

Agresividad diferencial en una población uruguaya de *Cochliobolus sativus* en cebada

Gamba Fernanda¹, Estramil Enrique^{2†}

¹Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Estación Experimental Mario A. Cassinoni. Ruta 3 km 363. Paysandú 60.000, Uruguay. Correo electrónico: fgamba@fagro.edu.uy

^{2†}Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía. Universidad de la República.

Recibido: 4/7/10 Aceptado: 29/3/12

Resumen

La mancha borrosa inducida por *Cochliobolus sativus* es una de las enfermedades foliares más importantes de la cebada (*Hordeum vulgare* L.) por las mermas en rendimiento y calidad que la misma puede causar. El uso de cultivares con resistencia genética constituye el pilar principal del manejo integrado, sin embargo su efectividad puede ser afectada por el tipo y nivel de resistencia así como por variaciones en agresividad en la población del hongo. En este estudio, se evaluó la diversidad en agresividad de cuarenta y cuatro aislados de *C. sativus* en veintiocho genotipos de cebada, en condiciones de temperatura y fotoperíodo controlados. Se identificaron ocho aislados que solamente indujeron respuestas de infección indicativas de una alta compatibilidad hospedante-parásito, pero diferentes entre sí considerando los otros dos tipos de respuestas de infección. La mayor frecuencia de respuestas (84%) indicativas de baja compatibilidad hospedante-parásito fue encontrada en solo dos aislados. El nivel de resistencia de las cebadas varió entre 63,6% y 0% con un importante rango de comportamientos diferentes frente a este grupo de aislados. Se destacó la alta variabilidad intrínseca de la interacción entre los aislados y las cebadas estudiadas. Estudios con muestras del patógeno y de la cebada más diversos permitirán profundizar en el conocimiento de la dinámica de esta relación hospedante-parásito y serían útiles en el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético dirigidas a lograr cultivares con resistencia más efectiva y durable.

Palabras clave: *Hordeum vulgare*, mancha borrosa, agresividad diferencial

Summary

Differential Aggressiveness in a Uruguayan Population of *Cochliobolus sativus* on Barley

Spot blotch induced by *Cochliobolus sativus* is one of the most important foliar diseases of barley (*Hordeum vulgare* L.) due to yield and quality reduction. The use of cultivars with genetic resistance is the basis of an integrated disease management; however, its effectiveness may be affected by the type and level of genetic resistance and by variations in aggressiveness in the pathogen population. In this study, the aggressiveness diversity of forty-four monosporic isolates of *C. sativus* was evaluated on twenty-eight barley genotypes under conditions of controlled temperature and photoperiod. Eight isolates only induced infection responses indicative of high host-parasite compatibility, but they were different from each other considering the other two infection response types. The highest frequency of responses (84%) – indicative of low compatibility host-parasite interaction – was found in only two isolates. Resistance levels varied from 63.6 % to 0% with an important range of different performances for this group of isolates. The high intrinsic variability of the interaction was remarkable. Studies with more diverse pathogen and barley samples will allow a deeper understanding of the dynamics of this host-parasite relationship and would be useful to develop focused breeding strategies, aimed to obtain cultivars with more effective and durable resistance.

