

**Ignacio Antonio Erreguerena**

Tesis presentada  
como requisito para optar al título de

**DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS**

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Balcarce, Argentina

Diciembre, 2023

ESTUDIOS SOBRE LA CAPACIDAD ADAPTATIVA DE *Ramularia collo-cygni*, AGENTE CAUSAL DEL SALPICADO NECRÓTICO DE LA CEBADA (*Hordeum vulgare* L.): VARIABILIDAD GENÉTICA, SENSIBILIDAD DE AISLAMIENTOS ANTE ACTIVOS FUNGITÓXICOS Y PERÍODO DE SUSCEPTIBILIDAD DEL CULTIVO.

**Ignacio Antonio Erreguerena**

COMITÉ CONSEJERO

**Director**

Dr. Marcelo A. Carmona

Profesor Titular Plenario de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina.



**Codirectora**

PhD. Silvia Pereyra

Investigador Instituto Nacional de Investigación (INIA), Uruguay.



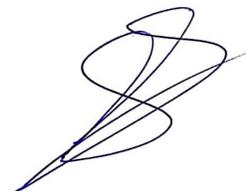
**Asesores**

Dr. Facundo J. Quiroz

EEA Balcarce, Bs As, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

Dr. Eduardo Guillín

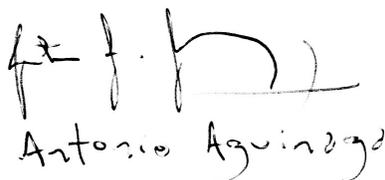
AER Quines, San Luis, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.



ESTUDIOS SOBRE LA CAPACIDAD ADAPTATIVA DE *Ramularia collo-cygni*, AGENTE CAUSAL DEL SALPICADO NECRÓTICO DE LA CEBADA (*Hordeum vulgare* L.): VARIABILIDAD GENÉTICA, SENSIBILIDAD DE AISLAMIENTOS ANTE ACTIVOS FUNGITÓXICOS Y PERÍODO DE SUSCEPTIBILIDAD DEL CULTIVO.

Ignacio Antonio Erreguerena

APROBADA POR



Antonio Aguinaga

.....  
Evaluador 1  
Dr. Ing. Agr. Antonio Aguinaga  
Gerente de Investigación y Desarrollo de Cervecería y Maltería Quilmes



.....  
Evaluador 2  
Dra. Ing. Agr. Rosanna Nora Pioli  
Docente de la cátedra de fitopatología en Facultad de Ciencia Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario



.....  
Evaluador 3  
Dr. Ing. Agr. Pedro Balatti  
Investigador principal (CIC) y docente en Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de la Plata

## DEDICATORIA

*A Andoni, Laura, mis padres, hermanos, sobrinos y amigos*

*“Hay mil formas de hacer lo mismo,  
tantas como personas hay en el mundo,  
somos un montón de cosas, esto también...  
lo más valiente que podemos ser, es ser uno mismo siempre...”*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

A mi gran amor Andoni, gracias por enseñarme a ser mejor papá y persona todos los días, por enseñarme y recordarme por dónde va la cosa.

A mi compañera de viaje, amor de mi vida Laura, por estar ahí acompañándome, por tu amor incondicional y por compartir esta aventura que se llama vida.

A mis padres por darme la vida y las herramientas para vivirla, los amo con el alma. Fueron, son y serán un faro para mí.

Al Dr. Marcelo “Marce” Carmona, por su gran compromiso en mi formación, su amistad, paciencia, practicidad, respeto y sus consejos en estos años.

A la Dra. Silvia Pereyra, por su empatía y compromiso para conmigo y mi formación.

Al Dr. Neil Havis por su amistad, ayuda y creer en mí siempre. Eternamente agradecido.

A mis compañeros del SRUC Henry Creissen, Francois Dussart, Peter Hoebe, Kalina Gorniak, Jeannette Taylor y María Stanisz-Migal por su amabilidad, ayuda, hospitalidad y todas las “pints” y risas compartidas.

Dr. Thies Marten Heick por su crucial ayuda en esta tesis y amabilidad.

Al Dr. “Edu” Guillín por su predisposición y tan importantes aportes a esta tesis y por “la filosofía barata y zapatos de goma”.

A la Dra Flor Lucca por su buena onda y predisposición frente a mis consultas.

A mis dos grandes mentores Alberto Escande y Facundo Quiroz, eternamente agradecido por sus consejos, enseñanzas y lo importante de siempre tomarse unos segundos para pensar las cosas.

A Gladys Clemente, por despertar en mí la vocación de fitopatólogo.

A mis dos grandes colegas/amigas dentro de la fitopatología Normita Formento y Lucre Couretot, gracias por compartir y enseñarme tantas cosas.

A Mauro Zabaleta, por su gran amistad, ayuda incondicional e inconmensurable predisposición para trabajar.

A “Choco” Antonelli y Silvio Giuliano por su ayuda y predisposición para trabajar y las risas compartidas.

A mis compañeras 'fitopatolocas' de la EEA Balcarce: gracias por su amistad, por compartir no solo el trabajo sino muchas experiencias y risas. Por permitirme ser y desarrollarme profesionalmente apoyándome constantemente.

A Marcelo López Sabando, Juan Erreguerena, Ana Storm y Aapresid "Fangio" por conducir los ensayos de Lobería, Barrow y Mar del Plata y por todo lo compartido en estos años.

A mis queridos amigos de la EEA Bordenave Fede Moreyra, "el Ruso" González y "el Pulga" Giménez por su gran amistad, lo compartido, predisposición y toda su ayuda en esta tesis y otros trabajos.

Al Dr. Fernando "Fer" Andrade por siempre escucharme y aconsejarme.

A Julita Albornoz por su amistad, luz y consejos.

A mis compañeros de trabajo y compañeros de la EEA Manfredi: Guille, Claudio, Luis, Ana y todos aquellos/as que me trataron con respeto y buena onda a mi llegada.

A los integrantes de los grupos de la EEA Balcarce con quien he tenido y tengo el placer de trabajar en conjunto y aprender de ellos/as.

A los Ings. Fidel Cortese y Mario Cattáneo por toda su ayuda, apoyo y respeto, siempre dando el espacio a los mas "jóvenes".

A Francisco Ciucci y al querido Carlos "Peto" Petoyan (q.e.p.d) de Syngenta Agro S.A. por ser parte del inicio de este camino.

A los amigos de Agroestudio Viento Sur por su constante intercambio y la buena onda de siempre.

A CREA Mar y Sierras, Aapresid, BASF y BAYER, productores y asesores por el intercambio y por aportar muestras de cebada.

A los evaluadores de la tesis, Dra. Pioli, Dr. Balatti y Dr. Aguinaga por los invaluable aportes constructivos realizados a este trabajo.

A mis amigos y amigas: los amo, gracias por estar siempre. No me alcanzan las palabras para describir cuan importantes son para mí.

A las siguientes instituciones que permitieron realizar mi doctorado:

- Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
- Fundación ArgenINTA

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                                                                                                   |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| DEDICATORIA.....                                                                                                                                                                  | iii   |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                                                                                                             | iv    |
| ÍNDICE GENERAL .....                                                                                                                                                              | vi    |
| INDICE DE TABLAS .....                                                                                                                                                            | ix    |
| INDICE DE FIGURAS .....                                                                                                                                                           | xii   |
| PRODUCCION DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.....                                                                                                                            | xv    |
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                     | xviii |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                    | xix   |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                                                                                  | 1     |
| INTRODUCCIÓN GENERAL.....                                                                                                                                                         | 1     |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....                                                                                                                                                      | 2     |
| 1.1. OBJETIVO GENERAL .....                                                                                                                                                       | 9     |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                                                                   | 9     |
| 1.1. HIPÓTESIS .....                                                                                                                                                              | 10    |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                                                                  | 11    |
| Caracterización de la sensibilidad a fungicidas de aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> en Argentina y mutaciones asociadas en proteínas fúngicas involucradas.....       | 12    |
| 2.1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                            | 13    |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                   | 14    |
| 2.2.1. Técnica de muestreo y aislamiento .....                                                                                                                                    | 14    |
| 2.2.2. Identificación molecular de aislamientos de Rcc.....                                                                                                                       | 16    |
| 2.2.3. Ensayo para determinar la sensibilidad de aislamientos de Rcc frente a fungicidas .....                                                                                    | 16    |
| 2.2.4. Análisis de mutaciones asociadas con la resistencia a fungicidas mediante secuenciación de genes de proteínas objetivo de fungicidas en <i>Ramularia collo-cygni</i> ..... | 18    |
| 2.3. RESULTADOS .....                                                                                                                                                             | 19    |
| 2.3.1. Técnica de muestreo y aislamiento de Rcc .....                                                                                                                             | 19    |
| 3.3.2. Identificación molecular de aislamientos de Rcc.....                                                                                                                       | 20    |
| 2.3.3. Ensayo para determinar la sensibilidad de aislamientos de Rcc frente a fungicidas .....                                                                                    | 20    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.4. Análisis de mutaciones asociadas con la resistencia a fungicidas mediante secuenciación de genes de proteínas objetivo de fungicidas en <i>Ramularia collo-cygni</i> .....                                                                                      | 23 |
| 2.4. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 26 |
| CAPÍTULO 3 .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 31 |
| Estudio y comparación de la diversidad genética, estrategia de reproducción y estructura de poblaciones argentinas y europeas de <i>Ramularia collo-cygni</i> mediante la utilización de marcadores microsatélites.....                                                | 31 |
| 3.1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 32 |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                                                                        | 34 |
| 3.2.1. Poblaciones estudiadas y extracción de ADN.....                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| 3.2.2. PCR multiplex con marcadores moleculares SSR.....                                                                                                                                                                                                               | 35 |
| 3.2.3. Análisis de microsatélites amplificados.....                                                                                                                                                                                                                    | 36 |
| 3.3. RESULTADOS.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 37 |
| 3.4. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 42 |
| 3.5. CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 44 |
| CAPÍTULO 4 .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 45 |
| Determinación del periodo de protección de la cebada contra <i>Ramularia collo-cygni</i> , impacto de la enfermedad en la producción y descripción de condiciones predisponentes para el desarrollo de modelos de predicción del salpicado necrótico de la cebada..... | 45 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 46 |
| 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                                                                        | 47 |
| 4.2.1. Ensayos de campo para establecer el período de protección de la cebada contra el SNC.....                                                                                                                                                                       | 48 |
| 4.2.2. Ensayo de eficiencia de control del SNC de diversas formulados de fungicidas en el periodo de protección de la cebada establecido previamente en el contexto de manejo integrado.....                                                                           | 51 |
| 4.2.3. Datos de rendimiento y calidad del grano.....                                                                                                                                                                                                                   | 52 |
| 4.2.4. Variables ambientales y su asociación con los niveles de SNC.....                                                                                                                                                                                               | 52 |
| 4.2.5. Análisis de los datos .....                                                                                                                                                                                                                                     | 53 |
| 4.3. RESULTADOS.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 55 |
| 4.3.1. Ensayos de campo para evaluar el período de protección frente a el SNC.....                                                                                                                                                                                     | 55 |
| 4.3.2. Efectos de los tratamientos con fungicidas dentro o fuera del período de protección de la cebada (PP) contra el SNC.....                                                                                                                                        | 59 |
| 4.3.3. Eficiencia de control del SNC de fungicidas formulados con diversos ingredientes activos en un contexto de manejo integrado.....                                                                                                                                | 60 |
| 4.3.4. Desarrollo foliar en relación con los estadios fenológicos del cultivo.....                                                                                                                                                                                     | 61 |
| 4.3.4. Impacto del SNC en la producción de cebada.....                                                                                                                                                                                                                 | 62 |
| 4.3.5. Variables ambientales y su asociación con los niveles de SNC.....                                                                                                                                                                                               | 63 |
| 4.4. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 67 |

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5. CONCLUSIONES.....                                                  | 71  |
| CAPÍTULO 5 .....                                                        | 73  |
| DISCUSIÓN GENERAL .....                                                 | 73  |
| 5.1. DISCUSION GENERAL.....                                             | 74  |
| 5.2. RESPUESTA A LAS HIPÓTESIS PLANTEADAS.....                          | 78  |
| 5.3. PRINCIPALES APORTES AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO ..... | 80  |
| 5.4. PERSPECTIVAS.....                                                  | 81  |
| 6. REFERENCIAS.....                                                     | 83  |
| APÉNDICES .....                                                         | 99  |
| APÉNDICE 1 .....                                                        | 99  |
| APENDICE 2 .....                                                        | 100 |
| APENDICE 3 .....                                                        | 101 |

## INDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2.1. Aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> utilizados en este estudio. <sup>1</sup> Provincia de Buenos Aires, <sup>2</sup> Grupo de fungicidas (foliares) utilizados en el año muestreado. *dosis dividida entre dos momentos de pulverización, () diferentes momentos de pulverización. Sev: severidad del salpicado necrótico de la cebada donde alto (A, >40%), medio (M, 21-40%) y bajo (B, 5-20).<br>.....                                                                                                                                           | 15 |
| Tabla 2.2. Valores de concentración efectiva 50 (CE50) promedio y línea base (mg L <sup>-1</sup> ) para aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> evaluados <i>-in vitro-</i> frente a seis fungicidas. *línea de base o 'baseline' de <i>cytb</i> de tipo salvaje (Fountaine y Fraaije, 2009). .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 21 |
| Tabla 2.3. Evolución de los valores medios de concentración efectiva 50 (CE50, mg L <sup>-1</sup> ) de aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> (Rcc) entre años para seis fungicidas. Factor de reducción de sensibilidad (FRS=Año B/Año A) y Factor de resistencia (FR= CE50 media de Rcc para cada año/CE50 media de aislamientos de tipo salvaje o línea de base alternativa); valores superiores a uno indican una reducción de la sensibilidad de los aislamientos de Rcc entre cada año de muestreo o entre los valores de referencia, respectivamente. .... | 22 |
| Tabla 2.4. Haplotipos encontrados en aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> (Rcc) de Argentina según algunas mutaciones en los genes <i>cytb</i> , <i>cyp51</i> y <i>sdh</i> , y su ocurrencia (%). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| Tabla 3.1. Estadísticas de diversidad genética de <i>Ramularia collo-cygni</i> por región (EU: Europa y SA: Sudamérica) y poblaciones (SC: Escocia, CZ: República Checa y ARG: Argentina) en diez loci SSR. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 38 |
| Tabla 3.2. Análisis jerárquicos de varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de <i>Ramularia collo-cygni</i> provenientes de Argentina (Norte y sur de la provincia de Buenos Aires), Escocia y República Checa según diez loci de microsatélites (con corrección de clones) con 100 genotipos multilocus (111 aislamientos). Los valores de <i>p</i> en negrita (prueba de Monte Carlo) representan un efecto significativo; g.l.: grados de libertad. EU: Europa, SA: Sudamerica.....                                                                          | 40 |
| Tabla 3.3. Índice de diferenciación de Jost (Djost) y significancia (valor de <i>p</i> <sub>Djost</sub> ) en los estratos de población y región para aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> . Djost varía entre 1 y 0, donde 1 es diferenciación completa y 0 significa que no hay diferenciación.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 41 |
| Tabla 4.1. Tratamientos fungicidas básicos (isopirazam + azoxistrobina) utilizados para evaluar el período de protección (PP) de la cebada contra el salpicado necrótico de la cebada (ensayos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |

desde 2013 al 2016) y tratamientos de validación del PP propuesto con estrategia de una o dos aplicaciones (ensayos desde 2014 al 2015). ..... 49

Tabla 4.2. Ingredientes activos y dosis de los fungicidas utilizados en cada tratamiento para el análisis de eficiencia de control del salpicado necrótico de la cebada en la localidad de Balcarce 2017. .... 51

Tabla 4.3. Tabla resumen de los valores promedio generales de los niveles de salpicado necrótico de la cebada (SNC), variables productivas obtenidas en cada ensayo y efecto de variables clasificatorias e interacción (Ensayo, Tratamiento y Error) dentro del análisis multivariado ANoVa y LSD Fischer. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad basada en la severidad, CIR: Coeficiente de infección relativo (Saari Prescott, 1975 y Stubbs et al., 1986). PMG: peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: número de granos, GLA: área de hoja verde. .... 55

Tabla 4.4. Límites del período de protección (PP) contra el salpicado necrótico de la cebada (SNC) observados en cada ensayo y total. Se proporciona el intervalo de confianza (95 %) para cada valor límite medio del PP y los límites del PP encontrados con fungicidas alternativos. <sup>1</sup>Ensayos en los que se usó una mezcla de isopirazam y azoxistrobina. .... 57

Tabla 4.5. Validación del período de protección (PP) contra el salpicado necrótico de la cebada (SNC). Análisis de varianza de los tratamientos de la estrategia de aplicación del fungicida (isopirazam y azoxistrobina) en uno y dos momentos, dentro o fuera del PP y los efectos en los niveles de SNC y variables de producción en los ensayos Balcarce 2014, 2015 y Lobería 2015. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ABCPE: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad basada en la severidad. PMG: Peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: Número de granos ha<sup>-1</sup> SF: Sin fungicida, PT: Protección total. \* $p < 0.0001$ . .... 59

Tabla 4.6. Índices de pérdida relacionados con el salpicado necrótico (SNC). Coeficientes de análisis de regresión lineal entre la severidad del SNC, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) basada en la severidad y los valores de producción obtenidos en ensayos de campo (n=8). m y b: pendiente de regresión e intercepto respectivamente, Ymax: valor máximo, PMG: peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: número de granos. .... 62

Tabla 4.7. Variables ambientales con correlaciones significativas moderadas-altas con la severidad del salpicado necrótico (parcelas sin fungicida) y análisis de regresión múltiple en todos los ensayos incluidos en nuestro estudio (n=10). D: días. .... 65

Tabla 4.8. Análisis de regresión múltiple entre las variables ambientales y la severidad del salpicado necrótico de la cebada (SNC) observada en nuestros senderos (n=10). Las variables regresoras analizadas fueron la temperatura media ( $T_{media}$ ) (Z21+Z39) y la combinación con días de balance hídrico (DBH) > 50% y DBH = 100% (anegamiento) ambas hasta la etapa Z39, precipitación acumulada y duración de mojado de hoja acumulada (DMH) (Z21+Z39). ..... 65

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1. Mapa de distribución y año de primera detección de <i>Ramularia collo-cygni</i> a nivel mundial (Spencer et al, 2019).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 3  |
| Figura 1.2. Sintomatología del salpicado necrótico de la cebada causada por <i>Ramularia collo-cygni</i> en diversos estadios del cultivo de cebada. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 3  |
| Figura 1.3. Conidios y conidióforos en fascículos (izquierda y centro, fuente: Erreguerena I y SRUC, respectivamente) desde estomas foliares y forma espermogonial ( <i>Asteromella</i> sp) (derecha) del hongo <i>Ramularia collo-cygni</i> (Khier, 2002; Barnett, 2006). ....                                                                                                                                                                                                                              | 5  |
| Figura 1.4. Ciclo del salpicado necrótico de la cebada causada por el hongo <i>Ramularia collo-cygni</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 6  |
| Figura 1.5. Factores asociados a la ocurrencia del salpicado necrótico de la cebada (SNC) causado por el hongo <i>Ramularia collo-cygni</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 8  |
| Figura 2.1. Conidios y conidióforos de <i>Ramularia collo-cygni</i> (centro) en fascículos emergiendo desde las estomas foliares alrededor de un mancha necrótica (izquierda) y aislamientos monospóricos (micelio) en medio agar zanahoria (derecha).....                                                                                                                                                                                                                                                   | 20 |
| Figura 2.2. Electroforesis en gel de agarosa (1.2 % p v <sup>-1</sup> ) de los productos esperados (115 pb) de PCR con cebadores específicos para la identificación de aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> (Rcc) (n=21). El tamaño de las bandas se estimó con un marcador molecular de 100 pb (M). Control negativo (--): agua destilada estéril, Control positivo (+): ADN Rcc. Los triángulos negros indican 115 pb. ....                                                                        | 20 |
| Figura 2.3. Ocurrencia de mutaciones en los genes <i>cytb</i> , <i>cyp51</i> y <i>sdh</i> en aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> obtenidos en Argentina en 2012, 2015 y 2017 (n = número de aislamientos analizados (Tabla suplementaria 1, APENDICE 1). ....                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| Figura 2.4. Valores de concentración efectiva 50 (CE50; mg L <sup>-1</sup> ) para protioconazol-destio, epoxiconazol, fluxapiraxad e isopirazam registrados en aislamientos de <i>Ramularia collo-cygni</i> de los años de muestreo 2012, 2015 y 2017 en Argentina. Se proporcionan los valores medios y los errores estándar de los aislamientos de tipo salvaje (wt) y mutantes (mut) para los genes <i>cyp51</i> y/o <i>sdh</i> . Los aislamientos wt o mut representan aislamientos con o sin mutaciones |    |

respectivamente, para un gen dado. Las líneas punteadas representan los valores CE50 de referencia para cada fungicida. .... 24

Figura 3.1. Mapa de distribución de las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* utilizadas en este estudio. Argentina (área negra), República Checa (área gris) y Escocia (área blanca). .... 35

Figura 3.2. Minimum spanning network (MSN) donde se observan los genotipos multilocus (MLG) de las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* de Argentina, República Checa y Escocia (colores de nodo). Cada MLG está representado por un nodo. El tamaño de los nodos indica el número de aislamientos en cada MLG. La barra de escala de negro a gris muestra la distancia genética de Bruvo entre MLGs. El grosor y el color de las líneas (barra de escala de grises) son proporcionales a la distancia genética entre dos nodos..... 39

Figura 3.3. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) y asignación de conglomerados (K: 1 a 7) para aislamientos de *Ramularia collo-cygni* (puntos grises) de tres poblaciones diferentes (Argentina, República Checa y Escocia). Gráfico de barras insertado: análisis discriminantes para la agrupación en clústeres de K-media. Los gráficos circulares muestran la proporción de aislamientos de cada país para un grupo determinado..... 40

Figura 4.1. Mapa de ubicación geográfica de ensayos y años de experimentación para la determinación del periodo de protección de la cebada frente al salpicado necrótico de la cebada. .... 48

Figura 4.2. Período de protección de la cebada (PP) contra el salpicado necrótico (SNC). Se dan los valores medios de severidad de SNC en la etapa de llenado de grano (Z78) de cada tratamiento para los ensayos Balcarce 2015 (A) y Lobería 2015 (B) (variedad de cebada 'Andreia') y se ajustaron curvas de regresión sigmoideal. Se utilizó el nivel máximo de enfermedad (MDL) (20% de severidad de SNC) para establecer los límites del PP en grados día (°Cd). Los puntos negros y blancos representan los valores medios con errores de cada tratamiento de protección o desprotección con fungicida aditivo, respectivamente. .... 57

Figura 4.3. Eficiencia de control máxima (ECM) alcanzada (%) del salpicado necrótico de la cebada a través de los ensayos en diferentes años y localidades. Los símbolos indican el promedio de la ECM de cada ensayo ( $\pm$  error estándar) mediante la utilización del fungicida en mezcla azoxistrobina e isopirazam. \*Año 2017: dato de EC del fungicida azoxistrobina e isopirazam del ensayo 4.2.2. .... 59

Figura 4.4. Eficiencia de control (EC) y rendimiento promedio ( $\pm$  error estándar) observados con diferentes formulados con fungicidas para el control del salpicado necrótico de la cebada (SNC)

en Balcarce (2017). Pr: protioconazol, Tr: trifloxistrobina, Bx: bixafen, Fx: fluxapiroxad, Ep: epoxiconazol, P: piraclostrobina, I: isopirazam, Az: azoxistrobina, Cl: clorotalonil y TSF: Testigo sin fungicida. .... 61

Figura 4.5. Desarrollo del área foliar por macollo de cebada a lo largo del ciclo del cultivo (Balcarce, 2015). Puntos negros indican el promedio del área foliar de diez macollos por muestreo/estadio fenológico. El área sombreada indica el periodo de protección determinado previamente. Z25 y Z29: pleno y fin de macollaje respectivamente, Z30: inicio de encañazón, Z33: tres nudos, Z39: hoja bandera, Z47: aristas visibles y Z78: llenado de grano..... 62

Figura 4.6. Balance hídrico (agua disponible, BH) en días después de la siembra (DAS) para cultivo de cebada en tres de diez ensayos con alta (70%, Balcarce 2012), media (40%, Balcarce 2015) y baja (5%, Barrow 2015) severidad del salpicado necrótico (SNC) en parcelas no tratadas evaluadas en la etapa de llenado de grano. La línea negra indica los niveles de BH. Las flechas punteadas negras indican períodos de BH por debajo del 50% (déficit hídrico). Los valores de BH por encima de esta línea indican agua disponible para el cultivo. Las flechas indican los períodos de deficiencia de agua para el cultivo. Las barras negras indican las precipitaciones diarias. .... 64

Figura 4.7. Gráficos de contorno que describen la relación encontrada entre las variables ambientales y la severidad del salpicado necrótico(SNC) hacia un modelo de predicción para la enfermedad hasta la etapa Z39. A: severidad de SNC (%) versus temperatura media acumulada (°C) (Z21 a Z39) y días con balance hídrico >50% agua disponible (DBH>50%) hasta Z39 y B: severidad de SNC (%) versus temperatura media acumulada (°C) y lluvia acumulada (mm) durante Z21 a Z39 (n=10)..... 67

## PRODUCCION DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

### *Presentaciones congresos, simposios y jornadas (posters y disertaciones):*

Erreguerena I, Quiroz F, Montoya M, Maringolo C, Lázzaro N, Giménez F, 2014. Ventana de protección para el control químico de *Ramularia collo-cygni* y *Rhynchosporium secalis* en cebada en el sudeste bonaerense. 3er Congreso Argentino de Fitopatología, San Miguel de Tucumán, 4-6 junio de 2014. ISBN: 978-987-24373-1-2 pp 542: (359).

Erreguerena I y Quiroz F, 2014. ¿Donde se esconde “la Ramularia”? Implicancia en la epidemiología del Salpicado Necrótico de la cebada. Visión Rural Año XXI N° 103: ISSN 0328-7009.

Erreguerena IA; Maringolo CA; Montoya MRA; Quiroz FJ. 2015. Detección por PCR de *Ramularia collo-cygni* en cebada (*Hordeum vulgare*) y su implementación como técnica de diagnóstico en estadíos iniciales del cultivo en lotes de producción de la provincia de Buenos Aires. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santa Fe, Santa Fe, 7 al 9 de octubre 2015.

Farengo J., Erreguerena IA, Quiroz FJ., 2015 Estrategias de protección química de la cebada ante enfermedades foliares. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santa Fe, Santa Fe, 7 al 9 de octubre, 2015.

Erreguerena I. Ventana de protección para el control químico de *Ramularia collo-cygni* en cebada en el sudeste bonaerense. Taller del Proyecto Nacional de Cereales y Oleaginosas, Santa Fé, 2016.

Silvia Pereyra; Ignacio Erreguerena; Lucrecia Couretot, Carlos Pérez, Cintia Palladino; Neil Havis. Upsurge of Ramularia leaf spot in South America. 2nd International Workshop on Barley Leaf Diseases. 2nd International Workshop on Barley Leaf Diseases April 5-7, 2017. Rabat, Morocco.

Erreguerena I. Disertación: Avances en el estudio de *Ramularia collo-cygni* - Variabilidad genética y sensibilidad a fungicidas, BASF – 8 de Marzo 2019. Estancia “El Casco”, Balcarce.

Invitación especial a disertar en Avances en el estudio de *Ramularia collo-cygni* en Sudamérica en el 3rd International Workshop on Barley Leaf Diseases July 1-3, 2020 Saint Petersburg, Russia (suspendido pandemia)

Disertación Taller de Resistencia fungicidas en “Sensibilidad de población de *Ramularia collo-cygni* a fungicidas” en el 5º Congreso Argentino de Fitopatología y la 59a Reunión de la APS División Caribe (59th Meeting of the APS Caribbean Division) Septiembre, 2020.

Erreguerena I. Disertación en “Detección y epidemiología de *Ramularia collo-cygni*”. 1er Congreso Argentino de Semillas (sanidad)– Noviembre 2 y 3 – 2020.

Erreguerena I. Disertación "Ramularia Leaf Spot in Argentina: an emerging pathogen in an emerging crop" in the International Ramularia Workshop, London Stansted, London, England, UK. October 3rd and 4th, 2018.

Erreguerena I. Disertación seminario "An overview of plant diseases challenges and lines of work to face them". Scotland's Rural College, Edinburgh, Scotland, UK. October 24th of 2018.

Erreguerena I –Distribución, epidemiología, diagnóstico y manejo de *Ramularia collo-cygni* en cebada. Aapresid Revista Innovadores N 128. Abr 2021.  
[https://issuu.com/aapresid/docs/cultivos\\_inv\\_web\\_final](https://issuu.com/aapresid/docs/cultivos_inv_web_final)

Erreguerena I. Ramularia en cebada. CASAFE y FRAC Argentina. 2021.  
<https://www.casafe.org/ramularia-en-cebada/>

Erreguerena I. Disertación en Ciclo Webinars: Resistencia a fungicidas. Principales resistencias en cebada. FRAC Argentina/CASAFE. 4 Nov, 2021.

Erreguerena I y Carmona M. Alerta para la cebada: confirman en el país la resistencia de Ramularia a estrobilurinas. La Nación Campo y Clarín Rural, Marzo 2021.  
<https://www.lanacion.com.ar/economia/campo/alerta-confirman-en-el-pais-la-resistencia-de-ramularia-a-estrobilurinas-nid14032021/>.

Disertación como docente invitado en posgrado de "Calidad de semillas" 29 de abril, 2021 sobre resistencia a fungicidas -Mercedes Scandiani – Rossana Pioli - Zavalla Universidad Nacional de Rosario.

Docente invitado en Epidemiología Aplicada al Manejo de Enfermedades en Cereales de Invierno Curso Universidad de la Republica (UY), INIA (UY), SRUC (Escocia), INTA (ARg) - Dos (2) disertaciones - Docencia de postgrado en la carrera en Universidad de la Republica (UY) - 23 y 30/8/2021.

Erreguerena, Havis N, Heick, TM, Gorniak, K Quiroz, F Carmona MA. Estado de la sensibilidad de las poblaciones argentinas de *Ramularia collo-cygni*. 5to Congreso Argentino de Fitopatología y 59th International meeting APS, Septiembre, 2021.

Erreguerena IA., Hoebe, P, Havis ND, Guillín E, Gorniak, K, Carmona MA. Estudio de la variabilidad genética en aislamientos argentinos y europeos de *Ramularia collo-cygni*. 5to Congreso Argentino de Fitopatología y 59th International meeting APS, Septiembre, 2021.

Erreguerena IA y Carmona MA. Manejo integrado de enfermedades en cebada y evaluación de fungicidas para el control de *Ramularia collo-cygni*. 5to Congreso Argentino de Fitopatología y 59th International meeting APS, Septiembre, 2021.

#### *Publicaciones con referato:*

Erreguerena, I.A., Havis, N.D., Heick, T.M. et al. Characterization of DMI, QoI and SDHI fungicides sensitivity of *Ramularia collo-cygni* isolates in Argentina. J Plant Dis Prot (2022).  
<https://doi.org/10.1007/s41348-022-00645-0>

Erreguerena, I.A., Hoebe, P.N., Carmona, M.A., Guillín, E. & Havis, N.D. (2024) Comparative analysis of Argentinian and European populations of *Ramularia collo-cygni* on barley. *Plant Pathology*, 00, 1–9. : <https://doi.org/10.1111/ppa.13872>

Erreguerena IA, Quiroz FJ, Cambareri M, Carmona MA, Pereyra S, Havis ND. Assessing fungicide protection period of barley against *Ramularia* Leaf Spot caused by the fungus *Ramularia collo-cygni*, disease impact and description of weather conditions towards disease forecast in Argentina. En revisión *Crop Protection*.

## RESUMEN

El salpicado necrótico de la cebada (SNC) causado por el hongo *Ramularia collo-cygni* (Rcc) se ha convertido en una amenaza para la producción de cebada en Argentina y el mundo provocando pérdidas en rendimiento y calidad de grano. Características del patógeno como un largo período de latencia, numerosas regiones transposónicas y capacidad de infectar hospedantes alternativos le facilitan adaptarse a cambios ambientales y/o medidas de control como los fungicidas dando cuenta de su alto potencial evolutivo. Las actividades desarrolladas en esta tesis fueron: a) caracterizar la diversidad genética y la estructura de la población de Rcc de Argentina, en comparación con dos poblaciones europeas, b) estudiar los niveles de sensibilidad de aislamientos de Rcc a los fungicidas más utilizados en Argentina y determinar la presencia o ausencia de mutaciones genéticas específicas asociadas; c) establecer un período óptimo de protección (PP) de la cebada con fungicidas; d) cuantificar el impacto del SNC en el rendimiento y calidad física del grano, y e) establecer la asociación entre algunas condiciones ambientales y los niveles de SNC para el diseño de modelos de predicción y estrategias de protección eficientes. Se realizó un análisis genético en aislamientos escoceses (n=60), checos (n=30) y argentinos (n=21) con diez marcadores SSR específicos para Rcc. Se estimaron diferentes parámetros: riqueza genotípica, diversidad, desequilibrio de ligamiento, nivel de asociación y diferenciación geográfica. La población argentina de Rcc presentó menor diversidad genética (moderada) y mayor nivel de estructuración y número de aislamientos clonales que las poblaciones europeas. En todas las poblaciones se observó evidencia de reproducción sexual. La diferenciación significativa ( $P_{D_{jost}} < 0.001$ ) a escala de población y región/continente sugiere la ocurrencia de un cuello de botella genético en la entrada de Rcc a Argentina (por semilla) y que esta población podría estar aún en un estado de establecimiento/emergencia. Mediante un ensayo de sensibilidad y secuenciación de genes *cytb*, *cyp51* y *sdh* en aislamientos argentinos se determinó la alta ocurrencia de haplotipos resistentes a estrobilurinas (G143A) y en menor medida la ocurrencia de mutaciones relacionadas a reducciones de sensibilidad a triazoles (Y403S/C y G404D) y carboxamidas (N87S y H266LI). Encontramos seis haplotipos que podrían demostrar que Rcc se está adaptando potencialmente a los fungicidas. En ensayos de campo (n=8) se determinó que el PP comienza desde la etapa de encañazón (Z33) hasta aristas visibles (Z47) proponiendo el estado de hoja bandera (Z39) como el momento más eficiente de control del SNC y que las pérdidas

de rendimiento (16%) se dieron por mermas en el peso de grano (8.7%) y el calibre (20%). Se propusieron cuatro posibles modelos de pronóstico basados en la temperatura promedio acumulada en las etapas de macollaje y encañazón, en combinación con el número de días de agua disponible, número de días con exceso de agua, duración de la humedad foliar o lluvia acumulada durante Z21 hasta Z39.

**Palabras clave:** diversidad genética, mutaciones, fungicidas, impacto productivo, modelos de predicción, cebada

## ABSTRACT

Ramularia Leaf Spot (RLS) caused by the fungus *Ramularia collo-cygni* (Rcc) has become a threat to barley production in Argentina and the world, causing losses in grain yield and quality. Characteristics of the pathogen such as a long latency period, numerous transposonic regions and the ability to infect alternative hosts might lead to a rapid adaptation to environmental changes and/or control measures such as fungicides showing its high evolutionary potential. The objectives of this thesis were: a) to study the genetic diversity and structure of the Rcc population in Argentina and in comparison to two European populations, b) study the impact of specific gene mutations on the sensitivity levels of Rcc isolates to the most widely used fungicides in Argentina; c) to establish fungicides application strategies with optimal protection period (PP) to control RLS ; d) to quantify the impact of RLS on grain yield and physical quality and e) establish the association between environmental conditions and RLS levels to design prediction models. Genetic analysis was performed on Scottish (n=60), Czech (n=30), and Argentinian (n=21) isolates with ten Rcc-specific SSR markers. Different parameters were estimated: genotypic richness, diversity, linkage disequilibrium, level of association and geographic differentiation. The Argentinian population of Rcc had lower genetic diversity (moderate) and higher level of structuring and number of clonal isolates than the European populations. Evidence of sexual reproduction was observed in all populations. The significant differentiation ( $P_{D_{jost}} < 0.001$ ) at the population and region/continent scale suggests the occurrence of a genetic bottleneck in the entry of Rcc to Argentina (by seed) and that this population could still be in a state of establishment/emergence. Based on a sensitivity assay and sequencing of *cytb*, *cyp51* and *sdh* genes in Argentinian isolates, we observed high occurrence

of haplotypes resistant to strobilurins (G143A) and, to a lesser extent, the occurrence of mutations related to reduced sensitivity to triazoles and carboxamides. We found six haplotypes that provide evidence that Rcc is potentially adapting to fungicides. In field trials (n=8) it was determined that the PP starts from the third detected node at the stem elongation stage (GS33) to the awns-peeping stage (GS47), proposing the flag leaf stage (GS39) as the most efficient spraying time for RLS control. Maximum grain yield losses caused by RLS were up to 16%, and were obtained by grain weight (8.7%) and plumpness (20%) losses. We proposed four possible forecast models based on the average temperature accumulated during tillering and elongation stages in combination with the number of days with available water in the soil, number of days with water excess, duration of leaf wetness or accumulated rainfall during GS21 until GS39.

**Keywords:** genetic diversity, mutations, fungicides, productive impact, prediction models, barley

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.) es, después del trigo, el cereal de invierno más sembrado en la Argentina ocupando una superficie de alrededor de 800.000 ha con una producción total de 2.9 millones de toneladas (año 2020). El sur de la provincia de Buenos Aires es la zona con mayor aporte, donde se produce más del 60% del total (SIIA, 2018). Entre las limitantes más importantes del cultivo en esta región se destacan a las enfermedades foliares que reducen el área fotosintética afectando el rendimiento y calidad del grano. Entre las enfermedades más importantes se encuentran la mancha en red tipo red, escaldadura y mancha borrosa causadas por los hongos *Drechslera teres* f. *teres* (teleomorfo *Pyrenophora teres* f. *teres* (Sacc.) Shoemaker), *Rhynchosporium commune* Oud. (Davis) y *Bipolaris sorokiniana* (teleomorfo *Cochliobolus sativus* (Sacc.) Shoemaker), respectivamente.

En la campaña 2012/13 se observó una severa epifitía del salpicado necrótico de la cebada (SNC), provocado por el hongo *Ramularia collo-cygni* (Sutton and Waller, 1988; *Rcc*), en amplias regiones de producción de Argentina (Carmona et al., 2013) y Uruguay (Stewart, 2001). En Argentina se reportaron pérdidas de rendimiento de grano de hasta un 70% (Carmona et al., 2013) y en la calidad comercial de grano (peso de grano y calibre) (Norma V - ANEXO A - SENASA Res. 27/2013). A nivel mundial las pérdidas en rendimiento y calidad de grano por el SNC reportadas son muy variables según país o región, variando entre 0.4 y 1 tn/ha (Havis et al., 2015).

*Ramularia collo-cygni* es un hongo que presenta una distribución cosmopolita en las regiones de producción de cebada. Actualmente es considerado uno de los patógenos más importantes del cultivo en el norte de Europa (Escocia, Inglaterra, Irlanda, Francia, entre otros); Namibia en África; Nueva Zelanda en Oceanía y Argentina y Uruguay en América entre otros (Kiehr et al., 2002; Gubis et al. 2008; Walters et al., 2008; Koric et al., 2009; Afanasenko et al., 2012; Sooväli et al., 2014; Havis et al., 2015).

