

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de herramientas para el estudio de Ramulariosis en cebada y alternativas para su manejo

Código de proyecto ANII: FMV_1_2017_1_136660

02/11/2021

PEREYRA CORREA, Silvia Antonia (Responsable Técnico - Científico)

PALLADINO ALMADA, Maria Cintia (Investigador)

PÉREZ RODRÍGUEZ, Carlos Alberto (Investigador)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE

Resumen del proyecto

La ramulariosis es causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc) y ocasiona mermas en rendimiento y calidad física de grano hasta 70 y 90%, respectivamente. La principal medida de manejo disponible para esta enfermedad es la utilización de fungicidas foliares, llevando a incrementos en los costos de producción. El objetivo de este proyecto fue contribuir al manejo integrado de Rcc en cebada, minimizando la interferencia de la enfermedad en la cadena agroindustrial, optimizando el uso de fungicidas. Los objetivos específicos son a) ajustar un método de detección y cuantificación de Rcc en semilla mediante PCR a tiempo real (qPCR), b) determinar la transmisión de Rcc vía semilla en diferentes lotes y c) optimizar la estrategia de manejo químico para la enfermedad. Para el cumplimiento de los objetivos se realizó un ajuste de la técnica qPCR para detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula. Con dicha técnica se evaluaron diferentes lotes de semillas y 2 fungicidas curasemilla para el control de Rcc. Para el ajuste de estrategias de manejo con fungicida se instalaron experimentos en dos zonas y en dos años consecutivos. Luego de la cosecha se calculó nivel de enfermedad, rendimiento en grano y eficiencia de control de los diferentes tratamientos químicos. La metodología de diagnóstico ajustada contribuyó en la generación de semilla de alta calidad, permitió la evaluación de lotes de semillas y fungicidas curasemilla. Los resultados de este proyecto contribuyeron conocimientos en la epidemiología de la enfermedad en nuestras condiciones y asistirán en el manejo de la misma. Esta información, generará un impacto positivo en términos de mejoramiento de la calidad de la producción de cebada cervecera en Uruguay.

Palabras claves: inóculo en semilla, qPCR, *Ramularia collo-cygni*.

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agronomía, reproducción y protección de plantas / Fitopatología

Palabras clave: *Ramularia* / cebada / manejo /

Introducción

La ramulariosis se considera la principal limitante biótica de la producción de cebada de Uruguay. Causa pérdidas de rendimiento de grano de hasta 70% (Pereyra, 2013a). Uno de los componentes que más se ve afectado es el tamaño de grano (calibre), registrándose pérdidas en rendimiento de 1era+2da (granos mayores a 2,5 mm) que alcanzan valores de 90% (Pereyra, 2013b; Havis et al, 2020).

Esta enfermedad fue detectada por primera vez en el país en la zafra 2000 por Stewart (2001) y su importancia ha incrementado tanto en el cono sur como en otras regiones del mundo (Havis et al., 2015a; Oxley y Havis, 2004). Actualmente, no hay cultivares con resistencia genética suficiente capaces de minimizar los efectos de la ramulariosis. Si bien se ha encontrado variabilidad entre cultivares en relación a su comportamiento frente a la enfermedad, los mismos presentan susceptibilidad intermedia a alta, limitando la eficiencia de esta medida de manejo (Leistrumaite y Liatukas 2006; Brown y Makepeace, 2009; Havis et al., 2012; Pereyra, 2013a).

Ramularia collo-cygni (Sutton y Waller; Rcc) es un hongo necrotrófico, con capacidad de alimentarse y permanecer asociado al rastrojo de cebada (Havis et al., 2012; Pereyra, 2013a; 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, así como tampoco se ha cuantificado la capacidad de diseminación aérea de este patógeno. A pesar de que se disemina entre chacras, la principal fuente de inóculo es la semilla, posee vital importancia en el manejo de esta enfermedad (Havis et al., 2006a, b, 2014).

Hasta el momento no existe ningún fungicida curasemilla con demostrada eficiencia de control de Rcc, así como tampoco un tratamiento físico y/o químico que reduzca significativamente el nivel del patógeno (Pereyra, 2013a; Pereyra, 2013b, Havis et al., 2012). La principal limitante para el uso de esta herramienta de manejo es la falta de un método práctico de evaluación de fungicidas-curasemilla que permita comparar la eficiencia de distintas moléculas.

La dificultad de detectar la presencia del patógeno en plántulas ha limitado la evaluación de eficiencia de fungicidas-curasemillas. Los métodos estándares como Blotter test, deep freezing o siembra en medio de cultivo específico eficientes para la detección de otros patógenos no han brindado resultados consistentes para el caso de Rcc (Havis et al., 2015; Gonzalez et al. 2019). Esto representa una gran limitante, ya que hay una estrecha correlación entre la severidad de infección en la semilla y la transmisión del patógeno a la plántula (Newel, 1997).

Por esta razón, a nivel internacional se han desarrollado métodos de análisis molecular que permiten determinar la

presencia (Havis et al., 2006a, Havis et al., 2006b; Taylor et al., 2010; Matusinsky et al., 2011) y cuantificar indirectamente el nivel de infección basado en la concentración de ADN de Rcc en la semilla (Taylor et al., 2010; Havis et al., 2015). Sin embargo, este último método (cuantitativo) no ha sido ajustado en Uruguay, y actualmente no se encuentra disponible para el sector productivo (Pereyra, 2013b).

El ajuste de técnicas moleculares para la detección y cuantificación de Rcc representaría una valiosa herramienta, ya que el diagnóstico de ramulariosis suele ser difícil y tardío. Generalmente, en las primeras etapas del cultivo (emergencia a principio de espigazón) el hongo se encuentra asintomático creciendo en forma sistémica. A partir de encañazón, se pueden observar manchas difusas sobre hojas basales cloróticas, mientras que a partir de floración se observan los síntomas típicos que son pequeñas lesiones necróticas puntiformes, de color pardo oscuro, rodeadas por un halo clorótico, esparcidas sobre el haz y el envés de la lámina. Estas manchas pueden expandirse y cubrir rápidamente toda la superficie de la hoja, formando grandes zonas necróticas (Carmona et al., 2013, Havis et al., 2015; Pereyra, 2013a; Pereyra, 2013b; Havis et al., 2004). La producción de toxinas Rubellinas por parte de Rcc, pueden causar un secado rojizo y senescencia prematura en plantas (Havis et al., 2015a).