Key words: *Hordeum vulgare*, spot blotch, differential aggressiveness

Introducción

El cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) constituye junto con el trigo la única opción de cultivos invernales en el área agrícola del Uruguay. Las manchas foliares a hongos son una de las principales limitantes en el logro de rendimientos altos y estables a través de los años (Mathre, 1997). La problemática sanitaria de la cebada es aún más importante por su incidencia en la calidad industrial de la malta (Arias, 1985). La creciente adopción de la técnica de siembra directa sin rotaciones adecuadas ha causado un aumento en la incidencia de esta enfermedad en los últimos años (Pereyra *et al.*, 2003). La escasez de cultivares de cebada con niveles aceptables de resistencia genética sería otro factor que explicaría la creciente importancia de este tipo de enfermedades. La mancha borrosa inducida por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (forma teleomórfica *Cochliobolus sativus* S. Ito & Kurib., Drechsler ex Dastur, syn. *Helminthosporium sativum* Pammel, C. M. King y Bakke) es un hongo Ascomicete, clase Loculoascomycetes, orden Pleosporales y familia Pleosporaceae. Posee una amplia distribución geográfica en muchos países de Asia, América del Sur, Europa y América del Norte (Kwasna, 1995; Pereyra, 1996; Pratt, 2003; Steffenson *et al.*, 1996; Tekauz *et al.*, 2003). Es capaz de infectar una amplia gama de hospedantes siendo económicamente más importante en trigo y cebada (Mathre, 1997). De los síntomas que puede inducir en todos los órganos de la planta, la mancha foliar es la que causa mayores reducciones de rendimiento (Almgren *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2002). Se han reportado pérdidas de rendimiento entre 7% y 30% (Anonymous, 2005; Pereyra, 2005; Van Leur *et al.*, 1997). El hongo presenta diversos perfiles de virulencia y/o agresividad dependiendo del cultivar con el que interactúe. Existen diversos antecedentes mundiales que reportan diferencias en virulencia de *C. sativus*. El primer estudio que reportó especialización fisiológica entre aislados de trigo y de cebada fue Christensen (1926). Valjavek-Gratian y Steffenson (1997a, 1997b) identificaron tres patotipos de una colección de 33 aislados de North Dakota (EE.UU.) sobre la base de fenotipos de la infección con tres cebadas diferenciales. Otros estudios realizados con un grupo de 34 aislados australianos, identificaron seis patotipos usando un grupo de 20 cultivares de cebada (Meldrum *et al.*, 2004).

En Siria, Arabi y Jawar (2004) reportaron la presencia de tres grupos de virulencia en 11 aislados con 10 cebadas diferenciales. En el primer estudio exploratorio realizado en Uruguay, se sugirió la existencia de tres perfiles de virulencia diferencial, en un grupo de 37 aislados y 15 genotipos de

cebada (Gamba *et al.*, 2000). Trabajos posteriores encontraron tres cebadas uruguayas que permitieron distinguir tres grupos de virulencia diferencial, entre 30 aislados. En ese estudio, también se inocularon los tres patotipos estadounidenses (patotipo 0: ND 93-1; patotipo 1: ND 90Pr, y patotipo 2: ND 85F), identificados y caracterizados por Valjavek-Gratian y Steffenson (1997a) y 26 aislados uruguayos que fueron inoculados en las tres cebadas diferenciales (ND5883, Bowman y NDB112) usadas por Valjavek-Gratian y Steffenson (1997a). Se identificaron dos grupos de aislados, uno de igual comportamiento al patotipo 1 y el otro al patotipo 2. No se encontró ningún aislado con patrón de virulencia similar al patotipo 0 (Gamba y Estramil, 2002).

El reporte nacional más reciente sugiere la existencia de una alta variabilidad de la población local de *C. sativus*, así como niveles muy bajos de resistencia genética de la cebada (Gamba *et al.*, 2010). Estos datos fueron consistentes con una alta variabilidad genética de los aislados locales detectada con marcadores moleculares RAPDs (Pritsch *et al.*, 2006). Los fungicidas pueden reducir el impacto de esta enfermedad, pero la medida ambientalmente más sana y económicamente más efectiva es el uso de cultivares resistentes. El manejo de esta enfermedad debe integrar la diversificación de cultivares con resistencia genética efectiva frente a la población local de *C. sativus*. Los niveles de resistencia genética actuales frente a *C. sativus* han sido ampliamente documentados como de intermedios a bajos (Castro *et al.*, 2010). Sin embargo, la resistencia genética puede perder su efectividad debido al tipo y nivel de la misma así como por cambios en la agresividad en la población del hongo. Información sobre la diversidad de la agresividad en presente la población local de *C. sativus* es necesaria para obtener cultivares con resistencia efectiva frente a la misma.

El objetivo del trabajo fue estudiar la variabilidad de una población uruguaya de *C. sativus*.

