



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

**TESIS DE DOCTORADO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**CONTROL INTEGRADO DE *Alternaria alternata*
EN *Amaranthus mantegazzianus***

Tesista: Ing. Agr. María Cristina Isabel Noelting

Directora de tesis: Dra. María del Carmen Molina

Tribunal evaluador

Dr. Ing. Agr. Eduardo Roberto Wright
Dra. Andrea Patriarca
Dra. Vanessa Gimena Lourdes Zachetti

Año 2023

DEDICATORIA

“A mis padres por hacerme comprender que el trabajo realizado con esfuerzo y dedicación tiene sus resultados a pesar de los innumerables obstáculos y vicisitudes que depara la vida”

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina por colaborar en la realización de los ensayos a campo.

A la Dra. María del Carmen Molina por guiarme en un camino con numerosos obstáculos.

A la Ing. Agr. Mtr. María Cristina Sandoval, Ing. Agr. Marina Sisterna, Dra. Nora Abiatti, Dra. Mónica Astiz Gasso, Dr. Marcelo Lovisolo; Ing. Agr. Silvia Sanchez, Ing Agr. Guillermo Mantz por su desinteresada colaboración durante la realización de la tesis.

Al Dr. Ivan Bedendo y sus tesisistas de la Universidad Nacional de San Pablo por brindar su colaboración en el desarrollo del capítulo IV.

A la señora Mirta Streitenberger por su capacidad de gestión y calidez humana.

A la Dra. Adriana Alippi, Dr. Franco Rossi, Dr. Miguel Lavilla por la lectura crítica de los capítulos II y III.

A todos, sinceramente muchas gracias.

PRODUCCION CIENTIFICA DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas científicas

Noelting M.C., Sisterna M.N., Lori, G., Sandoval M.C., Molina, M.C., Mónaco, C.I. 2011. First report of *Alternaria alternata* causing discoloration on *Amaranthus* seeds in Argentina. Australasian Plant Dis. Notes. DOI 10.1007/s13314-0001-2.

Noelting M.C., Molina, M.C., Mónaco, C.I., Sandoval, M.C., Perelló, A.E. 2012. First report of *Alternaria infectoria* on *Amaranth* (*Amaranthus caudatus* ssp. *mantegazzianus*) in Argentina New Disease Reports 25: 11.

<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.025.011>

Noelting, M.C., Sisterna, M.N., Lovisoló, M., Molla-Kralj, A., Lori, G., Sandoval, M.C., Sulyok, M., Molina, M.C. 2016. Discoloured seeds of amaranth plant infected by *Alternaria alternata*: physiological, histopathological alterations and fungal secondary metabolites associated. Journal of Plant Protection Research 56(3): 244-249 DOI: <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0036> Print ISSN 1427-4345 Online ISSN 1899-007X.

Noelting, M.C., Ferreira, J., Rodrigues Galvão, S., Greizerstein, E.J., Molina, M.C., López C.G., Bedendo, I.P. 2019. *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*: A new host of „*Candidatus* Phytoplasma hispanicum“ (subgroup 16Sr XIII- A). Journal of Phytopathology 1-6 <https://doi.org/10.1111/jph.12852>

Noelting, M.C., Sisterna, M., Sulyok, M., Abbiati, N.N., Molina M.C. 2022. Damages caused by *Alternaria alternata* on the quality and germination of amaranth seed. European Journal of Plant Pathology 163(1): 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02468-z>.

Capítulo de libro

Noelting, M.C. 2010. Enfermedades de *Amaranthus mantegazzianus* Pass. (ataco, chaclión, trigo inca). Atlas Fitopatológico Argentino 3:1. Eds: Nome, S.F.; Docampo, D.M.; Conci, L.R. y Pérez, B.A. ISSN 1851-8974. Córdoba, Argentina.

URL: <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=1031>

Presentaciones en eventos científicos

Noelting, M.C., Sandoval M.C., Molina, M.C. 2009. Revisión de las principales patologías que afectan al cultivo de amaranto en Argentina. Jornadas Amaranto, libro de Res., pág. 25. La Plata.

Noelting, M.C., Sisterna, M., Mónaco, C.I., Molina, M.C., Sandoval, M.C. 2009. Manchado en semillas de amaranto: Nuevos hongos involucrados. Jornadas Amaranto libro de Res., pág. 24. La Plata.

Noelting, M.C., Sisterna, M., Lori, G ; Molina, M.C., Sandoval, M.C., Mónaco C.I. 2009. Manchado en semillas de amaranto. Suplemento del Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 44: 125. ISSN 0373-580. Jornadas Argentinas de Botanica, Córdoba.

Noelting, M.C., Perelló, A., Mónaco, C.I., Molina, M.C., Sandoval, M.C. 2011. *Alternaria infectoria* asociada al manchado de panojas y semillas de amaranto. de Res., Resúmenes del II Congreso Argentino de Fitopatología pág. 2. Mar del Plata.

Noelting, M.C., Sisterna, M.N., Lori, G., Sandoval, M.C., Molina, M.C., Mónaco, C.I. 2011. First report of *Alternaria alternata* causing discoloration on *Amaranthus* seeds in Argentina. Australasian Plant Dis. Notes DOI 10.1007/s13314-0001-2.

Noelting, M.C., Sisterna, M., Lovisoló, M., Molla Kralj, A., Lori, G., Sandoval, M.C., Labuda, R., Sulyok, M., Molina, M.C. 2014. Manchado de semillas de amaranto asociado a *Alternaria alternata*: estudios preliminares. 3er Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes pág 195

Noelting, M.C., Abiatti, N.N., Sulyok, M., Molina, M.C. 2015. Respuesta de germoplasmas de amaranto a infecciones naturales causadas por *Alternaria alternata*. Congreso Internacional de Fitopatología Mexican. Journal of Phytopathology 33: 146-147, Suplemento. ISSN-2007-8080

Noelting, M.C., Rojas-Martínez, R, I., Molina, M.C. 2015. Detección molecular de *Candidatus* Phytoplasma pruni en semillas de amaranto en Argentina. Revista Mexicana de Fitopatología. Mexicana Journal of Phytopathology 33: 236-237. Suplemento. ISSN-2007-8080

Noelting, M.C., Abiatti, N.N., Sulyok, M., Molina, M.C. 2017. Respuesta de germoplasmas de amaranto a patologías ocasionadas por *Alternaria alternata*. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de resúmenes pág 353. Mendoza del 19 al 21 de abril.

Noelting, M.C., Abiatti, N.N., Molina, M.C. 2017. Evaluación de estrategias de manejo de patologías ocasionadas por *Alternaria alternata* en un cultivo de amaranto. 4º Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes pág 352. Mendoza 19 al 21 de Abril.

Noelting, M.C., Bedendo, I.P., Ferreira, J., Galvão, S., Greizerstein, E.J., Molina, M.C. 2017. *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*: un nuevo hospedante de *Candidatus* Phytoplasma hispanicum en Argentina. Libro de Resúmenes IV Jornadas Uruguayas de Fitopatología y II Jornadas Uruguayas de Protección Vegetal, pág 21.

Noelting, M.C., Molina, M.C. 2020. Evaluación de fungicidas para el control de *Alternaria alternata* en semillas de amaranto. 1er Congreso Argentino de Semillas. Libro de resúmenes 304 S. 3-4 Noviembre.

Noelting, M.C., Molina, M.C. 2020. Selección de potenciales antagonistas de *Alternaria alternata* para su uso como biofungicidas en semillas de amaranto. 1er Congreso Argentino de Semillas. Libro de resúmenes 310 S. 3-4 Noviembre.

Noelting, M.C; Molina, M.C. 2021. Actualización en patología ocasionadas por *Alternaria alternata* en el cultivo de amaranto. 5to Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de resúmenes pág 303. Corrientes 22 y 23 de Setiembre.

Seminarios - Conferencias y cursos dictados

Curso de Posgrado

Patología de semillas en cultivos de importancia agronómica, su impacto en la productividad.

Tema de Disertación: Enfermedades del cultivo de amaranto. Dictado del 12 al 16 de Mayo 2014. Curso acreditable a Carreras de Posgrado Art 3 Ord N° 261/03-UNLP FCAyF-UNLP.

Tema de Disertación: Enfermedades del cultivo de amaranto
Destinatarios Alumnos de la Universidad Católica Argentina.
Años 2016 y 2018.

ISimposio Argentino sobre Carbones 5/7/2019, Rosario
Tema de Disertación: Carbones que afectan al cultivo de amaranto

ÍNDICE GENERAL

PRODUCCION CIENTIFICA DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS	I
Publicaciones en revistas científicas	I
Capítulo de libro	I
Presentaciones en eventos científicos	I
Seminarios - Conferencias y cursos dictados	III
ÍNDICE GENERAL	IV
CAPITULO I.....	1
1. INTRODUCCION	1
1.1. Cultivo de amaranto	1
1.1.1. Historia	1
1.1.2. Origen.....	1
1.2. Taxonomía	2
1.2.1. Clasificación	2
1.3. Descripción botánica	3
1.4. Importancia del cultivo	4
1.5. Características agronómicas	7
1.6. Usos del amaranto.....	7
1.7. Producción de amaranto	8
1.7.1. Producción de amaranto en Argentina	9
1.8. Manejo del cultivo.....	10
1.8.1. Densidad de siembra.....	10
1.8.2. Fecha de siembra	10
1.8.3. Control de malezas	11
1.8.4. Aporque	11
1.8.5. Fertilización	11
1.9. Cosecha	11
1.9.1. Limpieza del grano	11
1.10. Rendimiento de grano	12
1.11. Comercialización	12
1.12. Legislación	12
1.13. Análisis FODA: Fortalezas+Oportunidades+Debilidades+Amenazas.....	13
1.14. Factores bióticos que afectan al cultivo	13
1.14.1 Plagas que afectan al cultivo	14
1.14.2. Enfermedades de origen biótico que afectan al cultivo de amaranto	14
1.14.2.1. Enfermedades ocasionadas por hongos	15
1.14.2.2. Enfermedades que afectan a las plántulas.....	15
1.14.2.3. Enfermedades que afectan al follaje	15
1.14.2.4. Enfermedades que afectan a los tallos	15
1.14.2.5. Enfermedades que afectan a la base del tallo y de la raíz.....	15
1.14.2.6. Enfermedades que afectan a toda la planta	16
1.14.2.7. Enfermedades que afectan al sistema radicular	16
1.14.2.8. Enfermedades que afectan a las inflorescencias (panojas)...	16
1.15. Hongos que afectan a las semillas.....	17
1.16. Enfermedades fúngicas de mayor importancia a nivel mundial	17
1.17. Enfermedades fúngicas en cultivos de amaranto en Argentina.....	18
1.17.1. Enfermedades que afectan al follaje causadas por <i>Alternaria</i> spp.	19

1.17.1.1. Manchas foliares	21
1.17.1.2. Tizón foliar	23
CAPITULO II	25
EVALUACION DE ESTRATEGIAS DE MANEJO AGRONÓMICO DESTINADAS A MINIMIZAR EL DAÑO OCASIONADO POR <i>Alternaria alternata</i> EN EL CULTIVO DE <i>Amaranthus caudatus</i> subsp. <i>mantegazzianus</i>.....	25
RESUMEN	25
2.1. INTRODUCCION	27
2.1.1. Estrategias de manejo del tizón foliar	27
2.1.2. Control químico	27
2.1.3. Control biológico	29
2.1.4. Control cultural	32
2.1.5. Análisis de situación	33
2.1.6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	35
2.1.7. OBJETIVOS	35
2.2. MATERIALES Y METODOS	36
2.2.1. Evaluación de los fungicidas <i>in vitro</i>	36
2.2.2. Selección de los fungicidas	39
2.2.3. Análisis estadístico	40
2.2.4. Aislamiento, evaluación y selección de antagonistas de <i>A.alternata</i>	40
2.2.5. Índice de inhibición del crecimiento micelial	40
2.2.6. Efectos de los antagonistas en la zona de interacción con <i>Alternaria alternata</i>	41
2.2.7. Evaluación de los efectos de los antagonistas de <i>A alternata</i> en las semillas de amaranto	41
2.2.8. Ensayos en lotes experimentales	42
2.2.9. Monitoreo de las lesiones foliares	44
2.2.10. Variables epidemiológicas y agronómicas examinadas	45
2.2.11. Análisis de datos de las variables epidemiológicas y de interés agronómico	48
2.3. RESULTADOS	53
2.3.1. Evaluación <i>in vitro</i> de los fungicidas.....	53
2.3.2. Identificación de antagonistas nativos de <i>Alternaria alternata</i>	61
2.3.2.1. <i>Chaetomium globosum</i> Kunze	61
2.3.2.1.1. Clasificación taxonómica	61
2.3.2.1.2. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Chaetomium globosum</i>	62
2.3.2.2. <i>Epicoccum nigrum</i> Link syn <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	62
2.3.2.2.1. Clasificación taxonómica	62
2.3.2.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Epicoccum nigrum</i>	62
2.3.2.3. <i>Trichoderma atroviride</i> Karst (1892) teleomorfo: <i>Hypocrea atroviridis</i> Dodd, Lieckfeldt y Samuels (2003).....	63
2.3.2.3.1. Clasificación taxonómica	63
2.3.2.3.2. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichoderma atroviride</i>	63
2.3.3. Identificación del agente etiológico del tizón foliar (<i>Alternaria alternata</i>)	64
2.3.3.1. Clasificación taxonómica	64
2.3.3.2. . Características macroscópicas y microscópicas de <i>Alternaria alternata</i>	64
2.3.4. Efecto de los antagonistas sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	65
2.3.5 Interacciones hifales:	66
2.3.5.1 Interacción entre <i>C. globosum</i> y <i>A. alternata</i>	66
2.3.5.2 Interacción entre <i>E. nigrum</i> y <i>A. alternata</i>	66
2.3.5.3 Interacción entre <i>T. atroviride</i> y <i>A. alternata</i>	67
2.3.6. Efecto de los antagonistas <i>E. nigrum</i> , <i>C. globosum</i> , <i>T. atroviride</i> aplicados en semillas de amaranto	68
2.3.6.1. Porcentaje de germinación.....	68
2.3.6.2. Largo de radícula.....	68
2.3.6.3. Largo de hipocótilo.....	69
2.3.7. Ensayos a campo	70
2.3.8. Análisis descriptivo de las variables epidemiológicas, agronómicas y de calidad de las semillas de amaranto. Análisis multivariado (Campaña 2005-2006).....	73

2.3.9.....	76
2.3.10. Selección de tratamientos a través de los índices <i>ad hoc</i> IRV, IRPPVE, IRPPVA.....	91
Tabla 2.47. Evaluación del índice relativo porcentual promedio de las variables de interés agronómico en los tratamientos T4 y T7.....	93
2.4. DISCUSION.....	94
2.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> de los fungicidas.....	94
2.4.2. Efecto de los fungicidas sobre el hospedante.....	95
2.4.3. Efecto de los fungicidas en las plántulas de amaranto.....	96
2.4.4. Incidencia de los fungicidas en el peso seco de las plántulas de amaranto.....	96
2.4.5. Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en semillas de amaranto.....	97
2.4.6. Selección final de los fungicidas <i>in vitro</i>	97
2.4.7. Efecto de los antagonistas sobre <i>Alternaria alternata</i>	97
2.4.8. Efectos de los antagonistas de <i>Alternaria alternata</i> en las semillas de amaranto.....	98
2.4.9. Manejo del tizón foliar: Ensayos <i>in vivo</i>	99
2.4.9.1. Aparición de las primeras lesiones foliares.....	949
2.4.9.2. Escalas aplicadas de acuerdo al tipo de lesión.....	95
2.4.9.3. Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar según tratamientos.....	100
2.4.9.4. Condiciones ambientales que favorecieron al tizón foliar en el cultivo de amaranto.....	100
2.4.9.5. Incidencia del tizón foliar en amaranto.....	100
2.4.9.6. Severidad del tizón foliar en el cultivo.....	100
2.4.9.7. Selección de los tratamientos en función de las principales variables epidemiológicas y agronómica.....	100
2.4.9.8. Tratamientos seleccionados.....	101
CAPITULO III.....	105
3. MANCHADO EN SEMILLAS DE AMARANTO.....	105
3.1. INTRODUCCION.....	106
3.1.1. Análisis de situación.....	107
3.1.2. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	108
3.2 OBJETIVOS.....	108
3.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	108
3.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	108
3.3. MATERIALES Y METODOS.....	109
3.3.1. Descripción de la sintomatología que afecta a las semillas de amaranto.....	109
3.3.1.1. Muestra de semillas.....	109
3.3.2. Análisis histopatológico y micológico de semillas.....	111
3.3.3. Respuesta de genotipos de distinto ciclo a patologías ocasionadas por <i>Alternaria</i> spp.....	113
3.3.4. Variables evaluadas y análisis realizados.....	114
3.3.5. Análisis Multivariado.....	117
3.4. RESULTADOS.....	119
3.4.1. Descripción de los síntomas que afectan a las semillas de amaranto.....	119
3.4.2. Análisis sanitario de semillas manchadas y no manchadas de amaranto.....	119
3.4.3. Pruebas de patogenicidad.....	120
3.4.5. Análisis histopatológicos y micológicos de las semillas de amaranto.....	124
3.4.6. Análisis de los metabolitos secundarios.....	125
3.4.7. Condiciones ambientales durante las campañas: 2013-2014 y 2014-2015.....	126
3.4.8. Evaluación de lesiones foliares.....	128
3.4.9 Análisis de los datos.....	129
3.4.10. Análisis conjunto de las variables evaluadas en las tres etapas del cultivo.....	133
3.4.11. Análisis de la varianza para cada una de las variables y separación de medias en conjunto en las campañas 2013-2014 y 2014-2015.....	137
3.4.11.1. Interacciones significativas entre genotipos y campañas.....	137
3.4.11.2. Area bajo la Curva de progreso de la severidad de manchas foliare.....	137
3.4.11.3. Poder germinativo.....	138
3.4.11.4. Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en semillas.....	139
3.4.11.5. Incidencia del manchado en semillas de mayor tamaño.....	139
3.4.11.6. Largo de la panoja.....	140
3.4.11.7. Incidencia del manchado en semillas de menor tamaño.....	141

3.4.11.8. Diámetro basal del tallo a la cosecha.....	142
3.4.11.9. Area bajo la Curva de progreso de la incidencia de manchas foliares.....	137
3.4.11.10. Altura de planta a cosecha... ..	144
3.4.11.11. Incidencia de manchas y/o tizón foliar a la cosecha.....	144
3.4.11.12. Rendimiento en semillas por metro cuadrado.....	145
3.4.11.13. Peso de 1000 semillas.....	145
3.4.12. Análisis de metabolitos secundarios en semillas de amaranto.....	146
3.5. DISCUSION.....	148
3.5.1. Análisis sanitario de semillas de amaranto.....	148
3.5.2. Determinación del agente etiológico responsable del manchado de semillas.....	148
3.5.3. Daños en semillas y plántulas.....	148
3.5.4. Poder germinativo de las semillas de amaranto vs incidencia de <i>Alternaria alternata</i>	150
3.5.5. Técnica para inducir el manchado en forma artificial en las semillas de amaranto.....	150
3.5.6. Componentes del plaqueo de semillas en amaranto.....	150
3.5.7. Análisis histopatológico de las estructuras de las semillas normales y manchadas natural y artificialmente.....	151
3.5.8. Metabolitos secundarios en semillas de amaranto.....	151
3.5.9. Relación entre la presencia de micotoxinas y las condiciones ambientales.....	152
3.5.10. Micotoxinas en semillas de distinto tamaño.....	153
3.5.11. Acido tenuazónico asociado al manchado de semillas.....	153
3.5.12. Manchas foliares.....	154
3.5.13. Estado sanitario de las semillas de genotipos de distinto ciclo.....	155
3.5.14. Calidad sanitaria y fisiológica de las semillas de amaranto asociada a la estructura de la panoja.....	156
3.5.15. Genotipo de ciclo precoz.....	156
3.5.16 Análisis de datos.....	156
3.6. CONCLUSIONES.....	157
CAPITULO IV.....	158
4.1. INTRODUCCION.....	159
4.2. HPOTESIS DE TRABAJO.....	161
4.3. OBJETIVOS.....	161
4.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	161
4.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	161
4.4. MATERIALES Y METODOS.....	162
4.4.1. Lugar del estudio.....	162
4.4.2. Material vegetal.....	162
4.4.3. Evaluación de la incidencia y distribución de plantas de amaranto sintomáticas en el cultivo. ..	162
4.4.4. Extracción de ADN.....	162
4.4.5. Análisis moleculares.....	163
4.4.6. Reacciones de PCR.....	163
4.4.7. Secuenciación.....	163
4.4.8 Caracterización molecular.....	164
4.4.9. Estudio filogenético.....	164
4.4.10. Identificación mediante análisis virtual de RFLP.....	164
4.4.11. Ensayo de transmisión por semillas.....	165
4.5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	166
4.5.1. Evaluación de plantas sintomáticas en el cultivo.....	166
4.5.2. Incidencia de plantas sintomáticas.....	167
4.5.3. Distribución de las plantas sintomáticas en el cultivo.....	167
4.5.4. Determinación del agente etiológico.....	168
4.5.5. Análisis filogenético Gen 16Sr DNA.....	169
4.5.6. Caracterización molecular.....	170
4.5.7. Comparación de patrones de RFLP y cálculo de coeficientes de similitud entre secuencias de distintos subgrupos de fitoplasmas 16Sr XIII.....	170
4.5.8. Transmisión del fitoplasma 16Sr XIII-A.....	172

4.6. CONCLUSIONES	175
5 CONCLUSIONES GENERALES	176
5 BIBLIOGRAFIA	177
6. ANEXOS	197
6.1. Medios de cultivo	197
6.2 Análisis Moleculares.....	200
6.3. Análisis descriptivo de variables: CAPITULO II. Ensayos a campo	209

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Contenido de proteína en la semilla de amaranto (pseudocereal) y de cebada, maíz, arroz, trigo y centeno.....	5
Tabla 1.2.	Valor nutritivo del amaranto como grano y verdura: Rango de valores promedios para varias especies de amaranto expresados en mg por cada 100 g de peso seco. (Fuente: Nieto Cabrera, 1990).....	6
Tabla 2.1.	Fungicidas y concentraciones utilizadas en los ensayos <i>in vitro</i>	36
Tabla 2.2.	Tratamientos aplicados en el suelo; en semillas y, en plantas de amaranto.....	42
Tabla 2.3.	Contrastes ortogonales entre los grupos de tratamientos T1 a T7.....	48
Tabla 2.4.	Porcentaje de inhibición de desarrollo micelial de <i>Alternaria alternata</i> con diferentes concentraciones de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole.....	52
Tabla 2.5.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de <i>Alternaria alternata</i> a las 6 h de la incubación.....	53
Tabla 2.6.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de <i>Alternaria alternata</i> a las 12 h de la incubación.....	54
Tabla 2.7.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de <i>Alternaria alternata</i> a las 18 h de la incubación.....	55
Tabla 2.8.	Poder germinativo de semillas de amaranto tratadas con los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado, difenoconazole y el control...	56
Tabla 2.9.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la longitud de la radícula de las plántulas de amaranto.....	57
Tabla 2.10.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la longitud del hipocótilo de plántulas de amaranto.....	57
Tabla 2.11.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el peso seco de plántulas de amaranto.....	58
Tabla 2.12.	Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la incidencia de <i>Alternaria alternata</i> en semillas de amaranto.....	59
Tabla 2.13.	Variables relativas utilizadas para seleccionar los fungicidas por su efectividad biológica sobre <i>Alternaria alternata</i> y su inocuidad en semillas y plántulas de amaranto.....	60
Tabla 2.14.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i> (POR1) en presencia de los antagonistas.....	64
Tabla 2.15.	Efecto de los antagonistas de <i>Alternaria alternata</i> en la germinación de semillas de amaranto.....	67
Tabla 2.16.	Efecto de los antagonistas de <i>Alternaria alternata</i> en la longitud radicular de plántulas de amaranto.....	68
Tabla 2.17.	Efecto de los antagonistas de <i>Alternaria alternata</i> en la longitud del hipocótilo de plántulas de amaranto.....	68
Tabla 2.18.	Características del suelo de los lotes experimentales del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, UNLP, en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.....	69
Tabla 2.19.	Correlaciones entre las variables evaluadas en la campaña 2005-2006 en Llavallol, Buenos Aires, en un cultivo de amaranto para los tratamientos T1 a T7.....	72
Tabla 2.20.	Contribución de cada componente a la variabilidad total.....	73
Tabla 2.21.	Correlaciones de los componentes principales con las variables originales.....	73
Tabla 2.22.	Correlaciones entre las variables evaluadas en la campaña 2006-2007 en Llavallol, Buenos Aires, en un cultivo de amaranto para los tratamientos T1 a T7.....	76
Tabla 2.23.	Contribución de cada componente a la variabilidad total en la campaña 2006-	

	2007.....	76
Tabla 2.24.	Correlaciones entre los componentes principales 1 y 2 y las variables analizadas..	77
Tabla 2.25.	Contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos para la variable: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.....	80
Tabla 2.26.	Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar según la prueba de Tukey-Kramer.....	80
Tabla 2.27.	Contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos para la variable: Área bajo la curva del progreso de la severidad del tizón foliar en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.....	81
Tabla 2.28.	Medias estimadas y error estándar para la variable según la prueba de Tukey-Kramer para las campañas 2005-2006 y 2006-2007.Área bajo la Curva del progreso de la severidad del tizón foliar.....	82
Tabla 2.29.	Análisis de contrastes ortogonales para la variable Altura de planta a cosecha.	82
Tabla 2.30.	Medias estimadas y error estándar para la variable Altura de planta a cosecha según la prueba de Tukey- Kramer en la campaña 1 (2005-2006) y campaña 2 (2006-2007).....	83
Tabla 2.31.	Promedio del largo de las panojas en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.	83
Tabla 2.32	Análisis de los contrastes ortogonales para la variable Rendimiento en semillas en la campaña 2006-2007.....	84
Tabla 2.33.	Medias estimadas y error estándar para la variable rendimiento de semillas según la prueba de Tuckey- Kramer en las dos campañas.....	85
Tabla 2.34	Medias estimadas y error estándar para el rendimiento de semillas en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.....	85
Tabla 2.35.	Medias estimadas y error estándar para la variable: Materia fresca por metro cuadrado en las dos campañas.....	85
Tabla 2.36.	Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Rendimiento de materia seca por metro cuadrado en las dos campañas.....	86
Tabla 2.37.	Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable Rendimiento de materia seca por metro cuadrado, según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.....	86
Tabla 2.38.	Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Poder germinativo de las semillas.....	87
Tabla 2.39.	Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Poder germinativo según la prueba de Tukey-Kramer para las dos campañas.....	87
Tabla 2.40	Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en semillas.	88
Tabla 2.41.	Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en semillas según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.....	88
Tabla 2.42.	Análisis de los contrastes ortogonales para la variable Peso de 1000 semillas....	89
Tabla 2.43.	Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable Peso de 1000 semillas según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.....	89
Tabla 2.44.	Promedio general estimado para la variable Peso de 1000 semillas.	90
Tabla 2.45.	Evaluación del índice relativo de variables para los siete tratamientos según las variables epidemiológicas y de interés agronómico.	90
Tabla 2.46.	Evaluación del índice relativo porcentual promedio de las variables epidemiológicas para los tratamientos T4 y T7.....	91
Tabla 2.47.	Evaluación del índice relativo porcentual promedio de las variables de interés agronómico en los tratamientos T4 y T7.....	92
Tabla 3.1.	Micobiota aislada de semillas normales y manchadas de amaranto.....	118
Tabla 3.2.	Análisis de las interacciones de la incidencia de <i>Alternaria</i> spp. y el poder germinativo de las semillas de amaranto en relación a los métodos de análisis sanitarios; tipos de semillas y niveles de desinfección aplicados a las semillas.....	121

