

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Carrera Ingeniería Agronómica



Trabajo Final de grado

“Manchado del grano de trigo candeal: incidencia, micoflora y estudios bioquímicos en material del SE de la Pcia de Bs. As.”

Alumna: Cipollone, María Josefina

Legajo: 26539/3

Director: Ing. Agr. Sisterna, Marina

Lugar de realización: CIDEFI Curso de Fitopatología. Departamento de Ciencias Biológicas.

Modalidad: Trabajo de investigación

La Plata, 20 de Diciembre de 2016.

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Hipótesis	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS.....	19
Incidencia.....	19
<i>La Dulce</i>	19
<i>Miramar</i>	20
Sanidad de las muestras.....	23
<i>La Dulce</i>	26
<i>Miramar</i>	27
Peroxidasas.....	28
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO 1	38
ANEXO 2	42
ANEXO 3	46

RESUMEN

La producción del trigo candeal está destinada a la obtención de harinas y sémolas para la elaboración de fideos frescos y secos principalmente, teniendo el manchado del grano de trigo una gran incidencia en la calidad harinera. El objetivo del trabajo fue cuantificar la incidencia de la enfermedad en nueve variedades de trigo candeal sembradas en La Dulce y Miramar en dos épocas de siembra, y aislar e identificar a nivel de género el complejo fúngico asociado a la enfermedad, a través del método de APG siguiendo las normas ISTA. Se determinó la actividad enzimática (peroxidasas) en granos de todas las variedades de la primer época de siembra en Miramar, tomando como testigo granos completamente sanos y totalmente enfermos, a través de la oxidación del guayacol (polifenol).

La incidencia presentó diferencias entre localidades y entre épocas de siembra. La variedad N°8 Buck Granate fue quien presentó el mayor % de incidencia. Se determinó un elevado % de infección de hongos del género *Alternaria*, con gran variabilidad entre cepas. También se identificaron hongos de los géneros *Bipolaris*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Stemphylium*.

La cuantificación de la actividad de peroxidasas no presentó diferencias en las variedades, como tampoco en los testigos granos machados y granos sanos.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum* sp.) pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae) y en la producción mundial es el tercer cereal de importancia, detrás del maíz y el arroz. Es el cereal más ampliamente consumido en el occidente desde la antigüedad. Con una producción mundial de 725.000.000 tn., la mayor contribución es realizada por países que forman la Unión Europea (principalmente Francia y Alemania), seguido en importancia por China, India, Rusia y USA (Figura 1). La totalidad de hectáreas sembradas en el mundo fue de 219.000.000 ha en el período 2014-2015.

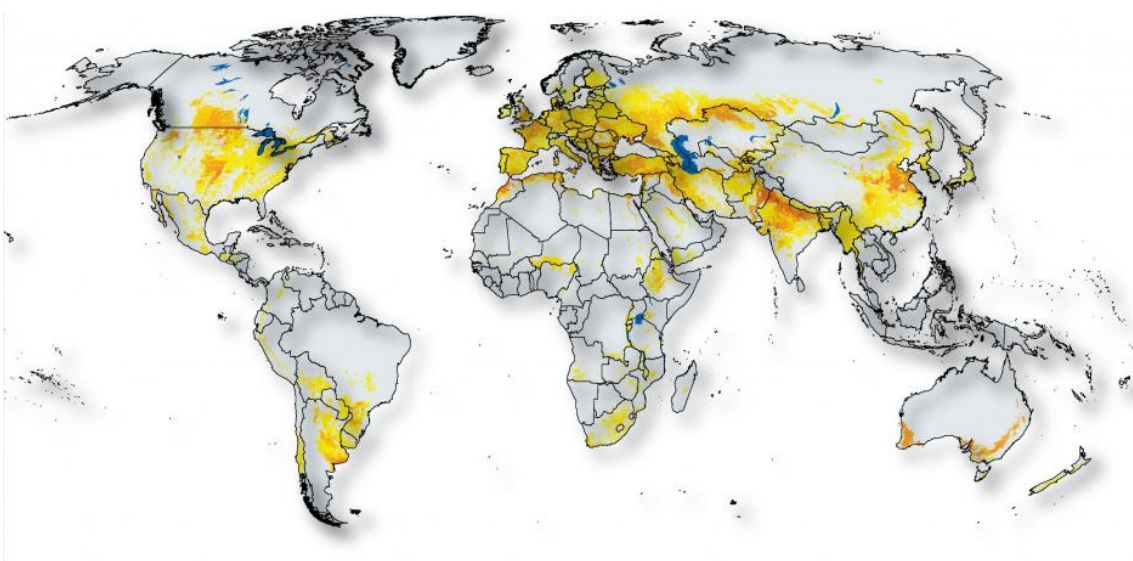


Figura 1: Producción de trigo en el mundo.

Con respecto al trigo candeal *Triticum durum* Desf., mundialmente se cultivan 18.5 millones de hectáreas, que producen entre 35 y 40 millones de toneladas y representan un 8% de la producción total (Figura 2). Canadá (más del 50%), Europa y USA son los mayores exportadores de trigo candeal destinado en gran parte a Italia, USA, norte de África (Argelia, Marruecos, Túnez), Venezuela y Japón (Seghezzo, 2015).

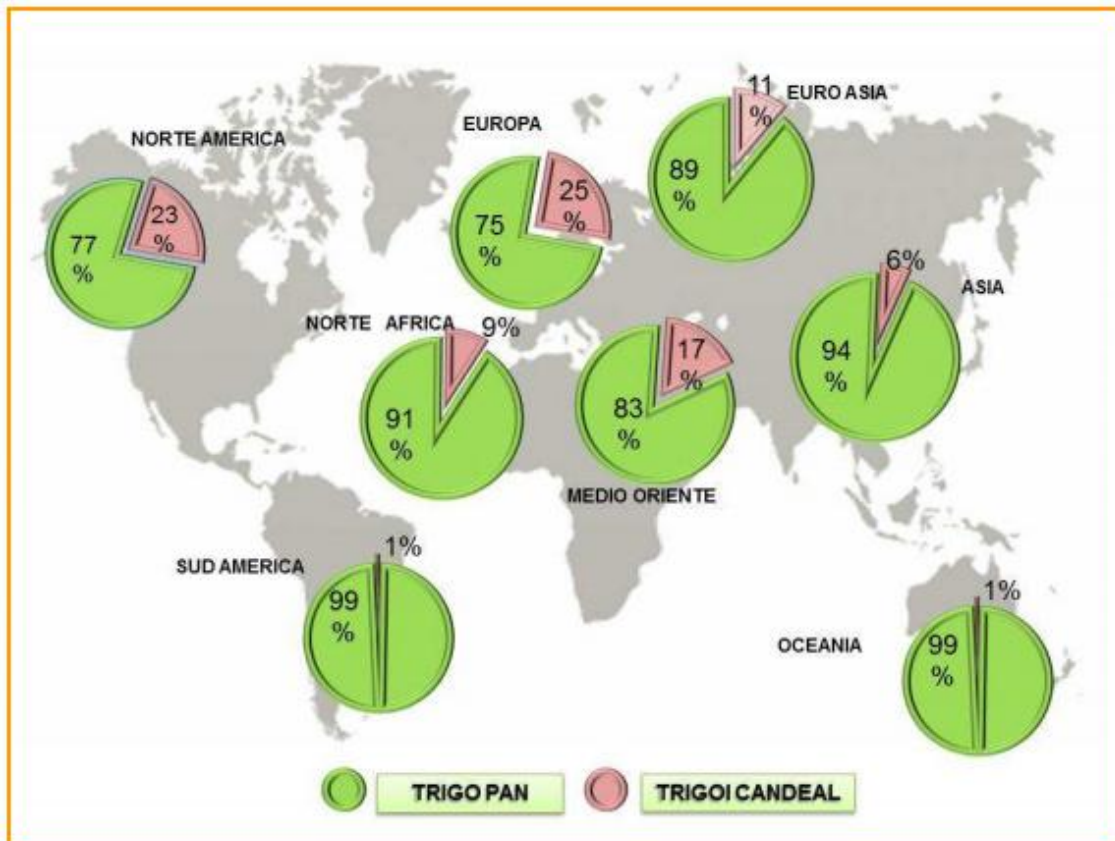


Figura 2: Producción mundial de trigo pan vs trigo candeal (International Wheat Council 2006; Seghezzo 2015).

En Argentina, la variedad de trigo más cultivada es la de trigo pan (*Triticum aestivum* L.). Por las condiciones agroecológicas diferenciales, la región triguera se extiende desde los 25° de Lat. Sur hasta los 40°, y de este a oeste abarca de los 58° a los 66° de Long. Oeste. La zona triguera tradicional está limitada al norte por la isoterma de 13°C de julio mientras que en el sur lo es por la de 7°C. Pueden identificarse las siguientes subregiones trigueras de acuerdo a las características locales de suelo y clima (Figura 3):

-Subregión I: comprende el centro de Santa Fé y el departamento cordobés de San Justo. En el extremo sur de la región se halla la mayor concentración del cultivo, asociada con la alternativa trigo-soja 2ª.

-Subregión II Norte: comprende un sector del NE de la provincia de Buenos Aires, el Sur de Santa Fé y los departamentos de Unión y Marcos Juárez de Córdoba.

- Subregión II Sur: es una región netamente bonaerense.
- Subregión III: comprende la provincia de Entre Ríos.
- Subregión IV: se ubica en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, integrada por los partidos que van desde General Pueyrredón hasta Tres Arroyos.
- Subregión V Norte: comprende casi la totalidad de la provincia de Córdoba, con excepción de los departamentos de General Roca (V Sur), Marcos Juárez y Unión (II Norte) y San Justo (I). Incluye también el norte de San Luis y el sur de Santiago del Estero.
- Subregión V Sur: ocupa 16 departamentos de La Pampa, uno de Córdoba (General Roca) y 15 del oeste y sur bonaerense.

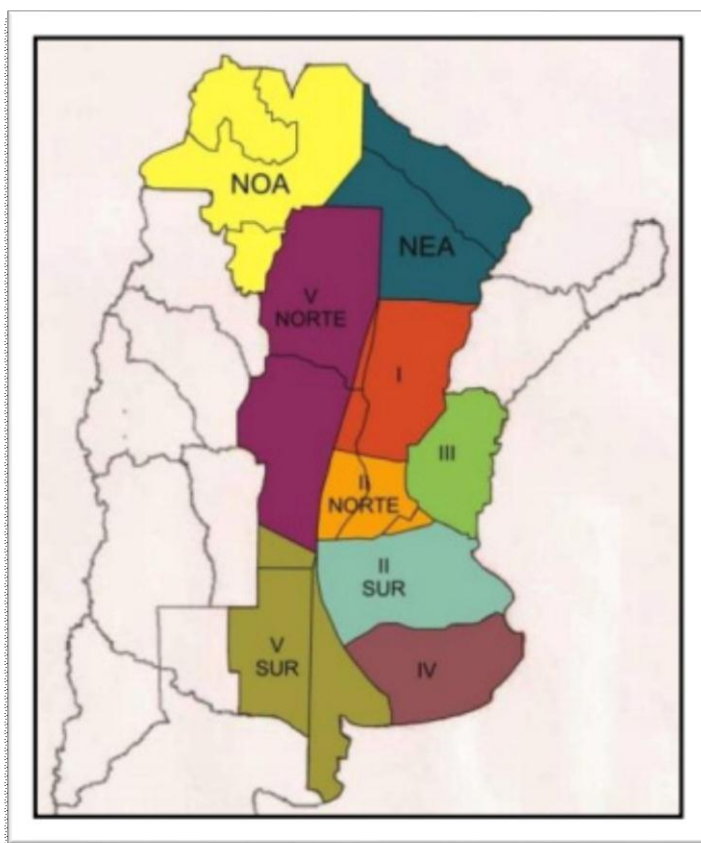


Figura 3: Regiones de cultivo de trigo pan en Argentina.

Con respecto al trigo candeal, la siembra se realiza desde julio a mediados de agosto con una cosecha en diciembre. Su producción se localiza en el sudeste y centro sur de

la provincia de Buenos Aires correspondiente a las subregiones trigueras IV y V sur. El área de cultivo se divide en tres subregiones (Figura 4):

-Sudeste con centro en Balcarce y Miramar (1 y 2), correspondiente al área papera, con suelos de mayor fertilidad natural. Esta es la subregión con mayor potencial de rinde pero con riesgos sanitarios (fusariosis, escudete negro) y con problemas de calidad de grano, principalmente lavado, debido a las abundantes lluvias y la consiguiente mayor humedad.