Materiales y métodos

Obtención de aislados monospóricos y producción de inóculo

Los aislados monospóricos se obtuvieron a partir de trozos de 15-20 mm de hojas con síntomas de mancha borrosa colectadas en el campo, luego de ser desecadas y esterilizados superficialmente, se colocaron en placas de petri de 9 cm con papel de filtro humedecido. La esporulación fue promovida incubándolos por 2-3 días a 21 °C, cada conidio fue transferido con una aguja esterilizada a

una placa de petri conteniendo agar V₈ al 10% e incubado a 20 °C y 12 h de fotoperíodo por 6-8 días. La multiplicación del inóculo se realizó colocando 4-6 trozos de la colonia en varias placas de petri conteniendo el mismo medio e incubándolas en las mismas condiciones anteriores. Los conidios producidos fueron colectados raspando la colonia superficialmente con un portaobjeto y con agua destilada estéril, la concentración se ajustó a 5000 conidios/ml usando un hematocitómetro Hausser Scientific Horsham, Pa. Para asegurar una completa dispersión del inóculo se agregó 25 ml de Tween 20 cada 250 ml de solución. Se obtuvieron cuarenta y tres aislados monospóricos de muestras colectadas en los años 1993, 1994, 1996-1998, 2001-2003, 2005-2008. Se incluyó el aislado canadiense WRS 1903 caracterizado por Ghazvini y Tekauz (2007) para su comparación. El origen de los aislados aparece en el Cuadro 1.

Siembra, inoculación y registro de las respuestas de infección

Se sembraron 8-10 semillas de veintiocho genotipos de cebada (Cuadro 2), en macetas conteniendo una mezcla de tierra, sustrato y vermiculita en partes iguales. Las mismas permanecieron en una cámara de crecimiento controlados a 21 °C y 16 h de fotoperíodo, hasta su inoculación al comienzo del desarrollo de la segunda hoja Z 12 (Zadoks *et al.*, 1974). La fertilización y el riego se manejaron de modo que no fueron limitantes para el crecimiento normal de las plántulas. La inoculación se realizó con un atomizador De Vilbis a presión constante de 10 lb/in², posteriormente las plántulas permanecieron a 100% de humedad relativa y oscuridad, transcurridas 18 h fueron regresadas a las condiciones anteriores. Las respuestas de infección fueron registradas 8-10 días post-inoculación con la escala cualitativa de 9 dígitos desarrollada por Fetch y Steffenson (1999). Estas respuestas fueron agrupadas en tres categorías generales: de 1 a 3 se consideraron indicativas de baja compatibilidad hospedante-parásito, 4 y 5 intermedias, mientras que las respuestas comprendidas entre 6 y 9 se consideraron de alta compatibilidad. Todas las inoculaciones se repitieron tantas veces como fue necesario para proporcionar una caracterización inequívoca de las respuestas de infección. El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los tratamientos incluyeron un testigo inoculado con agua.

Cuadro 1. Aislados de *Cochliobolus sativus* según el año, cebada muestreada y localidad.

Número	Año	Cebada	Localidad
93.1	1993	Ana	Colonia
94.9	1994	NE 853-15	Young, Río Negro
96.10.1	1996	Defra	Young, Río Negro
96.10.2	1996	Defra	Young, Río Negro
98.1	1998	Clipper	Colonia
01.8	2001	M 6456	Paysandú
02.1.1	2002	Q.Ayelén	Paysandú
02.3.1	2002	I. Ceibo	Paysandú
02.7.1	2002	MUSA 936	Paysandú
02.7.2	2002	MUSA 936	Paysandú
02.8.2	2002	Clipper	Young, Río Negro
02.9.1	2002	Clipper	Paysandú
02.10.2	2002	N.Daymán	Paysandú
02.15.2	2002	N.Daymán	Paysandú
02.19.3	2002	N.Daymán	Paysandú
02.19.4	2002	N.Daymán	Paysandú
02.22.2	2002	NE 1695	Paysandú
02.23.2	2002	MUSA 016	Paysandú
02.24	2002	NE 5593-13	Paysandú
02.25.1	2002	Stirling	Paysandú
02.27.2	2002	ND 19840	Colonia
02.28	2002	Excel	Colonia
02.81.3	2002	NE 1695	Paysandú
02.81.4	2002	NE 1695	Paysandú
02.31.1	2002	E.Quebracho	Colonia
02.32.1	2002	CLE 164	Young, Río Negro
03.65.2	2003	MP 1007	Paysandú
05.6	2005	C 5/4202/5	Colonia
05.7	2006	I. Ceibo	Mercedes, Soriano
06.2	2006	I. Ceibo	Paysandú
06.3	2007	CLE 240	Young, Río Negro
07.4.2	2007	I.Ceibo	Dolores, Soriano
07.11.3	2007	S.I.	Paysandú
07.23.1	2007	Danuta	Young, Río Negro
07.25.5	2007	S.I.	Young, Río Negro
07.31.2	2007	CLE 254	Young, Río Negro
07.43.2	2007	Ambev 23	Young, Río Negro
07.49.1	2007	I.Ceibo	Risso, Soriano
07.53.2	2007	Danuta	Dolores, Soriano
07.501.2	2007	S.I.	Dolores, Soriano
07.503.2	2007	LE 2335	Dolores, Soriano
08.106	2008	Cruzamiento	Colonia
08.107	2008	853-15	Young, Río Negro
WRS 1903	2000	Winnipeg	Manitoba, Canadá