Tabla 3.3.	Microorganismos fúngicos aislados en tejidos seminales (episperma, perisperma y embrión), de semillas de aspecto normal (S1), manchadas naturalmente con <i>Alternaria</i> spp. (S2) y manchadas por inoculación artificial con <i>A. alternata</i> (S3).....	124
Tabla 3.4.	Contenido de metabolitos secundarios en semillas de amaranto normales (S1), manchadas naturalmente (S2) y artificialmente con <i>A. alternata</i> (S3) y en la cepa LPSC N°1085 de <i>A. alternata</i>	125
Tabla 3.5.	Promedios de temperaturas máxima, mínima, promedio, humedad relativa y precipitación acumulada, durante las campañas: 2013-20014 y 2014-2015, Llavallol, Buenos Aires.....	127
Tabla 3.6.	Coefficientes de correlación de Pearson de once variables evaluadas en cinco genotipos de amaranto expuestos en forma natural a la infección con <i>Alternaria</i> spp. en la localidad de Llavallol, Buenos Aires, en la campaña del 2013-2014....	129
Tabla 3.7.	Contribución de los dos componentes principales a la variabilidad total en la campaña 2013-2014.....	129
Tabla 3.8.	Correlaciones de los componentes principales con las variables analizadas en la campaña 2013-2014.....	130
Tabla 3.9.	Coefficientes de correlación de Pearson de once variables evaluadas en un genotipo de ciclo precoz y cuatro genotipos de ciclo largo de amaranto expuestos naturalmente a la infección con <i>Alternaria</i> spp. en la localidad de Llavallol, Buenos Aires, en la campaña 2014-2015.....	133
Tabla 3.10.	Contribución de los dos primeros componentes principales a la variabilidad total (campaña 2014-2015).....	133
Tabla 3.11.	Correlaciones entre los componentes principales y las variables evaluadas en la campaña 2014-2015.....	134
Tabla 3.12.	Concentración de metabolitos fúngicos secundarios o micotoxinas hallados en semillas de amaranto de diferente tamaño, de un genotipo de ciclo corto y cuatro genotipos de ciclo largo; cultivados en Llavallol, Buenos Aires, durante 2013-2014.....	146
Tabla 3.13.	Concentración de metabolitos fúngicos secundarios o micotoxinas hallados en semillas de amaranto de diferentes tamaños, de un genotipo de ciclo precoz y cuatro de ciclo largo cultivados en Llavallol, Buenos Aires en la campaña 2014-2015.....	146
Tabla 4.1.	Distribución espacio-temporal de plantas de amaranto sintomáticas (+) y asintomáticas (-) en un lote experimental a los 64 días de la emergencia del cultivo.....	168
Tabla 4.2.	Distribución espacio-temporal de plantas de amaranto sintomáticas (+) y asintomáticas (-) en un lote experimental, a los 129 días de la emergencia del cultivo.....	168
Tabla 4.3.	Valores de coeficientes de similitud (F) obtenidos del fitoplasma de proliferación de brotes de amaranto (ASP-Ar1) y fitoplasmas afiliados a distintos subgrupos pertenecientes al grupo 16Sr XIII.....	171

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribución del género <i>Amaranthus</i> en América.....	2
Figura 1.2.	Especies de amaranto cultivadas: a) <i>A. hypochondriacus</i> ; b) <i>A. cruentus</i> ; c) <i>A. caudatus</i> ; d) <i>A. mantegazzianus</i>	3
Figura 1.3.	Pixidio unilocular de amaranto.....	4
Figura 1.4	Semilla de amaranto (a) y embrión (b).....	4
Figura 1.5	Mancha foliar ocasionada por <i>Alternaria alternata</i> en hojas de <i>Amaranthus caudatus</i> subsp. <i>mantegazzianus</i>	20
Figura 1.6.	Tizón foliar ocasionado por <i>Alternaria alternata</i> en hojas de <i>Amaranthus caudatus</i> subsp. <i>mantegazzianus</i>	22
Figura 2.1.	Manchas foliares (etapa inicial del tizón foliar) en amaranto (a); Escala diagramática utilizada para evaluar la severidad de manchas foliares (b) (Fuente Leite y Amorin, 2002).....	44
Figura 2.2.	Hojas de amaranto afectadas por tizón foliar ocasionado por <i>Alternaria alternata</i>	45
Figura 2.3.	Colonia identificada morfológicamente como <i>Chaetomium globosum</i> en medio APG (a); peritecio (b); ascosporas y pelos flexuosos (c).....	61
Figura 2.4.	Colonia identificada morfológicamente como <i>Epicoccum nigrum</i> en medio APG (a); conidios (b).....	62
Figura 2.5.	Colonia identificada morfológicamente como <i>Trichoderma atroviride</i> en medio APG (a); conidióforos fíalides y conidios (b); Hifas hialinas, micelio uniforme (c).....	63
Figura 2.6.	Colonia identificada morfológicamente como <i>Alternaria alternata</i> en medio de cultivo APG (a); patrón de esporulación (b); conidios (c).....	64
Figura 2.7.	Cultivo apareado de <i>A. alternata</i> y <i>C. globosum</i> (a); hifas de <i>C. globosum</i> enrolladas alrededor de las hifas de <i>A. alternata</i> (b); vacuolas en el citoplasma de las hifas de <i>A. alternata</i> (c).....	65
Figura 2.8.	Halo de inhibición en el cultivo apareado de <i>A. alternata</i> y <i>E. nigrum</i> (a); hifas de <i>E. nigrum</i> creciendo en paralelo a las hifas de <i>A. alternata</i> (b); hifas de <i>E. nigrum</i> enrolladas a las hifas de <i>A. alternata</i> (c).....	66
Figura 2.9.	Halo de inhibición en el cultivo apareado entre <i>A. alternata</i> y <i>T. atroviride</i> (a); Enrollamiento de las hifas de <i>A. alternata</i> y formación de clamidosporas de <i>T. atroviride</i> (b); Formación de ganchos o apresorios (c); Penetración de las hifas de <i>T. atroviride</i> en las hifas de <i>A. alternata</i> produciendo lisis celular (d).....	67
Figura 2.10.	Registros meteorológicos mensuales de temperatura máxima (T máx), mínima (T mín), promedio (T media); humedad relativa (HR) y precipitaciones (PP) correspondientes a la campaña 2005-2006 de la localidad de Llavallol, Buenos Aires.....	70
Figura 2.11.	Registros meteorológicos mensuales de temperatura máxima (T máx), mínima (T mín), promedio (T media); humedad relativa (HR) y precipitaciones (PP); correspondientes a la campaña 2006-2007, localidad de Llavallol, Buenos Aires.....	70
Figura 2.12.	Hoja de amaranto afectada por manchas foliares (a), Colonia identificada morfológicamente como <i>Alternaria alternata</i> (b); patrón de esporulación (c); Conidios y conidióforos (d).....	71
Figura 2.13.	Hoja de amaranto afectada por tizón foliar (a), Colonia identificada morfológicamente como <i>Alternaria alternata</i> (b); patrón de esporulación (c); Conidios y conidióforos (d).....	71
Figura 2.14.	Distribución de los tratamientos T1 a T7 (●) y de las variables (○) evaluadas en forma conjunta en la campaña 2005-2006.....	74
Figura 2.15.	Dendrograma correspondiente al efecto de los tratamientos T1 a T7 sobre las variables evaluadas en la campaña 2005-2006.....	75
Figura 2.16.	Distribución de los tratamientos T1 a T7 (●) y de las variables (○) evaluadas conjuntamente en la campaña 2006-2007.....	78

Figura 2.17.	Dendrograma correspondiente al efecto de los tratamientos T1 a T7, sobre las variables analizadas. Promedio (Average linkage). Distancia: (Euclidea) correlación cofenética = 0,833.....	79
Figura 3.1	Semillas de amaranto de apariencia normal (a) y manchada en forma natural (b).....	118
Figura 3.2.	Colonia identificada morfológicamente y molecularmente como <i>A. alternata</i> en APG (a), patrón de esporulación (b) y conidios en Agar agua (c).....	119
Figura 3.3.	Semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma natural (b).	120
Figura 3.4.	Daños ocasionados en amaranto por <i>A. alternata</i> : manchado de las semillas (a), clorosis en plántulas (b); plegado de cotiledones (c y d); radícula atrofiada (d); manchado en cotiledones (e); cancro en hipocótilo (f).....	120
Figura 3.5.	Semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma natural (b) y manchadas por inoculación con <i>Alternaria alternata</i> (c).....	123
Figura 3.6.	Cortes longitudinales de semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma natural (b) y artificial (c); perisperma (p), radícula (ra) y cotiledones (co).....	124
Figura 3.7.	Promedios mensuales de temperatura máxima, mínima; humedad relativa y precipitación correspondientes a las campañas: a) 2013-2014 y b) 2014-2015, localidad de Llavallol, Buenos Aires. Fuente Servicio Meteorológico Nacional, Ezeiza.....	126
Figura 3.8.	Biplot de genotipos de amaranto en función de las variables evaluadas en la campaña 2013-2014.....	131
Figura 3.9	Dendrograma asociado a las variables evaluadas en el cultivo en la campaña 2013-2014, según el método jerárquico de agrupamiento promedio (Average linkage o UPGMA). G1: genotipo de ciclo corto y G2 a G5: Genotipos de ciclo largo.....	132
Figura 3.10.	Biplot de genotipos de amaranto en función de las variables evaluadas en las tres etapas: monitoreo de las lesiones foliares en la etapa de: cultivo, cosecha y post-cosecha, campaña 2014-2015.....	135
Figura 3.11.	Dendrograma asociado a las variables evaluadas en las tres etapas (cultivo, cosecha y post-cosecha), construido según el método de Encadenamiento Promedio (UPGMA) con distancia Euclidea; campaña 2014-2015. G1 genotipo de ciclo precoz, G2 a G5 genotipos de ciclo largo.....	136
Figura 3.12.	Promedio del Área bajo la curva de progreso de la severidad de manchas aisladas, (MASE±SE) en cinco genotipos de amaranto.....	137
Figura 3.13.	Promedio del porcentaje de germinación (PG±SE) en semillas de cinco genotipos de amaranto.....	137
Figura 3.14.	Promedio de incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en semillas (IN1±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	138
Figura 3.15	Promedio de incidencia del manchado en semillas de mayor tamaño, (SMG±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	139
Figura 3.16	Valores promedio de largo de panoja (LP±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	140
Figura 3.17.	Promedio de la Incidencia del manchado en semillas de menor tamaño, (SMC±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	141
Figura 3.18.	Promedio del diámetro basal de tallo: (DBT±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	141
Figura 3.19.	Promedio de Incidencia de manchas aisladas (ABCPE) MAIN±SE, en cinco genotipos de amaranto.....	142
Figura 3.20.	Promedio de altura de la planta a cosecha (ALT±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	143
Figura 3.21.	Promedio de Incidencia de manchas y/o tizón foliar al momento de la cosecha (NTA±SE) en cinco genotipos de amaranto.....	143
Figura 3.22.	Promedio de rendimiento de semillas por metro cuadrado (REN±SE) de cinco genotipos de amaranto.....	144

Figura 3.23.	Promedio del Peso de 1000 semillas de genotipos de amaranto \pm error estándar en cinco genotipos de amaranto.....	145
Figura 4.1.	Planta de amaranto asintomática (a), Plantas sintomáticas con entrenudos cortos, hojas atrofiadas y numerosas panojas laterales de menor tamaño (b y c)	166
Figura 4.2.	Planta de amaranto con brotes atrofiados y amarillamiento de sus hojas (a); Detalle de un brote afectado (b).....	167
Figura. 4.3.	Árbol filogenético construido en base a la secuencia de 16Sr ADN del fitoplasma de proliferación de brotes de amaranto (ASP-Ar1) y cepas representativas de fitoplasma de subgrupos clasificados dentro del grupo 16Sr XIII.....	169
Figura 4.4.	Plántulas de amaranto con cotiledones enrollados (a y b); plantas con rebrotes y panojas deformes (c).....	172

ABREVIATURAS

A: Modo de acción.

AA: Agar agua.

ABCPE: Area bajo la Curva de progreso de enfermedad.

AC: Análisis de clúster o conglomerado.

ACP: Análisis de componentes principales.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AFLP: amplified fragment length polymorphism.

ALT: altura de la planta.

ALTX: alvertoxina.

AM: análisis multivariado.

AME: alternariol monometil éter.

ANA: Acido naftalen acético.

ANOVA: Análisis de varianza.

AOH: alternariol.

APG: Agar papa glucosa.

APZ: Agar papa zanahoria.

ARN: Acido ribonucleico.

a_w: actividad del agua.

Bo: Boro..

C/N: Relación carbono nitrógeno.

CAMP1: Campaña 1.

CAMP12: Promedio de las campañas 1 y 2.

CAMP2: Campaña 2.

cc: Centímetros cúbicos.

CE: conductividad eléctrica.

cm: centímetro.

CME: cuadrado medio del error.

CP: componente principal.

CP1: componente principal 1.

CP2: componente principal 2.

CT: clase toxicológica.

CV: coeficiente de variación.

D: difenoconazole.

dms: diferencia mínima significativa.

DRYES: Agar diclorán rosa de bengala extracto de levadura sacarosa cloranfenicol.

EC: concentrado emulsionable.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

F: Prueba F o de Fisher.

FAA: Formaldehido alcohol acético.

FAO: Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas.

FCAyF: Facultad de Ciencia Agrarias y Forestales.

FF: fertilizante foliar soluble en agua.

FS: fertilización del suelo con N, K, P.

FV: Fuente de variación.

g/l: gramos por litro.

g: gramo.

GenBank: Base de datos de secuencias genéticas.

gl : grados de libertad.

gr-esp.: grupo-especie.

h: horas.

ha: hectárea.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

HR: humedad relativa ambiente.

ia: ingrediente activo.

IFSC: Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.

IICM: índice de inhibición del crecimiento micelial.

INI: Incidencia en semillas afectadas por *A. alternata*.

IRPPVA: índice relativo porcentual promedio de variables agronómicas.

IRPPVE: índice relativo porcentual promedio de las variables epidemiológicas.

IRV: índice relativo de las variables.

ISTA: International Seed Testing Association.

ITS: espaciadores internos de la transcripción.

K: Potasio.

Kb: Unidad de medida en biología molecular igual a 1000 pares de bases de ADN o ARN.

kg: kilogramo.

l: litro.

LC/MS-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

LH: largo del hipocótilo.

LOD: límite de detección.

LP: longitud de la panoja.

LR: Largo de radícula.

m: metro.

MAIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia de la mancha foliar.

MASE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad de la mancha foliar.

meq: miliequivalente.

MET: microscopio electrónico de transmisión.

Mg: Magnesio.

min: minutos.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

Mn: Manganeseo.

MO: materia orgánica.

Mo: Molibdeno.

MS: materia seca.

MseI: Enzima endonucleasa de restricción.

MTIN: Área bajo la curva de progreso de la incidencia del tizón foliar.

mtin: incidencia de hojas afectadas por manchas confluyentes o atizonadas.

MTSE: Área bajo la curva de progreso de la severidad del tizón foliar.

mtse: severidad en hojas afectadas por tizón foliar.

MV: materia fresca.

N: nitrógeno.

NARC: National Agricultural Research Centre.

NRC: National Research Council.

ns: no significativo.

P: fósforo.

P1: primer o cebador universal 1.

P7: primer o cebador universal 7.

Pa: Proporción acumulada.

pb: pares de bases.

PC: fungicida preventivo, curativo.

PCE: fungicida preventivo, curativo, erradicante.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Pe: proporción de la varianza explicada por cada componente principal.

PG: poder germinativo.

pH: grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

PI: porcentaje de inhibición de contaminación de semillas con *A. alternata*.

PIA: porcentaje de inhibición de incidencia de *A. alternata*.

PIG: porcentaje de inhibición de conidios.

PIM: inhibición del crecimiento micelial.

PIP: programa de cooperación europeo manejado por COLEACP.

PM: peso de 1000 semillas.

PP: precipitación.

ppm: parte por millón.

pr: probabilidad.

PS/pl: peso seco por planta.

PS: peso seco.

q: quintal.

r: coeficiente de correlación.

R16F2n-R2: primer universal.

RAPD: perfiles de amplificación con cebadores aleatorios.

RFLP: fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

rpm: revoluciones por minuto.

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

SC: suspensión concentrada.

SD: desvío estándar.

SE: error estándar del promedio de una muestra.

sp: especie no identificada.

SP: sulfato de cobre pentahidratado.

spp: especies no identificadas.

subsp: subespecie.

T media: temperatura media.

T min: temperatura mínima.

T1: tratamiento 1.

T2: tratamiento 2.

T3: tratamiento 3.

T4: tratamiento 4.

T5: tratamiento 5.

T6: tratamiento 6.

T7: tratamiento 7.

TA: *Trichoderma atroviride*.

TeA: ácido tenuazónico.

TEN: tentoxina.

Tm: temperatura de disociación.

Tmáx: Temperatura máxima.

v/v: volumen/volumen.

Vp: Valores propios.

Zn: Zinc.

µg: microgramo.

µm: micrón.

RESUMEN GENERAL

El tizón foliar es una enfermedad endémica para el cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* en la provincia de Buenos Aires, siendo causado por *Alternaria alternata*, patógeno que afecta el vigor de las plantas y la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas. Con el objetivo de reducir los daños ocasionados por el patógeno, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar los tratamientos más efectivos. Los resultados obtenidos en las dos campañas diferenciaron a los tratamientos en los cuales se integró la fertilización del suelo previo a la siembra y la aplicación en las semillas por inmersión de carboxin+thiram (500 ppm) y el tratamiento con *Trichoderma atroviride* (1×10^6 /ml) en forma respectiva. Los tratamientos mencionados redujeron en promedio en ambas campañas la incidencia del tizón foliar e incrementaron el rendimiento en semillas por m²; rendimiento de materia seca; peso de 1000 semillas; poder germinativo de las semillas y redujeron la contaminación de las semillas por *Alternaria* spp. Complementariamente se dieron a conocer dos nuevas patologías: Manchado de semillas y Fitoplasmosis las cuales por su gravedad podrían limitar la producción del cultivo en el futuro. Para el estudio del Manchado de las semillas se efectuaron análisis para identificar al agente etiológico, estudiar la histopatología de las semillas, cuantificar las micotoxinas y evaluar el comportamiento sanitario de genotipos de amaranto de distinto ciclo. Los resultados indicaron que *Alternaria alternata* es el principal microorganismo asociado a las semillas manchadas con una incidencia del 41 %. A su vez, las pruebas de patogenicidad realizadas con este microorganismo demostraron su capacidad para producir el manchado de las semillas, reducir la germinación e inducir el desarrollo anormal de las plántulas. El análisis histopatológico y micológico de las semillas manchadas permitió: a) Localizar los propágulos de *A. alternata* en todos los componentes seminales; b) Observar hipertrofias en perisperma y embrión; c) Detectar mayor concentración de micotoxinas en semillas manchadas y d) Diferenciar a genotipos de amaranto de distinto ciclo destacándose el genotipo de ciclo corto por producir semillas que tuvieron mayor poder germinativo, menor incidencia del manchado y escasa a nula contaminación por micotoxinas. Para el estudio de la segunda patología (Fitoplasmosis) la cual produce alteraciones en el crecimiento de las plantas, se evaluó la distribución y la incidencia de plantas sintomáticas en el cultivo. Se realizaron análisis moleculares para identificar al agente causal, y ensayos en cámara de cultivo para evaluar su transmisión por semillas. De los resultados obtenidos se concluyó que las plantas sintomáticas se distribuyen en forma uniforme en el cultivo con

una máxima incidencia del 92 %. A su vez, los análisis moleculares realizados en plantas sintomáticas permitieron identificar al fitoplasma *Candidatus phytoplasma hispanicum* (subgrupo 16Sr XIII-A), el cual constituye la primera referencia en *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* (Pass) Hanelt en Argentina y, la tercera referencia en América; siendo transmitido por semillas.

Palabras claves: tizón foliar, estrategias de manejo, fungicidas curasemillas, biocontroladores, manchado de semillas, fitoplasmosis

ABSTRACT

Leaf blight is an endemic disease of *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* crop in the Buenos Aires Province caused by *Alternaria alternata*. This pathogen affects plant vigor and the sanitary and physiological quality of seeds. In order to reduce the damage caused by the pathogen, in vitro and in vivo tests were carried out to determine the most effective treatments. Results of two campaigns highlighted treatments in which soil fertilization was integrated prior to sowing and the application to the seeds by immersion of carboxin+thiram (500 ppm) and *Trichoderma atroviride* (1×10^6 /ml) respectively. The aforementioned treatments reduced leaf blight incidence in both campaigns and reduced seeds contamination by *Alternaria* spp. and increased seed yield per m²; dry matter yield; 1000 seed weight and germination. In addition, two new diseases were revealed: Seed discoloration and phytoplasmosis, which due to their severity could limit crop production in the future. For the study of seed discoloration, analyzes were carried out to identify the etiological agent, study the histopathology of the seeds, quantify the mycotoxins and evaluate the sanitary behavior of amaranth genotypes of different cycles. *A. alternata* was the main microorganism associated with discolored seeds with an incidence of 41 %. Pathogenicity tests carried out with this microorganism demonstrated its ability to produce seed discoloration, reduce germination and induce abnormal seedling development. Component plating, histopathological and mycological analyses on discoloured seeds allowed a) location of propagules of *A. alternata* in all seminal components; b) observation of hypertrophies in perisperm and embryo and c) determination of several fungal secondary metabolites, mainly high concentrations of tenuazonic acid and d) differentiate between amaranth genotypes of different cycles, highlighting the short-cycle genotype for producing seeds that register greater germination, lower incidence of discoloration and little to no mycotoxin contamination. For the study of the second pathology which produces alterations in plant growth, the distribution and incidence of symptomatic plants in the lot was evaluated. Molecular analyzes were carried out to identify the causal agent, and tests in a culture chamber to evaluate its transmission by seeds. The symptomatic plants are distributed uniformly in the crop with a maximum incidence of 92 %. In turn, the molecular analyzes carried out on symptomatic plants allowed us to identify the phytoplasma *Candidatus* phytoplasma hispanicum (subgroup 16Sr XIII-A), which constitutes the first reference in *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* (Pass) Hanelt in Argentina and the third reference in America; being transmitted by seeds.

Keywords: leaf blight, management strategies, seeds, fungicides, biocontrol; seed discoloration, phytoplasma

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

1.1. Cultivo de amaranto

1.1.1. Historia

El amaranto es un cultivo ancestral que formó parte de la dieta de las civilizaciones precolombinas que habitaban el continente americano (National Academy of Sciences, 1985), recibiendo diferentes denominaciones según las regiones donde se cultivaba. En Perú: Kiwicha en Cusco; Achita en Ayacucho, Coyo en Cajamarca y Achis en Huaraz; en Bolivia: Coimi, Millmi e Inca pachaqui o grano inca, en Ecuador: Sangorache, Ataco, Quinoa de Castilla, en México: Alegría y Huanthi, en la India: Rejgira, Ramdana, Eerai.

Los amarantos de grano se han cultivado durante más de 8.000 años desde antes de la civilización precolombina de América Central y del Sur (He y Park, 2013). Sin embargo, debido a que las civilizaciones indígenas lo utilizaban en las ceremonias paganas fue prohibido por los conquistadores españoles llegando a quemar los cultivos.

Luego de la conquista española, el amaranto pasó a ser un cultivo casi olvidado, hasta 1979 donde fue revalorizado por la Academia Nacional de Ciencias de USA, por su alta calidad nutricional, pudiendo el amaranto convertirse en un grano con gran potencial para su explotación comercial (NRC,1984).

En los últimos años se ha incrementado el interés por investigar y producir amaranto en América, Asia, África, y varios países del este de Europa debido a su potencial como alimento de alta calidad nutritiva (Kauffman, 1992; Mujica, et al., 1999).

1.1.2. Origen

El amaranto es una dicotiledónea de la familia Amaranthaceae, perteneciente al género *Amaranthus*, habiéndose identificado unas 70 especies tanto silvestres como cultivadas (Brenner et al., 2000; Costea et al., 2001). Según Sauer (1967) 60 especies son nativas de América, mientras que el resto son originarias de Asia, África, Australia y Europa. En cambio, para Robertson (1981) 40 especies son nativas de América y el resto provienen de Europa, Asia, África y Australia.



Figura 1.1. Distribución del género *Amaranthus* en América. (Fuente: Sauer, 1950).

1.2. Taxonomía

Amaranthus proviene del griego *amaranthos*, que significa "flor que no se marchita", siendo descrito y clasificado por Carlos Linneo, en 1753 (Lineau, 1753).

1.2.1. Clasificación

El amaranto se lo clasifica científicamente como:

Reino: Vegetal Plantae.

Subreino: Tracheobionta.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Subclase: Caryophyllidae.

Orden: Caryophyllales.

Familia: Amaranthaceae.

Subfamilia: Amaranthoideae.

Tribu: Amarantheae.

La organización más reciente del género fue propuesta por Mosyakin et al. 1996 incluyendo tres subgéneros: *Acnida*, que agrupa a las especies dioicas, *Amaranthus* y *Albersia*, ambos con especies monoicas, diferenciándose por el tipo de inflorescencia y la dehiscencia del fruto. Las principales especies de amaranto cultivadas por sus granos y más utilizadas para la nutrición humana son *A. caudatus* en Perú y otros países andinos, *A.*

cruentus en Guatemala y *A. hypochondriacus* en México (Bressani, 2003). La mayoría de las especies de amaranto son utilizadas como graníferas, hortícolas, forrajeras, tintóreas, medicinales u ornamentales y otras como malezas como el *Amaranthus quitensis* L. (yuyo colorado) que se lo encuentra en numerosos cultivos.

Entre las especies cultivadas en América (Aguilera Cauich et al., 2021) podemos mencionar: *A. hypochondriacus* (Fig. 1.2a), *A. cruentus* (Fig. 1.2b), *A. caudatus* (Fig. 1.2c) y *A. mantegazzianus* (Fig. 1.2d).



Figura 1.2. Especies de amaranto cultivadas: a) *A. hypochondriacus*; b) *A. cruentus*; c) *A. caudatus*; d) *A. mantegazzianus*.

1.3. Descripción botánica

Desde el punto de vista botánico el amaranto incluye a plantas anuales, herbáceas o arbustivas de diversos colores que pueden superar los 3 m de altura según la especie.

La raíz es pivotante, ramificada con múltiples raicillas delgadas. El tallo de sección cilíndrica presenta estrías longitudinales y ramificaciones.

Las hojas son pecioladas de borde entero, sin estípulas de forma oval, elíptica, opuestas o alternas con nervaduras prominentes en el envés, lisas o poco pubescentes de color verde o púrpura de tamaño variable entre 6,5-15 cm (Sumar Kalinowski, 1993; Tapia, 1997).