-Centrosur con centro en La Dulce y Barrow (3 y 4), zona mixta-cerealera, es el área más tradicional del cultivo de trigo candeal. Presenta una gran heterogeneidad de suelos.

-Sudoeste con centro en Cabildo y Bordenave (5 y 6), de características más frías y secas, con una fuerte presencia de cultivos de granos finos.

En las últimas dos subregiones, si bien los rendimientos son menores que la subregión Sudeste, también es menor el riesgo fitosanitario y por ende se puede lograr buena calidad comercial e industrial.

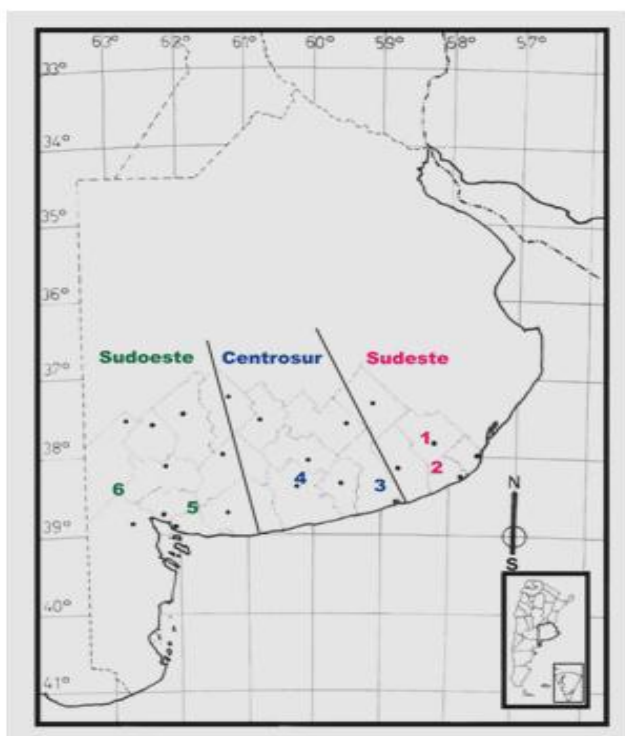


Figura 4: Subregiones de cultivo de trigo candeal.

Hay que mencionar que el cultivo de trigo candeal ha dejado de ser estrictamente regional con la incorporación de áreas bajo riego en la provincia de San Luis y 10.000 hectáreas en Tucumán, debido a la instalación de un importante molino y fábrica de pastas (Seghezzo, 2015).

Según datos del Ministerio de Agroindustria de la Nación (Figura 5), el promedio de la superficie sembrada en los últimos años es de 55.000 hectáreas aproximadamente y la producción ronda las 150.000 tn/año, con variaciones interanuales importantes debido principalmente a las condiciones agroclimáticas.

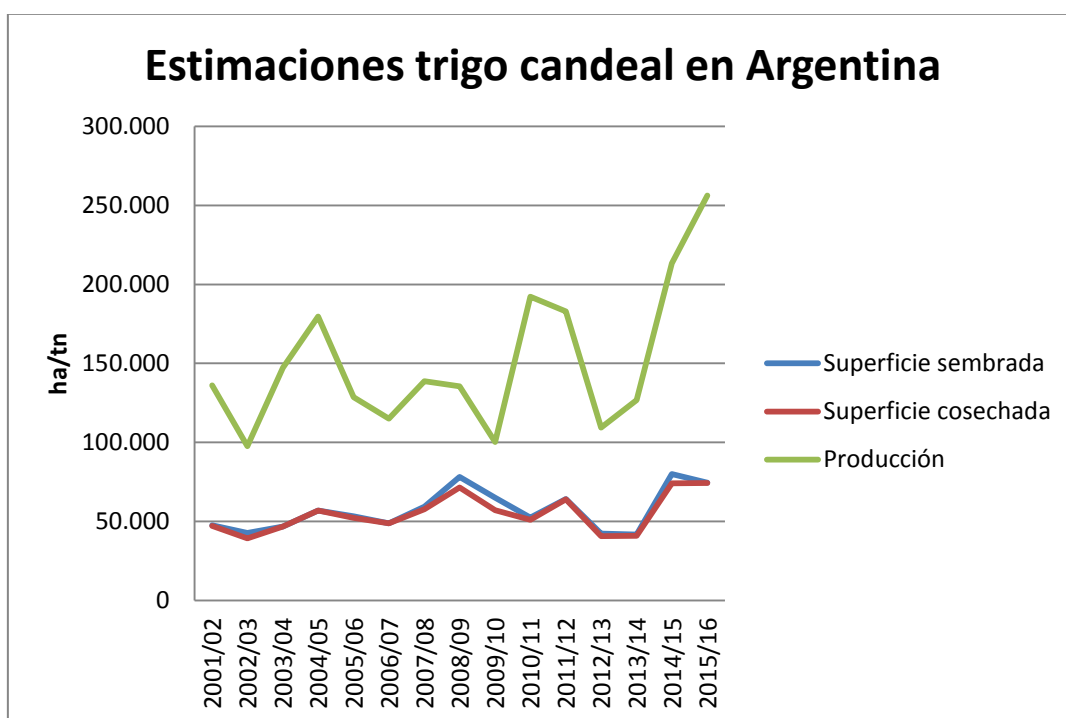


Figura 5: Estimaciones de la producción, y superficie sembrada y cosechada de trigo candeal (Ministerio de Agroindustria de la Nación, 2016).

La producción del trigo candeal está destinada a la obtención de harinas y sémolas para la elaboración de fideos frescos y secos, principalmente porque presenta el doble de pigmento amarillo que el trigo pan lo que garantiza el color amarillo buscado en los fideos. Además los trigos candeales, por las características del endosperma, dan

mayor rendimiento de sémola, requieren menor cantidad de agua para su amasado (siendo esto una ventaja cuando las pastas se secan), y los fideos realizados no se desintegran al ser hervidos debido a que tienen una mayor estabilidad. Por lo mencionado anteriormente un grano de calidad molinera debe ser grande, uniforme y de endosperma vítreo. La presencia de granos dañados, descoloridos y de panza blanca reducen el rendimiento y la calidad de las sémolas.

Para apreciar la calidad de la pasta se consideran aspectos visuales como la coloración, que debe ser amarilla y uniforme, sin puntos oscuros. Es aquí donde cobra importancia el manchado del grano de trigo ya que esta enfermedad provoca serias pérdidas porque reduce la calidad del grano debido a la coloración o arrugado del mismo. La harina, la sémola y los subproductos obtenidos a partir de granos enfermos, frecuentemente contienen pecas negras y partículas coloreadas que pasan a la harina perdiendo valor comercial (Dexter y Matsuo 1982; Lorenz 1986).

El manchado del grano de trigo (Figura 6) se caracteriza por una coloración parda o negra en áreas próximas al embrión, conocida como “escudete negro” (blackpoint), aunque en ataques importantes también puede extenderse al área circundante, al surco o al cepillo (kernel smudge) (Mathur y Cunfer, 1993). El trigo candeal generalmente es más afectado que el trigo pan (Machacek y Greaney 1938; Graney y Wallace, 1943).

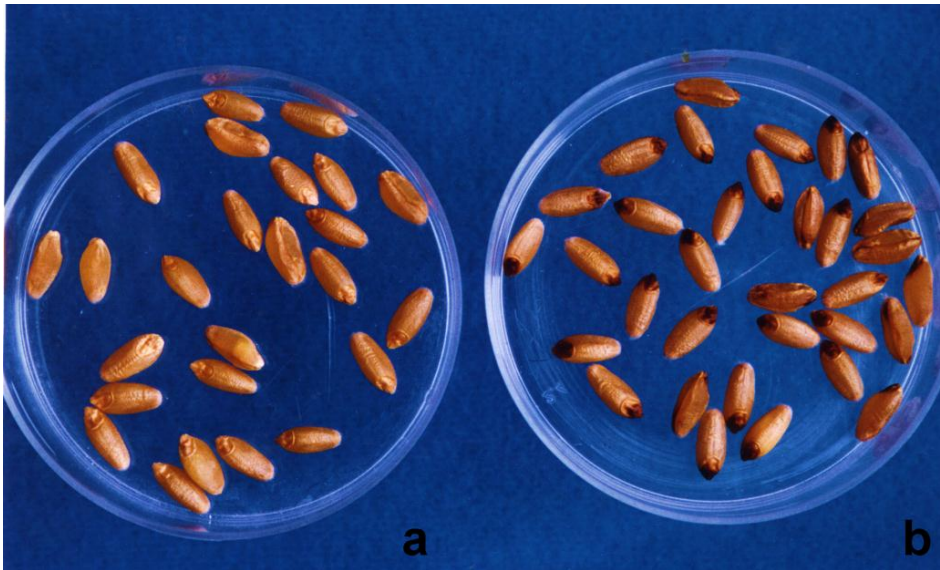


Figura 6: Granos sanos (a) vs. Granos con síntoma de manchado (b).

No habría una sola causa relacionada con los síntomas de manchado. A través de los años, las evidencias más fuertes se han inclinado hacia la infección fúngica. Se ha registrado un complejo de hongos, en su mayoría dematiaceos (hongos con estructuras vegetativas y reproductivas de color pardo oscuro), como *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Exserohilum* spp., y el género *Fusarium* spp. (con micelio y esporas hialinas) (Mathur y Cunfer, 1993; Özer, 2005; Wiese, 1987). Una microflore débil acompaña estos patógenos en los granos de trigo (Sisterna y Lori, 2005), coparasitando la semilla. Difieren en agresividad y están ampliamente distribuidos (Zillinsky, 1983). Generalmente no penetran la semilla y no le ocasionan daño. Pero, bajo ciertas condiciones, pueden pasar de un hábito saprofitario a un tipo de vida parasítica, penetrando al interior de la semilla, dañando su calidad y vigor (Löiveke *et al.* 2004). Los géneros más comúnmente registrados son *Acremonium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Stemphylium*, *Torula*, *Trichothecium*, *Ulocladium* (Neergaard, 1979; Warham *et al.*, 1999; Wiese, 1987). También, otros géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*, pueden causar coloración de la semilla en almacenamiento resultando en fallas de germinación, embriones dañados y producción de micotoxinas (Malaker *et al.* 2008).

El género ***Alternaria*** (Figura 7) abarca especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tales como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados (Carrillo, 2003). En los cultivos de cereales las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración subepidérmica, si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. El hongo se localiza en las glumas y causa manchas negras y cuando coloniza el endosperma contribuye a reducir la calidad del grano.

En la Argentina, el manchado de grano se asocia especialmente a la especie *A. alternata*. En los últimos años, los relevamientos efectuados en diferentes cultivares y regiones ecológicas trigueras indican la presencia de aislamientos de *Alternaria* pertenecientes a grupos de especies diferentes a *alternata*, tales como *tenuissima* e *infectoria*. Esto indicaría que muchos aislamientos identificados inicialmente como *A. alternata* fueron confundidos, o erróneamente clasificados. Esto podrá deberse también a la aparición de nuevos taxa por el cambio climático, los nuevos escenarios productivos y los nuevos paradigmas tecnológicos. Se considera al manchado de grano una enfermedad emergente, en diferentes cultivares de trigo, con riesgo de incrementar su incidencia y dispersión especialmente en ambientes climáticos con monocultivo y siembra directa (Perelló *et al.*, 2012).

Microscópicamente se observan conidióforos simples, tabicados, de forma alargada. En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color pardo, con septos transversales y longitudinales (muriformes) de disposición irregular. Macroscópicamente presentan un aspecto veloso, al principio de color gris, después adquieren tonos negros oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia (Ellis, 1971).



Figura 7: Conidios de *Alternaria* spp

El género ***Bipolaris*** incluye importantes patógenos de plantas con distribución mundial. La característica distintiva de las especies del género *Bipolaris* es la producción de macroconidios multicelulares, elípticos a ovalados, de pared gruesa con superficies lisas, nacidos de conidióforos geniculados en una disposición simpodial (Figura 8). La designación *Bipolaris* surge de la propiedad de formar tubos germinales que se originan desde ambos extremos de los macroconidios en paralelo con el eje longitudinal de la célula (Koneman *et al.*, 2008).

Las colonias en medio de cultivo varían en coloración, desde tonalidades blanquecinas o claras, hasta gris oscuro siendo la más frecuente la coloración marrón olivácea oscura. Esta pigmentación oscura de la colonia ha mostrado una fuerte correlación con la agresividad del patógeno.



Figura 8: Conidios de *Bipolaris* spp.

