



# Optimizando la evaluación de curasemillas para el control de *Ramularia collo-cygni* en cebada mediante técnicas moleculares

Foto: Nicolás Vivián

## Rodrigo Vivián Paradizo

Ing. Agr., Polo de Desarrollo Universitario Abordaje Holístico impactos de los agroquímicos, Cenur Litoral Norte, Udelar, EEMAC. nicolas.paradizo@gmail.com

## Carlos Pérez

Ing. Agr. MSc., PhD., Fitopatología, Dpto. Protección Vegetal, FAGro, Udelar, EEMAC. caperez@fagro.edu.uy

## Silvia Pereyra

Ing. Agr. MSc., PhD., Fitopatología, Programa Nacional de Cultivos, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. spereyra@inia.org.uy

## Cintia Palladino

Ing. Agr. MSc., Polo de Desarrollo Universitario Abordaje Holístico impactos de los agroquímicos, Cenur Litoral Norte, Udelar, EEMAC. cpalladino@cup.edu.uy

## 1 - INTRODUCCIÓN

La ramulariosis, causada por *Ramularia collo-cygni* (Rcc), se ha convertido en una de las principales restricciones biológicas que ha desafiado al cultivo de cebada en los últimos años, por las pérdidas de rendimiento y calidad de grano (Havis *et al.*, 2015b; 2020). Existen estimaciones de pérdidas de rendimiento que alcanzan hasta un 70 %, y reducciones de hasta 90 % en el rendimiento de 1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup>. Este último aspecto restringe la comercialización, ya que el destino principal del grano es la producción de malta para exportación, lo que hace a la calidad un elemento fundamental para la cadena agroindustrial (Pereyra, 2013).

Es difícil realizar un diagnóstico de la presencia de Rcc en etapas tempranas del cultivo y más aún, inferir la ocurrencia de epidemias en etapas iniciales del ciclo del cultivo, debido a que Rcc presenta una fase de colonización asintomática, con hábito endófito, de largo variable pero que puede durar varias semanas (Oxley *et al.*, 2008; Newton *et al.*, 2010; Havis *et al.*, 2015a). En general, la ramulariosis coincide con la ocurrencia de condiciones de estrés, ya sea por condiciones climáticas o por demandas metabólicas según el estado y el ciclo del cultivo. Estos síntomas corresponden a lesiones necróticas, pequeñas, de color marrón, de forma irregular-rectangular, en general con presencia de halo clorótico (Havis *et al.*, 2015b). Frecuentemente, los síntomas característicos de la enfermedad (Figura N° 1) se encuentran acompañados de un manchado rojizo causado por toxinas producidas por Rcc (Rubellinas) que son fotosensibles. Sin embargo, estas se observan principalmente en las hojas del tercio superior del cultivo y son más superficiales. Esta característica permite diferenciar estos síntomas de la mancha foliar causada por la necrosis directa de tejidos por parte del



Figura Nº 1. Hoja de cebada con síntomas de ramulariosis: pequeñas lesiones necróticas, marrón-oscuras, rodeadas por un halo clorótico, rectangulares siguiendo las nervaduras, algunas manchas se unen formando manchas más grandes, esparcidas sobre el haz (derecha) y el envés de la lámina (izquierda).

hongo (Havis *et al.*, 2015a). A su vez, los síntomas descritos pueden confundirse, en las primeras etapas, con manchado fisiológico asociado a genética del cultivar e interacción con factores abióticos. Estos últimos son generalmente solo visibles en el lado de la hoja expuesto directamente a los rayos solares.

A pesar de ser un hongo necrotrofico (patógeno que mata el tejido de la planta y luego se alimenta de sus nutrientes), aún no se conoce la importancia epidemiológica del rastrojo como fuente de inóculo para la enfermedad. Tampoco se ha cuantificado la capacidad de diseminación aérea de Rcc. Havis *et al.* (2006a, 2006b, 2014) concluyeron que la semilla es la principal fuente de inóculo, y por lo tanto es un factor de vital importancia en el manejo de la enfermedad.