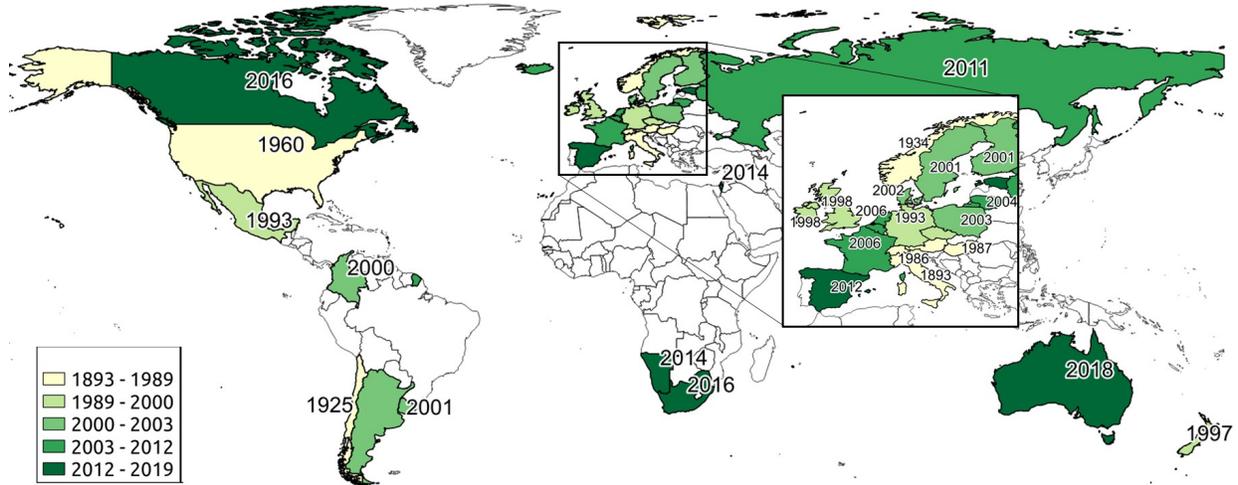


Figura 1.1. Mapa de distribución y año de primera detección de *Ramularia collo-cygni* a nivel mundial (Spencer et al., 2019).

Los síntomas del SNC consisten en pequeñas lesiones necróticas salpicadas sobre el limbo de las hojas, con y sin halo clorótico, las cuales se visualizan principalmente desde floración. En estadios avanzados, las lesiones se expanden y cubren toda la superficie foliar. Estos síntomas también se encuentran en el tallo y vainas foliares, y a veces alcanzan las espigas (Carmona, 2013; Havis et al., 2014). Como resultado, la planta senesce anticipadamente aumentando la probabilidad de ocurrencia de quebrado del tallo impactando directamente sobre la producción. El desarrollo de síntomas I(macollaje/encañazón) y subsiguiente esporulación se encuentra relacionada a eventos de estrés (anegamiento, acumulación de superóxidos, bajos niveles de nitrógeno, radiación entre otros) (Schützendübel et al., 2008, Oxley et al., 2010, McGrann et al., 2018 y Hoheneder et al., 2021).

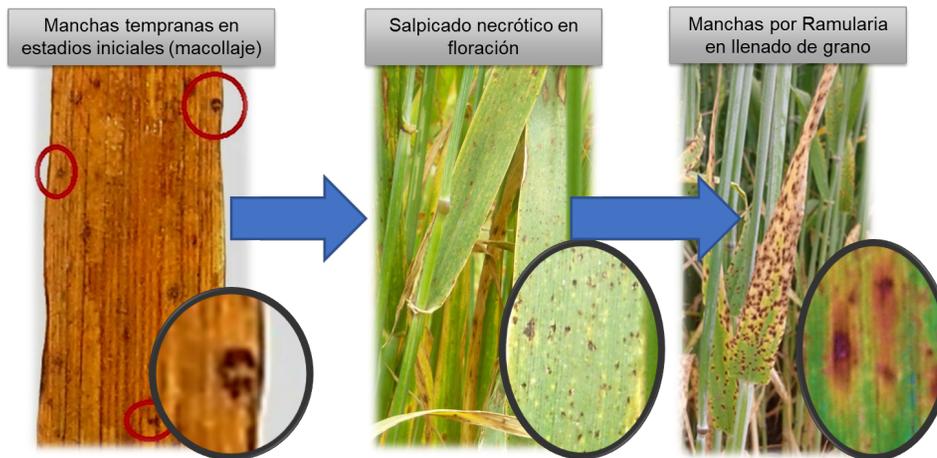


Figura 1.2. Sintomatología del salpicado necrótico de la cebada causada por *Ramularia collo-cygni* en diversos estadios del cultivo de cebada.

Se han llevado a cabo varios estudios para conocer la biología de *Rcc* y los factores que determinan el desarrollo de síntomas y su implicancia dentro de la epidemiología de la enfermedad (Walters et al., 2008 y Huss 2004). Desde este punto de vista, es muy complejo clasificar a esta enfermedad según un modelo o patrón epidemiológico. *Rcc* esporula en el hospedante con mayor intensidad en floración y en menor medida en hojas senescentes o que han sufrido algún estrés en estadios previos o tempranos. Esto sugiere que el progreso de la enfermedad seguiría un modelo policíclico, aunque cabe destacar que las fuentes de inóculo primarias son diversas en cuanto a su origen y tiempos de liberación de inóculo. La existencia de una fase hemi-endófitica (Newton et al., 2010) acompañada de prolongados períodos de latencia supone una combinatoria o comportamiento intermedio entre un modelo mono, oligocíclico y/o policíclico.

Se ha establecido que las fuentes de inóculo primaria y los medios de disseminación son la semilla, los hospedantes alternativos y/o cebadas voluntarias y el rastrojo de cebada o de otras gramíneas (Huss, 2004; Salamati & Reitan, 2006). *Rcc* posee una fase espermogonial llamada *Asteromella* sp. en la que se producen estructuras tipo picnidios llamados espermogonios (Khier, 2002). Éstos liberan al ambiente pequeños conidios enteroblásticos (espermacios) (Pazoutová, 2012). Esta fase se produce en rastrojos de cebada y otros hospedantes como *Elymus repens* sin. *Agropyron repens* (agropiron) (Walters et al., 2008). En otros patosistemas como *Pinus nigra* (pino)-*Dothistroma septospora* (teleomorfo: *Mycospaherella pini*) que involucran al género *Asteromella* en su ciclo indican que con la presencia de esta fase en acículas los síntomas de la enfermedad (tizón de acículas por *Dothistroma*) fueron más severos (Bednářová, 2006). La importancia de esta fase en la subsecuente infección del cultivo de la cebada aún está en discusión. También puede encontrarse a *Rcc* creciendo en hojas muertas como saprófito (micelio) (Salamati y Reitan, 2006).

Thirugnanasambandam et al. (2011) demostraron la presencia de *Rcc* bajo la cubierta seminal y, en menor medida, en los restantes componentes de la semilla. Complementariamente, Havis (2006) confirmó la transmisión de *Rcc* desde la semilla a la plántula y el subsecuente desarrollo asintomático (fase endófitica) del patógeno en tejidos de la planta adulta. Asimismo, Havis et al. (2008) empleando trampas caza-esporas no detectaron la presencia de conidios aéreos del hongo hasta fines de julio en las condiciones de cultivo en Escocia, sugiriendo a la semilla como fuente de inóculo principal. Adicionalmente, Matusinsky et al., (2011) encontraron que el nivel de contaminación en semilla *Rcc* no fue el factor determinante en los niveles de enfermedad alcanzado en los cultivos. Recientemente, Havis et al., (2023) relación entre los niveles de esporas en el aire (75 y 105 días antes de la cosecha) y

los niveles finales del SNC en cebadas de invierno en el Reino Unido. Actualmente sigue en discusión la importancia de las fuentes de inóculo en los niveles finales de la enfermedad, ponderando principalmente a la semilla y a las esporas dispersadas por el aire.

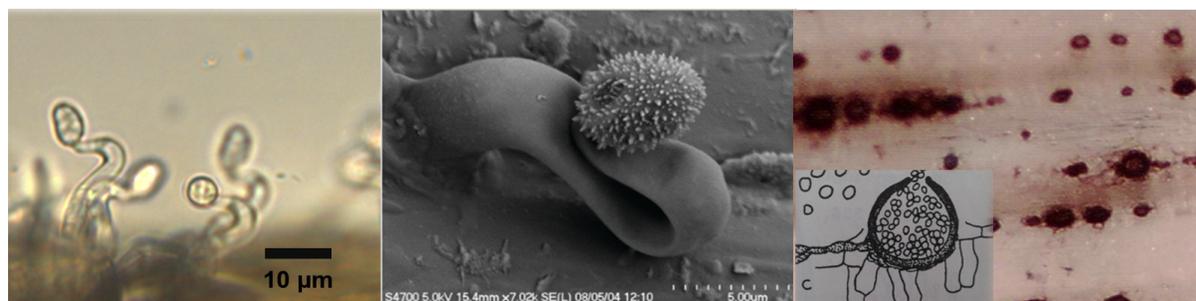


Figura 1.3. Conidios y conidióforos en fascículos (izquierda y centro, fuente: Erreguerena I y SRUC, respectivamente) desde estomas foliares y forma espermogonial (*Asteromella* sp) (derecha) del hongo *Ramularia collo-cygni* (Khier, 2002; Barnett, 2006).

Durante el ciclo del cultivo, en estadios iniciales, suelen observarse conidios sobre conidióforos libres en tejidos de las hojas inferiores senescentes, alrededor de pequeños puntos necróticos ocasionados por *Rcc*. Éstos constituyen el inóculo secundario para subsecuentes infecciones en estadios más avanzados (Huss, 2002; Hess et al., 2007; Pereyra, 2013; y Havis et al., 2014b). Los conidios son muy pequeños ( $8 \mu\text{m}$  largo y  $4,4 \mu\text{m}$  ancho) y livianos (Braun, 1998) lo que le confiere una gran capacidad de diseminación a través del viento (Havis et al., 2014). Las epifitias severas en cebadas de primavera ocurren no sólo por el aporte de inóculo presente en semillas infectas sino también por la llegada de conidios desde otras fuentes (inóculo secundario y/o primario) (Schützendübel et al., 2008; Zamani-Noor et al., 2011). *Rcc* también ha sido aislamiento de hospedantes alternativos inoculados como *Triticum aestivum* L. (trigo pan), *Triticum durum* Dest. (trigo candeal), *Avena sativa* L. (avena), *Poa pratensis* L. (grama de prado), *Lolium perenne* L. (raigrás perenne), *Agropyron repens* (agropiro) y *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. (Frei y Gindrat, 2000; Peraldi et al., 2014) y en cebadas voluntarias de campañas anteriores (Erreguerena et al., 2014). En Argentina, estas especies vegetales se encuentran presentes en los lotes de producción o zonas aledañas, y en algunos casos llegan a estados de madurez fisiológica antes que la cebada.

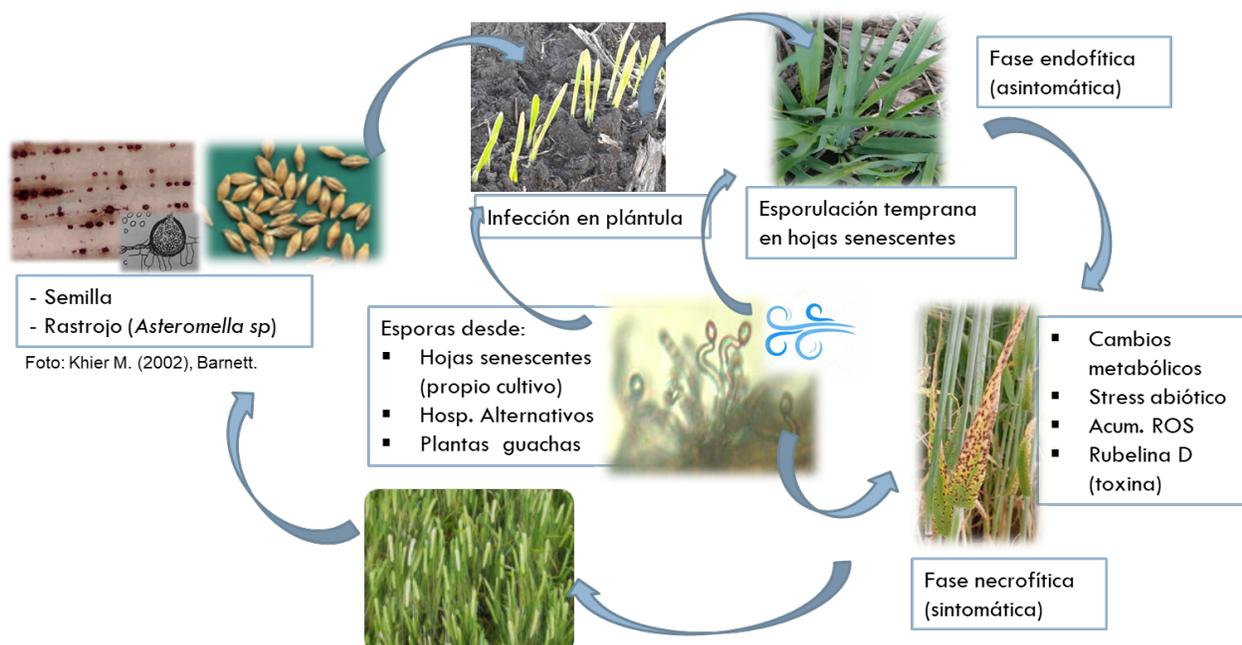


Figura 1.4. Ciclo del salpicado necrótico de la cebada causada por el hongo *Ramularia collo-cygni*.

Las estrategias de reproducción y de dispersión de hongos patógenos tienen una importante influencia tanto en la estructura de la población como en el potencial evolutivo de las poblaciones de patógenos. A su vez, contribuyen significativamente a mayor diversidad y la rápida evolución de genotipos mejor adaptados a nuevos ambientes (Barrett et al., 2008; McDonald y Linde, 2002). La deriva genética y la selección natural o inducida favorecen la diferenciación genética local de las poblaciones (Slatkin, 1987). Los estudios genéticos de poblaciones son implementados con éxito para analizar el potencial evolutivo de poblaciones de varios patógenos como *Zymoseptoria tritici*, *Rhynchosporium commune* (McDonald et al., 1999), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Holtz et al., 2014) entre otros. Estudios genéticos sobre poblaciones de *Rcc* europeas, utilizando marcadores moleculares como los AFLP (Amplified Fragment length polymorphism) (AFLP), indicaron que las poblaciones de *Rcc* serían muy diversas y que es probable que tenga estrategia de reproducción sexual y asexual durante la temporada de crecimiento (Hjortshoj et al., 2013; Leisova-Svobodova et al., 2012). Mediante la utilización de marcadores moleculares SSR (secuencias simples repetidas), Piotrowska et al. (2016) determinaron que dos poblaciones de *Rcc* europeas (Escocia y Republica Checa) tuvieron una alta diversidad genética con un gran potencial evolutivo sugiriendo que la reproducción sexual sería parte del ciclo de vida del patógeno. En Argentina, *Rcc* es considerado un patógeno emergente, por lo que sería de gran utilidad conocer el nivel de

diversidad, estructuración y adaptación a medidas de control (ej: sensibilidad a fungicidas) para considerar su potencial evolutivo-adaptativo y evaluar el riesgo que esto implicaría sobre la producción.

Ante la falta de variedades resistentes frente al SNC, el manejo de la enfermedad se basa en la utilización de fungicidas foliares y de semillas (Hess et al., 2007; Walters et al., 2008; Hess et al., 2009). En Europa, desde 1999, esta enfermedad se controló mediante el uso de fungicidas de la familia de las estrobilurinas (inhibidores de la quinona externa, IQe). Pocos años después (2002) estas moléculas perdieron efectividad, lo cual se explicó por una mutación puntual (G143A) en el gen del *citocromo b (cytb)* de *Rcc* (Fontaine y Fraaije, 2009). En la actualidad, en dicho continente existen poblaciones del hongo resistentes a las estrobilurinas en una proporción de 50:50 con respecto a las sensibles (Havis et al., 2015). A partir de estas evidencias fue necesario sumar otras familias de moléculas de fungicidas para mantener altos niveles de protección y evitar y/o retrasar la generación de resistencia del patógeno a estos agentes químicos (Russell, 2009; HGCA, 2014). Entre ellas se incluyen a los triazoles (inhibidores de la desmetilasa, IDM; ej: protioconazol, epoxiconazol), las carboxamidas (inhibidoras de la succinato deshidrogenasa, ISDH; ej: bixafen, sedaxane, fluxapyroxad e isopyrazam) y fungicidas multi-sitio como el clorotalonil. En el caso de los ISDH, el desarrollo de resistencia por parte de *Rcc* a este grupo químico es clasificado actualmente por la Fungicide Resistance Action Comitee (FRAC) de “medio a alto riesgo” dado que sólo un único punto de mutación en el gen que codifica para el complejo II (Succinato Deshidrogenasa) es necesario para desarrollar altos niveles de resistencia (Hjortshøj et al., 2013; Piotrowska et al., 2011, 2013). Si bien todos los datos actualmente disponibles sugieren que *Rcc* es todavía sensible a todos los fungicidas ISDH, se han reportado aislamientos con sensibilidad reducida a esta familia química en Alemania, Irlanda y Eslovenia (FRAC 2015 SDHI, Working Group). En el Reino Unido, para el control de *Rcc*, se utilizan mezclas de ISDHs (carboxamidas) con IDMs (triazoles) y un fungicida con mecanismo de acción multisitio, de bajo riesgo de generación de resistencia, como el clorotalonil (Piotrowska, 2014). En Argentina y Uruguay, los programas de protección química para el SNC están basados en el uso estrobilurinas y carboxamidas, con o sin triazoles en doble o triples mezclas y combinaciones con clorotalonil (este último sólo en Uruguay) (Pereyra et al., 2014). En este escenario, resultaría de gran importancia la implementación de estrategias tendientes a reducir los riesgos de aparición de variantes del patógeno resistentes a la enfermedad (anti-resistencia) y el relevamiento de la respuesta de las poblaciones locales provenientes de las diferentes zonas de producción ante las diferentes moléculas fungitóxicas.

La mayor dispersión y producción de esporas de *Rcc* y severidad del SNC se han asociado positivamente con el tiempo de mojado de hoja (Havis et al., 2009b; Havis et al., 2012) y/o alta humedad relativa (Salamati y Reitan, 2006) durante los primeros estadios de la encañazón (Z30-31) (Zadoks et al., 1974). En Argentina, las epifitias importantes del SNC se han relacionado a las precipitaciones acumuladas en los meses de agosto y septiembre por encima de la media histórica (Carmona, 2013).

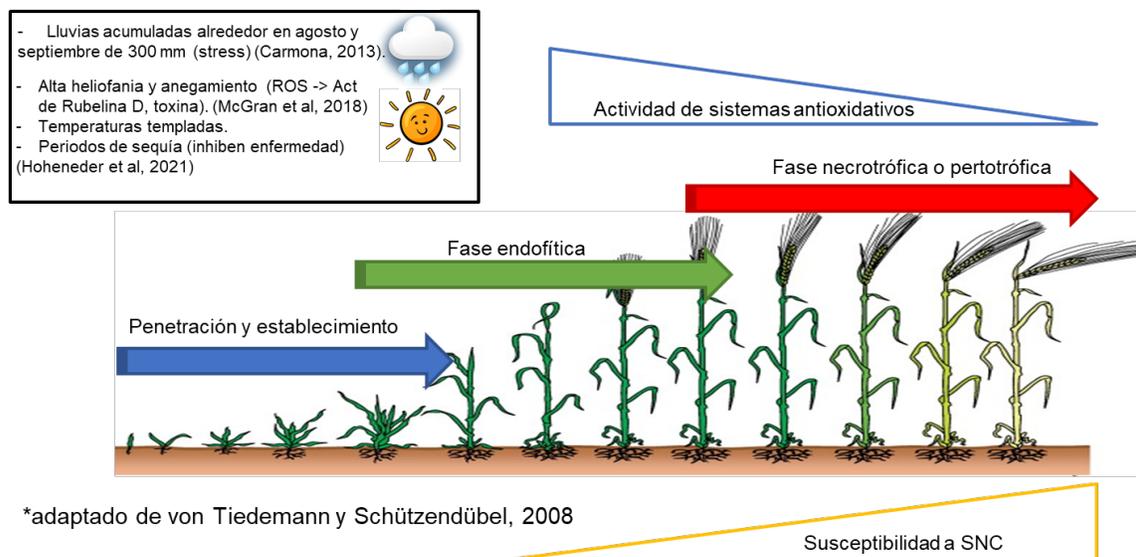


Figura 1.5. Factores asociados a la ocurrencia del salpicado necrótico de la cebada (SNC) causado por el hongo *Ramularia collo-cygni*.

Paveley et al. (2000) demostraron que el inicio de las enfermedades foliares policíclicas como mancha de la hoja causada por *Z. tritici* se relacionó con el estadio de desarrollo de las hojas de trigo. Estos autores demostraron que el momento de emergencia completa (definido como el 90% del tamaño máximo de la hoja) de la hoja correspondería al tiempo 0 de la epifitia, en coincidencia con la mayor exposición de las hojas al inóculo (principalmente secundario). Schützendübel et al. (2008) observaron que la caída de la actividad del sistema de protección antioxidativo de las hojas llegando a floración se asocia e incrementa la incidencia y severidad de los síntomas del SNC. En el cultivo de cebada la emergencia y expansión total de las hojas superiores (-2,-1 y bandera) ocurre entre elongación de tallo y aristas visibles.

El momento de aplicación de los fungicidas cumple una función determinante para el manejo del SNC (Havis et al., 2015). La mayoría de los estudios europeos indican que la aplicación de fungicidas en aristas visibles (Z49) brinda el mejor control del SNC. Los programas de protección química en Uruguay y Alemania de doble aplicación en elongación- de primer a

tercer nudos (Z31-33) y aristas visibles (Z47) también ofrecen eficiencias de control aceptables (entre 60 y 80 %) y reduciendo las pérdidas de rendimiento de grano (12% promedio) (Pereyra et al., 2014) por esta enfermedad. En Argentina, ensayos comerciales sugieren que la aplicación de mezclas de moléculas IQes, IDMs e ISDHs en inicio de elongación de tallo (Z31) brindaría el mejor control del SNC (González Montaner, comunicación personal, Havis et al., 2015). En cambio, otros autores proponen la aplicación de mezclas con carboxamidas a finales del estadio de espigazón (Z59) (Palacios, 2019).

Las problemáticas presentadas y la falta de información sobre estos temas a nivel local hacen necesario el estudio genético de poblaciones del patógeno para analizar su diversidad y capacidad de adaptación a nuevos ambientes. Conocer el nivel de sensibilidad de la población argentina de *Rcc* a fungicidas y el periodo de protección o periodo de mayor susceptibilidad de cultivo al SNC permitirá el diseño de estrategias de control de *Rcc* más eficientes que además eviten o retrasen la generación de resistencia a fungicidas. Teniendo en cuenta la falta de estudios mencionados, se consideran las siguientes hipótesis de trabajo con sus respectivos objetivos.

## 1.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al diseño de estrategias de manejo eficiente para el control del salpicado necrótico de la cebada, causado por *Ramularia collo-cygni*, basados en el conocimiento de la diversidad genética y sensibilidad de la población del hongo frente a fungicidas, así como en la identificación de períodos de mayor susceptibilidad de la cebada a la enfermedad en Argentina.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Determinar y caracterizar el nivel de sensibilidad de las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* en Argentina frente a los fungicidas más comúnmente utilizados en su control, con el propósito de informar estrategias efectivas de manejo y control de esta enfermedad en la región.
- II- Identificar y analizar cambios en la sensibilidad a los fungicidas a lo largo del tiempo en las poblaciones argentinas de *Ramularia collo-cygni*, con el fin de evaluar posibles tendencias a la resistencia y adaptación del hongo a los tratamientos con fungicidas empleados para su control.

III- Caracterizar la variación genética de la población de *Ramularia collo-cygni* de Argentina y compararla con dos poblaciones europeas más antiguas para conocer y contrastar su potencial evolutivo.

IV- Evaluar la presencia de estructura genética en la población de *Ramularia collo-cygni* en Argentina y realizar una comparación con dos poblaciones europeas con el fin de identificar posibles patrones de diferenciación o similitud entre las mismas.

V- Determinar y definir el período de susceptibilidad de la cebada al salpicado necrótico causado por *Ramularia collo-cygni*, con el objetivo de optimizar las estrategias de manejo y control de la enfermedad en función de la fenología del cultivo.

VI- Cuantificar y evaluar el impacto del salpicado necrótico de la cebada en las variables productivas del cultivo, con el fin de comprender su influencia en el rendimiento y la calidad de la cosecha, proporcionando información relevante para la toma de decisiones en el manejo de la enfermedad.

VII- Describir y analizar las condiciones ambientales vinculadas a los niveles de salpicado necrótico en cebada, con el propósito de identificar patrones y relaciones significativas entre el ambiente y la prevalencia de la enfermedad contribuyendo al control eficiente de la enfermedad.

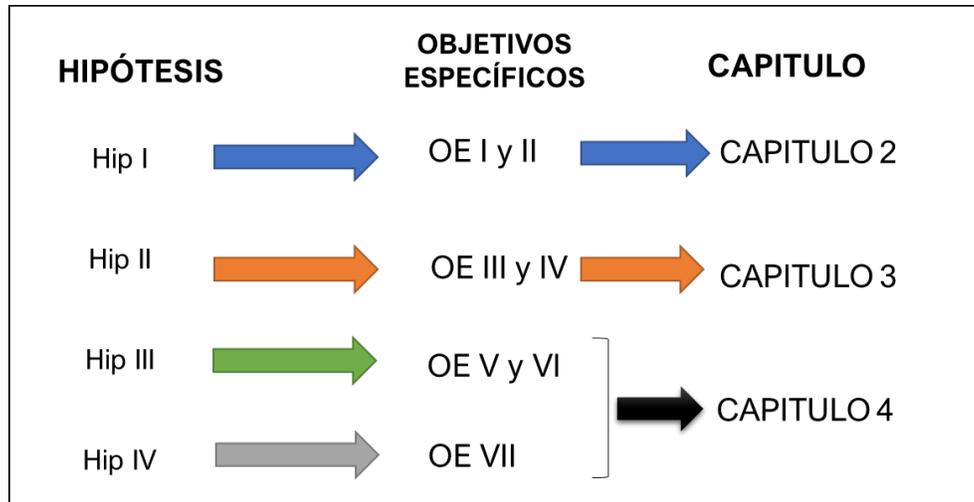
## 1.1. HIPÓTESIS

I- Los aislamientos de *Ramularia collo-cygni* provenientes de la zona de producción de cebada en Argentina son sensibles a todos los grupos químicos de fungicidas utilizados para el control del SNC en Argentina.

II- La variabilidad genética de las poblaciones argentinas de *Ramularia collo-cygni* es menor que las de poblaciones europeas.

III- El período de mayor susceptibilidad de la cebada al salpicado necrótico ocurre entre elongación de tallo y aristas visibles en coincidencia con el momento de desarrollo completo de las hojas superiores del canopeo.

IV- El balance hídrico (% agua disponible) del suelo y las variables meteorológicas estudiadas y relacionadas a éste, están asociadas a la ocurrencia o ausencia de epifitias del salpicado necrótico de la cebada.



Esquema 1. Criterio de organización de los capítulos del manuscrito en relación a los objetivos específicos (OE) e hipótesis (Hip) asociadas a los mismos.

## CAPÍTULO 2

Caracterización de la sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Ramularia collo-cygni* en Argentina y mutaciones asociadas en proteínas fúngicas involucradas

## 2.1. INTRODUCCIÓN

En la producción cerealera argentina, la cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el segundo cultivo de invierno con una superficie productiva de un millón de hectáreas. En el promedio de los últimos años, los rendimientos de grano se encuentran en torno a los 4100 kg ha<sup>-1</sup> (Agroindustria, 2020). Las enfermedades fúngicas de las hojas pueden conducir a una pérdida severa del rendimiento (alrededor de un 20% promedio), por lo tanto, la cebada se trata comúnmente dos o tres veces por temporada con fungicidas (en semilla y de forma foliar) para brindar un control efectivo de patógenos. El salpicado necrótico de la cebada (SNC), causada por *Ramularia collo-cygni* (Sutton & Waller, 1988) (*Rcc*), considerada una enfermedad esporádica, se ha convertido en una importante limitante biótica para la producción de cebada en Argentina y Uruguay desde 2012 (Carmona et al. 2013; Pereyra, 2013). Se ha demostrado que todas las variedades de cebada sembradas en Argentina son susceptibles al SNC (Moreyra et al. 2020); por lo que el control de la enfermedad se basa principalmente en la aplicación de fungicidas. Los programas argentinos de protección contra la enfermedad de la cebada se basan en el uso de ISDHs como isopirazam (2012), fluxapirroxad (2014) y bixafen (2015) entre otros como los principales ingredientes activos de fungicidas para el control del SNC. Otros fungicidas, como los IQes (azoxistrobina y piraclostrobina) e IDMs (protioconazol y el epoxiconazol) se utilizan en mezclas junto con los ISDH mencionados (Erreguerena et al. 2021). El clorotalonil, que hasta hace poco era de uso común y esencial de los programas de protección europeos (Havis et al. 2015), no está registrado para su uso en cebada en Argentina. *Rcc* es considerado como un patógeno de alto riesgo para el desarrollo de resistencia a los fungicidas (FRAC, 2019). En Europa, hay varios reportes sobre resistencia cualitativa y/o cuantitativa a fungicidas (Brent et al. 2007a) en *Rcc* a los tres grupos de fungicidas mencionados (Fountaine y Fraaije, 2009; Piotrowska et al. 2017; Rehfus et al., 2019; Kiiker et al, 2021, Assinger et al, 2021) asociado con varias mutaciones en los genes que traducen las proteínas objetivo de los fungicidas (intercambios de aminoácidos en diversas posiciones). El enfoque experimental de estos estudios se ha basado principalmente en la asociación de la presencia o ausencia de mutaciones y los niveles de sensibilidad in vitro (cálculo de la concentración inhibitoria o efectiva al 50%, CE50) para contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a los fungicidas. Varios ejemplos de mutaciones han sido reportados en individuos de poblaciones de *Rcc* principalmente en Europa que otorgan desde resistencia total, moderada, baja a nula a diversos fungicidas. En el caso del

gen *sdh* (gen de la succinato deshidrogenasa) varias mutaciones como B-H266Y/R/L, B-T267I, B-I268V, C-N87S, C-H146R, C-H153R se han reportado con mayor frecuencia donde las dos ultimas confieren altos niveles de resistencia a carboxamidas al individuo portador. Las mutaciones en el gen *cyp51* (gen de la esterol C14-demetilasa) es el mecanismo más común de adaptación en muchos patógenos fúngicos a los IDMs [41,42]. En total, se han reportado identificaron 12 mutaciones y 15 haplotipos diferentes de Rcc en dicho gen en 2017 en Europa [33]. El haplotipo más frecuente fue el C1 con mutaciones I381T, I384L y Y459C y el segundo haplotipo más popular C3 tenía una combinación de mutaciones I381T, I384L y Y461H [33]. En lo que respecta a resistencia estrobilurinas la única mutación reportada en Rcc fue la sustitución G143A en la quinona externa en poblaciones de Rcc Europa. Esta mutacion le confiere resistencia total a toda la flia IQes (Havis et al, 2015;

Poco se sabe sobre el estado actual de Rcc en Argentina en cuanto a la sensibilidad a los fungicidas utilizados para su control y la presencia o ausencia de mutaciones que le confieren resistencia a los fungicidas o pérdida de sensibilidad. Este trabajo tuvo como objetivo conocer el impacto de diferentes mutaciones en los niveles de sensibilidad en aislamientos de campo de Rcc a diversos fungicidas utilizados para el control de SNC en cebada en Argentina y otros países.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Técnica de muestreo y aislamiento

En los años 2015 y 2017 se recolectaron muestras de hojas de cebada con síntomas de SNC en el estadio de llenado de grano de lotes comerciales de la provincia de Buenos Aires en Argentina (Norte y Sur). En cada lote se tomaron entre cinco y diez plantas con síntomas característicos de la enfermedad (manchas necróticas rectangulares de 0.8–1.4 mm de largo y 0.5–0.7 mm de ancho). El nivel de severidad fue variable entre lotes muestreados clasificados como bajo, medio y alto (5-20, 21-40 y >40, respectivamente). Los aislamientos de *Ramularia collo-cygni* se obtuvieron mediante la escisión de conidios con una aguja estéril fina (0.25 x 6 mm) (Novofine® 31G, Novo Nordisk, Dinamarca) del envés de hojas desde las manchas de cebada sintomáticas. Los cultivos de Rcc de una sola espora se cultivaron en agar de zanahoria (CA) (Leslie et al., 2006) suplementados con antibióticos: cloranfenicol (3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y

estreptomycin (5 µg ml<sup>-1</sup>). Mirtha Kiehr de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina) suministró dos aislamientos de 2012 con menor exposición a fungicidas ISDH y IDM más nuevos (como prothioconazol). Los detalles de los aislamientos estudiados (ubicación, variedad, fungicidas pulverizados y severidad de SNC) se muestran en la tabla 2.1. Luego, los aislamientos se usaron para el ensayo de sensibilidad o el análisis de los genes objetivo y se almacenaron a -80°C en medio líquido de papa dextrosa al 2%, modificado con 15% de glicerol.

Tabla 2.1. Aislamientos de *Ramularia collo-cygni* utilizados en este estudio. <sup>1</sup>Provincia de Buenos Aires, <sup>2</sup>Grupo de fungicidas (foliares) utilizados en el año muestreado. \*dosis dividida entre dos momentos de pulverización, () diferentes momentos de pulverización. Sev: severidad del salpicado necrótico de la cebada donde alto (A, >40%), medio (M, 21-40%) y bajo (B, 5-20%).

| Aislamiento | Ubicación geográfica         | Región <sup>1</sup> | Año  | Varietal | Sev | Ingredientes activos <sup>2</sup>                                       | Dosis (cm <sup>3</sup> /ha) |
|-------------|------------------------------|---------------------|------|----------|-----|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1           | 37°50'09.7"S<br>58°41'44.6"O | Sur                 | 2015 | Andreia  | A   | isopyrazam + azoxystrobina                                              | 500                         |
| 2           | 37°31'45.4"S<br>58°49'51.8"O | Sur                 | 2015 | Scarlett | A   | cyproconazol + azoxystrobina                                            | 400                         |
| 3           | 38°16'49.2"S<br>58°34'50.3"O | Sur                 | 2015 | Shakira  | M   | (cyproconazol + azoxystrobina) +<br>(epoxiconazol + piraclostrobina)    | 400<br>+ 1000               |
| 4           | 38°31'59.6"S<br>58°48'01.0"O | Norte               | 2015 | Andreia  | M   | cyproconazol + azoxystrobina                                            | 400                         |
| 5           | 38°30'11.1"S<br>59°44'28.7"O | Norte               | 2015 | Andreia  | B   | fluxapyroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina                        | 1200                        |
| 6           | 38°02'15.1"S<br>60°08'09.1"O | Norte               | 2015 | Traveler | B   | isopyrazam + azoxystrobina                                              | 500                         |
| 7           | 38°32'06.1"S<br>58°40'24.9"O | Sur                 | 2015 | Shakira  | M   | -                                                                       | -                           |
| 8           | 38°00'31.0"S<br>57°44'26.4"O | Sur                 | 2015 | Explorer | A   | isopyrazam + azoxystrobina                                              | 500                         |
| 9           | 37°54'42.8"S<br>61°28'24.4"O | Sur                 | 2012 | Scarlett | M   | cyproconazol + azoxystrobina                                            | 400                         |
| 10          | 38°24'46.4"S<br>61°20'29.7"O | Sur                 | 2012 | Scarlett | M   | cyproconazol + azoxystrobina                                            | 400                         |
| 11          | 35°10'23.0"S<br>60°36'59.4"O | Norte               | 2017 | Andreia  | M   | fluxapyroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina                        | 1200                        |
| 12          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"O | Sur                 | 2017 | Aliciana | A   | isopyrazam + azoxystrobina                                              | 500                         |
| 13          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"O | Sur                 | 2017 | Shakira  | A   | fluxapyroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina                        | 1200                        |
| 14          | 33°58'12.9"S<br>60°42'42.7"O | Norte               | 2017 | Andreia  | M   | cyproconazol + picoxistrobin                                            | 400                         |
| 15          | 37°37'35.5"S<br>58°30'18.4"O | Sur                 | 2017 | Andreia  | M   | fluxapyroxad* + epoxiconazol* +<br>piraclostrobina*                     | 1200*                       |
| 16          | 37°47'52.9"S<br>59°50'56.4"O | Norte               | 2017 | Overture | A   | prothioconazol + trifloxistrobina                                       | 700                         |
| 17          | 38°24'49.8"S<br>60°12'33.4"O | Norte               | 2015 | Shakira  | B   | isopyrazam + azoxystrobina                                              | 500                         |
| 18          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"O | Sur                 | 2017 | Aliciana | A   | fluxapyroxad* + epoxiconazol* +<br>piraclostrobina*                     | 1200*                       |
| 19          | 33°59'18.5"S<br>60°27'13.3"O | Norte               | 2017 | Andreia  | M   | (cyproconazol + azoxystrobina) +<br>(prothioconazol + trifloxistrobina) | 400<br>+ 1000               |
| 20          | 37°34'15.7"S<br>58°32'27.0"O | Sur                 | 2017 | Andreia  | M   | fluxapyroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina                        | 1200                        |
| 21          | 37°59'56.4"S<br>58°57'05.4"O | Sur                 | 2017 | Shakira  | A   | fluxapyroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina                        | 1200                        |

### *2.2.2. Identificación molecular de aislamientos de Rcc*

Para la extracción de ADN genómico se tomaron fragmentos de agar colonizados por Rcc (1 x 1 cm) y se transfirieron a cajas Petri de 9 cm de diámetro con PDA fresco. Posteriormente, con un esparcidor de vidrio y una alícuota de agua destilada estéril, se esparció el micelio por toda la superficie del medio. El procedimiento se repitió para cada aislamiento por duplicado y las placas se incubaron a 18°C en la oscuridad durante doce días en una incubadora (Minitron®, Infors HT, Basilea, Suiza). Se extrajeron fragmentos de agar colonizado (0.5 cm de tamaño) de cada aislamiento con un bisturí y se transfirieron a una solución tampón de extracción de 75 µl (Quanta Extract DNA-Prep Kit for PCR, Quantabio®, Beverly, Massachusetts, EE. UU.) en Eppendorf de 1.5 ml. ® tubos. Luego se colocaron en un termociclador (PCR System 9700, Gene Amp®, Applied Biosystems, EE. UU.) y se incubaron a 95 °C durante 30 min. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente (20 °C) y se añadieron 75 µl de solución tampón de estabilización. Para la reacción de PCR, 12.5 µl de VWR Red Taq DNA Polymerase® Master mix; 0.5 µl de los cebadores RamF6 y RamR6 (Taylor et al., 2010) en una concentración de 10 uM cada uno. Se colocaron 9.5 µl de agua destilada estéril y 2.0 µl del ADN extraído en microtubos Eppendorf® (50 ul) con un volumen de reacción final de 25 µl. El proceso se realizó para un total de 23 reacciones, incluido el control positivo (ADN del aislamiento Rcc de referencia DK05 de Scotland Rural College, Escocia, Reino Unido) y el control negativo (agua destilada estéril). Las muestras se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 29 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por un min y extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1,2 % (Eurogentec®, Lieja, Bélgica). Para la preparación del gel y para realizar la electroforesis se utilizó el tampón de carga TBE 0,5x (tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). Para visualizar las bandas bajo luz UV, se añadió 1 µl de GelRed Nucleic Acid Stain, 10000x en DMSO (Biotium, Hayward, EE. UU.) por cada 10 ml de gel de agarosa utilizado. Las muestras se analizaron con marcadores de tamaño de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) durante la electroforesis. El fragmento amplificado esperado para Rcc fue de 115 pb (Taylor et al., 2010).