En ocasiones, estas manchas pueden confundirse con aspectos nutricionales o con otras manchas tanto bióticas como de origen fisiológico. En general aparecen mezcladas con síntomas causados por otros patógenos dificultando aún más su diagnóstico (Harvey, 2002; Carmona et al., 2013). El método de detección ayudaría además a aplicar prácticas de manejo recomendadas internacionalmente, como 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 indicando contener menos de 1 pg de ADN de Rcc por 100 ng de ADN total (Havis et al., 2015a).

Actualmente en Uruguay, la falta de un método que cuantifique el nivel de infección de la semilla, así como la escasa resistencia genética presente en los cultivares comerciales, han determinado un ajuste rápido de estrategias de manejo por aplicación foliar de fungicidas. A su vez, el desarrollo explosivo de la enfermedad y la baja eficiencia de los fungicidas cuando los niveles de infección son elevados han llevado a que la intervención con fungicidas se realice en general, ante la aparición de los primeros síntomas (Carmona et al., 2013; Havis et al., 2015a; Pereyra, 2013a).

Los productos recomendados a nivel internacional son mezclas con carboxamidas, estrobirulinas y triazoles (Sachs, 2006, Oxley et al., 2006; Pereyra, 2013a). El momento de aplicación es clave para el buen control de la mima y es a primera detección considerando el clima (Pereyra y Pérez, 2017). En los últimos años, en Europa se ha reportado pérdida de sensibilidad de Rcc a los principales grupos de fungicidas utilizados para el control de ramulariosis (Matusinsky et al., 2010; Fountaine y Fraaije, 2009; Taylor et al., 2014; Piotrowska et al., 2017; Havis et al., 2018; Rehfus et al., 2019). Rcc ha adquirido resistencia a esos grupos de fungicidas incluso cuando eran aplicados en conjunto con un fungicida multisitio, clorotalonil (Havis et al., 2020). Desde mayo 2020, el uso de clorotalonil está prohibido en la Unión Europea (UE, 2019).

En Uruguay y Argentina, los principales grupos para el control de enfermedades en cebada comprenden carboxamidas, estrobirulinas y triazoles. A nivel comercial, se encuentran en mezclas simples o triples, y su uso se incluye para el control de ramulariosis (Pereyra y Pérez, 2017). Sin embargo, la población de Rcc presente en el país posee resistencia a las estrobilurinas, y por tanto no son efectivas en el control de ramulariosis. Dada la situación internacional (especialmente en Europa) con mayor frecuencia de individuos con resistencia o sensibilidad reducida a los tres grupos, y germoplasma susceptible a moderadamente susceptible a ramulariosis, principalmente de origen europeo, se debe optimizar el uso los mismos para prevenir la generación de resistencia

El uso de fungicidas puede incluir beneficios económicos y productivos. Sin embargo, existen muchos reportes que establecen su impacto negativo sobre la salud del consumidor y el ambiente, aumentando las probabilidades de encontrar residuos de fungicidas en los granos (Strada et al., 2012), a pesar de que no se recomiendan aplicaciones de fungicidas más allá de comienzo de llenado de grano (Pereyra, 2013a). En los últimos años, se ha registrado un aumento en la dependencia del uso de fungicidas para el manejo de las enfermedades en cebada, siendo en este caso la única medida de manejo disponible para el productor.

La presente propuesta buscó desarrollar un método que permita determinar el inóculo en distintos lotes de semilla, permitiendo descartar aquellos con alta presión de inóculo. Dicho método permitirá a su vez evaluar la eficiencia de distintas alternativas de fungicidas curasemillas que permitan minimizar los niveles de infección en la semilla. Sobre la hipótesis de que la semilla es la principal fuente de inóculo, la identificación de lotes con bajos niveles de infección permitiría una mayor eficiencia en el uso de fungicidas-curasemillas, Esto resultaría en cultivos más sanos, con menor necesidad de aplicaciones de fungicidas foliares, menor costo de producción, impacto ambiental, y sin reducir la producción y la calidad del producto final.

El objetivo general de este proyecto fue desarrollar estrategias de manejo que reduzcan el riesgo del desarrollo de ramulariosis en cultivos de cebada. Se pretendió minimizar el inóculo inicial de Rcc en semilla, enfatizando en la reducción

de la dependencia de fungicidas foliares.

Los objetivos específicos incluyeron:

OE1. Ajustar un método de detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula mediante qPCR.

OE2. Determinar la importancia de la semilla como fuente de inóculo de Rcc en el cultivo

OE3. Estimar la eficiencia de control de distintos curasemillas sobre el inóculo de Rcc en semilla de cebada y su impacto sobre el desarrollo de la ramulariosis en primeras etapas de desarrollo del cultivo

OE4. Estimar el impacto del inóculo en la semilla sobre la eficiencia en el uso de fungicidas foliares

Este proyecto buscó:

*Ajustar y validar un método de cuantificación del nivel de infección de Rcc en la semilla (OE1), mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). A nivel internacional se desarrolló la metodología y se establecieron niveles de referencia para contenido de Rcc en semilla (Taylor et al., 2010; Havis et al., 2015). Estos se ajustarán/validarán para las condiciones de Uruguay. Esta herramienta permitirá segregar lotes de semilla y utilizar esta información para el manejo de la enfermedad mediante el uso de semilla con menores niveles de infección y el descarte de semilla con niveles elevados de infección. Este protocolo es de aplicabilidad inmediata y representaría un producto fácilmente transferible al sector.

*Caracterización del nivel de infección de la semilla en el sector (OE2). Una vez ajustado el método, se procedió a validar el mismo en distintos lotes de semilla de distintos cultivares, localidades y producida en cultivos con distintos niveles de ramulariosis, lo cual va a permitir tener una estimación de la importancia de los niveles de infección en una muestra de la semilla comercial de las tres safras que se analizarán. Conocer los niveles de infección en la semilla comercial permitirá una estimación de la importancia de la semilla como fuente de inóculo, y evaluar la posibilidad de obtener niveles con bajos o nulos niveles de infección.