Hasta el momento no se han identificado genes mayores de resistencia a Rcc (McGrann *et al.*, 2014) y se ha demostrado que la interacción genotipo-ambiente es muy significativa, limitando la identificación y utilización de resistencia cuantitativa para el control de ramulariosis (Pinnschmidt y Sindberg, 2009). A nivel mundial y en Uruguay, se ha reportado variabilidad en el comportamiento de los cultivares frente a esta enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los cultivares comerciales disponibles presentan susceptibilidad alta a intermedia (Reitan and Salamati, 2007; Havis *et al.* 2015a; Pereyra, 2013; Castro *et al.*, 2018).

Debido a la falta de resistencia genética aceptable para el control de la enfermedad y a la capacidad reducida para detectar al patógeno presente en la semilla, el manejo de ramulariosis depende en gran medida del uso de fungicidas foliares (Walters *et al.*, 2008; Pereyra, 2013). Para minimizar el uso de fungicidas foliares es necesario integrar nuevas alternativas para el manejo integrado (Lamichhane *et al.*, 2016).

La información disponible del uso de fungicidas curasemilla para reducir o eliminar el inóculo inicial en semilla no es conclusiva en cuanto a la eficiencia (Havis *et al.*, 2012, 2018; Pereyra y Pérez 2017). Zamani-Noor (2011) evaluó diferentes fungicidas curasemillas en cebada para el control de ramulariosis en el cual se aplicaron tres fungicidas comerciales con los siguientes principios activos: 1) fluxastrobina + tebuconazol + prothioconazol + triazóxido 2) ciprodinil + fludioxinil + tebuconazol y 3) ciproconazol + imazalil, siendo esta última mezcla la más eficiente. A pesar de no eliminar por completo a Rcc en la semilla, redujo a la mitad la cantidad de ADN del hongo con respecto al testigo sin tratar que presentaba 0,6 ng de ADN del hongo/ 100 mg de ADN total.

Por otra parte, en Argentina, se evaluó el efecto del curasemilla mezcla fluxapirroxad + triticonazol en la reducción de Rcc en plántulas. Para ello, se cuantificó el ADN de las muestras extraídas de plántulas tratadas y no tratadas con esta mezcla de fungicidas. Los tejidos de las plántulas no tratadas presentaron mayor cantidad de ADN de Rcc que plántulas que fueron tratadas con fungicidas (Clemente *et al.*, 2014). En base a los antecedentes mencionados anteriormente, se planteó el uso de carboxamida como curasemilla y cuantificar su eficiencia mediante la cuantificación de la concentración del ADN de Rcc en la plántula.

En los últimos años, la técnica qPCR (PCR: reacción de la cadena de polimerasa, por su sigla en inglés, y qPCR: PCR cuantitativo por su sigla en inglés o también llamado PCR en tiempo real), ha sido utilizada en otros países para la detección de Rcc en semilla y plántula de cebada (Taylor *et al.*, 2010; Havis *et al.*, 2015a). Es una técnica molecular relativamente simple, utilizada en biología molecular para lograr amplificar y detectar secuencias de ADN aún en muy baja concentración, en este caso aplicada a Rcc. La ventaja de este método respecto al PCR tradicional, es su mayor sensibilidad del mismo, lo que permite detectar mínimas concentraciones de ADN de Rcc, aunque éste se encuentre mezclado con ADN vegetal y de otros microorganismos. Para llevar a cabo esta técnica, se requiere una sonda y un par de cebadores específicos para la amplificación de determinada secuencia blanco (en este caso corresponde a una secuencia específica de Rcc).

En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de fungicidas curasemillas para el control de Rcc mediante la técnica de qPCR

## 2- PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE CURASEMILLAS EN EL CONTROL DE RAMULARIA COLLO-CYGNI

Para evaluar el efecto del fungicida curasemilla sobre el inóculo de Rcc en la semilla, se seleccionaron dos lotes de semilla de cebada con nivel de infección de Rcc muy alto (lote

1: 48,9 pg/100 ng ADN total) y alto (lote 2: 22,6 pg/ 100 ng ADN total). Se tomó como referencia que la semilla con niveles por encima de 1 pg de ADN de Rcc/100 ng de ADN total, no es recomendada para su comercialización (Havis *et al.*, 2015a). Ambos lotes correspondieron a la variedad INIA Cronos (CLE 280) cosechados durante la zafra 2016/17. Esta variedad ha sido caracterizada como de susceptibilidad intermedia frente a ramulariosis (Castro *et al.*, 2018). Se evaluaron seis tratamientos, en un diseño factorial completo de dos factores (nivel de infección y fungicida curasemilla):