S.I. :sin información

Cuadro 2. Genotipos de cebada inoculados con *Cochliobolus sativus*.

Ackerman Laisa
Ackerman Madi
AMBEV 4
AMBEV 19
AMBEV 23
AMBEV 42
AMBEV 488
C 9215
C 9402
C 9609
C 9614
C 9616
C 97043
C 97050
CLE 232
Clipper
Danuta
Estero 2098
INIA Aromo
INIA Arrayán
INIA Ceibo
INIA Viraró
MUSA 936
Norteña Carumbé
Norteña Daymán
Perún
Quilmes Ainará
Scarlet

Resultados y discusión

Los datos obtenidos son presentados en el Cuadro 3 en el que las respuestas de infección se ordenaron de manera decreciente.

Los aislados 02.10.2 y 02.81.3 fueron los menos agresivos ya que exhibieron 84% de las respuestas de infección correspondientes a un bajo nivel de compatibilidad hospedante-parásito.

Se identificaron ocho aislados con ausencia de tipos de reacción de baja compatibilidad, pero diferentes entre sí teniendo en cuenta los otros dos tipos de reacción.

En cuanto a las cebadas, el nivel de resistencia varió entre 63,6% (C 97043) y 0% (AMBEV 23), con un importante rango de comportamientos diferentes, frente a este grupo de aislados. Se destaca la alta variabilidad intrínseca de la interacción entre los aislados y las cebadas estudiadas.

En las Figuras 1 y 2 se muestra el comportamiento de los cuarenta y cuatro aislados de *Cochliobolus sativus*, ordenados por agresividad creciente y las respuestas de infección de las veintiocho cebadas estudiadas.

Los aislados que mostraron menor agresividad fueron los siguientes: 02.10.2, 02.81.3, 07.503.2, 07.501.2, 02.32.1, 06.2 y 02.81.4 que indujeron respuestas de infección bajas en una frecuencia desde 84% a 60%. Entre los aislados más agresivos que solo indujeron respuestas de infección altas e intermedias se encontraron los siguientes: 02.25.1, 02.19.4, 98.1, 02.3.1, 02.24, 02.28, 96.10.2 y 01.8. Estos resultados indicarían la existencia de altos y muy diversos perfiles de agresividad de estos aislados de *C. sativus*.

En relación a las cebadas estudiadas, las mismas presentaron comportamientos altamente variable con niveles de resistencia muy bajos. Las cebadas que mostraron el mejor comportamiento fueron la línea experimental C 97043 con frecuencias de las respuestas de infección de 63,6%, 25% y 11,4% (bajas, intermedias y altas respectivamente), y el cultivar AMBEV 19 cuyas frecuencias de las respuestas de infección fueron 45,9%, 13,5% y 40,5% (bajas, intermedias y altas respectivamente). En el otro extremo, se destacó el cultivar AMBEV 23 porque no solo no exhibió ninguna respuesta de infección baja sino que mostró la mayor frecuencia de infección alta (94,9%). Por otro lado, entre el grupo de las cebadas de peor comportamiento se encontraron las siguientes líneas experimentales y cultivares: C 9609, Danuta, Perún, A. Madi, C 9215, C 9616, Scarlet, Clipper, I. Aromo, I. Arrayán, EST. 2098 e I. Ceibo y AMBEV 488. Las frecuencias de las respuestas de infección bajas de este grupo de cebadas variaron desde 2,7% a 25%; las respuestas intermedias fueron desde 16,2% a 61,4% mientras que las respuestas altas variaron desde 13,6% a 81,1%.