Esta caracterización será una transferencia de tecnología y en etapas posteriores podría aportar a una normativa regulatoria donde semilla que supere determinado nivel de infección no podrá ser comercializada.

*Metodología para la evaluación de la eficiencia de fungicidas curasemillas para el control de Rcc (OE3) será un aporte sustantivo del presente proyecto. Actualmente no es posible evaluar la eficiencia de distintos fungicidas curasemilla en el control de este patógeno. La posibilidad de detectar la presencia de ADN de Rcc en los tejidos de la plántula hacen que la detección del patógeno sea independiente de la expresión del síntoma de la enfermedad, punto fundamental en un patosistema donde la enfermedad tiene una etapa asintomática de importancia como este caso. La aplicación de distintos fungicidas en una semilla con infección de Rcc conocida, y posterior análisis de la presencia del patógeno en la plántula permitirá estimar la eficiencia del curasemilla en la disminución de la transmisión del patógeno de la semilla a la plántula. Esta metodología podría ser utilizado en un futuro para nuevas moléculas e incluso otros patosistemas, y generará tecnología transferible de aplicabilidad inmediata.

*La determinación de la importancia del inóculo en la semilla sobre el desarrollo y manejo de epifitias de ramulariosis (OE4) aportará información fundamental en la valoración epidemiológica de la semilla. Estimar la brecha generada por la adición de tecnologías y evaluar la eficiencia adicional de cada herramienta es información fundamental al momento de la toma de decisiones. Esta tecnología será transferible inmediatamente al sector, y aportará conocimiento para la minimización del impacto de ramulariosis en cebada.

Metodología/diseño del estudio

*OE1. Puesta a punto de PCR en tiempo real para Rcc

- Extracción de ADN de cepa de Rcc

Se utilizó una cepa de Rcc (Rcc3) de la colección del Laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela para la extracción de ADN, mediante el método CTAB (Cerdeira-Granados y Díaz, 2013). Luego se estimó la concentración de ADN, mediante espectrofotometría (espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific) determinando la concentración y la pureza de la muestra de ADN. Inmediatamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con GoodView como indicador de tinción, a 28 V, 150 mA durante 1 h. Se reveló bajo visualizador de geles (ENDURO GDS TOUCH Labnet International, Inc.).

- Extracción de ADN de semilla y plántula

Se seleccionaron cuatro lotes de semilla de la variedad INIA Arrayán, caracterizada como de susceptibilidad intermedia-alta frente a ramulariosis según Castro et al. (2018). A partir de una muestra de 150 g de cada lote de semilla se molió hasta obtener una harina fina con un molino universal (IKA M20). De la muestra molida se extrajo 0,1 g para luego realizar las extracciones de ADN según el método adaptado de Arruabarrena et al. (2018).

La extracción de ADN de plántulas se realizó con el método CTAB adaptado de CIMMYT (2005) partiendo de la liofilización

de las mismas. Luego de la extracción de ADN total de semilla y plántula se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher scientific), siguiendo las instrucciones suministradas por el proveedor.

Condiciones de PCR en tiempo real

El método de PCR en tiempo real se llevó en un volumen total de 20 microl. La reacción contenía los siguientes componentes: 10 μ l de qPCR Universal MMIX II (Qiagen, Alemania), 1,6 μ l de cebador directo y reverso (150 nmol; 10 μ l), 0,3 (10 microl) de sonda Ramularia (Qiagen), 3,1 microl de agua miliQ estéril y 5 μ l (20 ng/ μ l) de plantilla 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. (2010).

Se realizaron dos amplificaciones simultáneas para cada muestra para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Para las reacciones de control negativo (sin plantilla), se substituyó el ADN por agua libre de nucleasas. El ciclo de amplificación consistió en un ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C. Luego una fase de extensión de 1 min a 95°C. La reacción se llevó a cabo en un equipo StepOne, Corbett Life Science. La emisión de fluorescencia se midió en la fase de recocido. Los ciclos de umbral se calcularon automáticamente con el software StepOne (versión 2.3).

Se desarrolló una curva estándar con diluciones seriadas de uno en cinco de la solución del ADN genómico de Rcc en agua. El rango de concentraciones utilizado fue entre 2 ng a 0,64 pg 20 μ l⁻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 del logaritmo de la concentración de ADN. Se determinó la linealidad, la eficiencia y el rango dinámico.

Además, 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. A estas muestras se añadieron diferentes cantidades de ADN genómico de Rcc (0,1 y 0,01) y cada muestra se sometió a la PCR en tiempo real. Además, se incluyeron dos blancos y diluciones hechas con agua para comparar los Ct obtenidos en cada caso y así determinar si existe inhibición de la matriz.

Detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula

Para detección y cuantificación de Rcc en semilla, se seleccionaron cuatro lotes de semilla de la variedad INIA Arrayán, caracterizada como de susceptibilidad intermedia- alta frente a ramulariosis (Castro et al., 2018). Las muestras de lotes de semilla provinieron de cultivos con diferentes momentos / números de aplicaciones de fungicidas para el control de ramulariosis.

Para detección y cuantificación de Rcc en plántula, se seleccionaron dos lotes de semilla de cebada de la variedad INIA Cronos (CLE 280) con niveles de infección alto de Rcc (lote 1: 48,9 pg/100 ng ADN total y lote 2: 22,6 pg/ 100 ng ADN total). Esta variedad ha sido caracterizada como de susceptibilidad intermedia frente a ramulariosis (Castro et al., 2018).

Los lotes fueron sembrados en una bandeja de 28 cm de largo por 15 de ancho, con 400 semillas por bandeja, dispuestas en línea y entre pliegues de papel de filtro humedecidos con agua, de modo tal de permanecer constantemente humedecidos. Las bandejas fueron colocadas en una cámara de germinación a 21 \pm 2 °C con ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, durante tres semanas. Luego de tres semanas de incubación y cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas, éstas se cortaron con tijera a una altura de un centímetro por encima de la semilla. El material vegetal congelado se liofilizó (BW10) durante 12 h antes de realizar las extracciones de ADN.