### Nivel de infección de Rcc

- Muy alto (48,9 pg/100 ng ADN total) (Lote1)
- Alto (22,6 pg/100 ng ADN total) (Lote 2)

### Fungicida curasemilla

- Testigo sin fungicida curasemilla
- Mezcla con carboxamidas: fluxapiraxad+ triticonazol
- Mezcla sin carboxamidas: carbendazim + tiram + iprodiona

La aplicación de los fungicidas se hizo en forma manual, se colocó 200 g de semilla en bolsa plástica y se le aplicó un caldo (curasemilla + agua) equivalente a 1 % del volumen de semilla (es decir, 2 cc), luego se agitó manualmente la bolsa para lograr una cobertura homogénea de las semillas. La dosis utilizada de los fungicidas curasemillas fueron las recomendadas según proveedores:

1. Mezcla de dos productos simples: fluxapiraxad (333 g de p.a. /L) aplicado a 75 cc/100 kg de semilla + triticonazol (100 g de p.a./L) aplicado a 25 cc/100 kg de semilla
2. Triple mezcla formulada: carbendazim (200 g de p.a. /L) + tiram (200 g de p.a. /L) + iprodiona (100 g de p.a. /L), aplicada a 250cc/100 kg de semilla.

## 2.1 SIEMBRA DE SEMILLAS EN CONDICIONES CONTROLADAS

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

## 2.2 COLECTA DE PLÁNTULAS

Luego de tres semanas de incubación y cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas, éstas se cortaron con tijera a una altura de un centímetro por encima de la semilla. La tijera se desinfectó con alcohol 70 % entre muestras. Las muestras recolectadas no presentaron síntomas visibles de ningún agente patogénico.

## 2.3 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez llevada a cabo la colecta, cada muestra proveniente de cada unidad experimental se colocó dentro de bolsas plásticas identificadas con cada tratamiento y fueron conservadas en frío a -80 °C (Thermo Scientific, 88300V) hasta su posterior utilización. El material vegetal congelado se liofilizó (BW10) durante 12 h antes de realizar las extracciones de ADN, y luego se conservaron a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C hasta su análisis. La liofilización permitió la eliminación del agua del material vegetal en condiciones de baja presión y temperatura, lo que favorece la deshidratación de los tejidos, manteniendo todas sus propiedades estables.