Las especies de ***Drechslera*** (Figura 9 A) también se caracterizan por la producción de macroconidios multicelulares y cilíndricos que nacen en conidióforos geniculados pero, a diferencia de *Bipolaris*, los conidios germinan por el ápice y los laterales de las células que los componen. Resulta difícil aislar y hacer esporular los hongos de este género en medios de cultivo ya que en la mayoría de los casos tiende a formar rápidamente la fase sexual (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005). Los macroconidios del género ***Curvularia*** son más fáciles de reconocer en comparación a los de *Bipolaris* y *Drechslera* debido a que tienen cuatro a cinco células separadas por tabiques transversales con la célula central más grande que la de los extremos dándole apariencia curva (Figura 9 B).

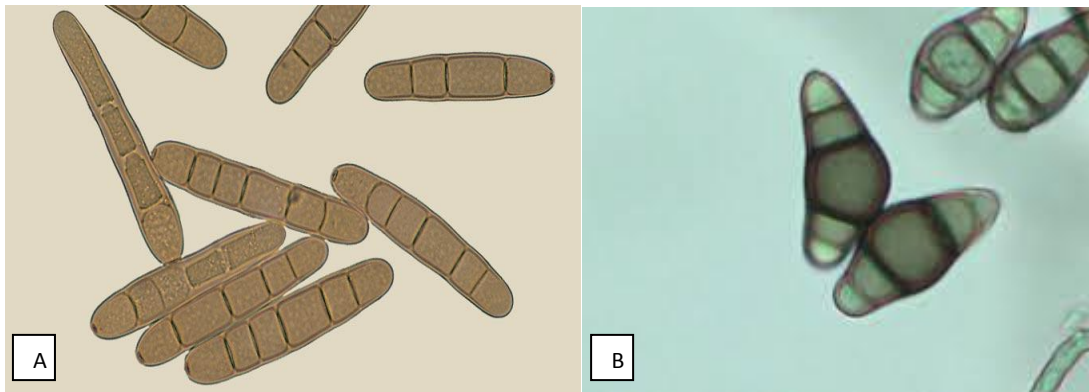


Figura 9: A-Conidios de *Drechslera* spp. B- Conidios de *Curvularia* spp.

El género ***Fusarium*** presenta generalmente colonias algodonosas o vellosas (micelio aéreo abundante) cuya coloración depende de la especie y puede ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc. Son hongos filamentosos hialinos que producen microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los macroconidios son las esporas más importantes para la identificación y suelen ser multicelulares, largos, con forma de hoz, cuyas células están separadas por tabiques transversales, descritos como “canoas” o “barcos” (Figura 10).



Figura 10: Conidios de *Fusarium* spp.

Con respecto a la micoflora débil podemos mencionar al género ***Nigrospora*** (Figura 11A) que desarrolla conidios unicelulares, castaños, de forma globosa o subglobosa, sobre conidióforos simple cortos, oscuros y algo ensanchados, con micelio aéreo de crecimiento radial, blanquecino a grisáceo (Batalla, 2014). También ***Epicoccum* spp.** (Fig. 11B) que presenta formación de esporodoquios pequeños de color castaño rojizo a oscuros; los conidios son unicelulares, globosos a subglobosos, multiseptados, de color castaño rojizo, con la pared espinulescente; conidióforos cortos, de color castaño oscuro (Batalla, 2014).

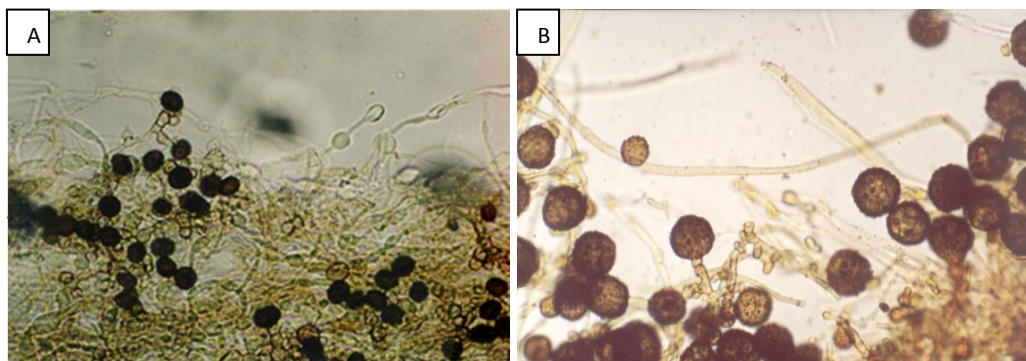


Figura 11: A-Conidióforos y conidios de *Nigrospora* spp. B- Conidióforos y conidios de *Epicoccum* spp.

***Stemphylium* spp.** produce macroconidios muriformes (con tabiques transversales y longitudinales), que nacen de modo individual de un conidióforo no geniculado y recto, levemente dilatados y redondeados en la punta (Figura 12A). ***Cladosporium* spp.**

(Figura 12B) presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena.

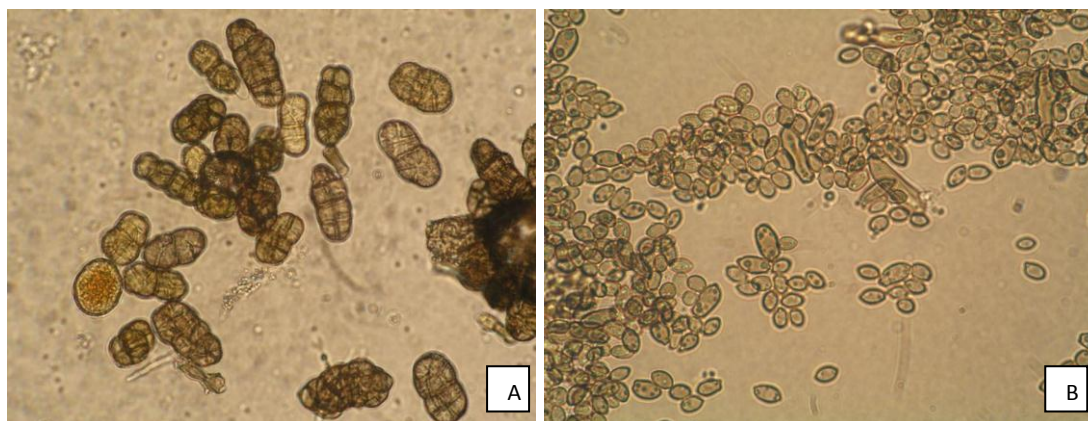


Figura 12: A- Conidios de *Stemphylium* sp. B- Conidios de *Cladosporium* sp.

La evidencia de la asociación fúngica con el síntoma fue con frecuencia contradictoria dentro de la literatura (Jacobs y Rabie, 1987; Kaan *et al.*, 1995). Los estudios del origen de esta patología se comenzaron a enfocar entonces hacia la bioquímica de la coloración (Hadaway, 2002; Sulman *et al.* 2001). Numerosos trabajos en tejidos vegetales sugieren que muchas de las reacciones de coloración pueden ser debidas a la oxidación de compuestos fenólicos (Kaan *et al.* 1995). Los síntomas de escudete se encuentran usualmente en el embrión del grano y se ha sugerido que esto puede ser debido a que enzimas como las peroxidadas, conocidas por catalizar la formación de productos fenólicos coloreados, se localizan en esta región del grano (Williamson, 1997). En cebada, se ha observado que las peroxidadas de la aleurona producen la oxidación de fenoles durante el proceso de germinación y que son responsables de la acumulación de material marrón-dorado en las paredes de las células que se desgarran cuando el tejido es roto por el embrión que germina (Cochrane, 1994a,b). Por otro lado, existen fuertes evidencias de que estas enzimas estarían implicadas en

respuestas de defensa a la entrada de microorganismos patógenos mediante su rol en la formación de lignina y suber (Morohashi, 2002).

En la Argentina, si bien el manchado del grano se ha registrado desde hace muchos años, la incidencia natural de esta enfermedad ha aumentado, probablemente debido a un efecto de interacción entre la fertilización nitrogenada y los sistemas de labranza.

El presente trabajo permitió estudiar varios aspectos relacionados con la enfermedad, como la incidencia de la misma en la zona de producción típica de trigo candeal y la micoflora asociada a esta patología. Además se estudió el mecanismo bioquímico del manchado, mediante el rol que cumplen las enzimas peroxidasas.

Hipótesis

- El manchado del grano muestra diferencias en los materiales genéticos y localidades, en cuanto a su incidencia.
- La micoflora en granos manchados está en función de la genética del hospedante.
- El manchado es provocado por la actividad de peroxidasas que se visualizan por reacciones colorimétricas.

Objetivo general

Estudiar el manchado, su micoflora y las alteraciones bioquímicas que los hongos provocan en el grano de trigo candeal del Sudeste de la Provincia de Buenos Aires.

Objetivos particulares

- Determinar la incidencia del manchado en el grano de trigo en diferentes materiales genéticos.
- Aislar e identificar la micoflora asociada al mismo.
- Determinar la actividad de peroxidasas por métodos colorimétricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 9 variedades de trigo candeal (3 repeticiones por variedad) provenientes de ensayos realizados en la Chacra Experimental Integrada de Barrow, durante la campaña 2014/2015 en Miramar y La Dulce (Provincia de Buenos Aires), en dos épocas de siembra.

Las 9 variedades pertenecen a 3 criaderos: las variedades BONAERENSE INTA son de Barrow, las BUCK son del criadero Buck Semillas y las ACA son de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA). Las variedades son:

- 1- BONAERENSE INTA FACÓN
- 2- BUCK TOPACIO
- 3- BUCK ESMERALDA
- 4- BONAERENSE INTA CARILÓ
- 5- BUCK PLATINO
- 6- ACA 1801F
- 7- ACA 1901F
- 8- BUCK GRANATE
- 9- BONAERENSE INTA QUILLÉN

- En laboratorio:

Se realizó el análisis de sanidad de granos para lo cual:

- 1- Se cuantificó la incidencia de la enfermedad (porcentaje de granos enfermos en relación al total) en muestras de 200 granos por cada repetición, evaluando en cada muestra la presencia o ausencia de la enfermedad a ojo desnudo. Para ello se realizó el promedio de las tres repeticiones obteniendo el porcentaje de granos manchados de la variedad.
- 2- Se analizó la sanidad de las muestras (tres repeticiones de 100 granos cada una) mediante el método de APG (agar papa glucosado al 2 %), siguiendo las normas ISTA (International Seed Testing Association, Neergaard 1979). Los granos de trigo, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, se sembraron en cajas de Petri estériles conteniendo APG y se incubaron en cámara de cría climatizada ($21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; 75% HR; 12h de luz + UV/12 h de oscuridad). Se utilizaron 7 cajas de Petri por repetición, sembrando 15 granos en cada una. Se evaluaron en lupa estereoscópica a los 5-7 días después de la siembra y se determinó el porcentaje de granos contaminados y/o patogenizados por agentes fúngicos (en una de las siete cajas de Petri por cada repetición se descartaron 5 granos al azar). Se identificaron a nivel de género los principales hongos aislados mediante bibliografía específica.

Reacciones bioquímicas:

- 1- Se evaluó la actividad enzimática a través de la aparición de una coloración rosa-marrón como resultado de la actividad de la oxidación del guayacol en presencia de las peroxidasas (Dann and Deverall, 2000; Hadaway *et al.*, 2003). Se analizaron granos de todas las variedades de la primera época de siembra en Miramar, tomando como testigos granos totalmente enfermos y granos totalmente sanos. Para ello se utilizaron 5 g. de granos de cada variedad, los cuales se molieron. Del resultado de la molienda se tomaron 0,2 g de cada tratamiento los cuales se colocaron en tubos Eppendorf, con 1 ml de una

solución de Sacarosa al 20%. El extracto de grano se obtuvo, luego de una hora de agitación en un agitador rotatorio (Shaker) y posterior centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 25 µL de dicho extracto y se colocaron en una cubeta a la cual se le añadieron 0,25 mL de H₂O₂ 0,38 M, 1 mL de fosfato de sodio buffer pH 5,8 0,2 M y 25 µL de guayacol 0,02 M. Se determinó en forma cuantitativa la absorbancia en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 470 nm durante 150 segundos con intervalos de 10 segundos, calculándose la variación de absorbancia en un minuto.

- Análisis de los datos: Se realizó el análisis de la varianza (ANNOVA) de los valores medias de incidencia a través del programa Infostat (2008), para todas las variedades en ambas localidades en las dos épocas de siembra.

RESULTADOS

Incidencia

La incidencia promedio registrada para todas las muestras en ambas localidades para las dos épocas de siembra fue de **27,2%**.