La inflorescencia es una panoja amarantiformes o glomeruladas de diversos colores; amarillo, anaranjado, café, rojo, rosado hasta púrpura. El tamaño de las mismas oscila entre 50 a 90 cm con flores masculinas y femeninas. La panoja esta formada por glomérulos de flores unisexuales femeninas y masculinas dispuestas en la base y apice del glomérulo en forma respectiva (Tapia, 1997).

Las plantas son principalmente autógamas según el tipo de polinización, variando el porcentaje de polinización cruzada según los cultivares.

El fruto es una cápsula pequeña (pixidio unilocular) que se abre transversalmente a la madurez (Sumar Kalinowski, 1993) conteniendo una sola semilla (Fig. 1.3).

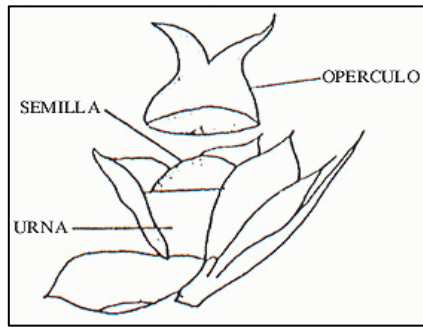


Figura 1.3. Pixidio unilocular de amaranto (Brenner,1990).

Las semillas (Fig. 1.4a) son de forma lenticular ligeramente aplanadas de diversos colores: blanquecinos, amarillentos, dorados, rojos, rosados, púrpuras o negros de 1 a 1,5 mm de diámetro (Mujica y Berti, 1997). Estas semillas están conformadas por una cubierta seminal llamada episperma constituida por una capa de células muy delgadas, la segunda denominada endosperma, el embrión que es rico en proteínas y por último una capa interna llamada perisperma que contiene almidón (Irving et al., 1981, Reguera y Haros, 2017). El embrión de forma curvada está ubicado en la periferia de la semilla (Fig. 1.4b).

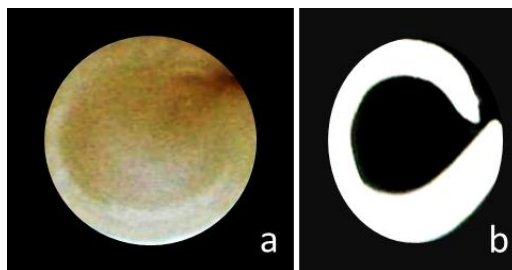


Figura 1.4. Semilla de amaranto (a) y embrión (b).

1.4. Importancia del cultivo

Desde el punto de vista nutricional, el amaranto es un pseudocereal considerado como un cultivo alternativo proveyendo nutrientes de mayor calidad y cantidad que muchos de los cultivos tradicionales (Sumar Kalinowski, 1987), pudiendo combatir la desnutrición que afecta a las personas de menores recursos.

Se destaca de los otros cultivos por las características nutricionales de sus granos teniendo un alto contenido de proteínas variando entre 13 y 18 % (Tabla 1.1), siendo ricas en aminoácidos muchos de los cuales son deficitarios en otras especies (Bejosano y Corke, 1998), como por ejemplo lisina (5 %) (Afolabi et al., 1981; Becker et al., 1981; Carlsson, 1980; Schmidt, 1977; Uzo y Okorie, 1983).

Tabla 1.1. Contenido de proteína en la semilla de amaranto (pseudocereal) y de cebada, maíz, arroz, trigo y centeno. (Fuente: USDA, 1963).

Cultivo	Proteína (%)
Amaranto	13,6 - 18,0
Cebada	9,5 - 17,0
Maíz	9,4 - 14,2
Arroz	7,5
Trigo	14,0 - 17,0
Centeno	9,4 - 14,0

El almidón representa entre el 50 y 60 % del peso de la semilla, de fácil digestión debido al tamaño reducido de los gránulos (1-3 μ m) en relación a los gránulos del maíz y la papa de mayor tamaño.

Contiene además fibra, lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, minerales (hierro, calcio y magnesio); vitaminas A, C y un alto contenido de vitamina E (Lehmann et al.,1994), fitoesteroles, escualeno, fagopiritol, saponinas y polifenoles. El aceite es relativamente rico en tocofenoles y tocotrienos (Breene, 1991).

Según la FAO y la OMS, sobre un valor proteico ideal de 100, el amaranto posee 75, mientras la soja contiene 68, el trigo 60 y el maíz 44. Los granos como su follaje tienen un elevado valor nutritivo, siendo la digestibilidad de los grano muy alta, alcanzando valores de entre 80 y 92 % (Hernández y Herrerías, 1998).

Por su elevado nivel nutritivo, desde 1979 la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (NAS) y la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) consideran al amaranto como uno de los cultivos en el mundo con un elevado potencial para su explotación económica y nutricional a gran escala calificándolo como el principal alimento de origen vegetal para el consumo humano.

El amaranto tiene efectos antioxidantes y también puede contribuir al tratamiento de enfermedades degenerativas crónicas, como osteoporosis, hipertensión, estreñimiento, insuficiencia renal, hepática y celíaca para aquellos que son alérgicos al gluten o a la glucosa, recomendándose su consumo a las personas con diabetes (Porr, 2012).

Por otro lado, las harinas de amaranto, son libre de gluten, por ese motivo pueden ser consumidas por enfermos celíacos (Green y Cellier, 2007).

Las hojas de amaranto son una buena fuente de proteínas y minerales como el manganeso, hierro, cobre, calcio, magnesio, potasio y fósforo, fibra dietética, ácido fólico,

fitosteroles (Tabla 1.2). El consumo de hojas de amaranto es una opción recomendada en pacientes afectados por diabetes, celiaquía, hipercolesterolemia, anemia, sobrepeso, hipertensión, osteoporosis, cáncer y ceguera entre otros.

Tabla 1.2. Valor nutritivo del amaranto como grano y verdura: Rango de valores promedios para varias especies de amaranto expresados en mg por cada 100 g de peso seco. (Fuente: Nieto Cabrera, 1990).

Característica	Grano	Verdura
Proteína (%)	12,0-19,0	14,0-33,3
Grasa (%)	6,1-8,1	1,0-4,7
Fibra (%)	3,5-5,0	5,3-17,0
Carbohidratos (%)	71,8	19,4-43,0
Cenizas (%)	3,0-3,3	2,1-3,0
Calcio (%)	130,0-154,0	1042,0-2776,0
Fósforo (%)	530,0	740,0-760,0
Potasio (%)	800,0	
Hierro (%)	6,3-12,8	7,0-52,0
Caroteno (%)		24,0-33,0
Lisina (%)	0,8-1,0	
Vitamina C (%)	1,5	64,0-693,0

A diferencia de los cereales tradicionales el amaranto se diferencia por su contenido en lisina, aminoácido esencial para la formación de la masa encefálica y por ende favorecería el desarrollo intelectual. El déficit de este aminoácido en particular se puede observar en niños y adolescentes los cuales manifiestan falta del desarrollo intelectual o problemas de aprendizaje como consecuencia de la desnutrición que padecen y que está asociada con alimentos deficientes en lisina. Además este aminoácido es significativo para la producción de hormonas, anticuerpos y enzimas.

Su aporte de fósforo es esencial en el funcionamiento renal y en la formación de los huesos. Su contenido de magnesio es importante en el metabolismo del azúcar en sangre y como relajante del músculo liso (Rastogi y Shukla, 2013).

Los tocoferoles (vitamina E) y tocotrienoles han demostrado tener actividad antitumoral, y antioxidante (Mapes Sánchez y Espitia, 2010), estando clasificado como uno de los cinco principales vegetales con su capacidad antioxidante.

Las semillas contienen una importante cantidad de componentes bioactivos, como ácido L-ascórbico, betacaroteno, polifenol, antocianinas y luteína (Walter, 2001) con propiedades antipiréticas, astringentes, diuréticas, antihemorrágicas y como agente hepatoprotector (Kirtikar y Basu, 1987) y, para el tratamiento de la disentería (Madha et al., 2008).

1.5. Características agronómicas

Desde el punto de vista agronómico el amaranto es un cultivo anual, sembrándose a partir del período libre de heladas. El ciclo del cultivo oscila entre 4 a 6 meses, con los siguientes estados fenológicos: emergencia, fase vegetativa, fase reproductiva, panojamiento, antesis, llenado de los granos, madurez fisiológica y madurez de cosecha (Mujica y Quillahuamán, 1989; Henderson et al., 1993).

Desde el punto de vista fisiológico son plantas que presentan la vía fotosintética de tipo C4, razón por la cual son más resistentes que las plantas C3 a condiciones de mucha luminosidad, altas temperaturas y déficit hídrico, requiriendo menor consumo de agua que los cultivos tradicionales. Presenta una alta capacidad de biosíntesis y baja velocidad de foto-respiración, estas características explicarían su rápido crecimiento y alto rendimiento en biomasa. Además las plantas de amaranto tienen alta plasticidad ecológica adaptándose a diversas regiones agroecológicas, pudiendo desarrollarse a más de 3500 m de altura y en diversos tipos de suelos (NARC, 1984; Liu y Stützel, 2002; Omami y Hammes, 2006), destacándose por su gran plasticidad, resistencia a sequía y salinidad en relación a los cultivos tradicionales (Brenner et al., 2000). Esto, hace que el amaranto pueda prosperar en zonas áridas y semiáridas donde pocos cultivos se desarrollarían (Brenner et al., 2000; Johnson y Henderson, 2002; Omami y Hammes, 2006).

1.6. Usos del amaranto

El amaranto puede ser utilizado en la alimentación humana y animal como en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y en la ornamentación, variando su uso según los países.

En China es utilizado como forraje y como grano consumiéndolo como harina para pastas o dulces y como colorante para la salsa de soja (Yue y Sun, 1993).

En África, se consume principalmente como verdura mientras que en regiones de Asia y en países como Rusia, el amaranto silvestre es utilizado como forraje (Komen, 1992).

En USA, la producción comercial del grano de amaranto se destina principalmente a la elaboración de productos para desayuno, panes y pastas (NRC, 1989).

En Europa se consume como cereal mezclándolo con trigo, linaza y avena entre otros y reventado, inflado, como hojuela o cubierto de miel (Jacobsen y Shewood, 2002).

En la India se consume el grano y las hojas en numerosos platos de la cocina tradicional hindú (Singhal, 1984).

Las harinas son utilizadas para enriquecer otras a base de trigo y maíz.

Las hojas tiernas e incluso las plántulas se consumen en forma de hortalizas, herviéndolas como si fuesen espinaca o acelga y licuándolas se obtiene puré.

La industria alimentaria utiliza los granos enteros o las harinas en la elaboración de postres, papillas, tortas, budines, bebidas, dulces, barras de cereal, sopas, panes, cereales para desayuno, galletitas, etc. (NRC, 1984; Singhal y Kulkarni, 1988; Mujica et al., 1997). También se utiliza para la producción de concentrados proteicos foliares debido a su alto rendimiento de biomasa verde, de proteína (Masoni y Ercali, 1994) y en la producción de brotes nutritivos.

La industria cosmética emplea al escualeno en la elaboración de productos para la piel (Lehmann, 1990) y el almidón para la elaboración de talcos (Saunders y Becker, 1984) y los tallos para la fabricación de cartones debido a su elevado contenido de celulosa.

Como forraje, el amaranto hasta el estado de panojamiento, puede ser consumido por los animales ya sea solo o combinándolo con otras especies forrajeras, principalmente desde el estado vegetativo hasta la formación de la inflorescencia. Los granos pueden utilizarse en la elaboración de alimentos balanceados para aves (Peiretti, 2018).

1.7. Producción de amaranto

Actualmente el cultivo del amaranto se ha difundido a nivel mundial, cultivándose en los cinco continentes ya sea para grano, forraje y en más de 50 países como verdura (National Research Council, 2006).

Los principales países donde se cultiva el amaranto son China, India, Kenya, México, Nepal, Perú, EE.UU., Rusia, Sudamérica e Islas del Pacífico Sur (Bale y Kauffman, 1992).

China es el mayor productor a nivel mundial de amaranto destinado a la producción

de granos y de forrajes, con mas de 150.000 ha cultivadas, (Yue y Sun, 1993), teniendo uno de los bancos de germoplasma más importantes del mundo (Becerra, 2000).

1.7.1. Producción de amaranto en Argentina

En Argentina el cultivo de amaranto se realiza a pequeña escala, sembrándose aproximadamente 500 ha distribuidas en las provincias de La Pampa, Córdoba, San Luis y, en menor proporción en Buenos Aires y Santiago del Estero (Martinez y Mátar, 2017).

La introducción del cultivo se ha realizado en diversas provincias como Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán, La Pampa, Córdoba, Santa Fé, Santiago del Estero, San Luis, Río Negro y en Buenos Aires en las localidades de Miramar, Laprida, Pergamino, Ascasubi, Luján, Llavallol y Los Hornos.

En Buenos Aires Matteucci (1998); Jacquelin et al. (2011); Ciocchini (2013) y Del Valle y Del Valle (2017) señalan al amaranto como una alternativa para pequeños y medianos productores en áreas marginales.

Entre las especies cultivadas en Argentina se encuentra *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* destinadas a la producción de granos y *A. mantegazzianus* para doble propósito utilizándose para verdura, forraje y granos.

El cultivo de amaranto constituye una alternativa potencial para un área superior a los 5.000.000 ha, ubicada en la región semiárida del norte de la Patagonia (Covas, 1994).

Diferentes proyectos se han implementado para ayudar a fortalecer la producción, difusión y consumo del amaranto destinado a la población más vulnerable, entre los cuales tenemos en orden cronológico a los siguientes:

- Proyecto de ley “Fomento, promoción y desarrollo de cultivos andinos subexplotados de valor nutricional en el noroeste argentino”.

- Amaranth: Future and Food. Proyecto internacional del cual participaron investigadores de la República Checa, España, Argentina, México, Dinamarca y Nicaragua (Fomsgaard et al., 2010).

- Proyecto amaranto orgánico: Evaluación del cultivo en distintas localidades de la Pcia. de Buenos Aires, Pergamino. El cultivo de amaranto (Jacquelin et al., 2011).

- Producción de amaranto en un predio orgánico en la zona de Luján, Pcia de Buenos Aires, Argentina (Introcaso et al., 2015).

- Proyecto Kiwicha en Argentina (Amaranto) “Agricultura Autóctona para el desarrollo humano y social como única alternativa para la lucha contra el hambre en la

región, Salta, Argentina” (AID N° 8961/CIPSI/ARG). Eje temático: mesa 3: Ciencia Tecnología y Sociedad (Paredes y Sato, 2011).

1.8. Manejo del cultivo

El amaranto se desarrolla preferentemente en suelos sueltos, arenosos con elevado contenido de materia orgánica, aunque existen variedades que crecen bien en suelos alcalinos (pH 8,5). El cultivo requiere una buena preparación del terreno debido al pequeño tamaño de la semilla que puede realizarse mediante arado de disco o vertedera y rastra de discos o de dientes rígidos o flexibles.

La siembra es conveniente realizarla a una profundidad de 2,0-2,5 cm, manualmente por golpe o a chorrillo, mecánicamente con una sembradora hortícola, una sembradora de grano fino con cajón alfalfero o con sembradores de siembra directa. Para una mejor distribución de las semillas se la puede mezclar con arena o inertes (Henderson et al., 1993).

1.8.1. Densidad de siembra

La densidad de siembra varía en función de la calidad de la semilla y del sistema utilizado. Por lo general se utiliza de 4 a 6 kg de semilla por ha para obtener una densidad de aproximadamente 100-150 mil plantas/ha (Mujica y Berti, 1997).

La producción de semillas tiende a incrementarse en siembras densas que favorecen el desarrollo de plantas de menor altura, diámetro de tallos, número de ramificaciones, número de panojas secundarias y menor porcentaje de vuelco (Bansal et al., 1995).

1.8.2. Fecha de siembra

Las semillas de amaranto requieren para germinar altas temperaturas, siendo la óptima de 25 °C. El umbral mínimo de crecimiento del cultivo es de 8 °C. A temperaturas inferiores a 4 °C comienza a sufrir daño fisiológico por el frío. La temperatura máxima tolerada es de 47 °C (Roque-Siguas, 2019).

En Argentina por lo general, se comienza la siembra a campo, a partir de noviembre donde se dan las condiciones óptimas de temperatura, aunque el inicio de la siembra puede variar dependiendo la región donde se lo cultive ya sea el NOA, Buenos Aires, Córdoba o San Luis.

1.8.3. Control de malezas

El cultivo es muy susceptible en sus primeros estadios de desarrollo a la competencia de las malezas. Una vez establecido se efectúan los raleos necesarios para tener el número de plantas deseado por unidad de superficie, se eliminan las plantas más pequeñas y débiles. El control de malezas puede realizarse en forma mecánica mediante cultivadores o química con herbicidas.

1.8.4. Aporque

Se debe realizar el aporque cuando el cultivo tiene una altura entre 30 a 40 cm para evitar el vuelco de las plantas.

1.8.5. Fertilización

La fertilización se realizó de acuerdo a las condiciones del suelo, disponibilidad de humedad, cultivo antecesor y la especie a sembrar, dado que las distintas especies de amaranto responden de manera diferente a la cantidad de fertilizante aplicado (Elbehri et al., 1993; Fasina et al., 2008).

En términos generales, los requerimientos serán mayores en aquellas especies de doble propósito como es el caso de *A. mantegazzianus* que tiene la capacidad de producir grandes volúmenes de biomasa y por ende el nitrógeno será consumido en mayor cantidad.

1.9. Cosecha

La cosecha se realiza cuando las plantas presentan signos de madurez como hojas secas en la base del tallo y amarillentas hacia el ápice de la planta; cierta dehiscencia en la base de la panoja; granos duros y muy difíciles de romper (González y Rojo, 2005).

La cosecha puede ser manual o mecánica mediante cosechadoras equipadas con cabezal sojero y zaranda de sorgo con mosquitero a las cuales se cierra casi totalmente el ventilador para minimizar las pérdidas debido al bajo peso de las semillas. El secado puede realizarse al sol o por una corriente de aire caliente.

1.9.1. Limpieza del grano

Las impurezas como ramas, tallos, restos de hojas, brácteas y cubiertas de semilla, deben eliminarse para mejorar la calidad del producto (Cabrera Nieto, 1990). El almacenamiento debe efectuarse en lugares ventilados y secos.

1.10. Rendimiento de grano

En América latina se reportan rendimientos que oscilan entre 203 a 7200 kg/ha (Berti et al., 1997).

En Argentina los valores de rendimiento en granos de amaranto por provincias son los siguientes:

La Pampa

Según Reinaudi et al. (2011) en La Pampa el rendimiento del cultivo de amaranto oscila entre 350 a 2.000 kg/ha.

Córdoba: Río Cuarto 1.000-1.500 kg/ha (Peiretti y Gesumaria, 1998).

Buenos Aires: Llavallol: 3.400 a 4.500 kg/ha de semillas (Matteucci, 1998); Pergamino: 800 kg/ha (Jacquelin et al., 2011); La Plata (Los Hornos) 971 kg/ha a 1.635 kg/ha (Del Valle y Del Valle, 2017); Laprida 410 a 450 kg/ha (Reinaudi et al., 2011).

Santiago del Estero: los cultivares graníferos de 1.500 a 2.200 kg/ha y de 82 a 274 kg/ha los cultivares forrajeros de *A. mantegazzianus* (Casenave de Sanfilippo et al., 1993).

Salta: 700 a 1.050 kg/ha (Bayón et al., 2019).

Jujuy: 143 a 1.530 kg/ha, (Mujica Sánchez et al., 1999).

Río Negro: 4.300 kg/ha (Zubillaga, 2017).

Tucumán: 232 kg/ha (Brandán de Antoni et al., 2013).

1.11. Comercialización

En Argentina la producción de granos se comercializa a nivel minorista principalmente en dietéticas y empresas productoras de golosinas, galletitas y barritas de cereales; exportándose a Alemania y Brasil (Lezcano, 2013).

El precio de mercado oscila entre USD 1 a 1,5 por kg de mercadería limpia. Se castiga la presencia de granos negros. Por ello se deben eliminar las plantas fuera de tipo y malezas emparentadas, particularmente el *Amaranthus spinosum*.

1.12. Legislación

Las semillas de amaranto se encuentran incluidas en el Código Alimentario Argentino, en el artículo 660 (Res MSyAS 80 del 13/01/1994) “Con el nombre de Amaranto se entienden las semillas sanas, limpias y bien conservadas de las siguientes especies de este pseudo-cereal: *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amaranthus caudatus* L. y *Amaranthus mantegazzianus* Passer.

El contenido de proteínas (Nitrógeno por 6,25 - Método de Kjeldahl) no debe ser menor de 12,5 %, la humedad no debe ser mayor de 12 %, el contenido de cenizas debe ser menor de 3,5 %, el contenido de almidón no debe ser menor de 60 %, el peso hectolítrico mínimo de 77 kg.

Los granos de amaranto, correspondientes a las especies mencionadas, son de color blanco, ámbar pálido, amarillo o castaño muy pálido, opacas o translúcidas.

También están incluidas en el Código Alimentario Argentino (Res 42/2003 y 360/2003) en el artículo 869 bis a las hojas de amaranto quedando redactado de la siguiente manera: “Art 1: Con la denominación de hojas de amaranto se entiende las hojas del género *Amaranthus* de las siguientes especies: *caudatus*, *cruentus*, *hypochondriacus*, *mantegazzianus*.”

1.13. Análisis FODA: Fortalezas+Oportunidades+Debilidades+Amenazas

El cultivo y producción de amaranto en la Pcia de Buenos Aires presenta fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas, las cuales se analizan a continuación:

Fortalezas: El cultivo de amaranto se ha adaptado a distintas condiciones agronómicas y climáticas sembrándose en las localidades de Pergamino, Luján, Los Hornos, Llavallol, Miramar, Laprida y Ascasubbi. Paralelamente se han creado empresas destinadas a la comercialización como Sturla, radicada en el parque industrial de Burzaco.

Oportunidades: En Argentina como a nivel mundial se ha incrementado la demanda de alimentos saludables, funcionales y para deportistas. Entre las materias primas de estos alimentos se encuentra el grano de amaranto. Entre los alimentos industrializados de gastronomía podemos mencionar las barras de cereales, granos inflados, granolas y los productos sin “TACC” aptos para celíacos, etc.

Debilidades: Reducida área sembrada y con pocos datos estadísticos sobre la producción nacional de amaranto, consumo bajo principalmente por falta de difusión, ausencia de un mercado referencial por ser aún un cultivo para autoconsumo. Ausencia de laboratorios de análisis de calidad de amaranto. No hay maquinaria y equipamiento adaptados al cultivo.

Amenazas: Países competidores como Bolivia y Perú. Plagas y enfermedades que podrían limitar la producción del cultivo por producir daños tanto cuantitativos como cualitativos.

1.14. Factores bióticos que afectan al cultivo

Los principales factores bióticos que afectan al cultivo son los siguientes:

1.14.1. Plagas que afectan al cultivo

Insectos: El cultivo de amaranto es afectado por diversos insectos entre los cuales podemos mencionar a los gusanos cortadores (*Agrotis* spp.); minadores de hojas (*Liriomyza* spp.), defoliadores: hormigas (*Atta* spp.); orugas defoliadoras (*Spodoptera albuna*), escarabajos *Diabrotica speciosa*; bicho moro (*Epicauta adspersa*); oruga del yuyo colorado (*Loxostege bifidalis*); barrenadores de tallo: *Conotrachelus histrio*; *C. seniculus*; *C. cervinus*; *Hypolixus haerens*; *Hypolixus truncatulus*; *Amauromyza abnormalis*; succionadores: Pulgones (*Aphis* spp.), mosca blanca (*Aleurodes* spp.); chinches (*Lygus lineolaris*).

Ácaros: (*Tetranychus* spp., *Mononychellus* spp.; *Oligonychus* spp.).

Nematodos: *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*, producen nódulos en las raíces causando daños significativos a la producción del orden del 10 a 14 % del rendimiento de grano.

Aves: Consumen granos maduros y destrozan la inflorescencia produciendo la caída de las semillas al suelo pudiendo disminuir el rendimiento hasta en un 45 %, sobre todo en áreas donde existen bosques. El daño es mayor si se siembra en épocas donde no hay otros granos en el campo. Durante la siembra y la emergencia de las plántulas, las aves consumen los granos sembrados y plántulas.

Roedores: Causan daños al consumir las semillas almacenadas y disminuyen su valor comercial.

1.14.2. Enfermedades de origen biótico que afectan al cultivo de amaranto

El cultivo de amaranto es afectado por agentes bióticos, entre las que se destacan las patologías de origen fúngico, que pueden tener incidencia directa sobre la producción cualitativa y cuantitativa..

Sin embargo, la ocurrencia de las enfermedades está supeditada a la mayor o menor tolerancia a un determinado patógeno, condiciones ambientales, germoplasmas utilizados, presencia de vectores, hospedantes alternativos además de prácticas de manejo.

Entre los síntomas producidos por los diversos patógenos se encuentran pudriciones, manchas en hojas y en tallos, atizonamiento de tejidos, marchitamiento general de la planta, acortamiento de entrenudos, etc.

1.14.2.1. Enfermedades ocasionadas por hongos

Las enfermedades de origen fúngico que afectan al cultivo a nivel mundial según los órganos afectados son:

1.14.2.2. Enfermedades que afectan a las plántulas

Mal de los almácigos, mal del semillero o Damping off: (*Pythium aphanidermatum*); *Phytophthora*; *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Rivas-Valencia et al., 2012).

1.14.2.3. Enfermedades que afectan al follaje

Roya blanca (*Albugo bliti Wilsoniana bliti*; *Albugo amaranthi Wilsoniana amaranthi*) (NARC, 1984; de Sanson, 1989; Barantes del Aguila, 1991; Alcalde, 1995; Keinath, 2003; Zapata et al., 2009; Noelting, 2010).

Manchas foliares

Alternaria ssp.: (NARC, 1985; Andrango Tunal, 1987; Kearney et al., 2012).

Alternaria alternata: (Pusz, 2009b; Noelting, 2010).

Alternaria amaranthi: (Teri y Mlasani, 1994; de Sanson, 1989; Mondal et al., 2002).

Alternaria tenuissima: (Blodgett et al., 1999).

Alternaria alternantherde: (Holcom, 1978; NAC, 1984).

Cercospora canescens: (De Samson, 1989).

Cercospora beticola: (Sarasola, 1975).

Curvularia lunata (Pankaj et al., 2011)

Viruela: *Phyllosticta amaranthi* (Alcalde de Lanfranco, 1995; Noelting, 2010).

Mildew: *Peronospora effusa* y *Peronospora farinosa* (Brandenburger, 1985).

Tizón foliar

Alternaria spp. (Casenave de Sanfilippo et al., 1993; Kearney et al., 2012).

Alternaria alternata (Sánchez et al., 1990; Noelting et al., 2004, 2010).

Alternaria amaranthi (Ventakakrishnaiad, 1952).

Choanephora cucurbitarum (Teri y Mlasani, 1994).

Phomopsis amaranthicola; (Roskopf et al., 2000).

Rhizoctonia solani (Kamala et al., 1996).

1.14.2.4. Enfermedades que afectan a los tallos

Mancha negra del tallo: *Macrophoma* sp. (Cabrera-Nieto et al., 1991; Sánchez et al., 1991; Noelting, 2010)

Mancha del tallo: Mancha ojival del tallo *Phoma* sp. (Noelting y Sandoval, 2003; Noelting, 2010); *P. longissima* (Espitia Rangel, 1986; *P. betae* (Zubillaga et al., 2012); *P. amaranthi* (Sánchez et al., 1991).