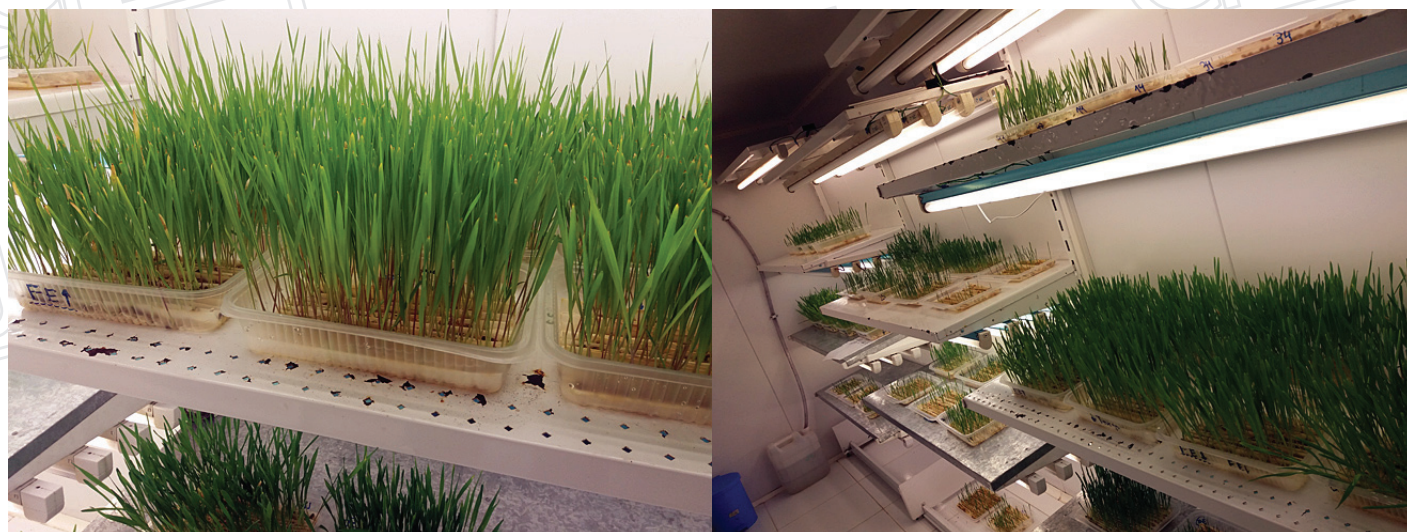


Figura N° 2. Plántulas de cebada con dos hojas expandidas en la cámara de germinación.

## 2.4 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de las plántulas liofilizadas y consistió en la separación y purificación del ADN para su posterior análisis. Para ello se utilizó el método CTAB adaptado de CIMMYT (2005) y posteriormente se realizó la cuantificación de ADN de los tratamientos mediante la técnica de qPCR.

## 2.5 CUANTIFICACIÓN DE ADN DE LOS TRATAMIENTOS

La cuantificación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Taylor *et al.* (2010), utilizando los cebadores: RamF6 (CGT CAT TTC ACC ACT CAA G), RamR6 (CCT CTG CGA ATA GTT GCC) y la sonda Ram6 (FAM-GCG ATT CCG GCT GAG CGG TTC GTC ATC GCG-BHQ-1), sintetizados por Invitrogen® (California, EEUU). El ciclado de qPCR fue: 10 min a 95 °C, 50 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s y una extensión final de 1 min a 95 °C. Dicho análisis se realizó en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR, en el laboratorio de Biología Molecular de la EEMAC.



Plántula de cebada.

La cuantificación de ADN de Rcc en cada tratamiento se hizo mediante la generación de una curva estándar, elaborada en base a estándares de concentración de ADN conocida, que permiten corroborar la eficiencia y ajuste de cada corrida. A su vez permite visualizar donde se ubica el resultado de la muestra en estudio y de esa forma determinar la concentración de ADN objetivo en la muestra en cuestión.

La curva estándar se realizó a partir de ADN genómico de Rcc obtenido de la cepa pura Rcc3, que fue aislada de hojas de cebada con síntomas típicos de la enfermedad y es mantenida en la colección perteneciente al Laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela. Con dicho ADN se generó la curva de calibración mediante la realización de diluciones seriadas en base cinco (este número indica las veces que debió diluirse el ADN en agua para obtener una de menor concentración del mismo). La curva presentó un rango de concentración de 0,4 ng/μL y 0,064 pg/μL, permitiendo detectar y cuantificar la presencia de Rcc siempre que esté dentro de ese rango. Para conocer la reproducibilidad de los datos de la curva se realizaron dos réplicas de cada dilución. Las muestras de ADN de plántula de cada tratamiento fueron también evaluadas por duplicado. Además, se incluyeron dos blancos conteniendo agua miliQ estéril (Qiagen) con el fin de comprobar que no haya contaminación en el experimento.

Luego se realizó la prueba de influencia de la matriz (ADN de plántula de cebada) para determinar si existía inhibición por parte de ésta en la cuantificación de ADN del hongo. Para ello, se partió de la extracción de ADN total de una muestra de 0,1 g de plántula de cebada. Al extracto obtenido de la muestra se le añadió cantidades diferentes de ADN genómico de Rcc (Cuadro N° 1), y se repitió el mismo tipo de análisis antes descrito para evaluar si la cuantificación de ADN objetivo coincidía con la concentración agregada en cada caso. Si la cuantificación para una misma concentración coincide en la muestra con ADN de cebada y sin ADN de cebada, indica que la matriz (ADN de cebada) no está alterando los resultados y que el método es eficiente en el cumplimiento de su objetivo.

**Cuadro 1.** Estudio del efecto matriz. Equivalencias de concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) en el ADN de plántula de cebada.