La Dulce

En la primera época de siembra, se determinó que de las 9 variedades la que presentó mayor incidencia fue la variedad N°8 (BUCK GRANATE) con 36,8%, seguido de la variedad N°9 (BONAERENSE INTA QUILLÉN) con 30,3% y la variedad N°4 (BONAERENSE INTA CARILÓ) con 30,17% (Figura 13).

En la segunda época de siembra la variedad N°8 (BUCK GRANATE) es también la que presentó el mayor porcentaje de incidencia con 38,8%, seguido de la variedad N°3 (BUCK ESMERALDA) con 38% y la variedad N°9 (BONAERENSE INTA QUILLÉN) con 34% (Figura 14).

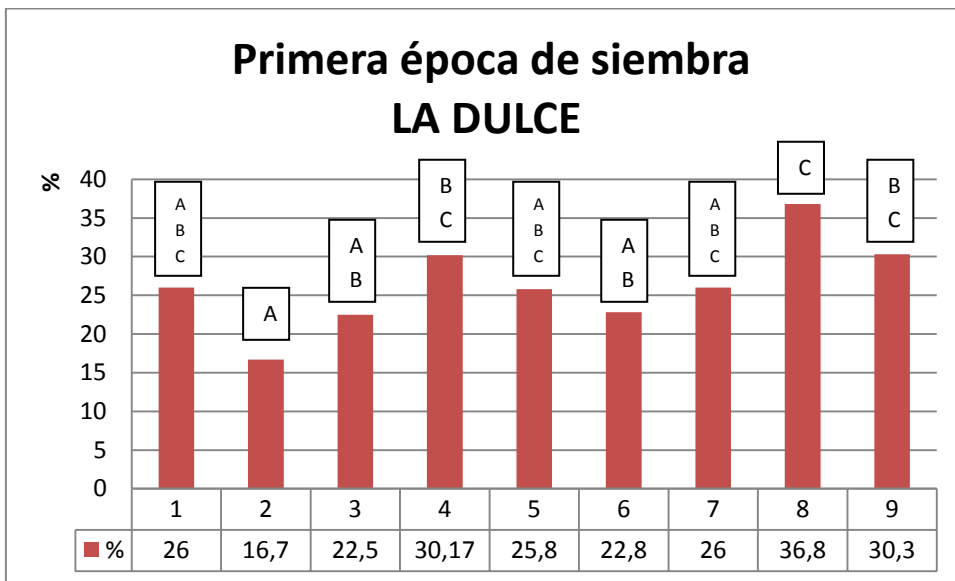


Figura 13: Incidencia entre variedades en la primera época de siembra.

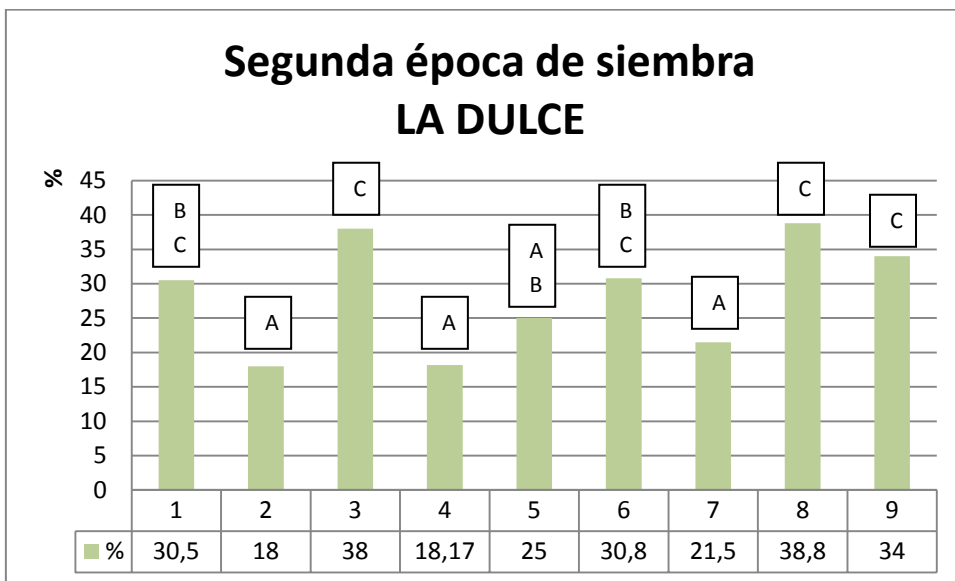


Figura 14: Incidencia entre variedades en la segunda época de siembra.

Miramar

Se determinó que en la primera época de siembra la variedad que presentó mayor incidencia fue la variedad N°8 (BUCK GRANATE) con 40,7%, luego la variedad N°9 (BONAERENSE INTA QUILLÉN) con 36,7% y la variedad N°4 (BONAERENSE INTA CARILÓ) con 35,5% (Figura 15).

En la segunda época de siembra la variedad N°8 (BUCK GRANATE) también presentó la mayor incidencia de manchado con 38%. Con 33,8% la variedad N°9 (BONAERENSE INTA QUILLÉN) se ubica en el segundo lugar, seguido de la variedad N°4 (BONAERENSE INTA CARILÓ) con 26,5% de incidencia (Figura 16).

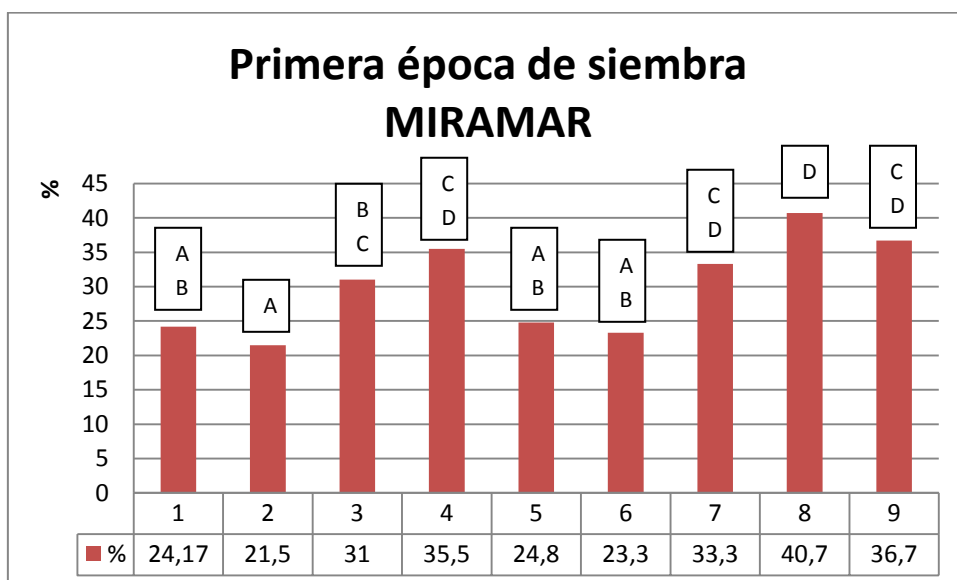


Figura 15: Incidencia entre variedades en la primera época de siembra.

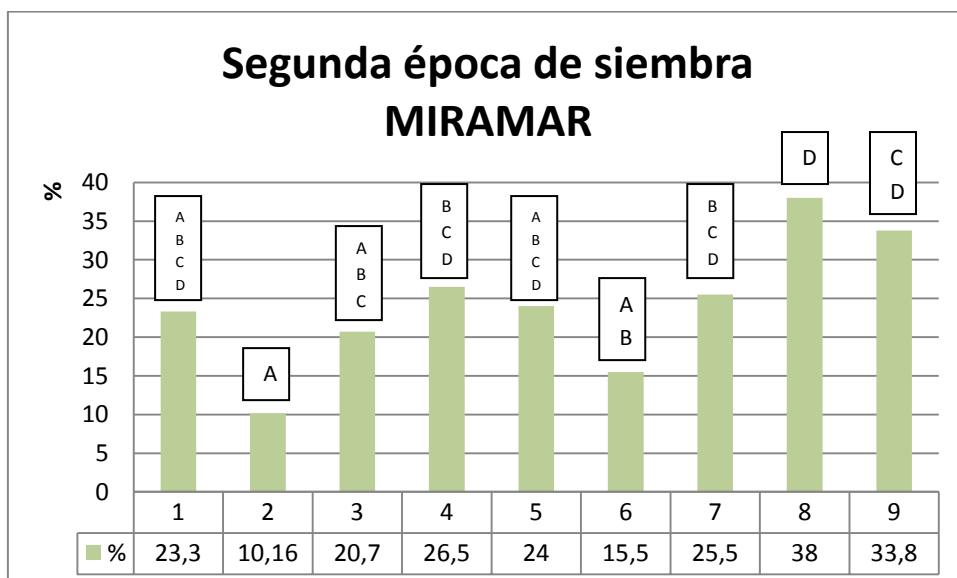


Figura 16: Incidencia entre variedades en la segunda época de siembra.

Comparando los resultados de incidencia de ambas localidades, en la primera época de siembra se observó una mayor incidencia en Miramar (promedio 30,11%) (Figura

17) mientras que en la segunda época de siembra donde se presentó mayor incidencia fue en La Dulce (promedio 28,30%) (Figura 18).

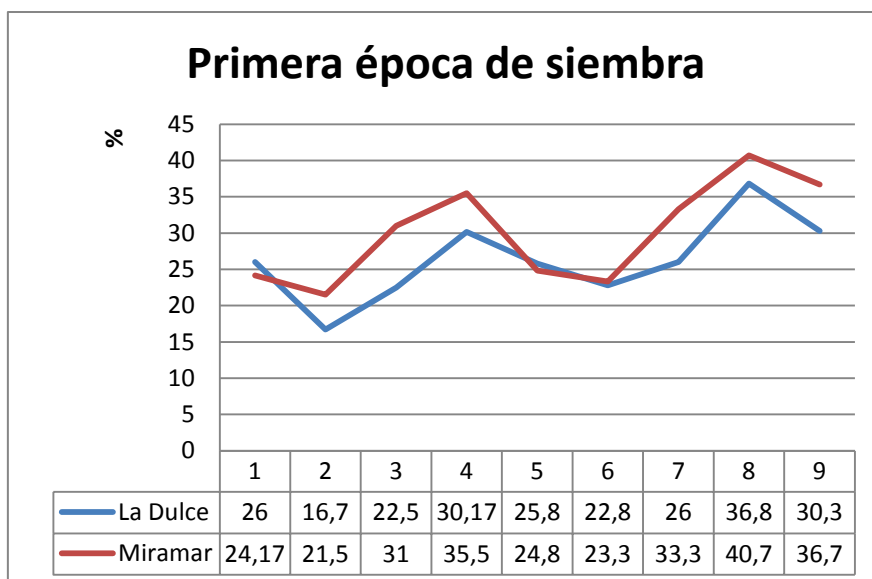


Figura 17: Incidencia en la Primera época de siembra.

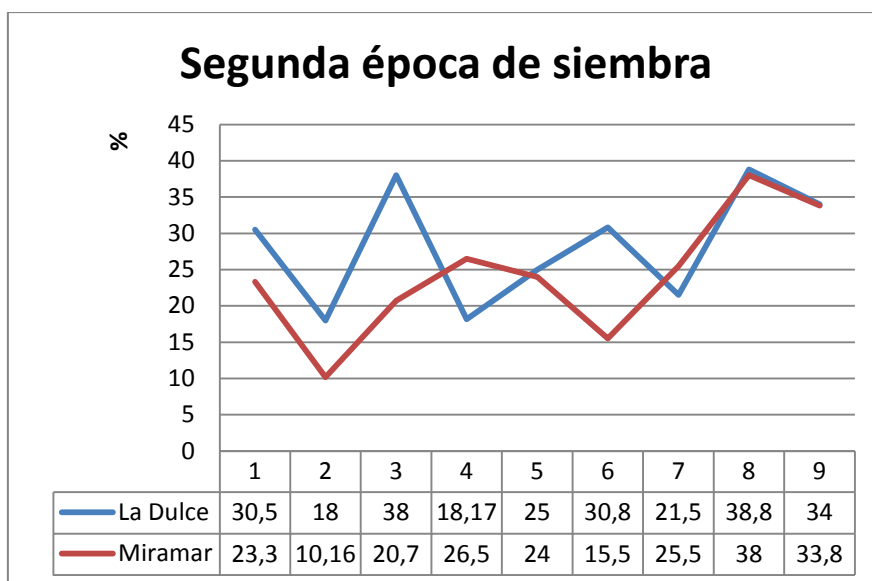


Figura 18: Incidencia en la Segunda época de siembra.