### *2.2.3. Ensayo para determinar la sensibilidad de aislamientos de Rcc frente a fungicidas*

Se produjeron suspensiones de micelio de Rcc a partir de aislamientos cultivados en caldo de éster alquílico (AE) (Skinner et al., 1998) durante 12 días a 16 °C en un agitador orbital (120 rpm) (Minitron®, Infors HT, Basilea, Suiza). Las suspensiones se filtraron y diluyeron a una concentración de  $2.5 \times 10^3$  piezas de micelio por ml en cámara de Neubauer (Piotrowska et al., 2016). Se utilizaron seis fungicidas diferentes en el ensayo de sensibilidad: dos ISDH (fluxapiraxad e isopirazam), dos IDM (epoxiconazol y protioconazol-desthio), IQe (azoxistrobina) y un multisitio (clorotalonil) (98 % de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Todos los productos químicos se suministraron como grado técnico y se prepararon stocks de fungicidas a una concentración de  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  disolviéndolos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). El ensayo de sensibilidad se realizó en una placa de 96 pocillos utilizando concentraciones finales de fungicida de 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0 ppm en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{l}$  de suspensión de micelio añadido a 100  $\mu\text{l}$  de medio enmendado con fungicida) con tres repeticiones (tres pocillos) por aislamiento. Las concentraciones de epoxiconazol fueron 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 y 0 ppm. Todas las diluciones de micelio y fungicida se realizaron en caldo AE. La concentración final más alta de DMSO en pozos fue igual a 2% v/v cuando se utilizó la concentración más alta de fungicida de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  y 1% v/v para concentraciones de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Las placas se incubaron a 16°C, con agitación continua en un agitador orbital, durante una semana antes de ser leídas en el lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 400 nm (Piotrowska et al., 2017). Los valores de CE50 (basados en el promedio del valor de absorbancia en los tres pocillos en cada concentración de i.a) se calcularon mediante el software de análisis de datos MARS (BMG Labtech, Ortenberg, Baden-Württemberg). Se realizó una transformación de Johnson para normalizar los datos (Minitab®, versión 19.1). Se realizó un ANOVA de una vía con la corrección de Welch para comparar los valores medios de CE50 de cada fungicida de aislamientos de Rcc de diferentes años ( $\alpha = 0.05$ ) (Graph Prism, versión 8.0.2, GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) para probar la sensibilidad cruzada entre diferentes grupos de fungicidas (Minitab®, versión 19.1). La fuerza de la correlación se evaluó según Taylor et al. (1990).

Para medir la evolución de la CE50 media de Rcc entre años, se calculó el factor de reducción de la sensibilidad (FRS) dividiendo la CE50 de la población analizada por la CE50 de una población anterior. Cuando el valor de FRS fue igual a 1, se consideró que no hubo cambio en la sensibilidad, y cuando el valor de FRS fue  $> 1$ , se tomó como reducción de la sensibilidad (Russell, 2004; Arduim et al., 2012). Para calcular las líneas de base para cada fungicida evaluado, se usaron aislamientos de Rcc argentinos de tipo salvaje (sin mutación).

Alternativamente, en el caso del IQe donde no fue posible establecer una línea de base, usamos líneas de base de estudios previos (Russell, 2004) según lo informado por Fountaine y Fraaije (2009). Los factores de resistencia (FR) para cada año muestreado se determinaron mediante la fórmula:  $FR = (CE50 \text{ media de Rcc para cada año}) / (CE50 \text{ media de aislamientos de tipo salvaje o línea base alternativa})$ .

#### 2.2.4. Análisis de mutaciones asociadas con la resistencia a fungicidas mediante secuenciación de genes de proteínas objetivo de fungicidas en *Ramularia collo-cygni*

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de los genes *cyp51*, *sdh-b*, *sdh-c* y *cytb* de las proteínas objetivo de los IDM, ISDH e IQe y la posterior secuenciación para determinar la presencia de mutaciones en la enzima objetivo que confieren resistencia o pérdida de sensibilidad a los fungicidas en todos los aislamientos de Rcc. Para la amplificación de genes, fueron utilizados un conjunto de cebadores y protocolos de Piotrowska et al. (2016), Rehfus et al. (2019) y Matusinsky et al. (2010).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Dinamarca). Cada tubo contenía 11.3  $\mu$ l de agua milliQ esterilizada en autoclave, 5  $\mu$ l de tampón de reacción de PCR GoTaq 5x (Promega, Dinamarca), 2.5  $\mu$ l de cebador directo, 2.5  $\mu$ l de cebador inverso (ambos 10  $\mu$ M), 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (25 mM), 1  $\mu$ l de 2.5 mM dNTP, 0.2  $\mu$ l de 5U  $\mu$ l<sup>-1</sup> de polimerasa GoTaq y 1  $\mu$ l de templado de ADN (concentración: aprox. 2 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>).

Las reacciones de PCR para obtener las secuencias del gen *sdh* se realizaron utilizando los cebadores SdhB\_Rcc\_Final\_F y SdhB\_Rcc\_Final\_R para la subunidad SdhB y SdhC\_Rcc\_Final\_F y SdhC\_Rcc\_Final\_R para la subunidad SdhC (Piotrowska et al, 2017) (Tabla suplementaria 2). La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación a 57 °C (SdhB) o 50 °C (SdhC) durante 30 s, extensión a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

La amplificación del gen *cyp51* se realizó utilizando los cebadores KES2230 y KES2231 para la amplificación (Rehfus et al, 2019) (Tabla suplementaria 2). Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 60 s, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 120 s y un paso final de elongación a 72 °C por 5 min .

La amplificación del gen *cytb* se realizó utilizando los cebadores RCCcytobF y RCCcytobR para la amplificación (Matusinsky et al, 2010) (Tabla suplementaria 2). Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 90 s, 35 ciclos a 95 °C por 60 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 120 s y un paso final de elongación a 72 °C por 5 mín.

Se analizó un volumen de 5 µl de producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5% junto con marcadores de tamaño de ADN y se tiñó con SYBR Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific, Dinamarca) y posteriormente se envió para la secuenciación de Sanger a Macrogen Europe en un analizador de ADN Applied Biosystems 3730 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Se constató la calidad de las secuencias y se recortaron con CLC Workbench 19 (Qiagen, Dinamarca). Las secuencias obtenidas se verificaron utilizando las herramientas de búsqueda blastn y blastx disponibles públicamente en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La homología de secuenciación de nucleótidos y proteínas de los fragmentos secuenciados se las comparo con bases de datos no redundantes y secuencia de referencia DK05 utilizando CLC Workbench 19 (Qiagen, Dinamarca).

Luego, se confeccionaron graficos de valores promedio de CE50 y errores estándar para relacionar la presencia o ausencia de mutaciones (agrupados) y los niveles de sensibilidad a los diversos fungicidas utilizados (Rehfus et al, 2019). Aquí también se incluyeron los valores de línea base para cada fungicida como patrón de referencia para la sensibilidad observada en los aislamientos analizados.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Técnica de muestreo y aislamiento de Rcc

Se obtuvieron 21 aislamientos de 2012 (n = 2), 2015 (n = 9) y 2017 (n = 10) (Tabla 2.1), con características macroscópicas típicas de Rcc (McGrann et al. 2017) (Figura 2.1). Cabe destacar que Rcc es de muy lento crecimiento in vitro por lo que la presencia de hongos contaminantes como *Alternaria* sp redujeron el porcentaje de obtención de aislamientos puros en relación a las esporas sembradas.

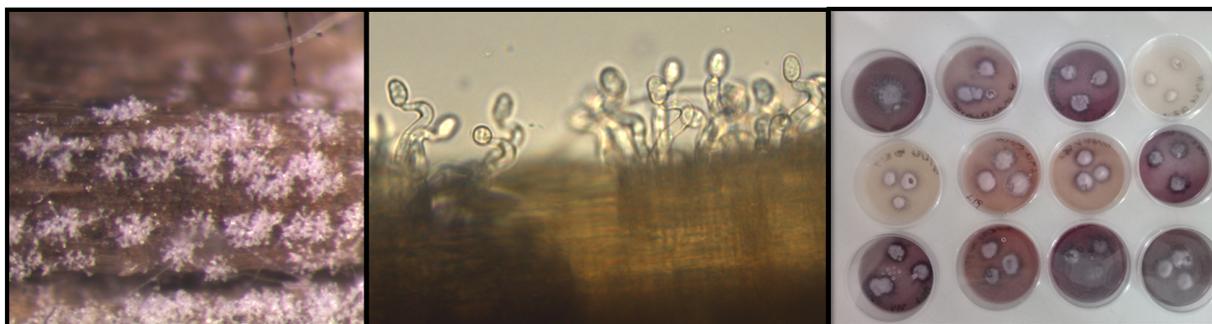


Figura 2.1. Conidios y conidióforos de *Ramularia collo-cygni* (centro) en fascículos emergiendo desde las estomas foliares alrededor de un mancha necrótica (izquierda) y aislamientos monospóricos (micelio) en medio agar zanahoria (derecha).

### 3.3.2. Identificación molecular de aislamientos de Rcc

En la figura 2.2 se observan los resultados de la PCR cualitativa donde se confirma la identidad molecular (Figura 1) evidenciado por la observación del producto esperado de 115 pb de cada uno de los aislamientos analizados.

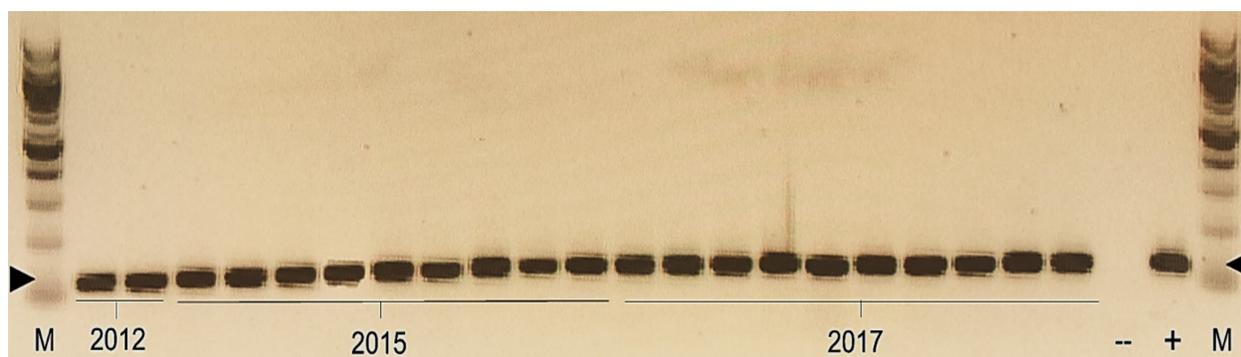


Figura 2.2. Electroforesis en gel de agarosa ( $1.2\% \text{ p v}^{-1}$ ) de los productos esperados (115 pb) de PCR con cebadores específicos para la identificación de aislamientos de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) ( $n=21$ ). El tamaño de las bandas se estimó con un marcador molecular de 100 pb (M). Control negativo (--): agua destilada estéril, Control positivo (+): ADN Rcc. Los triángulos negros indican 115 pb.

### 2.3.3. Ensayo para determinar la sensibilidad de aislamientos de Rcc frente a fungicidas

En la tabla 2.2 se muestran los valores promedios, mínimos y máximos de CE50 de los aislamientos de Rcc por año de muestreo y fungicida utilizado. Los rangos de valores de CE50 variaron en relación con el fungicida utilizado (Tabla 2.2 y Tabla suplementaria 1). En general,

los aislamientos fueron más sensibles a los fungicidas más nuevos, como los ISDH, el clorotalonil y el protioconazol-desthio.

Los resultados para la azoxistrobina sugieren que los aislamientos de Rcc resistentes estuvieron presentes en todos los años de muestreo (CE50 promedio superior a 1 mg L<sup>-1</sup>). El valor inicial para los aislamientos sensibles a este fungicida fue de 0.032 mg L<sup>-1</sup> (Fontaine y Fraaije, 2009), mientras que los valores medios de CE50 fueron de 1.67 mg L<sup>-1</sup> para los aislamientos argentinos de Rcc, con un rango de 0.24 a 4.6 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 2.2).

Los valores de fluxapiroxad e isopyrazam variaron entre 0.001 y 1.44 mg L<sup>-1</sup>, donde la mayoría de los aislamientos fueron sensibles, excepto dos aislamientos del 2017 que estuvieron por encima del promedio (con 1.44 mg L<sup>-1</sup> y 0.81 mg L<sup>-1</sup>) (Tabla 2.2). La línea de base para ISDHs fue alrededor de 0.04 y 0.024 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

El ensayo de sensibilidad a IDMs se realizó utilizando protioconazol-desthio y epoxiconazol. El rango de valores de CE50 de prothioconazole-desthio fue de 0.03 a 0.05 mg L<sup>-1</sup>, con un promedio de 0.04 mg L<sup>-1</sup> para todos los aislamientos, lo que indica que parece ser uno de los fungicidas más efectivos junto con ISDH y clorotalonil. En el caso del epoxiconazol se encontró un rango más amplio de valores de CE50 (0.05 a 7.75 mg L<sup>-1</sup>). En los aislamientos de 2017 se observó un aumento en el valor promedio de CE50 alcanzando los 0.95 mg L<sup>-1</sup> en relación a los valores de 2015 (0.22 mg L<sup>-1</sup>) y la línea de base (0.2 mg L<sup>-1</sup>). En general, los aislamientos fueron más sensibles a protioconazol-desthio que al epoxiconazol, siendo este último fungicida más antiguo.

Con clorotalonil se observó un control *in vitro* eficaz para todos los aislamientos estudiados. Los valores de CE50 estuvieron en el rango de 0.05 y 0.33 mg L<sup>-1</sup> con un valor promedio de 0.12 mg L<sup>-1</sup>. Su línea de base fue de los 0.07 mg L<sup>-1</sup>.

Tabla 2.2. Valores de concentración efectiva 50 (CE50) promedio y línea base (mg L<sup>-1</sup>) para aislamientos de *Ramularia collo-cygni* evaluados *-in vitro-* frente a seis fungicidas. \*línea de base o 'baseline' de *cytb* de tipo salvaje (Fontaine y Fraaije, 2009).

| Año de muestreo | Clorotalonil | Protioconazol-desthio | Epoxiconazol | Fluxapiroxad | Isopirazam | Azoxistrobina |
|-----------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------|------------|---------------|
| 2012 (n=2)      | 0.16         | 0.04                  | 0.08         | 0.04         | 0.02       | 4.13          |
| 2015 (n=9)      | 0.08         | 0.04                  | 0.22         | 0.05         | 0.035      | 0.98          |

|                                                                                 |      |       |      |      |        |        |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|-------|------|------|--------|--------|
| 2017<br>(n=10)                                                                  | 0.09 | 0.08  | 0.95 | 0.13 | 0.19   | 1.63   |
| Todos los<br>aislamientos<br>(n=21)                                             | 0.12 | 0.053 | 0.42 | 0.07 | 0.08   | 1.67   |
| Valores máximos y mínimos CE50 (mg L <sup>-1</sup> ) en aislamientos argentinos |      |       |      |      |        |        |
| Mínimo                                                                          | 0.05 | 0.03  | 0.05 | 0.02 | <0.001 | 0.24   |
| Máximo                                                                          | 0.33 | 0.17  | 7.75 | 0.82 | 1.41   | 4.6    |
| Línea de<br>base<br>(mg L <sup>-1</sup> )                                       | 0.07 | 0.06  | 0.2  | 0.04 | 0.024  | *0.032 |

No se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad de Rcc obtenidos en a 2012, 2015 y 2017 a azoxistrobina ( $p = 0.12$ ), clorotalonil ( $p = 0.36$ ), isopirazam ( $p = 0.10$ ), fluxapiroxad ( $p=0.30$ ), protioconazol-destio ( $p = 0.058$ ) y epoxiconazol ( $p =0.35$ ).

Tabla 2.3. Evolución de los valores medios de concentración efectiva 50 (CE50, mg L<sup>-1</sup>) de aislamientos de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) entre años para seis fungicidas. Factor de reducción de sensibilidad (FRS=Año B/Año A) y Factor de resistencia (FR= CE50 media de Rcc para cada año/CE50 media de aislamientos de tipo salvaje o línea de base alternativa); valores superiores a uno indican una reducción de la sensibilidad de los aislamientos de Rcc entre cada año de muestreo o entre los valores de referencia, respectivamente.

|     | Año       | Clorotalonil | Protioconazol<br>-desthio | Epoxiconazol | Fluxapiroxad | Isopirazam | Azoxistrobina |
|-----|-----------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|------------|---------------|
| FRS | 2015/2012 | 0.5          | 2.75                      | 1            | 1.25         | 1.8        | 0.21          |
|     | 2017/2015 | 1.1          | 4.32                      | 2            | 2.8          | 5.4        | 1.66          |
| FR  | 2012      | 2.30         | 0.67                      | 0.4          | 1            | 0.83       | 129.06        |
|     | 2015      | 1.14         | 0.67                      | 1.1          | 1.25         | 1.46       | 30.62         |
|     | 2017      | 1.28         | 1.33                      | 4.75         | 3.25         | 7.9        | 52.18         |

Sin embargo, los análisis de SRF mostraron reducciones en la sensibilidad a los fungicidas entre los años de muestreo ( $1.1 < \text{FRS} < 5.4$ ) (Tabla 2.3). Los aislamientos de 2012 fueron los más sensibles a los fungicidas evaluados, excepto a clorotalonil y azoxistrobina, para los que se observaron los valores de CE50 más altos para todos los años muestreados. La Tabla 2.3 también muestra los valores medios de FR para cada año que representa un grado de aumento/disminución en la sensibilidad a los fungicidas entre los CE50 observados y los

valores de referencia encontrados en nuestra población. Se observó un aumento significativo hacia la resistencia a la azoxistrobina ( $30 < FR < 129$ ) entre años. Se registró una disminución de la sensibilidad de baja a moderada ( $1.1 < FR < 7.86$ ) a IDMs, ISDHs y clorotalonil, especialmente en los aislamientos del año 2017.

El análisis de correlación de los valores de CE50 transformados de Johnson mostró una sensibilidad cruzada entre fungicidas dentro de grupos. Se encontró una sensibilidad cruzada moderada significativa entre protioconazol-destio y epoxiconazol ( $r=0.55$ ,  $p=0.03$ ) y entre fluxapiraxad e isopirazam ( $r=0.45$ ,  $p=0.04$ ).

#### 2.3.4. Análisis de mutaciones asociadas con la resistencia a fungicidas mediante secuenciación de genes de proteínas objetivo de fungicidas en *Ramularia collo-cygni*

Para este estudio, se evaluó la ocurrencia de mutaciones dentro de los genes *cytb*, *cyp51* y *sdh* (subunidades B y C) de aislamientos de Rcc de Argentina y su influencia en la sensibilidad a fungicidas.

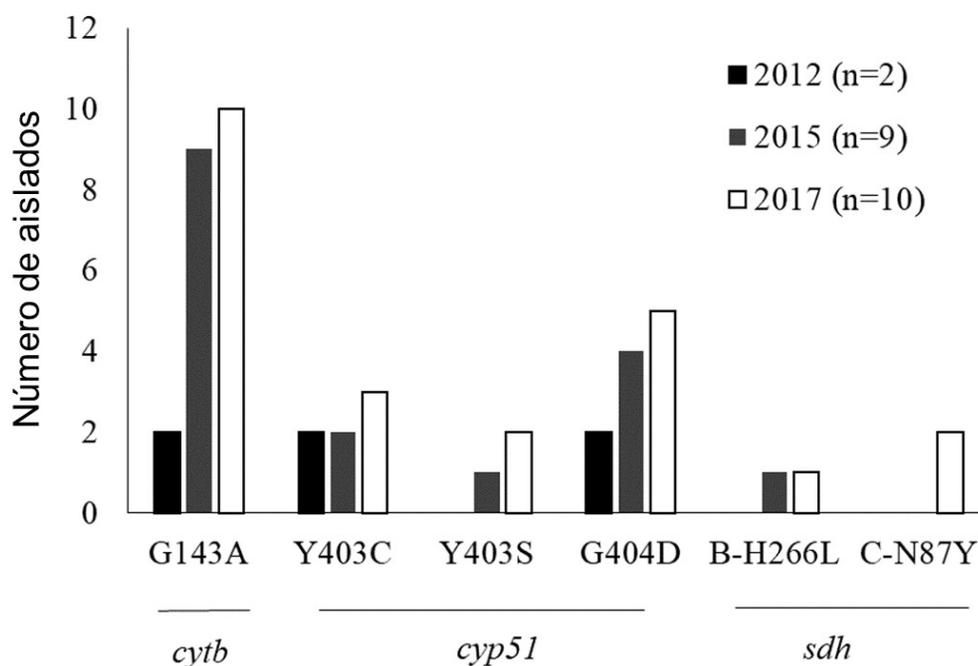


Figura 2.3. Ocurrencia de mutaciones en los genes *cytb*, *cyp51* y *sdh* en aislamientos de *Ramularia collo-cygni* obtenidos en Argentina en 2012, 2015 y 2017 (n = número de aislamientos analizados (Tabla suplementaria 1, APENDICE 1).

Todos los aislamientos analizados (Tabla suplementaria 1, APENDICE 1) presentaron la mutación G143A en el gen *cytb* (Figura 2.3), lo que explicaría los altos valores de CE50 observados (Tabla 2.2) con azoxistrobina. Además, no se encontró la mutación F129L.

En el gen *sdh* (subunidades B y C) se analizaron para varias mutaciones (B-N224T, B-R264P, B-H266R/Y/L, B-T267I, B-I268V, C-N87S, C-G91R, C-H146R/L, C-R152M, C-H153R y C-G171D). La mutación B-H266L se detectó en dos aislamientos obtenidos de 2015 y 2017 (Figura 2.3). En éstos se observó un aumento moderado pero significativo en los valores de CE50 para ambas carboxamidas especialmente en isopirazam (Figura 2.4). La mutación C-N87S solo se encontró en 2017 en dos aislamientos de todos los aislamientos de Rcc evaluados. Es mutación coincidió con un aumento significativo en los valores de CE50 para ambas carboxamidas (tres veces el valor promedio del tipo salvaje) (Figuras 2.3 y 2.4), lo que explicaría la diferencia en el índice SRF entre los aislamientos de 2015 y 2017 (Tabla 2.3).

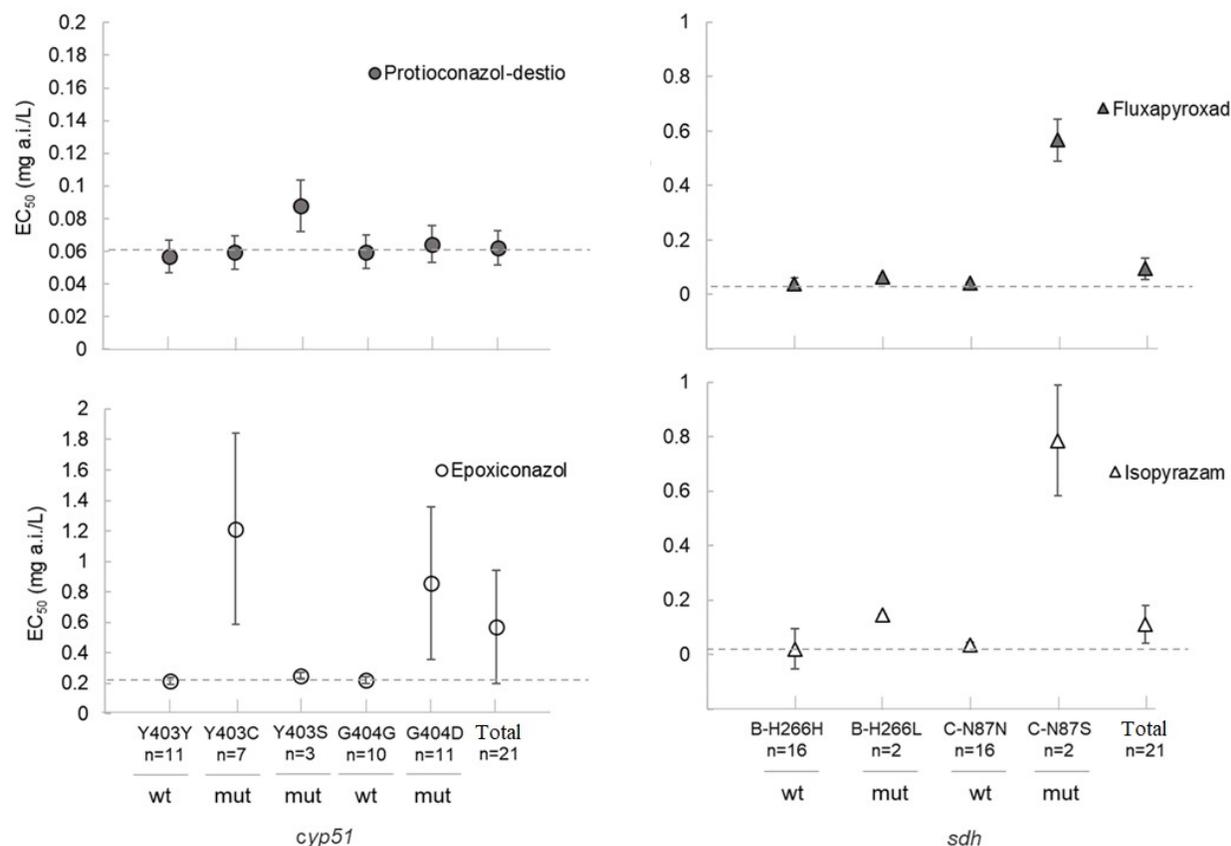


Figura 2.4. Valores de concentración efectiva 50 (CE50; mg L<sup>-1</sup>) para protioconazol-destio, epoxiconazol, fluxapiraxad e isopirazam registrados en aislamientos de *Ramularia collo-cygni* de los años de muestreo 2012, 2015 y 2017 en Argentina. Se proporcionan los valores medios y los errores estándar de los aislamientos de tipo salvaje (wt) y mutantes (mut) para los genes *cyp51* y/o *sdh*. Los aislamientos wt o mut representan aislamientos con o sin mutaciones respectivamente, para un gen dado. Las líneas punteadas representan los valores CE50 de referencia para cada fungicida.

El gen *cyp51* de los aislamientos de Rcc se analizó para detectar mutaciones que podrían conducir a cambios en la estructura de la proteína (demetilasa), objetivo de los fungicidas IDM. Se evaluaron varias mutaciones (I325T, I328L, Y403C/S, G404D e Y405H) e identificamos tres presentes en aislamientos de Rcc. Se observaron dos tipos de intercambio de nucleótidos en la posición 403 (Y403C e Y403S). Ambas mutaciones estuvieron presentes en todos los años muestreados con excepción de Y403S, ausente en 2012. La ocurrencia de la mutación Y403C fue mayor que la de Y403S en 2015 y 2017, también se encontró la mutación G404D con una ocurrencia que varía entre todos los aislamientos en 2012 (n=2), cuatro en 2015 y cinco en 2017 (Figura 2.3).

Se observó una alta dependencia entre las mutaciones Y403C/S con G404D, pero solo los aislamientos de Rcc con ambas mutaciones Y403C y G404D mostraron un aumento significativo en la CE50 con epoxiconazol, en comparación con su valor basal (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Alternativamente, los aislamientos de Rcc con mutaciones Y403S y G404D combinadas mostraron un ligero aumento en los valores de CE50 con protioconazol-desthio en comparación con su línea de base (0.06 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 2.4). La mutación G404D se encontró como una mutación única solo en un aislamiento de Rcc de 2015 (Haplotype 1, Tabla 2.4) y no se observó un aumento asociado en CE50 en ninguno de los IDM analizados.

Tabla 2.4. Haplotipos encontrados en aislamientos de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) de Argentina según algunas mutaciones en los genes *cytb*, *cyp51* y *sdh*, y su ocurrencia (%).

|                   | <i>cytb</i> |       | <i>cyp51</i> |       | <i>sdh</i> |        | Ocurrencia total (%) | Ocurrencia 2015/2017 (%) |
|-------------------|-------------|-------|--------------|-------|------------|--------|----------------------|--------------------------|
|                   | G143A       | Y403C | Y403S        | G404D | B-H266L    | C-N87S |                      |                          |
| Haplotype 0 (n=8) | +           | -     | -            | -     | -          | -      | 38                   | 44 / 40                  |
| Haplotype 1 (n=1) | +           | -     | -            | +     | -          | -      | 5                    | 11.1 / 0                 |
| Haplotype 2 (n=2) | +           | -     | -            | -     | +          | -      | 9                    | 0 / 10                   |
| Haplotype 3 (n=3) | +           | -     | +            | +     | -          | -      | 14                   | 11.1 / 20                |
| Haplotype 4 (n=5) | +           | +     | -            | +     | -          | -      | 24                   | 22.2 / 10                |
| Haplotype 5 (n=2) | +           | +     | -            | +     | -          | +      | 10                   | 0 / 20                   |

En total, para el conjunto de los aislamientos de este trabajo, encontramos seis alteraciones en los genes seleccionados y se identificaron seis haplotipos. En la tabla 2.4, se presentan los perfiles de mutación para los haplotipos que observamos. Los aislamientos de Rcc de 2017 fueron los más adaptados a los fungicidas. Los haplotipos con un mayor número de mutaciones se encontraron principalmente en aislamientos de Rcc de 2017 (Tabla 2.4). Los aislamientos del haplotipo 5 (con cuatro mutaciones combinadas: G143A + Y403C + G404D y

C-N87S) presentaron los valores más altos de CE50 para todos los fungicidas evaluados, excepto para la azoxistrobina (Figura 2.4, Tabla 2.4).

## 2.4. DISCUSIÓN

Muchos patógenos fúngicos de cereales económicamente importantes, como *R. commune*, *Z. tritici* y *P. tritici-repentis*, han demostrado la capacidad de superar las presiones de selección, incluidos los ambientes cambiantes y las estrategias de manejo para las enfermedades que causan (Oxley et al. 2010; Phelan et al. 2017; Heick et al., 2017; Carmona et al., 2020; Sautua y Carmona, 2021). Estas estrategias incluyen el uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos y la combinación de tratamientos químicos y biológicos, tanto en aplicaciones foliares como en semillas. *Ramularia collo-cygni* se considera un patógeno de alto riesgo (FRAC, 2019) que se adapta fácilmente a los fungicidas utilizados para su control (Piotrowska et al., 2016; Refhus et al., 2019; Assinger et al. 2021).

En este estudio, reportamos cambios en los valores de CE50 de los fungicidas IQe, IDM y ISDH hacia una reducción en la sensibilidad de los aislamientos de Rcc de Argentina entre los años de muestreo influenciados por la ocurrencia de varias mutaciones (Tabla 2.2 y 2.3. Tabla suplementaria 1). También establecimos la sensibilidad de referencia de los aislamientos de Rcc a algunas de las principales clases de fungicidas inhibidores de un solo sitio, que podrían ser utilizados en futuros programas de monitoreo. En tanto los aislamientos estudiados en este trabajo estuvieron expuestos a los fungicidas IQe y no hubo cepas aisladas antes del uso de IQe en el país, no se pudo estimar la línea base de sensibilidad para este grupo de fungicidas. En este sentido y de acuerdo con Russell (2004) utilizamos la sensibilidad de base de azoxistrobina reportada por Fountaine y Fraaije (2009).

Se sabe que Rcc ha desarrollado rápidamente resistencia a muchos fungicidas IQe en Europa y otras regiones (Fountaine y Fraaije, 2009; Matusinsky et al., 2010). Havis et al. (2015) informaron una proporción de 50:50 de aislamientos resistentes dentro de las poblaciones noruegas. A partir de nuestros hallazgos podemos concluir que la mutación G143A que confiere resistencia total a los fungicidas IQe es muy frecuente en aislamientos de Rcc de Argentina y esta resistencia IQe podría observarse en el campo. La frecuencia de uso de las estrobilurinas para controlar las enfermedades de la cebada en Argentina ha sido alta. Azoxistrobina fue registrado por primera vez en 1998 por Syngenta Agro S.A. Azoxistrobina en mezcla con

isopirazam fue el primer fungicida registrado para el control de SNC en Argentina (2012, Syngenta Agro S.A). En nuestro estudio, la azoxistrobina se utilizó en las pruebas *in vitro* como representante de los fungicidas IQe, y todas las muestras mostraron valores altos de CE50 para este compuesto (por encima de  $1 \text{ mg ai L}^{-1}$ ). Hasta donde sabemos, este es el primer informe de resistencia de IQes de Rcc en América Latina. Muchas variedades de cebada sembradas en Argentina tienen antecedentes genéticos europeos, especialmente de Europa Central (Alemania, República Checa). La primera detección de Rcc fue en la variedad Scarlett (Criadero Breun de Alemania) (Khier et al. 2002). En 2012, esta variedad representó el 85% del área de producción de cebada en Argentina y también se ha utilizado ampliamente en programas de mejoramiento de cebada cervecera en todo el mundo (Friedt et al., 2010). Debido a su alta susceptibilidad a enfermedades y la necesidad de mejorar la calidad del malteado, la producción se ha desplazado hacia otras variedades. Sin embargo, estas variedades tienen antecedentes genéticos similares y también incorporan material del Reino Unido y Francia. La variedad más sembrada es Andreia (Desarrollo conjunto Ackermann & Co. con Programa de Investigación de Cervecería y Maltería Quilmes, AB-Inbev). Al momento representa el 40-50% de la producción de cebada en Argentina. Rcc es un patógeno endémico en Argentina y ha sido detectado molecularmente en todas las variedades sembradas, tanto en semilla como en etapas tempranas de desarrollo del cultivo (Havis et al., 2014; Erreguerena et al., 2015). Por lo tanto, queda la pregunta de si esta rápida resistencia a IQes fue un desarrollo local o podría ser una consecuencia de la transferencia de semillas infectadas con Rcc entre regiones productoras de cebada del mundo o la combinación de ambos.

La resistencia a los fungicidas IDM se asocia frecuentemente con mutaciones en el gen objetivo *cyp51* (Price et al., 2015). Se han descrito muchas mutaciones en la literatura, pero su impacto en la resistencia a IDM en Rcc y otros patógenos ha sido variable. Encontramos varias mutaciones en el gen *cyp51* en el conjunto de los aislamientos estudiados, como Y403C/S y G404D. Estas mutaciones en las posiciones 403 y 404 fueron altamente dependientes ya que las encontramos combinadas en el 90% de los aislamientos analizados. Solo un aislamiento contenía solo la mutación G404D. El impacto de estas mutaciones en el gen *cyp51* en los valores de CE50 fue diferente para ambos fungicidas IDM utilizados en este estudio. La combinación entre las mutaciones Y403C y G404D aumentó significativamente la CE50 promedio con epoxiconazol ( $1.2 \text{ mg L}^{-1}$ ). En comparación, los aislamientos con ambas mutaciones Y403S + G404D combinadas mostraron un aumento significativo en los valores de CE50 solo para protioconazol-destio ( $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ , Fig. 3). Trabajos previos sugieren que las mutaciones I325T, I328L e Y403C combinadas con Y405 (Y403C/Y405) pueden explicar la

pérdida significativa de sensibilidad hacia los fungicidas IDM observada en Europa (FRAC, 2017; Rehfus et al., 2019). Los haplotipos Cyp51 C3 y C4 (Mair et al., 2016) informados por Rehfus et al. (2019) mostraron haplotipos de baja sensibilidad hacia los fungicidas IDM con mutaciones I325T e I328L. En nuestro estudio, estas mutaciones estaban ausentes a excepción de Y403C/S. Por lo general, las mutaciones Y403C/Y405H ocurren juntas (Heick et al., 2017). El cambio en la posición 404 de GLY (G) a ASP (D) en nuestras muestras podría implicar que las mutaciones Y403C/S sean más viables, incluso en ausencia de Y405H. Esas dos combinaciones podrían representar un paso hacia otras combinaciones de haplotipos, como Y403C/Y405H. En *Z. tritici*, un hongo dothideomycete estrechamente relacionado con Rcc (Stam et al., 2018), esas posiciones también mostraron muchas mutaciones diferentes: Y459C/D/N/S/P/ $\Delta$ , G460D/ $\Delta$ , Y461D/H/S. Curiosamente, esas mutaciones parecen ocurrir en una base regional localizada, por ejemplo, la mutación Y461H está presente con alta frecuencia en Dinamarca y Suecia, pero no es frecuente en el Reino Unido e Irlanda (Heick et al., 2017).

Se analizó la presencia o ausencia de varias mutaciones en el gen *sdh* (subunidades B y C) en los aislamientos de Rcc argentinos. Se encontraron las mutaciones B-H266L y C-N87S y ambas se relacionaron con un aumento significativo y moderado o alto en CE50 para ambas carboxamidas probadas en nuestro estudio, especialmente en isopirazam. Estas mutaciones también fueron reportadas por Rehfus et al. (2019) con efectos similares en la sensibilidad de los aislamientos de Rcc. Intercambios similares a C-N87S parecen comunes en otros patógenos de cereales, que han mostrado adaptación ISDH, por ejemplo, C-N86S en *Z. tritici* y C-N75S en *P. teres* (FRAC 2019; Heick et al., 2017; Rehfus et al., 2016; 2018).

Se observaron algunos patrones de sensibilidad cruzada de ISDH y IDM en nuestros aislamientos de Rcc. En la literatura se han descrito patrones de sensibilidad cruzada para varios patógenos de plantas. Sin embargo, muchos autores afirmaron que la resistencia/sensibilidad cruzada es compleja, debido al hecho de que el impacto de los haplotipos informados sobre la sensibilidad ISDH y IDM varía según las mutaciones involucradas y el fungicida probado de cada grupo (Hsiang et al., 1997; Stammler et al., 2010; 2015; Fraaije et al., 2012; Doukas et al., 2012; Sierotzki et al., 2011; Derpmann et al., 2019; Ishii et al., 2021). En este estudio, encontramos patrones similares entre fungicidas del mismo grupo, aunque los aumentos en los valores de CE50 dentro y entre los años de muestreo (2015 y 2017) dependieron en gran medida del tipo de ingredientes activos evaluados.

En Argentina, epoxiconazol y fluxapirroxad fueron registrados en mezclas con otras moléculas por la empresa BASF en 1997 y 2012, respectivamente. Este último, se utilizó por primera vez en cebada como fungicida foliar en 2014 y como tratamiento de semillas a partir de

2016. El protioconazol (Bayer) se registró por primera vez en 2005 pero no se usó en cebada hasta 2015, cuando se comercializó en una mezcla con trifloxistrobina (Registro Nacional de Terapéutica Vegetal). Como se mencionó anteriormente, isopirazam fue el primer fungicida registrado por ISDH para el control de Rcc en 2012, como un producto combinado con azoxistrobina. Nuestros resultados mostraron que en los aislamientos de Rcc analizados, los ingredientes activos más antiguos utilizados para controlar el SNC producen reducciones de sensibilidad más altas que los más nuevos.

En el caso del fungicida multisitio clorotalonil, no observamos cambios significativos en la sensibilidad entre años de muestreo. Aunque anteriormente se habían informado reducciones de la sensibilidad a este fungicida en otros cultivos debido principalmente a la sobreexpresión de tioles en el patógeno (Reis et al., 2021), serán necesarios más estudios para explicar los valores más altos de CE50 encontrados en nuestros aislamientos desde 2012. Hasta la fecha, este fungicida no está incluido en los programas de protección de cebada en Argentina. Aunque fue la columna vertebral de los programas de protección contra el SNC en todo el mundo (Havis et al. 2015), el clorotalonil fue prohibido en la Unión Europea y muchos otros países (EPA, 2017; EFSA, 2020) debido a su alto impacto ambiental. Por lo tanto, se debe considerar cuidadosamente el posible uso futuro de este multisitio en cebada en Argentina. Otro fungicida de acción multisitio, aprobado para el control de enfermedades en la cebada en Europa, es el folpet. En el Reino Unido, este producto solo tiene una recomendación de etiqueta para *R. commune*, sin embargo, se ha observado actividad contra SNC. Todavía se está estudiando su eficacia y, dado que parece poseer una actividad *in vitro* más baja contra Rcc en comparación con el clorotalonil (Havis et al., 2020), es posible que se necesiten más ensayos de campo para determinar la mejor estrategia para usarlo en los programas de control de SNC (Kildea, 2019).