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

Una vez realizadas todas las diluciones el efecto matriz se analizó por qPCR con las condiciones de ciclado descritas anteriormente. En la misma prueba se incluyeron dos blancos y diluciones realizadas con agua de forma de comparar el Ct resultante en cada caso. El Ct es el número de ciclos de PCR necesarios para detectar y lograr un resultado positivo de ADN genómico de Rcc. A menor concentración de ADN objetivo presente en la muestra, es necesario un mayor número de ciclos (Ct) para lograr superar el umbral de detección. O sea, un mayor Ct significa una menor concentración del ADN objetivo en la muestra. Cuando el Ct de la muestra objetivo supera al Ct del blanco (muestra sin ADN), significa que no se detectó el ADN objetivo.

### 3. RESULTADOS Y APLICABILIDAD

El estudio del efecto matriz (correspondiente al extracto de plántula de cebada con la cantidad de ADN de Rcc en la misma), permitió concluir que no hubo efecto matriz (Cuadro N° 2). Esto se corroboró al observarse los mismos valores de detección (Ct) tanto cuando el ADN de Rcc se mezcló con extracto de plántula, como cuando se mezcló con agua. Las pequeñas diferencias de Ct se encontraron dentro del error del método (Zipper *et al.*, 2004). Estos resultados determinan que la presencia de ADN de plántula no interfiere en la cuantificación de Rcc presente en dichos tejidos.

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

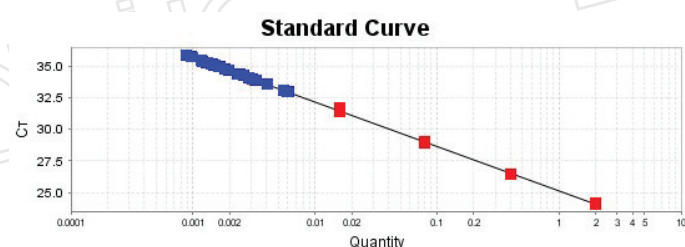


Figura N° 3. Curva estándar de calibración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc). Los puntos rojos representan los valores registrados de las muestras de concentración conocida, en un rango de concentración de 0,4 ng/μl a 0,064 pg/μl, y los puntos azules indican los valores obtenidos a partir de las muestras de los tratamientos de los que no se conocía su concentración.

En ambos lotes de semilla se obtuvieron resultados similares de concentración de ADN de Rcc en el tratamiento testigo, lo cual indica que a pesar de haberse caracterizado un lote como muy alto nivel de infección (Lote 1) y otro con alto nivel de infección (Lote 2), ambos presentaron contenido de Rcc similar en plántula (Figura N° 4). Esto coincide con Havis *et al.* (2015a), ya que ambos lotes entrarían en la categoría no recomendada para la comercialización por la alta concentración de Rcc en la semilla.

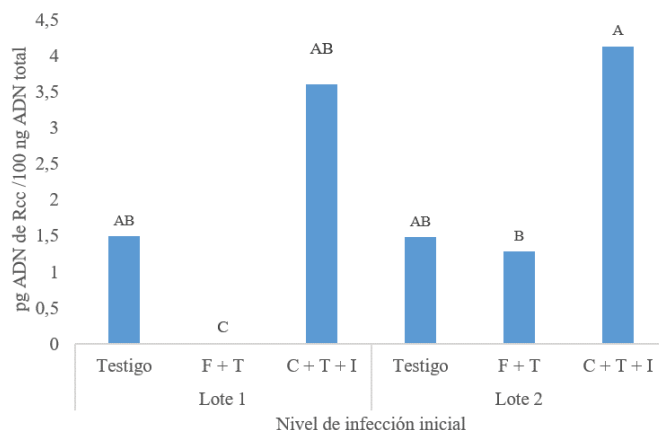


Figura N° 4. Concentración de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) en semilla determinado en función del ADN total extraído a partir de tejidos de hojas de plántulas según tratamiento. Valores promedio con letras iguales no difieren significativamente entre sí, Tukey (p > 0, 05).

Referencias: F + T= fluxapiraxad + triticonazol / C + T + I= carbendazim + tiram + iprodiona. Lote 1 (48,9 pg de ADN de Rcc/ 100 ng ADN total), Lote 2 (22,6 pg de ADN de Rcc/ 100 ng ADN total).