Podredumbre marrón del tallo: *Sclerotinia sclerotiorum* (Cabrera- Nieto, 1989; Mujica Sánchez, 1997; Peiretti y Gesumaria, 1998; Noelting et al., 2001).

Podredumbre carbonosa: *Macrophomina phaseolina* (Dhingra y Sinclair, 1978; Pérez Fernández y Vargas López, 1991; Mihail y Champaco, 1993).

Pudrición húmeda: *Choanephora cucurbitarum* (Ikediugwu, 1981; Rangaswami y Mahadevan, 1988; Anno-Nyako et al., 1993)

Decaimiento de tallos: *Fusarium oxysporum*; *F. sambucinum*; *F. subglutinans* (Blodgett et al., 2004).

Cancrosis del tallo: *Pythium aphanidermatum* (Mihail y Champaco, 1993; Noelting y Sandoval, 2007).

Pudrición del cuello: *Sclerotium rolfsii* (Espitia-Rangel, 1986).

Tizón del tallo y hojas: *Phomopsis amaranthicola* *Phomopsis amaranthi* (Rosskopf et al., 2000).

1.14.2.5. Enfermedades que afectan a la base del tallo y de la raíz

Pudrición de cuello: *Fusarium*, *Rhizotocnia* y *Pythium* (Espitia-Rangel, 1986). Pudrición de cuello y tallo (Blodgett et al., 1999).

1.14.2.6. Enfermedades que afectan a toda la planta

Marchitamiento: *Fusarium poae*; *Phytophthora* (Suquilanda-Valdivieso, 2007).

1.14.2.7. Enfermedades que afectan al sistema radicular

Podredumbre húmeda: *Choanephora cucurbitarum* (Rangaswami y Mahadevan, 1988; Anno-Nyako et al., 1993).

1.14.2.8. Enfermedades que afectan a las inflorescencias (panojas)

Carbón de la panoja: *Thecaphora amaranthi* (Noelting y Astiz Gasso, 2005); *T. amaranthicola* (Noelting et al., 2010).

1.15. Hongos que afectan a las semillas

Diversos microorganismos fúngicos pueden afectar a las semillas produciendo en las mismas diversos daños como:

Atrofas: *Thecaphora amaranthi* y *T. amaranthicola* (Noelting y Astiz Gasso, 2005; Noelting et al., 2005).

Podredumbres: *Alternaria alternata*, *Fusarium poae* (Noelting et al., 2004).

Esclerotizaciones: *Sclerotinia sclerotiorum* (Noelting et al., 2001).

Contaminación por micotoxinas: *Alternaria* spp. (ácido tenuazónico, alternariol, alternariol metil eter) (Noelting et al., 2016); *Fusarium* sp. (zearalenonas), *Aspergillus* sp. (aflatoxinas) y *Penicillium* sp. (citrinina) (Bresler et al., 1995).

Algunas de las patologías no adquieren mayor relevancia dado que pueden manifestarse en forma esporádica, mientras que otras como las manchas y los tizones del follaje son consideradas endémicas ya que aparecen todos los años.

Los agentes etiológicos de origen fúngico de las distintas patologías pueden presentarse en forma individual o formando complejos como es el caso del mal de los almácigos o *damping-off*.

En su mayoría son microorganismos necrótrofos que pueden persistir aún en ausencia del cultivo. El resto, está integrado por patógenos biótrofos como es el caso de *Albugo*, agente causal de la roya blanca o por patógenos hemibiótrofos como *Thecaphora amaranthi* (Bernal-Muñoz et al., 2000; Noelting y Astiz Gassó, 2005; Noelting, 2010; Noelting et al., 2010) o *T. amaranthicola*, ambos responsables de producir el carbón en amaranto (Noelting et al., 2010).

1.16. Enfermedades fúngicas de mayor importancia a nivel mundial

En México, Espitia-Rangel (1986) citó a la mancha negra del tallo y a la podredumbre del cuello de la raíz como las enfermedades de mayor importancia con una incidencia de hasta un 100 % y 73 % respectivamente. Ambas patologías pueden causar el vuelco de las plantas imposibilitando la cosecha mecánica. Según Sánchez et al. (1990) la susceptibilidad del amaranto a las enfermedades limita fuertemente su rendimiento en las zonas productoras de México.

En Ecuador, Suquilanda-Valdivieso (2007) reporta a patologías asociadas a *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y al carbón de la espiga son mencionadas como las principales enfermedades que afectan al cultivo.

En Perú (Cusco), Garmendia (1985), citado por FAO en Cultivos andinos, menciona a la Esclerotiniosis y la Alternariosis como las principales enfermedades del amaranto y según Barantes del Aguila (1991) la roya blanca es la enfermedad más frecuente en la mayoría de los cultivares de amaranto.

En Estados Unidos (Missouri), Mihail y Champaco (1993) reportan a la cancrrosis del tallo ocasionada por *Pythium* sp. como la posible limitante de la producción del cultivo debido a que este patógeno, en condiciones de elevada temperatura y prolongada saturación de agua en el suelo, ocasiona el vuelco de las plantas florecidas.

En Sud-Africa (Nigeria), Anno-Nyako et al. (1993) mencionan a la prodredumbre marrón del tallo y la muerte regresiva ocasionada por *Choanephora cucurbitarum* como las principales patologías que afectan al cultivo de amaranto.

En India, Rangaswami y Mahadevan (1988) mencionan a la roya blanca como la responsable de producir la defoliación del cultivo en ataques severos y Kamala et al. (1996) consideran que el tizón foliar causado por *Rhizoctonia solani* es una seria amenaza para el cultivo de amaranto.

1.17. Enfermedades fúngicas en cultivos de amaranto en Argentina

En Argentina, los reportes sobre enfermedades en especies cultivadas de amaranto provienen de las siguientes provincias:

La Pampa:

De Sansón 1989) reportó en *A. mantegazzianus*; roya blanca (*Albugo bliti*) y Manchas foliares (*Alternaria amaranthi*); en *A. cruentus* y en especies cultivadas de *A. cruentus* y *A. mantegazzianus* a Manchas foliares (*Cercospora* sp.).

Pérez Fernández y Vargas López, (1991) reportaron en cultivos de *A. mantegazzianus* la Podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*).

Santiago del Estero:

Casenave de Sanfilippo et al. (1993) reportaron en cultivares forrajeros de *A. mantegazzianus* a la mancha de la hoja producida por *Alternaria* spp.

Córdoba:

Alcalde de Lanfranco (1995, 1996) reportó a roya blanca (*Albugo bliti*) y viruela (*Phyllosticta* sp.) en *A. mantegazzianus*.

Peiretti y Gesumaria (1998), reportaron al mal de semillero (*Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*) y podredumbre húmeda del tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*). en *A. mantegazzianus*.

Alcalde y Peiretti (2018) reportaron en hojas: Viruela (*Phyllosticta amaranthi*); Mancha en V (*Alternaria* sp.); en tallos: Mancha castaña del tallo (*Phomopsis* sp.) y en panojas al Carbón del amaranto (*Thecaphora amaranthicola*).

Kearney et al. (2012) y Bonelli et al. (2014) reportaron foliares (*Alternaria* sp.) y Roya blanca (*Albugo bliti*).

Alcalde y Peiretti (2018) reportaron la Podredumbre blanda (*Fusarium* sp.) y la Mancha castaña del tallo (*Phomopsis amaranthi*) en *Amaranthus cruentus*.

Buenos Aires:

Noelting et al. (2004) reportaron Tizón foliar (*A. alternata*) y marchitamiento (*Fusarium poae*) y Carbón de la panoja (*Thecaphora amaranthi*) en *A. cruentus* y marchitamiento (*Fusarium poae*) en *Amaranthus hypochondriacus*,

Noelting y Sandoval (2007) reportaron Cancrosis del tallo (*Pythium aphanidermatum*) en *Amaranthus caudatus* subsp. *caudatus*.

Noelting (2010) reportó el mal de los almácigos (*Pythium aphanidermatum*); roya blanca (*Albugo bliti*); mancha foliar (*A. alternata*); tizón foliar (*A. alternata*); mancha negra del tallo (*Macrophoma* sp.); mancha ojival del tallo (*Phoma* sp.); viruela o necrosis circular (*Phyllosticta* sp.); pudrición marrón del tallo o esclerotiniosis (*Sclerotinia sclerotiorum*) y carbón de la panoja (*Thecaphora amaranthi* y *T. amaranthicola*) en *A. mantegazzianus*.

Salta

Zapata et al. (2009) citaron a la roya blanca (*Albugo amaranthi*) en *A. mantegazzianus*

Río Negro

Zubillaga et al. (2012) reportaron a la mancha del tallo (*Phoma betae*) en cultivos de *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*.

A la lista de enfermedades mencionadas anteriormente en Argentina se suman dos nuevas patologías que potencialmente podrían limitar la producción del cultivo, las cuales se reportan en los capítulos III y IV de la presente tesis.

1.17.1. Enfermedades que afectan al follaje causadas por *Alternaria* spp.

El género *Alternaria* es el patógeno foliar más grave que afecta al cultivo de amaranto (NARC, 1985) el cual ocasiona la madurez anticipada del mismo, reduciendo el rendimiento (Andrango Tunal, 1987). En ataques severos puede producir la defoliación anticipada.

Las enfermedades foliares causadas por el género *Alternaria*, reciben distintas denominaciones como: alternariosis, (Coca Morante, 2015); mancha foliar o mal negro

(Holcom, 1978; Blodgett et al., 1999; Casenave de Sanfilippo et al., 1993; Noelting et al., 2006, 2009; Pusz, 2009b; Noelting, 2010; Fuentes Fernandez, 2011, Bonelli et al., 2014), tizón de la kiwicha o alternariosis (de Sansón, 1989; Estrada Zúniga et al., 2014); tizón foliar (Ventakakrishnaiad, 1952; Sánchez et al., 1990; Noelting et al., 2004; 2010).

1.17.1.1. Manchas foliares

***Alternaria* spp.**

En Argentina (Pcia de Córdoba), Kearney et al. (2012) reportaron manchas foliares causadas por *Alternaria* spp. en cultivos de *Amaranthus mantegazzianus*.

***Alternaria alternantherae* Holcomb y Antonopoulos**, sp. nov. Es un hongo del suelo que puede provocar defoliación de las hojas maduras en las plantas (Holcom, 1978) y reducir drásticamente el vigor de las plantas (NAC, 1984). *Amaranthus caudatus* ha demostrado ser susceptible a este patógeno en Pennsylvania, Estados Unidos (NAC, 1984).

***Alternaria amaranthi* (Peck) JM Hook**: Este patógeno causa manchas concéntricas de forma circular, ovalada y de tamaño pequeño en las hojas de color rojizo al principio, luego se vuelven de color marrón oscuro. Este agente puede producir manchas irregulares en los tallos (Teri y Mlasani, 1994). Su presencia fue reportada en ejemplares de *A. cruentus* en La Pampa, Argentina (de Sanson, 1989) y en ejemplares de *Amaranthus paniculatus* en India (Mondal et al., 2002).

***Alternaria tenuissima* (Kunze: Fr.) Wiltshire**: Se informó por primera vez en Sudáfrica en cultivos de *A. hybridus*, produciendo lesiones necróticas de forma circular y ovalada en las hojas, con un diámetro de 1 a 7 mm, rodeada por tejidos adyacentes verdes. El daño causado puede producir la pérdida total del cultivo (Blodgett et al., 1999).

***Amaranthus tenuis* syn. *A. alternata* (P.) Keissler**: Ha sido reportado en Argentina afectando a ejemplares de *A. mantegazzianus* (Noelting et al., 2006, 2009; Noelting, 2010; Bonelli et al., 2014) y en Polonia a ejemplares de *A. cruentus* (Pusz, 2009).



Figura 1.5. Mancha foliar ocasionada por *Alternaria alternata* en hojas de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*.

Los síntomas corresponden a manchas que se encuentran entre las nervaduras (Fig. 1.5) variando el color desde negro a marrón oscuro a rojizo (Noelting et al., 2006, 2009; Pusz, 2009b; Noelting, 2010). El patógeno sobrevive en semillas, tallos, restos de cultivos y malezas como *A. retroflexus* (Mazur et al., 2015).

En la Pcia de Buenos Aires, los niveles de incidencia evaluadas como número de plantas afectadas sobre el total de plantas monitoreadas alcanzaron al 100 % de las plantas en *A. mantegazzianus*.

1.17.1.2. Tizón Foliar

Con la denominación de tizón foliar, alternariosis o atizonamiento del amaranto se reportan los siguientes agentes etiológicos:

***Alternaria* spp.**

En Argentina, Casenave de Sanfilippo et al. (1993), en la Pcia de Santiago del Estero y Kerney et al. (2012) en la Pcia de Córdoba, reportaron manchas foliares en cultivos de *A. mantegazzianus* causadas por *Alternaria* spp.

***Alternaria amaranthi* (Peck.) Venkat**

Este patógeno fue reportado por primera vez en la India en plantas de *Amaranthus paniculatus* (Ventakakrishnaiad, 1952). Los síntomas se observan principalmente en las hojas como manchas circulares de color marrón a marrón oscuro. En los tallos pueden observarse manchas oscuras deprimidas.

El signo del patógeno en forma de micelio puede observarse en las inflorescencias (brácteas, sépalos, estigmas y ovarios).

En ataques severos el patógeno puede ocasionar la defoliación anticipada de las plantas.

***Alternaria tenuis* syn. *Alternaria alternata* (P.) Keissler**

El tizón foliar ocasionado por *A. alternata* fue reportado por primera vez en México en cultivos de *A. hypochondriacus* (Sánchez et al., 1990) y en Argentina en cultivos de *A. hypochondriacus*; *A. cruentus* (Noelting et al., 2004) y *A. mantegazzianus* syn *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* (Noelting et al., 2010).

Los primeros síntomas pueden observarse en las hojas basales, como lesiones necróticas que pueden tener un halo clorótico a su alrededor (Fig.1.6). Las lesiones son de forma irregular y pueden formarse a partir de lesiones más pequeñas que tienden a fusionarse.

En otros casos, las lesiones son manchas angulares de aspecto acuoso que pueden estar rodeadas por un halo clorótico, cubriendo en algunos casos el total de la superficie foliar causando la defoliación prematura.

Generalmente esta patología se manifiesta a partir del período de floración incrementándose hacia el final del ciclo.

Los signos están representados por micelio y conidios que puedan visualizarse sobre hojas lesionadas.



Figura 1.6. Tizón foliar ocasionado por *Alternaria alternata* en hojas de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*.

El tizón foliar ocasiona la pérdida del vigor en las plantas y en los casos severos la defoliación anticipada de las plantas con la formación de numerosas fuentes de inóculos secundarios que afectarán posteriormente a las panojas y semillas.

La infección es favorecida por temperaturas entre 25 a 30 °C y elevada humedad relativa, por ese motivo una alta densidad de plantas incrementa la humedad relativa favoreciendo la enfermedad.

Por otro lado, las siembras tempranas de *A. mantegazzianus* favorecen la manifestación de la roya blanca que causa la ruptura de los tejidos permitiendo el ingreso de *Alternaria* (Información no publicada).

En cultivos de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* localizados en la Pcia. de Buenos Aires, (Llavallol) se han reportado niveles de incidencia del tizón foliar que oscilaron entre 40 y un 90 % del total de las plantas evaluadas (Noelting et al., 2004) y del 100 % en cultivos de *A. mantegazzianus*.

1.18. Consideraciones a tener en cuenta para el manejo de patologías ocasionadas por *Alternaria* spp.

Los daños ocasionados por diversas especies de *Alternaria* están relacionados con la destrucción de los tejidos con pérdida del área fotosintéticamente activa; el valor comercial de las hojas destinadas a verdura y de la calidad sanitaria de las semillas donde el patógeno coloniza incrementando la concentración de micotoxinas nocivas para el consumidor.

Desde el punto de vista epidemiológico debemos tener en cuenta que las enfermedades o patologías producidas por *Alternaria* spp. son enfermedades policíclicas es decir que el patógeno cumple varias generaciones en el mismo huésped. El patógeno una vez establecido se multiplica y dispersa durante el crecimiento del cultivo huésped (Van derPlank, 1963).

Muchos de los hospedantes del género *Alternaria* demuestran susceptibilidad a enfermedades en tejidos jóvenes; tejidos senescentes o heridos. En tejidos jóvenes, *Alternaria* por ser transmitida por semillas (Neergard, 1977) ocasiona el damping off enfermedad que afecta a la germinación. La susceptibilidad de las hojas envejecidas o heridas ha sido reportada en casi todos los sistemas de *Alternaria*-hospedante (Rotem, 1994).

Alternaria alternata, por lo general afecta a los tejidos vegetales envejecidos o dañados (Pusz et al., 2015) siendo su transmisión por semillas lo cual facilita su diseminación (Simmons et al., 2007).

Las semillas y los restos de cultivo constituyen las principales fuentes de inóculo. Los conidios una vez producidos sobre las lesiones pueden dispersarse por el agua, viento,

insectos y maquinaria agrícola. Las semillas pueden ser asintomáticas pero estar infectadas.

Por otro lado, Pusz et al. (2015) mencionan a las especies *Amaranthus hybridus* y *Amaranthus retroflexus* como hospedantes de *A. alternata* pudiendo ser una fuente de inóculo a tener en cuenta para el manejo de la enfermedad.

Hasta el presente no se cuenta con referencias sobre las pérdidas en el rendimiento del cultivo generadas por *A. alternata*. Sin embargo, varias investigaciones reportan que una frecuencia elevada de este patógeno en las semillas de amaranto afectaría su calidad sanitaria. El tizón foliar del amaranto en Llavallol, Buenos Aires, es considerado una de las patologías endémicas del cultivo de *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* syn *A. mantegazzianus*, motivo por el cual se realizó la presente tesis con el objetivo de hallar estrategias para su manejo.

CAPITULO II

EVALUACION DE ESTRATEGIAS DE MANEJO AGRONÓMICO DESTINADAS A MINIMIZAR EL DAÑO OCASIONADO POR *Alternaria alternata* EN EL CULTIVO DE *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo analizar diversas estrategias destinadas a reducir los daños generados por el tizón foliar en el cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* Hanelt syn *A. mantegazzianus* Pass. En la primera etapa se seleccionaron los principios activos químicos y biológicos efectivos para controlar *A. alternata* y paralelamente fuesen inocuos para las plantas. Los fungicidas comerciales utilizados fueron: carboxin (20 % ia) + thiram (20 % ia) con 400, 500 y 600 ppm; difenoconazole (25 % ia) 250, 500 y 700 ppm y sulfato de cobre pentahidratado (25 % ia) 250, 500 y 700 ppm. Los ensayos para determinar el efecto de los fungicidas sobre el desarrollo micelial de *A. alternata* se realizaron *in vitro*, en placas de Petri con Agar Papa Glucosado (2 %), el accionar de los fungicidas en la germinación de los conidios, en portaobjetos cavados y para determinar si producían efectos fitotóxicos, en las diferentes concentraciones, se tomó en cuenta el poder germinativo de las semillas y el desarrollo de las plántulas (largo de radícula, largo de hipocotilo y peso seco de las plántulas. De los potenciales antagonistas de *A. alternata* se seleccionaron a *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum* y *Trichoderma atroviride*. La efectividad de los antagonistas para controlar a *A. alternata* se determinó *in vitro* a partir de cultivos apareados evaluándose el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* y las interacciones hifales entre el patógeno y los antagonistas. La inocuidad de los antagonistas se evaluó teniendo en cuenta el poder germinativo de las semillas y el desarrollo de las plántulas de amaranto. Los resultados de la primera etapa demostraron que todos los fungicidas en las concentraciones analizadas inhibieron la germinación de los conidios de *A. alternata* entre un 80,13 a 92,54 %. Las tres concentraciones de carboxin+thiram inhibieron el desarrollo micelial de *A. alternata* entre un 65,25 a 68,61 %. Los tratamientos más eficientes *in vitro* fueron: carboxin+thiram (500 ppm); difenoconazole (700 ppm) y sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm), teniendo en términos generales un porcentaje de efectividad superior al 86 %. Por otro lado, entre los antagonistas evaluados se destacó *Trichoderma atroviride* por la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *A. alternata* (49,65 %);

micoparasitar las hifas; incrementar la germinación de las semillas de amaranto y el desarrollo tanto de la radícula (68 %) como del hipocótilo de las plántulas (110 %) en relación con el control sin tratar. La segunda etapa se llevó a cabo durante dos campañas consecutivas, en un lote experimental ubicado en la localidad de Llavallol. Se evaluaron seis tratamientos con tres repeticiones que recibieron fertilización en suelo NPK 15:15:6 (180 kg/ha); en forma previa a la siembra, tratamientos que además de la fertilización en suelo recibieron la aplicación en semillas por inmersión de difenoconazole (700 ppm); carboxin+thiram (500 ppm); sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) y una suspensión acuosa de conidios de *T. atroviride* (1/10⁶/ml) en forma respectiva; un tratamiento a base de fertilizante foliar nitrogenado y un tratamiento testigo o control. Se evaluaron diez variables en total durante el desarrollo del cultivo, al momento de la cosecha y en forma posterior. Los datos se sometieron a análisis multivariados, de la varianza (ANOVA) e índices de selección *ad hoc*. Los resultados obtenidos en las dos campañas destacaron a los tratamientos en los cuales se integró la fertilización del suelo previo a la siembra y la aplicación en las semillas por inmersión de carboxin+thiram (500 ppm) y el tratamiento de *T. atroviride* (1/10⁶/ml). Los tratamientos mencionados redujeron en promedio en ambas campañas la incidencia del tizón foliar e incrementaron el rendimiento en semillas, materia seca; peso de 1000 semillas; poder germinativo de las semillas y redujeron la contaminación de las semillas por *Alternaria* spp.

Palabras clave: *Alternaria alternata*, tizón foliar, amaranto, fungicidas, biocontroladores estrategias de manejo.

2.1. INTRODUCCION

2.1.1. Estrategias de manejo del tizón foliar

El control de una enfermedad, se puede lograr mediante un único método, aunque en la mayoría de los casos es necesario utilizar distintas alternativas, siendo aconsejable un manejo integrado de la enfermedad, para controlar la misma y paralelamente disminuir el impacto desfavorable sobre el medio ambiente.

Para ello es necesario tener en cuenta las características de la enfermedad, las prácticas culturales, el uso de los productos químicos y/o biológicos y el impacto sobre el medio ambiente (Achicano y López, 2001).

En las estrategias a utilizar en el manejo de la enfermedad, se debe tener en cuenta las características del agente causal, del hospedante y su relación con el ambiente.

Con respecto al agente causal *A. alternata* se caracteriza por ser un patógeno polífago (afecta a varios cultivos), necrótrofo (sobrevive en restos del hospedante), endófito (desarrolla en plantas asintomáticas).

El tratamiento de las semillas con fungicidas reduciría el inóculo de las mismas y como consecuencia, disminuiría el patógeno en los cultivos y su impacto en el medio ambiente (Fuentes Fernandez et al., 2011).

Con respecto al hospedante, es más vulnerable cuando está sometido a estrés ya sea por falta de nutrientes, agua o daños por insectos, siendo uno de los factores que más influye la humedad ambiental que favorece la colonización del patógeno en los tejidos vegetales (Fuentes Fernandez et al., 2011).

En el cultivo de amaranto, para controlar la Alternariosis se utilizan distintos métodos culturales como la eliminación de restos de cosecha, rotación de cultivos, utilización de variedades tolerantes, evitar siembras densas, controlar a las malezas, químicos como aplicación de fungicidas en semillas y en las plantas y desde el punto de vista genético contar con germoplasmas tolerante a la enfermedad (Fuentes Fernandez et al., 2011).

2.1.2. Control químico

Existe escasa información sobre el uso de fungicidas en amaranto y por lo general, no son específicos para esta especie y tienen poca información sobre los patógenos que atacan en una determinada enfermedad.

Se ha observado que fungicidas, con diferentes principios activos como carboxin+thiram, difenoconazole y sulfato de cobre pentahidratado tuvieron un accionar

semejante controlando a *Alternaria* spp. tanto *in vitro* como *in vivo* (Thejakumar et al., 2016; Rajput y Chaudhari, 2018).

En el cultivo de amaranto, Mujica-Sánchez et al. (1997), recomendaron para el control de hongos a carbendazim (Vitavax), a razón de 2,5 g/kg de semillas, en cambio Suquilanda- Valdivieso (2007) recomienda utilizar 2 g/kg de semilla de hidróxido de cobre o 4 g de ceniza vegetal por kg de semilla. Estrada Zúniga et al. (2014) utilizaron Carbendazim por vía semi-húmeda a razón de 2,5 g/kg de semilla. Sin embargo, ninguna de las referencias citadas especificó que microorganismos fúngicos controlaron. Además, Coca Morante (2015) recomienda en la etapa de formación y maduración de las semillas, el uso de fungicidas sistémicos a base de Carbendazim en zonas endémicas y años húmedos (Pyraclostrobin+Metiram, Azoxystrobina+Difenoconazol, etc.) y fungicidas de contacto en zonas no endémicas y de clima más seco como el oxiclورو de cobre y caldo bordelés.

En cultivos de girasol, Suryawanshi et al. (2018) demostraron que la formulación a base de carboxin+thiram al 37,5 % aplicado a una concentración del 0,25 % inhibe el desarrollo micelial de *A. alternata* que es el principal patógeno foliar del girasol transmitido por semillas.

En cultivo de algodón, Bhattiprolu, 2017 señala que la aplicación de carboxin+thiram al 37,5 % a razón de 4,54 g de formulado por kg de semillas redujo la intensidad de las manchas foliares ocasionadas por *Alternaria* (4,11 %) e incrementó el rendimiento del cultivo. En el mismo cultivo, (Monga et al., 2018) reportan una reducción del 33,6 % de la incidencia del tizón foliar por *Alternaria* y un incremento del 34 % en el rendimiento en semillas previamente tratadas con carboxin+thiram.

En relación al sulfato de cobre pentahidratado, Herrero (2005), señala que en términos generales tiene la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de los hongos por su contenido en cobre.

Por otro lado tenemos que considerar que los fungicidas pueden incrementar la germinación de las semillas y la productividad de los cultivos (Chen et al., 2001; Chen y Edwards, 2001; Tort y Turkyilmaz, 2003).

En relación a los efectos del carboxim+thiram en la germinación de las semillas Biniek y Tylkowska (1987); Muñiz y Porto (1999); Magalhaes et al. (2004), obtuvieron incrementos en la germinación en las semillas de zanahoria, Faria et al. (2003) en algodón, Kabir et al. (2006) en arroz y Rogério et al. (2012) en cártamo. En trigo los resultados

fueron contradictorios para Marini et al. (2011) las semillas tratadas con carboxin+thiram redujeron la germinación y para Malajer y Mian (2009) incrementó su rendimiento.

En relación al difenoconazole, Nithyameenakshi et al. (2006) reportaron incrementos en la germinación de las semillas de *Sesamum indicum* y en *Phaseolus mungo*.

2.1.3. Control biológico

Con respecto al uso de biocontroladores, Prakash et al. (2017) consideran que es una buena opción para controlar las enfermedades para evitar el uso indiscriminado y excesivo de las fungicidas que ocasiona el desarrollo de poblaciones de patógenos más resistentes. Ello trajo aparejado el uso de fungicidas en mayores concentraciones lo cual incrementa la concentración de residuos tóxicos en los alimentos.