*OE2. Importancia del inóculo de Rcc en semilla en Uruguay

Se evaluaron 47 lotes de semilla de la zafra 2016/2017 y 103 lotes de la zafra 2017/2018. Las muestras provenían de la principal zona productora de cebada de Uruguay (litoral noroeste). De cada lote se tomó una muestra representativa del mismo de 150 g y se realizó la extracción de ADN total de la semilla siguiendo la metodología de Anabarruena et al. (2011). Con el ADN total de semilla se realizó la cuantificación de ADN de Rcc en el total de ADN de la semilla mediante la técnica de qPCR y el resultado de la misma se tomó como el nivel de infección de Rcc en semilla expresado en pg de ADN de Rcc en semilla / 100 ng de ADN total de semilla.

El método de PCR en tiempo real se realizó con 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). La mezcla de reactivos y ciclo de amplificación fue el mismo que el utilizado por Taylor et al. (2010). La reacción se llevó a cabo en un equipo StepOne, Corbett Life Science. La emisión de fluorescencia se midió en la fase de recocido. Los ciclos de umbral se calcularon automáticamente con el software StepOne (versión 2.3). El rango de concentraciones de la curva estándar fue de 2 ng a 0,64 pg 20 μ l⁻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 del logaritmo de la concentración de ADN. Se determinó la linealidad, la eficiencia y el rango dinámico.

Relación entre el nivel de inóculo de Rcc en la semilla y las condiciones climáticas durante el cultivo

Se realizó una base de datos con las variables climáticas (radiación solar, humedad relativa, temperatura media y precipitación acumulada) considerando los tres períodos de estudio: 1. siembra a Z30, 2. Z30-Z49 y 3. Z49 a cosecha. Los datos de fecha de siembra, variedad y localidad fueron suministrados por los productores al momento de la colecta de las muestras de los lotes de cebada. Los datos del clima fueron tomados de las bases de datos de las estaciones agrometeorológicas de INIA y de Facultad de Agronomía.

Relación entre la severidad de ramulariosis y el nivel de Rcc en grano cosechado.

Se seleccionaron 14 lotes de semillas con sus 4 repeticiones en 2 años consecutivos, con diferente nivel de severidad de ramulariosis en Z49. Se cuantificó la concentración de ADN de Rcc en cada lote, lo cual permitió estimar la relación entre niveles de infección de Rcc a campo y en grano cosechado. La cuantificación se llevó a cabo con los parámetros detallados en el punto 2.1.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat® (ver. 2020I; Centro de Transferencia InfoStat, Córdoba, Argentina). Se realizó un análisis de varianza del nivel de infección de Rcc en semilla para cada zafra por separado y luego se realizó la separación de medias se realizó con LSD ($p = 0.10$).

Con los datos de clima de las diferentes zafras y el nivel de infección de Rcc en semilla expresado como pg ADN-Rcc/100 ng ADN total en semilla (variable dependiente) se realizó un árbol de clasificación – regresión con suma de cuadrados corregida con mínimo tamaño del nodo 20. Además, se realizó una correlación con los datos de AUDPC a nivel de campo y el nivel de Rcc en grano cosechado, (expresado como pg ADN-Rcc/100 ng ADN total en semilla).

*OE3. Evaluación de la efectividad de fungicida curasemilla en el control de *Ramularia collo-cygni*

Diseño experimental

Para evaluar el efecto del fungicida curasemilla sobre el inóculo de Rcc en la semilla, se seleccionaron dos lotes de semilla de cebada con nivel de infección de Rcc según los parámetros internacionales (Havis et al., 2015a). Ambos lotes correspondieron a la variedad INIA Cronos (CLE 280), caracterizada como de susceptibilidad intermedia frente a ramulariosis (Castro et al., 2018). Se evaluaron seis tratamientos, en un diseño factorial completo de dos factores: nivel de infección y fungicida curasemilla. El nivel de infección con dos niveles: muy alto (lote 1: 48,9 pg/100 ng ADN total) y alto (lote 2: 22,6 pg/ 100 ng ADN total). El fungicida curasemilla presentaba tres niveles: sin fungicida curasemilla, fluxapiraxad (333 g de p.a. /L) + triticonazol (100 g de p.a./L) y carbendazim (200 g de p.a. /L) + tiram (200 g de p.a. /L) + iprodiona (100 g de p.a. /L). La dosis utilizada fueron las recomendadas según proveedores.

El diseño del experimento fue de bloques completos aleatorizados, con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió en una bandeja de 28 cm de largo por 15 de ancho, con 400 semillas por bandeja, dispuestas en línea y entre pliegues de papel de filtro humedecidos con agua, de modo tal de permanecer constantemente humedecidos. Las bandejas fueron colocadas en una cámara de germinación a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, durante tres semanas.

Cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas, se realizó la colecta de las mismas con tijera a una altura de un centímetro por encima de la semilla. Luego, el material vegetal se liofilizó (BW10) durante 12 h antes de realizar las extracciones de ADN con el método CTAB adaptado de CIMMYT (2005).

Cuantificación de ADN de Rcc los tratamientos fungicidas-curasemillas

La cuantificación se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente ajustado en el OE1, utilizando los cebadores: RamF6 (CGT CAT TTC ACC ACT CAA G), RamR6 (CCT CTG CGA ATA GTT GCC) y la sonda Ram6 (FAM-GCG ATT CCG GCT GAG CGG TTC GTC ATC GCG-BHQ-1), sintetizados por Invitrogen® (California, EEUU). El ciclado de qPCR fue: 10 min a 95°C , 50 ciclos de 95°C durante 20 s, 55°C durante 20 s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 1 min a 95°C . Dicho análisis se realizó en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR.

La curva presentó un rango de concentración de 0,4 ng/?L y 0,064 pg/?L. Las muestras de ADN de plántula de cada tratamiento fueron también evaluadas por duplicado. Además, se incluyeron dos blancos conteniendo agua miliQ estéril (Qiagen).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para los tratamientos utilizando el programa InfoStat (ver. 2020I; Centro de

Transferencia InfoStat, Córdoba, Argentina).