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

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

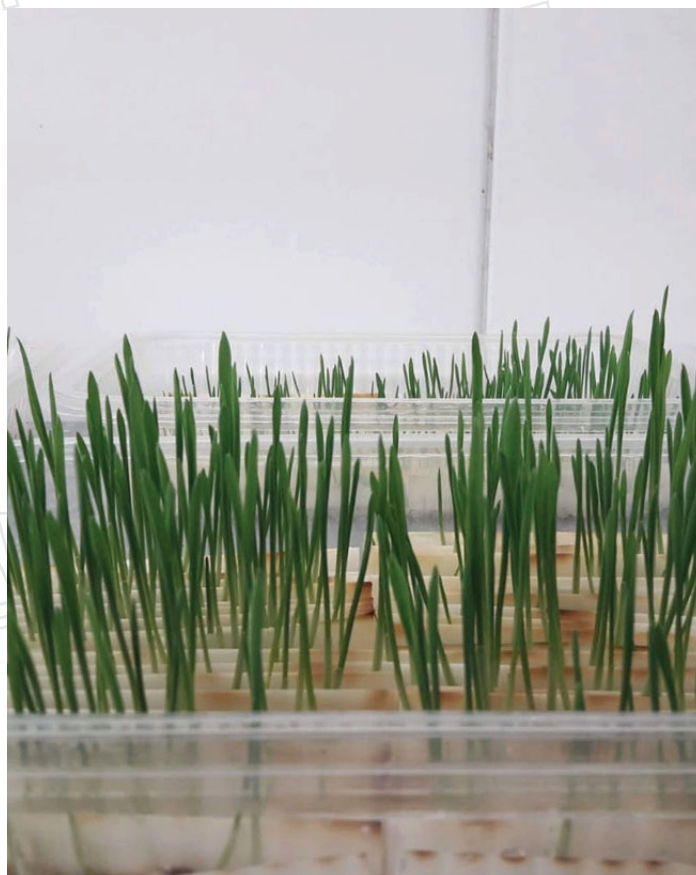
El tratamiento con carbendazim + tiram + iprodiona presentó mayor concentración de ADN de Rcc que el tratamiento testigo sin curasemilla en el Lote 2. Posiblemente, este fungicida, aun cuando no fue eficiente para el control de Rcc, pudo haber tenido un control de otros microorganismos presentes en la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

Cuadro 2. Estudio del efecto matriz. Comparación del umbral del ciclo (Ct) frente a diferentes concentraciones de ADN de *Ramularia collo-cygni* (Rcc) en ADN de plántula de cebada y en agua.

ADN de plántula (ng/μL)	ADN Rcc (ng/μL)	Ct (Rcc en extracto de plántula)	Ct (Rcc en agua)
1	1	24	24
1	0,1	28	28
1	0	34	35



Germinadores de plántulas de cebada.



de Rcc. Estos resultados coinciden con Bonifaz (2015), quien concluyó que la aplicación de determinados fungicidas podría resultar en un incremento del patógeno *target* cuando un fungicida controla diferencialmente a ciertos hongos y no a otros, resultando en una menor competencia de otros hongos en los tejidos del hospedero. Esta menor competencia podría llevar al desarrollo de una mayor biomasa de Rcc, mayor número de células, mayor número de núcleos, y por consiguiente mayor concentración de ADN de este hongo en los tratamientos con agregado de un fungicida no efectivo para Rcc, respecto a los testigos sin fungicidas.


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

Según Russell (2009), la introducción de las carboxamidas en los tratamientos de fungicidas ha brindado un aporte significativo para el control de patógenos en cebada. Sin embargo, hay una preocupación constante sobre el uso de las mismas dado que Rcc es un patógeno con alto riesgo de generar resistencia frente a este grupo de fungicidas de manera rápida.

## 4. CONCLUSIONES

La metodología propuesta de cuantificación de ADN de Rcc en tejidos foliares de plántulas mediante la técnica de qPCR, resultó ser rápida, sencilla y confiable en los resultados obtenidos. Esta técnica podrá ser utilizada en la evaluación de distintos fungicidas curasemillas para el control de ramulariosis u otras enfermedades transmitidas por semilla. Además, servirá como base para futuras investigaciones en otros patosistemas de difícil diagnóstico como Rcc.