Luego del análisis de la varianza (Anexo 1) se pudo determinar que existen diferencias significativas entre la variedad N°2 y la variedad N°8 coincidiendo este resultado en las dos localidades tanto en la primer época de siembra como en la segunda.

Sanidad de las muestras

En los ensayos *in vitro* en APG predominó la infección fúngica con hongos del género *Alternaria*. Se visualizó cierta variabilidad entre las cepas (Figura 19), siendo *A. alternata* la especie más frecuente.

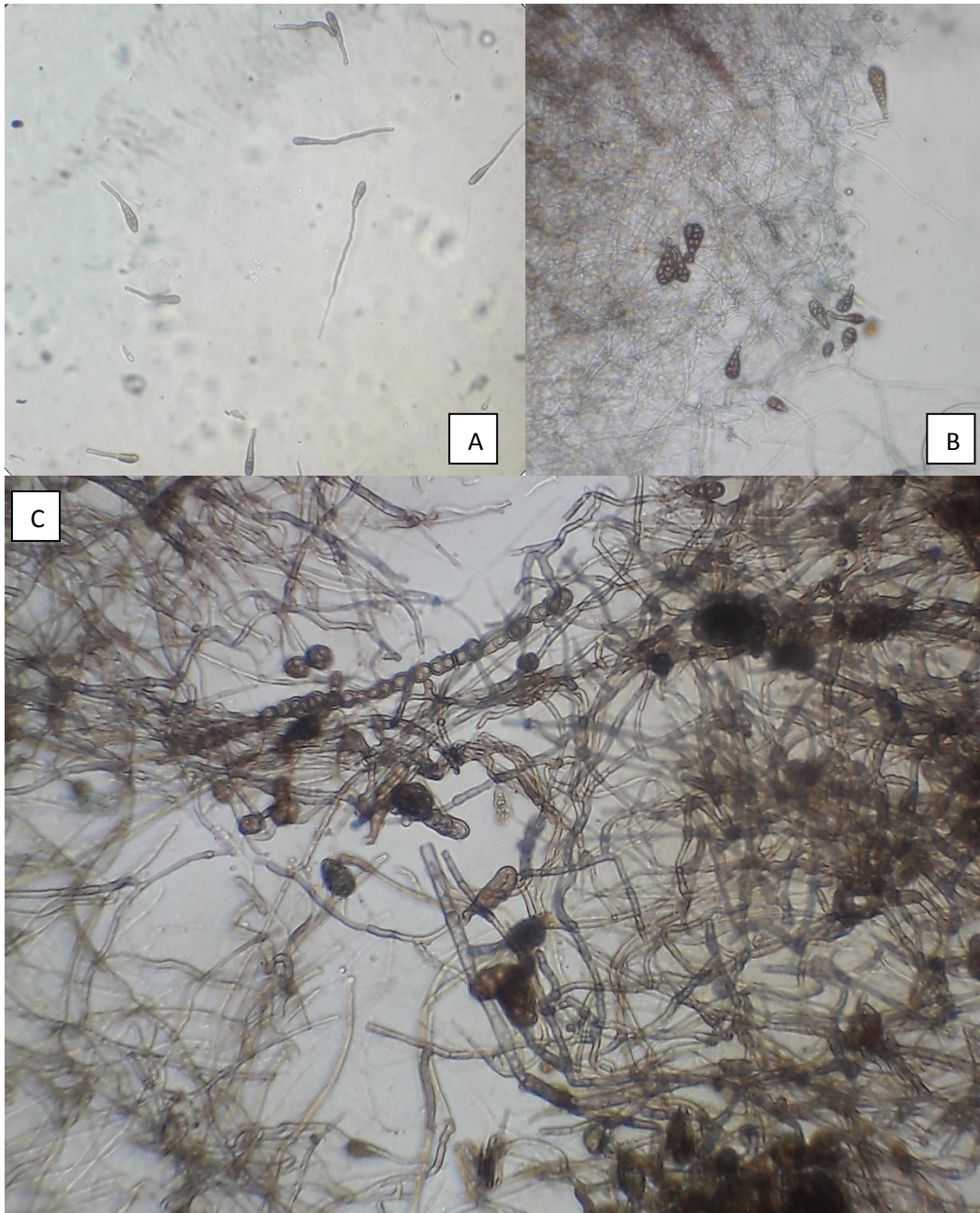


Figura 19: A-B: conidios de *Alternaria* spp. C: conidios y clamidosporas de *Alternaria* spp.

Con respecto a otras dematiaceas, se registraron diversas especies de *Bipolaris*, *Curvularia* y *Drechslera* (Figura 20). Si bien *Bipolaris sorokiniana* no se registró en porcentajes elevados, su importancia radicó en la agresividad infectiva, impidiendo en muchos casos la germinación de la semilla (Figura 21).

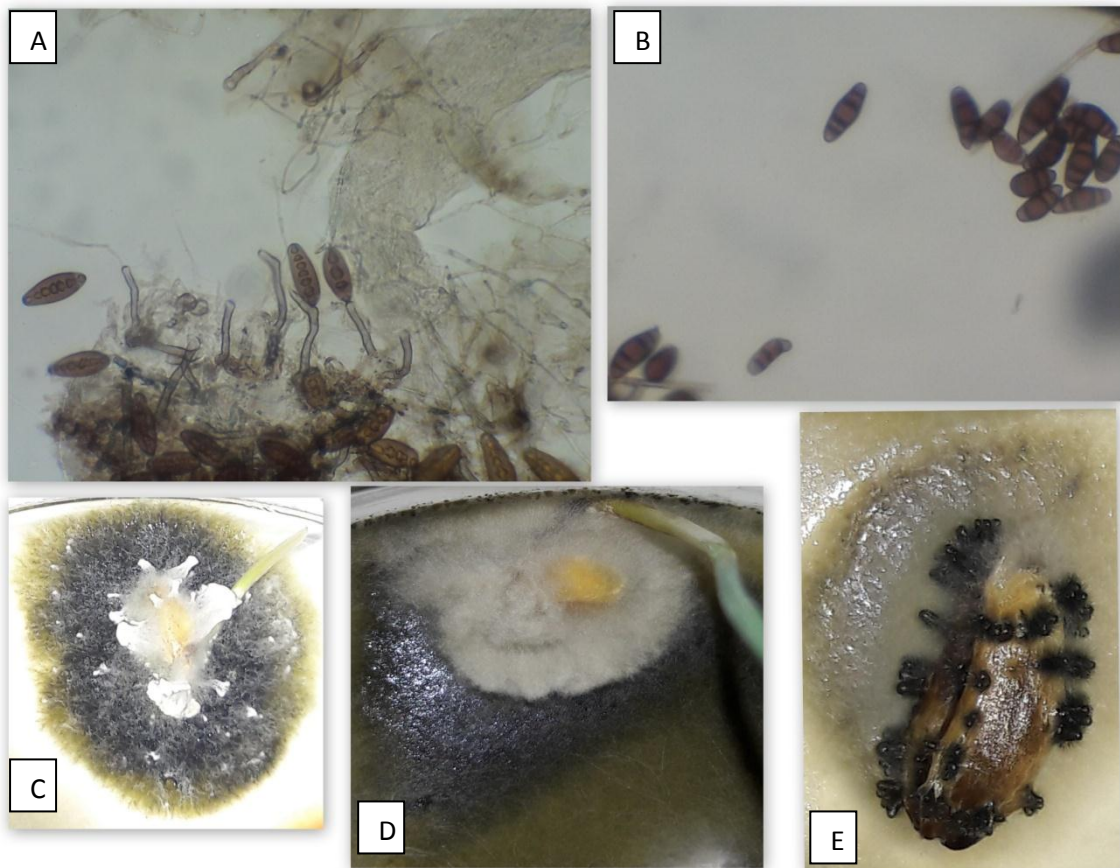


Figura 20: A- Conidios de *Bipolaris nodulosa*. B- Conidios de *Curvularia lunata*. C- Colonia de *Drechslera* spp. D- Colonia de *Drechslera siccans*. E- Estromas de *Drechslera campanulata* en semilla.

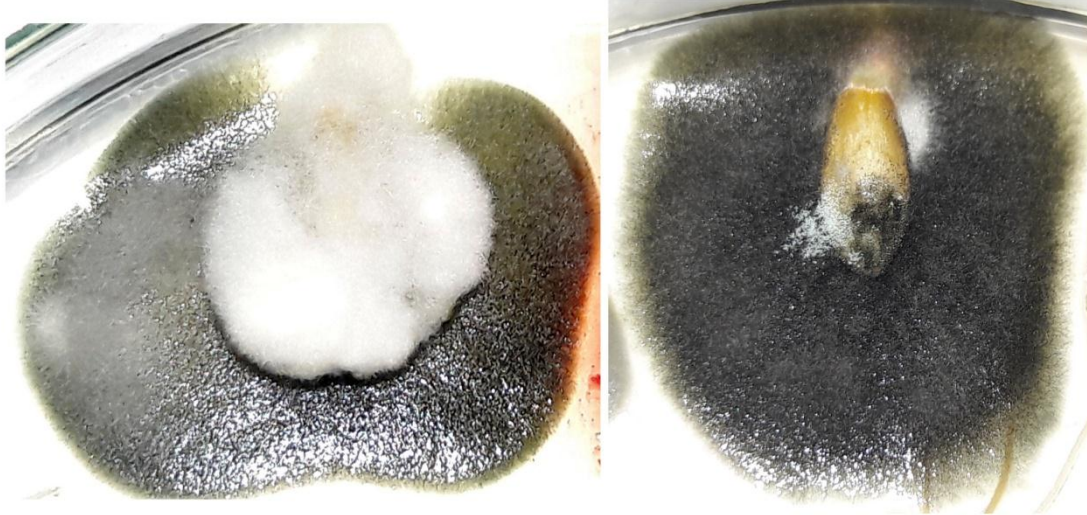


Figura 21: *Bipolaris sorokiniana* infectando semillas.

Por otro lado, coparasitaron las semillas, géneros como *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Stemphylium* y *Epicoccum* (Figura 22).

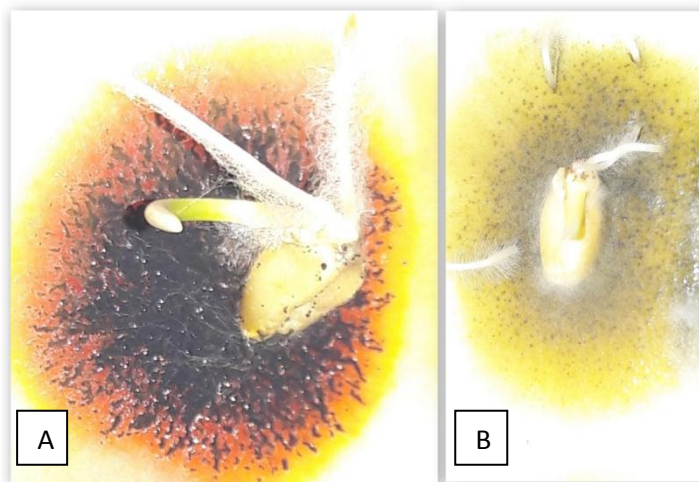


Figura 22: A- Colonia de *Epicoccum* spp. B- Colonia de *Stemphylium* sp.

También se determinaron dos especies de *Fusarium*: *graminearum* y *poae*. En tanto se encontraron, en baja proporción, géneros de hongos de almacenamiento como *Aspergillus* y *Penicillium*.

A nivel cuantitativo (Anexo 2), en todas las muestras en ambas localidades para las dos épocas de siembra, *Alternaria* spp. tuvo un promedio de infección del 79,02%. Le

siguieron en importancia *Fusarium graminearum* (8,83%) y *Epicoccum* spp. (5,39%). Además fueron registrados *Bipolaris sorokiniana* (0,83%), *Cladosporium* sp. (0,66%), *Stemphylium* sp. (1,41%), entre otros (Figura 23).