Estudios anteriores también reportaron altos niveles de virulencia en otra población patogénica para la mayoría del germoplasma de cebada estudiado (Gamba *et al.*, 2000; Gamba y Estramil, 2002). Los aislados y las cebadas utilizadas en este estudio no permitieron separar ningún grupo con comportamiento virulencia diferencial. Estos resultados difieren de otros estudios realizados previamente (Gamba y Estramil, 2002; Valjavec-Gratian y Steffenson, 1997a, 1997b) en los que se sugirió la existencia de tres grupos de aislados. Diferentes cebadas y aislados utilizados en estos estudios podrían explicar estas diferencias.

Continuar con estudios que incluyan otros aislados así como otros genotipos de cebada permitiría realizar una caracterización más completa de la composición de la población de *C. sativus*. Este conocimiento podrá ser útil en el

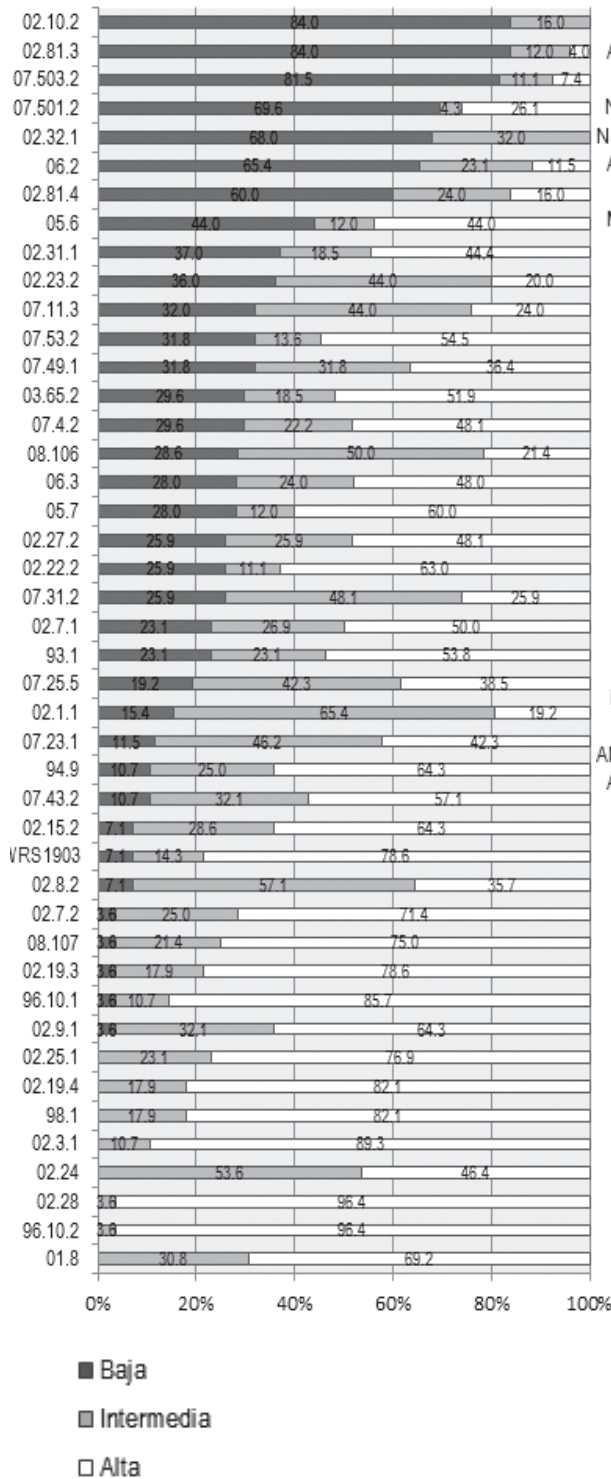


Figura 1. Caracterización de cuarenta y cuatro aislados de *Cochliobolus sativus*, como frecuencia de las diferentes tipos de respuestas de infección.

