-cygni* isolates in Argentina. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00645-0>

European Commission. (1997). Commission of the European Communities, Directorate General for Agriculture – VI B II-1. 7029/VI/95 rev. 5, 22/7/97. Appendix B: General recommendations for the design, preparation and realization of residue trials. Annex 1: Sampling. https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/pesticides_mrl_guidelines_app-b.pdf

- European Commission. (2019). Regulation (EU) No 2019/677 concerning the non-renewal of the approval of the active substance chlorothalonil, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. *Official Journal of the European Union*, 2019, L 114, 15-17.
- European Union. (2005). Commission Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, 2005, L 70, 1.
- FAO (Food and Agricultural Organization). (2022, 10 de junio). *Situación alimentaria mundial*. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- FAO. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de pesticidas en los alimentos. In: Codex Alimentarius: normas internacionales de los alimentos [Internet]. Rome: FAO; 2021 [cited 2023 Dec 18]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- Fokunang, C. N., Tembe-Fokunang, E. A., Tomkins, P. y Barkwan, S. (2006). Global impact of mycotoxins on human and animal health management. *Outlook on Agriculture*, 35(4), 247-253. <https://doi.org/10.5367/000000006779398263>
- Fontaine, J. M. y Fraaije, B. A. (2009, 7-8 de abril). Development of Qol resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni* [contribución]. Workshop: the Second European Ramularia. Edinburgh.
- FRAC. (2020, 2 de junio). *Fungicide Resistance Action Committee*. <https://www.frac.info/knowledge-database/downloads>
- Hans, G. J., Rooseboom, A., van Dam, R., Roding, M., Arondeus, K. y Sunarto, S. (2007). Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1715–1754. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1357-1>

- Harvey, I. (2002). Epidemiology and control of leaf and awn spot of barley caused by *Ramularia collo-cygni*. *New Zealand Plant Protection*, 55, 331-335. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3901>
- Havis, N. D., Brown, J., Clemente, G., Frei, P., Jedryczka, M., Kaczmarek, J., Matušinsky, P., McGrann, G. R. D., Pereyra, S., Piotrowska, M., Sghyer, H., Tellier, A. y Hess, M. (2015a). *Ramularia collo-cygni* - an emerging pathogen of barley crops. *Phytopathology*, 105(7), 895-904. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI>
- Havis, N. D., Fountaine, J., Gorniak, K., Paterson, L. y Taylor, J. M. G. (2015b). Diagnosis of *Ramularia collo - cygni* and *Rhynchosporium* spp. En Barley. *Plant Pathology: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1302, 29-36. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6_3
- Havis, N. D., Gorniak, K., Stanisiz-Migal, M., Creissen, H. E., Burnett, F. J. (2020). Controlling *Ramularia* leaf spot post chlorothalonil. *Proceedings Crop Production in Northern Britain 2020*, 87-92.
- Havis, N. D., Kaczmarek, J., Jedryczka, M., Hess, M. y Fang, Z. (2023). Spore dispersal patterns of the ascomycete fungus *Ramularia collo-cygni* and their influence on disease epidemics. *Aerobiologia*, 39, 105-118. <https://doi.org/10.1007/s10453-022-09778-z>
- Havis, N. D., Nyman, M. y Oxley S. (2014). Evidence for seed transmission and asymptomatic growth of *Ramularia collo-cygni* in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Pathology*, 63, 929-936. <https://doi.org/10.1111/ppa.12162>
- Havis, N. D., Oxley, S. J. P. y Burnett, F. J. (2012). Advance in control of *Ramularia collo-cygni*. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain 2012*, 111-124.
- Havis, N. D., Oxley, S. J. P., Piper, S. y Langrell, S. (2006). Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiology Letters*, 256, 217-223.
- Hoheneder, F., Hofer, K., Groth, J., Herz, M., Heß, M. y Hüchelhoven, R. (2021). *Ramularia* leaf spot disease of barley is highly host genotype-dependent and suppressed by continuous drought stress in the field. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128, 749-767. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00420-z>