En la actualidad hay una marcada tendencia a utilizar agentes de control biológico o biocontroladores, para producir cultivos sanos sin agroquímicos o con una mínima dosis de los mismos, para evitar que haya mayor impacto en los consumidores y en el medio ambiente.

Por ese motivo, en el control biológico de enfermedades se utilizan organismos que disminuyen el crecimiento y/o la reproducción del patógeno (Cook y Baker, 1987) constituyéndose en un método alternativo y seguro para el medio ambiente.

En una recopilación bibliográfica sobre microorganismos biocontroladores, Amerio et al. (2020) destacan, que el género *Trichoderma* es uno de los microorganismos de mayor uso y efectividad en los programas de manejo integrado de plagas, utilizándose como antagonico y regulador de hongos fitopatógenos con gran capacidad para multiplicarse en diferentes sustratos, adaptarse a ambientes diversos, estimular el crecimiento de los cultivos e inducir resistencia sistémica (Harman et al., 2004; Cervantes, 2007).

Las especies de *Trichoderma* como *harzianum*, *atroviride*, *virens* y *koningii*, son las más utilizadas en agricultura porque actúan no sólo como agentes biocontroladores de diferentes patógenos produciendo micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y estimulación de la resistencia sistémica de las plantas, sino también porque tienen tolerancia al estrés abiótico, promoción del crecimiento y desarrollo de los cultivos (Martínez et al., 2013; Waghunde et al., 2016).

2.1.3.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma*, *Chaetomium* y *Epicoccum*

Entre los mecanismos de acción ejercidos por los biocontroladores podemos citar mecanismos directos e indirectos

Entre los mecanismos directos podemos mencionar la competencia tanto por espacio como por nutrientes, micoparasitismo, antibiosis (Aguilar, 2014); secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Haram et al., 1996; Zimand et al., 1996).

La competencia se produce cuando el biocontrolador y el patógeno tienen los mismos requerimientos compitiendo por el sustrato vegetal (Martínez et al., 2013; Waghunde et al., 2016), por los nutrientes o por estimulación de la resistencia sistémica de los nutrientes.

En el micoparasitismo los agentes de biocontrol se nutren de los tejidos del patógeno. Durante este proceso el antagonista crece hacia el hospedante, se adhiere a las paredes del mismo se enrollan y en algunos casos tiene la capacidad de penetrar al degradar las paredes celulares del patógeno (Samuels, 1996).

La penetración de las hifas del antagonista en el hospedante se produce por la acción de enzimas como las quitinasas, glucanasas y proteasas las cuales degradan a la quitina, el glucano y las proteínas presentes en el hospedante (Martínez et al., 1994). Una vez que las hifas del antagonista han penetrado absorben los nutrientes del hongo fitopatógeno (Eveleigh, 1986).

La antibiosis implica la acción tóxica de metabolitos sobre microorganismos sensibles a los mismos.

Entre los mecanismos indirectos desarrollados por *Trichoderma* se encuentra la inducción de defensas fisiológicas y bioquímicas como la activación en la planta de compuestos relacionados con la inducción de la resistencia (Harman, et al., 2004), la detoxificación de toxinas excretadas por el patógeno y la desactivación de enzimas durante el proceso de infección produciéndose la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma natural no son accesibles para las plantas.

Los aislamientos más eficientes de los antagonistas en general serán aquellos que desarrollen varios mecanismos de acción, lo cual les otorgará mayor control sobre los patógenos.

En relación al control de manchas foliares ocasionadas por *Alternaria*, diversas especies de *Trichoderma* han sido reportadas en girasol (Vijayalakshmi et al., 2018), maní (Ajayabhai et al., 2018) y pimiento (Begum et al., 2010).

Surekha et al. (2013) demostraron que semillas cubiertas con esporas de *T. viride* redujeron la incidencia y la severidad del tizón de *Alternaria*.

Vijayalakshmi et al. 2018 reportaron que la aplicación de *Trichoderma viride* en semillas de girasol redujo, la severidad de la mancha foliar producida por *Alternaria* en un 49,53 %, incrementando el rendimiento del cultivo en un 25 % en relación al control e inhibiendo el crecimiento micelial de *A. helianthi* en un 58 % en condiciones *in vitro*.

Sandoval et al. (2006) reportaron la efectividad de *T. harzianum* aplicada en semillas de coriandro obteniendo un porcentaje superior de germinación y una menor contaminación con *A. alternata* en los granos cosechados.

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso del suelo que actúa como un agente de biocontrol para una amplia gama de patógenos de plantas económicamente importantes (Papavizas, 1985; Chet, et al., 1987), teniendo propiedades antagonistas de micoparasitismo, competencia y producción de antibióticos (Adams, 1990).

Perez et al. (2015) reportaron la efectividad de *T. atroviride* la cual permitió reducir la incidencia y la severidad de algunas enfermedades e incrementar el rendimiento en diversos los cultivos.

Los antagonistas pueden aislarse en la rizósfera o en la filósfera de la planta huésped, se multiplican *in vitro* y pueden aplicarse en el cultivo por medio de la pulverización de conidios en suspensión sobre el follaje o mediante el peleteado de las semillas. Por lo general se recomienda el empleo de biocontroladores nativos o locales ya que están más adaptados al medio en el cual se desarrolla el cultivo (Harman et al., 2010).

Con respecto a la promoción de crecimiento ejercida por diversas especies de *Trichoderma* es importante señalar que algunas especies pueden ejercer efectos beneficiosos en el crecimiento de las plantas incrementando la resistencia a factores bióticos y abióticos. Los primeros trabajos revelaron que *Trichoderma* promueve el crecimiento en cultivos de rábano, pimiento, pepino y tomate (Baker et al., 1987; Martínez et al., 2013).

Distintas cepas de *Trichoderma* aplicadas en semillas de pimiento incrementaron la germinación en un 54,87 %, la altura de la planta en un 42 % y la longitud radicular en un 46 % en relación al control (Begum et al., 2010). Víglaš y Olejníková (2019) han hallado que *T. atroviride* promueve el crecimiento en las plantas de *Lepidium sativum* y actúa a su vez como micoparásito potencial de diversos hongos fitopatógenos (*A. alternata*, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*).

Asimismo, los patógenos foliares pueden antagonizarse con otros agentes de biocontrol, entre los cuales se encuentra *Chaetomium globosum* que ha tenido efecto antagónico en diversos patógenos foliares de diferentes hospedantes (Fokkema y Lorbeer,

1974; Sharma y Sainger, 1989; Heller y Theiler-Hedtrich, 1994; Li y Sutton, 1995; Mónaco, 1997; Mónaco et al., 1999, Zhao et al., 2017). Este hongo tiene la capacidad de enrollarse alrededor de las hifas de los patógenos (Cullen y Andrews, 1984; Walther y Gindrat, 1988; Di Pietro et al., 1992).

Por otro lado, *Epicoccum nigrum* ha sido utilizado como agente de control biológico de varios hongos patógenos de plantas (Larena et al., 2005; Mari et al., 2007, Ogórek y Płaskowska, 2011; Li et al., 2013). En semillas de amaranto, *E. nigrum* ha sido mencionado por Moreno-Velázquez et al. (2005), no especificando su rol, es decir si se comporta como patógeno o antagonista.

En el caso particular del control biológico de *A. alternata* en amaranto no se han reportado antecedentes, exceptuando una primera referencia en Argentina de dos cepas de *T. harzianum* evaluadas en un cultivo de *A. hypochondriacus* aplicados a la siembra (Noelting et al., 2001).

2.1.4. Control cultural

El cultivo de amaranto tiene limitaciones en su producción debido a que la mayor parte se realiza a escala familiar, donde las diferentes labores culturales, son realizadas por lo general, en forma manual o asistida por una mecanización básica, no existiendo aún un paquete tecnológico específico, desarrollado para el cultivo extensivo del amaranto, como por ejemplo mejoramiento genético, control químico de malezas, mecanización de las labores culturales, fertilización, etc. (Del Valle y Del Valle, 2017).

Según Primavesi (1984) no hay enfermedad vegetal sin previamente presentar alguna deficiencia mineral, resultando plantas más débiles y afectadas por enfermedades y plagas. Los nutrientes favorecen el crecimiento de las plantas resultando ser más vigorosas, especialmente en amaranto (Martín de Troiani et al., 2005; Zubillaga, 2017; Del Valle y Del Valle, 2017); incrementando la resistencia a enfermedades y retardando la senescencia (Rotem, 1994). La mejora del estado nutricional de las plantas puede conducir potencialmente a la mitigación de los efectos adversos causados por ciertos patógenos (Dordas, 2008). La fertilización puede influir en la resistencia inducida de los patógenos (Huber y Watson, 1974; Marschner, 1995) al retrasar la senescencia de las hojas, siendo la nutrición del huésped un factor importante que afecta la severidad de las epidemias causadas por *Alternaria* (Goodman et al., 1986; Rotem, 1994).

En el cultivo de repollo, la aplicación de fertilizantes integrados por N, P y K redujo la severidad de tizón por *Alternaria* (Singh et al., 2002) y en mostaza, la aplicación

de fertilizantes nitrogenados a razón de 120 kg/ha redujo la severidad del tizón en un 16,38 % e incrementó el rendimiento (Mahapatra et al., 2014).

En el cultivo de papa, se ha demostrado que las altas tasas de fertilización nitrogenada impide la expresión del tizón temprano causado por *A. solani* al posponer la senescencia natural (Barclay et al., 1973; Soltanpour y Harrison, 1974).

El género *Alternaria* afecta principalmente a tejidos senescentes de las plantas, por ende cualquier factor que dilate la madurez también podría reducir la severidad de la enfermedad y mejorar calidad fisiológica y poder germinativo de las semillas (Blachinsky et al., 1996, Singh et al., 2002).

2.1.5. Análisis de situación

Teniendo en cuenta las perspectivas del cultivo de amaranto en la Pcia. de Buenos Aires (Matteucci, 1998; Jacquelin et al., 2011; Ciocchini, 2013 y Del Valle y Del Valle, 2017) y, los daños generados por el tizón foliar, se consideró la posibilidad de analizar estrategias para minimizar en el cultivo el impacto de las patologías ocasionadas por *A. alternata* las cuales producen disminución del vigor a las plantas, defoliación anticipada, pérdida de la calidad comercial del follaje y detrimento de la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas.

La información relacionada con el uso de fungicidas en amaranto mencionada previamente, es escasa y por lo general no es específica en relación a los patógenos a controlar.

En relación al control biológico de patógenos en amaranto son muy escasos los reportes sobre antagonistas nativos de los principales patógenos que lo afectan. En Tailandia, hallaron especies de *Streptomyces* con capacidad de antagonizar a *Pythium aphanidermatum*, principal patógeno asociado al damping off en el cultivo de amaranto (Bajaree et al., 2013).

En nuestro país, se han detectado antagonistas nativos de diversos patógenos fúngicos del cultivos de amaranto entre los cuales tenemos a especies de *Trichoderma* como controladores biológicos de *Sclerotinia sclerotiorum* (Noelting y Sandoval, 2005) y de *Pythium aphanidermatum* (Noelting y Sandoval, 2003); *Epicoccum nigrum* como controlador biológico de *Albugo bliti* (Noelting et al., 2009); *Helicocephalum* y *Nigrospora* como controladores biológicos de teliosporas de: *Thecaphora amaranthicola* (Noelting et al., 2007) y *Cladosporium* spp. como controlador biológico de teliosporas de *T. amaranthi* (Noelting et al., 2007).

En general, se mencionan diversas técnicas para reducir el impacto de las enfermedades, entre ellas las culturales como rotación y eliminación de restos de los cultivos, utilización de variedades tolerantes, siembras de baja densidad y control de malezas (Fuentes Fernandez et al., 2011).

2.1.6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es posible seleccionar estrategias de manejo agronómico para minimizar el impacto del tizón foliar en el cultivo de amaranto.

2.1.7. OBJETIVOS

2.1.7.1. Objetivo general

- Contribuir al desarrollo de estrategias de manejo agronómico integrado, ecológicamente aceptables, para disminuir el impacto del tizón foliar.

2.1.7.2. Objetivos específicos

- Analizar la actividad inhibitoria de los fungicidas carboxin (20 % ia)+thiram (20 % ia), 400, 500 y 600 ppm (ia); b) difenoconazole (25 % ia), 250, 500 y 700 ppm (ia); y sulfato de cobre pentahidratado (25 % ia), 250, 500 y 700 ppm (ia) en el crecimiento micelial y en la germinación de los conidios de *A. alternata*.
- Determinar la inocuidad de los fungicidas en semillas y en las plántulas de amaranto.
- Aislar, evaluar y seleccionar potenciales antagonistas nativos de *A. alternata*. para su aplicación en semillas.
- Evaluar en el cultivo bajo condiciones no controladas, la efectividad de los tratamientos preseleccionados *in vitro* sobre las variables de interés epidemiológico y agronómico.

2.2. MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se realizaron ensayos en el laboratorio, en cámara de cultivo y en el campo en lotes experimentales.

Para la evaluación de los fungicidas *in vitro* se utilizó una cepa *A. alternata*, secuenciada por Macrogen y depositada en el cepario del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina bajo el número 2361.

En cambio, para la evaluación de los tratamientos en los ensayos *in vivo* solo fue identificado el género debido a la imposibilidad de identificar a nivel molecular a todas las cepas de *Alternaria* aisladas de las lesiones foliares.

A continuación se describen los ensayos en condiciones controladas

2.2.1. Evaluación de los fungicidas *in vitro*

Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la efectividad de los fungicidas. Para ello se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIM); el porcentaje de inhibición de germinación de los conidios de *A. alternata* (PIG) y el porcentaje de semillas contaminadas por *A. alternata* (PIA).

Se realizaron las siguientes determinaciones:

2.2.1.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las colonias de *Alternaria alternata* por acción de los fungicidas

La efectividad de los fungicidas se evaluó tomando como referencia la técnica de envenenamiento por alimentos (Nene y Thapliyal, 1979). Los principios activos evaluados fueron: carboxin (20 % ia)+thiram (20 % ia); difenoconazole (25 % ia) y sulfato de cobre pentahidratado (25 % ia) en tres concentraciones cada uno.

En la Tabla 2.1 se detallan los fungicidas, empresa que lo produce, nombre comercial, principio activo, dosis utilizadas, modo de acción y clase toxicológica de cada uno de ellos.

Se utilizaron soluciones madres de los tres fungicidas (carboxin+thiram; difenoconazole y sulfato de cobre pentahidratado) al 10 % de la formulación comercial utilizando para diluirlos agua destilada estéril. Para obtener las soluciones de trabajo se tomó 1 ml de la solución madre de cada fungicida de acuerdo a las concentraciones preestablecidas en la Tabla 2.1 y se lo diluyó con agua deionizada estéril hasta obtener la concentración a utilizar.

Para la aplicación de los fungicidas *in vitro*, se utilizó las concentraciones indicadas en la Tabla 2.1 y se las incorporó al medio de cultivo (APG 2%) previo a su solidificación, colocándose posteriormente el medio suplementado con los fungicidas en placas de Petri de 90 mm de diámetro.

Tabla 2.1. Fungicidas y concentraciones utilizadas en los ensayos *in vitro*.

Empresa	Nombre comercial	Principio activo	ia(%)	cc	A	CT		
Chemtura	Vitavax flo (SC)	carboxin+thiram	20+20	400	500	600	PC	III
Syngenta Agro S.A.	Bogard (EC)	difenoconazole	25	250	500	700	PCE	III
Agrimarketing	Python (SC)	sulfato de cobre pentahidratado	25	250	500	700	PC	III

cc: Concentración expresada en partes por millón de ingrediente activo; A: Modo de acción; CT: Clase toxicológica; SC: suspensión concentrada; EC: concentrado emulsionable; PC: Preventivo-Curativo; PCE: Preventivo, Curativo, Erradicante.

Una vez solidificado el medio se colocó en el centro de cada placa de Petri un disco de 5 mm de diámetro de APG (2 %) colonizado con *A. alternata*, obtenido del borde de una colonia de siete días de edad.

Por cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones incluyendo como testigo o control tres placas de Petri sin el agregado de fungicidas según un diseño completamente aleatorizado.

Las placas se incubaron en cámara de cultivo a 25 °C y 12 h de fotoperíodo durante siete días. Diariamente se midió el diámetro de las colonias del patógeno.

Con los valores del diámetro de las colonias de *A. alternata* a los siete días se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento en cada uno de los tratamiento en relación con el control, utilizándose la fórmula de Bliss, (1934).

$$PIM(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde:

PIM: porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno; C: Diámetro de la colonia del patógeno en el tratamiento control (mm) y T: Diámetro de la colonia del patógeno (mm) en presencia del fungicida.

2.2.1.2. Inhibición de la germinación de los conidios de *Alternaria alternata*

Para evaluar la efectividad de los fungicidas sobre la germinación de los conidios de *A. alternata* (PIG), se agregó a una colonia sembrada siete días antes en un medio de APG (2 %), 10 ml de agua destilada estéril raspándose la parte superior de la misma con una espátula de goma.

La suspensión obtenida se filtró para eliminar los restos de micelio y del medio de cultivo. El líquido sobrenadante conteniendo la suspensión de conidios se ajustó a una concentración de 1×10^4 conidios/ml con una cámara de Neubauer. La suspensión de conidios de *A. alternata* se mezcló con cada una de las soluciones de los fungicidas en una relación 1:1 (v/v) y se colocó 0,08 ml en cada una de las cavidades de un portaobjeto cavado cubriéndolos con un cubreobjeto. Como control se utilizó una suspensión de conidios sin el agregado de fungicida. Los portaobjetos se colocaron dentro de placas de Petri las cuales se distribuyeron en la cámara de cultivo en oscuridad a 25 °C, según un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento.

El porcentaje de germinación de los conidios se evaluó a las 6, 12 y 18 h después de iniciada la incubación observándolos en un microscopio óptico (Carl Zeiss 4033699) a analizándose 100 conidios por muestra tomados al azar. El porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PIG (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Donde:

PIG: Porcentaje de inhibición de germinación de conidios; a: total de conidios germinados en el testigo o control y b: total de conidios germinados en cada tratamiento.

2.2.1.3. Evaluación de la efectividad de los fungicidas en semillas

Para evaluar la efectividad de los fungicidas en semillas (PIA), se utilizaron semillas de amaranto las cuales se desinfectaron para eliminar la contaminación superficial por microorganismos, con una solución de hipoclorito de sodio (55 g/cl) al 2 % durante cinco min, se enjuagaron con agua destilada estéril y secaron entre papeles de filtro estériles.

Las semillas una vez desinfectadas se inocularon con una suspensión de conidios de *A. alternata* (1×10^4 conidios/ml), obtenidos de una cepa con marcada actividad patógena en el follaje, la cual se la secuenció en Macrogen y se encuentra depositada en el cepario del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina bajo el número 2361.

A partir de las muestras preinoculadas se aplicaron los fungicidas mediante la técnica de inmersión. Se colocaron 10 g de semillas en cada una de las soluciones de los fungicidas durante 30 minutos, se secaron entre papeles de filtro estériles y sembraron en placa de Petri con 15 ml de medio de APG (2 %) 25 semillas por repetición y 100 semillas por tratamiento. Las placas de Petri se incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C y 12 h de fotoperíodo. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

A los siete días se evaluaron los hongos desarrollados en las semillas en un microscopio estereoscópico (Nikon) y calculándose el porcentaje de semillas infectadas por *A. alternata*.

El porcentaje de inhibición de la contaminación de las semillas por *A. alternata* por los fungicidas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{PIA (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

Donde PIA (%): Porcentaje de inhibición de incidencia de *A. alternata* en semillas; a: Incidencia de semillas contaminadas por *A. alternata* en el control (%) y b: Incidencia de las semillas contaminadas por *A. alternata* con fungicida (%).

2.2.1.4. Determinación de la inocuidad de los fungicidas en semillas y en plántulas de amaranto

Semillas de amaranto previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante cinco min y enjuagadas con agua destilada estéril, se trataron con cada una de las soluciones de los fungicidas y se sembraron en bandeja a razón de 100 semillas por cada tratamiento (unidad experimental) con cuatro repeticiones, según un diseño completamente aleatorizado. Las bandejas se incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C y a 12 h de fotoperíodo.

Al cabo de siete días de incubación se evaluó el poder germinativo de cada uno de los tratamientos aplicándose la fórmula número de semillas germinadas sobre el total de semillas por 100 y se midió largo de radícula, hipocótilo y peso seco de las plántulas.

2.2.2. Selección de los fungicidas

Para seleccionar el o los fungicidas con mejor comportamiento y las concentraciones más efectivas, se tuvo en cuenta: a) Inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata*; b) Inhibición de la germinación de los conidios de *A. alternata*; c) Incidencia

en las semillas tratadas en relación al control y d) Inocuidad de los fungicidas en semillas y en plántulas de amaranto.

2.2.3. Análisis estadístico

Los datos de las variables se analizaron con el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2018). Se analizaron las medias y a las variables cuyos cuadrados medios resultaron significativos, se les aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.2.4. Aislamiento, evaluación y selección de antagonistas de *A.alternata*

Los aislamientos de potenciales antagonistas de *A. alternata* se obtuvieron de semillas de *A. cruentus* que tenían baja contaminación por *A. alternata*. Las semillas provenían de plantas madres que habían registrado escasa incidencia de tizón foliar en los lotes experimentales.

Para aislar a los microorganismos, las semillas de *A. cruentus* se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min., se enjuagaron en agua destilada estéril y secaron entre papeles de filtro estériles. Las semillas se sembraron en placas de Petri con 15 ml de medio APG e incubaron en una cámara de cultivo durante siete días a 25 °C y 12 h de fotoperíodo.

Al cabo de siete días de incubación se aislaron e identificaron los microorganismos desarrollados en base a sus características morfológicas y culturales mediante observaciones en el microscopio estereoscópico; microscopio óptico, técnicas de microcultivo y con claves sistemáticas (Rifai, 1969; Domsch et al., 1980; Arx et al., 1986; Simmons, 1995; 2007).

2.2.5. Índice de inhibición del crecimiento micelial

La evaluación del índice de inhibición del crecimiento micelial (IICM) de los antagonistas sobre el *A. alternata* se realizó *in vitro* utilizando la técnica de cultivos duales. Para ello, se sembraron enfrentados en una placa de Petri de 90 mm de diámetro un disco de micelio del patógeno de 5 mm de diámetro y otro del antagonista, a una distancia de 4 cm, para cada una de las combinaciones. Los discos del patógeno y el antagonista se extrajeron de los márgenes de las colonias puras desarrolladas durante siete días en placas de Petri con medio de cultivo APG.

El antagonismo se evaluó a través del índice de inhibición del crecimiento micelial (IICM) calculado a partir del diámetro del patógeno y de cada uno de los antagonistas, a los siete días de incubados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IICM (\%)} = \frac{D1 - D2}{D1} * 100$$

Donde:

IICM: Índice de inhibición del crecimiento micelial.

D1: diámetro de la colonia del patógeno (testigo).

D2: diámetro de la colonia del patógeno desarrollado en presencia del antagonista.

2.2.6. Efectos de los antagonistas en la zona de interacción con *Alternaria alternata*

Para evaluar la capacidad de los antagonistas de producir alteraciones en las hifas y en los conidios de *A. alternata* se tomaron secciones de la zona de interacción del patógeno y del antagonista se montaron en un portaobjetos y se tiñeron con lactofenol. Posteriormente se analizaron con un microscopio óptico Marca Carl Zeiss, los efectos producidos por los antagonistas en la morfología de las hifas y conidios del patógeno.

2.2.7. Evaluación de los efectos de los antagonistas de *A. alternata* en las semillas de amaranto

2.2.7.1. Preparación del inóculo

Las suspensiones de conidios de los antagonistas: *C. globosum*, *E. nigrum* y *T. atroviride* se obtuvieron de las colonias desarrolladas durante siete días en placas de Petri con medio APG.

Para la preparación del inóculo, se agregó agua destilada estéril a las placas de Petri. Posteriormente, se raspó la superficie de las colonias con una espátula para recolectar las esporas, se filtró el líquido sobrenadante para eliminar resto de medio medio e hifas. La concentración de las suspensiones se midió con un hematocímetro y se ajustó a una concentración de 1×10^4 esporas por ml.

2.2.7.2. Tratamiento de las semillas de amaranto

Para analizar el efecto de los antagonistas en las semillas de amaranto se realizó un ensayo con cuatro repeticiones. Las semillas se trataron con las suspensiones de cada uno de los antagonistas, colocándose 100 semillas por repetición en bandejas con papel prehumedecido incluyendo un control con semillas sin tratar.

Posteriormente las bandejas se incubaron en cámara de cultivo a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h. Al séptimo día de incubadas, se evaluó el poder germinativo de las semillas y en plántulas se evaluó la longitud de la radícula y del hipocótilo.

2.2.7.3. Análisis estadístico

Los datos de cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza según un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. En todos los casos se analizaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas y aditividad.

Las diferencias entre tratamientos se calcularon mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (varianzas homogéneas). Los análisis se realizaron con el programa estadístico software InfoStat (Di Rienzo et al., 2018), con un nivel de significación del 5%.

2.2.7.4. Selección de los antagonistas

Para la selección de los antagonistas se tuvo en cuenta la actividad desarrollada sobre el patógeno (*A. alternata*) y su inocuidad en semillas y plántulas de amaranto.

2.2.8. Ensayos en lotes experimentales

2.2.8.1. Localización de los ensayos

La investigación se llevó a cabo durante las campañas 2005-2006 y 2006-2007 en el predio experimental del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina ubicado en la localidad de Llavallol (latitud 34° 47' sur, longitud 58° 26' oeste) aproximadamente a 20 metros sobre el nivel del mar, en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

Las temperaturas medias quinquenales máximas y mínimas fueron de 22,2 °C y 10,7 °C respectivamente. Enero fue el mes de temperaturas más elevadas (29,3 °C en promedio). La precipitación quinquenal promedio fue de 1118 mm por año.

2.2.8.2. Análisis de suelo

En las dos campañas se tomaron muestras de suelo de distintos sectores del lote experimental. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Edafología FCAYF, UNLP. Se determinó nitrógeno, fósforo, potasio, pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y relación carbono nitrógeno. El análisis de textura y contenido en K se realizó en el Laboratorio de Edafología (UNLZ).

2.2.8.3. Genotipo utilizado

Se utilizó un genotipo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* syn *A. mantegazzianus* de ciclo largo de 160 días susceptible al tizón foliar.

2.2.8.4. Tratamientos

En los ensayos se emplearon seis tratamientos combinando N, K, P, fertilizante foliar soluble en agua y los fungicidas difenoconazole, carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado, el biocontrolador *Trichoderma atroviride* y el control sin tratamiento (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Tratamientos aplicados en el suelo; en semillas y, en plantas de amaranto.

TRAT	FS	FF	D	CT	SP	TA
T1	0	0	0	0	0	0
T2	FS	0	0	0	0	0
T3	FS	0	D	0	0	0
T4	FS	0	0	CT	0	0
T5	FS	FF	0	0	0	0
T6	FS	0	0	0	SP	0
T7	FS	0	0	0	0	TA

TRAT: tratamientos, FS: fertilización aplicada en el suelo; FF: fertilizante foliar nitrogenado soluble en agua, D: difenoconazole (700 ppm); CT: carboxín+thiram (500 ppm); SP: sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm); TA: *Trichoderma atroviride*.