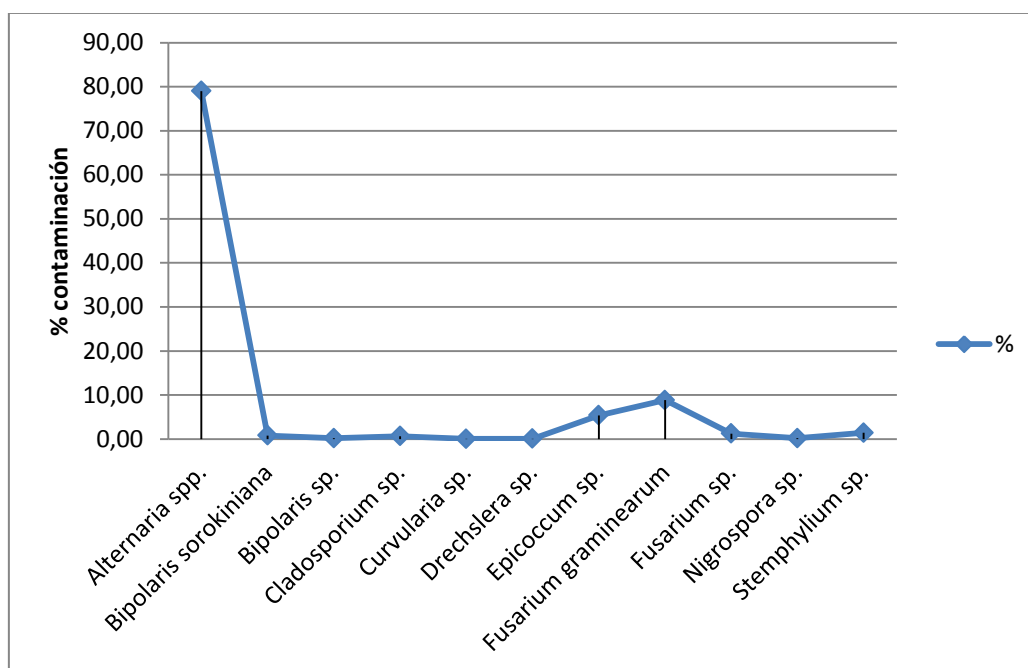


Figura 23: Promedio del % de contaminación.

La Dulce

Se observaron para *Alternaria* spp. mayores valores en la segunda época de siembra (85,56%) que en la primera (77,20%). Sin embargo en las dos épocas de siembra, los porcentajes entre variedades fueron similares. En el caso de *F. graminearum*, hubo más contaminación en la primera (11,13%) que en la segunda (4,46%). Para *Epicoccum* sp. en la primer época de siembra se determinó 7,50% de contaminación mientras que en la segunda época 3,56%.

En la segunda época de siembra se registró un mayor número de géneros fúngicos (Tabla 1).

Tabla 1: Determinación porcentual promedio de los géneros fúngicos en La Dulce en ambas épocas de siembra.

1º Época de siembra	TOTAL (%)	2ª Época de siembra	TOTAL (%)
<i>Alternaria spp.</i>	77,20	<i>Alternaria spp.</i>	85,56
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	1,11	<i>Aspergillus sp.</i>	0,03
<i>Bipolaris sp.</i>	0,33	<i>Bipolaris cynodontis</i>	0,03
<i>Cladosporium sp.</i>	1,39	<i>Bipolaris nodulosa</i>	0,07
<i>Epicoccum sp.</i>	7,50	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	1,11
<i>F. graminearum</i>	11,13	<i>Bipolaris spicifera</i>	0,03
<i>Fusarium poae</i>	0,99	<i>Bipolaris sp.</i>	0,03
<i>Fusarium sp.</i>	0,19	<i>Cladosporium sp.</i>	0,76
<i>Stemphylium sp.</i>	0,11	<i>Curvularia lunata var. aerea</i>	0,03
<i>Ulocladium sp.</i>	0,03	<i>Drechslera campalunata</i>	0,03
		<i>Epicoccum sp.</i>	3,56
		<i>F. graminearum</i>	4,46
		<i>Fusarium poae</i>	0,22
		<i>Fusarium sp.</i>	0,69
		<i>Stemphylium sp.</i>	0,52
		Sin identificar	0,03

Miramar

En esta localidad se observaron para *Alternaria spp.* valores similares en ambas épocas de siembra (75,04% y 78,28%), presentando todas las variedades porcentajes similares de infección. Para *F. graminearum* se determinó para la primera época de siembra un mayor valor (11,22%) en comparación a la segunda (8,50%), mientras que para *Epicoccum sp.* se determinaron valores similares en ambas épocas de siembra (5,67% y 4,83%).

Con respecto a la época de siembra, en la segunda época se registraron un mayor número de géneros y especies fúngicas (Tabla 2).

Tabla 2: Determinación porcentual de los géneros fúngicos en Miramar en ambas épocas de siembra.

1º Época de siembra	TOTAL (%)
<i>Alternaria spp.</i>	75,04
<i>Aspergillus sp.</i>	0,04
<i>Bipolaris cynodontis</i>	0,04
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,26
<i>Cladosporium sp.</i>	0,15
<i>Drechslera siccans</i>	0,07
<i>Epicoccum sp.</i>	5,67
<i>F. graminearum</i>	11,22
<i>Fusarium poae</i>	0,04
<i>Fusarium sp.</i>	1,81
<i>Mariellottia biseptata</i>	0,04
<i>Nigrospora sp.</i>	0,33
<i>Penicillium sp.</i>	1,96
<i>Stemphylium sp.</i>	2,30
Sin identificar	0,48

2ª Época de siembra	TOTAL (%)
<i>Alternaria spp.</i>	78,28
<i>Aspergillus sp.</i>	0,03
<i>Bipolaris cynodontis</i>	0,03
<i>Bipolaris nodulosa</i>	0,08
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,82
<i>Bipolaris sp.</i>	0,19
<i>Cladosporium sp.</i>	0,37
<i>Curvularia inaequalis</i>	0,04
<i>Curvularia lunata</i>	0,11
<i>Drechslera campanulata</i>	0,06
<i>Drechslera siccans</i>	0,04
<i>Drechslera sp.</i>	0,04
<i>Drechslera tritici-repentis</i>	0,04
<i>Epicoccum sp.</i>	4,83
<i>Fusarium graminearum</i>	8,50
<i>Fusarium poae</i>	0,29
<i>Fusarium sp.</i>	0,81
<i>Nigrospora sp.</i>	0,40
<i>Penicillium sp.</i>	0,81
<i>Stemphylium sp.</i>	2,71
Sin identificar	0,54

Peroxidasas

Luego de cuantificar los valores de absorbancia en espectrofotómetro (Anexo 3) se pudo determinar que la variación de la misma en un minuto en todas las variedades y en los testigos (T1: granos sanos; T2: granos enfermos) no presentan diferencias notorias, encontrándose en un mismo rango de valores.

Cabe destacar que la variedad N°7 presentó el menor valor, siendo importante continuar con estos estudios para confirmar los presentes resultados (Figura 24).

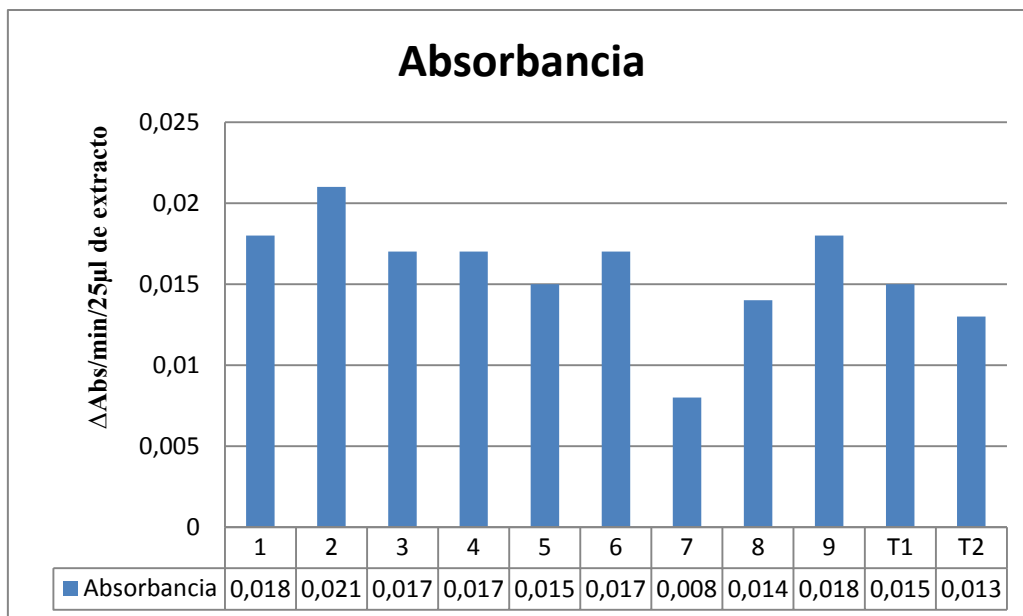


Figura 24: Variación de la absorbancia en un minuto.

DISCUSIÓN

La enfermedad se caracterizó por tener un nivel medio de **incidencia** (27,2%), valores similares a los encontrados para Argentina por Sisterna y Sarandón (2000; 2005). En contraposición, Miravalles *et al.* (2008), Moschini *et al.* (2006) y Sisterna y Sarandón (2000) hallaron porcentajes bajos de incidencia para la misma región productiva del SE de la Pcia de Bs. As. En este sentido, en otros países, como India (Kalappanavar *et al.* 2000), Rumania (Cristea *et al.*, 2013), Australia (Southwell *et al.* 1980) y Canadá (Conner y Davidson, 1988) también se han registrado incidencias bajas, con rangos que oscilan entre 0,2 a 8%.

La incidencia en este trabajo presentó una gran variabilidad entre genotipos, coincidiendo con Sisterna y Sarandón (2000, 2005), quienes determinaron que los valores de la misma son influenciados principalmente por los cultivares. La variedad que presentó la menor incidencia en ambas localidades, en las dos épocas de siembra, fue la N°2: Buck Topacio coincidiendo con experiencias realizadas por

Miravalles *et al.* (2008) pero difiriendo con lo encontrado por Sisterna y Sarandón (2000), quienes determinaron altos porcentajes para Buck Topacio.

A nivel mundial, otros autores también encontraron diferencias importantes entre distintos materiales genéticos (Conner y Davidson 1988; Fernandez *et al.*, 1994; Madariaga y Mellado, 1988; Toklu *et al.* 2008). Hasta el presente no se encontraron cultivares completamente libres de manchado (Conner y Davidson, 1988; Sisterna y Sarandón, 2000).

En cuanto a las localidades, la incidencia fue mayor en Miramar, para la primera época de siembra, en concordancia con lo expuesto por Solanki *et al.* (2006), donde se determinó que la incidencia de la enfermedad tuvo niveles más altos en los cultivos sembrados más temprano. En La Dulce en la segunda época de siembra se observó una mayor incidencia, coincidiendo con lo determinado por Moschini *et al.* (2006), para esta localidad.

De acuerdo con Conner y Davidson (1988) las diferencias en la incidencia del manchado entre cultivares en diferentes localidades podría depender de si las condiciones son o no favorables para el desarrollo de la enfermedad. Además, según el momento de siembra, se producen modificaciones en el ciclo de las variedades en los distintos sitios. Tales modificaciones determinan cambios en las fechas de espigazón y antesis, y por ende, desplazamientos del período de llenado de granos y del momento crítico de la enfermedad.

El análisis de la **sanidad** de los granos permitió identificar un elevado porcentaje de infección por especies del género *Alternaria*, en todos los cultivares, en similitud con lo expuesto por otros investigadores (Cristea *et al.*, 2013, Gargouri-Kammoun *et al.* 2014, Toklu *et al.* 2008), donde *Alternaria* spp. fue el género fúngico predominante. En segundo término se registró el género *Fusarium*, especialmente *F. graminearum*, en concordancia con Cristea *et al.* (2013) y Gargouri-Kammoun *et al.* (2014).

Dentro del género *Alternaria*, la especie identificada con mayor frecuencia fue *A. alternata* como lo encontrado en otros estudios (Kalappanavar *et al.* 2000, Moschini *et al.* 2006, Sisterna y Sarandón 2000, 2005, Zare 2013). También se pudieron observar otros aislamientos con características diferentes, al igual que lo hallado por Gargouri-Kaummoun *et al.* (2014) quienes identificaron seis especies de *Alternaria*. En Argentina se han encontrado otros representantes como a *A. triticina* (Perelló y Sisterna 2006) y el complejo *A. infectoria* (Perelló y Sisterna 2008).

Además de *A. alternata*, el otro microorganismo asociado al manchado es *Bipolaris sorokiniana* (Moschini *et al.* 2006, Sisterna y Sarandón 2000, 2005, Zare 2013). En nuestros ensayos, si bien se identificó a *Bipolaris sorokiniana* con un bajo porcentaje de infección, debido a su agresividad generó fallas en la germinación de la semilla, en coincidencia a lo expuesto por Sisterna y Sarandón (2000).

Se registraron también otras especies fúngicas como *Bipolaris spicifera*, *Curvularia lunata*, *Drechslera siccans* y *Fusarium poae*, habiendo sido ya mencionadas en investigaciones locales (Moschini *et al.* 2006, Sisterna y Sarandón 2000, 2010) e internacionales (Mathur y Cunfer 1993; Özer 2005; Wiese 1987).