Las características de producción tienen un impacto masivo en la dinámica de las poblaciones de patógenos fúngicos (Assinger et al., 2021). Como se discutió anteriormente, históricamente, el área de producción de cebada en Argentina estuvo dominada principalmente por una variedad que se sabía que era altamente susceptible a las enfermedades fúngicas más prevalentes, incluido el SNC (Moreyra et al., 2020), lo que llevó a estrategias de manejo de enfermedades altamente dependientes de fungicidas representando un gran riesgo para el desarrollo de resistencia.

Características ya descritas de Rcc como un largo período de latencia (Walters et al. 2008), alto potencial evolutivo impulsado por evidencia de recombinación sexual (Piotrowska et al. 2016), numerosas regiones transponibles en su genoma (6%) (Stam et al. 2018), y varios hospedantes alternativos (Huss, 2004; Salamati y Reitan, 2006, Walters et al., 2008), entre

otros, fueron informados por Grimmer et al. (2015) como características significativas que contribuyen al desarrollo de resistencia a fungicidas.

En tanto el SNC se consideraba una enfermedad esporádica en Argentina, su monitoreo fue escaso y limitado en el tiempo. Sin embargo, el número de aislamientos recolectados en esta investigación fue suficiente para encontrar la variabilidad necesaria para detectar cambios en la sensibilidad/resistencia a los fungicidas. El presente estudio ha demostrado que los aislamientos de Rcc de lotes de cebada argentinos tuvieron la capacidad de adaptarse a los fungicidas IQe, ISDH y IDM utilizados para controlar el SNC y otras enfermedades co-ocurrentes. Encontramos muchas mutaciones en los genes de proteínas objetivos de los tres fungicidas que confieren resistencia total (IQe) o moderada (IDM y ISDH). Comparando nuestros resultados con los reportados por Rehfus et al. (2019) de un alto número de haplotipos resistentes en Europa, podemos sugerir que Argentina podría estar en una "fase emergente" del desarrollo de resistencia (van den Bosch et al., 2011) donde los aislamientos mutantes de Rcc (*cyp51* y/o *sdh*) se encuentran en cantidades bajas y aún no se han estabilizado en la población. Con el fin de respaldar estos hallazgos, se necesitarán más investigaciones que incluyan un mayor número de aislamientos para evaluar el desarrollo de la resistencia a fungicidas en Argentina.

En condiciones selectivas de fungicidas, los individuos resistentes podrían propagarse hasta superar un punto crítico, llegando a una "fase de selección" donde puede ocurrir un fuerte aumento de aislamientos resistentes (van den Bosch et al, 2011). Por lo tanto, las campañas inmediatas representan un momento oportuno para comenzar a implementar estrategias anti-resistencia (FRAC, 2019; van den Bosch et al, 2014) que eviten o retrasen el desarrollo de resistencia a los fungicidas. La inclusión de nuevos ingredientes activos en las mezclas además del uso de fungicidas multisitio, la rotación de ingredientes activos y la reducción del número de aplicaciones de fungicidas en las dosis recomendadas podrían brindar el tiempo necesario para desarrollar y adoptar variedades con mayor resistencia genética a SNC (van den Bosch et al, 2014). Con el objetivo de lograr una producción agrícola menos dependiente de fungicidas, es necesario la incorporación de resistencia genética a las principales enfermedades de los cultivos incluida en un enfoque de manejo integrado (McGrann et al., 2018; Hoheneder et al., 2021). Esto ofrecerá beneficios en términos de manejo de la resistencia y también beneficios económicos y ambientales para la población en general.

## CAPÍTULO 3

Estudio y comparación de la diversidad genética, estrategia de reproducción y estructura de poblaciones argentinas y europeas de *Ramularia collo-cygni* mediante la utilización de marcadores microsatélites

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las estrategias de reproducción y dispersión de patógenos de origen fúngico tienen una gran influencia en la estructura de la población, así como en el potencial evolutivo de las poblaciones de patógenos (Barrett et al., 2008; McDonald & Linde, 2002). Los hongos fitopatógenos pueden reproducirse sexualmente, asexualmente o pueden experimentar ciclos sexuales y asexuales durante la campaña. La recombinación, que lleva a la formación de nuevas variantes genotípicas multilocus, ocurre durante el ciclo sexual; sin embargo, además, los patógenos fúngicos pueden sufrir el proceso de parasexualidad, en el que la recombinación mitótica puede contribuir a la diversidad genotípica de las poblaciones (Agrios, 2005; Carlile et al., 2001). Esta estrategia de reproducción mixta es conocida en muchos patógenos de plantas económicamente importantes, como por ejemplo en el patógeno del trigo *Z. tritici* (Scott et al., 1988) y en la roya amarilla del trigo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Jin et al., 2010). Las poblaciones que experimentan ciclos reproductivos mixtos tienen mayores probabilidades de adaptarse a cambios ambientales, ya que los nuevos genotipos formados durante los ciclos sexuales o parasexuales pueden aumentar en gran número como esporas asexuales (McDonald & Linde, 2002). Otra fuente de variabilidad genética es la transferencia genética horizontal (TGH) entre especies la cual consiste en la transmisión de material genético a través de los genomas de organismos biológicos por procesos distintos a la fertilización favoreciendo la adaptación y evolución de los organismos receptores, incluidos los fitopatógenos (Tiwari et al., 2020). Tal es el caso de *Parastagonospora nodorum* y la transferencia del gen de la toxina específica A (ToxA) a *P. tritici-repentis* (Friesen et al., 2006). A su vez, se reportó que esta última especie fungicida habría transferido dicho gen al hongo *P. teres* (Leisova-Svobodova et al., 2010).

En el caso de Rcc, patógeno fúngico generalizado en muchas regiones/países de cultivo de cebada en todo el mundo (Spencer et al, 2019), muchas características fúngicas, como una gran cantidad de elementos transponibles (Stam et al., 2018), población de gran tamaños efectivo y posible recombinación sexual (Piotrowska et al., 2016) sugieren un alto potencial evolutivo y una rápida adaptación a los desafíos ambientales (manejo). Tanto el potencial evolutivo como la estructura genética están fuertemente influenciados por el equilibrio de fuerzas evolutivas tales como el flujo de genes, la deriva genética, la selección natural y artificial. En estudios previos de genética de poblaciones de Rcc, se reportó que las poblaciones europeas forman pools génicos moderadamente divergentes como parte de un grupo geográfico (Piotrowska et al., 2016; Stam et al., 2019). Esta divergencia parcial se atribuyó a la

dispersión de esporas de Rcc a gran escala a lo largo de grandes distancias geográficas. Recientemente se ha reportado el rápido desarrollo de resistencia a fungicidas (Rehfus et al., 2019) y sólo cierta evidencia de resistencia cuantitativa del hospedante (McGrann et al., 2018; Hoheneder et al., 2021). Estas características explican la creciente amenaza que Rcc representa para el cultivo de cebada y su propagación por toda Europa y muchos otros continentes/países, principalmente a través del intercambio de semillas (Havis et al., 2015).

En este sentido, sabemos que las variedades de cebada de primavera europeas modernas derivan de variedades autóctonas europeas de Baviera (sur de Alemania), Moravia (República Checa), Suecia y el Reino Unido, entre otros. Los programas de mejoramiento que incluían razas locales y la inclusión de materiales de cebada exóticos para mejorar el rendimiento, la calidad del malteado y la resistencia a enfermedades (gen *mlo*) dieron como resultado varias variedades tempranas. Estas dieron lugar a una variedad importante como Trumpf (o Triumph) a principios de la década de 1970. Esta y su descendencia adquirieron una amplia distribución en Europa. Más recientemente, la variedad Scarlett (1995) (con genética de Trumpf) se hizo muy popular y generalizada en Europa y otros continentes (Friedt et al., 2010). Scarlett fue la principal variedad de cebada de primavera producida en América del Sur, especialmente en Argentina entre 1996 y 2014 (Cattáneo & Cortese 2021; com. personal de Aguinaga A.) alcanzando hasta el 85% del área de cebada (0.3 millones de has) en el país.

El primer registro de Rcc en Argentina fue en el año 2001 en la variedad Scarlett (Khier et al. 2002), aunque la primera epifitía de SNC no se observó hasta el año 2012 cuando la superficie de cebada se expandía hasta 1.25 millones de hectáreas en total. Debido a las grandes limitaciones por enfermedades en esta variedad y la necesidad de mejorar la calidad maltera, la producción de cebada en Argentina viró hacia otras variedades como Andreia (germoplasma alemán), así como a otras con origen canadiense, francés y Reino Unido (com. personal de Cattáneo). Estas cebadas de primavera aún representan más del 50% del área de producción. Tal como lo describieron Havis et al (2014a) y Erreguerena et al (2015), Rcc se considera un patógeno endémico en Argentina, ya que se ha detectado en semilla y en las primeras etapas del cultivo (macollaje) de todas las variedades sembradas en el país. Por lo expuesto habría una alta probabilidad de que Rcc haya ingresado a Sudamérica a través del intercambio de semillas desde Europa.

Analizar la diversidad genética de la población de *Ramularia collo-cygni* en Argentina y evaluar la estructura genética en comparación con dos poblaciones europeas más antiguas (República Checa y Escocia), con el propósito de entender el estado evolutivo de la población argentina y detectar patrones de diferenciación o similitud en la estructura poblacional.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Poblaciones estudiadas y extracción de ADN

Se analizó un conjunto de 111 aislamientos monospóricos de Rcc. Los aislamientos se recolectaron de lotes de cebada de primavera e invierno de la República Checa (n=30), Escocia (n=60) (Piotrowska et al., 2016) cedidos por el Scotland Rural College – grupo Soil and Crop Protection de Escocia (Reino Unido) y de Argentina (n=21) (Figura 3.1). Esta última población se obtuvo de varios campos de cebada de primavera del norte y sur de la provincia de Buenos Aires Argentina (años 2012, 2015 y 2017) (Capítulo 2 , Figura 2.1). Para todos los aislamientos se confirmó la identidad utilizando un marcador molecular específico (Piotrowska 2014 y Taylor et al., 2010). Para la extracción de ADN se transfirieron pequeños fragmentos de medio colonizado (50 mm<sup>2</sup>) a tubos Eppendorf de 1.5 ml con 500 µl de agua destilada estéril. El micelio se trituró con un molinillo de plástico hasta que la suspensión resultó homogénea. Se transfirieron además 300 µl de la suspensión a botellas Duran® de 250 ml que contenían 100 ml de medio de sal mineral (MSM) (Zajic y Supplisson 1972). Las botellas se colocaron en un agitador orbital (Minitron®, Infors HT, Basilea, Suiza) a 18 °C durante 12 días a 125 rpm. Se obtuvo una suspensión de micelio Rcc pasando el medio a través de un filtro de plástico de poro de 100 µm (MACS® SmartStrainers, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Luego, el micelio filtrado se congeló durante 60 minutos en un congelador a -80 °C y se liofilizó a 1 mbar, a -20 °C durante 24 horas (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Osterode am Harz, Alemania). El ADN total se aisló utilizando el kit de extracción Quick DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos) y el Genomic DNA Clean & Concentrator kit™ (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos), según instrucciones del fabricante. La concentración de ácido nucleico se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos). Luego se realizaron diluciones en serie con agua destilada estéril para obtener soluciones de trabajo de ADN finales de 2,5 ng/ul para ensayos de marcadores moleculares.

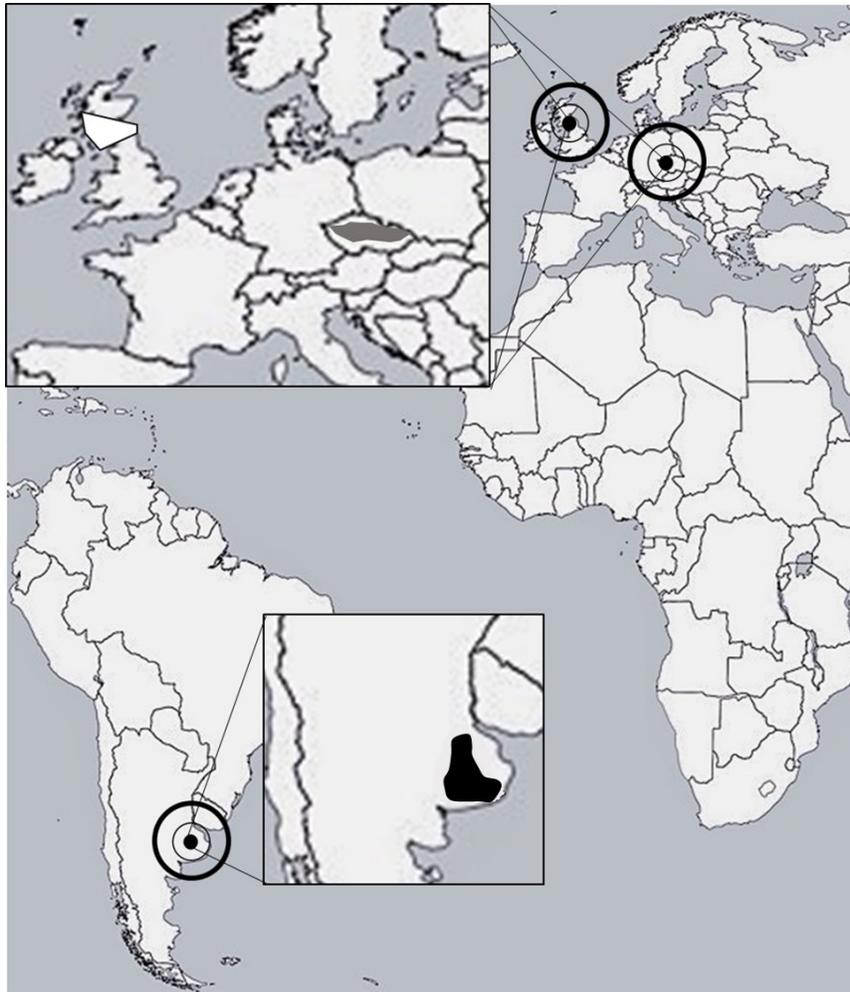


Figura 3.1. Mapa de distribución de las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* utilizadas en este estudio. Argentina (área negra), República Checa (área gris) y Escocia (área blanca).

### 3.2.2. PCR multiplex con marcadores moleculares SSR

La estructura genética de las tres poblaciones de Rcc se analizó utilizando diez pares de cebadores SSR, que contenían repeticiones de pentanucleótidos dentro del genoma de Rcc (Piotrowska et al., 2016; Tabla suplementaria 3).

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de PCR de alta pureza (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se analizaron en un secuenciador automático (ABI 3730 DBS Genomics) en la Universidad de Durham (Durham, Reino Unido). Se registraron los tamaños de los fragmentos de ADN utilizando el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems) y los alelos que

diferían en tamaño en una sola base (y en muy pocos casos en dos) se agruparon manualmente para el análisis genético. Si bien el procedimiento de PCR con los marcadores SSR se hizo en primera instancia con los aislamientos europeos y luego con los sudamericanos (con el mismo protocolo), el agrupamiento según tamaño de los productos de PCR fue realizado conjuntamente.

### 3.2.3. *Análisis de microsatélites amplificados*

En cada población y/o región se estimaron las frecuencias alélicas, la riqueza alélica efectiva por locus y por población ( $A_r$ ) (rarificada en relación a la población con el tamaño de muestra más bajo), el número de genotipos multilocus observados (MLG) y esperados (eMLG), distribución de abundancias de genotipos (uniformidad,  $E$ ) (Pielou, 1975; Ludwig & Reynolds, 1988; Grünwald et al., 2003), el índice de diversidad génica insesgado de Nei (Hexp) (Nei, 1978) y el índice de Simpson ( $\lambda$ ) (Simpson, 1949) utilizando el paquete R POPPR (Kamvar et al., 2014). Este paquete hace énfasis en el análisis de datos genéticos en poblaciones no modelo, incluidos organismos clonales o parcialmente clonales. Para evaluar el número mínimo de aislamientos necesarios para capturar la mayor parte de la diversidad genética y el número medio de alelos por locus dentro de cada población, se utilizó un método de arranque o 'bootstrapping' para generar submuestras de individuos aleatorios de tamaño creciente utilizando 1000 réplicas (Infogen®) (Moreno et al, 2015). Para estandarizar los resultados de riqueza alélica entre poblaciones se utilizó la técnica de rarefacción que permite evaluar el número esperado de alelos entre muestras de igual tamaño obtenidas de diferentes poblaciones (Petit et al, 1998). Para estudiar el sistema de reproducción de las poblaciones de Rcc, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento (DL) para determinar las desviaciones de la asociación aleatoria entre los loci SSR. El DL se estimó como correlación por pares entre los pares de loci SSR (clon corregido) (Weir, 1996) con el software FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 1995, 2002). El nivel de significación para DL se basó en 900 permutaciones y valores de  $P$  ajustados para un nivel nominal del 5 % a  $p = 0.001$ .

Para representar gráficamente las relaciones genéticas entre los individuos, se realizó una red de expansión mínima (MSN) basada en análisis de disimilitud genética relativa (Kamvar et al., 2014) para SSR MLG (POPPr, paquete R). La estructura genética de las tres poblaciones se investigó utilizando un análisis DAPC basado en agrupamiento de K-medias. En el DAPC, los datos se transformaron mediante un análisis de componentes principales (PCA) y, posteriormente, los grupos o conglomerados (K) se identifican mediante el análisis discriminante

(DA) para inferir el número óptimo de individuos Rcc relacionados genéticamente en cada uno de éstos conglomerados (Pritchard et al., 2000; Jombart et al., 2010; Grünwald & Goss 2011).

Para estudiar el origen de la variación genética y la diferenciación genética entre poblaciones se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) y se calculó el índice de diferenciación de  $D_{jost}$  por pares (Jost 2008, 2009) con sus correspondientes valores  $p$  ( $\alpha = 0.05$ ) utilizando el paquete DEMETics (programa R). El estimador  $D_{jost}$  es la fracción de variación alélica entre poblaciones. Los valores del estimador que están cerca de uno indican una diferenciación completa (incluso con una gran variación dentro de las poblaciones) y los que están cerca de cero indican que no hay diferenciación. Según Gerlach et al. (2010) este estimador es el más preciso para medir la diferenciación genética de poblaciones con más de dos alelos por locus. La estratificación de los datos para el análisis AMOVA se realizó de la siguiente manera: región (Europa, EU y Sudamérica, SA) y origen (República Checa, Escocia, Norte y Sur de Buenos Aires).

### 3.3. RESULTADOS

La población argentina mostró el mayor número de individuos clonales ( $n = 10$ ) agrupados en tres MLG únicos, mientras que las poblaciones checa y escocesa mostraron solo un aislamiento clonal cada una. Los números medios de alelos efectivos ( $A_r$ ) por locus fueron 3.7, 3.2 y 1.9, y la diversidad genética media sobre todos los loci ( $H_{exp}$ ) fueron 0.41, 0.4 y 0.25 en las poblaciones escocesa, checa y argentina, respectivamente. El mismo patrón se observó con el índice  $\lambda$  y cuando analizamos las poblaciones como regiones (EU y SA, Tabla 1), donde la población argentina arrojó valores de diversidad más bajos. En general, observamos 100 genotipos multilocus únicos (MLG) de los 111 aislamientos de Rcc recolectados (Tabla 3.1). El análisis de uniformidad mostró una distribución equitativa de las abundancias de genotipos en todas las poblaciones donde los valores estaban cerca de 1, aunque las poblaciones argentinas mostraron el valor  $E$  más bajo de 0.73 (Tabla 3.1).

En los análisis de DL se observaron valores de  $p$  no significativos ( $p > 0.001$ ) entre los marcadores en la población argentina, por lo que no se rechazó la hipótesis nula de que no hay vínculo entre los marcadores, lo que sugiere segregación independiente, es decir, evidencia de reproducción sexual. En las poblaciones europeas de Rcc se observaron los mismos resultados que los reportados previamente por Piotrowska et al (2016). En el análisis de muestra mínimo (bootstrapping) se observó que el número de aislamientos de Rcc necesarios para obtener la

mayor parte de la variación genética y el número de alelos, varió entre 10 y 12 en las poblaciones analizadas.

Tabla 3.1. Estadísticas de diversidad genética de *Ramularia collo-cygni* por región (EU: Europa y SA: Sudamérica) y poblaciones (SC: Escocia, CZ: República Checa y ARG: Argentina) en diez loci SSR.

|           | Pop      | N   | MLG | eMLG | SE   | Ar   | H <sub>exp</sub> | $\lambda$ | E    |
|-----------|----------|-----|-----|------|------|------|------------------|-----------|------|
| Región    | EU       | 90  | 88  | 20.9 | 0.31 | 3.45 | 0.47             | 0.99      | 0.98 |
|           | SA       | 21  | 12  | 12   | 0    | 1.9  | 0.25             | 0.86      | 0.73 |
| Población | SC (EU)  | 60  | 59  | 20.9 | 0.32 | 3.7  | 0.41             | 0.98      | 0.99 |
|           | CZ (EU)  | 30  | 29  | 20.5 | 0.5  | 3.2  | 0.39             | 0.96      | 0.98 |
|           | ARG (SA) | 21  | 12  | 12   | 0    | 1.9  | 0.25             | 0.86      | 0.73 |
|           | Total    | 111 | 100 | 12   | 0.83 | 4.7  | 0.52             | 0.98      | 0.85 |

Pop: nombre de la población, N: número de aislamientos observados, MLG: número de genotipos multilocus observados. eMLG: el número de MLG esperado en el tamaño de muestra más pequeño  $\geq 10$  basado en rarefacción (jack knife), SE: error estándar basado en eMLG. Ar (riqueza alélica): número de alelos por locus, H<sub>exp</sub>: índice de diversidad genética imparcial de Nei,  $\lambda$ : índice de diversidad genética de Simpson, E: Evenness (distribución de abundancias de genotipo). cc: clon corregido.

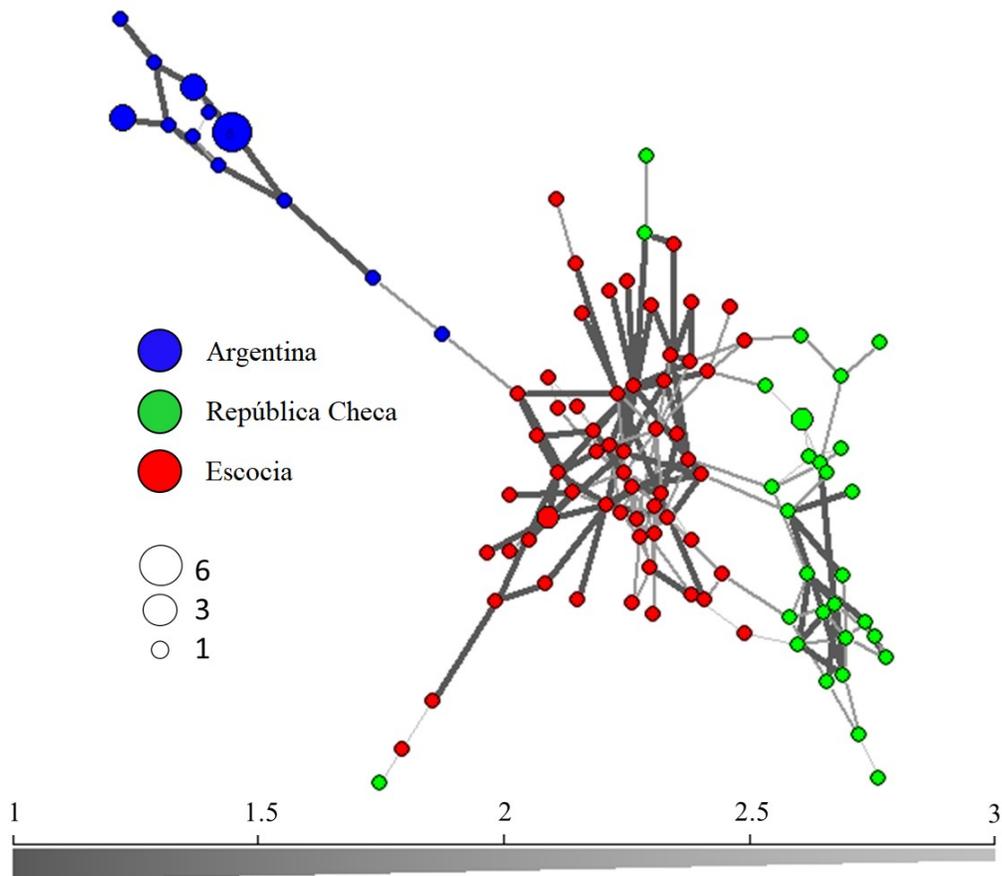


Figura 3.2. Mínimum spanning network (MSN) donde se observan los genotipos multilocus (MLG) de las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* de Argentina, República Checa y Escocia (colores de nodo). Cada MLG está representado por un nodo. El tamaño de los nodos indica el número de aislamientos en cada MLG. La barra de escala de negro a gris muestra la distancia genética de Bruvo entre MLGs. El grosor y el color de las líneas (barra de escala de grises) son proporcionales a la distancia genética entre dos nodos.

Para representar gráficamente los patrones de similitud genética entre los grupos de aislamientos de Rcc, se realizó un análisis MSN basado en MLG SSR. Con base en la distancia genética el análisis mostró que los aislamientos formaron tres grupos, donde los argentinos, escoceses y checos se agruparon en su mayoría según su origen geográfico; los de Argentina se agrupan completamente separados de los de origen europeo, mientras que solo tres aislamientos checos se entremezclan dentro de los aislamientos escoceses (Figura 3.2).

Para corroborar y ampliar las observaciones gráficas en el análisis MSN se realizó un análisis DAPC. La figura 3.3 muestra la distribución y proporción (gráficos circulares) de aislamientos de Rcc en cada conglomerado detectado (número óptimo de conglomerados = 7), graficados a lo largo de los componentes principales uno y dos. Veinte de los 21 aislamientos

de Rcc argentinos formaron dos conglomerados (K = 2 y 5) diferenciados espacialmente (principalmente a lo largo del eje PC1) de los aislamientos restantes. En el conglomerado 2 (n= 12) estuvo integrado por un 92 % de aislamientos del sur de la provincia de Buenos Aires y en el conglomerado 5 un 60 % de aislamientos del norte de la misma provincia. Los aislamientos europeos se distribuyen en cuatro grupos (K = 1, 3, 6 y 7), con un grupo totalmente escocés (K = 6) y tres grupos mixtos (K = 1, 3 y 7). Observamos solo un aislamiento argentino compartiendo un grupo (K = 4) con los aislamientos escoceses.

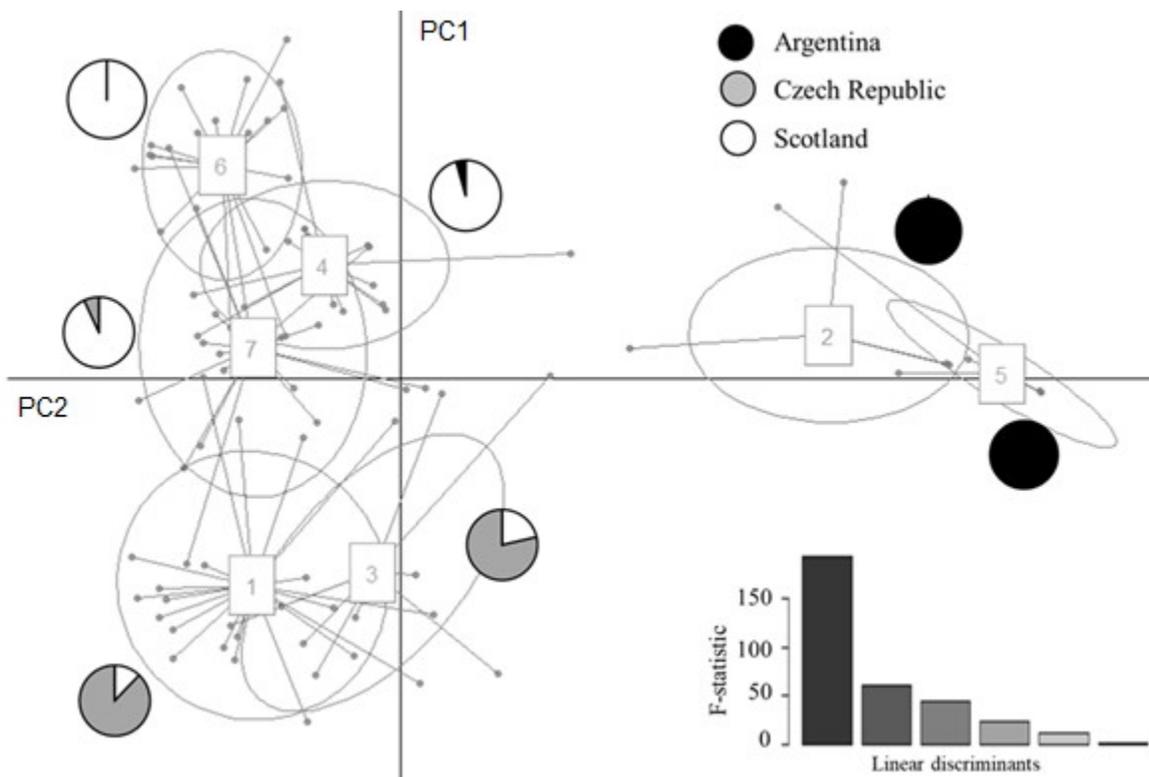


Figura 3.3. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) y asignación de conglomerados (K: 1 a 7) para aislamientos de *Ramularia collo-cygni* (puntos grises) de tres poblaciones diferentes (Argentina, República Checa y Escocia). Gráfico de barras insertado: análisis discriminantes para la agrupación en clústeres de K-media. Los gráficos circulares muestran la proporción de aislamientos de cada país para un grupo determinado.

Tabla 3.2. Análisis jerárquicos de varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de *Ramularia collo-cygni* provenientes de Argentina (Norte y sur de la provincia de Buenos Aires), Escocia y República Checa según diez loci

de microsatélites (con corrección de clones) con 100 genotipos multilocus (111 aislamientos). Los valores de  $p$  en negrita (prueba de Monte Carlo) representan un efecto significativo; g.l.: grados de libertad. EU: Europa, SA: Sudamerica

| Fuente de variación                  | g.l. | Suma de cuadrados | Varianza | Porcentaje de la variación % | $p$          |
|--------------------------------------|------|-------------------|----------|------------------------------|--------------|
| Entre regiones                       | 1    | 78.5              | 2.66     | 34.0                         | 0.31         |
| Entre orígenes dentro de cada región | 2    | 61.9              | 1.19     | 15.2                         | <b>0.001</b> |
| Dentro del origen                    | 97   | 385.66            | 3.97     | 50.8                         | <b>0.001</b> |
| Total                                | 100  | 526.12            | 7.82     | 100                          |              |

El análisis AMOVA mostró que las poblaciones se diferenciaron a nivel de país de origen debido a la mayor variación genética observada en este estrato (50,8%,  $P < 0,001$ ). La variación genética entre regiones alcanzó un 34 % y 15 % entre orígenes dentro de las regiones (Tabla 3.2). Estos resultados sugieren cierto nivel de estructuración genética a nivel origen y en menor medida, regional. La diferenciación en el estrato región no fue estadísticamente significativa (valor  $p = 0.31$ , Tabla 3.2)

Tabla 3.3. Índice de diferenciación de Jost ( $D_{jost}$ ) y significancia (valor de  $p_{D_{jost}}$ ) en los estratos de población y región para aislamientos de *Ramularia collo-cygni*.  $D_{jost}$  varía entre 1 y 0, donde 1 es diferenciación completa y 0 significa que no hay diferenciación.

| Estrato | A               | B          | $D_{jost}$ | $p_{D_{jost}}$ |
|---------|-----------------|------------|------------|----------------|
| Origen  | República Checa | Escocia    | 0.202      | 0.001          |
| Origen  | República Checa | Argentina  | 0.597      | 0.001          |
| Origen  | Escocia         | Argentina  | 0.5503     | 0.001          |
| Región  | Europa          | Sudamérica | 0.5414     | 0.001          |

Para evaluar en mayor profundidad la diferenciación genética entre poblaciones y regiones, calculamos los valores del índice  $D_{jost}$ . Los aislamientos argentinos de Rcc evidenciaron alta

diferenciación respecto de los europeos en todos los niveles (región y origen) ( $D_{jost} > 0.5$ ;  $p_{D_{jost}} = 0.001$ ). Las poblaciones checa y escocesa mostraron una diferenciación significativa moderada entre ellas ( $D_{jost} = 0.202$ ) (Tabla 3.3).

### 3.4. DISCUSIÓN

El éxito de muchas especies invasoras como patógenos fúngicos depende de su capacidad para superar un conjunto de diferentes barreras que van desde la introducción, el establecimiento y la invasión, para adaptarse a nuevos ambientes diferentes de su hábitat endémico (Kolar & Lodge, 2001). Este proceso podría involucrar eventos estocásticos (aleatorios) y/o de selección (Brown & Hovmöller, 2002). Esto también incluye el factor antrópico como la introducción de un nuevo patógeno, por ejemplo, por el transporte de semillas (Gladioux et al., 2015). Los aislamientos europeos de Rcc incluidos en este estudio se encuentran a una distancia aproximada de 11.500 a 12.100 km de la población argentina y a 1.600 km entre sí. Por lo tanto, es poco probable que Rcc llegara a América del Sur a través de la dispersión de esporas y no dentro de la semilla de cebada. Esto también está respaldado por el evidente intercambio de semillas de variedades de cebada entre continentes (Friedt et al., 2010). De hecho, la diversidad generalizada de la presencia de Rcc entre los países del hemisferio norte y sur sugiere que el patógeno puede haberse diseminado por la semilla (Spencer et al., 2019; Havis et al., 2015) además no existen regulaciones ni medidas de control relacionadas con el intercambio de semillas y patógenos transmitidos por semillas como Rcc (SENASA Resol. 256/99). Como se mencionó anteriormente, dado que Rcc es capaz de invadir muchos hospedantes alternativos, no descartamos el efecto de esta fuente de inóculo sobre la dinámica poblacional. De esta forma, Stam et al. (2019) observaron que los aislamientos de Rcc de diferentes hospedantes aparecen mezclados genéticamente. Se sabe que numerosos hospedantes alternativos promueven la recombinación y la transmisión (Rauch et al. 2005) de patógenos. También pueden aumentar la estabilidad de la población, reduciendo así el efecto de los “cuellos de botella” disminuyendo la deriva genética (Barret et al., 2008).

El análisis de desequilibrio de ligamiento mostró evidencia de recombinación sexual para todas las poblaciones, aunque observamos una alta proporción de aislamientos clonales (42 %) en la población sudamericana. Esto sugiere un papel más importante para la propagación asexual o, más probablemente, un origen más reciente de la población argentina a partir de uno o más eventos fundadores (Templeton, 2008) que está aún más lejos (número de generaciones

de patógenos) del equilibrio observado en las poblaciones europeas (Tabla 3.1). Muchos estudios han demostrado que las especies de hongos con estrategias reproductivas mixtas poseen un mayor potencial para invadir y establecerse con éxito en nuevos ambientes (Bazin et al., 2014). Este establecimiento a menudo se continúa de un rápido aumento en el tamaño de la población, generalmente mediante una estrategia de reproducción clonal si las condiciones ambientales son estables (Wallen y Perlin, 2018). Según nuestros resultados, este podría ser el caso de Rcc en Argentina y probablemente de otros países productores de cebada en el continente, como Uruguay. Esto también está respaldado por los valores del índice de diversidad ( $H_{exp}$ ,  $\lambda$ ) obtenidos en este trabajo, donde la población de Rcc argentina mostró valores de diversidad genética significativamente más bajos (Tabla 3.1) que las poblaciones escocesa y checa, incluso cuando están considerablemente más restringidas desde un punto de vista geográfico (menos lotes muestreados en las poblaciones europeas) (Piotrowska et al., 2016).

MSN y DAPC sugieren un alto nivel de estructuración (más evidente en Argentina) y diferenciación a escala poblacional y de región/continente (Europa – Sudamérica). Independientemente de nuestros resultados de MSN y DAPC, observamos una falta de significación ( $p = 0.31$ ) a escala regional en el análisis AMOVA, pero con un porcentaje importante de variación (34 %) atribuido a la jerarquía regional (Excoffier et al., 1992). Para comprender mejor este aparente conflicto, realizamos el análisis D<sub>jost</sub> que mostró una diferenciación significativa (alta a moderada) entre todas las poblaciones incluidas en nuestro estudio. El nivel moderado de diferenciación encontrado entre las poblaciones europeas respalda los resultados de Stam et al. (2018), quienes sugirieron que las poblaciones europeas de Rcc forman un grupo genético impulsado principalmente por la dispersión de esporas a gran escala. Sin embargo, no descartamos la potencial contribución sobre la diversidad genética de Rcc del intercambio de semillas entre los países europeos incluidos en nuestro estudio.

En base a estos resultados consideramos poco probable que la población de Rcc argentina pueda tener su origen en las localidades europeas donde se obtuvieron las colecciones escocesas o checas. Como se indicó anteriormente, estos resultados pueden reflejar la ocurrencia de un probable “cuello de botella genético” o por eventos fundadores que (en ambos casos deviene en una reducción de la variabilidad genética) de la Rcc experimentó después de ingresar al subcontinente sudamericano. Para determinar con precisión la ocurrencia del “cuello de botella”, primero es necesario establecer el origen geográfico del patógeno, que en muchos casos puede ser el mismo que el hospedante. Uno de los muchos ejemplos en la literatura que se han reportado es el patógeno *Zymoseptoria tritici* en el trigo (Banke & McDonald 2005;

Stukenbrock et al., 2007) (muy relacionado con Rcc). Aunque sugerimos que los eventos fundadores han dado forma a la población argentina de Rcc, existen otros factores contribuyentes que podrían favorecer la reproducción clonal o sexual y, por lo tanto, afectar a la diversidad. Estos serían la limitación de nutrientes, la competencia interespecífica por el nicho, entre otros (Wallen y Perlin 2018). Será pertinente para continuar estudios acerca de la estrategia reproductiva del patógeno en un contexto de cambio climático mundial sumar esfuerzos para profundizar estudios con un conjunto más amplio de poblaciones Rcc. Estos estudios permitirían determinar el efecto de los cambios ambientales en la estrategia de reproducción de Rcc, la variabilidad, la relación y la estructura genética de la dinámica de las poblaciones de Rcc con un mayor grado de certeza.

### **3.5. CONCLUSIÓN**

Si bien los resultados del presente estudio indican que la población de Rcc argentina podría encontrarse en un estado de establecimiento y emergencia en su proceso de invasión de una nueva región (Gladieux et al., 2015), aún debe considerarse un gran riesgo para la producción de cebada en el país. La amplia gama de hospedantes de Rcc y su alta capacidad de adaptación ecológica y genética para superar las barreras que impiden su desarrollo como resistencia a fungicidas (Kaczmarek et al., 2017; Refhus et al., 2019) lo convierten en una amenaza considerable para la producción de cebada en todo el mundo. Medidas como el certificado de semillas "libres de Rcc" en el intercambio de semillas entre países serán cruciales para evitar que Rcc invada una nueva área, además de que las variedades de cebada con resistencia genética a la enfermedad junto con medidas de manejo alternativas sólidas de SNC ofrecerán la mejor estrategia a largo plazo para controlar la propagación y el impacto de la enfermedad. Profundizar la investigación de la estructura genética de Rcc a escala global ayudará a comprender la dinámica de evolución de los patógenos y la perspectiva para ajustar estas prácticas de manejo para reducir las epidemias de SNC en la producción de cebada.