OE4 -Efecto del inóculo en la semilla sobre la eficiencia en el uso de fungicidas foliares

Se llevaron a cabo experimentos de campo en dos localidades (INIA La Estanzuela, departamento de Colonia y Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), departamento de Paysandú) durante 2018 y 2019. Se evaluó el efecto de tres factores: nivel de inóculo de Rcc en semilla (baja y alta infección en 2018; alta y muy alta en 2019 según cuantificación por qPCR ajustado en este proyecto), curasemilla (sin y con fungicida con carboxamida: 75 ml fluxapiraxad + triticonazol cada 100 kg de semilla) y fungicida foliar en tres niveles (sin fungicida, aplicación tecnológica según detección y protección total cada 21 días) con un diseño BCA con arreglo de factorial completo. Se conservaron muestras de plántulas y grano en freezer para cuantificación de Rcc por qPCR. Se realizaron lecturas periódicas de severidad e incidencia de ramulariosis y otras manchas foliares en al menos dos momentos, rendimiento de grano, peso de mil granos, clasificación de 1^a+2^a. Se contó con datos parciales de los experimentos (ver anexo II).

Resultados, análisis y discusión

OE1.

Puesta a punto de PCR en tiempo real para Rcc

La reproducibilidad de los datos del ensayo fue buena, ya que la variación de los Ct de las tres replicadas era baja (Cuadro 1, Figura 1). La pendiente de la curva estándar que muestra la eficiencia de la amplificación fue de -3,336, lo que indica que la eficiencia de amplificación fue buena. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99 lo que muestra una gran proximidad de ajuste entre la línea de regresión y los puntos Ct individuales de la reacción estándar. La intercepción con el eje y (Y-inter), en este caso es de 23,192.

Figura 1; Cuadro 1 (Anexo 1)

No se observó inhibición del qPCR por las matrices, ni interferencia en la cuantificación del ADN de las muestras. Esto indica que la sensibilidad del ensayo no se vio afectada por la presencia del ADN de la semilla o la plántula (Cuadro 2). El Ct obtenido en presencia de extracto de las matrices fue similar al Ct obtenido en presencia de agua, y las diferencias de Ct se encontraron dentro del error del método.

Cuadro 2 (Anexo1)

Detección y cuantificación de Rcc en semilla y plántula

Se logró detectar y cuantificar el ADN de Rcc presente en muestras de semilla y plántula (Cuadro 3). Los lotes de semillas mostraron diferentes niveles de concentración, lo que era esperable ya que provenían de diferentes situaciones de chacra. En cuanto a las plántulas, se logró cuantificar el nivel de Rcc en las mismas a pesar de que éstas no presentaban síntomas visibles de ningún patógeno. Los lotes de semilla sembrados presentaban altos niveles de ADN de Rcc en los lotes de semilla, pero se logró cuantificar niveles inferiores en plántulas provenientes de esos lotes.

Cuadro 3 (Anexo 1)

La puesta a punto del método de qPCR confirma lo estudiado por Taylor et al. (2010) y Zamani-Noor (2011), pudiendo detectar el ADN de Rcc en hojas y semilla aun cuando los síntomas visibles de ramulariosis están ausentes.

La implementación de estos métodos de diagnóstico contribuirá al manejo más eficiente de la enfermedad. Antes de la siembra, ayudará a realizar usos diferenciales de los lotes de semilla considerando los valores de referencia de pg de ADN de Rcc en 100 ng de ADN de semilla mencionados en la literatura internacional (Havis et al., 2015). En base a ellos se podrá descartar lotes con alta carga de ADN de Rcc para siembra y se podrán utilizar para otros usos como alimento animal.

Luego de sembrado el cultivo, en las etapas de iniciales del mismo (cercano a macollaje), se podrá con dicha metodología realizar una detección temprana de la enfermedad en cultivos asintomáticos. Lo que permitirá definir el momento de intervención química, evitando una aplicación de forma preventiva sin tener presente la enfermedad, o una aplicación tardía, con niveles de infección muy elevados, que limitan la respuesta al tratamiento y condicionan tanto su eficiencia como su residualidad (Pereyra y Pérez, 2017). También, la metodología permitirá confirmar síntomas que pueden confundirse con agentes abióticos u otros patógenos y que en cámara húmeda no llegan a formar micelio, ni esporular.

*OE2. Nivel de inóculo de Rcc en la semilla en dos zafros en Uruguay

Se cuantificaron los niveles de inóculo de Rcc de lotes comerciales de semilla a nivel nacional en dos zafros epidemiológicamente contrastantes para el desarrollo de la ramulariosis (2016/17 y 2017/18). Para la zafra 2016/17, el promedio de los lotes presentaba un 3,2 pg ADN de Rcc/100 ng total ADN de la semilla, mientras que en la zafra 2017/18 el promedio fue de 12,9 pg ADN de Rcc/100 ng total ADN de la semilla, representando casi tres veces más que la zafra anterior (Figura 2). Lo que muestra un aumento del nivel de ADN de Rcc detectado en semilla.

Figura 2 (Anexo 1)

Según las recomendaciones internacionales para el manejo de ramulariosis que se basan en la implementación del método de detección y cuantificación mediante qPCR como clasificador de lotes de semillas, indican que aquellos lotes que presentan menos de 1-5 pg de ADN de Rcc en 100 ng de ADN total podrían considerarse aptos para su uso como semilla (Oxley y Havis, 2010; Havis et al., 2015a).

Considerando estos límites, los resultados obtenidos en este proyecto muestran que el 40 % de los lotes relevados y analizados de la zafra 2016/17 presentaron niveles aptos para ser sembrados comercialmente (menor a 1 pg ADN de Rcc/100 pg total ADN total), mientras que esta categoría representó el 30 % en los lotes relevados de la zafra 2017/18 (Figura 3).

Figura 3 (Anexo 1)

Si se considera el porcentaje de lotes de semilla > 1 pg ADN-Rcc/100 pg total ADN, en la zafra 2017/18 representaban el 70%, mientras que en la zafra anterior representaban el 59 % del total de lotes evaluados. Este aumento podría estar dado porque se utiliza semilla de zafros anteriores, sin conocer la carga fúngica con respecto a Rcc y no hay fungicida curasemilla con eficacia demostrada para éste patógeno (Havis et al., 2018). Además, el año 2017 fue más conductivo para la enfermedad, con más días con eventos de lluvias y mayores niveles de precipitación acumulada. Siendo estos factores de estrés desencadenantes de las epidemias de RLS (McGrann et al., 2018; Hoheneder et al, 2021).