Este estudio demostró que el uso de fungicidas curasemillas carbendazim + tiram + iprodiona resultó ineficiente para el control de Rcc, respecto a la mezcla fluxapirroxad + triticonazol.

La mezcla de fungicida curasemilla con agregado de carboxamidas (fluxapirroxad) es prometedora para el control de ramulariosis, ya que fue la que logro disminuir el nivel de infección de Rcc con respecto al testigo y a la otra mezcla evaluada, carbendazim + tiram + iprodiona. Cabe destacar que estos datos son preliminares, y, por tanto, se necesitan más estudios para poder concluir con respecto a la mezcla más eficiente de fungicidas. 

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonifaz, A.** 2015. Crecimiento, supervivencia y muerte de microorganismos. McGraw-Hill Interamericana de España. 726 p.
- Castro, M.; Germán, S.; Pereyra, S.; Azzimonti, G.** 2018. Caracterización sanitaria de cultivos de trigo y cebada. Disponible online en: <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estanzuela/caracterizaci%C3%B3n%20sanitaria%20trigo%20y%20cebada3.pdf>.
- CIMMYT**, 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. México, D.F.: CIMMYT. (en línea). Consultado 27 nov. 2020. Disponible en <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1333/91195.pdf>
- Clemente, G.; Quintana, S.; Aguirre, N.; Rosso, A.; Cordi, N.; Havis, N. D.** 2014. State of art of *Ramularia collo-cygni* (leaf spot of barley) in Argentina and detection and quantification of *R. collo-cygni* by Real Time PCR in barley plantlets and seeds treated with fungicide. Ramularia Workshop Abstracts. 11<sup>th</sup> conference European Foundation of Plant Pathology University of Agriculture, Krakow, 9<sup>th</sup> September 2014.
- González, S.; Rossi, C.; Pereyra, S.** 2019. Sanidad de semillas de trigo y cebada: eslabón clave en el manejo de enfermedades. Revista INIA Uruguay. No. 56, p. 57-61.
- Havis, N. D.; Pastok, M.; Pyzalski, S.; Oxley, S. J. P.** 2006a. Investigating the life cycle of *Ramularia collo-cygni*. The Dundee Conference: Crop Protection in Northern Britain 2006: Proceedings of the Conference Held at the West Park Conference Centre, University of Dundee, Scotland (Heilbronn TD, ed), pp. 219-223
- Havis, N. D.; Oxley, S.; Piper, S.; Langrell, S.** 2006b. Rapid nested PCR – based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. FEMS Microbiology Letters. 256(2): 217-223.
- Havis, N. D.; Oxley, S. J. P.; Burnett, F. J.** 2012. Advances in control of *Ramularia collo-cygni*. The Association for Crop Protection in Northern Britain. 22(3): 125-130.
- Havis, N. D.; Nyman, M.; Oxley, S. J. P.** 2014. Evidence for seed transmission and symptomless growth of *Ramularia collo-cygni* in barley (*Hordeum vulgare*). (en línea). Plant Pathology. 63(4): 929-936. Consultado 17 set. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1111/ppa.12162>
- Havis, N. D.; Fountaine, J.; Gorniak, K.; Paterson, L.; Taylor, J.** 2015a. Diagnosis of *Ramularia collo-cygni* and *Rhynchosporium* spp. in barley. Plant Pathology: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology. 1302: 29-36.
- Havis, N. D.; Brown, J.; Clemente, G.; Frei, P.; Jedryczka, M.; Kaczmarek, J.; Kaczmarek, M.; Matusinsky, P.; Mcgrann, G.; Pereyra, S.; Piotrowska, M.; Sghyer, H.; Tellier, A.; Hess, M.** 2015b. *Ramularia collo-cygni* - an emerging pathogen of barley crops. Phytopathology. 105(7): 895-904.
- Havis, N. D.; Gorniak, K.; Taylor, J.; Stanisz-Migal, M.; Burnett, F. J.** 2018. Controlling Ramularia leaf spot in barley crops. The Dundee Conference: Crop Protection in Northern Britain 2018: Proceedings of the Conference Held at the West Park Conference Centre, University of Dundee, United Kingdom (Creative Commons, ed), pp. 91-96.