## CAPÍTULO 4

Determinación del periodo de protección de la cebada contra *Ramularia collo-cygni*,  
impacto de la enfermedad en la producción y descripción de condiciones  
predisponentes para el desarrollo de modelos de predicción del salpicado necrótico de  
la cebada.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Ante la ausencia de variedades resistentes al salpicado necrótico de la cebada (SNC) (Hess et al., 2007; Walters et al., 2008; Hess et al., 2009 y Moreyra et al., 2020), el manejo actual se basa principalmente en el uso de fungicidas foliares (Havis et al, 2015, Erreguerena et al, 2016, 2021). Recientemente, Hoheneder et al. (2020) identificaron variedades de cebada que presentaban resistencia cuantitativa (QTL) en condiciones controladas. Muchos autores han informado aislamientos con sensibilidad reducida o con resistencia a varios fungicidas de diferentes grupos químicos, como los IQe, IDM y los ISDH, relacionados con mutaciones en las proteínas objetivo de los fungicidas (Fountaine y Fraaije, 2009; FRAC 2015 ISDH, Grupo de trabajo; Rehfus et al. 2019 y Kiiker et al. 2021) en muchos países europeos. Los programas de protección frente al SNC incluyen mezclas de carboxamidas con triazoles y se utilizan fungicidas multisitio como el clorotalonil (Piotrowska, 2014), aunque este último fue prohibido recientemente (EFSA, 2018). En Argentina y Uruguay los programas de protección química para SNC se basan en el uso de estrobilurinas y carboxamidas, con o sin triazoles en mezclas dobles o triples (Erreguerena et al., 2016; 2017 y 2021) y combinaciones con clorotalonil pero solo en Uruguay (Pereyra et al., 2014). Los fungicidas en semillas (ingredientes activos similares a los fungicidas foliares) utilizados para controlar el SNC no son efectivos (Erreguerena et al., 2017) debido a la rápida recuperación de Rcc de las capas internas dentro de la semilla (Matusinsky et al., 2011). Por otro lado, el momento de aplicación de los fungicidas (relacionado con las etapas de crecimiento del cultivo) juega un papel preponderante y determinante para el manejo de enfermedades (Havis et al., 2015). La mayoría de los estudios europeos indican que la aplicación de fungicidas alrededor del estadio de primeras aristas visibles (Z47) (Zadoks et al., 1974) proporciona el mejor control del SNC. Los programas de protección con fungicidas en Uruguay y Alemania propusieron dos momentos, elongación del tallo (Z31-33) y aristas visibles (Z47) proporcionando altas eficiencias de control y menores pérdidas de rendimiento de grano (Pereyra et al., 2014). En Argentina se han propuesto varios momentos de aplicación para el control del SNC, como elongación del tallo (Z31) o espigazón (Z59) (Cortese, 2014 y Palacios, 2018).

La ocurrencia de SNC y los niveles de enfermedad dependen en gran medida de las condiciones ambientales durante la temporada de cultivo (Havis et al, 2015). La observación de una mayor dispersión de esporas de Rcc y la severidad de SNC se ha asociado positivamente con la duración de mojado de hoja (DMH) (Havis et al., 2009b; Havis et al., 2012) y/o una humedad relativa alta (Salamati y Reitan, 2006) durante las etapas de elongación del tallo (Z30-

31). En Argentina, el SNC se considera una enfermedad esporádica donde los altos niveles de síntomas se han relacionado con precipitaciones acumuladas en los meses de agosto y septiembre (invierno-primavera) por encima del promedio histórico y anegamientos (Carmona et al., 2013) en torno al estadio de elongación de tallo. De esta forma, Mc Grann et al. (2017) encontraron niveles más altos de SNC en plántulas de variedades de cebada inoculadas expuestas a anegamiento y estrés por radiación asociado principalmente a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pan et al., 2021). Por otro lado, Hoheneder et al. (2020) observaron que largos períodos de sequía desde la etapa de vaina engrosada (Z41) y temperaturas medias por encima del histórico redujeron significativamente los niveles de SNC.

Podría sugerirse que existe un período crítico en la interacción hospedante-patógeno-ambiente donde es más probable que se desarrollen niveles severos de la enfermedad bajo determinadas condiciones ambientales. Este período de susceptibilidad o período de protección probable (PP) podría estar asociado principalmente con la(s) etapa(s) de crecimiento del cultivo en estrecha relación con las condiciones climáticas favorables mencionadas anteriormente y el éxito del patógeno en llegar a los estratos superiores (ya sea por colonización endófito y/o esporas en el aire en la superficie de la hoja). Paveley et al. (2000) demostraron que la aparición de enfermedades foliares policíclicas como la mancha foliar causada por *Z. tritici* estaba relacionada con la etapa de desarrollo de las hojas de trigo. Estos autores demostraron que el momento de emergencia total de la hoja correspondía al tiempo 0 de epidemias de la enfermedad, coincidiendo con la mayor exposición de las hojas al inóculo (principalmente secundario). Schützendübel et al. (2008) observaron que la disminución de la actividad del sistema de protección antioxidante de las hojas al llegar a la floración se asoció con altos niveles de síntomas de SNC. En el cultivo de cebada la emergencia total de las hojas superiores (-2, -1 y hoja bandera) ocurre entre la elongación del tallo (Z31) y las aristas visibles (Z47/49), esto podría estar relacionado con un período de susceptibilidad o protección. Determinar el PP del cultivo contra el SNC contribuiría a ajustar las estrategias de protección química para el control del SNC y otras enfermedades reduciendo los insumos de fungicidas aumentando su eficiencia.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

En la figura suplementaria 1 (APENDICE 3) se presenta un esquema de materiales y métodos de todos los ensayos, objetivos de estos y variables medidas en este capítulo.

#### 4.2.1. Ensayos de campo para establecer el periodo de protección de la cebada contra el SNC

Los ensayos de campo para la determinación del periodo de protección se realizaron durante las campañas 2013, 2014, 2015 y 2016 de cebada en las localidades de Balcarce ( $37^{\circ}45'44,9''S$ ,  $58^{\circ}18'23,2''O$ ), Miramar ( $38^{\circ}09'20.8''S$   $57^{\circ}59'45.0''O$ ), Lobería ( $38^{\circ}09'06.0''S$   $58^{\circ}45'37.8''O$ ), Tres Arroyos ( $38^{\circ}19'42.5''S$   $60^{\circ}14'49.3''O$ ) y Mar del Plata ( $37^{\circ}52'57.5''S$   $57^{\circ}50'44.7''O$ ) (Figura 4.1) en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Dado que los ensayos no se realizaron en todos los años y localidades la denominación de cada ensayo surge de la combinación del año y localidad en los que fueron realizados o alguna característica distintiva como variedad o fungicida utilizado.

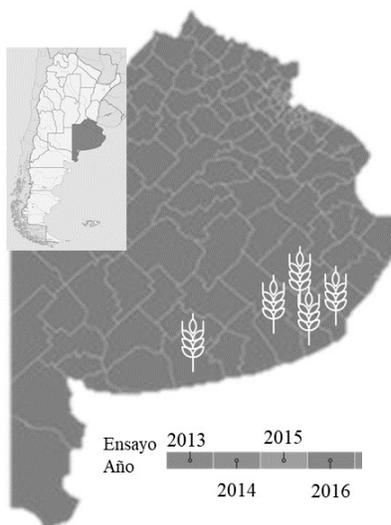


Figura 4.1. Mapa de ubicación geográfica de ensayos y años de experimentación para la determinación del periodo de protección de la cebada frente al salpicado necrótico de la cebada.

Sólo en los ensayos Balcarce 2013 y 2014, se instaló un sistema de riego de tres boquillas (1,17 L/min, PSUltra Diffuser, Hunter®, San Marcos, California, EE. UU.) para asegurar condiciones favorables para la enfermedad. El régimen de riego fue de unos 10 mm (1 h) solo en días soleados al mediodía, hasta dos o tres días antes o después de eventos lluviosos. El riego comenzó desde etapas tempranas (Z13) hasta el final de la etapa de llenado de grano (Z81).

Los detalles de cada ensayo y esquema se dan en la tabla suplementaria 4 (Apéndice 3).

Los tratamientos consistieron en una serie de momentos de aplicaciones aditivos de fungicida desde etapas fenológicas de cebada tempranas hasta tardías (Zadoks et al, 1974) y viceversa como se describe en la tabla 4.1. En todos los ensayos se incluyeron dos tratamientos de control: uno sin fungicida (NF) y protección total (TP) en los que se aplicó el fungicida en cada tiempo de aspersión definido para los tratamientos. Cada tratamiento se realizó aplicando el fungicida en mezcla isopirazam (12.5 g) + azoxistrobina (20 g) (500 cm<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, ReflectXtra®, Syngenta, Buenos Aires, Argentina) en las etapas indicadas para cada año y localidad (Tabla 4.1).

Para describir el desarrollo foliar y su posible relación con la intercepción del fungicida en el ensayo de Balcarce del año 2015 se midió el área foliar por macollo (cm<sup>2</sup>). Para esto se obtuvieron diez macollos al azar por muestreo y se separaron las hojas de cada muestra y se le determinó el área foliar promedio por macollo con un medidor de área foliar modelo LI-3100 (LICOR, inc.). Se realizaron seis muestreos en los estadios de pleno macollaje (Z25), fin de macollaje (Z29), primer nudo (Z31), tres nudos (Z33), hoja bandera (Z39), aristas visibles (Z47) y grano lechoso (Z78).

Tabla 4.1. Tratamientos fungicidas básicos (isopirazam + azoxistrobina) utilizados para evaluar el período de protección (PP) de la cebada contra el salpicado necrótico de la cebada (ensayos desde 2013 al 2016) y tratamientos de validación del PP propuesto con estrategia de una o dos aplicaciones (ensayos desde 2014 al 2015).

| Tipo de tratamiento   | Tratamiento | Estadios fenológicos de cebada |     |     |     |     |
|-----------------------|-------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
|                       |             | Z13                            | Z30 | Z39 | Z59 | Z77 |
| Protección aditiva    | <Z13        | +                              |     |     |     |     |
| Protección aditiva    | <Z30        | +                              | +   |     |     |     |
| Protección aditiva    | <Z39        | +                              | +   | +   |     |     |
| Protección aditiva    | <Z69        | +                              | +   | +   | +   |     |
| Control con fungicida | TP          | +                              | +   | +   | +   | +   |
| Desprotección aditiva | >Z30        |                                | +   | +   | +   | +   |
| Desprotección aditiva | >Z39        |                                |     | +   | +   | +   |
| Desprotección aditiva | >Z69        |                                |     |     | +   | +   |
| Desprotección aditiva | >Z77        |                                |     |     |     | +   |
| Control sin fungicida | SF          |                                |     |     |     |     |

|                |                  | Estadios fenológicos de cebada aplicados con fungicida |         |         |     |  |
|----------------|------------------|--------------------------------------------------------|---------|---------|-----|--|
| Una aplicación | Z13              | Z30                                                    | Z39     | Z59     | Z77 |  |
|                | Dos aplicaciones | Z30+Z39                                                | Z33+Z49 | Z39+Z69 |     |  |

A partir del año 2014 hasta el 2016 inclusive se incluyeron en los tratamientos los estadios Z33 y Z49 como momentos de aplicación de fungicida. En el ensayo de Balcarce del año 2016, el fungicida clorotalonil (32 Sc) ( $1.5 \text{ L ha}^{-1}$ , Odeón®, Adama Argentina S.A, Buenos Aires, Argentina) y una mezcla con prothioconazol (17.5 g) y trifloxistrobina (15 g) ( $700 \text{ ml ha}^{-1}$ , Cripton®, Bayer CropScience., Buenos Aires Argentina) se incluyeron en los ensayos para establecer el PP. Para validar el PP, se incluyeron en los ensayos de 2014 (Balcarce) y 2015 (Balcarce y Lobería) tratamientos que consistieron en la aplicación de fungicida en cada estadio por separado (estrategia de una aplicación) y sus combinaciones (estrategia de dos aplicaciones) (Tabla 4.1). Las aspersiones del fungicida se realizaron con una mochila de presión constante ( $3.5 \text{ kgf/cm}^2$ ) equipada con una barra y cuatro tabletas de cono hueco separadas 35 cm entre sí. Se utilizó un volumen final equivalente a  $140 \text{ L ha}^{-1}$ . Los tratamientos se dispusieron en un diseño de bloques completos al azar con 2, 3 o 4 repeticiones según cada ensayo. Las parcelas constaban de  $10 \text{ m}^2$  de superficie. Se utilizó la variedad de cebada 'Andreia' a una densidad de siembra de 220-250 semillas/ $\text{m}^2$ . En el ensayo de Lobería también se utilizó la variedad de cebada 'Aliciana'. La fertilización nitrogenada y fosforada de los ensayos se aplicó en suficiencia en forma de urea en la siembra (Tabla suplementaria 3).

Desde el estadio de llenado de grano (Z75) se evaluaron semanalmente los síntomas de SNC. La incidencia de la enfermedad ( $100 \times \text{número de plantas sintomáticas/número de plantas totales}$ ) y el coeficiente relativo de infección (CIR) según la escala modificada de dos dígitos de Saari Prescott (1975) (altura 0-9 y severidad 0-9 de la enfermedad) de 20 plantas fueron evaluadas (Stubbs et al, 1986). Para el cálculo del CIR se utilizó la siguiente ecuación:  $\text{CIR} = [\text{VI}/(\text{VI}_{\text{max}}+1)] \times 100$  donde la VI es la variable de infección (altura x severidad). La severidad de las hojas consistió en el porcentaje promedio del área de las hojas afectada por SNC. El área bajo la curva de progreso de la enfermedad (basada en la severidad) (ABCPE) se calculó a partir de evaluaciones de la enfermedad (Madden et al. 2007). El área de hoja verde (% GLA) se estimó a partir de los niveles de severidad de SNC de Piotrowska, (2013) y Newton et al. (2004). La eficiencia de control (EC) se calculó relativizando todos los valores de enfermedad al testigo sin fungicida según Abbot (1925).

4.2.2. *Ensayo de eficiencia de control del SNC de diversos formulados de fungicidas en el periodo de protección de la cebada establecido previamente en el contexto de manejo integrado.*

Para determinar y comparar el nivel de control de los formulados de fungicidas más utilizados en Argentina para el control del SNC se implantó un ensayo de campo en la EEA Balcarce en el año 2017. Los tratamientos consistieron en microparcels de 10 m<sup>2</sup> con cuatro repeticiones (DBCA) en la EEA Balcarce en la campaña 2017 con diversas estrategias de manejo integrado: 1- Variedad Andreia, comportamiento intermedio a mancha en red (*D. teres f sp teres*) (Moreyra et al, 2020) (Resistencia), 2- Siembra tardía (22/072017) evitando temperaturas bajas que favorecen el desarrollo de escaldadura (*R. commune*) (Walters et al, 2012) (Evasión/Regulación), 3- Análisis sanitario de semilla (incidencia de patógenos, %) previo a la siembra por medio de un blotter test por congelamiento sobre papel, de acuerdo a las reglas ISTA (International Seed Testing Association) (Exclusión), 4- Selección de lote: sin historia de cebada evitando fuente de inóculo (rastrojo) (Evasión), 5- Control químico del SNC (Terapia/Protección: seis tratamientos de fungicidas según tabla 4.2 aplicados en el estadio de hoja bandera con las mismas condiciones que en el punto 4.2.1 y mismas evaluaciones de enfermedad, variables productivas y de condiciones ambientales.

Tabla 4.2. Ingredientes activos y dosis de los fungicidas utilizados en cada tratamiento para el análisis de eficiencia de control del salpicado necrótico de la cebada en la localidad de Balcarce 2017.

| Tratamientos | Ingredientes activos                                       | Dosis (cc/ha) |
|--------------|------------------------------------------------------------|---------------|
| 1            | protioconazol + trifloxistrobina<br>adyuvante              | 700<br>250    |
| 2            | protioconazol + trifloxistrobina +<br>bixafen<br>adyuvante | 700<br>250    |
| 3            | fluxapiroxad + epoxiconazol +<br>piraclostrobina           | 1200          |
| 4            | isopyrazam + azoxistrobina                                 | 500           |
| 5            | clorotalonil + (protioconazol +<br>trifloxistrobina)       | 1500 + 700    |

|   |                                                                   |             |
|---|-------------------------------------------------------------------|-------------|
| 6 | clorotalonil + (fluxapiroxad +<br>epoxiconazol + piraclostrobina) | 1500 + 1200 |
| 7 | Testigo sin fungicida                                             | 0           |

#### 4.2.3. Datos de rendimiento y calidad del grano.

Los ensayos se cosecharon con una cosechadora de microparcels de grano fino (Classic ST, Wintersteiger, 2006, Austria) cuando la humedad del grano era inferior al 14 %. Para cada tratamiento se determinó rendimiento de grano ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), peso de mil granos (PMG; g), calibre de grano (CG; %), contenido de proteína (%) y humedad del grano (%) en el Laboratorio de Calidad de Grano de la EEA. Bordenave (Buenos Aires, Argentina). Para la medición de GW se utilizó un clasificador automático de granos Sortimat (Modelo K3, PFEUFFER® GMBH, Kitzingen, Alemania) con tres tamaños de tamices (calibre 2.8, 2.5 y 2.2 mm). Se colocaron 100 gramos de cada muestra y se agitó durante 5 minutos. Luego se pesaron los granos retenidos en cada tamiz mediante una balanza analítica (Serie FD, Ohaus®, Argentina). El PMG se calculó contando 100 granos de cada muestra y luego se multiplicó por diez para llegar a mil granos con tres repeticiones. La cuantificación de proteína de grano y humedad (%) se realizó a partir de 400 g de grano con un analizador de grano automático (Modelo 1241, Foss Electric S.A., Hillerød, Dinamarca).

#### 4.2.4. Variables ambientales y su asociación con los niveles de SNC

Para estudiar la posible asociación entre las variables meteorológicas en los ensayos de campo y los niveles máximos de SNC (valor de severidad en el testigo sin fungicida), se utilizó la información disponible de la red de estaciones meteorológicas del Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica, INTA (2012-2017) ubicadas en o cerca de los sitios de ubicación de los ensayos (aquí se incluyeron todos los ensayos de campo planteados en esta tesis). En este análisis se incluyeron los datos meteorológicos y de enfermedad de un lote cebada de Balcarce de 2012 (lote sin fungicida) como ambiente de severidad alta del SNC (Laboratorio de Fitopatología, UIB, 2012). La temperatura media ( $T_{\text{media}}$ ), máxima ( $T_{\text{max}}$ ) y mínima ( $T_{\text{min}}$ ), humedad relativa diaria (HR), precipitación diaria (DR) y acumulada (DR<sub>acum</sub>),

evapotranspiración (ET) y heliofanía (He) fueron algunas de las variables registradas en todos los ensayos incluidos en este análisis (n=10).

Para evaluar el porcentaje de agua disponible para el cultivo en el suelo, se realizó un análisis de balance hídrico del suelo (BH) en todas las localidades y año de experimentación. Las variables de entrada del modelo para el cálculo del BH fueron: Ppd, ET de referencia (ET<sub>o</sub>), coeficiente de cultivo (K<sub>c</sub>), profundidad del suelo, límites máximo y mínimo de almacenamiento de agua en el suelo y contenido de agua inicial. La evapotranspiración real (ETR) se calculó a partir de la corrección de ET<sub>o</sub> por K<sub>c</sub> para obtener la evapotranspiración máxima (ETM), cuando el agua del suelo estaba fácilmente disponible. Si el suelo se estaba secando por debajo de un umbral crítico (UC; ajustado por las condiciones ambientales locales y el suelo como 0,80 de agua disponible), se consideró una disminución lineal en la evapotranspiración relativa (ETR/ETM) en función de la fracción de agua disponible. El coeficiente K<sub>c</sub> en cada estación de cultivo y sitio se estimó siguiendo las recomendaciones de Allen et al. (1998). Los valores límite máximo y mínimo para el almacenamiento de agua en el suelo y la profundidad efectiva se estiman en función de la serie de suelo en la que se profundiza el ensayo en cada sitio. El balance de cada sitio se inició 30 días antes de la fecha de siembra, con un valor inicial igual al límite máximo de almacenamiento (Allen et al., 2006).

A partir de los datos meteorológicos registrados en todos los ensayos incluidos se generaron otras variables como el Ppd acumulado (mm) (Carmona et al., 2013), T<sub>mean</sub> y T<sub>max</sub> acumulados, número de días con HR >90% y >85% desde macollaje hasta encañazón (Havis et al., 2013), número de días con agua disponible (DWB) (50 < BH < 99) y número de días con exceso de agua (BH = 100%) desde la emergencia hasta la etapa de encañazón tardío y madurez fisiológica. La variable duración de mojado de hoja (DMH) se estimó a partir de la información con un sensor de humedad de la hoja (Modelo LWS-L, Decagon® METER Group Inc, Estados Unidos) utilizado en el ensayo Balcarce 2015. La estimación se realizó mediante un análisis de regresión no lineal entre la media diaria de DMH (hs) y HR (%) (DMH=32.9\*lnHR-127.5, R<sup>2</sup>>0.9, p<0.05).

#### *4.2.5. Análisis de los datos*

La normalidad de todas las variables se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilks y Kolmogorov (Infostat®, Versión 2.0, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las variables que no fueran normales se transformaron logarítmicamente para el análisis de varianza (ANoVa). Se realizó un ANoVa multiambiental

(Variable respuesta =  $\mu$  + Tratamiento + Ensayo (LocalidadxAño) + bloque + TratamientoXEnsayo + Error) para analizar el efecto de los tratamientos sobre las diversas variables respuestas. Las medias de cada tratamiento se compararon mediante el método LSD Fischer y se realizó análisis de correlación de Pearson entre variables mediante el programa estadístico Infostat®. Las correlaciones de  $\leq 0.3$  se clasificaron como bajas, de 0.31 a 0.6 como moderadas y de 0.61 a 1 como altas (Taylor, 1990). El ANoVa multiambiental se realizó para los tratamientos destinados a la determinación del PP y por otro lado para los tratamientos para la validación de la PP (una y dos aplicaciones) (4.2.1, Tabla 4.1) con sus respectivos testigos. En los casos donde los datos de las variables estuvieron desbalanceados se asumió suma de cuadrados secuencial (Tipo I) (Infostat®; Iacobucci, 1995). Los ensayos incluidos en estos análisis fueron aquellos donde se observó una severidad mayor al 10% en el testigo sin tratar. Esta información se detalló en la figura suplementaria 1 y en los resultados (4.3). Para el análisis de cada ensayo individual de determinación del PP (4.2.1) y el ensayo de eficiencia de fungicidas (4.2.2) para el control del SNC (Balcarce 2017) basada en el PP para el análisis de los datos se realizó un ANoVa (ecuación: Variable respuesta =  $\mu$  + Tratamiento + bloque + Error) y comparación de medias por LSD Fischer (Infostat®).

Para una mejor representación de los datos los tratamientos para la determinación del PP se transformaron en grados día ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) según Miralles (2011) para el cultivo de cebada utilizando la temperatura para cada época del año y lugar del ensayo. Para esto se utilizó la ecuación:  $^{\circ}\text{Cd} = [(T_{\text{max}} - T_{\text{min}})/2] - T_{\text{b}}$  donde  $T_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{min}}$  y  $T_{\text{b}}$  son la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) máxima, mínima y base (= 0  $^{\circ}\text{C}$  para cebada) diaria, respectivamente. Luego cada tratamiento consistió en los  $^{\circ}\text{Cd}$  acumulados según periodo de protección o desprotección que represente.

Para establecer los límites del período de protección (PP) en los diferentes ensayos y temporadas se realizaron dos análisis: 1- Análisis de regresión entre los niveles de enfermedad y los tratamientos propuestos utilizando el programa SigmaPlot® (Systat Software Inc. Versión 12.0, 2011 ) y 2- Para definir el nivel máximo de enfermedad (MDL), se realizó un análisis de regresión utilizando 560 datos de incidencia, altura y severidad de SNC de tratamientos incluidos en ensayos comerciales de protección química (Grupo Patología Vegetal, Erreguerena, 2014; 2015; 2016, 2017) donde el MDL se estableció en los valores donde las variables severidad y la altura comenzaron a aumentar exponencialmente en relación a la incidencia (Seem, 1984).

Por otro lado, para estudiar la relación entre las variables ambientales y la severidad del SNC (testigo sin fungicida) en cada ensayo se utilizó un análisis de correlación de Pearson (Infostat®). Se realizó un análisis de regresión múltiple (Minitab®) para generar modelos de

predicción preliminares para evaluar las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de SNC. Para esto, se tomaron en cuenta las variables obtenidas en el paso anterior (variables regresivas o independientes), incluyendo aquellas con moderada a alta (Taylor, 1990) y correlaciones significativas con el nivel de enfermedad de los testigos sin fungicida en etapa de llenado de grano (variables dependientes) con y sin transformación (logit, logaritmo natural y raíz cuadrada) (Hooker et al., 2002; De la Campa et al., 2005 y Subba Rao et al., 1990). Las variables que se correlacionaron entre sí se incluyeron en diferentes modelos de regresión. Para comparar la robustez entre los modelos de predicción obtenidos se analizaron el índice *cp* Mallows,  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado, significación de los parámetros y distribución de los residuales (Minitab®) según Moschini et al. (2013). Se realizaron gráficas de contorno para representar el(los) modelo(s) obtenido(s) (Minitab®).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Ensayos de campo para evaluar el período de protección frente a el SNC

Para establecer el período de protección, se excluyeron del análisis los ensayos en los que no se observaron niveles significativos de SNC (severidad de SNC < 10% en el control sin fungicida) o en los que se presentaron dificultades técnicas. De esta forma, los ensayos incluidos en nuestro análisis fueron: Balcarce 2013, 2014, 2015, 2016 y ambos en Lobería 2015 (variedades de cebada 'Andreia' y 'Aliciana'). En la temporada 2013 no se observó otra enfermedad que no fuera la escaldadura de la cebada (*R. commune*) solo en las primeras etapas en la parte inferior del cultivo. A partir del análisis de regresión entre los niveles de incidencia, altura y severidad del SNC, la MDL se determinó en torno al 50, 4.5 y 20 %, respectivamente (Figura 2 suplementaria, APENDICE 3).

Tabla 4.3. Tabla resumen de los valores promedio generales de los niveles de salpicado necrótico de la cebada (SNC), variables productivas obtenidas en cada ensayo y efecto de variables clasificatorias e interacción (Ensayo, Tratamiento y Error) dentro del análisis multivariado ANoVa y LSD Fischer. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad basada en la severidad, CIR: Coeficiente de infección relativo (Saari Prescott, 1975 y Stubbs et al., 1986). PMG: peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: número de granos, GLA: área de hoja verde.

| Localidad - Año<br>(Ensayo) | Variables SNC     |                 |                      |         |         | Variables productivas |                         |         |                   |                               |                                 |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|---------|---------|-----------------------|-------------------------|---------|-------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                             | Incidencia<br>(%) | Altura<br>(0-9) | Severidad<br>(%) Z78 | ABCPE   | CIR     | GLA (%)               | Rendimien<br>to (kg/ha) | PMG (g) | CG >2.8<br>mm (%) | NG/ha<br>(x 10 <sup>8</sup> ) | Contenido<br>de Proteína<br>(%) |
| Balcarce - 2013             | 41.98ab           | 4.8bc           | 24.09bc              | 134.17b | 26.24ab | 68.99bc               | -                       | -       | -                 | -                             |                                 |
| Balcarce - 2014             | 37.92a            | 4.5b            | 27.25cd              | 192.06c | 32.75b  | 66.92ab               | 6497.29b                | 46.13c  | 73.45c            | 1.41b                         | 11.09e                          |
| Balcarce - 2015             | 46.52b            | 4.85bc          | 19.21ab              | 114.33b | 24.41a  | 70.65cd               | 6924.59b                | 48.52d  | 82.69d            | 1.44b                         | 8.55a                           |
| Lobería - 2015 <sup>a</sup> | 60.91c            | 6c              | 30.91cd              | 197.27c | 29.23ab | 65.22a                | 7015.34b                | 41.73ab | 47.83a            | 1.66c                         | 10.06cd                         |
| Lobería - 2015              | 56.36c            | 5.86bc          | 34.09d               | 211.59c | 29.88ab | 63.74a                | 7015.54b                | 41.1a   | 50.2a             | 1.71c                         | 10.63de                         |
| Balcarce - 2016             | 36.67a            | 3.21a           | 14.55a               | 77.27a  | 25.54ab | 72.82de               | 4657.97a                | 42.79b  | 61.94b            | 1.09a                         | 9.35bc                          |
| Análisis de la Varianza     |                   |                 |                      |         |         |                       |                         |         |                   |                               |                                 |
| R <sup>2</sup>              | 0.92              | 0.93            | 0.9                  | 0.94    | 0.9     | 0.88                  | 0.85                    | 0.88    | 0.94              | 0.83                          | 0.84                            |
| Ensayo                      | ***               | *               | ***                  | ***     | NS      | ***                   | ***                     | ***     | ***               | ***                           | ***                             |
| Tratamiento                 | ***               | ***             | ***                  | ***     | ***     | ***                   | ***                     | ***     | ***               | *                             | NS                              |
| Ensayo x<br>Tratamiento     | NS                | ***             | ***                  | ***     | NS      | ***                   | **                      | **      | **                | **                            | NS                              |

<sup>a</sup>variedad 'Aliciana' \* < 0.01, \*\* < 0.001, \*\*\* < 0.0001, NS: no significativa

La aparición de síntomas evidentes de SNC se observaron desde espigazón hasta el estadio de llenado de granos (Z59 a Z81) en los diversos ensayos de campo y años. Los ensayos con síntomas más tempranos tendieron a mostrar niveles más altos de enfermedad (Tabla 4.3). Se realizaron análisis de ANOVA multi-ambiental y LSD Fischer para estudiar los efectos de los tratamientos y ensayos sobre los niveles de enfermedad y las variables de producción (valores promedio). Se observaron efectos estadísticamente significativos de Ensayo, Tratamiento y Ensayo x Tratamiento en la mayoría de las variables. Los ensayos en Lobería (sin diferencias significativas entre variedades,  $p > 0.05$ ) mostraron los niveles promedio de SNC, rendimiento y número de granos significativamente más altos ( $p < 0.05$ ). Estas últimas variables no fueron significativamente diferentes entre los ensayos a excepción de Balcarce 2016 donde se observaron los valores más bajos (Tabla 4.3). En general, los rendimientos medios de grano más altos, el número de grano por hectárea y el contenido de proteína (potencial productivo) tendieron a estar relacionados con niveles de enfermedad más altos entre todos los ensayos, aunque estas relaciones se abordarán más adelante en nuestro estudio. Los tratamientos no tuvieron efecto significativo sobre el contenido de proteína del grano ( $p > 0.05$ ) (Tabla 4.3).

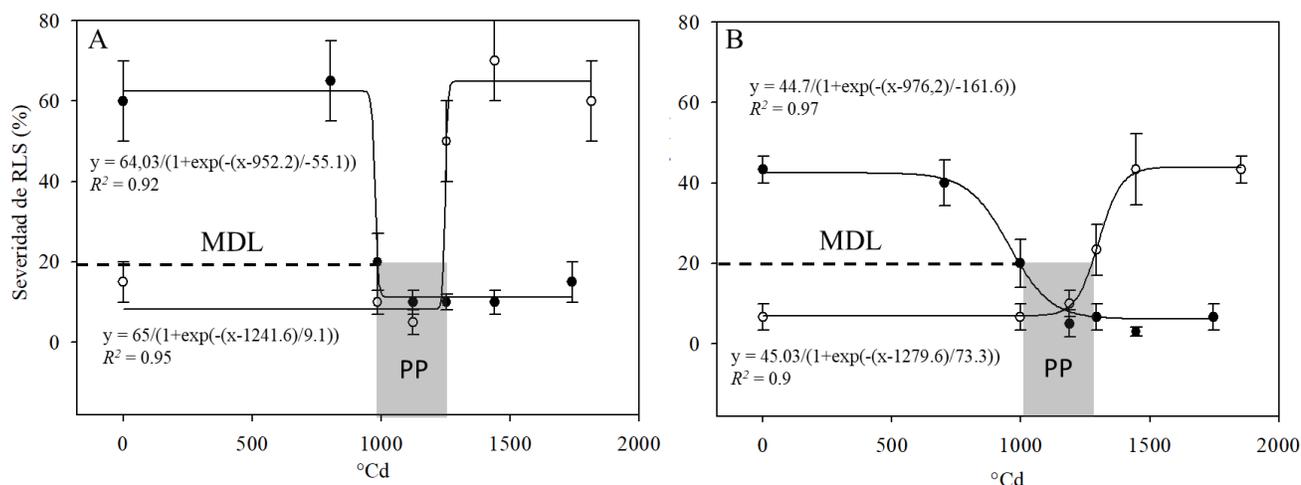


Figura 4.2. Período de protección de la cebada (PP) contra el salpicado necrótico (SNC). Se dan los valores medios de severidad de SNC en la etapa de llenado de grano (Z78) de cada tratamiento para los ensayos Balcarce 2015 (A) y Lobería 2015 (B) (variedad de cebada 'Andreia') y se ajustaron curvas de regresión sigmoideal. Se utilizó el nivel máximo de enfermedad (MDL) (20% de severidad de SNC) para establecer los límites del PP en grados día (°Cd). Los puntos negros y blancos representan los valores medios con errores de cada tratamiento de protección o desprotección con fungicida aditivo, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos con fungicidas tuvieron un efecto significativo en los niveles de SNC (incidencia, altura y severidad) (Tabla 4.2). En el caso de los tratamientos de protección aditiva, se logró una reducción significativa del 33.3 y 46.5% de la severidad del SNC con protección aditiva hasta 974 °Cd (Z33), (Figura 4.2 A y B, respectivamente). Se observó una reducción significativa máxima de la severidad de SNC del 91 % cuando el cultivo se protegió hasta 1277 °Cd (alrededor de la etapa de hoja bandera, Z39). Se observó una respuesta similar a los tratamientos en incidencia, altura, ABCPE y CIR. Otros tratamientos de protección con fungicidas aditivos (<Z47, <Z59 y <Z77 y PT) no mostraron diferencias significativas con el control máximo logrado con el tratamiento <Z39 en ambos ensayos en todas las variables de la enfermedad. Por otro lado, cuando el cultivo estuvo desprotegido hasta 1200 °Cd, se observó un aumento abrupto y significativo en los niveles de enfermedad (25 y 45% de severidad SNC) (Figura 4.2 A y B, respectivamente). La falta adicional de protección fungicida (>Z59, >Z77 y NF) condujo a un aumento de la severidad media de la enfermedad hasta un 60 y un 45% de la severidad de la enfermedad.

Tabla 4.4. Límites del período de protección (PP) contra el salpicado necrótico de la cebada (SNC) observados en cada ensayo y total. Se proporciona el intervalo de confianza (95 %) para cada valor límite medio del PP y los límites

del PP encontrados con fungicidas alternativos. <sup>1</sup>Ensayos en los que se usó una mezcla de isopirazam y azoxistrobina.

| Ensayo<br>Localidad - Año - Variedad | Severidad SNC (< 20%)    |                          |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                      | Límite inferior<br>(°Cd) | Límite superior<br>(°Cd) |
| Balcarce - 2013 - Andreia            | 732                      | 1164                     |
| Balcarce - 2014 - Andreia            | 730                      | 1252                     |
| Balcarce - 2015 - Andreia            | 926                      | 1264                     |
| Lobería - 2015 - Aliciana            | 1012                     | 1232                     |
| Lobería - 2015 - Andreia             | 985                      | 1235                     |
| Balcarce - 2016 - Andreia            | 977                      | 1035                     |
| Mean                                 | 893.6                    | 1197                     |
| Intervalo conf 95% sup               | 996.85                   | 1266.3                   |
| Intervalo conf 95% inf               | 790                      | 1127.7                   |
| Error                                | 61.21                    | 17.35                    |

| Ensayo<br>Localidad - Año – Fungicida                 | Severidad SNC (< 20%)    |                          |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                                       | Límite inferior<br>(°Cd) | Límite superior<br>(°Cd) |
| Balcarce - 2016 – Clorotalonil                        | 908                      | 1063                     |
| Balcarce - 2016 - Protioconazol +<br>Trifloxistrobina | 936                      | 1024                     |

Los límites del PP se establecieron en valores de °Cd a partir de la intersección entre el MDL (20% de severidad) y las curvas de regresión (Figura 4.2 A y B). Los límites medios de la PP basados en la incidencia y la altura estuvieron entre 941.6 y 1198 °Cd (datos no mostrados). Asimismo, la PP basada en severidad se estableció entre 893.6 y 1197 °Cd (Z33 y Z49, respectivamente) (Figura 4.2, Tabla 4.4). En el ensayo Balcarce 2016 no se observaron diferencias en los límites del PP cuando se aplicaron otros fungicidas. Aunque, en este ensayo se observaron niveles bajos de severidad de SNC (<25%).

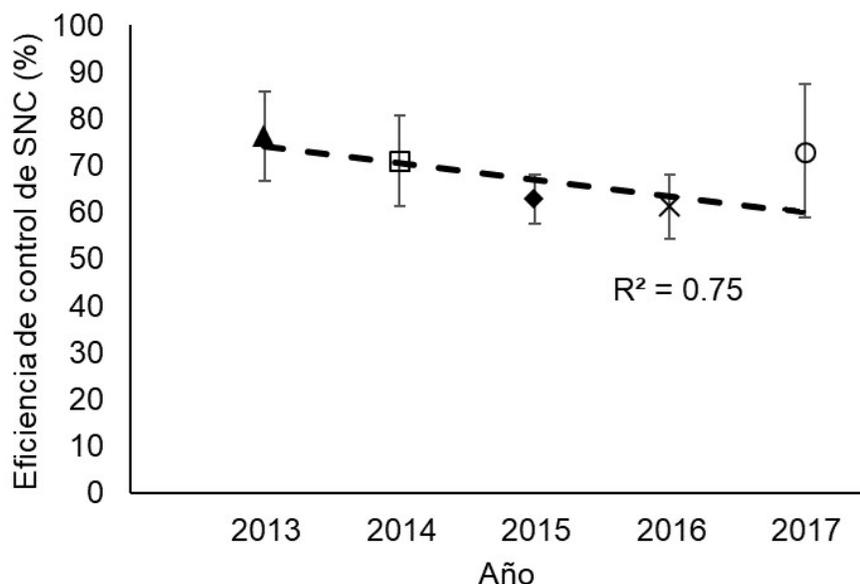


Figura 4.3. Eficiencia de control máxima (ECM) alcanzada (%) del salpicado necrótico de la cebada a través de los ensayos en diferentes años y localidades. Los símbolos indican el promedio de la ECM de cada ensayo ( $\pm$  error estándar) mediante la utilización del fungicida en mezcla azoxistrobina e isopirazam. \*Año 2017: dato de EC del fungicida azoxistrobina e isopyrazam del ensayo 4.2.2.

Si bien no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de control del SNC a través de los años en los ensayos evaluados se observó una tendencia decreciente de la eficiencia de control de la mezcla fungicida utilizada (Figura 4.3).

#### 4.3.2. Efectos de los tratamientos con fungicidas dentro o fuera del período de protección de la cebada (PP) contra el SNC

Para comparar el efecto de la aplicación de fungicidas (isopirazam + azoxistrobina) dentro o fuera de los límites del PP establecido, se evaluaron los niveles de SNC y los valores de producción de los tratamientos de la estrategia de aspersión de fungicidas simples o dobles.