En países donde la enfermedad es una problemática (Escocia e Inglaterra), Havis et al. (2014), analizaron muestras de semilla en los años 2007 a 2011, mediante qPCR, en donde observaron una gran variación en la concentración de ADN de Rcc (0,8 - 25,8 pg de ADN Rcc/100ng ADN total). Estas concentraciones son menores a los reportados por Oxley y Havis (2010), para los mismos países.

Relación entre el nivel de inóculo de Rcc en la semilla y las condiciones climáticas durante el cultivo

El árbol de regresión mostro dos grandes grupos (Figura 4) los cuales se separaron por las fechas de siembra, grupo 1 <=12/6/2017 y grupo 2 con fecha posterior al 12/6/2017. Dentro de este grupo, la temperatura en el segundo periodo <=16°C y lluvias totales de >280 en el periodo 1 dan los mayores niveles de infección de Rcc en semilla.

Dentro del grupo 2, se diferencian con los milímetros de agua caída > 255 mm en el segundo período en análisis, mostrando mayores niveles de infección.

Figura 4 (Anexo 1)

Si bien la humedad relativa (% HR) no figuro como una variable de clasificación del árbol de regresión, cuando es analizada independiente en los tres períodos por separado, mostro que HR >81% muestran un nivel de infección de Rcc mayor que a menor HR para el año 2017. En cambio, en el año 2016 no se observó diferencias.

Si bien los datos son preliminares se podría decir que las condiciones de estrés del cultivo en las primeras etapas de crecimiento del mismo (de siembra a Z49) son condicionantes para la generación de una epifita y por ende la generación de inóculo en semilla.

Determinar la relación entre el nivel de enfermedad, la cantidad de Rcc en grano cosechado y el clima.

Si bien no hay una asociación estrecha y significativa entre el nivel de infección de Rcc en semilla medido como pg ADN-Rcc/100 pg total ADN y la cantidad de severidad en Z49, hay una tendencia a mayor severidad a mayor nivel de infección de Rcc en semilla ($R^2=0,1$; p-valor < 0.0001, Figura 5).

Figura 5, Cuadro 4 (Anexo 1)

Estudios realizados utilizando esta metodología basada en qPCR en planta por Taylor et al. (2010), encontraron una relación entre los síntomas visuales de la enfermedad y el nivel de ADN del Rcc en la planta ($R^2=0,79$), medido mediante qPCR. Del mismo modo en otros estudios (Matusinsky et al., 2011; Zamani-Noor, 2011) obtuvieron resultados similares, en los que se indica una relación positiva y significativa entre la evolución de la severidad de la enfermedad y la cantidad de ADN de Rcc determinados por qPCR. Además, Havis et al. (2014) en ensayos de campo en los que se sembraron tres variedades Cocktail, Decanter y Optic, encontraron una correlación lineal entre los síntomas visuales de la enfermedad y el nivel de ADN de Rcc, de 0,89 y 0,69 para el año 2008 y 2009 respectivamente.

*OE3. Evaluación de la efectividad de fungicida curasemilla en el control de *Ramularia collo-cygni*

La evaluación de fungicidas curasemillas mediante la técnica de qPCR resultó exitosa (Figura 6), dado que los parámetros de la curva estándar fueron óptimos para la evaluación (pendiente = -3,5; Y-inter= 24,5; $R^2 = 0,99$; %Eff= 94). Los valores obtenidos están de acuerdo con los de Taylor et al. (2010)..

Figura 6 (Anexo 1).

En ambos lotes de semilla se obtuvieron resultados similares de concentración de ADN de Rcc en el tratamiento testigo, lo cual indica que a pesar de haberse caracterizado un lote como muy alto nivel de infección (Lote 1) y otro con alto nivel de infección (Lote 2), ambos presentaron contenido de Rcc similar en plántula (Figura 7). Esto coincide con Havis et al. (2015a), ya que ambos lotes entrarían en la categoría no recomendada para la comercialización por la alta concentración de Rcc en la semilla.

Figura 7 (Anexo 1).

La detección de ADN de Rcc en plántulas asintomáticas coincide con los resultados obtenidos por Zamani-Noor (2011) y confirma la capacidad de Rcc de transmitirse de la semilla a la plántula. Este punto es de gran importancia epidemiológica, dado que el inóculo no solo debe ser capaz de diseminarse en la semilla, sino que para luego causar epidemias debe ser capaz de transmitirse a la plántula. Vale a su vez remarcar que, como se mencionó anteriormente, Rcc puede permanecer en la plántula de forma asintomática, datos que concuerdan con los resultados obtenidos por Havis et al. (2012) y Nyman et al. (2009).

De acuerdo a los resultados de este estudio, la semilla del lote 1 curada con fluxapiraxad + triticonazol presentó significativamente ($p > 0,05$) menor nivel de Rcc en plántula con respecto al testigo sin curar de ese mismo lote. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre tratamientos para la semilla del lote 2. Dado estos resultados, corresponde repetir el experimento para evaluar su eficiencia, en tanto ambos lotes presentaban alta nivel de infección de Rcc en la semilla.

El tratamiento con carbendazim + tiram + iprodiona presentó mayor concentración de ADN de Rcc que el tratamiento testigo sin curasemilla en el Lote 2. Posiblemente, este fungicida, aun cuando no fue eficiente para el control de Rcc, pudo haber tenido un control de otros microorganismos presentes en la semilla y de esta forma podría haber favorecido una mayor infección de Rcc.

La reducción en la concentración de ADN de Rcc obtenida con el curasemilla mezcla de fluxapiraxad + triticonazole, sugiere un efecto sobre la transmisión del patógeno a la plántula. Determinadas carboxamidas (ej. fluxapiraxad o isopiraxam) han presentado una alta eficiencia de control de Rcc cuando son incluidas en aplicaciones foliares, por lo cual su uso como curasemilla podría ser de gran aporte (Pereyra y Pérez, 2017). En ensayos realizados durante los años 2015-2017 en donde se evaluaron diferentes mezclas de fungicidas curasemillas sobre un cultivar de cebada susceptible a mancha en red tipo red, (causada por *Dreschlera teres f. teres*), se determinó que la mezcla de fluxapiraxad + triticonazole redujo la severidad de la enfermedad hasta el momento de encañazón del cultivo con respecto al tratamiento testigo (González et al., 2019). A su vez, estos resultados concuerdan con los que obtuvimos en este trabajo, donde la misma mezcla de fungicidas curasemillas fue la que logro reducir la concentración de ADN de Rcc en semilla.