- Havis, N. D.; Gorniak, K.; Stanisz-Migal, M.; Creissen, H. E.; Burnett, F.** 2020. Controlling Ramularia leaf spot post chlorothalonil. The Dundee Conference: Crop Protection in Northern Britain 2020. Proceedings of the Conference Held at the West Park Conference Centre, University of Dundee, United Kingdom (Creative Commons, ed), pp. 87-92.
- Lamichhane, J.R.; Dachbrodt-Saaydeh, S.; Kudsk, P.; Messéan, A.** 2016. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. Plant Dis. 100:10-24.
- Newton, A. C.; Fitt, B. D.; Atkins, S. D.; Walters, D. R.; Danieli, T. J.** 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. Trends in Microbiology. 18: 365-373.
- Nyman, M.; Havis, N. D.; Oxley, S. J. P.** 2009. Importance of seed-borne infection of *Ramularia collo-cygni*. In: Oxley, S.; Brown, J.; Foster, V.; Havis, N. D. (eds.). The 2nd European Ramularia Workshop - A new disease and challenge in barley production. Aspects of Applied Biology 92: 91-96.
- Oxley, S. J. P.; Havis, N.; Brown, J.; Makepeace, J.; Fountaine, J.** 2008. Impact and interactions of *Ramularia collo-cygni* and oxidative stress in barley. (en línea). HGCA Project Report. no. 431. 100 p. Consultado 30 set. 2020. Disponible en <https://cereals.ahdb.org.uk/media/269137/pr431-summary.pdf>
- 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. (en línea). In: Jornada de Cultivos de Invierno (2013, Young, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Actividades de Difusión 720:33-41. INIA Uruguay. 33-41 pág. Consultado 11 set. 2020. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761220413093940.pdf>
- Pereyra, S.; Pérez, C.** 2017. Avances y perspectivas para el manejo de ramulariosis en cebada en Uruguay. (en línea). Cangüé. 38: 13-18. Consultado 24 oct. 2020. Disponible en [http://www.eemac.edu.uy/canguue/joomdocs/canguue\\_38/Canguue38\\_ramul\\_ariosis.pdf](http://www.eemac.edu.uy/canguue/joomdocs/canguue_38/Canguue38_ramul_ariosis.pdf)
- Pinn Schmidt, H.; Sindberg, L.** 2009. Yield effects of Ramularia leaf spot on spring barley. Conference: The 2nd European Ramularia Workshop – A new disease and challenge in barley production. Aspects of Applied Biology. 92, 2009.
- Reitan, L.; Salamati, S.** 2007. Field screening in Norway for resistance to *Ramularia collo-cygni* in old and new barley material. In Proceedings of the First European Ramularia Workshop, Germany, Göttingen. 73-82.
- Russell, P. E.** 2009. Fungicide resistance action committee (FRAC): A resistance activity update. Outlooks Pest Manage. 20:120-125.
- Taylor, J.; Paterson, L.; Havis, N. D.** 2010. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *Ramularia collo-cygni* from barley (*Hordeum vulgare*). Letters in Applied Microbiology. 50(5): 493-499.
- Walters, D. R.; Havis, N. D.; Oxley, S. J. P.** 2008. *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. (en línea). FEMS Microbiology Letters. 279(1): 1-7. Consultado 6 nov. 2020. Disponible en DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x
- Zamani-Noor, N.** 2011. Studies on *Ramularia leaf spots* on barley- Resistance Phenotyping, Epidemiology and Pathogenicity (en línea). PhD. Degree of Agricultural Sciences. Göttingen, Germany. Georg-August-University Göttingen. Faculty of Agricultural Sciences. 146 p. Consultado 2 nov. 2020. Disponible en <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/001735-0000-0001-BC13-F?locale-attribute=en>
- Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F.** 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I: its structure determination and methodological implications. (en línea). Nucleic Acids Res. 32(12):e103. Consultado 20 set. 2020. Disponible en doi:10.1093/nar/gnh101