Tabla 4.5. Validación del período de protección (PP) contra el salpicado necrótico de la cebada (SNC). Análisis de varianza de los tratamientos de la estrategia de aplicación del fungicida (isopirazam y azoxistrobina) en uno y dos momentos, dentro o fuera del PP y los efectos en los niveles de SNC y variables de producción en los ensayos Balcarce 2014, 2015 y Lobería 2015. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ABCPE: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad basada en la severidad. PMG: Peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: Número de granos ha<sup>-1</sup> SF: Sin fungicida, PT: Protección total. \* $p < 0.0001$ .

| SNC                     | $R^2$                | SF     | Una aplicación de fungicida |         |          |          |        | PT       | Dos aplicaciones de fungicida |         |                                 |                               |         |
|-------------------------|----------------------|--------|-----------------------------|---------|----------|----------|--------|----------|-------------------------------|---------|---------------------------------|-------------------------------|---------|
|                         |                      |        | Z13                         | Z30     | Z39      | Z59      | Z77    |          | Z13+Z30                       | Z30+Z39 | Z33+Z49                         | Z39+Z59                       | Z49+Z59 |
| Incidencia (%)          | 0.87*                | 93.8f  | 88.9f                       | 63.3de  | 15.7ab   | 87.9f    | 85.2ef | 8a       | 78.19e                        | 19.5b   | 38.6cd                          | 40c                           | 87.1d   |
| Severidad (%)           | 0.88*                | 75.3f  | 65.6d                       | 40.6c   | 4.3a     | 69.3e    | 66.1c  | 6.9a     | 35.21d                        | 9.8ab   | 15.5c                           | 12.8bc                        | 38.6d   |
| ABCPE                   | 0.89*                | 315.4e | 350.9e                      | 178.5c  | 50a      | 256.23d  | 196.9c | 22.02a   | 205.77c                       | 58.86a  | 172.5b <sub>c</sub>             | 110b                          | 175.9bc |
| +Rendimiento            | 0.84*                | 0a     | 858.8ab                     | 1575.2c | 1679.3cd | 1036.6bc | -      | 1192.5cd | 841.9ab                       | 2165d   | 1824.5 <sub>cd</sub>            | 1755.3 <sub>cd</sub>          | 171.3a  |
| +PMG                    | 0.88*                | 0a     | 1.5abcd                     | 4.2e    | 5.7f     | 0.6ab    | -      | 2.9de    | 0.8ab                         | 2.8de   | 2.2 <sub>bcd</sub> <sub>e</sub> | 2 <sub>bcd</sub> <sub>e</sub> | 0.14a   |
| +NG (x10 <sup>7</sup> ) | 0.79,<br>=0.000<br>7 | 0a     | 2.14b                       | 2.9c    | 2.9c     | 2.6bc    | -      | 2.4bc    | 2.2b                          | 4.7e    | 4.2cd                           | 4.2cd                         | 0.95ab  |
| +CG > 2.8mm             | 0.93*                | 0a     | 0.7a                        | 9.9bc   | 17.5d    | 0.81a    | -      | 9.3b     | 4ab                           | 7.5b    | 3.8ab                           | 3.1ab                         | 0.09a   |

En la tabla 4.5 se muestran los valores promedios de los niveles de SNC (incidencia, severidad y ABCPE en relación con el nivel máximo por prueba) y las variables productivas (ganancia) logradas en cada tratamiento ( $0.93 < R^2 < 0.84$ ,  $p < 0.0001$ ) en una o dos aplicaciones de fungicidas estrategias. Los tratamientos con fungicidas que incluyeron la etapa de hoja bandera (dentro del PP) solos o en combinación con otro tiempo de aspersión mostraron menores niveles de enfermedad y mayor ganancia productiva. En general, no hubo diferencias significativas entre los valores medios obtenidos con una o dos aplicaciones de fungicidas, excepto para los tratamientos Z13 y Z13+Z30.

#### 4.3.3. Eficiencia de control del SNC de fungicidas formulados con diversos ingredientes activos en un contexto de manejo integrado

Según el PP determinado los formulados fueron aplicados alrededor del estadio de hoja bandera (Z39). En el análisis sanitario de 400 semillas se observó una incidencia de 8% de *Fusarium* spp, 15% de *Alternaria* sp y 5% de *D. teres f sp teres*. En las evaluaciones de campo no se observaron síntomas de enfermedades a excepción del SNC. El valor máximo de severidad observado fue de alrededor de un 50%. En la figura 4.4 se observa que la EC de los tratamientos planteados fue alta y variando entre 70 y 100% logrando 1 tn/ha (promedio) más

que el testigo sin fungicida (TSF) ( $3700 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). La inclusión del multisitio clorotalonil no generó mejoras significativas en la EC o rendimiento observados. Un patrón similar se observó en otras variables productivas medidas como peso de mil granos y calibre de grano (datos no mostrados).

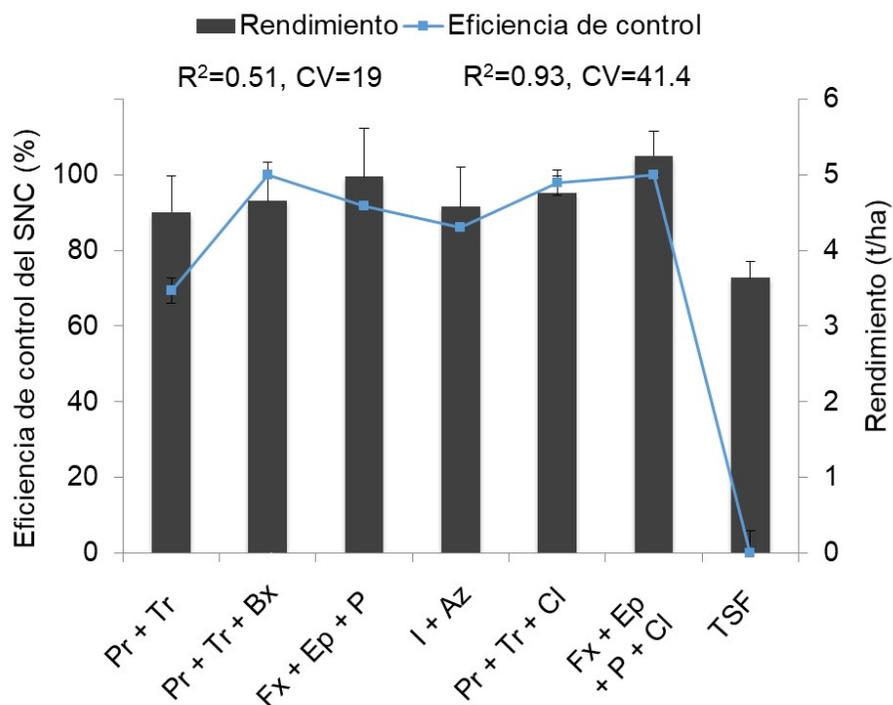


Figura 4.4. Eficiencia de control (EC) y rendimiento promedio ( $\pm$  error estándar) observados con diferentes formulados con fungicidas para el control del salpicado necrótico de la cebada (SNC) en Balcarce (2017). Pr: prothioconazol, Tr: trifloxistrobina, Bx: bixafen, Fx: fluxapiroxad, Ep: epoxiconazol, P: piraclostrobina, I: isopirazam, Az: azoxistrobina, Cl: clorotalonil y TSF: Testigo sin fungicida.

#### 4.3.4. Desarrollo foliar en relación con los estadios fenológicos del cultivo

Para determinar la capacidad máxima probable de intercepción foliar de fungicida se midió la evolución del desarrollo foliar por macollo durante el ciclo del cultivo (Balcarce 2015). Se observó que entre los estadios de tres nudos (Z33) y hoja bandera (Z39) ( $1000 \text{ }^\circ\text{Cd}$ ) se alcanzó el máximo de desarrollo foliar por macollo. En estadios más avanzados se observó una leve disminución del área foliar probablemente asociada a la pérdida o marchites de hojas basales.

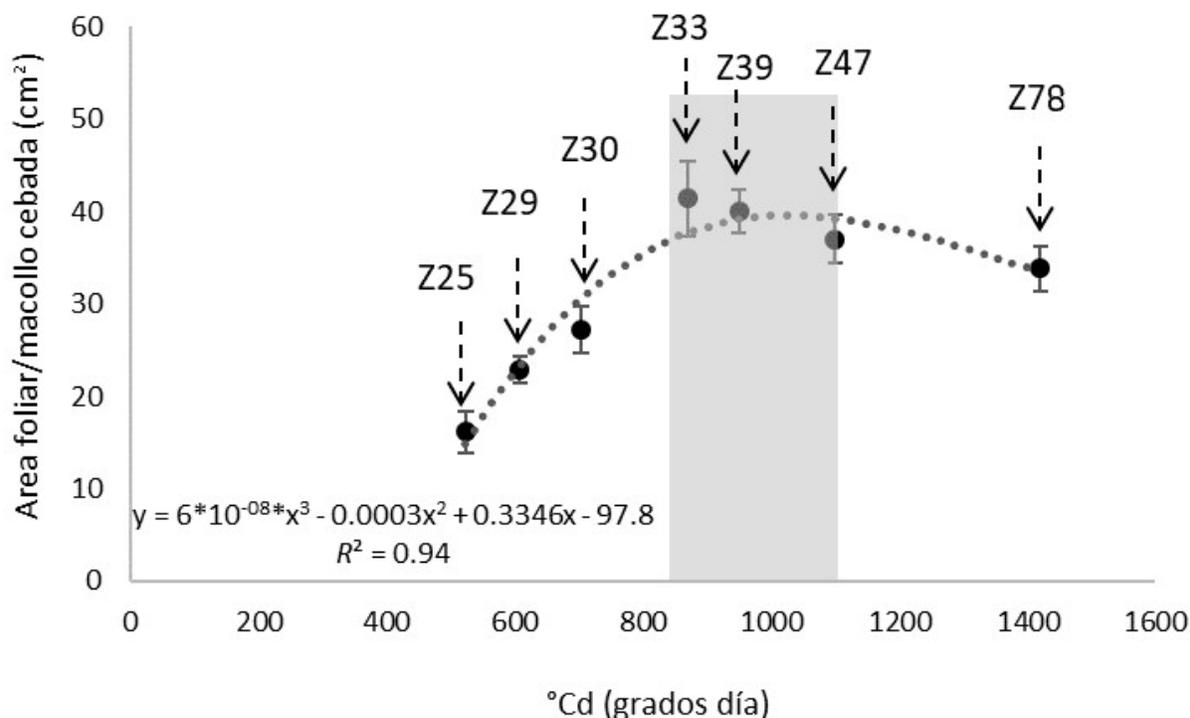


Figura 4.5. Desarrollo del área foliar por macollo de cebada a lo largo del ciclo del cultivo (Balcarce, 2015). Puntos negros indican el promedio del área foliar de diez macollos por muestreo/estadio fenológico. El área sombreada indica el periodo de protección determinado previamente. Z25 y Z29: pleno y fin de macollaje respectivamente, Z30: inicio de encañazón, Z33: tres nudos, Z39: hoja bandera, Z47: aristas visibles y Z78: llenado de grano.

#### 4.3.4. Impacto del SNC en la producción de cebada

Como se observa en la tabla 2, los niveles de SNC varían entre los ensayos donde se observaron valores más altos de enfermedad en los ensayos con mayor producción general (Rendimiento, PMG, NG y CG). A partir del análisis de regresión lineal entre los niveles de SNC (severidad y ABCPE) y las variables de producción, se observó una tendencia similar.

Tabla 4.6. Índices de pérdida relacionados con el salpicado necrótico (SNC). Coeficientes de análisis de regresión lineal entre la severidad del SNC, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) basada en la severidad y los valores de producción obtenidos en ensayos de campo (n=8). m y b: pendiente de regresión e intercepto respectivamente, Ymax: valor máximo, PMG: peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: número de granos.

| ABCPE         |                                    |        |        |         |      |      |                               |          |          |              |      |      |
|---------------|------------------------------------|--------|--------|---------|------|------|-------------------------------|----------|----------|--------------|------|------|
|               | Rendimiento (Kg ha <sup>-1</sup> ) |        |        | PMG (g) |      |      | NG (granos ha <sup>-1</sup> ) |          |          | CG > 2.8 (%) |      |      |
|               | m*(-1)                             | b      | Ymax   | m*(-1)  | b    | Ymax | m*(-1)                        | b        | Ymax     | m*(-1)       | b    | Ymax |
| Promedio      | 2.5                                | 6285.5 | 7219.7 | 0.0096  | 44.9 | 47   | 33703.9                       | 1.4E+08  | 1.7E+08  | 0.03         | 66.6 | 72.9 |
| Error         | 0.39                               | 479.9  | 356.6  | 0.0009  | 0.9  | 1.07 | 8025.2                        | 1.1E+07  | 7.5E+06  | 0.01         | 4.8  | 4.39 |
| SNC Severidad |                                    |        |        |         |      |      |                               |          |          |              |      |      |
| Promedio      | 14.6                               | 6239.7 | 7219.7 | 0.056   | 44.9 | 47   | 2.0E+05                       | 1.39E+08 | 1.67E+08 | 0.2          | 66.4 | 72.9 |
| Error         | 2.41                               | 501.8  | 356.6  | 0.01    | 1    | 1.07 | 3.5E+04                       | 9.9E+06  | 7.5E+06  | 0.03         | 4.85 | 4.39 |

Los índices de rendimiento, número de granos, peso de mil granos y pérdida de calibre de grano ( $m$ =pendiente, Tabla 4.6) relacionados con los niveles de SNC tendieron a ser más altos cuando se lograron mayores valores de producción en cada ensayo (Tabla suplementaria 5). Los valores máximos de severidad de SNC y ABCPE alcanzados en nuestros datos fueron alrededor del 70% y 595 respectivamente de los ensayos de Lobería en parcelas sin tratamientos con fungicidas. Así, las pérdidas máximas medias relacionadas con SNC fueron del orden de 1022.5 kg ha<sup>-1</sup> ( $\pm$  233) para rendimiento (14%), 5.7 g ( $\pm$  0.54) para peso de mil granos (12%),  $2 \cdot 10^7$  granos ha<sup>-1</sup> ( $\pm$   $4.7 \cdot 10^6$ ) (11.7%) y 17.9% de calibre de grano >2.8 mm.

#### 4.3.5. Variables ambientales y su asociación con los niveles de SNC

Para describir las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de SNC, se analizaron varias variables meteorológicas y se realizó el análisis de balance hídrico (agua disponible, BH) de todos los ensayos, incluidos aquellos que fueron excluidos del análisis de determinación del PP (Miramar 2014, Barrow 2015 y Mar del Plata 2015). En este análisis se incluyeron las condiciones ambientales de Balcarce 2012 (estancia Santa Rita, 37°38'30.0"S, 58°29'29.2"O) y Balcarce 2017 (37°45'44.9"S, 58° 18'23.2"O) como años de niveles de SNC alto y medio, respectivamente.

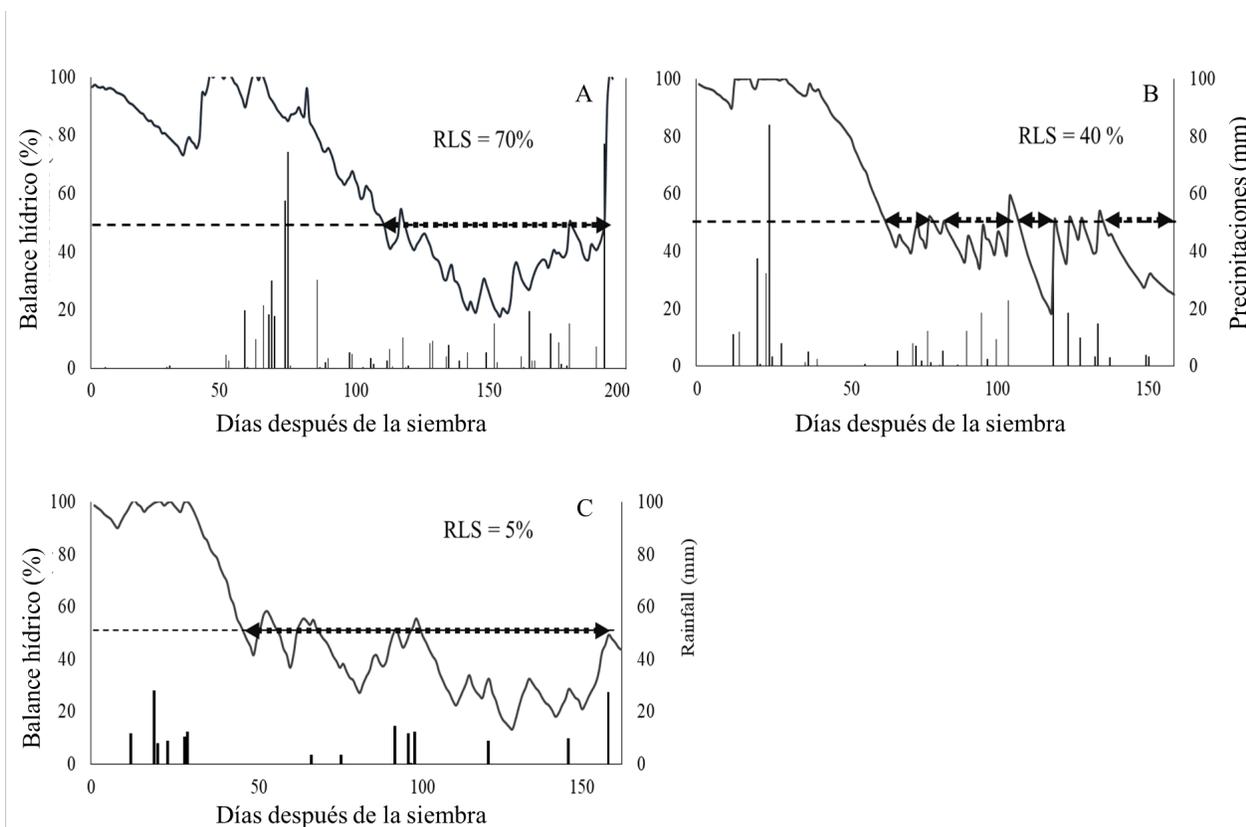


Figura 4.6. Balance hídrico (agua disponible, BH) en días después de la siembra (DAS) para cultivo de cebada en tres de diez ensayos con alta (70%, Balcarce 2012), media (40%, Balcarce 2015) y baja (5%, Barrow 2015) severidad del salpicado necrótico (SNC) en parcelas no tratadas evaluadas en la etapa de llenado de grano. La línea negra indica los niveles de BH. Las flechas punteadas negras indican períodos de BH por debajo del 50% (déficit hídrico). Los valores de BH por encima de esta línea indican agua disponible para el cultivo. Las flechas indican los períodos de deficiencia de agua para el cultivo. Las barras negras indican las precipitaciones diarias.

En la figura 4.6 se muestra el BH del suelo (% de agua disponible) de tres ensayos con niveles contrastantes de severidad de SNC (70, 40 y 5%). En el ensayo de baja severidad de SNC (Figura 4.6 C), se observó un período de aproximadamente 120 días con  $DBH < 50\%$  (desde el estadio de macollaje tardío hasta madurez), así como un período de 60 días sin lluvia desde macollaje hasta las etapas de encañazón tardío (Z33). Además, en este ensayo las precipitaciones no superaron en ningún caso los 30 mm. En los experimentos con severidad alta y media de SNC (Figura 4.6 A y B), se observaron períodos más cortos de  $DBH < 50\%$  de 40 y 50 días, respectivamente. En el primero de etapa de espigazón y en el segundo dividido en cuatro periodos de 10, 20, 12 y 23 DDS de etapa de encañazón hasta llenado de grano. Las precipitaciones se distribuyeron homogéneamente a lo largo del ciclo de ambos cultivos. Cabe

señalar que en el ensayo de alta severidad (Fig. 4.6 A), se observaron eventos de lluvia de 80 y 60 mm en el mes de agosto (etapa de macollaje/encañazón). La precipitación acumulada en el período Z21 a Z39 estuvo más de 200 mm por encima de la precipitación histórica en el ensayo de SNC alto (Figura 4.6 A y Figura suplementaria 3). En el caso de los ensayos de niveles medio y bajo de SNC, la diferencia fue de 84 y -9,4 mm, respectivamente (Figura 4.6 B y C, Figura suplementaria 3). Este patrón se observó en todos los ensayos evaluados.

Tabla 4.7. Variables ambientales con correlaciones significativas moderadas-altas con la severidad del salpicado necrótico (parcelas sin fungicida) y análisis de regresión múltiple en todos los ensayos incluidos en nuestro estudio (n=10). D: días.

|                   | Temperatura (Z21 + Z39) |                     | Balance hídrico (BH)      |                      |                     | Humedad relativa (RH)  | Duración de mojado de hoja (DMH) (hs) | Precipitación (mm)                   |
|-------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                   | Promedio ( $\Sigma$ )   | Máxima ( $\Sigma$ ) | DBH > 50 (Ciclo completo) | DBH > 50 (hasta Z39) | DBH=100 (hasta Z39) | DRH > 90% (Z21 to Z39) | DMH ( $\Sigma$ ) (Z21 to Z39)         | Precipitación acumulada (Z21 to Z39) |
| Severidad SNC (%) | -0.87                   | -0.87               | 0.81                      | 0.86                 | 0.87                | 0.7                    | 0.76                                  | 0.84                                 |

Para la evaluación de posibles modelos de predicción de la enfermedad, se utilizó como variable dependiente la severidad del SNC (estadio de llenado de grano) sin transformación (raíz cuadrada, logit entre otras) ya que no se observaron mejoras en los análisis. La temperatura (Tmax y Tmean), DBH>50%, DBH=100% y la lluvia acumulada en las etapas de macollaje y encañazón fueron las variables que más se asociaron con la severidad del SNC (Cuadro 13). Estas se incluyeron en el análisis de regresión múltiple, aunque cabe señalar que las variables regresoras basadas en BH (DBH>50%, DBH=100%) y precipitación se correlacionaron entre sí ( $r > 0.8$ ,  $p < 0.01$ ) por lo que se incluyeron en diferentes modelos con la Tmedia acumulada. Tmax se excluyó del análisis ya que se correlacionó significativamente con BH y precipitaciones ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4.8. Análisis de regresión múltiple entre las variables ambientales y la severidad del salpicado necrótico de la cebada (SNC) observada en nuestros senderos (n=10). Las variables regresoras analizadas fueron la temperatura media (Tmedia) (Z21+Z39) y la combinación con días de balance hídrico (DBH) > 50% y DBH = 100% (anegamiento) ambas hasta la etapa Z39, precipitación acumulada y duración de mojado de hoja acumulada (DMH) (Z21+Z39).

## Análisis de regresión múltiple

| Variable 1 (X1)                 | Temperatura media acumulada (°C) |                           |                             |                            |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Variable 2 (X2)                 | DBH>50%                          | DBH=100%                  | Precipitación acum (mm)     | Acum DMH media (hs)        |
| Modelos (Y= Severidad SNC)      | 49-0.12*X1+<br>1.11*X2           | 141-0.15*X1-<br>0.712*X2  | 108.4-0.126*X1+<br>0.134*X2 | 67.2-0.14*X1<br>+0.14*X2   |
| R <sup>2</sup> (%)              | 94.2                             | 94.5                      | 93.4                        | 86.14                      |
| R <sup>2</sup> ajustado (%)     | 92.5                             | 91.7                      | 92.1                        | 82.2                       |
| Significancia del modelo (p)    | <0.001                           | 0.001                     | <0.001                      | 0.002                      |
| Significancia de parámetros (p) | X1: p=0.002<br>X2: p=0.002       | X1: p=0.004<br>X2: p=0.05 | X1: p=0.003<br>X2: p=0.006  | X1: p=0.011<br>X2: p=0.081 |
| Residuales vs ajustados         | Normal                           | Normal                    | Normal                      | Normal                     |

Con base en el análisis de regresión múltiple, se obtuvieron cuatro modelos de regresión para la predicción de la severidad del SNC con altos niveles de ajuste ( $R^2 > 0.86$ ,  $p < 0.01$ ) antes de la floración (aparición típica de los síntomas del SNC). La mayoría de los parámetros fueron significativos ( $p < 0.05$ ) excepto DMH ( $p = 0.081$ ) y la distribución de residuos fue normal en todos los modelos.

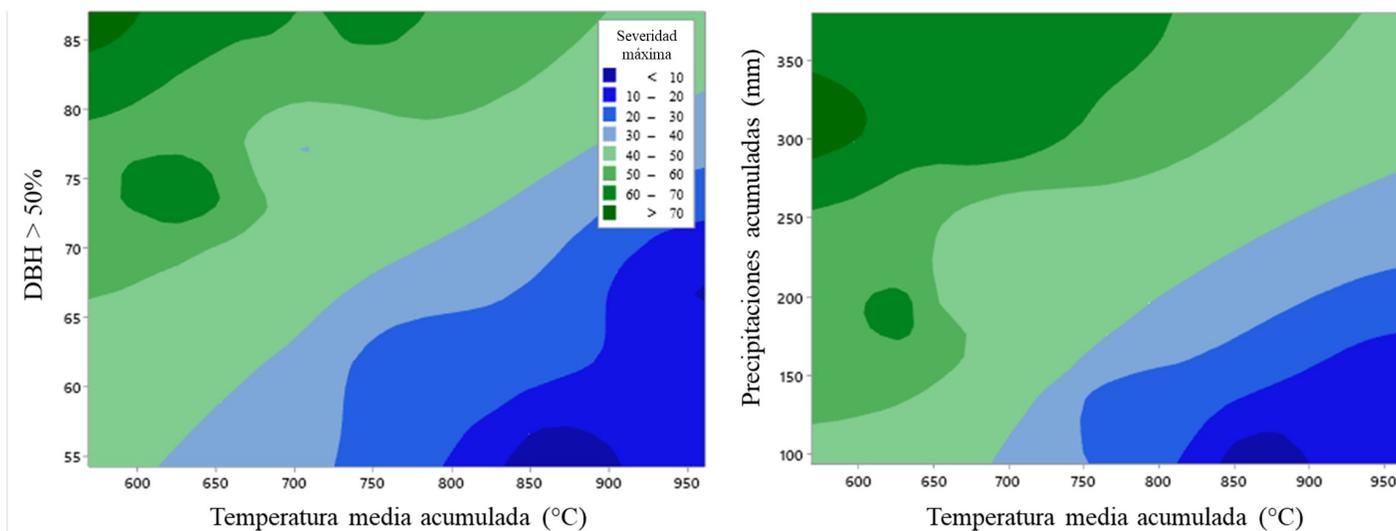


Figura 4.7. Gráficos de contorno que describen la relación encontrada entre las variables ambientales y la severidad del salpicado necrótico(SNC) hacia un modelo de predicción para la enfermedad hasta la etapa Z39. A: severidad de SNC (%) versus temperatura media acumulada (°C) (Z21 a Z39) y días con balance hídrico >50% agua disponible (DBH>50%) hasta Z39 y B: severidad de SNC (%) versus temperatura media acumulada (°C) y lluvia acumulada (mm) durante Z21 a Z39 (n=10).

Los gráficos de contorno basados en dos de los modelos obtenidos para la predicción de SNC muestran el gradiente de severidad de SNC entre Tmedia acumulada (Z21 y Z39) en combinación con DBH>50% (hasta 39) o lluvia acumulada (Z21 y Z39) (Figura 4.7 A y B, respectivamente). El riesgo de niveles elevados de severidad del SNC fue mayor a medida que aumentó la precipitación acumulada o DBH>50% y disminuyó la Tmedia acumulada. Se observaron patrones similares en los otros modelos de regresión obtenidos.

#### 4.4. DISCUSIÓN

Las estrategias anti-resistencia a fungicidas para el control de patógenos de cereales como la elección de los principios activos y sus mezclas están siendo ampliamente difundidas por organizaciones como el FRAC ([www.frac.info](http://www.frac.info)) para evitar o retrasar la tolerancia de los patógenos a los principios activos. En el caso de Rcc, será crucial reducir el número de aplicaciones de fungicidas específicos por campaña de cultivo, ya que Rcc es un patógeno con alto riesgo de desarrollar resistencia a fungicidas (FRAC, 2010). En el presente estudio se estudió el período de protección frente al SNC en cuatro años consecutivos en diversas localidades del sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Aunque se observaron algunas diferencias en los niveles de enfermedad entre los ensayos, el período de protección se estableció entre la etapa de tres nudos (Z33) y las primeras aristas visibles (Z47), donde se observó menos enfermedad. Dentro del PP establecido para el control del SNC, especialmente en el estadio de hoja bandera (Z39), los niveles de enfermedad fueron los más bajos en todos los ensayos en los que se utilizó fungicida a base de mezclas con carboxamidas. Se observó un patrón similar cuando se usaron otros ingredientes activos para el control de SNC (a base de prothioconazol o clorotalonil). No se observaron diferencias significativas en los niveles de SNC

ni en los valores de producción ( $p > 0.05$ ) entre los tres fungicidas utilizados en los tratamientos del ensayo Balcarce 2016. Aunque en este último ensayo observamos bajos niveles de enfermedad (<25%) y variables de producción en comparación con otros ensayos. La escasez de agua podría haber limitado no solo el desarrollo del SNC sino también la productividad de los cultivos. Adicionalmente se evaluó la eficiencia de control del SNC entre diversas mezclas de fungicidas y su eficiencia en el PP establecido en un contexto de manejo integrado de enfermedades. Se demostró la alta eficiencia de control del SNC de mezclas de diversos formulados fungicidas con carboxamidas combinadas con clorotalonil y/o proclorazolo en el PP establecido en Argentina poniendo en evidencia las numerosas opciones y posibilidad de rotación de ingredientes activos. Farengo et al (2015) en Argentina, observaron que las aplicaciones de fungicidas en el estadio de hoja bandera (Z39-41) y/o estrategias de protección que incluyeron este estadio redujeron la incidencia y la severidad del SNC a niveles bajos (menor al 10% de severidad). Estos mismos autores determinaron que las aplicaciones de fungicidas fuera del PP definido en este estudio no controlaron eficientemente la enfermedad (Z30 ni Z59).

Varios estudios en Suiza, Reino Unido y Alemania sugirieron que se logró la máxima eficiencia de control cuando se aplicaron fungicidas alrededor de aristas visibles (Z47) (Hess et al., 2007 y Havis et al., 2012 y 2015). Estos resultados respaldan nuestros hallazgos, aunque las condiciones de cultivo de la cebada son diferentes en los países europeos. En Uruguay, con condiciones ambientales para la producción de cebada similares a las de Argentina, Pereyra et al. (2014) no observaron diferencias significativas entre aplicaciones individuales de mezclas de fungicidas (a base de carboxamidas) en Z33, Z38 y Z49 o combinadas. Zamani-Noor (2011) por medio de la cuantificación de Rcc en semillas (qPCR) demostró que la aplicación de fungicida foliar en alrededor de hoja bandera (Z39-41) redujo la concentración del patógeno en semillas en comparación con un fungicida aplicado en etapas de crecimiento más tardío como antesis (Z65-69).

Rcc se considera un patógeno transmitido por semillas y ésta fuente de inóculo se reporta como la más relacionada con la ocurrencia, niveles del SNC (Havis et al, 2015) y la propagación a larga distancia del patógeno (p.e.: continente). Recientemente se ha observado que Rcc tiene la capacidad de alojarse en todas las capas de la semilla, incluido el endosperma donde los fungicidas no pueden llegar (Kaczmarek et al., 2013). Por otro lado, hay estudios que sugieren que el inóculo secundario (esporas en el aire de plantas de cebada espontáneas y/o hospedantes alternativos) contribuiría a la ocurrencia y propagación local de la enfermedad (Matusinsky et al, 2011) por lo que no se descarta el aporte de este inóculo en las epifitias de la

enfermedad. von Tiedemann (2008) sugirió que Rcc se encuentra en un estado de establecimiento y/o penetración (transmisión del patógeno a la plántula desde la semilla y/o llegada de esporas) desde las primeras etapas fenológicas de la cebada hasta el macollaje tardío. Todo esto podría explicar por qué la protección del cultivo en las primeras etapas, incluida la semilla, los fungicidas no lograron reducir los niveles de enfermedad final (Erreguerena et al., 2016).

En la etapa de encañazón, Rcc comenzaría su fase sistémica, invadiendo internamente al hospedante, llegando a los estratos superiores. Esta fase del patógeno coincide con la PP determinada y con el período de máxima área foliar (hoja bandera) (Ballesteros et al, 2015), período donde se define el máximo número de hojas y crecimiento (área foliar) (Figura 4.5). Este período correspondería al momento de mayor interceptación foliar del fungicida, lográndose una mayor eficiencia de aplicación que en estados fenológicos anteriores o posteriores, donde el cultivo se encuentra en pleno crecimiento (hojas nuevas/tejido desprotegido) o en senescencia (sin capacidad de absorción), respectivamente. Además, la aparición de espigas puede causar interferencia, reduciendo la eficiencia (por absorción) en aplicaciones tardías de fungicidas, cuando el objetivo es el control de enfermedades foliares como el SNC (Platz, 2021 y Meng, 2018). Será de importancia avanzar con el estudio del rol epidemiológico de las esporas en la expresión de la enfermedad para dilucidar, entre otros factores, si el PP determinado podría no solo estar inhibiendo el desarrollo interno del patógeno en la planta sino también el de las esporas que puedan llegar al cultivo por el aire.

Por otro lado, cabe destacar que el PP establecido reduciría la probabilidad de acumulación de residuos en grano dado que cumple con los periodos de carencia (período entre la aplicación de un fungicida y la cosecha) de todos los formulados utilizados (de 60 a 14 días) (Marbete Orquesta Ultra®, BASF; Marbete Reflect Xtra®, SYNGENTA; Marbete Crypton y Crypton Xpro®, Bayer y Marbete Odeón® SC 72, ADAMA).

En cuanto al impacto de SNC en la producción de cebada en Argentina, los valores máximos de rendimiento de grano, peso de mil granos y ancho de grano se observaron dentro de los PP establecidos en todos los experimentos. En promedio, las pérdidas de rendimiento en los controles sin fungicida fueron de 1,02 tn/ha (16%) (a razón de 14.6 kg/ha  $\pm$  2.4 por 1% de severidad SNC) (Tabla 5). Aunque el mayor efecto negativo y significativo se observó en PMG (tasa: 0.056 g  $\pm$  0.01 por 1% de severidad SNC) y en calibre de grano (GW > 2.8 mm: 0.19 % por 1% de severidad SNC) llegando a 8,7 y 20 %, respectivamente. Los informes de pérdidas de rendimiento relacionadas con SNC oscilaron entre el 20% (Hron & Oberforster, 1990), el 25% (Greif, 2002) y el 35% (Cromey et al., 2002). Havis et al. (2015) y Oxley et al. (2010)

reportaron pérdidas de rendimiento de 1000 y 400 Kg ha<sup>-1</sup> respectivamente en el Reino Unido. En general, los síntomas de SNC son evidentes a mediados del período crítico de producción de cebada del cultivo (comenzando 10-20 días antes de la floración hasta espigazón) (Cronos Cebada®), se espera que el impacto en la producción de cebada sea en las variables asociadas al llenado de grano más que al rendimiento como se observa en nuestro trabajo. Nuestros resultados sugieren que el SNC podría causar una pérdida de rendimiento significativa al reducir el PMG (componente de rendimiento) de las plantas afectadas, como observaron Pinnschmidt y Jørgensen (2009). En otro patógeno de la cebada como *P. teres* sp *teres* que afecta al cultivo en etapas tempranas, se reportaron índices de pérdida de rendimiento de 217 (Carmona y Barreto, 2008) y 37.4 Kg ha<sup>-1</sup> (Erreguerena et al., 2017) por 1% de severidad de la enfermedad. Estos índices de pérdidas de rendimiento fueron significativamente más altos que los encontrados en nuestro estudio para una enfermedad tardía como el SNC.

Dado que la aparición del SNC depende en gran medida de las condiciones ambientales, se considera una enfermedad esporádica (Carmona et al., 2013; Havis et al., 2015). De esta forma, en nuestro trabajo describimos algunos patrones contrastantes relacionados con el agua disponible en el suelo para el cultivo y propusimos variables hacia posibles modelos de pronóstico de enfermedades que pudieran apoyar la implementación del PP para el control del SNC en años favorables. En los ensayos donde los niveles de enfermedad fueron bajos (<5-10% de severidad) se observó un período de déficit hídrico (70 días con BH<50%) cuando el cultivo pasó del final de la etapa de macollaje, además de varios períodos de más de 15 días sin eventos de lluvia (Figura 3 C). Esto concuerda con lo informado por Hoheneder et al. (2020) quienes sugirieron que largos periodos de sequía hídrica desde la etapa Z41 y una temperatura media por encima del promedio limitan el desarrollo del SNC en el cultivo. En ensayos con altos niveles de enfermedad (Figura 4.6 A) se observó disponibilidad de agua (DBH>50%) durante la mayor parte del ciclo de cultivo (más de 90 días). Esto permitiría que el patógeno se establezca, desarrolle e invada con éxito al hospedante (fase endofítica). Además, se observaron eventos de lluvia distribuidos homogéneamente con varios días de exceso de agua acumulada (DBH=100%) desde el macollaje hasta la etapa de espiga embuchada. Carmona et al. (2013) sugirieron que en Argentina los altos niveles de SNC estaban asociados con el anegamiento debido a la precipitación acumulada por encima del promedio. McGrann et al. (2018) determinaron que los excesos de agua en etapas tempranas del cultivo aumentan los síntomas del SNC debido a la acumulación de especies oxidativas en la planta (ROS) (Cruz de Carvalho, 2008). La acumulación de especies de ROS dentro de la

planta desencadena la liberación de especies de toxina rubelina-D que favorecen el desarrollo de los síntomas del SNC (Dussart et al., 2022).

Todos los modelos de regresión múltiple basados en las variables ambientales (Tabla 4.8) seleccionadas por su alta correlación con la enfermedad (Tabla 4.7) fueron capaces de explicar los niveles de SNC con alta precisión, lo que nos permite proponerlos como posibles modelos de pronóstico de SNC, aunque se necesitarán más datos y localidades para respaldar estos hallazgos. En estos modelos asumimos inóculo ilimitado de Rcc (dentro de la semilla o esporas en el aire) basado en Carmona et al. (2014) y Erreguerena et al. (2015), aunque la cuantificación de ADN de Rcc en semilla contribuirá a mejorar estos u otros modelos de pronóstico. Por otro lado, vale la pena destacar algunas características de las variables ambientales utilizadas en nuestro trabajo que podrían favorecer o limitar la implementación de los modelos. El DBH>50 y DWB=100 son variables que incluyen muchas otras para su construcción, por lo que, aunque fueron buenas predictoras de enfermedad, requieren más información que otras. En el caso de DMH, esta es una variable que se obtiene a través de sensores específicos y es raro encontrar esta variable en las estaciones meteorológicas. La mayoría de los trabajos suelen estimarlo en base a la humedad relativa (HR>90%), punto de rocío y temperatura, entre otros (Rowlandson et al., 2015; Sentelhas et al., 2008). En el caso del modelo basado en lluvia, esta variable, así como la temperatura promedio son variables que se pueden encontrar disponibles en la mayoría de las localidades y lotes.