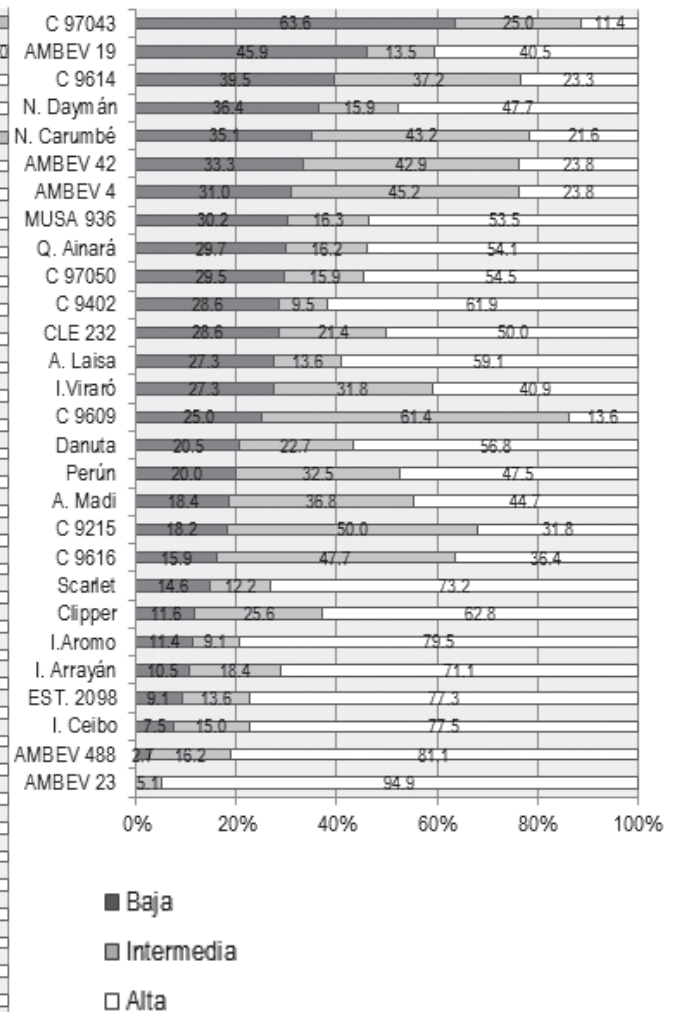


Figura 2. Respuestas de infección de veintiocho cebadas frente a cuarenta y cuatro aislados de *Cochliobolus sativus*.

desarrollo de estrategias de mejoramiento genético más dirigidas que permitan la obtención de cultivares de cebada con resistencia genética más efectiva y durable. Aislamientos de agresividad amplia y diversa, usados solos o en combinación, permitirán identificar y seleccionar cebadas con diferentes respuestas a este patógeno, que podrán tener distintos tipos de resistencia genética. El criterio de selección final dependerá del nivel de resistencia deseado en el cultivar. Llevar a cabo estos estudios requiere -entre otros aspectos- muestreos periódicos de la enfermedad con el objetivo de monitorear los perfiles de agresividad de estas poblaciones y en un futuro próximo poder actuar con anticipación a posibles cambios. Por otro lado, estos estudios contribuirán a fortale-

cer las actividades de control genético de esta enfermedad y al uso más racional de funguicidas.

Agradecimientos

A Andrej Tekauz (Agriculture and Agri Food Canada) por su continua cooperación y por proveer el aislado WRS 1903; a la Ing. Agr. (PhD) Clara Pritsch por sus valiosos aportes en la discusión del trabajo; al Ing. Agr (PhD) Ariel Castro y al Ing. Agr. Gerardo Camps (INASE) por proveer de semilla necesaria; a la Ing. Agr. (PhD) Silvia Pereira (INIA-EELE) por proveer aislados monospóricos de su colección.

Este trabajo fue financiado por la Mesa Nacional de Cebada y por el Proyecto FPTA 219.

Nota: Este trabajo se escribió en memoria del Profesor Titular de Fitotecnia Enrique Estramil por sus valiosos aportes en esta temática y por su contribución permanente en mi formación académica y personal.