Para mejorar la adherencia de los conidios de *T. atroviride* a las semillas de amaranto se utilizó una suspensión acuosa de gluten al 1% (peso/volumen). Las semillas inoculadas se secaron entre papeles de filtro estériles, conservándolas hasta la siembra. El sulfato de cobre pentahidratado se aplicó por inmersión.

2.2.8.5. Diseño experimental

Los tratamientos se distribuyeron en parcelas según un diseño en bloques al azar con tres repeticiones. La unidad experimental estaba compuesta por parcelas de cuatro m de largo y tres surcos con una distancia entre los mismos de 0,50 m.

2.2.8.6. Prácticas culturales realizadas en el cultivo

Previo a la siembra, los lotes en ambas campañas se roturaron con un motocultivador.

Para la fertilización del suelo se utilizó un fertilizante granulado a base de N:P:K (15:15:6), a razón de 180 kg/ha, aplicándolo en el fondo del surco y cubriéndolo con una capa de suelo. En el tratamiento control no se aplicó fertilizante. Posteriormente se realizó la marcación de surcos y de parcelas.

La fertilización foliar, solamente se aplicó en el tratamiento (T5), utilizándose un fertilizante soluble en agua Yogen 1: N: 44 %, Zn: 0,08 %, Mn: 0,08 %, Bo: 0,02 %, trazas de Mo y ANA a razón de 3,5 g/l. La aplicación se realizó con una mochila pulverizadora de 5 litros de capacidad a los 27 días después de la emergencia del cultivo en la primera campaña y a los 26 días en la segunda campaña.

La siembra se efectuó manualmente depositando las semillas a chorrillo en el fondo de los surcos a 3 cm de profundidad. En la primera campaña se sembró el 19/12/05 y en la segunda campaña el 23/12/06. El desmalezado y aporque del cultivo se realizó manualmente.

Para el control de coleópteros que afectan al follaje se aplicó Carbaryl; para moscas blancas se utilizaron trampas de color amarillo para su captura y para las hormigas se utilizó un cebo comercial a base de (dodecacloropentaciclo [5.2.1.02,6.03,9.05,8] decano).

La cosecha se efectuó cuando las plantas estaban de color pardo amarillento y los granos opacos (10/5/06) para la primera y (2/5/07) para la segunda campaña. Las panojas se cortaron manualmente con una tijera de podar y se secaron en zarandas.

Con posteridad a la trilla se limpiaron las semillas con zarandas y ventiladores y se tamizaron con un tamiz de 1 mm de diámetro.

2.2.9. Monitoreo de las lesiones foliares

El cultivo se monitoreó semanalmente para detectar las primeras lesiones foliares y analizar el agente etiológico que las producía. Las hojas sintomáticas se recolectaron y llevaron al laboratorio para su procesamiento y posterior análisis.

De las hojas lesionadas se tomaron pequeños trozos de tejido (5×5 mm), se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min y enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron y colocaron en placas de Petri conteniendo APG 2 %, incubándose en cámara de cultivo a 25±2 °C, con un fotoperíodo de 12 h luz durante siete días. Luego de la incubación se analizaron macroscópicamente y

microscópicamente las colonias desarrolladas para identificar los patógenos a nivel genérico.

Para caracterizar a los aislamientos del género *Alternaria*, se utilizaron cultivos monospóricos incubados en placas de Petri con APZ y en Diclorán Rosa de bengala sacarosa y extracto de levadura (DRYES) durante siete días a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 8 h luz y 16 h de oscuridad (Andersen et al., 2001; Simmons, 2007). Al finalizar el período de incubación, se examinó el color de las colonias en ambos medios.

El patrón de esporulación de los aislamientos se analizó en las colonias desarrolladas en APZ con un microscopio estereoscópico (lupa), observándose el número de ramificaciones de las cadenas de conidios.

Las características morfobiométricas como tamaño, forma y disposición de los conidios, aspecto, color, ornamentación, número de tabiques transversales y longitudinales, características del conidióforo se analizaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss 4033699) con un aumento de 500X.

2.2.10. Variables epidemiológicas y agronómicas examinadas

Para evaluar el efecto de los tratamientos se cuantificaron y analizaron variables epidemiológicas y de interés agronómico en tres etapas:

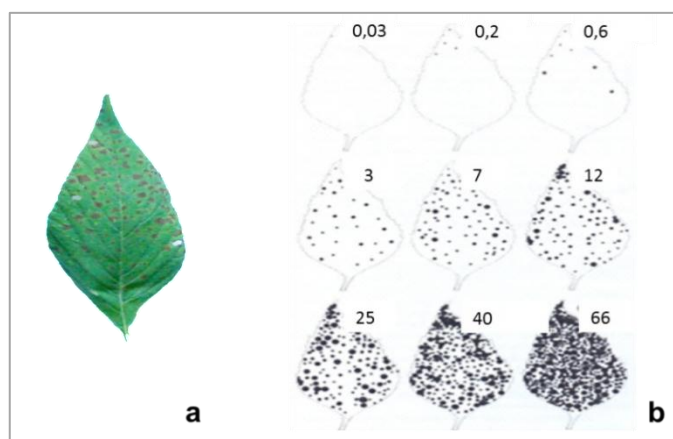


Figura 2.1. Manchas foliares (etapa inicial del tizón foliar) en amaranto (a); Escala diagramática utilizada para evaluar la severidad de manchas foliares (b) (Fuente Leite y Amorin, 2002).

En la primera etapa: se realizaron ocho evaluaciones cada siete días en el cultivo. De cada unidad experimental, se seleccionaron al azar nueve plantas en las cuales se analizó el total de hojas, determinándose la cantidad afectadas por tizón (incidencia) y

porcentaje de tejido dañado (severidad del tizón). Esta última se evaluó en los estadios iniciales (Fig. 2.1), utilizándose la escala de Leite y Amorin (2002).

En estados más avanzados se evaluó visualmente el porcentaje de área foliar afectada (severidad) en forma directa (Fig. 2.2).



Figura 2.2. Hojas de amaranto afectadas por tizón foliar ocasionado por *Alternaria alternata*.

En la primera etapa y en cada campaña se evaluaron las siguientes variables:

2.2.10.1. Incidencia de hojas afectadas por manchas confluyentes o atizonadas

La incidencia de las hojas atizonadas o confluyentes (mtin), se calculó mediante la fórmula:

$$mtin = \frac{N^{\circ} \text{ de hojas afectadas por tizón}}{\text{Total de hojas}} * 100$$

2.2.10.2. Severidad de hojas afectadas por tizón foliar

El grado de severidad del tizón foliar (mtse) se calculó considerando el porcentaje visual de área foliar afectada (% severidad). Para calcular la severidad promedio por planta se aplicó la siguiente fórmula:

$$mtse = \frac{\sum (N^{\circ} \text{ de hojas afectadas por tizón foliar} \times \text{severidad} (\%))}{\text{Total de hojas analizadas por planta}}$$

2.2.10.3. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad

Los valores de incidencia (mtin) y de severidad (mtse) fueron utilizados para calcular el área bajo la curva de progreso del tizón foliar (ABCPE) para incidencia (MTIN) y severidad (MTSE). Estos valores se calcularon mediante el modelo de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990), de acuerdo a la fórmula general:

$$ABCDE = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde: n: es el número de evaluaciones, y: es la proporción de la enfermedad y $(t_{i+1} - t_i)$ es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas.

La primera variable MTIN corresponde al ABCPE del tizón foliar calculada en base a la incidencia de hojas afectadas por tizón foliar (mtin) mientras que la variable MTSE corresponde al ABCPE calculada en base a la severidad del tizón foliar (mtse).

En la segunda etapa: durante la cosecha y a partir de nueve plantas tomadas al azar en cada unidad experimental se evaluó altura de la planta (ALT) y longitud de la panoja (LP).

En la tercera etapa: en la post-cosecha se evaluaron las siguientes variables:

2.2.10.4. Rendimiento de semillas

Para obtener el rendimiento de las semillas de cada uno de los tratamientos de las tres repeticiones, se cosecharon las panojas de 1 m² de cada una de las tres parcelas. Se secaron sobre zarandas y trillaron manualmente. Las impurezas se eliminaron pasando lo trillado por tamices y con un ventilador. Se tomaron muestras de las semillas para determinar el porcentaje de humedad y se ajustó el rendimiento por planta a un contenido de humedad equivalente al 12 %.

2.2.10.5. Materia fresca

Para determinar la materia fresca (MV) se cosecharon tres parcelas de 1 m² por tratamiento. Las muestras compuestas por hojas y tallos, se pesaron inmediatamente después de cosecharse. El promedio de las tres muestras constituyó el peso de la materia fresca por metro cuadrado.

2.2.10.6. Materia seca por metro cuadrado

Para determinar la materia seca por metro cuadrado (MS), se tomaron tres muestras de materia verde se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante. Con el promedio de las tres muestras se calculó la materia seca

2.2.10.7. Peso de 1000 semillas

Para calcular el peso de 1000 semillas (PM), se tomaron al azar, tres muestras de 1000 semillas cada una por tratamiento, se secaron en estufa hasta peso constante y posteriormente se ajustó a un 12 % de contenido de humedad.

2.2.10.8. Poder germinativo de las semillas

Para determinar el poder germinativo de las semillas (PG), se tomaron muestras de 400 semillas por cada tratamiento se sembraron en bandejas sobre papel prehumedecido (*blotter test*) y se colocaron en cámara de germinación a 20/30 °C con un fotoperiodo de 12/12 h luz-oscuridad durante siete días. Posteriormente, se contaron cantidad de semillas germinadas y el porcentaje de plántulas normales y anormales según lo establecidos por las normas ISTA 2018.

2.2.10.9. Incidencia de semillas afectadas por *Alternaria* spp.

La incidencia de las semillas de amaranto afectada por *Alternaria* spp. (IN1), se evaluó tomando muestras de 400 semillas por tratamiento, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante cinco min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se sembraron sobre papel humedecido en bandejas 100 semillas por cada repetición de los tratamientos. Las bandejas se incubaron a 25 °C con 12 h de luz negra durante siete días. Al finalizar la incubación se evaluó el número de semillas contaminadas por *Alternaria* spp. con la lupa binocular.

Los datos se expresaron en porcentaje de semillas contaminadas por *Alternaria* (incidencia).

2.2.11. Análisis de datos de las variables epidemiológicas y de interés agronómico

2.2.11.1. Análisis de los datos

En primera instancia se evaluaron los datos correspondientes a tres variables epidemiológicas MTIN, MTSE e IA1 y siete variables de interés agronómico ALT, LP, REN; MV; MS; PM y PG las cuales fueron sometidas a un análisis exploratorio de los

componentes principales en forma simultánea con todas las variables evaluadas en base a la matriz de correlaciones de promedios de las variables estandarizadas.

El análisis de componentes principales fue realizado con diez variables correspondientes al Área bajo la curva de progreso de la enfermedad en relación a la incidencia del tizón foliar; severidad de atizonamiento; altura de planta a cosecha; largo de panoja; rendimiento por metro cuadrado expresado en g de semilla; materia fresca expresado en g/m²; materia seca expresado en g/m²; poder germinativo; peso de 1000 semillas e incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp. .

Los tratamientos se consideraron como variables de clasificación y la dispersión de los tratamientos y variables analizadas se graficó sobre un plano con dos componentes principales (CP1 y CP2).

2.2.11.2. Análisis de Conglomerados

Para el análisis de conglomerados (AC) se empleó la matriz de distancias Euclideas. La selección del método jerárquico de agrupamiento se realizó a través del coeficiente de correlación cofenética (Sokal y Rohlf, 1962).

En segunda instancia se realizó un análisis de varianza para cada variable en particular. En todos los casos se analizaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas y aditividad. Cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, se emplearon modelos mixtos con una matriz de errores diagonal heterogénea según región, en el ANOVA (Mc Culloch y Searle, 2001). Las diferencias entre tratamientos se calcularon mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (varianzas homogéneas) o Tukey-Kramer (varianzas heterogéneas).

Como prueba adicional de comparación de tratamientos, se utilizó la técnica de contrastes ortogonales, evaluándose las siguientes comparaciones (Tabla 2.3). Todos los análisis se realizaron con los programas estadísticos software InfoStat (Di Rienzo et al., 2018) y SAS (SAS, 2016) y con un nivel de significación del 5 %.

Tabla 2.3. Contrastes ortogonales entre los grupos de tratamientos T1 a T7.

Contrastes	grupos de tratamientos
1	T1 vs T2 a T7
2	T1 vs T2
3	T2 vs T3,T4,T5,T6,T7
4	T4:T3,T4,T6 vs T7
5	T2 vs T5

T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7.

2.2.11.3. Análisis estadístico individual de variables epidemiológicas y agronómicas realizado en forma combinada para las dos campañas

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables estudiadas, se empleó un diseño en bloques al azar en arreglo factorial (factor 1: tratamientos; factor 2: campañas) con tres repeticiones considerando a los 7 tratamientos como efectos fijos y a los bloques anidados en campañas. Se realizó el análisis individual de un total de 10 variables según el siguiente modelo:

Modelo

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_{k(j)} + \varepsilon_{ijk} \quad i = 1, \dots, 7 \quad j = 1, 2 \quad k = 1, \dots, 3$$

donde:

y_{ijk} respuesta correspondiente al i -ésimo tratamiento, el k -ésimo bloque anidado en la j -ésima campaña.

μ promedio general.

α_i efecto del tratamiento i .

γ_j efecto de la campaña j .

$(\alpha\gamma)_{ij}$ efecto de la interacción entre el tratamiento i y la campaña j .

$\beta_{k(j)}$ efecto del k -ésimo bloque anidado en la j -ésima campaña.

ε_{ijk} error aleatorio correspondiente al i -ésimo tratamiento, el k -ésimo bloque anidado en la j -ésima campaña.

$\beta_{k(j)} \sim N(0, \sigma_\beta^2)$.

$\varepsilon \sim N(0, R)$.

R es la matriz de varianzas y covarianzas del vector de errores.

- En el análisis de las variables, MTIN ALT y MV, considerando que las varianzas son homogéneas, se empleó $R = I \sigma^2$.
- En el análisis de las variables: MTSE, PG y PM, considerando que las varianzas de los tratamientos eran heterogéneas, se utilizó una matriz R diagonal con varianzas diferentes para cada tratamiento $R = \sigma_i^2$.
- En el análisis de las variables DBT, REN, MS e IA1, considerando que las varianzas de los tratamientos en cada campaña resultaron heterogéneas, se empleó una matriz R diagonal de varianzas diferentes para cada tratamiento y campaña. $R = \sigma_{ij}^2$.

2.2.11.4. Selección de los tratamientos en los ensayos a campo

Para la selección final de los tratamientos se tuvieron en cuenta tres índices¹ *ad hoc*, con el propósito de contar con mayores elementos de juicio para una clasificación final de los tratamientos a modo de síntesis de los resultados alcanzados. Se utilizaron los siguientes índices: a) índice relativo de las variables (IRV); b) índice relativo porcentual promedio de las variables epidemiológicas (IRPPVE) y c) índice relativo porcentual promedio de las variables agronómicas (IRPPVA). El cálculo de los índices citados se desarrolló en tres etapas:

2.2.11.4.1. En la primera etapa

Para el cálculo del índice relativo de variables (IRV), se tuvieron en cuenta los resultados de ambas campañas para cada variable en particular según la prueba de Tukey-Kramer.

El procedimiento seguido para la obtención del IRV consistió en la asignación del valor 1 sólo para aquellos tratamientos que, en ambas campañas, se diferenciaron del tratamiento control en cada una de las variables analizadas. Posteriormente se realizó la sumatoria de todos los puntos obteniéndose un índice. A partir de los valores numéricos (IRV) se realizó una preselección de los tratamientos, estableciéndose como valor de corte ≥ 6 .

2.2.12.4.2. En la segunda etapa

A partir de los tratamientos preseleccionados se calcularon dos nuevos índices: el índice relativo porcentual promedio de variables epidemiológicas (IRPPVE) en el cual se cuantificaron para cada variable las diferencias relativas porcentuales con respecto al control. Las variables epidemiológicas consideradas fueron: MTIN, MTSE e IA1.

2.2.11.4.3. En la tercera etapa

Se calculó el índice relativo porcentual promedio de variables agronómicas (IRPPVA), para lo cual se cuantificaron las diferencias relativas porcentuales de cada tratamiento con respecto al control de las variables agronómicas: REN, MV, MS y PG.

¹El término índice hace referencia al agrupamiento de las medidas de diversas variables. Número con que se representa convencionalmente el grado de intensidad de una determinada cualidad o fenómeno. Permite asignar un valor a la calidad, o al aspecto al que se haga referencia, utilizando un número específico de parámetros, es una expresión matemática que permite indicar las características de un fenómeno que no puede ser medido de manera directa. Un índice permite hacer comparaciones (Guitton, 1960).

Para la selección final de los tratamientos se tuvo en cuenta los tratamientos que obtuvieron los máximos valores en los índices IRPPVE e IRPPVA. Es decir, se seleccionaron los tratamientos cuya aplicación redujeron los valores de variables epidemiológicas y que a su vez incrementaron los valores de las variables de interés agronómico.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Evaluación *in vitro* de los fungicidas

A continuación se muestran los resultados de las variables analizadas:

2.3.1.1. Inhibición del crecimiento micelial por efecto de los fungicidas

El análisis estadístico del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIM), mostró diferencias significativas entre los tratamientos de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole ($F=237,39$; $gl=35$; $p<0,0001$; $CV: 4,65\%$) (Tabla 2.4).

A su vez, la prueba de Tukey señaló que todos los tratamientos afectaron el desarrollo micelial de *A. alternata* con valores que oscilaron entre 9,86 y 68,61 % (Tabla 2.4). destacándose los tratamientos a base de carboxin+thiram por registrar los máximos valores de inhibición.

Tabla 2.4. Porcentaje de inhibición de desarrollo micelial de *Alternaria alternata* con diferentes concentraciones de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole.

Fungicidas	ppm (ia)	PIM (%)	±SD		
carboxin+thiram	400	68,61	1,99	a	
carboxin+thiram	600	67,38	3,23	a	
carboxin+thiram	500	65,25	4,77	a	
sulfato de cobre pentahidratado	700	37,38	6,12		b
sulfato de cobre pentahidratado	500	36,15	7,35		b
difenoconazole	700	33,57	7,62		b
difenoconazole	500	27,97	5,78	b	c
difenoconazole	250	14,67	8,62		c d
sulfato de cobre pentahidratado	250	9,86	7,51		d

PIM:Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, SD: desvío estándar; dms:14,85. Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

El fungicida carboxin+thiram en sus tres concentraciones (400, 500 y 600 ppm i,a) inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata* con valores superiores al 65 %, no hallándose diferencias significativas ($p\geq 0,05$), según la prueba de Tukey (dms: 14,85; CME: 38,97; $gl: 27$; $CV: 15,57\%$) entre las tres concentraciones analizadas (Tabla 2.4).

En el caso del sulfato de cobre pentahidratado y del difenoconazole, tuvieron diferencias significativas entre las concentraciones analizadas. La menor concentración de

cada uno de ellos tuvo menor efecto en relación a las dos concentraciones restantes, es decir que a medida que se incrementaba la concentración de cada uno de los fungicidas, se incrementaba la toxicidad sobre el patógeno. En este caso, la efectividad de los fungicidas estaba directamente relacionada a la concentración del ingrediente activo.

Si se considera el promedio de las tres concentraciones analizadas, el sulfato de cobre pentahidratado inhibió el crecimiento micelial en un 27,7 % y el difenoconazole en un 25 % en relación al control (Tabla 2.4).

Los tratamientos menos efectivos (Tabla 2.4), fueron el difenoconazole 250 ppm (14,67 %) y sulfato de cobre pentahidratado 250 ppm (9,86 %).

2.3.1.2. Inhibición de la germinación de los conidios por efecto de los fungicidas

Todos los fungicidas afectaron la germinación de los conidios de *A. alternata* (PIG), con valores superiores al 80 % en relación al tratamiento control o testigo, para el que se consideró con un valor de 0 de eficacia del control (Tabla 2.5; Tabla 2.6 y Tabla 2.7).

Tabla 2.5. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *Alternaria alternata* a las 6 h de la incubación.

Fungicidas	ppm (ia)	PIG	± SD	
sulfato de cobre pentahidratado	500	92,54	1,5	a
sulfato de cobre pentahidratado	700	92,16	1,6	a
sulfato de cobre pentahidratado	250	91,47	1,3	a b
difenoconazole	500	90,45	1,1	a b c
difenoconazole	250	87,23	2,8	b c
difenoconazole	700	86,52	1,5	c
carboxin+thiram	500	81,55	1,7	d
carboxin+thiram	400	81,55	2,9	d
carboxin+thiram	600	80,13	1,1	d

PIG: Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios; SD: desvío estándar; dms: 4,35. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

El análisis estadístico de la primera evaluación del porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *A. alternata*, realizada a las 6 h de incubación, mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($gl=35$; $F=31,87$; $p<0,0001$; $CV: 2,10\%$).

A su vez, la prueba de Tukey expresó diferencias significativas ($p>0,05$) entre las concentraciones de los fungicidas para el porcentaje de inhibición de germinación de los conidios, en relación al control (Tabla 2.5).

El sulfato de cobre pentahidratado a las 6 h de incubación afectó la germinación de los conidios de *A. alternata* siendo el más eficiente seguido por el difenoconazole y en último lugar el carboxin+thiram.

En la segunda evaluación, realizada luego de 12 h de incubación, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($gl=35$; $F=25,88$; $p<0,0001$; CV: 2,19 %). A su vez, la prueba de Tukey mostró diferencias significativas ($p>0,05$) entre las concentraciones de los fungicidas (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *Alternaria alternata* a las 12 h de la incubación.

Fungicidas	ppm(ia)	PIG	± SD	
sulfato de cobre pentahidratado	500	91,70	2,4	a
sulfato de cobre pentahidratado	700	91,01	1,6	a b
sulfato de cobre pentahidratado	250	91,01	1,6	a b
difenoconazole	500	88,86	0,4	a b c
difenoconazole	250	86,93	3,3	b c
difenoconazole	700	86,19	0,5	c d
carboxin+thiram	400	82,06	2,8	d e
carboxin+thiram	600	81,37	1,5	e
carboxin+thiram	500	80,68	0,7	e

ppm: parte por millón; PIG: porcentaje de inhibición de la germinación de conidios; SD: desvío estándar; dms: (4,52). Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

En la tercera evaluación realizada a las 18 h de incubación, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($gl=35$; $F=25,88$, $p<0,0001$; CV: 2,16 %). Los porcentajes de inhibición en relación al control oscilaron entre 81 a 91 %, hallándose diferencias significativas entre las concentraciones de los fungicidas en relación al control según la prueba de Tukey ($p>0,05$) (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *Alternaria alternata* a las 18 h de la incubación.

Fungicidas	ppm(ia)	PIG	±SD		
sulfato de cobre pentahidratado	250	90,71	1,65	a	
sulfato de cobre pentahidratado	500	90,70	1,77	a	
difenoconazole	500	89,39	0,36	a	b
sulfato de cobre pentahidratado	700	89,38	2,26	a	b
difenoconazole	250	86,07	2,69		b c
difenoconazole	700	84,75	1,49		c d
carboxin+thiram	600	80,80	1,00		d
carboxin+thiram	400	80,80	2,37		d
carboxin+thiram	500	80,75	1,99		d

ppm: parte por millón; PIG: Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios; SD: desvío estándar; dms: 4,2, Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

Los resultados obtenidos en las tres evaluaciones mostraron un óptimo control de la germinación de los conidios de *A. alternata* por todos los fungicidas especialmente por el sulfato de cobre pentahidratado en sus tres concentraciones.

2.3.1.3. Poder germinativo de las semillas de amaranto tratadas con fungicidas

El análisis estadístico del poder germinativo de las semillas de amaranto (PG), mostró diferencias significativas entre los tratamientos (gl: 39; F: 432,04; $p < 0,0001$; CV: 9,23 %). A su vez, la prueba de Tukey (dms: 18,53; CME: 59,06; gl: 30) mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el tratamiento control (agua destilada) y los fungicidas.

Los tratamientos incrementaron la germinación de las semillas con valores que oscilaron entre el 33 y 60 % en relación al control (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Poder germinativo de semillas de amaranto tratadas con los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado, difenoconazole y el control.

Fungicidas	ppm(ia)	PG	±SD	
difenoconazole	500	93	2,00	a
sulfato de cobre pentahidratado	250	92	5,66	a
difenoconazole	250	92	5,66	a
carboxin+ thiram	400	88	7,30	a
sulfato de cobre pentahidratado	500	85	10,00	a
sulfato de cobre pentahidratado	700	85	7,57	a
difenoconazole	700	84	5,66	a
carboxin+thiram	500	79	11,94	a
carboxin+thiram	600	77	8,25	a
control	0	58	8,33	b

ppm: parte por millón; PG: Poder germinativo; SD: desvío estándar; dms:18,53. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.1.4. Efectos de los fungicidas en el largo de la radícula en plántulas

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos con fungicidas y el control (gl: 39; F: 3,45; $p < 0,005$; CV: 11,15 %). A su vez, en la prueba de Tukey no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control pero si entre los tratamientos a base de carboxin+thiram 250 ppm y difenoconazole (700 ppm) y entre sulfato de cobre pentahidratado 250 ppm y difenoconazole (700 ppm) (Tabla 2.9).

El tamaño de la radícula osciló entre 1,9 cm (carboxin+thiram 250 ppm) a 2,8 cm (difenoconazole 700 ppm) (Tabla 2.9).

El tratamiento con difenoconazole con 700 ppm tuvo mayor desarrollo de la radícula diferenciándose a su vez del resto de los tratamientos (Tabla 2.9).

Semillas tratadas con 250 y 700 ppm de difenoconazole tuvieron mayor desarrollo del sistema radicular que las tratadas con 250 ppm de carboxin+thiram.

Tabla 2.9. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la longitud de la radícula de las plántulas de amaranto.

Fungicidas	ppm (ia)	LR (cm)	±SD	
carboxin+thiram	250	1,91	0,26	a
sulfato de cobre pentahidratado	250	2,12	0,36	a b
carboxin+thiram	600	2,37	0,38	a b c
Control	0	2,40	0,29	a b c
difenoconazole	500	2,43	0,18	a b c
sulfato de cobre pentahidratado	500	2,46	0,27	a b c
sulfato de cobre pentahidratado	700	2,46	0,32	a b c
carboxin+thiram	500	2,55	0,05	a b c
difenoconazole	250	2,63	0,14	b c
difenoconazole	700	2,80	0,25	c

ppm: parte por millón; LR: largo de raíz, SD: desvío estándar dms:0,64. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.1.5. Efectos de los fungicidas en el largo del hipocótilo en plántulas

El análisis de la varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (gl: 39; F: 4,55; $p < 0,0008$; CV: 6,9 %). A su vez, en la prueba de Tukey no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Tabla 2.10)

Tabla 2.10. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la longitud del hipocótilo de plántulas de amaranto.