*OE4. Efecto del inóculo de Rcc en la semilla sobre la eficiencia en el uso de fungicidas foliares

Independientemente de los niveles de inóculo de Rcc cuantificados en semilla, el desarrollo de ramulariosis fue tardío y bajo en todos los experimentos. Predominaron mancha en red tipo spot, mancha en red tipo red y manchado fisiológico en niveles intermedios. Para los experimentos analizados no existieron diferencias significativas entre tratamientos (nivel de inóculo en semilla, presencia/ausencia de curasemilla) para severidad de ramulariosis en las distintas evaluaciones. Solo se registraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos con y sin curasemilla fluxapyroxad+triticonazol, en la

severidad de mancha en red tipo spot en las tres evaluaciones en el experimento de Colonia 2019. Se contó con datos parciales de los experimentos (ver Anexo 2).

Conclusiones y recomendaciones

En este proyecto se logró ajustar un método de cuantificación de ADN de Rcc en semilla y en plántula mediante la técnica de qPCR descrita por Taylor et al. (2010). Se obtuvieron valores de referencia en cuanto a la efectividad del método aceptables. No se presentó efecto inhibitorio según se realice en plántula o semilla, lo que permite generar resultados confiables en cuanto a la cuantificación de ADN de Rcc en dichas matrices.

Ésta metodología contribuirá al manejo más eficiente de la enfermedad, permitiendo realizar una detección temprana de la misma. Esto asistirá en la definición del momento de intervención química, evitando una aplicación de forma preventiva sin tener presente la enfermedad, o una aplicación tardía, con niveles de infección muy elevados, que limitan la respuesta al tratamiento y condicionan tanto su eficiencia como período de acción (Pereyra y Pérez, 2017). A su vez, el uso de esta técnica podría evitar aplicaciones innecesarias (que puedan contribuir residuos de fungicidas en el grano o ambiente. Esta metodología contribuiría a optimizar el manejo de ramulariosis con fungicidas.

Este método ayudará a la cuantificación de ADN de Rcc en lotes de semillas comerciales para realizar usos diferenciales de los mismos, siguiendo la literatura internacional. En países como Europa, la cuantificación molecular del hongo en un lote de semilla está siendo actualmente utilizada como herramienta para descartar lotes de semilla que presenten alto nivel de infección (lotes de semilla con niveles superiores a 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). En este sentido, se recomienda solo utilizar lotes de semilla que presenten preferentemente menos de 1pg de ADN de Rcc por 100 ng de ADN total (Havis et al., 2015). Dado estos datos se recomienda realizar análisis a las semillas de los lotes previo a la siembra para poder realizar la misma con lotes de semillas con menores cargas de inóculo de Rcc.

Dado los resultados de la relación de las condiciones climáticas predisponentes para la enfermedad y nivel de infección de Rcc en lotes de semilla, se destaca que será necesario continuar generando información con el fin de llegar a modelos predictivos de potenciales escenarios de riesgo según determinadas situaciones productivas y climáticas.

El ajuste metodológico de la técnica qPCR contribuirá a la generación de semilla de cebada de alta calidad, pudiendo ser aplicados a nivel nacional para el control fitosanitario de lote, evitando la diseminación de Rcc en otros cultivos de cebada y en otras plantas que pueden ser reservorios del patógeno en nuestro país. Actualmente, se ha detectado a Rcc en otras gramíneas, incluido trigo (Frei y Gindro, 2015), lo que alerta como factor epidemiológico adicional si se registra la enfermedad con valores epidémicos. Eventualmente, sería recomendable realizar un control fitosanitario de lotes de este cereal.

El método ajustado de evaluación de inóculo en plántula permitirá la evaluación de distintos fungicidas curasemillas para el control de ramulariosis. Si bien son resultados preliminares, los datos recabados en este estudio de demostraron que el uso de fungicidas curasemillas carbendazim + tiram + iprodiona resultó ineficiente para el control de Rcc, respecto a la mezcla fluxaproxad + triticonazol. La mezcla de fungicida curasemilla con agregado de carboxamidas (fluxaproxad) es prometedora para el control de ramulariosis, ya que fue la que logro disminuir el nivel de infección de Rcc con respecto al testigo y a la otra mezcla evaluada, carbendazim + tiram + iprodiona. Cabe destacar que estos datos son preliminares, y, por tanto, se necesitan más estudios para poder concluir con respeto a la mezcla más eficiente de fungicidas.

Con esta metodología se podrá evaluar fungicidas curasemilla en otras enfermedades transmitidas por semilla y servirá como base para futura investigación en epidemiología de la ramulariosis así como en otros patosistemas de difícil diagnóstico.