Una micoflora débil representada por *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora* spp., *Stemphylium* spp., *Ulocladium* spp., fue aislada además coparasitando la semilla coincidiendo con Cristea *et al.* (2013), González *et al.* (1999, 2008); Marchionatto (1948); Sisterna y Lori (2005); Toklu *et al.* (2008); Winter *et al.* (1974), Zare (2013) quienes mencionaron algunos de estos géneros fúngicos.

En todos los materiales genéticos en ambas localidades, se pudieron identificar los mismos géneros fúngicos. Sin embargo, entre las épocas de siembra se observó una diferencia cualitativa, ya que en la segunda época el número de especies que se determinaron fue mayor. Se registraron distintos representantes de los géneros *Bipolaris* (*cynodontis*, *nodulosa*, *spicifera*), *Curvularia* (*inaequalis*, *lunata*, *lunata* var. *aeria*) y *Drechslera* (*campanulata*, *siccans*, *tritici-repentis*).

Determinar las variedades con menor porcentaje de incidencia y los géneros que se aislaron en forma más frecuentes, permitirá identificar las prácticas de manejo que sean más sustentables para poder reducir la presencia de la enfermedad.

La reacción de oxidación del guayacol permitió cuantificar la **actividad de peroxidasas**, obteniéndose valores similares en la variación de absorbancia en un minuto tanto para las 9 variedades como también para los testigos.

A partir de esto se pudo determinar que no existe una relación clara entre la actividad de las enzimas peroxidasas y el manchado del grano de trigo, principalmente porque todas las variedades, aún las que presentaron los mayores valores de incidencia como también el testigo de granos totalmente sanos, tuvieron los valores de la variación de absorbancia dentro de un mismo rango. Esto coincide lo expuesto en el trabajo de investigación realizado por Hadaway *et al.* (2003).

CONCLUSIÓN

- La incidencia de la enfermedad presenta diferencias entre épocas de siembra en una misma localidad y entre localidades para una misma época de siembra.
- La variedad N°8, Buck Granate, fue la que presentó mayor porcentaje de incidencia en ambas localidades y en ambas épocas de siembra, mientras que la variedad N°2, Buck Topacio, presentó el menor porcentaje de incidencia en ambas localidades y en ambas épocas de siembra.
- No se determinaron diferencias entre las variedades en la micoflora aislada *in vitro* a través del método de APG.
- El género fúngico más aislado en todas las variedades y en ambas localidades, fue *Alternaria*, observando variabilidad entre las cepas encontradas.
- La actividad de peroxidasas no presentó diferencias entre las variedades por lo que, en nuestros resultados, no existiría relación clara con la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer la valiosa colaboración del Dr. Mario Saparrat y las Ings. Agrs. Gladys Lampugnani y Anahí Musso. También a mi directora Ing. Agr. Marina Sisterna por la dedicación, la enseñanza y el sostén brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatte P.E., Carbajo H. L., Jensen C., 2001. Trigo Candeal, Manual Técnico. Chacra Experimental Barrow (Convenio entre INTA y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación).
- Batalla A., 2014. Incidencia del manchado de grano en arroz. Ingeniero Agrónomo y Asesor técnico en cultivo de arroz. Argentina. Disponible en: http://www.latranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/Incidencia_del_manchado_de_grano_en_arroz.pdf. Fecha de consulta: 15-3-2016.
- Carrillo L., 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes, pp. 81-86. Disponible en: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Honaliforalt.pdf>. Fecha consulta: 3-3-2016.
- Cochrane M.P., 1994a. Observation of the germ aleurone of barley. Morphology and histology. *Annals of Botany* 73: 113-119.
- Cochrane M.P., 1994b. Observation of the germ aleurone of barley. Phenol oxidase and peroxidase. *Annals of Botany* 73: 121-128.
- Conner R.L., Davidson J.G.N., 1988. Resistance in wheat to black point caused by *Alternaria alternata* and *Cochliobolus sativus*. *Canadian Journal of Plant Science* 68: 351-359.
- Cristea C.M., Delian E., Berca M., 2013. Particularities of the wheat varieties seeds germination under the black-point attack incidence. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol.18, No 4. Pp: 8441-8446.
- Dann E.K., Deverall B.J., 2000. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Path.* 49: 324-332.
- Dexter J.E., Matsuo R.R., 1982. Effect of smudge and blackpoint, mildewed kernels and ergot on durum wheat quality. *Cereal Chemistry* 59: 63-69.
- Ellis M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. 608 pp. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK.
- Fernández M.R., Clarke J.M., DePauw R.M., Irvine R.B., Knox R.E., 1994. Black point and red smudge in irrigated durum wheat in southern Saskatchewan in 1990–1992. *Canadian Journal of Plant Pathology* 1: 221-227.

- Gargouri-Kammoun L., Bensassi F., Mnari-Hattab M., Rhouma A., Bacha H., Hajlaoui M.R., 2014. Identification of *Alternaria* species recovered from stored durum wheat kernels in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection* 9: 119-129.
- Gilchrist-Saavedra L., Fuentes-Dávila G., Martínez-Cano C., López-Atilano R.M., Duveiller E., Singh R.P., Henry M., García A. I., 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México D.F.: CIMMYT.
- González H.H.L., Martínez E.J., Pacin A., Resnik S.L., 1999. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence in Argentinian durum wheat. *Mycopathologia* 144: 97-102.
- González H.H.L., Moltó G.A., Pacin A., Resnik S.L., Zelaya M.J., Masana M., Martínez E.J., 2008. Trichothecenes and Mycoflora in Wheat Harvested in Nine Locations in Buenos Aires Province, Argentina. *Mycopathologia* 165: 105-114.
- Greaney F.J., Wallace H.A.H., 1943. Varietal susceptibility to kernel smudge in wheat. *Phytopathology* 33: 4-5.
- Hadaway T., 2002. The genetic and biochemical basis of black point in barley (*Hordeum vulgare* L.), Department of Plant Science, University of Adelaide, Honours Thesis.
- Hadaway T.K., March T.J., Able J., 2003. The involvement of peroxidases in the formation of black point in barley. Conference in 11 th. Australian Barley Technical Symposium and the 53 rd. Australian Cereal Chemistry Conference, 7-10 Sept. 2013. Disponible en: <http://www.proceedings.com.au/abts2003/papers/031HadawayT.pdf>
- Jacobs B., Rabie C.J., 1987. The correlation between mycelia presence and black point on barley. *Phytolactica* 19: 77-81.
- Kaan F., Régnier T., Macheix J.J., Souyris I., 1995. Recent advances in breeding for black point resistance in durum wheat. Nachit MM, Baum M, Porceddu E, Monneveux, Picard E (eds) 1998. SEWANA (South Europe, West Asia and North Africa) *Proceedings of the SEWANA Durum Network Workshop, ICARDA, Aleppo, Syria* 1995: 324-328.
- Kalappanavar I.K., Hasabnis S.N., Hanchinal R.R., 2000. Occurrence of Black Point, Eye Spot and Discolouration of Grains in Wheat. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 13 (1): 194-197.
- Kikot Gisele, 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Tesis doctoral en Ciencias exactas, área Química, UNLP, La Plata, Argentina. Pp: 15-20. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18266/l_-_Aislamiento_e_identificaci%C3%B3n_de_Fusarium_spp._a_partir_de_granos_de_trigo.pdf?sequence=6. Fecha de consulta: 15-07-2016

- Koneman E., Winn W. Jr., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., 2008. "Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color (6ª ed.)". Buenos Aires: Médica Panamericana S.A. Pp: 1158-1159.
- Larsen A., Jensen C., 2016. Presentación de trigo Candeal. A todo trigo y cultivos de invierno (Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina). Disponible en: <http://www.atodotrigo.com.ar/presentaciones.php>. Fecha de consulta: 15-08-2016.
- Lõiveke H., Ilumäe E., Laitmamm H., 2004. Microfungi in grain and grain feeds and their potential toxicity. *Agronomy Research* 2: 195-205.
- Lorenz K., 1986. Effects of black point on grain composition and baking quality of New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 29: 711–718.
- Machacek J.E., Greaney F.J., 1938. The 'black point' or 'kernel smudge' disease of cereals. *Canadian Journal of Research* 16: 84–113.
- Madariaga R., Mellado M., 1988. Estudio sobre la enfermedad "punta negra" en trigos de primavera, sembrados en la zona centro-sur de Chile. *Agricultura Técnica* 48: 43-45.
- Mak Y., Willows R., Roberts T., Wrigley C., Sharp P., Copeland L., 2006. Black Point associated with reduced levels of stress, disease and defence related proteins in wheat grain. *Molecular Plant Pathology* 7: 177-189.
- Malaker P.K., Mian I.H., Bhuiyan K.A., Akanda A.M., Reza M.M.A., 2008. Effect of storage containers and time on seed quality of wheat. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 33: 469-477.
- Marchionatto J.B., 1948. *Tratado de Fitopatología*. Ediciones Librería del Colegio, Buenos Aires, 537pp. McCabe T., Gallagher E.J., 1993. Winter wheat production systems: effect of reduced inputs on grain yield, quality and economic return. *Aspects of Applied Biology* 36: 251–256.
- Mathur S.B., Cunfer B., 1993. Black Point. In: Mathur SB, Cunfer B (Eds). *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, pp. 13-21, Copenhagen, Denmark.
- Ministerio de Agroindustria de la Nación, Argentina. Datos Abiertos, Estimaciones de la producción. Disponible en: <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Fecha de consulta: 15-8-2016.
- Miravalles M., Beaufort V., Möckel F., 2008. Susceptibilidad relativa a escudete negro en variedades de trigo para fideos de Argentina. *Phyton (Buenos Aires)*, 77, 263-273. Recuperado en 12 de octubre de 2016, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572008000100022&lng=es&tlng=es.

- Morohashi Yukio, 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, vol.53, No.374, pp:1643-1650.
- Moschini R.C., Sisterna M.N., Carmona M.A., 2006. Modelling of wheat black point incidence based on meteorological variables in the southern Argentinean Pampas región. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 1151-1156.
- Muñoz Gómez R.M., Lerma Tobarra M.L, Castillo Ortiz P. Ficha técnica nº 359. Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF). Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino, España. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/fichas/pdf/fd_359.pdf. Fecha de consulta: 15-08-2016.
- Neergaard P., 1979. *Seed Pathology*, vol. I and II. Revised Edition, Mac Millan Press, London, 1191pp.
- Özer N., 2005. Determination of the fungi responsible for black point in bread wheat and effects of the disease on emergence and seedling vigour. *Trakya University Journal of Science* 6: 35-40.
- Perelló A.E., Moreno, M. V and M.N. Sisterna. *Alternaria infectoria* species group associated to black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology* 57 (2): 379 (2008)
- Perelló A.E., Sisterna M.N., 2006. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathology* 55: 303.
- Perelló A.E., Sisterna M.N., 2008. *Alternaria infectoria* species-group associated with black point in Argentina. *Plant Pathology* 57: 379.
- Perelló A; Stenglein S; Moreno V; Labuda R., 2012. "Alternaria species-groups en trigo: identificación, patogenicidad y toxinas involucradas". Segunda Jornada Temática del INBA. La investigación científico-técnica en cereales de Invierno; 2012.
- Seghezzo M. Laura, 2015. Calidad en trigo candeal. Laboratorio de calidad industrial de granos. Chacra experimental integrada Barrow, INTA. Ediciones INTA.
- Sisterna M.N., Lori G.A., 2005. Hongos parásitos débiles asociados al manchado del grano de trigo. *Actas del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 2005*: 464.
- Sisterna M.N., Sarandón S.J., 2000. Blackpoint incidence on durum wheat in Argentina: Influence of cultivar and location. *Acta Agronómica Hungarica*, 48 (4), pp. 395-401.
- Sisterna M.N., Sarandón S.J., 2005. Preliminary Studies on the Natural Incidence of Wheat Blackpoint under Different Nitrogen Fertilization Levels and Tillage Systems in Argentina. *Plant Pathology Journal* 3.