Fungicidas	ppm (ia)	LH (cm)	±SD	
sulfato de cobre pentahidratado	250	1,20	0,06	a
sulfato de cobre pentahidratado	700	1,29	0,06	a b
control	0	1,32	0,09	a b c
difenoconazole	250	1,32	0,09	a b c
difenoconazole	500	1,34	0,13	a b c
carboxin+thiram	400	1,35	0,11	a b c
carboxin+thiram	500	1,36	0,04	a b c
difenoconazole	700	1,44	0,09	b c
carboxin+ thiram	700	1,50	0,06	b c
sulfato de cobre pentahidratado	500	1,53	0,15	c

ppm: parte por millón; LH: largo hipocótilo; SD: desvío estándar; dms: 0,22. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

Si bien hubo diferencias significativas entre algunos de los tratamientos con respecto a la longitud del hipocótilo, no se tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control (Tabla 2.10).

La longitud del hipocótilo osciló entre 1,20 a 1,53 cm. La mayor longitud del hipocótilo (1,53 cm), se registró con la concentración intermedia de sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm).

2.3.1.6. Incidencia de los fungicidas en el peso seco de las plántulas

El análisis de la varianza para el peso seco de las plántulas (PS), no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos (gl: 39; F: 1,64; $p < 0,148$; CV: 12,87 %)

El peso seco por plántula osciló entre 0,47 a 0,63 mg (Tabla 2.11), no registrándose diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey.

Tabla 2.11. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre el peso seco de plántulas de amaranto.

Fungicidas	ppm (ia)	PS/pl (mg)	±SD
carboxin+thiram	600	0,47	0,084 a
control	0	0,52	0,100 a
sulfato de cobre pentahidratado	500	0,54	0,035 a
difenoconazole	700	0,55	0,046 a
sulfato de cobre pentahidratado	700	0,56	0,088 a
difenoconazole	250	0,56	0,090 a
difenoconazole	500	0,57	0,068 a
carboxin+thiram	500	0,60	0,058 a
sulfato de cobre pentahidratado	250	0,62	0,080 a
carboxin+thiram	400	0,63	0,031 a

ppm: parte por millón; PS/pl: peso seco por planta; SD: desvío estándar. dms: 18,53. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.1.7. Inhibición de la contaminación por *Alternaria* spp. de las semillas de amaranto tratadas con fungicidas

El análisis de la varianza indicó diferencias entre los tratamientos (gl: 35; F: 16,13; $p < 0,0001$; CV: 5,93 %).

A su vez, la prueba de Tukey marcó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado 250 ppm y el resto de los tratamientos, siendo el menos efectivo para controlar *A. alternata* (Tabla 2.12).

Todos los fungicidas redujeron la contaminación de las semillas previamente inoculadas con conidios de *A. alternata* (Tabla 2.12). Los tratamientos, exceptuando al carboxin+thiram (400 ppm) y sulfato de cobre pentahidratado (250 ppm) tuvieron una efectividad superior al 80 % (Tabla 2.12).

Los valores correspondientes al porcentaje de inhibición de contaminación de semillas por *A. alternata* en relación al control oscilaron entre 59,40 a 91,78 %.

Tabla 2.12. Efecto de los fungicidas carboxin+thiram, sulfato de cobre pentahidratado y difenoconazole sobre la incidencia de *Alternaria alternata* en semillas de amaranto.

Fungicidas	ppm (ia)	PI	±SD	
carboxin+thiram	500	91,78	3,49	a
difenoconazole	700	91,59	6,34	a
carboxin+thiram	600	87,64	6,19	a b
sulfato de cobre pentahidratado	700	86,70	3,16	a b
sulfato de cobre pentahidratado	500	86,22	3,46	a b
difenoconazole	500	83,27	5,35	a b
difenoconazole	250	80,92	5,41	a b
carboxin+thiram	400	78,42	4,75	b
sulfato de cobre pentahidratado	250	59,40	4,92	c

PI= porcentaje de inhibición; SD: desvío estándar; dms: 11,68. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.1.8. Selección de los fungicidas *in vitro*

Del total de tratamientos evaluados (Tabla 2.13), se seleccionaron al carboxin+thiram (500 ppm), difenoconazole (700 ppm) y sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm). El peso seco de las plántulas, no se tuvo en cuenta para la selección de los tratamientos, debido a que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control.

Los tratamientos seleccionados se caracterizaron por:

- a) Inhibir el desarrollo del micelio de *A. alternata* (valores>30%).
- b) Inhibir la germinación de los conidios de *A. alternata* (valores>80%).
- c) Incrementar el poder germinativo (valores>36%).

d) Disminuir la contaminación de las semillas (valores >86%).

Tabla 2.13. Variables relativas utilizadas para seleccionar los fungicidas por su efectividad biológica sobre *Alternaria alternata* y su inocuidad en semillas y plántulas de amaranto.

Fungicidas	cc (ppm ia)	PIM (%)	PIG (%)	PG (%)	PI (%)
carboxin+thiram	400	68,61a	81,55 d	88 a	78,42 b
carboxin+thiram	500	65,25a	81,55 d	79 a	91,78 a
carboxin+thiram	600	67,38a	80,13 d	77 a	87,64 ab
difenoconazole	250	14,67 cd	87,23 bc	92 a	80,92 ab
difenoconazole	500	27,97 bc	90,45abc	93 a	83,27 b
difenoconazole	700	33,57 b	86,52 c	84 a	91,59 a
sulfato de cobre pentahidratado	250	9,86 d	91,47ab	92 a	59,40 c
sulfato de cobre pentahidratado	500	36,15 b	92,54a	85 a	86,22 ab
sulfato de cobre pentahidratado	700	37,38 b	92,16a	85 a	86,70 ab
Control	0	---	---	58 b	---

cc: concentración; ppm parte por millón; ia: ingrediente activo; PIM: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de *A. alternata*; PIG: Porcentaje de inhibición de germinación de conidios de *A. alternata* a las 6 h de incubación; PG: Porcentaje de germinación de semillas de amaranto; PI: Porcentaje de inhibición de contaminación de semillas por *Alternaria* spp.

2.3.2. Identificación de antagonistas nativos de *Alternaria alternata*

Las características morfológicas y culturales de los potenciales antagonistas de *A. alternata* utilizada en los ensayos se describen a continuación:

2.3.2.1. *Chaetomium globosum* Kunze

2.3.2.1.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Sordariales

Familia: Chaetomiaceae

Género: *Chaetomium*

Especie: *globosum*

2.3.2.1.2. Características macroscópicas y microscópicas de *Chaetomium globosum*

a) Características macroscópicas

Las colonias desarrolladas en medio de Agar papa glucosado (2%), mostraron un color blanquecino al principio y posteriormente oliváceo (Fig. 2.3a).

b) Características microscópicas

El ascoma peritecual ostiolado (Fig. 2.3b) de color castaño oscuro de 160-300 μm con numerosos pelos flexuosos de 2 a 4 μm , castaños, ornamentados. Las ascos claviformes, pedicelados, 8 esporado, 30-45 x 10-15 μm , evanescentes. Las ascosporas de formas limoniformes, biapiculadas, gutuladas, unicelulares, castañas a la madurez de 9-11 x 7-9 x 5-7 μm (Fig. 2.3c).

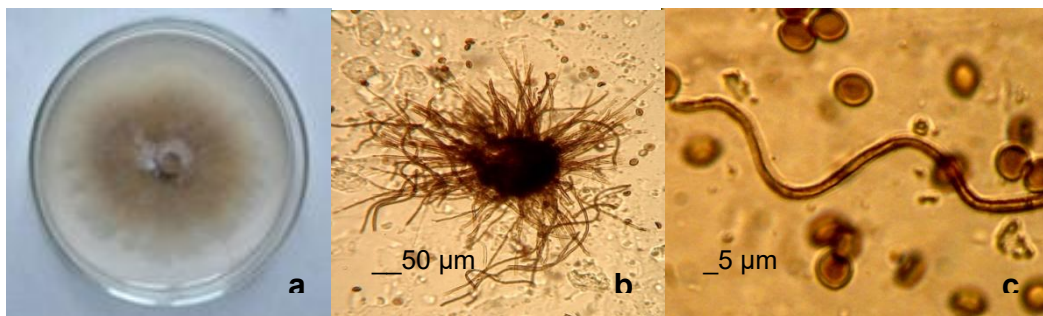


Figura 2.3. Colonia identificada morfológicamente como *Chaetomium globosum* en medio APG (a); peritecicio (b); ascosporas y pelos flexuosos (c).

2.3.2.2. *Epicoccum nigrum* Link syn *Epicoccum purpurascens* Ehrenb

2.3.2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothidiomycete

Orden: Pleosporales

Familia: Didymellaceae

Género: *Epicoccum*

Especie: *nigrum*

2.3.2.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de *Epicoccum nigrum*

a) Características macroscópicas

Las colonias desarrolladas en medio de APG (2 %) muestran un aspecto algodonoso o afelpado de color amarillo anaranjado y al envejecer de color negro (Fig. 2.4a).

b) Características microscópicas

Los conidióforos escasamente pigmentados dan origen a conidios de forma globosa verrugosos y esféricos (Fig. 2.4b), que alcanzan de 13 a 24 μm de diámetro con una

pigmentación oscura y una superficie externa verrugosa con una base en forma de embudo y varios tabiques transversales y verticales.

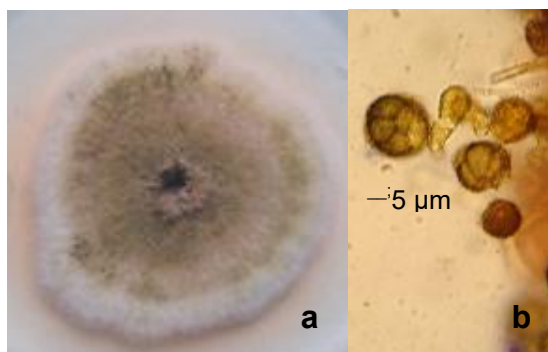


Figura 2.4. Colonia identificada morfológicamente como *Epicoccum nigrum* en medio APG (a); conidios (b).

2.3.2.3. *Trichoderma atroviride* Karst (1892) teleomorfo: *Hypocrea atroviridis* Dodd, Lieckfeldt y Samuels (2003)

2.3.2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phyllis: Ascomiceta

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especie: *atroviride*

2.3.2.3.2. Características macroscópicas y microscópicas de *Trichoderma atroviride*

a) Características macroscópicas

Las colonias de *Trichoderma atroviride* desarrolladas en APG son de color blanco a blanco-verdoso tornándose posteriormente a un color verde, aspecto algodonoso con una textura aterciopelada levemente correosa (Fig. 2.5a), sin pigmentos difusibles en el medio.

b) Características microscópicas

Los conidióforos de $7,7-8 \mu\text{m} \times 2-2,1 \mu\text{m}$; son hialinos están ramificados (Fig. 2.5b). Las ramificaciones se ubican en ángulo recto fiálides sinuosas a menudo cilíndricas de $6 \text{ a } 9,7 \mu\text{m} \times 1,8-3,5 \mu\text{m}$. Los conidios son de forma subglobosos a ovoidales de color verde pálido de $2,8 \times 4 \mu\text{m} \times 2-3 \mu\text{m}$; Las clamidosporas son abundantes de forma

globosas a subglobosas terminales o intercalares de 6 a 12 μm de diámetro. Las hifas son hialinas y el micelio uniforme (Fig. 2.5c).

El análisis morfobiométrico fue confirmado con el molecular realizado por el laboratorio Macrogen (Anexo).

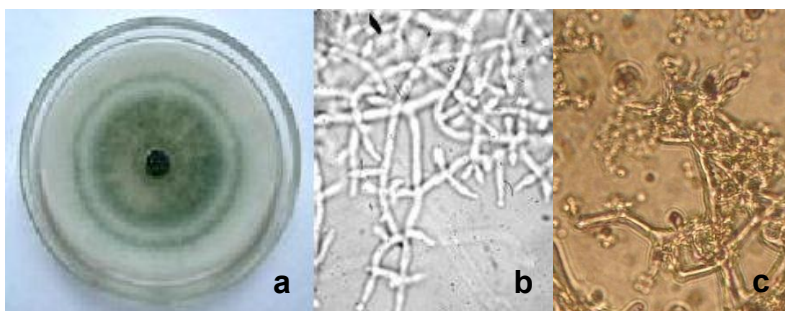


Figura 2.5. Colonia identificada morfológicamente como *Trichoderma atroviride* en medio APG (a); conidióforos filiales y conidios (b); Hifas hialinas, micelio uniforme (c).

2.3.3. Identificación del agente etiológico del tizón foliar (*Alternaria alternata*)

2.3.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *alternata*

2.3.3.2. Características macroscópicas y microscópicas de *Alternaria alternata*

a) Características macroscópicas

Las colonias de *A. alternata* desarrolladas en APG son de color gris oscuro a negro de aspecto algodonoso con una textura aterciopelada levemente correosa (Fig. 2.6a). El patrón de esporulación es ramificado en medio APZ (Fig. 2.6b).

b) Características microscópicas

El conidióforo principal simple o fasciculado, recto o doblado de 22 x 5 hasta 79 x 6 μm de largo y 2 x 0-4 x 9 μm de ancho; conidióforos secundarios cortos. Cadenas de 8 a

12 conidios obpiriformes a elipsoides de $20-40 \times 6-12 \mu\text{m}$, con 3-8 tabiques transversales y 0-3 longitudinales (Fig. 2.6c).

El tamaño promedio de los conidios ($n=50$) fue de $28,24 \times 10,24 \mu\text{m}$; siendo el de mayor tamaño de $40 \times 16 \mu\text{m}$ y el de menor de $20 \times 8 \mu\text{m}$; 3 tabiques transversales y 1 longitudinal; el diámetro del conidióforo primario fue de $2,24 \mu\text{m}$; el diámetro de conidióforo secundario $3,2 \mu\text{m}$ (Fig. 2.6c).

El análisis morfobiométrico se confirmó con el molecular realizado por el laboratorio de Macrogen (Anexo 6.2).

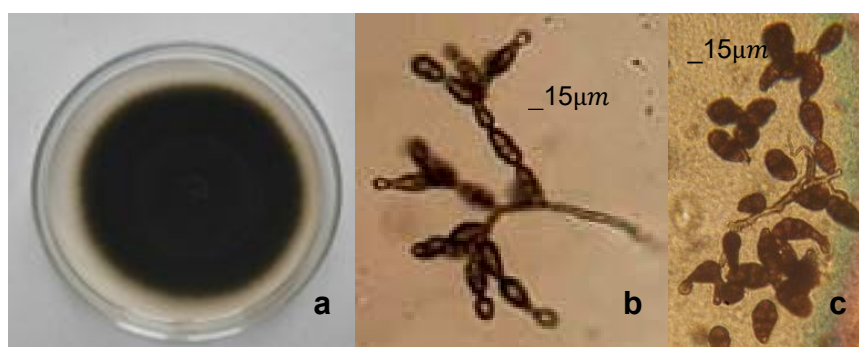


Figura 2.6. Colonia identificada morfológicamente como *Alternaria alternata* en medio de cultivo APG (a); patrón de esporulación (b); conidios (c).

2.3.4. Efecto de los antagonistas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*

El análisis de la varianza evidenció diferencias significativas entre los antagonistas (CM trat= 910,07; F= 124,42; $p < 0,0001$; gl: 11; CV: 8,31 %).

El diámetro promedio de las colonias de *A. alternata* se redujo significativamente por el accionar de los antagonistas a partir del tercer día de la siembra, detectándose según el test de Tukey diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los antagonistas (Tabla 2.14). De los antagonistas evaluados *T. atroviride* se destacó por producir el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de las colonias de *A. alternata*.

Tabla 2.14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* (POR1) en presencia de los antagonistas.

Antagonista	POR1	± SD
<i>T. atroviride</i>	49,63	2,7 a
<i>C. globosum</i>	26,90	2,8 b
<i>E. nigrum</i>	21,11	2,7 c

SD: desvío estándar; dms: 5,33. Medias seguidas por una letra en común no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.5 Interacciones hifales:

La observación microscópica de la zona de interferencia entre *A. alternata* con cada uno de los antagonistas, luego de siete días de incubación, se detallan a continuación:

2.3.5.1 Interacción entre *C. globosum* y *A. alternata*

De la observación microscópica de la zona de interacción del cultivo apareado entre *A. alternata* y *C. globosum* (Fig. 2.7a), se observaron escasos conidios de *A. alternata* con formas aberrantes; lisis celular; enrollamiento de las hifas de *A. alternata* con las hifas de *C. globosum* (Figura 2.7b) y vacuolización del citoplasma de las hifas de *A. alternata* (Figura 2.7b y 2.7c).

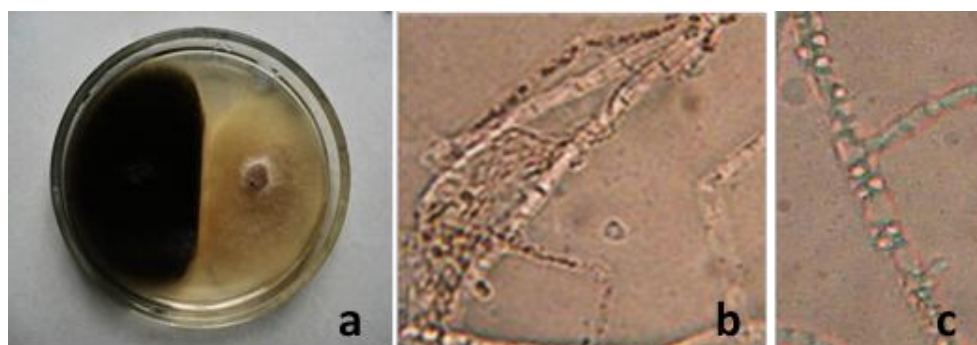


Figura 2.7. Cultivo apareado de *A. alternata* y *C. globosum* (a); hifas de *C. globosum* enrolladas alrededor de las hifas de *A. alternata* (b); vacuolas en el citoplasma de las hifas de *A. alternata* (c).

2.3.5.2 Interacción entre *E. nigrum* y *A. alternata*

De la observación microscópica de la zona de interacción en el cultivo apareado entre *E. nigrum* y *A. alternata*, tuvo menor crecimiento micelial *A. alternata* (Fig 2.8a), los conidios eran escasos, deformes, y con tinción del medio. Se observaron hifas de *E. nigrum*

creciendo paralelamente a las hifas de *A. alternata* (Fig 2.8b) y posteriormente enrollamiento de las hifas de *E. nigrum* alrededor de las hifas de *A. alternata* con el citoplasma granulado (Fig. 2.8c).

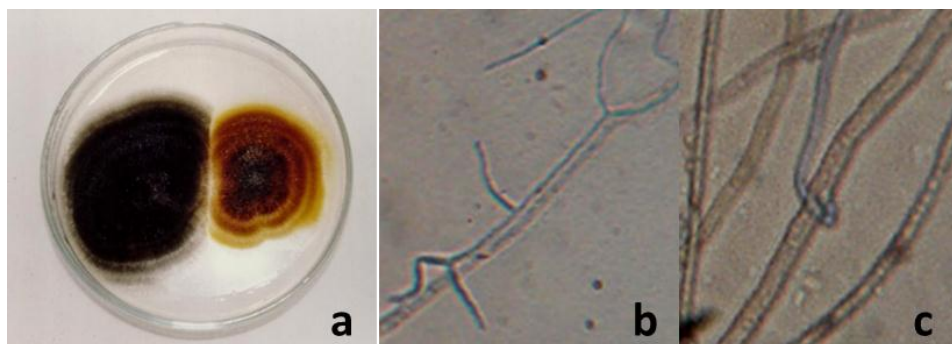


Figura 2.8. Cultivo apareado de *A. alternata* + *E.nigrum* donde se observa halo de inhibición (a); hifas de *E. nigrum* alrededor de las hifas de *A. alternata* (b); hifas de *E. nigrum* enrollando a las hifas de *A. alternata* (c).

2.3.5.3 Interacción entre *T. atroviride* y *A. alternata*

Del análisis microscópico de la zona de interacción entre *T. atroviride* y *A. alternata* se observó un menor desarrollo de *A. alternata* (Fig 2.9a) así como variaciones en el grosor del micelio y menor producción de conidios. En el caso de *T. atroviride* hubo un incremento en la producción de conidios y de clamidosporas.

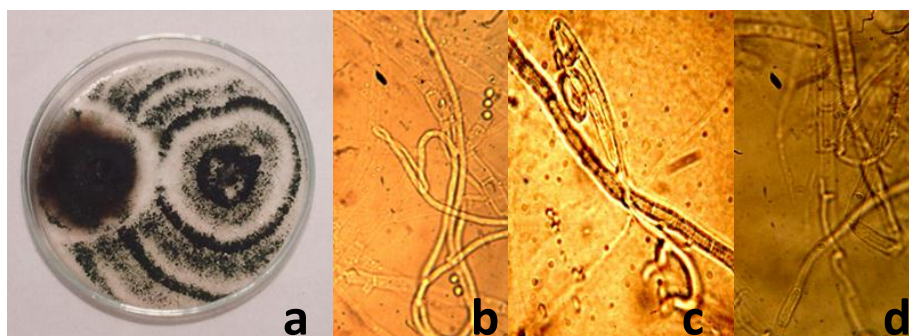


Figura 2.9. Cultivo apareado de *A. alternata* y *Trichoderma atroviride* donde se observa halo de inhibición (a); Enrollamiento de hifas de *A. alternata* y formación de clamidosporas de *T. atroviride* (b); Formación de ganchos o apresorios (c); Penetración de hifas de *T. atroviride* en hifas de *A. alternata* causando lisis celular (d).

Además, se observó micoparasitismo desarrollado a través del entrelazamiento de hifas de *T. atroviride* sobre las hifas de *A. alternata* (Fig. 2.9b); formación de ganchos o

apresorios por parte de *T. atroviride* (Fig 2.9c), penetración de las hifas de *T. atroviride* produciendo la lisis celular y colonización de las hifas de *A. alternata* (Fig 2.9d).

2.3.6. Efecto de los antagonistas *E. nigrum*, *C. globosum*, *T. atroviride* aplicados en semillas de amaranto

2.3.6.1 Porcentaje de germinación

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos para el porcentaje de semillas germinadas de amaranto (CM trat: 2368,23; F: 51,04; $p < 0,0001$ gl: 15; cv: 9,69 %).

Tabla 2.15. Efecto de los antagonistas *E. nigrum*, *C. globosum*, *T. atroviride* en la germinación de semillas.

Antagonistas	PG (%)	SD	
<i>E. nigrum</i>	46,25	± 5,06	a
<i>C. globosum</i>	52,50	± 5,26	a
Control	90,00	± 9,52	b
<i>T. atroviride</i>	92,50	± 6,45	b

PG: Poder germinativo; SD: desvío estándar; Medias seguidas por una letra en común no difieren estadísticamente entre sí.

El porcentaje de germinación osciló entre 46,25 a 92,50 %, resultando las semillas tratadas con *C. globosum* y *E. nigrum* las que registraron menor porcentaje de germinación en relación a las semillas no tratadas (control) o tratadas con *T. atroviride* en las cuales la germinación fue del 92,50 % (Tabla 2.15). Prueba de Tukey (Alfa=0,05; DMS: 14,298, Error: 46,3958 gl: 12).

Por otro lado, las semillas tratadas con *C. globosum* y *E. nigrum* tuvieron mayor porcentaje de plántulas con anomalías como hipocótilos engrosados, cotiledones plegados y raíces atrofiadas.

2.3.6.2. Largo de radícula

El análisis de la varianza de la longitud de radícula en plántulas de amaranto muestra diferencias altamente significativas entre los tratamientos (CM trat: 0,59; F: 39,64; $p < 0,0001$ gl: 15; cv: 10,91 %). A su vez, la prueba de Tukey muestra diferencias altamente significativas ($p > 0,05$) entre *T. atroviride* con respecto a los resto de los antagonistas *C. globosum* y *E. nigrum* y al testigo respectivamente (Tabla 2.16).

Trichoderma atroviride incrementó el tamaño de la radícula de las plántulas en un 68 % en relación al control sin tratar, mientras que el resto de los antagonistas no se diferenciaron del control (Tabla 2.16).

Tabla 2.16. Efecto de los antagonistas *C. globosum*, *E. nigrum* y *T. atroviride* en la longitud radicular de plántulas de amaranto.

Antagonistas	LR	SD	
<i>C. globosum</i>	0,83	0,16	a
<i>E. nigrum</i>	0,95	0,11	a
Control	1,00	0,07	a
<i>T. atroviride</i>	1,68	0,12	b

LR: Largo de radícula; SD: desvío estándar
Medias seguidas por una misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.6.3. Largo de hipocótilo

El análisis estadístico del largo de hipocótilo de plántulas de amaranto mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (CM trat: 3,66; F: 137,26; $p < 0,0001$; gl: 15; cv: 6,59 %). La prueba de Tukey, a su vez, mostró diferencias altamente significativas ($p > 0,05$) entre *T. atroviride* con respecto a los antagonistas *C. globosum*, *E. nigrum* y al control (Tabla 2.17). *T. atroviride* incrementó el tamaño del hipocótilo de las plántulas de amaranto en un 80,55 % en relación al control sin tratar.

Tabla 2.17. Efecto de los antagonistas *C. globosum*, *E. nigrum* y *T. atroviride* en la longitud del hipocótilo de plántulas de amaranto.

Antagonistas	LT	SD	
<i>C. globosum</i>	1,85	0,12	a
<i>E. nigrum</i>	2,01	0,11	a
Control	2,16	0,24	a
<i>T. atroviride</i>	3,90	0,16	b

LT: largo de hipocótilo; SD: desvío estándar;
dms: 0,34; Error: 0,02; gl: 12; Medias seguidas por una misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí.

2.3.7. Ensayos a campo

2.3.7.1. Características del suelo

Las muestras de suelo, en ambos lotes se caracterizaron por tener una textura franco limo arcillosa con buen contenido en materia orgánica, un contenido aceptable de nitrógeno, fósforo y potasio; baja conductividad eléctrica y pH ligeramente ácido (Tabla 2.18) Sin embargo consideramos que la tasa elevada de C/N no permite que todos los nutrientes puedan estar disponibles por la planta.

Tabla 2.18. Características del suelo de los lotes experimentales del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, UNLP, en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.

Análisis	Campañas	
	2005-2006	2006-2007
Textura	franco limo arcillosa	franco limo arcillosa
N (%)	0,20	0,25
P (ppm)	73,00	65,00
K meq por 100 g de suelo	2,00	1,74
pH	6,70	6,50
CE dS.m ⁻¹	1,20	1,31
MO (%)	5,20	5,85
C/N	15,10	13,10

N: Nitrógeno total; P: fósforo; K: Potasio; pH: acidez-alkalinidad del suelo; CE: conductividad eléctrica; MO: Materia orgánica; C/N: Relación carbono nitrógeno.

2.3.7.2. Condiciones ambientales

2.3.7.2.1. Campaña 2005-2006

Durante la campaña 2005-2006 (Fig. 2.10), la temperatura máxima se registró en el mes de Enero (28,8 °C) y la humedad relativa máxima en el mes de Marzo (85,5%). El régimen pluviométrico fue de 601,5 mm concentrándose la mayor cantidad de lluvias en el mes de enero (265 mm).