## 4.5. CONCLUSIONES

En nuestro estudio, se ha establecido el período de protección de la cebada para el control del SNC con fungicidas foliares. Este período comienza desde la etapa de encañazón (Z33) hasta las aristas visibles (Z47). Proponemos el estado de hoja bandera (Z39) como el momento de aplicación más eficiente dentro del PP, cuando el cultivo ya tiene definida su área foliar. El PP propuesto para el control del SNC basado en fungicidas antes de la aparición de síntomas evidentes de la enfermedad debe basarse en el conocimiento de las condiciones ambientales. De esta forma, se describieron las condiciones ambientales favorables y limitantes para el desarrollo de la enfermedad, donde el estado hídrico del suelo (agua disponible) y la temperatura parecen ser un factor determinante para la predicción de la enfermedad. Se propusieron cuatro posibles modelos de pronóstico basados en la temperatura promedio acumulada en la etapa de macollaje más encañazón en combinación con el número de días de

agua disponible, número de días con exceso de agua, duración de la humedad foliar o lluvia acumulada durante hasta Z39 en Argentina. Cabe señalar que el uso del balance hídrico (% de agua disponible) para el pronóstico SNC es un nuevo enfoque y se continuará trabajando para fortalecer y validar los modelos obtenidos en este trabajo a mayor escala. Todos estos hallazgos contribuirán al diseño y desarrollo de programas de protección más eficientes que permitan la reducción del uso de fungicidas para Argentina y otros países productores de cebada.

# **CAPÍTULO 5**

## **DISCUSIÓN GENERAL**

## 5.1. DISCUSION GENERAL

En el caso de los hongos fitopatógenos, los sistemas reproductivos y de dispersión juegan un papel crucial en la estructura de la población y su potencial evolutivo (Barrett et al., 2008; McDonald & Linde, 2002). El estudio de estas características nos ayuda a predecir la capacidad de adaptación de los patógenos en ambientes cambiantes y a implementar medidas de control efectivas, como el uso de fungicidas y variedades resistentes (McDonald y Linde, 2002). Por lo tanto, para medir y describir el potencial adaptativo de Rcc se realizó conjuntamente un análisis genético por medio de la utilización de diez marcadores de microsatélites neutros (microsatélites) polimórficos (Piotrowska et al., 2016) y un análisis de la sensibilidad a fungicidas de una población argentina de Rcc y presencia de mutaciones asociadas. Los resultados indicaron que la diversidad genética de Rcc en Argentina ( $H_{exp}=0.25$ ) es moderada a alta, aunque menor que la observada en poblaciones europeas ( $H_{expEs}=0.41$  y  $H_{expRC}=0.39$ ) con alto grado de clonalidad y nivel significativo de estructuración genética. Otros estudios de diversidad genética de aislamientos de Rcc basados en el análisis de marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) obtuvieron valores de diversidad genética ( $H_{exp}$ ) entre 0.018 y 0.237 (Leisova-Svobodova et al., 2012) para Europa central y 0.14 a 0.24 en Europa del norte (Hjortshoj et al., 2013). En el caso de estudios basados en el análisis de marcadores SSR en otros patosistemas con conocida fase sexual como *Z. tritici* (Suffert et al., 2016) y *P. tritici-repentis* (Schilder y Bergstrom, 1992) en trigo, los niveles de DG fueron de 0.31 a 0.56 (Gurung et al., 2011; Razavi y Hughes, 2004) y de 0.36 a 0.44 (Gurung et al., 2013), respectivamente. Todas las poblaciones analizadas en esta tesis presentaron evidencia de reproducción sexual (Capítulo 3) y una significativa diferenciación genética ( $D_{Jost}=0.54$ ) entre la población de Rcc local y las europeas. En estas últimas el grado de diferenciación fue menor, aunque significativo ( $D_{Jost}=0.202$ ). Complementariamente se observó en los ensayos in-vitro que la mayoría de los aislamientos de Rcc de argentina son sensibles a triazoles y carboxamidas

donde se determinó la presencia de varias mutaciones en los genes de proteínas objetivo de las fungicidas asociadas a reducciones en la sensibilidad a IDMs y ISDHs. De forma similar, la eficiencia de control en campo de los formulados registrados para el control de Rcc siguen siendo altas (alrededor del 80%) aunque con el formulado con isopyrazam + azoxistrobina se observó una tendencia de reducción a través de los años. En el caso de las IQe, en la población argentina estudiada se observó una ocurrencia del 100% de la mutación G143A que brinda resistencia total a estrobilurinas. Esto indicaría que probablemente esta mutación se encuentra en una gran proporción en la población argentina de Rcc. Además, también se observó una tendencia de reducción de la sensibilidad entre aislamientos de los años 2015 y 2017. En base a características de Rcc descritas previamente y observadas en este estudio para Argentina como evidencia de alternancia de reproducción sexual y asexual, variabilidad genética moderada con un probable proceso de “cuello de botella” genético en su entrada al país por la semilla y su capacidad de adaptarse a fungicidas indicarían que Rcc posee un significativo potencial evolutivo que nos permitiría considerarlo como un riesgo para la producción de cebada en Argentina.

Dado que la variabilidad genética de las poblaciones fúngicas no sólo está dada por las características de su genoma y ciclo de vida, sino también por los factores externos o de selección que determinan y/o afectan la dinámica poblacional (Barret et al., 2008) por lo que las características del manejo del cultivo están íntimamente relacionadas a la historia de las poblaciones fúngicas y por supuesto a su futuro. Dada la falta de variedades resistentes al SNC a nivel mundial (AHDB, 2016 y Moreyra et al 2020) la dependencia absoluta sobre el uso de fungicidas para el control de Rcc se destaca como uno de los principales factores de selección poblacional. En este trabajo se ha demostrado que el momento más eficiente de aplicación de fungicidas registrados para el control del SNC y reducción de su impacto sobre la producción (rendimiento y calidad de grano) se encuentra alrededor de hoja bandera (Z39) pudiendo variar desde el estadio de tres nudos (Z33) hasta aristas visibles (Z47) previo a la aparición de

síntomas diagnóstico de la enfermedad cumpliendo además con el periodo de carencia de todos los formulados utilizados. Adicionalmente, se demostró que se cuentan en el país con varias opciones de principios químicos para el control de Rcc permitiendo la rotación de ingredientes activos para retrasar el desarrollo de la resistencia o pérdida de sensibilidad del patógeno. Para el control con fungicidas, se plantea una estrategia de una única aplicación por ciclo de cultivo la cual debería implementarse sólo si las condiciones ambientales para la enfermedad son predisponentes dado que la ocurrencia del SNC es muy dependiente de éstas. Para ello las condiciones ambientales predisponentes y/o limitantes para la ocurrencia de epifitias del SNC donde el estado hídrico del cultivo/suelo sería un factor determinante fueron claramente descritas y analizadas en esta tesis. En relación a ello, se postulan cuatro modelos de predicción posibles del SNC basados en la temperatura media acumulada en macollaje (Z21) y fin de encañazón (Z39) en combinación con cantidad días de agua disponible, nro de días con excesos hídricos, duración de mojado de hoja o precipitaciones acumuladas durante el mismo periodo.

Por lo tanto, retomando el concepto de que el manejo agronómico de los cultivos puede incidir en la dinámica poblacional como fuerza de selección artificial podemos definir al 'riesgo agronómico' como todas aquellas condiciones ambientales que son adecuadas para el desarrollo de enfermedades y las prácticas de manejo de cultivos utilizadas por los agricultores que contribuyen a la desarrollo de una enfermedad, como por ejemplo, la intensificación de un cultivo o las variedades de cereales con diferentes niveles de susceptibilidad a los patógenos (Kuck & Russell, 2006). En Argentina, como se describió anteriormente, la producción de cebada posee varias características que aumentarían el riesgo agronómico favoreciendo el desarrollo de enfermedades y aparición de nuevas variantes de patógenos, estas son: alrededor del 50% del área sembrada con una sola variedad y susceptible al SNC la ausencia de disponibilidad de genotipos resistentes, la escasa rotación de lotes sembrados bajo siembra directa (cebada sobre cebada), el uso de fungicidas en semillas sin una planificación, la sub-

dosificación y división de dosis de marbete en al menos dos diferentes aplicaciones de ingredientes activos sin criterios sustentados científicamente, entre otros. Si a esto sumamos que la mayoría de los patógenos que afectan al cultivo de cebada en Argentina presentan reportes a nivel mundial de resistencia a fungicidas además de Rcc como *P. teres* f sp *teres*, *R. commune* y *Ustilago nuda* (FRAC, 2014c; FRAC, 2014f; Havis et al, 2014, Refhus et al, 2016, Newcombe & Thomas, 1991) el riesgo sanitario para el cultivo es aún mayor. Recientemente, en Argentina, Carmona et al. (2022) observaron una multi-resistencia a varias familias de fungicidas en aislamientos *P. teres* f sp *teres*. La interacción de este patógeno con su hospedante, generó hace al menos cinco años el cambio de clasificación de comportamiento sanitario de la variedad Andreia de buen comportamiento a intermedio (Moreyra et al., 2020).

En este panorama la diversificación de variedades con buen comportamiento frente a enfermedades, el uso de semilla libre de patógenos (de producción interna e importada), la implementación de estrategias anti-resistencia para el uso de fungicidas (en caso de ser necesarios) con criterios probados científicamente y alternativas a los mismos (biofungicidas, bioestimulantes inductores de defensa fosfitos, extractos de algas, entre otros) en un contexto de manejo integrado con un menor impacto en el ambiente, minimizará los riesgos o retrasará el desarrollo de poblaciones fúngicas más adaptadas que puedan provocar pérdidas en el cultivo de cebada en Argentina.

## 5.2. RESPUESTA A LAS HIPÓTESIS PLANTEADAS

### ***Hipótesis I***

Los aislamientos de *Ramularia collo-cygni* provenientes de zona de producción de cebada en Argentina son sensibles a todos los grupos químicos de fungicidas utilizados para el control del SNC en Argentina.

En el capítulo 2 se realizó un ensayo de sensibilidad in vitro a fungicidas (CE50) de las familias de los IDMs, IQe, ISDHs y un multisitio (cloronitrilo) y secuenciación de genes de proteínas objetivo de las familias de fungicidas mencionadas para la detección de mutaciones en 21 aislamientos de Rcc de Argentina. Se observaron valores altos de CE50 ( $>1 \text{ mg L}^{-1}$ ) de la IQe utilizada (azoxistrobina) y la presencia de la mutación G143A (resistencia total) en todos los aislamientos analizados. Se observaron reducciones moderadas de sensibilidad a IDMs y ISDHs asociadas a mutaciones presentes en los genes de las proteínas objetivo de estas familias.

Por lo tanto, la hipótesis I se rechaza

### ***Hipótesis II***

La variabilidad genética de la población argentina del hongo *Ramularia collo-cygni* es menor que las de poblaciones europeas.

En el capítulo 3 se analizó la variabilidad genética por medios de marcadores moleculares neutros (SSR, microsatélites) de una población argentina de Rcc y se la comparó con dos poblaciones europeas (Escocia y Republica Checa). Los resultados de este estudio mostraron que la población de Rcc argentina analizada tiene una variabilidad menor (probable “cuello de

botella” y menor número de generaciones) en comparación con las europeas. También se observó evidencia de reproducción sexual en todas las poblaciones estudiadas (desequilibrio de ligamiento) con probable alternancia con una estrategia de reproducción asexual. Por lo tanto, esto le proporcionaría la capacidad de adaptarse a las presiones de selección (aplicaciones de fungicidas y/o cultivares resistentes) con relativa rapidez.

Por lo tanto, la hipótesis II no se rechaza

### ***Hipótesis III***

El período de mayor susceptibilidad o protección de la cebada al salpicado necrótico ocurre entre elongación de tallo y aristas visibles en coincidencia con el momento de desarrollo completo de las hojas superiores del canopeo.

En el capítulo 4 se ha determinado el periodo de protección para el control del salpicado necrótico de la cebada con fungicidas de aplicación foliar registrados para Rcc. Este periodo se inicia desde el estadio de tres nudos hasta aristas visibles previo a la aparición de síntomas, postulando como mejor momento el de hoja bandera, cuando el cultivo ya ha definido finalizado su expansión foliar. Se demostró que con la protección del cultivo en este PP con las diversas formulaciones de fungicidas disponibles en el mercado registradas se obtuvieron las máximas eficiencias de control del SNC minimizando las pérdidas de rendimiento y calidad de grano en el cultivo de cebada.

Por lo tanto, la hipótesis III no se rechaza

### ***Hipótesis IV***

El balance hídrico (% agua disponible) del suelo y variables meteorológicas relacionadas están asociadas a la ocurrencia o ausencia de epifitias del salpicado necrótico de la cebada.

De todos los ensayos de determinación del periodo de protección se registraron varias variables meteorológicas y se realizó el balance hídrico del suelo (% de agua disponible) a lo largo de todo el ciclo del cultivo. Basado en la bibliografía y con el objetivo de aportar a futuros modelos de predicción el análisis de correlación de las diferentes variables meteorológicas con los niveles (severidad) del SNC se realizó sobre los estadios desde emergencia o macollaje hasta encañazón. La temperatura media, precipitaciones y duración del mojado de hoja (estimado) acumulados (entre macollaje y fin de encañazón) y número de días con agua disponible > 50% o = 100% (exceso hídrico) se correlacionaron significativamente con los niveles de enfermedad. Por medio de regresiones múltiples y descartando las variables meteorológicas auto-correlacionadas entre sí, se obtuvieron cuatro modelos capaces de predecir la enfermedad. Se observó también que largos periodos (80-120 días) desde macollaje/encañazón con un balance hídrico por debajo del 50% se asociaron con bajos niveles de la enfermedad.

Por lo tanto, la hipótesis IV no se rechaza

### **5.3. PRINCIPALES APORTES AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO**

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron generar los siguientes aportes:

- En esta tesis se estableció el nivel de sensibilidad y presencia de mutaciones asociadas aportando información al monitoreo de plagas resistentes (Proyecto Nacional INTA I086) estableciendo líneas de base para subsiguientes estudios o monitoreos del patógeno estudiado.
- La metodología de placas de microtitulación y espectrofotometría para el análisis de la sensibilidad a fungicidas utilizada en esta tesis es de última generación la cual está siendo y será compartida a nivel local para avanzar en diversas investigaciones en la temática en este y otros patosistemas.
- La evaluación y determinación del gran potencial adaptativo de este patógeno por ende su riesgo sobre la producción, pone en evidencia la necesidad de la inmediata adopción

de estrategias que reduzcan el número de aplicaciones de fungicidas aumentando la diversidad e implementación de variedades de buen comportamiento, además de establecer controles estrictos sobre la introducción de nuevas variedades de cebada al país que puedan traer en la semilla nuevas variantes del patógeno.

- La determinación del periodo de protección para el uso de fungicidas para el control de la enfermedad logrado en esta tesis ha generado un gran impacto tecnológico en la producción de cebada en Argentina donde la adopción ha sido generalizada por la mayoría de los productores y asesores del país.
- La metodología empleada para la determinación del periodo de protección puede ser adaptada a otros patosistemas aportando al diseño de estrategias de protección más eficientes.
- Los modelos preliminares de predicción de la enfermedad propuestos y el nuevo enfoque basado en el balance hídrico aportarán al desarrollo de modelos de predicción de esta enfermedad a nivel local e internacional y al ajuste de estrategias de protección del cultivo.

## **5.4. PERSPECTIVAS**

Numerosos interrogantes, surgidos a partir de los resultados de esta tesis quedan aún por responder. A continuación, se plantean algunos de estos interrogantes que serán abordados:

- Profundizar en el monitoreo de la sensibilidad de las poblaciones de Rcc con mayor número de aislamientos, ocurrencia de mutaciones y eficiencia de control en campo (ensayos de eficiencia de fungicidas dosis-respuesta) con protocolos estandarizados. Esto permitirá un seguimiento detallado de la evolución de las poblaciones con respecto

al manejo químico y medir el impacto de prácticas alternativas a los fungicidas (Bio fungicidas, inductores de defensas, comportamiento varietal entre otras).

- Se avanzará y profundizará en conjunto con otras instituciones y países (SRUC, Escocia e INIA, Uruguay) el desarrollo y estudio de estas variables y otras que aporten a modelos de predicción de la enfermedad para el uso eficiente de fungicidas.
  
- Se pretende avanzar en el rol epidemiológico como fuentes de inóculo de hospedantes alternativos del patógeno (cultivos de cobertura, malezas entre otras) y del rastrojo infestado (de cebada y otros cultivos). Por esto, la generación de información acerca de la dinámica de las esporas de Rcc dispersadas por el viento será de gran importancia. Conocer en detalle el nivel de aporte de estas fuentes de inóculo para el desarrollo de la enfermedad permitirá re-diseñar y/o ajustar estrategias de manejo integradas.
  
- Estudiar en detalle la acción curativa y/o protectora de los diferentes moléculas fungicidas (ingredientes activos) frente a las infecciones por Rcc (inoculación asistida) en condiciones controladas y/o en campo. Eso nos permitirá desarrollar estrategias más efectivas para el control de esta enfermedad y reducir su impacto. Este tipo de estudios aportan a la reducción de agroquímicos utilizados permitiendo ajustes de dosis e ingredientes activos en los formulados disminuyendo el impacto ambiental de esta práctica.

## 6. REFERENCIAS

- Agapow, P.M.; Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol Ecol Notes*, 1:101-102.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Afanasenko, O. S., Havis, N. D., Bepalova, L. A., Ablova, I. B.; Marienko, V. I. 2012. *Ramularia* leaf spot is a new barley disease in Russia. *Plant Protection and Quarantine*:11-13.
- Datos agroindustriales. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina.  
<https://datos.magyp.gob.ar/> consulta: 20 dec 2020 .
- Allen, R.G.; Pereira, L.S.; Raes, D.; Smith, M. 2006. *Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos*. Roma: FAO, 298(0).
- Arduim, F.S.; Reis, E.M.; Barcellos, A.L. and Turra C 2012). In vivo sensitivity reduction of *Puccinia triticina* races, causal agent of wheat leaf rust, to DMI and QoI fungicides. *Summa Phytopathol* 38:306-311. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000400006>
- Arena M, Auteri D, Barmaz S, Bellisai G, Brancato A, Brocca D, Bura L, Byers H, Chiusolo A, Court Marques D, et al 2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil. *EFSA J* 16:5126-5165. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5126>
- Assinger T, Torriani SFF, Accardo S et al 2021). Fungicide strategies and resistance of *Ramularia collo-cygni* to demethylation and succinate dehydrogenase inhibitors in Austrian winter barley (*Hordeum vulgare*). *J. Plant Dis. and Prot* 128:735-748. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00454-x>
- Banke S & McDonald BA 2005). Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Ecology* 14:1881-1896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02536.x>
- Ballesteros, B. C., Rubio, R. G., & Ferrero, J. M. 2015). Efecto de la composición del consejo de administración en las prácticas de responsabilidad social corporativa. *Revista de contabilidad*, 18(1), 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.resar.2014.02.003>
- Barrett, S.C., Colautti, R.I., & Eckert, C.G. 2008). Plant reproductive systems and evolution during biological invasion. *Mol. Ecol.* 17(1), 373-383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03503.x>
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. 2006) *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th Edition, The American

Phytopathological Society, St. Paul Minnesota.

- Bazin E, Mathe-Hubert H, Facon B, Carlier J, Ravigné V. 2014). The effect of mating system on invasiveness: some genetic load may be advantageous when invading new environments. *Biol Invasions* 16:875-886. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0544-6>
- Bednarova, M., Bodejkova, I., Palovcikova, D., Jankovský, L., 2007). The Contemporary Situation of Dothistroma Needle Blight Outbreak in the Czech Republic *Acta Silv. Lign. Hung., Spec. Edition* 17-21.
- Braun, U. 1998. A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic Hyphomycetes). 2:1-493.
- Brent K and Hollomon DW 2007a). *Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it Be Managed?* FRAC Monograph No. 1 (second, revised edition), Fungicide Resistance Action Committee, Brussels.
- Brown JK & Hovmøller M S. 2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 297:537-541. <https://doi.org/10.1126/science.1072678>
- Carmona MA, Carmona M, Moschini RC, Conti HA 1997). Meteorological factors influencing the incidence of barley scald and its spatial distribution over the argentinian pampas region. *J. Plant Pathol* 79:203-209.
- Carmona MA, Scandiani MM, Formento, AN, 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](http://www.aapresid.org.ar) .
- Carmona MA and Barreto D, 2008. Manejo integrado de enfermedades del cultivo de cebada cervecera. *Trigo* 2008. *Revista Aapresid*. 5 pp: 207-215.
- Carmona MA, Sautua F, Pérez-Hernández O, Reis EM 2020). Role of Fungicide Applications on the Integrated Management of Wheat Stripe Rust. *Front. Plant Sci* 11, 733. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00733>
- Carmona MA y Sautua F, 2022). Cebada: se confirmó una multiresistencia de mancha en red. *La nación campo*. 25 de Mayo. <https://www.lanacion.com.ar/economia/campo/agricultura/cebada-se-confirio-una-multiresistencia-de-mancha-en-red-nid25052022/>
- Sautua FJ, Carmona, MA 2023). SDHI resistance in *Pyrenophora teres f teres* and molecular detection of

- novel double mutations in *sdh* genes conferring high resistance. *Pest Management Science* 79(9):3300-3311. <https://doi.org/10.1002/ps.7517>
- Cattáneo M & Cortese F 2021). Cebada: Distribución varietal estimada en Argentina. *Cebada Cervecera*. <https://cebadacervecera.com.ar/cebada-distribucion-varietal-estimada-en-argentina-2021/>
- Cortese F., 2014. Fino manejo para una cebada de calidad. *Horizonte A Digital*. <http://horizonteadigital.com/fino-manejo-para-una-cebada-de-calidad/>
- Cromeey M G, Harvey I C, Sheridan J E, Grbavac N. 2002. Occurrence, importance and control of *Ramularia collo-cygni* in New Zealand. In Meeting the challenges of barley blights. Proceedings of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights, pp. 337-342. Eds A H Yahyaoui, L Brader, A Tekauz, H Wallwork and B Steffenson. Aleppo, Syria: ICARDA.
- Cruz de Carvalho, M. H. 2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
- De la Campa R, Hooker DC, Miller JD, Schaafsma AW, Hammond B.G. 2005. Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia* 159: 539-552. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-2150-3>
- Derpmann J, Mehl A 2019). SDHI crossresistance pattern of *Alternaria solani* field mutants and consequences for early blight control. WUR Special Report of the 17th Euroblight Workshop. Yok UK, 12-15 May, 87-96.
- Doukas EG, Markoglou AN, Vontas JG, Ziogas BN 2012). Effect of DMI-resistance mechanisms on cross-resistance patterns, fitness parameters and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* spore. *Fungal Genet. Biol* 49:92-801. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.07.008>
- Dussart, F., & Jakubczyk, D. 2022). Biosynthesis of Rubellins in *Ramularia collo-cygni* - Genetic Basis and Pathway Proposition. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3475. <https://doi.org/10.3390/ijms23073475>
- Erreguerena I y Quiroz F, 2014. Donde se esconde "la Ramularia"? Implicancia en la epidemiología del Salpicado Necrótico de la cebada. *Visión Rural Año XXI N° 103*: ISSN 0328-7009.
- Erreguerena, IA, Maringolo CA, Montoya MRA, Quiroz FJ 2015). Detección por PCR de *Ramularia collo-cygni* en cebada (*Hordeum vulgare*) y su implementación como técnica de diagnóstico en estadios iniciales del cultivo en lotes de producción de la provincia de Buenos Aires. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, September 2015, Santa Fé, Argentina.

- Erreguerena, I y Quiroz FJ 2016). Impacto de las enfermedades foliares sobre la producción de la cebada: tácticas de protección, criterios de aplicación y estrategias anti-resistencia. Ediciones INTA, 6 pp.
- Erreguerena IA, Quiroz FJ, Gimenez et al., 2017). Red de Protección ante Enfermedades de Cebada 2016-2017. Ediciones INTA, 25 pp.
- Erreguerena IA, Carpaneto B, Couretot L, Faberi AJ, González G, Melion D, Montoya MRA, Moreyra F, Samoiloff A, Storm A, 2021. Red de protección de cebada cervecera - campaña 2020-21. Ediciones INTA, 25 pp. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9436>
- Erreguerena IA, Carmona MA 2021). Manejo integrado de enfermedades en cebada y evaluación de fungicidas para el control de *Ramularia collo-cygni*. 5to Congreso Argentino de Fitopatología y 59th International meeting APS, Septiembre.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro J 1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Farengo J., Erreguerena IA, Quiroz FJ., 2015) Estrategias de protección química de la cebada ante enfermedades foliares. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santa Fe, 7 al 9 de octubre, 2015.
- Fontaine J and Fraaije BA 2009). Development of QoI resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni*. Asp. Appl. Biol 92:123-126.
- Fraaije BA, Bayon C, Atkins S, Cools HJ, Lucas JA, Fraaije MW 2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. Mol. Plant Pathol 13:263-275. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>
- FRAC. 2010). Recommendations for fungicide mixtures designed to delay resistance evolution. Disponible en: [www.frac.info](http://www.frac.info)
- FRAC. 2014c. Minutes of 2013 SDHI meeting. Recommendations for 2014. Accessed: Apr/2014c. Disponible en: <http://www.frac.info/work/Minutes%20of%20the%202013%20SDHI%20Meeting,%20Recommendations%20for%202014.pdf>
- FRAC, 2014f. Minutes of 2012 SDHI meeting. Recommendations for 2013. Consulta: Feb/2018. Disponible en: <http://www.frac.info/work/Minutes%20of%20the%202012%20SDHI%20Meeting,%20Recommendations%20for%202013.pdf>

- FRAC, 2015. Protocol of the discussions and use recommendations of the SDHI Working Group. Consulta: Feb/2018 Disponible en: [https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2015-sdhi-meeting-recommendations-for-2016.pdf?sfvrsn=47d4a9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2015-sdhi-meeting-recommendations-for-2016.pdf?sfvrsn=47d4a9a_2)
- FRAC, 2017. Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI) Working Group, Published minutes of the 2017 annual meeting. Consulta: Feb/2018. Disponible en: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/sbi-fungicides/recommendations-for-sbi>
- FRAC, 2019. SDHI working group. Consulta: Junio 2020. Disponible en: <http://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides>
- Frei, P. and Gindrat, D. 2000. Le champignon *Ramularia collo-cygni* provoque une forme de grillures sur les feuilles d'orge d'automne et de graminées adventices. Rev. Suisse Agric. 32:229-233.
- Friedt W, Horsley RD, Harvey BL, Poulsen DME, Lance RCM, Ceccarelli S, Grando S, Capettini F (2010). Barley Breeding. History, Progress, Objectives, and Technology. Ullrich, S.E., Ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 160-222. <https://doi.org/10.1002/9780470958636.ch8>
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu ZH, Meinhardt S, Ling H, et al. 2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. Nat Genet 38: 953-956. <https://doi.org/10.1038/ng1839>
- Gerlach G, Jueterbock, A, Kraemer P, Deppermann J and Harmand P, 2010. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics!. Mol Ecol 19:3845-3852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04784.x>
- Gladieux P, Feurtey A, Hood ME, Snirc A, et al. 2015). The population biology of fungal invasions. Mol Ecol 24:1969-1986. <https://doi.org/10.1111/mec.13028>
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. Journal of Heredity, 86, 485-486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Goudet, J., 2002. Fstat Vision (1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. Journal of Heredity, 86, 485-486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Greif P. 2002. Importance of *Ramularia collo-cygni* for barley growers and breeders. In Meeting the challenges of barley blights. Proceedings of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights, pp. 331-336. Eds A H Yahyaoui, L Brader, A Tekauz, H Wallwork and B Steffenson. Aleppo, Syria: ICARDA.

- Grimmer MK, van den Bosch F, Powers SJ, Paveley ND (2015). Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Manag. Sci.* 71:207-215. <https://doi.org/10.1002/ps.3781>
- Grünwald NJ., Goodwin SB., Milgroom MG., Fry WE. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>
- Grünwald NJ & Goss EM, 2011. Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: novel tools and approaches. *Annu Rev Phytopathol* 49:249-267. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095246>
- Gubis, J., Hudcovicova, M., and Klcova, L. (2008). First report of *Ramularia collo-cygni* in Slovakia. *J. Plant Pathol.* 90:149.
- Gurung S, Goodwin SB, Kabbage M, Bockus WW and Adhikari TB. 2011. Genetic differentiation at microsatellite loci among populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology*, 101: 1251-1259. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0212>
- Gurung S, Short D and Adhikari T. (2013). Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Gen. and Biol.*, 52: 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.003>
- Havis ND, Gorniak K, Stanisz-Migal JM, Creissen H, Burnett FJ (2020). Controlling ramularia leaf spot post chlorothalonil. The Dundee Conference, Crop Production in Northern Britain, Dundee, UK, 25-26 February pp.87-92 ref.12.
- Havis ND, Gorniak K, Taylor J, Stanisz-Migal M, Burnett FJ (2018) Controlling Ramularia leaf spot in barley crops. In. Dundee: The Association for Crop Protection in Northern, Britain, 91-96.
- Havis ND, Brown JK, Clemente G, Frei P, Jedryczka M, Kaczmarek J, Kaczmarek M, Matusinsky P, McGrann GR, Pereyra S, Piotrowska M, Sghyer H, Tellier A, Hess M (2015). *Ramularia collo-cygni* an emerging pathogen of barley crops. *Phytopathol* 105:895-904. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI>
- Havis ND, Gorniak K, Carmona MA, Formento AN, Luque AG, Scandiani MM (2014a). First molecular detection of Ramularia leaf spot (*Ramularia collo-cygni*) in seeds and leaves of barley in Argentina. *Plant Dis* 98, 277. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0416-PDN>

- Havis, N. D., Oxley, S. J. P., Burnett, F., and Hughes, G. 2012. Epidemiology of *Ramularia collo-cygni*. Proc.Crop Protection in Northern Britain: 119-124.
- Havis, N. D., Paterson, L., Taylor, J. M. G., and Walters, D. R., 2009b. Use of Resistance Elicitors to control *Ramularia collo-cygni* in spring barley. Asp. Appl. Biol. 92:127-132.
- Havis, N. D.; Oxley, S. J. P, 2008. Spread of *Ramularia collo-cygni*. The Dundee Conference. Crop Protection in Northern Britain, 2008, Dundee, UK, 2627 February 2008 pp. 127-132.
- Havis, N.D., Oxley, S. J. P., Piper, S. R., y Langrell, S. R. H. 2006. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. FEMS microbiology letters, 256(2), 217-223. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00121.x>
- Heick TM, Justesen AF, Jørgensen LN (2017). Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region - a status. Eur. J. Plant Pathol 149:669-682. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1216-7>
- Hess, M., Habecker, R., Kick, M., Martin, M., and Hausladen, H. 2007. Occurrence of the late leaf spot complex of barley and its consequences on optimized disease control. Gesunde Pflanzen 59:47-54. <https://doi.org/10.1007/s10343-007-0140-8>
- Hess, M., Weigand, S., and Hausladen, H. 2009. Studying the epidemics of *Ramularia collo-cygni* in Germany and Austria with different diagnostic tools; development of field diagnostics and implications for integrated disease control. Asp. Appl. Biol. 92:9-16.
- HGCA, 2014. Consulta en línea: 01/2/2019 [<http://www.hgca.com/crop-management/disease-management/fungicide-performance/fungicide-performance-in-barley.aspx>].
- Hoheneder F, Hofer K., Groth J et al (2021). *Ramularia* leaf spot disease of barley is highly host genotype-dependent and suppressed by continuous drought stress in the field. J Plant Dis Prot 128:749-767. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00420-z>
- Holtz M, Kumar K, Zantinge J and Xi K. 2014. Genetic diversity of *Puccinia striiformis* from cereals in Alberta, Canada. Plant Pathology, 63: 415-424. <https://doi.org/10.1111/ppa.12094>
- Hooker D.C., Schaafsma A.W., Tamburinc-Illincic L. 2002. Using weather variables pre and post-heading to predicting deoxinivalenol content in winter wheat. Plant Disease 86:611-619. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.611>
- Hjortshøj, R. L., Ravnsbøj, A. R., Nyman, M., Orabi, J., Backes, G., Pinnschmidt, H., Stukenbrock, E. H., (2013). High levels of genetic and genotypic diversity in field populations of the barley pathogen

*Ramularia collo-cygni*. Eur J of Plant Pathol., 136(1), 51-60. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0137-8>

Hron R, Oberforster M. 1990). Winter und Sommergetreide: Sortenbehandlungsversuche 1989 und mehrjährige Zusammenfassung. 43 pp. Wien: Versuchsergebnisse der Bundesanstalt für Pflanzenbau.

Hsiang T, Yang L, Barton W 1997). Baseline sensitivity and cross-resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. Eur. J. Plant Pathol 103:409-416. <https://doi.org/10.1023/A:1008671321231>

Huss H 2004). The biology of *Ramularia collo-cygni*. In: Yahyaoui AH, Brader L, Tekauz A, Wallwork H, Steffenson B. Meeting the Challenges of Barley Blights. Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights, (ICARDA), Aleppo, Syria, 321-8.

Iacobucci D 1995). Analysis of variance of unbalanced data. American Marketing Association, 337-343, 7pp.

Ishii H, Miyamoto T, Ushiod S, Kakishimab M 2010). Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora casiiicola* and *Podosphaera xanthii*. Pest Manag. Sci 67:474-482. <https://doi.org/10.1002/ps.2092>

Jombart T, Devillard S, Balloux F 2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genet 11:1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>

Jost L 2008). GST and its relatives do not measure differentiation. Mol Ecol. 17:4015-4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>

Jost L 2009). Reply: D vs G'ST: response to Heller and Siegismund 2009) and Ryman and Leimar 2009). Mol Ecol, 18:2088-2091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04186.x>

Kaczmarek M, Fountaine JM, Newton AC, Read ND, and Havis, ND 2013). The life history of *Ramularia collo-cygni*. In: 27th Fungal Genet. Conference, Asilomar, CA.

Kaczmarek, M., Piotrowska, M. J., Fountaine, J. M., Gorniak, K., McGrann, G. R. D., Armstrong, A., ... & Havis, N. D. 2017). Infection strategy of *Ramularia collo-cygni* and development of ramularia leaf spot on barley and alternative graminaceous hosts. Plant Pathol 66:45-55. <https://doi.org/10.1111/ppa.12552>

Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ 2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations

- with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ, 2. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Khier M, Carmona MA, Sachs E, Delhey R, Frayssinet S, Barreto D (2002). Salpicado necrótico, nueva enfermedad de la cebada en Argentina causada por *Ramularia collo-cygni*. Resúmenes XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas 26 al 29 de junio de 2002, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 47.
- Kildea S (2019). Managing cereal foliar diseases post chlorothalonil. Irish Farmer Journal Crops & Spreaders Supplement. Teagasc Publications, pp 2.
- Kolar CS & Lodge DM (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. Trends Ecol Evol 16:199-204. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02101-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02101-2)
- Koric B, Tomic Z, Simala, M, y Milek, M (2009). Ramularia leaf spot on barley in the Republic of Croatia. Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo: 273-279.
- Kuck KH, Russell PE. (2006). FRAC: Combined resistance risk assessment. Aspects of App. Biol., 78: 3-10.
- Leisova-Svobodova L, Matusinsky P and Kucera L. (2012). Variability of the *Ramularia collo-cygni* population in Central Europe. J. of Phytopathol., 160: 701-709. <https://doi.org/10.1111/jph.12017>
- Leisova-Svobodova L, Hanzalova A, Kucera L (2010). Expansion and variability of the Ptr Tox a gene in populations of *Pyrenophora tritici-repentis* and *Pyrenophora teres* . J Plant Pathol 92: 729-735. <https://www.jstor.org/stable/41998863>
- Leslie JF and Summerell BA (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ames, IA p. 12-13. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Ludwig JA., Reynolds JF. (1988). Statistical ecology: A primer in methods and computing. Wiley.com.
- Madden, L. V., Hughes, G., & Van Den Bosch, F. (2007). The study of plant disease epidemics. The American Phytopathology Society.
- Mair W, Lopez-Ruiz F, Stammler G, Clark W, Burnett F, Hollomon D, Ishii H, Thind TS, Brown JK, Fraaije B, Cools H, Shaw M, Fillinger S, Walker AS, Mellado E, Schnabel G, Mehl A, Oliver RP (2016). Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. Pest Manag. Sci 72:1449-1459. <https://doi.org/10.1002/ps.4301>
- Matusinsky P, Leisova-Svobodova L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V,

- Vysohliđova M, Spitzer T 2010). Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. J. Plant Dis. and Prot. 117:248-252. <https://doi.org/10.1007/BF03356369>
- Matusinsky, P., Leisova-Svobodova, L., Gubis, J., Hudcovicova, M., Klcova, L., Gubisova, M., ... & Minarikova, V. 2011). Impact of the seed-borne stage of *Ramularia collo-cygni* in barley seed. J. of Plant Pathol., 679-689. <https://www.jstor.org/stable/41999044>
- McDonald BA, Linde C. 2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Ann Rev of Phytopath, 40: 349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McDonald BA, Zhan J and Burdon JJ. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. Phytopathology, 89: 639-645. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.8.639>
- McGrann GRD and Havis ND 2017). Ramularia leaf spot: A newly important threat to barley production. Outlooks Pest Manag 28:65-69. [https://doi.org/10.1564/v28\\_apr\\_05](https://doi.org/10.1564/v28_apr_05)
- 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. Ann. Bot, 121, 415-430. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx170>
- Meng YH, Lan YB, Mei GY, Guo YW, Song JL, Wang ZG 2018). Effect of aerial spray adjuvant applying on the efficiency of small unmanned aerial vehicle for wheat aphids control. Int J Agric & Biol Eng, 11(5): 46-53. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20181105.4298>
- Miralles D J; Abeledo GL; Benech -Arnold R 2011). Cebada Cervecera. Editorial Facultad de Agronomía (EFA), Buenos Aires pp 284.
- Moreno MV., Mammaní E, Baldessari J y Etchart V. 2015). Determinación de muestra mínima para diversidad genética en maní. XXX Jornada Nacional de Maní" General Cabrera, Córdoba, Argentina. [http://www.ciacabrera.com.ar/jornada\\_del\\_maní/30\\_jornada\\_del\\_maní.html](http://www.ciacabrera.com.ar/jornada_del_maní/30_jornada_del_maní.html)
- Moreyra F, Erreguerena IA, Couretot L, Cattáneo M, Gonzalez G, Samoiloff A, Conti V, Carpaneto B, Vallati, Gonzalez A, Gil A, Giménez, F 2020). Perfiles sanitarios de cultivares de cebada cervecera utilizados en Argentina. Ediciones INTA.
- Moschini RC, Martínez M.I., Sepulcri MG 2013). Sistemas de pronóstico de enfermedades. Capítulo XXI Pag. 409-441. En "Agrometeorología". Editores: Guillermo M. Murphy y Rafael H. Hurtado. Segunda Edición Agosto.
- Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas->

[sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal](#) . accessed 15 March 2021.

- Nei, M. 1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, (893), 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Newcombe, G., & Thomas, P. L. 1991). Incidence of carboxin resistance in *Ustilago nuda*. *Phytopathol.*, 81(3), 247-250. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-247>
- Newton AC, Hackett CA, Lowe, R & Wale SJ. 2004). Relationship between canopy reflectance and yield loss due to disease in barley. *Ann. of App. Biol.*, 145(1), 95-106. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00364.x>
- Newton AC, Fitt BD, Atkins SD, Walters DR., y Daniell, TJ. 2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol.* 18:365-373. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.002>
- Oxley S J P. 2007). *Barley Disease Control*, TN583. Edinburgh: Scottish Agricultural College. [www.sac.ac.uk/consultancy/crops/publications/cropstechnotes/](http://www.sac.ac.uk/consultancy/crops/publications/cropstechnotes/)
- Oxley SJP, Havis ND 2010). Managing *Ramularia collo-cygni* through varietal resistance, seed health and forecasting. Project report No. 463, HGCA, Kenilworth, UK.
- Palacios C 2018). Informe sanidad de cultivos de invierno. Agosto 2018. Sanidad Vegetal SIEF y Palacio Lab.
- Paveley ND, Lockley D, Vaughan TB, Thomas J and Schmidt K. 2000). Predicting effective fungicide doses through observation of leaf emergence *Plant Pathology*, 49: 748-766. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00518.x>
- Peraldi, A., Griffe, L.L., Burt, C., McGrann, G. R. D., y Nicholson P. 2014). *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.* 63:544-562. <https://doi.org/10.1111/ppa.12114>
- Pereyra S, 2013). Herramientas disponibles para el manejo de dos enfermedades relevantes de la pasada zafra: Fusariosis de la espiga en trigo y *Ramularia* en cebada. *Actividades de Difusión INIA* 720:33-41.
- Pereyra, S. A.; Viera, J. P.; Havis, N. 2014). Managing *Ramularia* leaf spot of barley in Uruguay. *Proceedings of the 2014 APS-CPS Joint Meeting*, S274.