- Juntarawijit, C. y Juntarawijit, Y. (2018). Association between diabetes and pesticides: A case-control study among Thai farmers. *Environmental health and preventive medicine*, 23, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0692-5>
- Kaczmarek, M., Piotrowska, M. J., Fountaine, J. M., Gorniak, K., McGrann, G. R. D., Armstrong, A., Wright, K. M., Newton, A. C. y Havis, N. D. (2017). Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of *Ramularia* leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. *Plant Pathology*, 66(1), 45-55. <https://doi.org/10.1111/ppa.12552>
- Kildea, S., Spink, J. y Hennessey, M. (2019). An evaluation of the potential impact the loss of chlorothalonil may have on the productivity of winter wheat and spring and winter barley grown in Ireland. TEAGASC Report.
- Kmellár, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M. A., Valverde, A. y Fernandez-Alba, A. R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1215(1-2), 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.121>
- Leistrumaite, A. y Liatukas, Z. (2006). Resistance of spring barley cultivars to the new disease *Ramularia* leaf spot, caused by *Ramularia collo-cygni*. *Agronomy Research*, 4, 251-255.
- Lozowicka, B., Kaczynski, P., Paritova, A. E., Kuzembekova, G. B., Abzhalieva, A. B., Sarsembayeva, N. B. y Alihan, K. (2014). Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 238—248. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.038>
- Luke, M., Froberg, J. E. y Masumoto, H. T. (1975). Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 58(5), 1020-1026.
- Mäe, A. y Kiiker, R. (2022). Challenges in *Ramularia collo-cygni* Control. *Encyclopedia*, 2, 256-263. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010017>

- Mankevičienė, A., Butkutė, B., Gaurilčikienė, I., Dabkevičius, Z. y Supronienė, S. (2011). Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*, 22(6), 970-976. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.004>
- Matušinsky, P., Hanusová, M., Stemberková, L., Mařík, P., Minaříková, V., Tvarůžek, L., Langer, I. y Spitzer, T. (2013). Response of Spring Barley Cultivars to *Ramularia* Leaf Spot in Conditions of the Czech Republic. *Cereal Research Communications*, 41(1), 126-132. <https://doi.org/10.1556/CRC.2012.0023>
- Matušinsky, P., Svobodova, L., Mařík, P., Tvarůžek, L., Stemberková, L., Hanusová, M., Spitzer, T., Minaříková, V. y Vysohlidova, M. (2010). Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117(6), 248-252. <https://doi.org/10.1007/BF03356369>
- Niell, S., Pareja, L., Geis Asteggiante, L., Roehrs, R., Pizzutti, I. R., García, C., Heinzen, H. y Cesio, M. V. (2010). Development of methods for multiresidue analysis of rice post-emergence herbicides in loam soil and their possible applications to soils of different composition. *Journal of AOAC International*, 93(2), 425-431.
- Oxley, S. J. P. y Havis, N. D. (2010, 2 de octubre). Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting. HGCA Project Rep. 463. <http://www.hgca.com/media/267653/pr463.pdf>
- Palladino, C., Pareja, L., Pérez, C. A. y Pereyra, S. A. (2019, 19-24 de mayo). Do fungicide applications for the control of *Ramularia* leaf spot affect food safety in barley grains? [contribución]. 14th IUPAC International Congress of crop protection chemistry, Ghent
- Palladino, C., Pareja, L., Pérez, C. A. y Pereyra, S. A. (2023). Problems of pesticide residues in grains. *Agrociencia (Uruguay)*, 27(Supplement), e1230. <https://doi.org/10.31285/AGRO.27.1230>
- Palladino, C., Pérez, C. A. y Pereyra, S. A. (2019, 27-30 de agosto). Quantification of the inoculum of *Ramularia collo-cygni* on barley seed in two growing seasons in Uruguay [póster]. 51^o Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife.
- Palladino, C., Puigvert, F., Muela, A., Taborda, B., Pérez, C. A., Pérez-Parada, A. y Pareja, L. (2021). Evaluation of *Fusarium* mycotoxins and fungicide residues in barley grain