- Sisterna M.N., Sarandón S.J., 2010. Wheat Grain Discoloration in Argentina: Current Status. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*; Global Science Books: 54-64.
- Solanki V.A., Augustine N., Patel A.A., 2006. Impact of black point on wheat trade and its management. *Indian Phytopath.* 59:44-47.
- Southwell R.J., Brown J.F., Wong P.T.W., 1980a. Effect of inoculum density, stage of plant growth and dew period on the incidence of black point caused by *Alternaria alternata* in durum wheat. *Annals of Applied Biology* 96: 29-35.
- Southwell R.J., Wong P.T.W., Brown J.F., 1980b. Resistance of durum wheat cultivars to black point caused by *Alternaria alternata*. *Australian Journal of Agricultural Research* 31: 1097-1101.
- Sulman A., Fox G., Osman A., Inkerman A., Williamson P., Michalowicz M., 2001. Relationship between total peroxidase activity and susceptibility to black point in mature grain of some barley cultivars. *Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium, Canberra, Australia*.
- Toklu F., Akgül D.S., Biçici M., Karaköy T., 2008. The Relationship between Black Point and Fungi Species and Effects of Black Point on Seed Germination Properties in Bread Wheat. *Turk J Agric For* 32: 267-272.
- Warham E.J., Butler L.D., Sutton B.C., 1999. Seed Testing of Maize and wheat. A Laboratory Guide. CIMMYT-CAB, 84p.
- Wiese M.V., 1987. Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society: St Paul, MN, 112pp.
- Williamson P.M., 1997. Black point of wheat: *in vitro* production of symptoms, enzymes involved and association with *Alternaria alternata*. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 13–19.
- Winter W.E., Mathur S.B., Neergaard P., 1974. Seed-borne organisms of Argentina: a survey. *Plant Disease Reporter* 58: 507-511.
- Zare L., 2013. The casual agent of barley black point disease in certified seed loads in Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. Vol., 5: 332-335.
- Zillinsky F.J., 1983. Common Diseases of Small Grain Cereals. CIMMYT, México, 142pp.

ANEXO 1

LA DULCE PRIMERA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INC 1ER	54	0,52	0,41	22,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1656,85	10	165,69	4,72	0,0001
VARIEDAD	1569,04	8	196,13	5,58	0,0001
REPETICION	87,81	2	43,91	1,25	0,2967
Error	1510,35	43	35,12		
Total	3167,20	53			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,17032

Error: 35,1245 gl: 43

VARIEDAD	Medias	n	E.E.			
2	16,67	6	2,42	A		
3	22,50	6	2,42	A	B	
6	22,83	6	2,42	A	B	
7	26,00	6	2,42	A	B	C
1	26,00	6	2,42	A	B	C
5	26,50	6	2,42	A	B	C
4	30,17	6	2,42		B	C
9	30,33	6	2,42		B	C
8	36,83	6	2,42			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,79548

Error: 35,1245 gl: 43

REPETICION	Medias	n	E.E.	
RIII	25,39	18	1,40	A
RII	25,67	18	1,40	A
RI	28,22	18	1,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

LA DULCE SEGUNDA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INC 2DA	54	0,77	0,72	16,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3159,96	10	316,00	14,81	<0,0001
REPETICION	71,81	2	35,91	1,68	0,1979
VARIEDAD	3088,15	8	386,02	18,09	<0,0001
Error	917,69	43	21,34		
Total	4077,65	53			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,73800

Error: 21,3415 gl: 43

REPETICION	Medias	n	E.E.
RI	27,44	18	1,09 A
RIII	27,56	18	1,09 A
RII	29,94	18	1,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,70710

Error: 21,3415 gl: 43

VARIEDAD	Medias	n	E.E.
2	18,00	6	1,89 A
4	18,17	6	1,89 A
7	21,50	6	1,89 A
5	25,00	6	1,89 A B
1	30,50	6	1,89 B C
6	30,83	6	1,89 B C
9	34,00	6	1,89 C
3	38,00	6	1,89 C
8	38,83	6	1,89 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MIRAMAR PRIMERA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INC 1ER	54	0,73	0,67	14,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2323,67	10	232,37	11,57	<0,0001
REPETICION	56,33	2	28,17	1,40	0,2570
VARIEDAD	2267,33	8	283,42	14,11	<0,0001
Error	863,67	43	20,09		
Total	3187,33	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,62632

Error: 20,0853 gl: 43

REPETICION	Medias	n	E.E.
RII	28,67	18	1,06 A
RI	30,83	18	1,06 A
RIII	30,83	18	1,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,44694

Error: 20,0853 gl: 43

VARIEDAD	Medias	n	E.E.
2	21,50	6	1,83 A
6	23,33	6	1,83 A B
1	24,17	6	1,83 A B
5	24,83	6	1,83 A B
3	31,00	6	1,83 B C
7	33,33	6	1,83 C D
4	35,50	6	1,83 C D
9	36,67	6	1,83 C D
8	40,67	6	1,83 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MIRAMAR SEGUNDA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INC 2DA	52	0,59	0,50	32,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3607,70	10	360,77	6,02	<0,0001
REPETICION	178,03	2	89,02	1,49	0,2382
VARIEDAD	3429,67	8	428,71	7,16	<0,0001
Error	2455,99	41	59,90		
Total	6063,69	51			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,40274

Error: 59,9022 gl: 41

REPETICION	Medias	n	E.E.
RI	22,12	16	1,99 A
RII	23,61	18	1,82 A
RIII	26,44	18	1,82 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=15,02464

Error: 59,9022 gl: 41

VARIEDAD	Medias	n	E.E.
2	10,17	6	3,16 A
6	15,50	6	3,16 A B
3	20,67	6	3,16 A B C
1	23,33	6	3,16 A B C D
5	24,00	6	3,16 A B C D
7	25,50	6	3,16 B C D
4	25,53	4	3,95 B C D
9	33,83	6	3,16 C D
8	38,00	6	3,16 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO 2

Descripción de la micoflora fúngica por variedad en ambas localidades.

La Dulce

1º Época	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i>	<i>Bipolaris</i> <i>sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Epicoccum</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Fusarium</i> <i>poae</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>Stemphylium</i> <i>sp.</i>	<i>Ulocladium</i> <i>sp.</i>
1	73	1,4		5	12	8,3	0,3			
2	86,3	1,7		0,3	7,4	4	0,3			
3	83,7	0,3		3	7,7	5,3				
4	78,7	1,3		1	9,7	6,7	2,3			0,3
5	71,4	-	3	2,3	5,3	15,3	2,7			
6	74	2		0,3	9	11	2,7		1	
7	61,4	0,3		0,3	6,7	31	0,3			
8	83	1,7			7	8,3				
9	83,3	1,3		0,3	2,7	10,3	0,3	1,7		
TOTAL	77,20	1,11	0,33	1,39	7,50	11,13	0,99	0,19	0,11	0,03

2ª Época	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Bipolaris</i> <i>cynodontis</i>	<i>Bipolaris</i> <i>nodulosa</i>	<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i>	<i>Bipolaris</i> <i>spicifera</i>	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Curvularia</i> <i>lunata</i> var. <i>aeria</i>	<i>Drechslera</i> <i>campalunata</i>	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Fusarium</i> <i>poae</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Stemphylium</i> sp.	Sin identifi car	No coloni zada
1	86,3				3,7			0,4			3,3	6,3					
2	90		0,3		0,3			0,3			2,7	4,7		0,3			1,4
3	84				0,4			1,7			6	4		1,4	1,4		0,4
4	83,7				1		0,3				4	6	0,3	0,3			1,4
5	81				1,7			2,7	0,3		2,3	4,3	0,7	0,7		0,30	4,7
6	84,3	0,3		0,3	1			0,7			5,7	2	0,7	0,7	0,7		0,6
7	82,7			0,33	0,3			0,3			6	7,7		0,7	1,3		0,4
8	87,7				0,3			0,7		0,3	1,3	2,4	0,3	1,4	0,3		1,3
9	90,3				1,3	0,3					0,7	2,7		0,7	1		2,7
TO TAL	85,56	0,03	0,03	0,07	1,11	0,03	0,03	0,76	0,03	0,03	3,56	4,46	0,22	0,69	0,52	0,03	1,43

Miramar

1º ÉPOCA	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Bipolaris</i> <i>cynodontis</i>	<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Drechslera</i> <i>siccans</i>	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Fusarium</i> <i>poae</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mariellottia</i> <i>biseptata</i>	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Stemphylium</i> sp.	Sin identificar	No coloni zada
1	64,67						14,67	13,67	0,33	1,33	0,33	0,33		3,33	1,33	
2	84,33		0,33	0,33		0,33	1,67	6,33		2,00		0,33		3,33	0,33	0,67
3	79,67			0,33	0,33		3,33	11,33		1,00		1,00		2,00	0,33	0,67
4	78,00				0,33	0,33	4,00	12,67		1,33				3,33		
5	77,33			1,00			4,67	10,67		2,67		0,33		2,33		1,00
6	68,00				0,33		8,33	17,00		2,00		0,33		3,00	0,67	
7	63,67				0,33		8,67	24,00		1,33		0,67		1,00		
8	79,33			0,33			3,67	1,00		2,67			10,00	1,33	1,00	0,67
9	80,33	0,33		0,33			2,00	4,33		2,00			7,67	1,00	0,67	1,00
TOTAL	75,04	0,04	0,04	0,26	0,15	0,07	5,67	11,22	0,04	1,81	0,04	0,33	1,96	2,30	0,48	0,44

2º ÉPOCA	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Bipolaris cynodontis</i>	<i>Bipolaris nodulosa</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Bipolaris sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Drechslera campanulata</i>	<i>Drechslera siccans</i>	<i>Drechslera sp.</i>	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Nigropora sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Stemphylium sp.</i>	Sin ident	No colonizada
1	77,3			0,7	0,7		0,3							6,4	7	0,3	1	1,3		3,7		1,30
2	65,33				1,00	0,67	0,67					0,33		5,33	22,67	0,33	0,33		0,67	1,33	0,67	0,67
3	82,00				1,00									7,67	4,33	0,33	0,67			2,00	0,67	1,33
4	83,50				1,00					0,50				4,00	4,50		1,00			3,00	0,50	2,00
5	83,00				1,00		0,33	0,33					0,33	2,67	5,33		1,33	0,67		2,33	1,67	1,00
6	78,67				0,67		0,33				0,33			3,00	5,67		0,33	0,33		1,00	1,00	2,00
7	65,00				0,33		1,00		1,00					5,67	20,33	1,33	1,33	0,67	6,33	3,00	0,33	
8	84,33				1,00	1,00	0,67							4,00	3,33	0,33	0,33	0,33	0,33	4,00		0,33
9	85,40	0,30	0,30		0,70									4,70	3,30		1,00	0,30		4,00		
TO TAL	78,28	0,03	0,03	0,08	0,82	0,19	0,37	0,04	0,11	0,06	0,04	0,04	0,04	4,83	8,50	0,29	0,81	0,40	0,81	2,71	0,54	0,96

ANEXO 3

Datos de absorbancia

VARIEDAD 1

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,026
20	0,033
40	0,042
60	0,049
80	0,056
100	0,062
120	0,067
140	0,072
150	0,073

Δ Abs en 1min 0,018

VARIEDAD 2

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,015
20	0,023
40	0,031
60	0,039
80	0,047
100	0,054
120	0,06
140	0,065
150	0,067

Δ Abs en 1min 0,021

VARIEDAD 3

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,015
20	0,023
40	0,033
60	0,04
80	0,047
100	0,052
120	0,057
140	0,061
150	0,063

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 4

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,022
20	0,03
40	0,039
60	0,046
80	0,053
100	0,059
120	0,063
140	0,068
150	0,07

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 5

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,019
20	0,024
40	0,032
60	0,039
80	0,045
100	0,05
120	0,054
140	0,058
150	0,06

Δ Abs en 1min 0,015

VARIEDAD 6

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,015
20	0,021
40	0,028
60	0,035
80	0,042
100	0,047
120	0,052
140	0,056
150	0,058

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 7

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,012
20	0,015
40	0,018
60	0,022
80	0,024
100	0,028
120	0,03
140	0,032
150	0,033

Δ Abs en 1min 0,008

VARIEDAD 8

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,012
20	0,017
40	0,023
60	0,029
80	0,034
100	0,039
120	0,043
140	0,047
150	0,049

Δ Abs en 1min 0,014

VARIEDAD 9

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,019
20	0,027
40	0,035
60	0,044
80	0,051
100	0,057
120	0,062
140	0,066
150	0,068

Δ Abs en 1min 0,018

TESTIGO 1: SANOS

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,01
20	0,015
40	0,021
60	0,027
80	0,032
100	0,037
120	0,042
140	0,046
150	0,048

Δ Abs en 1min 0,015

**TESTIGO 2:
ENFERMOS**

TIEMPO	ABSORBANCIA
0	0,013
20	0,017
40	0,023
60	0,029
80	0,034
100	0,038
120	0,042
140	0,045
150	0,047

Δ Abs en 1min 0,013