Referencias bibliográficas

- ARRUABARRENA, A.; BENÍTEZ-GALEANO, M. J.; GIAMBIASI, M.; BERTALMIÓ, A.; COLINA, R.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L. 2016. Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. En: *Journal of Virological Methods*. 237: 14–17.
- CARMONA, M.; SCANDIANI, M.; FORMENTO, A.; LUQUE, A. 2013. Epidemias de *Ramularia collo-cygni*, organismo causal del salpicado necrótico de la cebada. Pages 44-47 in: *Campaña 2012-2013 Revista Cultivos Invernales en SD de Aapresid*. Online publication. Cultivos invernales, AAPRESID. www.aapresid.org.ar
- CASTRO, M.; GERMÁN, S.; PEREYRA, S.; AZZIMONTI, G. 2018. Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada. [En línea]. [Consulta: 25 de setiembre de 2021]. Disponible en: <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n%20sanitaria%20trigo%20y%20cebada3.pdf>.
- CAVARA, F. 1893. Ueber einige parasitische Pilze auf dem Getreide. (en línea). En: *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten*. 3(1):16-26.
- CERDA-GRANADOS, D.; DÍAZ, V. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. En: *Encuentro*, 94: 82-92.
- CIMMYT, 2005. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Third Edition. [En línea]. México, D.F.: CIMMYT [Consulta: 5 de setiembre de 2021]. Disponible en <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1333/91195.pdf>
- FREI, P.; GINDRO, K. 2015. *Ramularia collo-cygni*: un nouveau champignon pathogène de l'orge. En: *Agrarforschung Schweiz* 6(5):210-217.
- GONZÁLEZ, S.; ROSSI, C.; PEREYRA, S. 2019. Sanidad de semillas de trigo y cebada: eslabón clave en el manejo de enfermedades. *Revista INIA Uruguay* 56:57-61.
- 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.
- HAVIS, N. D.; BROWN, J.; CLEMENTE, G.; FREI, P.; JEDRYCZKA, M.; KACZMAREK, J.; KACZMAREK, M.; MATUSINSKY, P.; MCGRANN, G.; PEREYRA, S.; PIOTROWSKA, M.; SGHYER, H.; TELLIER, A.; HESS, M. 2015a. *Ramularia collo-cygni* - an emerging pathogen of barley crops. *Phytopathology*. 105(7):895-904.
- HAVIS, N.D.; FOUNTAINE, J.; GORNIK, K.; PATERSON, L.; TAYLOR, J. 2015b. Diagnosis of *Ramularia collo-cygni* and *Rhynchosporium* spp. in Barley. En: *Plant Pathology, Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1302.
- HAVIS, N.D.; NYMAN, M.; OXLEY, S. 2014. Evidence for seed transmission and asymptomatic growth of *Ramularia collo-cygni* in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Pathology* 63: 929–93.
- HAVIS, N.D.; OXLEY, S.; BURNETT, F. 2012. Advance in control of *Ramularia collo-cygni*. En: *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*, 125-130.
- HAVIS, N.D.; OXLEY, S.; PIPER, S.; LANGRELL, S. 2006. Rapid nested PCR –based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. En: *FEMS Microbiol Lett.*, 256:217–223.
- HAVIS, N.D.; PASTOK, M.; PYZALSKI, S.; OXLEY, S. 2006b. Investigating the Life Cycle of *Ramularia collo-cygni*. The Dundee Conference: Crop Protection in Northern Britain 2006: Proceedings of the Conference Held at the West Park Conference Centre, Scotland: University of Dundee ed. Heilbronn, T.D. pp. 219–223.
- HOHENEDER, F.; HOFER, K.; GROTH, J.; HERZ, M.; HEB, M.; HÜCKELHOVEN, 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.
- KACZMAREK, M.; PIOTROWSKA, M. J.; FOUNTAINE, J. M.; GORNIK, K.; MCGRANN, G. R. D.; ARMSTRONG, A.; WRIGHT, K. M.; NEWTON, A. C.; HAVIS, N. D. 2016. Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of ramularia leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. *Plant Pathology* 66(1):45-55.
- LEISTRUMAITIS, A.; 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.
- MATUSINSKY, P.; LEISOVA-SVOBODOVA, L.; MARIK, P.; TVARUZEK, L.; STEMBERKOVA, L.; HANUSOVA, M.; MINARIKOVA, V.; VYSOHLIDOVA, M.; SPITZER, T. 2011. 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.
- MCGRANN, G.R.D.; BROWN, J.K.M. 2018. The role of reactive oxygen in the development of *Ramularia* leaf spot disease in barley seedlings. *Annals of Botany*, 121:415–430.

- NEWELL, A.J. 1997. Effects of different seed treatments and coatings on the germination and establishment of four grass species *Journal of Turfgrass Science* 73:67-72.
- NYMAN, M.; HAVIS, N. D.; OXLEY, S. J. P. 2009. Importance of seed-borne infection of *Ramularia collo-cygni*. In: Oxley, S.; Brown, J.; Foster, V.; Havis, N. D. (eds.). *The 2nd European Ramularia Workshop - A new disease and challenge in barley production. Aspects of Applied Biology* 92:91-96.
- OXLEY, S.; HAVIS, N.D. 2010. Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting. (en línea). London, UK, HGCA. 59 p. (Project Report no. 463). Consultado 13 mar. 2021. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/267653/pr463.pdf>
- OXLEY, S.; HAVIS, N.D.; HUNTER, T.; HACKETT, R. 2006. Impact of fungicides and varietal resistance on *Ramularia collo-cygni* in spring barley. *Proceedings 1st European Ramularia Workshop*, pp. 103-112. March 2006, Göttingen. Germany.
- OXLEY, S.J.P.; HAVIS, N.D. 2004. Development of *Ramularia collo-cygni* on spring barley and its impact on yield. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain* 147-152.
- PEREYRA, S. 2013a. Herramientas para un manejo inteligente en trigos y cebadas. IN: *Jornada Cultivos de Invierno. La Estanzuela, INIA Serie Actividades de Difusión*, 720: 33-41.
- PEREYRA, S. 2013b. Nuevos desafíos para el manejo de enfermedades en cereales de invierno. Pp.93-105. IN: *Simposio Nacional de Agricultura*, 3., 2013, Paysandú, UY.. [Montevideo]: UdelaR. Facultad de Agronomía. EEMAC.
- PEREYRA, S.; PÉREZ, C. 2017. Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. *Revista Cangüé*. 38:13-18.
- SACHS, E. 2006. The history of research into *Ramularia* leaf spot on barley *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 58(7):186–189.
- STRADA, J.; RICCA, A.; CONLES, M.; SILVA, M.; ROJAS, D.; CASINI, C.; PIATTI, F.; MARTINEZ, M. 2012. Evaluación de residuos de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Interciencia* 37(6):412-417.
- SUTTON, B. C.; WALLER, J. M. 1988. Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. En: *Transactions of the British Mycological Society*. 90:55-61.
- TAYLOR, J.; PATERSON, L.; HAVIS, N.D. 2010. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). En: *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 50:493–499.
- WALTERS, D.; HAVIS, N.D.; OXLEY, S. 2007. *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. En: *FEMS Microbiology Letters* 279:1-7.
- ZAMANI-NOOR, N. 2011. *Studies on Ramularia Leaf Spots on Barley - Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity*. Göttingen: Georg-August-University, 2011. (Tesis Doctoral).139p.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)