Bibliografía

- Almgren I, Gustafsson M, Falt AS, Lindgren H, Lijeroth E. 1999. Interactions between root and leaf disease development in barley cultivars after inoculations with different isolates of *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Phytopathology*, 147: 331 - 337.
- Anonymous. 2005. September estimates of production of principal field crops, Canada, 2005. *Statistics Canada Field Crop Report Series*, 84: 13 - 24.
- Arabi MIE, Jawar M. 2004. Identification of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) isolates expressing differential virulence on barley genotypes in Syria. *Journal of Phytopathology*, 152: 461 - 464.
- Arias G. 1985. Mejoramiento genético y producción de cebada cervicera en América del Sur. Santiago de Chile : FAO. 157p.
- Castro M, Díaz M, Germán S, Vázquez D. 2010. Resultados experimentales de evaluación de cultivares de cebada cervicera período 2007-2008-2009. En: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de trigo, cebada, colza, triticale y trigo doble propósito de los últimos tres años: Período 2007-2008-2009. Montevideo: INASE, INIA. (Resultados experimentales: 2010), pp. 22 - 35.
- Christensen JJ. 1926. Physiological Specialization and Parasitism of *Helminthosporium sativum*. *Minnesota Agriculture Experimental Station Technical Bulletin*, 37: 101.
- Fetch TG, Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease*, 83: 213 - 217.
- Gamba F, Estramil E. 2002. Variation in virulence within an Uruguayan population of *Cochliobolus sativus*. In: Proceedings of the International Workshop on Barley Leaf Blights (2nd. Aleppo, Syria). pp. 59 - 62.
- Gamba F, Pritsch C, Ziminov M, Alonso O. 2010. Fenotipos de infección al estadio de plántula frente a diferentes aislamientos de *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* y *Cochliobolus sativus*. En: Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de cebada cervicera : Período 2009. Montevideo : INIA, INASE. pp. 32 - 34.
- Gamba F, Estramil E, Ilardía L. 2000. Pathogenic variability of *Cochliobolus sativus* in Uruguay. In: Proceedings of the International Barley Genetics Symposium (8th: Adelaide, Australia). pp. 115 - 116; v. 2
- Ghazvini H, Tekauz A. 2007. Virulence Diversity in the Population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease*, 91: 814 - 821.
- Kumar J, Schäfer P, Hüchelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein Najaran S, Kogel KH. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3: 185 - 195.
- Kwasna H. 1995. Ecology, taxonomy and nomenclature of *helminthosporia*-history and actual situation: In: Chelkowski J. [Ed.]. *Helminthosporia-Metabolites, Biology, Plant Diseases: Bipolaris, Drechslera, Exesohilum*. Poznan : Institute of Plant Genetics. pp. 27 - 69.
- Mathre D. 1997. Compendium of Barley Disease. 2nd ed. St Paul: The American Phytopathological Society. 90p.
- Meldrum SI, Ogle HJ, Platz GJ. 2004. Pathotypes of *Bipolaris sorokiniana* on Barley in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 109 - 114.
- Pereyra S. 2005. Uso de funguicidas en cebada. En: Jornada técnica de cultivos de invierno. Montevideo: INIA. (Actividades de Difusión; 404). pp. 5 - 9.
- Pereyra S. 1996. Enfermedades de cebada en Uruguay. En: Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo: INIA. (Serie Técnica 74). pp. 105 - 123.
- Pereyra S, Stewart S, Abadie T. 2003. Efecto de la rotación de cultivos en la población de *Bipolaris sorokiniana* en el suelo. En: Seminario 40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas. Colonia, Uruguay. Montevideo: INIA. (Serie Técnica 134). pp. 81 - 84.
- Pratt RG. 2003. First report of infection by *Bipolaris sorokiniana* in the South Eastern United States. *Plant Disease*, 87: 1265.
- Pritsch C, Albin J, Rodríguez S, Pravia V, Pereyra S, Gamba F. 2006. Genetic diversity of a local collection of *Cochliobolus sativus* revealed by RAPD analysis. In: Proceedings of the International Workshop on Barley Leaf Blights (3rd: Alberta, Canada). pp. 158.
- Steffenson BJ, Hayes PM, Kleinhofs A. 1996. Genetic of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. sp. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in Barley. *Theoretical Applied Genetics*, 92: 552 - 558.
- Tekauz A, Gilbert Mueller E, Stulzer M, Beyene M, Ghazvini H, Morgan K, Reverchon F. 2003. Survey for foliar diseases of barley in manitoba Manitoba in 2002. *Canadian Plant Disease*, 83: 60 - 61.
- Valjavec-Gratian M, Steffenson BJ. 1997a. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on Barley in North Dakota. *Plant Disease*, 81: 1275 - 1278.
- Valjavec-Gratian M, Steffenson BJ. 1997b. Genetics of Virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley. *Phytopathology*, 87: 1140 - 1143.
- Van Leur JG, Alamdar MZ, Khawatmi S. 1997. Effects of *Cochliobolus sativus* on yield of barley under experimental conditions in Northern Syria. *Australian Journal of Agriculture Research*, 48: 1 - 7.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6): 415 - 421.