- Phelan S, Barthe MS, Tobie C, Kildea S (2017). Detection of the cytochrome b mutation G143A in Irish *Rhynchosporium commune* population using targeted 454 sequencing. *Pest Manag. Sci* 73:1154-1160. <https://doi.org/10.1002/ps.4434>
- Pielou EC. 1975. *Ecological diversity*. Wiley New York.
- Piotrowska M., Burnett F., Fountaine J., Hoebe P., Ennos R. and Ranner D., (2011). Characterization of mutations in the succinate dehydrogenase gene for potential fungicide resistance in *Ramularia collo-cygni* (B7). In: 4th International Workshop on barley leaf blights, Dundee, Scotland, Junio 27-29, 2011.
- Piotrowska M, Burnett F, Hoebe P., Ennos R. Fountaine J., (2013). Estimation of genetic diversity of *Ramularia collo-cygni* populations using SSR markers to infer its potential to adapt to environment change. 27th Fungal Genetics Conference, Asimolar, CA, USA 12th-17th March 2013.
- Piotrowska, M. (2014). Evaluating the risk of fungicide resistance evolution to succinate dehydrogenase inhibitors in *Ramularia collo-cygni*. PhD thesis, University of Edinburgh.
- Piotrowska MJ, Ennos RA, Fountaine, JM, Burnett FJ, Kaczmarek, M, Hoebe, PN (2016). Development and use of microsatellite markers to study diversity, reproduction and population genetic structure of the cereal pathogen *Ramularia collo-cygni*. *Fungal Genet. Biol* 87:64-71. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.007>
- Piotrowska MJ, Fountaine JM, Ennos RA, Kaczmarek M, Burnett FJ (2017). Characterisation of *Ramularia collo-cygni* laboratory mutants resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Pest Manag. Sci* 73:1187-1196. <https://doi.org/10.1002/ps.4442>
- Pinnschmidt, H., & Jørgensen, L. N. (2009). Yield effects of *Ramularia* leaf spot on spring barley. *Asp. of App. Biol.*, 92: 57-66.
- Platz P. 2021. Efecto del uso de boquillas de aire inducido y adyuvante sobre la calidad de aplicación y deriva de fitosanitarios. Mg Thesis. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata.
- Price CL, Warrilow AGS, Parker JE, Mullins JGL, Nes WD, Kelly DE, Kelly SL (2015). Novel substrate specificity and temperature-sensitive activity of *Mycosphaerella graminicola* CYP51 supported by the native NADPH cytochrome P450 reductase. *Appl. Environ. Microbiol* 81:3379-3386. <https://doi.org/10.1128/AEM.03965-14>
- Pritchard JK., Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype

- data. *Genetics* 155:945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Razavi M, Hughes GR. 2004). Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome*, 47: 789-794. <https://doi.org/10.1139/g04-036>
- Rehfus A, Miessner S, Achenbach J, Strobel D, Bryson R, Stammler G 2016). Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenophora teres* in Europe. *Pest. Manag. Sci* 72, 1977-1988. <https://doi.org/10.1002/ps.4244>
- Rehfus A, Strobel D, Bryson B, Stammler G 2018). Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. *Plant. Pathol.* 67:175-180. <https://doi.org/10.1111/ppa.12715>
- Rehfus A, Matusinsky P, Strobel D, et al 2019). Mutations in target genes of succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors in *Ramularia collo-cygni* in Europe. *J Plant Dis and Prot* 126:447-459. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00246-4>
- Reis EM, Dias Guerra W, Camargo Reis A, Zanatta M, Carmona MA, Sautua F 2021). Fungi resistance to multisite fungicides. *J Agr. Sci* 13:141-152. <https://doi.org/10.5539/jas.v13n11p141>
- Rowlandson, T., Gleason, M., Sentelhas, P., Gillespie, T., Thomas, C., & Hornbuckle, B. 2015). Reconsidering leaf wetness duration determination for plant disease management. *Plant Disease*, 99(3), 310-319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0529-FE>
- Russell PE 2004). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC monograph 3. Crop Life International, Brussels, p 56.
- Saari EE, Prescott JM 1975). A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. *Plant Dis Reporter*. 59:377-380.
- Salamati S, Reitan L 2006). *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. In: Koopman B, Oxley S, Schützendübel A, von Tiedemann A, eds. Proceedings of the First European Ramularia Workshop, Georg-August University Gottingen, Germany, 19-35.
- Sautua FJ, Carmona MA 2021). Detection and characterization of QoI resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* populations causing tan spot of wheat in Argentina. *Plant Pathol* 00:1-12. <https://doi.org/10.1111/ppa.13436>
- Schilder AM, Bergstrom GC 1992). In: Francl LJ, Krupinsky JM, McMullen MP, editors. The dispersal of

- conidia and ascospores of *Pyrenophora tritici-repentis*. Proceedings of 2nd Tan Spot Workshop; Fargo. pp. 96-99.
- Schützendübel, A., Stadler, M., Wallner, D., y von Tiedemann, A. 2008). A hypothesis on physiological alterations during plant ontogenesis governing susceptibility of winter barley to *Ramularia* leaf spot. *Plant Pathol.* 57:518-526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01820.x>
- Seem, R. C. 1984). Disease incidence and severity relationships. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 133-150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001025>
- Sentelhas, P. C., Dalla Marta, A., Orlandini, S., Santos, E. A., Gillespie, T. J., & Gleason, M. L. 2008). Suitability of relative humidity as an estimator of leaf wetness duration. *Agricultural and forest meteorology*, 148(3), 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2007.09.011>
- Shannon, C.E 2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5:3-55. <https://doi.org/10.1145/584091.584093>
- Sierotzki H, Frey R, Morchoisne M, Olaya G, Mösch M, Scalliet G 2011). Sensitivity of fungal pathogens to SDHI fungicides. In: Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H (eds) *Modern fungicides and antifungal compounds*, DPG, Braunschweig, VI, 179-186.
- Simpson EH, 1949). Measurement of diversity. *Nature* 163:688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J 1998). A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 34:393-398. <https://doi.org/10.1007/s002940050412>
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural. *Science*, 236: 787-792. <https://doi.org/10.1126/science.3576198>
- Sooväli, P., Tikhonova, M., y Matušinsky, P. 2014. First report of *Ramularia* leaf spot caused by *Ramularia collo-cygni* on leaves and seeds of barley in Estonia. *Plant Dis.* 98:997. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1035-PDN>
- Spencer M, Havis ND, Creissen HE 2019). *Ramularia* detection dates by country. Zenodo. [www.zenodo.org/record/3375540#.YiYu8-rMLIU](http://www.zenodo.org/record/3375540#.YiYu8-rMLIU)
- Stam R, Münsterkötter M, Pophaly SD, Fokkens L, Sghyer H, Güldener U, Hückelhoven R, Hess, M 2018). A new reference genome shows the one-speed genome structure of the barley pathogen *Ramularia collo-cygni*. *Genome Biol. Evol* 12:3243-3249. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy240>

- Stam R, Sghyer H, Tellier A, Hess M & 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0117-R>
- Stammler G, Glättli A, Koch A, Schlehuber S 2010). Mutations in the target protein conferring resistance to SDHI fungicides. In: Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck K-H, Russell PE, Lyr H (eds) *Modern fungicides and antifungal compounds*, DPG. Braunschweig, Germany, VI, 195-198.
- Stammler G, Wolf A, Glättli A, Klappach K 2015). Respiration inhibitors: complex II. In: Ishii, H. and Hollomon, D.W. (eds). *Fungicide resistance in plant pathogens. Principles and a guide to practical management*, Springer, Tokyo, pp 105-117. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_8)
- Stukenbrock, E.H.; Banke S., Javan-Nikkhah M, McDonald BA 2007). Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Mol Biol Evol* 24: 398-411. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl169>
- Stewart, S. 2001. Manchado necrótico en cebada. *Actividades Difusion INIA*, 254:47-49.
- Stubbs, R.W; Prescott, J.M.; Saari, E.E; Dubin, H.J. 1986. *Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales*. CIMMYT. pp: 1-46.
- Subba Rao, K.V.; Berggren, G.T.; Snow, J.P. 1990. Characterization of wheat leaf rust epidemics in Louisiana. *Phytopathology* 80:402-410. <https://doi.org/10.1094/Phyto-80-402>
- Taylor, R. 1990. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6:35-39. <https://doi.org/10.1177/875647939000600106>
- Taylor, R.J.; Salas, B.; Secor, G.A.; Rivera, V.; Gudmestad, N.C. 2002. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (Metalaxyl). *Plant Disease*. 86(7), 797-802. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.797>
- Taylor, J.M.G.; Paterson L.; Havis, N.D. 2010. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). *Letters in Applied Microbiology*, 50:493-499. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02826.x>
- Templeton, A.R. 2008. The reality and importance of founder speciation in evolution. *Bioessays* 30:470-9. <https://doi.org/10.1002/bies.20745>
- Thirugnanasambandam, A.; Wright, K.M.; Havis, N.D.; Whisson, S.C.; Newton A.C. 2011. Agrobacterium-mediated transformation of the barley pathogen *Ramularia collo-cygni* with

- fluorescent marker tags and live tissue imaging of infection development. *Plant Pathology*, 60:929-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02440.x>
- Tiwari, P.; Bae, H. 2020. Horizontal Gene Transfer and Endophytes: An Implication for the Acquisition of Novel Traits. *Plants*, 9, 305. <https://doi.org/10.3390/plants9030305>
- van Den Bosch, F.; Paveley, N.; Shaw, M.; Hobbelen, P.; Oliver, R. 2011. The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose?. *Plant Pathology*, 60:597-606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>
- van den Bosch, F.; Oliver, R.; van den Berg, F.; Paveley, N. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual review of phytopathology*, 52, 175-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>
- Wallen, R.M., Perlin, M;H. 2018. An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 9:503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00503>
- Walters, D. R., Havis, N. D., and Oxley, S. J. P. 2008. *Ramularia collo-cygni*: The biology of an emerging pathogen of barley. *FEMS Microbiology Letters*, 279:1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x>
- Walters, D. R.; Avrova, A.; Bingham, I. J.; Burnett, F.J.; Fountaine, J.; Havis, N.D., ... & Newton, A. C. 2012. Control of foliar diseases in barley: towards an integrated approach. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 33-73. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9948-x>
- Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Zadoks, J. C.; Chang, T.T.; Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14(6), 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zajic, J.E.; Supplisson, B. 1972. Emulsification and degradation of "Bunker C" fuel oil by microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 1972) May;14(3):331-43. <https://doi.org/10.1002/bit.260140306>
- Zamani-Noor, N. 2011. *Studies on Ramularia Leaf Spots on Barley - Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity*. Göttingen: Georg-August-University, 2011. (Tesis Doctoral).139p.

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1

| Aislamiento | Ubicación                    | Región <sup>1</sup> | Año  | Variedad | G143A<br>( <i>cytb</i> ) | Y403C<br>( <i>cyp51</i> ) | Y403S<br>( <i>cyp51</i> ) | G404D<br>( <i>cyp51</i> ) | H266L<br>( <i>sdh</i> ) | N87S<br>( <i>sdh</i> ) | AZX   | CLT   | PRO   | EPOX  | FLUX  | ISO    |
|-------------|------------------------------|---------------------|------|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1           | 37°50'09.7"S<br>58°41'44.6"W | Sur                 | 2015 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,145 | 0,097 | 0,030 | 0,191 | 0,060 | 0,022  |
| 2           | 37°31'45.4"S<br>58°49'51.8"W | Sur                 | 2015 | Scarlett |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,666 | 0,052 | 0,020 | 0,096 | 0,074 | 0,002  |
| 3           | 38°16'49.2"S<br>58°34'50.3"W | Sur                 | 2015 | Shakira  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,150 | 0,06  | 0,050 | 0,353 | 0,020 | 0,045  |
| 4           | 38°31'59.6"S<br>58°48'01.0"W | Norte               | 2015 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,327 | 0,06  | 0,030 | 0,125 | 0,052 | 0,020  |
| 5           | 38°30'11.1"S<br>59°44'28.7"W | Norte               | 2015 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,927 | 0,05  | 0,100 | 0,102 | 0,044 | 0,003  |
| 6           | 38°02'15.1"S<br>60°08'09.1"W | Norte               | 2015 | Traveler |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,870 | 0,05  | 0,070 | 0,090 | 0,030 | 0,025  |
| 7           | 38°32'06.1"S<br>58°40'24.9"W | Sur                 | 2015 | Shakira  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,533 | 0,15  | 0,050 | 0,394 | 0,045 | 0,020  |
| 8           | 38°00'31.0"S<br>57°44'26.4"W | Sur                 | 2015 | Explorer |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,033 | 0,09  | 0,030 | 0,169 | 0,039 | 0,017  |
| 9           | 37°54'42.8"S<br>61°28'24.4"W | Sur                 | 2012 | Scarlett |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 7,100 | 0,20  | 0,030 | 0,084 | 0,038 | 0,008  |
| 10          | 38°24'46.4"S<br>61°20'29.7"W | Sur                 | 2012 | Scarlett |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 2,15  | 0,12  | 0,050 | 0,050 | 0,035 | 0,025  |
| 11          | 35°10'23.0"S<br>60°36'59.4"W | Norte               | 2017 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,49  | 0,15  | 0,040 | 0,434 | 0,046 | 0,042  |
| 12          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"W | Sur                 | 2017 | Aliciana |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,103 | 0,057 | 0,140 | 0,314 | 0,032 | 0,042  |
| 13          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"W | Sur                 | 2017 | Shakira  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 3,049 | 0,053 | 0,120 | 0,101 | 0,047 | 0,036  |
| 14          | 33°58'12.9"S<br>60°42'42.7"W | Norte               | 2017 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,208 | 0,058 | 0,170 | 0,223 | 0,022 | 0,008  |
| 15          | 37°37'35.5"S<br>58°30'18.4"W | Sur                 | 2017 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,39  | 0,061 | 0,160 | 0,074 | 0,819 | 0,131  |
| 16          | 37°47'52.9"S<br>59°50'56.4"W | Norte               | 2017 | Overture |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,89  | 0,077 | 0,060 | 0,054 | 0,022 | 0,035  |
| 17          | 38°24'49.8"S<br>60°12'33.4"W | Norte               | 2015 | Shakira  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,12  | 0,051 | 0,020 | 0,309 | 0,051 | 0,152  |
| 18          | 38°11'48.4"S<br>58°13'11.1"W | Sur                 | 2017 | Aliciana |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,59  | 0,028 | 0,015 | 0,189 | 0,031 | 0,007  |
| 19          | 33°59'18.5"S<br>60°27'13.3"W | Norte               | 2017 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 4,13  | 0,061 | 0,043 | 0,183 | 0,037 | 0,0001 |
| 20          | 37°34'15.7"S<br>58°32'27.0"W | Sur                 | 2017 | Andreia  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 0,24  | 0,025 | 0,042 | 0,228 | 0,062 | 0,142  |
| 21          | 37°59'56.4"S<br>58°57'05.4"W | Sur                 | 2017 | Shakira  |                          |                           |                           |                           |                         |                        | 1,20  | 0,305 | 0,045 | 7,746 | 0,317 | 1,441  |

Tabla suplementaria 1. Lista y características de aislamientos fúngicos utilizados en este estudio: ubicación, variedad, región, año, mutación/es presentes en sus genes *cytb*, *cyp51* y *sdh*, y valores de *CE50* (concentración inhibitoria del

50%, mg L<sup>-1</sup>) para seis fungicidas (AZX: azoxistrobina, CLT: clorotalonil, PRO: prothioconazole-destio, EPOX: epxiconazole, FLUX: fluxapiraxad e ISO: isopyrazam). <sup>1</sup>Provincia Buenos Aires. Las celdas grises indican presencia de mutación (Capítulo 2).

| Gen Objetivo | Nombre del cebador | Secuencia                  | Referencia               |
|--------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Cytb</i>  | RCCcytoB           | GGATGATTAATACGTTACTTACACTC | Matusinsky et al. (2010) |
|              | RCCcytoB           | GTTACCTGATCCTGCGCTGT       |                          |
| <i>SdhB</i>  | SdhB_Rcc_Final_F   | CAAATCACACACCATCCAGT       | Piotrowska et al, 2017   |
|              | SdhB_Rcc_Final_R   | CCAGCCCTCTTTACATCCTC       |                          |
| <i>SdhC</i>  | SdhC_Rcc_Final_F   | CACTCCAGCAAACCACGACC       | Piotrowska et al, 2017   |
|              | SdhC_Rcc_Final_R   | TAAAGCAGTTCTGTTGCTCT       |                          |
| <i>Cyp51</i> | KES2230            | CCTCCCTCCAACCATCCATTCC     | Rehfus et al, 2019       |
|              | KES2231            | ATCGCGGAGTGCATAAAAT        |                          |

Tabla suplementaria 2. Cebadores (primers) de PCR utilizados para la amplificación de los genes de las proteínas objetivo de los fungicidas (Capítulo 2).

## APENDICE 2

| Nombre del loci SSR | Nombre de los cebadores | Secuencias 5'---3'     | Tipo de SSR          | Tamaño (pb) del producto amplificado estimado (según aislamientos modelo) |
|---------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| SSR1                | PentaSSR_1_223nt_F1     | GCGTCAAACACTGACGAATGAG | (GGCAT) <sub>5</sub> | 223                                                                       |
|                     | PentaSSR_1_223nt_R1     | ACATCCTTCCAAACACCAGC   |                      |                                                                           |
| SSR2                | PentaSSR_2_233nt_F1     | CTCATGTTGCAGAGAGCGAG   | (CTTCA) <sub>5</sub> | 233                                                                       |
|                     | PentaSSR_2_233nt_R1     | AATTTCCGACGTGGATTGAG   |                      |                                                                           |
| SSR3                | PentaSSR_3_253nt_F1     | TAGGACAGGAAGACCCGAGA   | (GACAG) <sub>6</sub> | 253                                                                       |
|                     | PentaSSR_3_253nt_R1     | ACCTCGACACCTGAACCTTG   |                      |                                                                           |
| SSR4                | PentaSSR_4_266nt_F1     | AGGAGATTAGGGATGCGGTT   | (GTCCT) <sub>5</sub> | 266                                                                       |
|                     | PentaSSR_4_266nt_R1     | TAAATCCATCGAGCCCGTAG   |                      |                                                                           |
| SSR5                | PentaSSR_5_243nt_F1     | ATCAACACATCGCGATCAAA   | (CAGCA) <sub>5</sub> | 243                                                                       |
|                     | PentaSSR_5_243nt_R1     | GACAATTGCGGAGTTCCATT   |                      |                                                                           |

|       |                      |                      |                      |     |
|-------|----------------------|----------------------|----------------------|-----|
| SSR6  | PentaSSR_6_202nt_F1  | CTAGGAGAAGAGTGCCGTGG | (CACAG) <sub>5</sub> | 202 |
|       | PentaSSR_6_202nt_R1  | AACACGACGACGATTGTGAA |                      |     |
| SSR7  | PentaSSR_7_171nt_F1  | GTCCACACATTGACCGAGTG | (GGTGT) <sub>5</sub> | 171 |
|       | PentaSSR_7_171nt_R1  | GGTTTCGCCTGATCTACTGA |                      |     |
| SSR8  | PentaSSR_8_131nt_F1  | AGATCGCAAAGGATGGATTG | (GGAAG) <sub>5</sub> | 131 |
|       | PentaSSR_8_131nt_R1  | ATTCATTGCACGTTGGTTGA |                      |     |
| SSR11 | PentaSSR_11_213nt_F1 | TATTCCACACAACGCTCCAA | (CCTTA) <sub>5</sub> | 213 |
|       | PentaSSR_11_213nt_R1 | ATCTCACGCCTCAACGATTC |                      |     |
| SSR12 | PentaSSR_12_292nt_F1 | ATCAGATCAGCTCCATTGCC | (ATCCA) <sub>8</sub> | 292 |
|       | PentaSSR_12_292nt_R1 | GGTCGGCGATGACATTACTT |                      |     |
| -     | M13_For_(-20)_FAM    | ACTGTAAAACGACGGCCAGT | -                    | -   |

Tabla suplementaria 3. Listado de cebadores para amplificar los loci SSR (secuencias simples repetidas) en las poblaciones de *Ramularia collo-cygni* (Capítulo 3).

### APENDICE 3

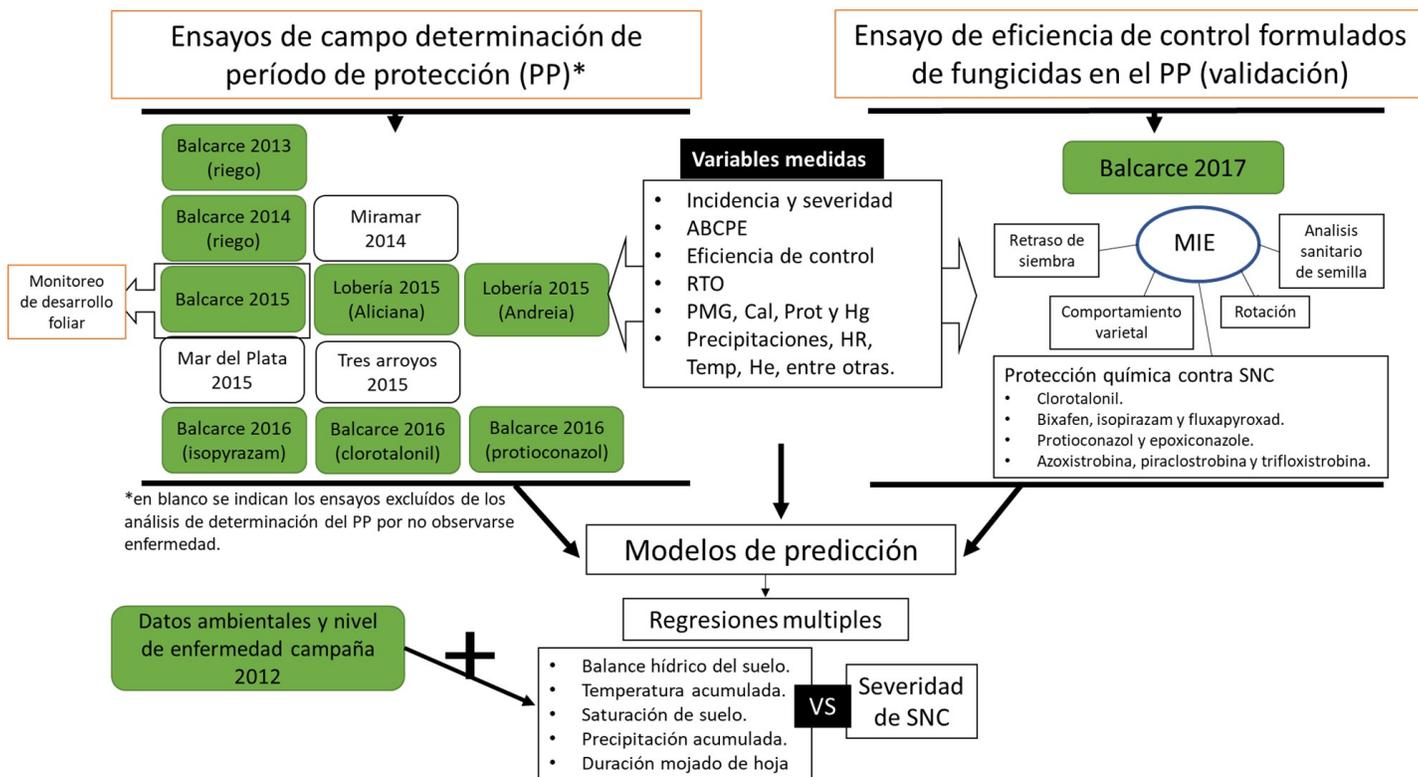


Figura suplementaria 1. Esquema gráfico del capítulo de determinación del periodo de protección de la cebada contra *Ramularia collo-cygni*, impacto de la enfermedad en la producción y descripción de condiciones predisponentes para el desarrollo de modelos de predicción del salpicado necrótico de la cebada (Capítulo 4). ABPCE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, RTO: rendimiento (kg/ha), PMG: peso de mil granos (g), Cal: calibre de grano (%), Prot: contenido de amilasas (%), Hg: humedad de grano (%), HR: humedad relativa, Temp: temperatura (°C), He: heliofanía, MIE: manejo integrado de enfermedades.

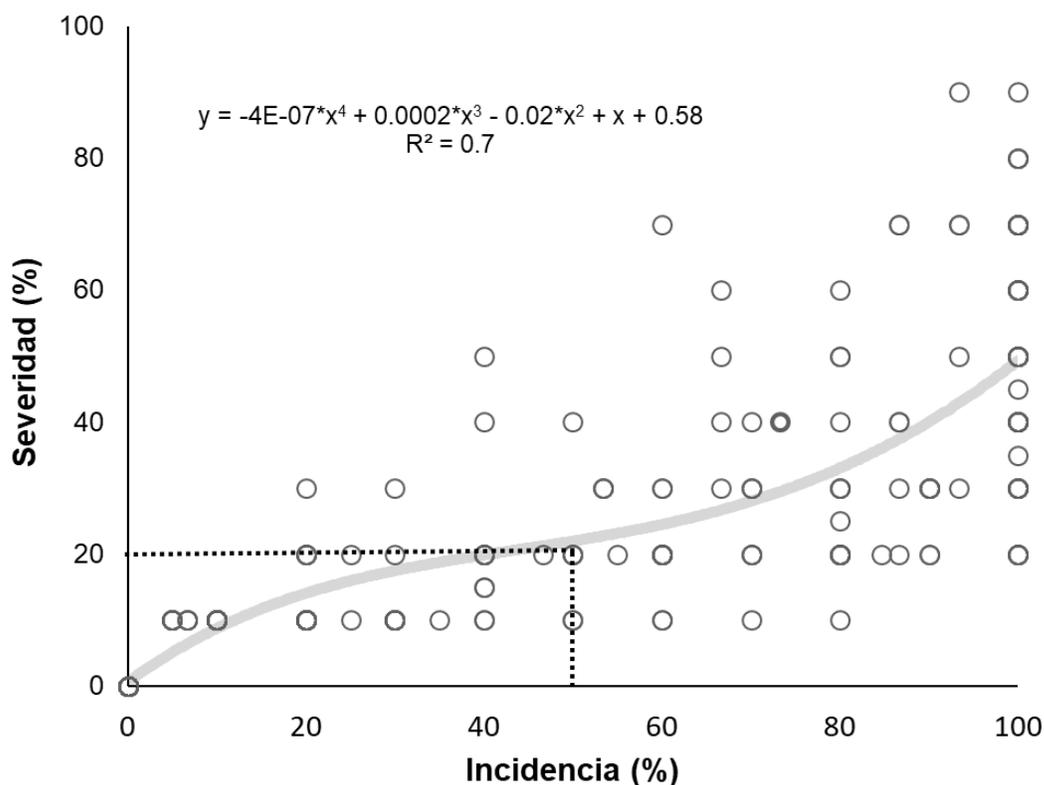


Figura suplementaria 2. Modelo de regresión entre la incidencia y severidad del salpicado necrótico de la cebada (SNC) (n=560) de ensayos comerciales de protección química para la determinación del nivel máximo de enfermedad aceptable(MDL). NME (líneas de puntos) = valor mínimo de incidencia y severidad, donde la segunda variable comienza a diferenciarse de forma exponencial de la primera (Capítulo 4).

| Localidad                          | Balcarce                                        | Balcarce   | Bordenave | Miramar  | Balcarce   | Tres Arroyos / Barrow | Mar del Plata | Lobería        | Lobería        | Balcarce*      | Balcarce       |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|-----------|----------|------------|-----------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Variedad                           | Andreia                                         | Andreia    | Andreia   | Scrabble | Andreia    | Andreia               | Andreia       | Andreia        | Aliciana       | Andreia        | Andreia        |
| Densidad (plantas/m <sup>2</sup> ) | 250                                             | 250        | 250       | 250      | 250        | 250                   | 240           | 250            | 250            | 260            | 250            |
| Siembra                            | 20/7/2013                                       | 25/7/2014  | 2014      | 2014     | 16/7/2015  | 2015                  | 9/6/2015      | 6/7/2015       | 6/7/2015       | 18/6/2016      | 21/7/2017      |
| Repeticiones                       | 4,00                                            | 4          | 4         | 4        | 4          | 3                     | 4             | 2              | 2              | 3              | 3              |
| Herbicida aplicado                 | Metsulfurón (7 g/ha + 100 cc/ha de coadyuvante) | idem       | idem      | idem     | idem       | idem                  | idem          | idem           | idem           | idem           | idem           |
| Fertilización nitrogenada          | Urea 100 Kg al ensayo                           | idem       | idem      | idem     | idem       | idem                  | idem          | Urea 120 kg/ha | Urea 120 kg/ha | Urea 100 kg/ha | Urea 120 kg/ha |
| Cosecha                            | -                                               | 20/12/2014 | -         | -        | 21/12/2015 | 20/12/2015            | 15/12/2015    | 22/12/2015     | 22/12/2015     | 20/12/2016     | 21/12/2017     |

\*tres ensayos con diferentes fungicidas

Tabla suplementaria 4. Detalles de los ensayos de determinación de periodo de protección (ensayos desde el año 2013 hasta el 2016) y eficiencia de fungicidas (año 2017 en Balcarce) para el control del salpicado necrótico de la cebada (Capítulo 4).

| ABCPE                                          |                                    |        |        |         |       |      |                              |          |          |             |       |      |
|------------------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|---------|-------|------|------------------------------|----------|----------|-------------|-------|------|
| Ensayo (Localidad – Año – Variedad/Fungicida)  | Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> ) |        |        | PMG (g) |       |      | NG (grano ha <sup>-1</sup> ) |          |          | Cal>2.8 (%) |       |      |
|                                                | m*(-1)                             | b      | Ymax   | m*(-1)  | b     | Ymax | m*(-1)                       | b        | Ymax     | m*(-1)      | b     | Ymax |
| Balcarce - 2014 - Andreia                      | 2.0                                | 6879.4 | 7857   | 0.0077  | 47.60 | 51   | 19799.79                     | 1.45E+08 | 1.64E+08 | 0.0371      | 80.60 | 85.9 |
| Balcarce - 2015 - Andreia                      | 3.5                                | 7414.7 | 8228   | 0.0092  | 49.58 | 51   | 44894.12                     | 1.50E+08 | 1.74E+08 | 0.0231      | 85.33 | 90.0 |
| Lobería - 2015 - Andreia                       | 1.3                                | 7293.2 | 7015   | 0.0133  | 43.91 | 45   | 24342.90                     | 1.66E+08 | 1.97E+08 | 0.0223      | 54.92 | 60.0 |
| Lobería - 2015 - Aliciana                      | 3.3                                | 7570.1 | 8300   | 0.0108  | 43.86 | 46   | 37662.44                     | 1.73E+08 | 1.86E+08 | 0.0261      | 52.99 | 60.4 |
| Balcarce - 2016 - Andreia                      | 2.2                                | 4950.5 | 6434   | 0.0061  | 43.26 | 46   | 74387.39                     | 1.25E+08 | 1.56E+08 | 0.0128      | 62.93 | 73.0 |
| Balcarce - 2016 - Pro                          | 1.3                                | 5002.1 | 6893   | 0.0095  | 43.64 | 46   | 10431.69                     | 1.08E+08 | 1.56E+08 | 0.0548      | 70.67 | 73.0 |
| Balcarce - 2016 - Clt                          | 2.1                                | 4888.9 | 5811   | 0.0106  | 42.50 | 44   | 24409.00                     | 1.01E+08 | 1.39E+08 | 0.0170      | 58.56 | 67.9 |
| Mean                                           | 2.2                                | 6285.5 | 7219.7 | 0.0096  | 44.9  | 47.0 | 33703.9                      | 1.38E+08 | 1.67E+08 | 0.028       | 66.6  | 72.9 |
| Error                                          | 0.39                               | 479.90 | 356.58 | 0.0009  | 0.99  | 1.07 | 8025.23                      | 1.05E+07 | 7.48E+06 | 0.0054      | 4.79  | 4.39 |
| Severidad SNC                                  |                                    |        |        |         |       |      |                              |          |          |             |       |      |
| Ensayo (Localidad – Año – Variedad/ Fungicida) | Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> ) |        |        | PMG (g) |       |      | NG (grano ha <sup>-1</sup> ) |          |          | Cal>2.8 (%) |       |      |
|                                                | m*(-1)                             | b      | Ymax   | m*(-1)  | b     | Ymax | m*(-1)                       | b        | Ymax     | m*(-1)      | b     | Ymax |
| Balcarce - 2014 - Andreia                      | 11.8                               | 6819   | 7857   | 0.0510  | 47.5  | 51   | 102950                       | 1.45E+08 | 1.64E+08 | 0.26        | 80.5  | 85.9 |
| Balcarce - 2015 - Andreia                      | 23.8                               | 7474   | 8228   | 0.0630  | 49.7  | 51   | 306209                       | 1.50E+08 | 1.74E+08 | 0.15        | 85.6  | 90.0 |
| Lobería - 2015 - Andreia                       | 7.5                                | 7273   | 7015   | 0.0780  | 43.8  | 45   | 208161                       | 1.66E+08 | 1.97E+08 | 0.13        | 54.7  | 60.0 |
| Lobería - 2015 - Aliciana                      | 21.1                               | 7577   | 8300   | 0.0680  | 43.8  | 46   | 248760                       | 1.73E+08 | 1.86E+08 | 0.16        | 52.8  | 60.4 |
| Balcarce - 2016 - Andreia                      | 15.5                               | 4884   | 6434   | 0.0240  | 43.1  | 46   | 305766                       | 1.13E+08 | 1.56E+08 | 0.03        | 62.3  | 73.0 |
| Balcarce - 2016 - Pro                          | 7.0                                | 4715   | 6893   | 0.0440  | 43.6  | 46   | 67585                        | 1.08E+08 | 1.56E+08 | 0.28        | 70.7  | 73.0 |
| Balcarce - 2016 - Clt                          | 15.3                               | 4936   | 5811   | 0.0620  | 42.7  | 44   | 195400                       | 1.17E+08 | 1.39E+08 | 0.11        | 58.4  | 67.9 |
| Mean                                           | 14.6                               | 6239.7 | 7219.7 | 0.0557  | 44.9  | 47.0 | 2.0E+05                      | 1.39E+08 | 1.67E+08 | 0.2         | 66.4  | 72.9 |
| Error                                          | 2.41                               | 501.8  | 356.6  | 0.01    | 1     | 1.07 | 3.5E+04                      | 9.9E+06  | 7.5E+06  | 0.03        | 4.85  | 4.39 |

Tabla suplementaria 5. Coeficientes de análisis de regresión lineal entre la severidad del salpicado necrótico de la cebada (SNC), el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) basada en la severidad y los valores de producción obtenidos en los tratamientos planteados (testigos incluidos) en los ensayos de campo (n=7) de determinación del periodo de protección. m y b: pendiente de regresión e intercepto respectivamente, Ymax: valor máximo, PMG: peso de mil granos, CG: calibre de grano, NG: número de grano. Pro: protioconazol (17.5 g) y trifloxistrobina (15 g) y Clt: clorotalonil (32 Sc) (1.5 L ha<sup>-1</sup>).

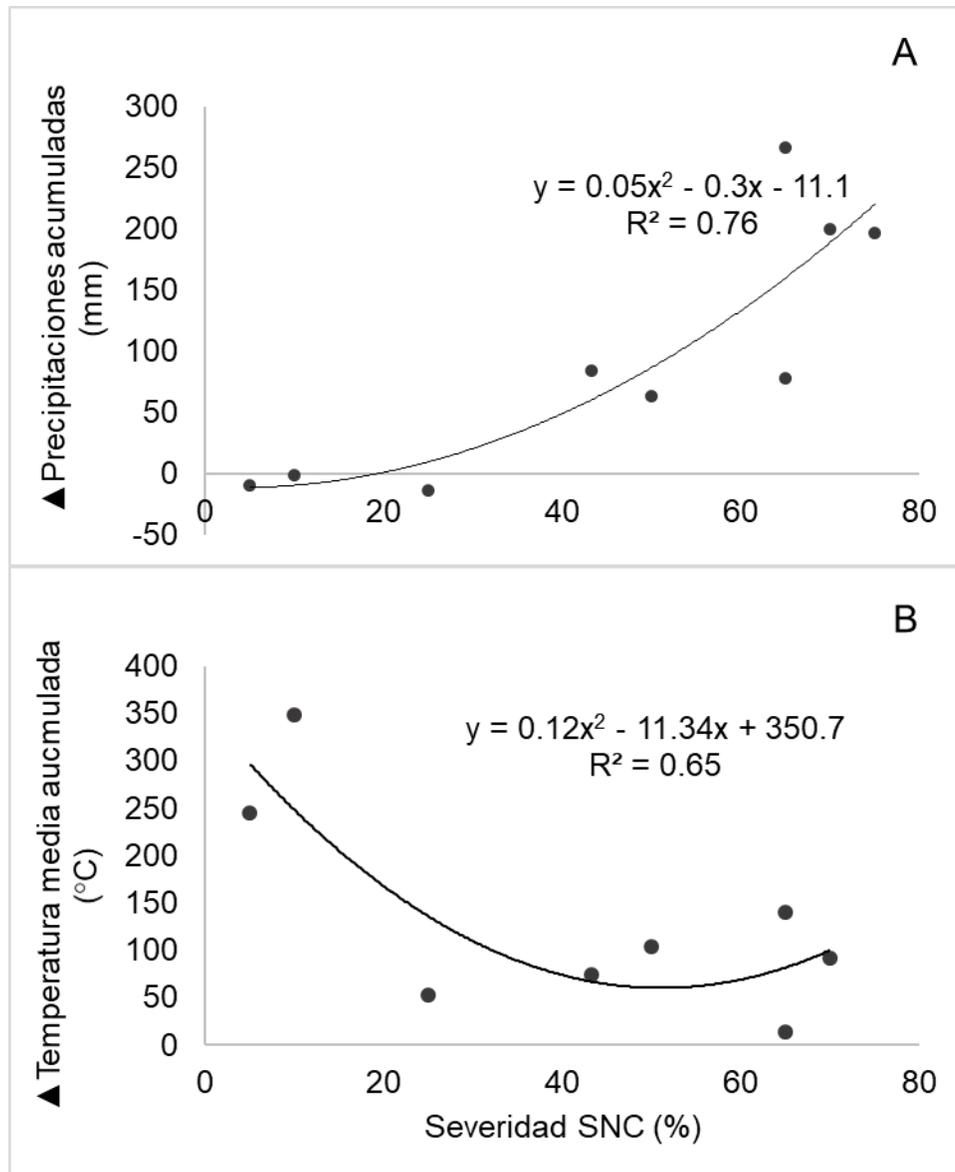


Figura suplementaria 3. Gráficos de regresión que describen la relación encontrada entre los valores observados menos los históricos (▲) de las variables ambientales precipitaciones (A) y temperaturas acumuladas (B) en la etapa de macollaje hasta fin de encañazón y la severidad del salpicado necrótico (SNC). (Capítulo 4).