- produced in Uruguay. *Journal of Agriculture and Food Research*, 3, 100092. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100092>
- Palladino, C., Tejera, M., Pareja, L., Pérez, C. A. y Pereyra, S. A. (2017, 5-7 de abril). *Strategies to manage Ramularia leaf spot with fungicides* [contribución]. Rabat. <http://iwblidicarda2017.com/international-workshop-on-barley-leaf-diseases/>
- Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J. y Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1697-1714. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1610-7>
- Peloché, D., Benítez, N., Pareja, L., Bentancur, O. y Palladino, C. (2020). Toma de decisiones e inocuidad: el caso de productores de cebada en Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*, 24(NE1), 347. <https://doi.org/10.31285/agro.24.34>
- Pereyra, S. A. (2013). *Herramientas para un manejo inteligente en trigos y cebadas*. INIA.
- Pereyra, S. A. y Germán, S. (2014, 30-31 de octubre y 1 de noviembre). Relevancia y manejo de las enfermedades de cebada en Uruguay [contribución]. *Congreso Latinoamericano de Cebada Cervecera, IV*. Bahía Blanca.
- Pereyra, S. A. y González, N. (2023, 15 de febrero). Caracterización de fungicidas evaluados por INIA según su eficiencia para el control de distintas enfermedades en trigo y cebada. <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estrategia/Caracterizaci%C3%B3nSanitaria/Fungicidas%20TRIGO%20y%20CEBADA%20marzo%202023.pdf>
- Pereyra, S. A. y Pérez, C. A. (2017). Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. *Revista Cangüé*, 38, 13-18.
- Pereyra, S. A., Erreguerena, I., Couterot, L., Pérez, C. A., Palladino, C. y Havis, N. D. (2017, 5-7 de abril). *Upsurge of Ramularia leaf spot in South America* [póster]. Rabat. <http://iwblidicarda2017.com/international-workshop-on-barley-leaf-diseases/>
- Pereyra, S. A., González, S., Palladino, C., Pérez, C. A. (2021). Avance en el conocimiento para el manejo de Mancha en red y ramulariosis en cebada. 1a. Jornada Nacional de Cultivos de Invierno, 07 - 08/04/2021.

https://fucreea.org/system/comfy/cms/files/files/000/001/490/original/Manejo_de_mancha_en_red_y_ramulariosis_en_cebada_C.P%C3%A9rez.pdf

- Pihlström, T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U. y Osterdahl, B. G. (2007). Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1773-1789. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1425-6>
- Piotrowska, M. J., Fountaine, J. M., Ennos, R. A., Kaczmarek, M. y Burnett, F. J. (2017). Characterisation of *Ramularia collo-cygni* laboratory mutants resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Pest Management Science*, 73, 1187–1196. <https://doi.org/10.1002/ps.4442>
- PPDB. Pesticide Properties Database. (2020, 15 marzo). Creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>
- Rehfus, A., Matušinsky, P., Strobel, D., Bryson, R. y Stammer, G. (2019). Mutations in target genes of succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors in *Ramularia collo-cygni* in Europe. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(5), 447–459. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00246-4>
- Rejczak, T., y Tuzimski, T. (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13(1), 000010151520150109. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>
- Retman, S., Melnichuk, F., Kyslykh, T. y Shevchuk, O. (2022). Complex of barley leaf spots in Ukraine. *Chemistry Proceedings MDPI*, 4, 2-4. <https://doi.org/10.3390/IOCAG2022-12290>
- Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J. y Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils-A hidden reality unfolded. *The Science of the total environment*, 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Stam, R., Sghyer, H., Tellier, A., Hess, M. y Hüchelhoven, R. (2019). The Current Epidemic of the Barley Pathogen *Ramularia collo-cygni*. Derives from a Population Expansion and Shows Global Admixture. *Phytopathology*, 109, 2161-2168.
- Stewart, S. (2001). *Manchado necrótico en cebada*. INIA.

- Sugeng, A. J., Beamer, P. I., Lutz, E. A. y Rosales, C. B. (2013). Hazard-ranking of agricultural pesticides for chronic health effects in Yuma Country, Arizona. *The Science of the total environment*, 463-464, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.051>
- Sutton, B. y Waller, J. (1988). Taxonomy of *Ophicladium hordei* causing leaf lesions on *Triticale* and other *Graminutesae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 90, 55-61.
- Taylor, J. M. G., Paterson, L. J. y Havis, N. D. (2010). A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 50, 493-499. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02826.x>
- Walters, D. R., Havis, N. D., Paterson, L., Taylor, J., Walsh, D. J., Sablou, C. (2014). Control of foliar pathogens of spring barley using a combination of resistance elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5, 241. 1-9.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415-21.
- Zamani-Noor, N. (2011). *Studies on Ramularia Leaf Spots on Barley - Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity*. [tesis de Ph.D.]. Georg-August-University Göttingen.
- Zhang, C., Zhou, T., Xu, Y., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J. y Zhu, L. (2020). Ecotoxicology of strobilurin fungicides. *The Science of the total environment*, 742, 140611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140611>
- Zhang, J., Wu, Y. y Lu, Y. (2013). Simultaneous Determination of Carbamate Insecticides and Mycotoxins in Cereals by Reversed Phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Using a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe extraction procedure. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 915-916, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.016>