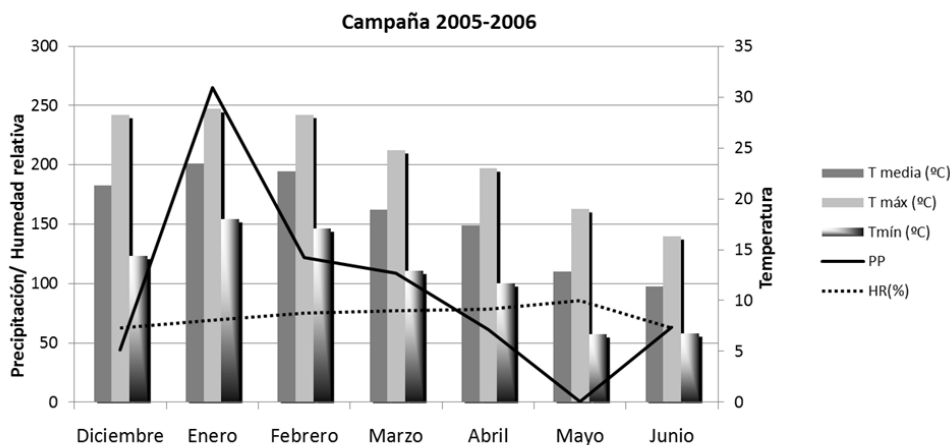


Figura 2.10. Registros meteorológicos mensuales de temperatura máxima (T máx), mínima (T min), promedio (T media); humedad relativa (HR) y precipitaciones (PP) correspondientes a la campaña 2005-2006 de la localidad de Llavallol, Buenos Aires.

2.3.7.2.2. Campaña 2006-2007

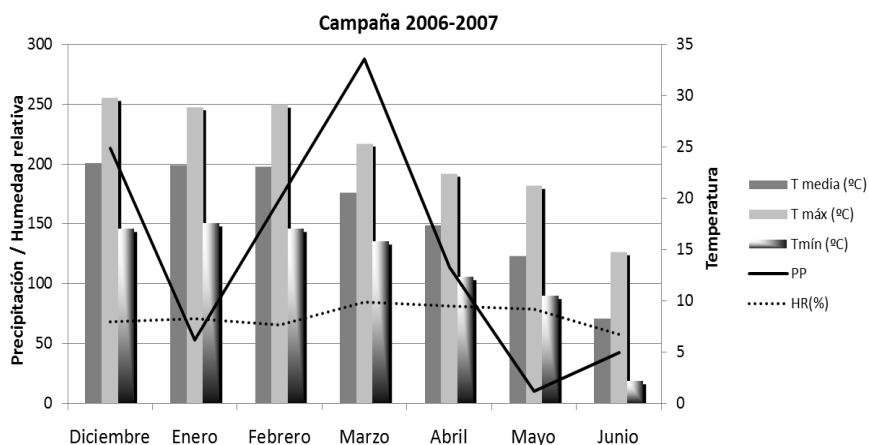


Figura 2.11. Registros meteorológicos mensuales de temperatura máxima (T máx), mínima (T min), promedio (T media); humedad relativa (HR) y precipitaciones (PP); correspondientes a la campaña 2006-2007, localidad de Llavallol, Buenos Aires.

En la segunda campaña (2006-2007), el régimen pluviométrico fue de 863,8 mm concentrándose las lluvias en el mes de marzo (288,1 mm).

La temperatura máxima se registró en el mes de Diciembre (29,76 °C) y la humedad relativa máxima en el mes de Marzo (84,35 %) (Fig. 2.11).

2.3.7.3. Aparición de lesiones foliares en el cultivo de amaranto

Las primeras lesiones foliares (Fig. 2.12a) se manifestaron en la primer campaña a los 34 días de la emergencia del cultivo y en la segunda a los 27 días.

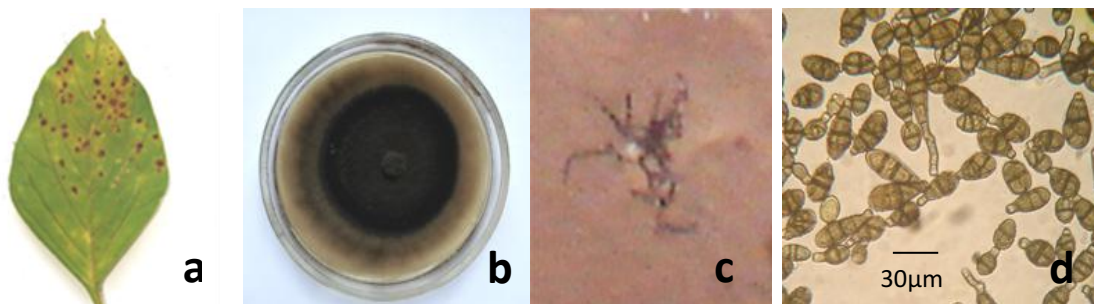


Figura 2.12. Hoja de amaranto afectada por manchas foliares (a), Colonia identificada morfológicamente como *A. alternata* (b); patrón de esporulación (c); Conidios y conidióforos (d).

De las hojas de amaranto afectadas por manchas foliares desarrollaron colonias de aspecto aterciopelado levemente coreoso de color marrón oscuro a negro (Fig. 2.12b), con un patrón de esporulación (Fig. 2.12c) y de conidios y conidióforos típicos de *Alternaria* spp. o *A. alternata*. (Fig. 2.12d), siendo este el principal género aislado.

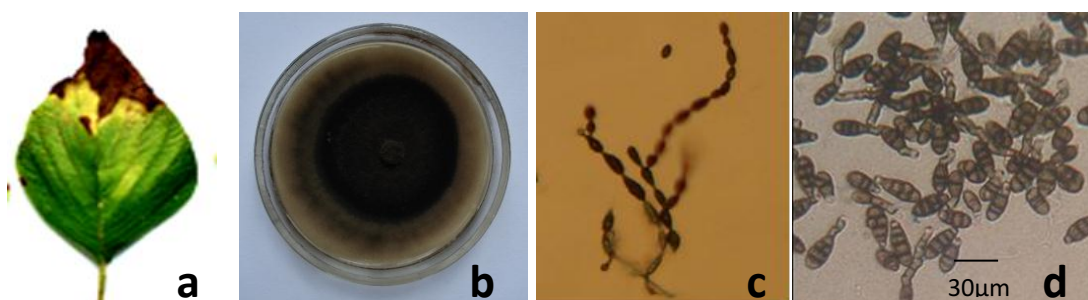


Figura 2.13. Hoja de amaranto afectada por tizón foliar (a), Colonia identificada morfológicamente como *A. alternata* (b); patrón de esporulación (c); Conidios y conidióforos (d).

2.3.7.4. Plagas

En las dos campañas se registraron insectos en distintos órganos de las plantas:

- En hojas: bicho moro (*Epicauta adspersa*), orugas (*Feltia* spp.); vaquitas (*Diabrotica* spp.); pulgillas (*Epitrix* spp.) y chinches.
- En hojas y tallos: barrenadores del género *Conotrachelus* spp. siendo una de las plagas insectiles más perjudiciales para el cultivo debido a que puede ocasionar daño económico tanto por disminuir el rendimiento en grano como por imposibilitar la cosecha de las plantas volcadas por efecto del barrenador.
- En brotes tiernos y panojas: pulgones (*Mizus* spp.) y ácaros.

2.3.8. Análisis descriptivo de las variables epidemiológicas, agronómicas y de calidad de las semillas de amaranto. Análisis multivariado (Campaña 2005-2006)

2.3.8.1. Análisis de correlación

En la Tabla 2.19 se detallan 45 correlaciones entre las 10 variables evaluadas en la campaña 2005-2006, de las cuales 10 fueron significativas y 35 no significativas.

Tabla 2.19. Correlaciones entre las variables evaluadas en la campaña 2005-2006 en Llavallol, Buenos Aires, en un cultivo de amaranto para los tratamientos T1 a T7.

	MTIN	MTSE	ALT	LP	REN	MV	MS	PG	IA1	PM
MTIN	1,00									
MTSE	0,99 **	1,00								
ALT	0,07 ns	-1,80E-03 ns	1,00							
LP	-0,56 ns	-0,46 ns	-0,24 ns	1,00						
REN	-0,62 ns	-0,66 ns	-0,21 ns	0,59 ns	1,00					
MV	-0,43 ns	-0,41 ns	0,34 ns	0,77 *	0,60 ns	1,00				
MS	-0,70 ns	-0,75 *	0,20 ns	0,60 ns	0,89 **	0,77 *	1,00			
PG	-0,66 ns	-0,57 ns	-0,35 ns	0,65 ns	0,35 ns	0,29 ns	0,31 ns	1,00		
IA1	0,64 ns	0,55 ns	0,25 ns	-0,71 ns	-0,34 ns	-0,41 ns	-0,35 ns	-0,99 **	1,00	
PM	-0,91 **	-0,94 **	-0,02 ns	0,58 ns	0,87 **	0,58 ns	0,9 **	0,58 ns	-0,57 ns	1,00

MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar, MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas/m²; MV: Materia fresca/m²; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo de semillas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; PM: Peso de 1000 semillas. **=Altamente significativo (p≤ 0,01); *=Significativo (p≤ 0,05), ns: No significativo.

2.3.8.2. Análisis de los componentes principales

En el Análisis de Componentes Principales realizado en base en la matriz de correlación de 10 variables, los dos primeros componentes principales explicaron el 78 % de la variabilidad total de los datos (Tabla 2.20) teniendo una buena representación del sistema (correlación cofenética= 0,955).

El primer componente contribuyó con el 61 % de la varianza total aportando en forma positiva las variables LP (0,79), REN (0,82), MV (0,70), MS (0,86), PG (0,73) y PM (0,95) y en forma negativa las variables epidemiológicas como MTIN (-0,90); MTSE (-0,87) y IA1(-0,74) (Tabla 2.21).

Tabla 2.20. Contribución de cada componente a la variabilidad total.

CP	Vp	Pe	Pa
1	6,07	0,61	0,61
2	1,76	0,18	0,78
3	1,03	0,10	0,89
4	0,88	0,09	0,97
5	0,22	0,02	1,00

CP: componentes principales; Vp: Valores propios, Pe: Proporción de varianza explicada por cada componente principal y Pa: Proporción acumulada.

Tabla 2.21. Correlaciones de los componentes principales con las variables originales.

Variables	CP1	CP2
MTIN	-0,90	0,04
MTSE	-0,87	-0,07
ALT	-0,10	0,77
LP	0,79	-0,17
REN	0,82	0,22
MV	0,70	0,43
MS	0,86	0,47
PG	0,73	-0,61
IA1	-0,74	0,54
PM	0,95	0,15

CP1 y CP2: Componente principal 1 y 2; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas por m²; MV: Materia fresca por m²; MS: Materia seca por m²; PG: Poder germinativo de las semillas; IA1: incidencia de *Alternaria* spp. en las semillas; PM: Peso de 1000 semillas.

El segundo componente contribuyó con el 18 % de la varianza total aportando en forma positiva con la altura de planta a cosecha (0,77) (Tabla 2.21).

En la Fig. 2.14 se observan las diez variables analizadas representadas como vectores de distintos módulos y direcciones ubicadas en distintos cuadrantes junto con los valores promedios de cada tratamiento.

Las variables epidemiológicas MTIN y MTSE presentaron una correlación positiva entre sí al igual que las variables REN con PM y REN con MS y, a la vez se correlacionaron negativamente con PM, PG e IA1.

El primer componente discriminó los tratamientos T2 a T7 que produjeron, tanto en el follaje como en las semillas, menor daño por *Alternaria* spp. (Fig. 2.14), con respecto del control que produjo un mayor daño.

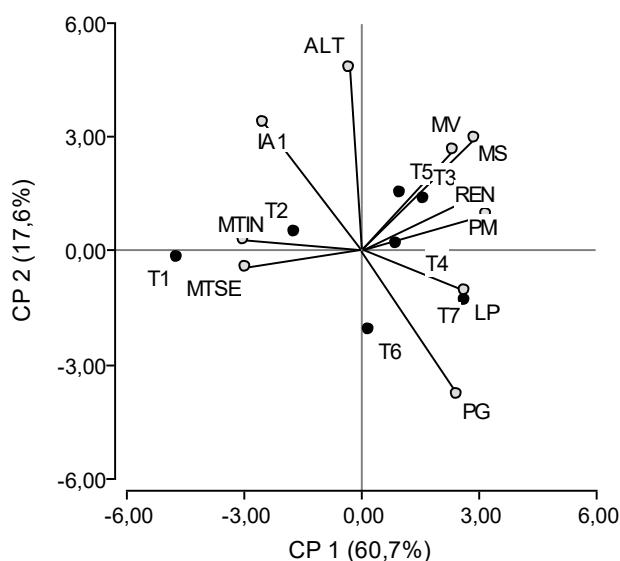


Figura 2.14. Distribución de los tratamientos T1 a T7 (●) y de las variables (○) evaluadas en forma conjunta en la campaña 2005-2006.

T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7; Variables: MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas/m²; MV: Materia fresca/m²; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo de semillas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; PM: Peso de 1000 semillas.

La distribución espacial de los tratamientos en base a los dos primeros componentes principales mostró tres agrupaciones (Fig. 2.14).

El control se ubicó a la izquierda del primer componente. La proximidad a las variables correspondientes al Área bajo la curva de progreso de tizón foliar calculadas en base a su incidencia y a la severidad en forma respectiva implica mayor susceptibilidad al tizón foliar que el control.

El tratamiento T2 se ubicó en una posición intermedia próximo a las variables correspondientes al Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar e Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas.

El resto de los tratamientos (T3 a T7) correspondientes a los tratamientos integrados por dos estrategias, se agruparon a la derecha del primer componente.

2.3.8.3. Análisis de conglomerados

El dendrograma del análisis de conglomerados obtenido a partir de las diez variables evaluadas (Fig. 2.15), diferenció a los tratamientos en tres grupos.

El primer grupo incluyó a los tratamientos T3, T4, T5 y T7; en el segundo se incluyeron a los tratamientos T2 y T6 y, en el tercer grupo al tratamiento control.

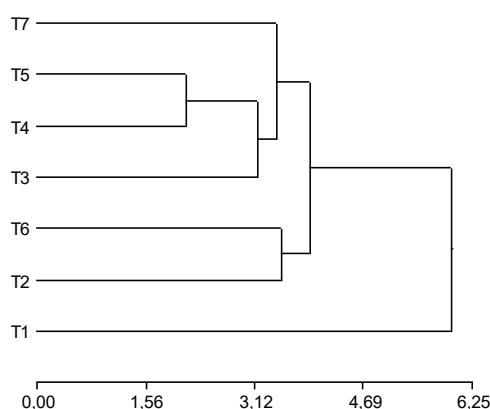


Figura 2.15. Dendrograma correspondiente al efecto de los tratamientos T1 a T7 sobre las variables evaluadas en la campaña 2005-2006. Promedio (Average linkage). Distancia (Euclídea) correlación cofenética= 0,828.

2.3.9. Análisis Multivariado campaña 2006-2007

En el análisis multivariado de la campaña 2006-2007, se consideraron las mismas variables que para la campaña 2005-2006.

2.3.9.1. Análisis de correlación

En la campaña 2006-2007, se analizaron 45 correlaciones de las cuales diez fueron significativas al 5 %, cuatro altamente significativas (1 %) y 31 no significativas. (Tabla 2.22). Las variables epidemiológicas correspondientes al Área bajo la curva de progreso de la incidencia y de la severidad del tizón foliar MTIN y MTSE se correlacionaron en forma directa entre sí y en forma indirecta con el peso de 1000 semillas.

Tabla 2.22. Correlaciones entre las variables evaluadas en la campaña 2006-2007 en Llavallol, Buenos Aires, en un cultivo de amaranto para los tratamientos T1 a T7.

	MTIN	MTSE	ALT	LP	REN	MV	MS	PG	IA1	PM
MTIN	1,00									
MTSE	0,95 **	1,00								
ALT	-0,67 ns	-0,52 ns	1,00							
LP	-0,75 *	-0,86 *	0,40 ns	1,00						
REN	-0,67 ns	-0,61 ns	0,85*	0,60 ns	1,00					
MV	-0,71 ns	-0,50 ns	0,83*	0,22 ns	0,61 ns	1,00				
MS	-0,75 *	-0,81 *	0,64 ns	0,81 *	0,89 **	0,39 ns	1,00			
PG	-0,69 ns	-0,60 ns	0,13 ns	0,38 ns	0,09 ns	0,52 ns	0,15 ns	1,00		
IA1	0,66 ns	0,55 ns	-0,11 ns	-0,32 ns	-0,05 ns	-0,52 ns	-0,10 ns	-1,00 **	1,00	
PM	-0,77 *	0,85 *	0,52 ns	0,72 ns	0,77 *	0,44 ns	0,93 **	0,31 ns	-0,26 ns	1,00

MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar, MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas/m²; MV: Materia fresca/m²; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo de semillas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; PM: Peso de 1000 semillas. **=Altamente significativo (p≤ 0,01); *=Significativo (p≤ 0,05), ns: No significativo.

2.3.9.2 Análisis de los componentes principales en la campaña 2006-2007

La suma de los dos primeros componentes principales explicó el 83 % de la variabilidad total de los datos (Tabla 2.23), teniendo una buena representación del sistema (correlación cofenética= 0,974).

Tabla 2.23. Contribución de cada componente a la variabilidad total en la campaña 2006-2007.

CP	Vp	Pe	Pa
1	6,26	0,63	0,63
2	2,05	0,20	0,83
3	1,21	0,12	0,95
4	0,28	0,03	0,98
5	0,15	0,02	0,99
6	0,05	0,01	1,00

CP: componentes principales; Vp: Valores propios; Pe: Proporción de la varianza explicada por cada componente principal; Pa: Proporción acumulada.

El primer componente contribuyó con el 63 % de la varianza total (Tabla 2.24), aportando en forma positiva las variables Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar (0,97) y el Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar (0,93) y negativamente las variables altura de planta a cosecha (-0,74); largo de panoja

(-0,80); rendimiento en semillas (-0,81); materia fresca (-0,71); materia seca (-0,87) y peso de 1000 semillas (-0,87).

El segundo componente contribuyó con el 20 % de la varianza total (Tabla 2.24) aportando en forma positiva la incidencia de *Alternaria* spp. en semillas (0,84) y en forma negativa el poder germinativo de semillas (-0,81).

Tabla 2.24. Correlaciones entre los componentes principales 1 y 2 y las variables analizadas.

Variables	CP1	CP2
MTIN	0,97	0,19
MTSE	0,93	0,10
ALT	-0,74	0,33
LP	-0,80	0,10
REN	-0,81	0,49
MV	-0,71	-0,17
MS	-0,87	0,43
PG	-0,57	-0,81
IA1	0,53	0,84
PM	-0,87	0,24

CP1 y CP2: componente principal 1 y 2; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas/m²; MV: Materia fresca/m²; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo de semillas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; PM: Peso de 1000 semillas. Correlación cofenética= 0,974.

En la Fig. 2.16 se observa la relación entre las diez variables y los tratamientos. En el primer cuadrante del biplot se agruparon las variables epidemiológicas correspondientes al Área bajo la Curva de progreso de la incidencia y de la severidad del tizón foliar en forma respectiva y la Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas. Los tratamientos más afectados fueron el control y el tratamiento T2.

Las variables relacionadas con la productividad del cultivo y con la calidad de las semillas se agruparon en el tercer y cuarto cuadrante conjuntamente con el resto de los tratamientos, a excepción del tratamiento T3 (Fig. 2.16).

La distribución espacial de los tratamientos teniendo en cuenta a los dos primeros componentes principales (Fig. 2.16) se presenta en tres agrupaciones. El tratamiento control se ubicó a la derecha del primer componente; los tratamientos T2 y T3 en una posición intermedia y el resto de los tratamientos en el extremo opuesto (Fig. 2.16).

El tratamiento T7 se ubicó en una posición más alejada del testigo observándose variables muy correlacionadas entre sí, es decir con una correlación directa con las variables epidemiológicas y las variables PG e IA1 que tuvieron una relación inversa (Fig. 2.16).

Las variables asociadas al daño generado por *Alternaria* spp. en el follaje como en las semillas se agruparon a la derecha del primer componente; mientras que a la izquierda del mismo componente se agrupó el resto de las variables relacionadas con las variables agronómicas y la calidad fisiológica y sanitaria de las semillas.

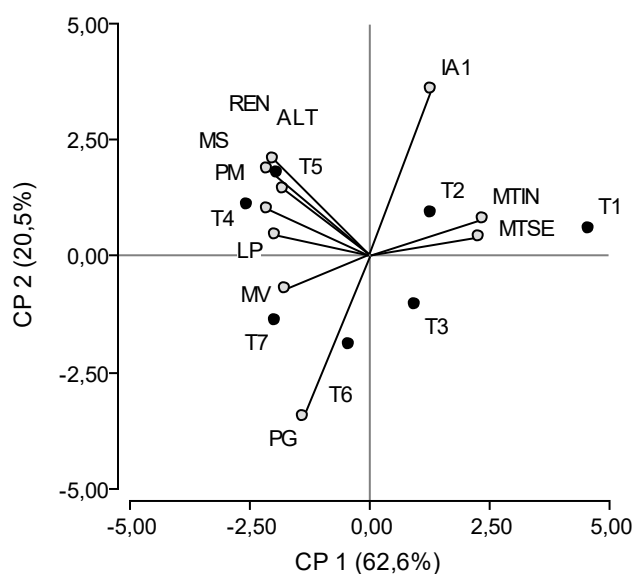


Figura 2.16. Distribución de los tratamientos T1 a T7 (●) y de las variables (○) evaluadas conjuntamente en la campaña 2006-2007.

T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7; IRV: Índice relativo de variables; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; REN: Rendimiento en semillas por m²; PM: Peso de 1000 semillas; MS: Materia seca por m²; PG: Poder germinativo de las semillas.

2.3.9.3. Análisis de conglomerados

En la Fig. 2.17 se representa el dendrograma del análisis de conglomerados obtenido a partir de las diez variables evaluadas y los siete tratamientos, los cuales se separaron en tres grupos.

El análisis permitió diferenciar al control del resto de los tratamientos, además de observar semejanzas entre los tratamientos T4 y T5 y entre los tratamientos T2, T3 y T6 (Fig. 2.17).

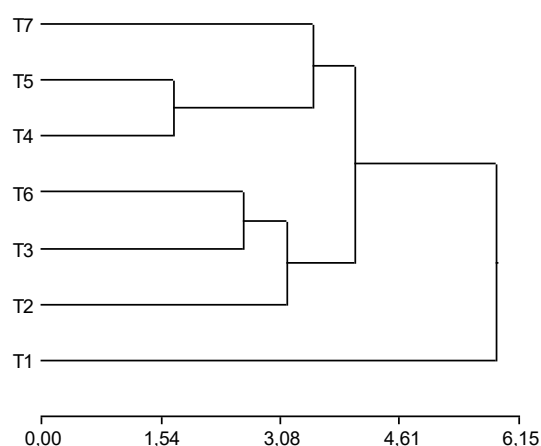


Figura 2.17. Dendrograma correspondiente al efecto de los tratamientos T1 a T7, sobre las variables analizadas. Promedio (Average linkage). Distancia: (Euclidea) correlación cofenética= 0,833.

2.3.9.4. Análisis de la Varianza para las principales variables epidemiológicas y agronómicas

En el Anexo 6.3 se detallan los análisis descriptivos de la campaña 2006-2007 para las diez variables evaluadas MTIN, MTSE, ALT, LP, REN, MV, MS, PG, IA1 y PM.

2.3.9.4.1. Area bajo la Curva del progreso de la incidencia del tizón foliar

El análisis estadístico indicó interacción significativa entre campañas y tratamientos ($p < 0,0001$). En la primera campaña se registraron diferencias entre el tratamiento control y el resto de los tratamientos T2 a T7 y entre los tratamientos T3 y T4.

En la segunda campaña se observaron diferencias altamente significativas entre el tratamiento T1 y el resto de los tratamientos T2 a T7; entre los tratamientos T3, T4, T6 y el tratamiento T7 y no significativas entre los tratamientos T2 vs T3 a T7 y entre el tratamiento T3 y el tratamiento T4.

A su vez, el análisis de contrastes ortogonales (Tabla 2.25) indicó en la primera campaña diferencias entre el tratamiento control y el resto de los tratamientos T2 a T7 y entre el tratamiento: T2 y los tratamientos integrados T3 a T7.

En la Tabla 2.26 se presenta el promedio estimado de la variable Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar según la Prueba de Tukey- Kramer para las dos campañas. En ambas campañas el máximo valor se registró en el control en relación al resto de los tratamientos exceptuando al tratamiento T2.

Tabla 2.25. Contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos para la variable: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
CAMP1	6	24	149,00	<0,0001	
T1 vs T2 a T7	1	24	718,00	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	7,56	0,011	**
T3, T4, T6 vs T7	1	24	0,06	0,807	ns
T3 vs T4	1	24	0,41	0,526	ns
CAMP2	6	24	21,90	<0,0001	
T1 vs T2 a T7	1	24	47,20	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	2,90	0,101	ns
T3, T4, T6 vs T7	1	24	14,10	0,001	**
T3 vs T4	1	24	0,08	0,700	ns

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador, CAMP1 y CAMP2: campañas 1 y 2. T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; **Altamente significativo ($p \leq 0,01$); *Significativo ($p \leq 0,05$); ns: No significativo.

Tabla 2.26. Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar según la prueba de Tukey-Kramer.

CAMP1	T6	T5	T7	T3	T4	T2	T1
Prom est	143,00	174,40	187,20	205,10	221,40	277,90	791,70
SE	33,15	40,74	29,22	31,78	36,30	43,45	35,41
	a	a	a	a	a		
		b	b	b	b	b	
							c
CAMP2	T7	T4	T6	T5	T2	T3	T1
Prom est	157,40	168,80	175,50	179,10	241,90	244,80	345,90
SE	29,22	36,30	33,15	40,74	43,45	31,78	36,40
	a	a	a	a	a		
		b	b	b	b		
					c	c	
					d		d

CAMP1 y CAMP2: Campañas 1 y campaña 2; T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7; Prom est: Promedio estimado; SE: error estándar.

La aplicación de los tratamientos redujo significativamente el Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón en relación al control en ambas campañas con valores que oscilaron en promedio de los tratamientos en un 76 % en la primera campaña y en un 46 % en la segunda a excepción del tratamiento T2, que solo se diferenció del control en la primera campaña.

2.3.9.4.2. Área bajo la Curva del progreso de la severidad del tizón foliar

El análisis estadístico mostró interacción entre campañas y tratamientos ($p=0,005$).

A su vez, el análisis de contrastes ortogonales en las dos campañas (Tabla 2.27), indicó diferencias entre el control y el resto de los tratamientos T2 a T7. A su vez, la prueba de Tukey- Kramer, en la campaña 2005-2006, diferenció al control del resto de los tratamientos (Tabla 2.28).

En la campaña 2005-2006 los valores de severidad oscilaron entre 22,80 a 137,92 y en la campaña 2006-2007 entre 22,70 a 63,91.

Tabla 2.27. Contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos para la variable: Área bajo la Curva del progreso de la severidad del tizón foliar en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
CAMP1	1		15,20	<0,0001	
T1 vs T2 a T7	1	24	78,10	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	4,31	0,0487	*
T3, T4, T6 vs T7	1	24	0,95	0,3404	ns
T3 vs T4	1	24	0,43	0,5173	ns
CAMP2	6	24	2,75	0,0353	
T1 vs T2a T7	1	24	9,16	0,0058	**
T2 vs T3 a T7	1	24	0,93	0,3453	ns
T3, T4, T6 vs T7	1	24	0,24	0,6299	ns
T3 vs T4	1	24	0,17	0,6811	ns

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador, pr>F: CAMP: campaña); T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento7;**Altamente significativo ($p\leq 0,01$); *Significativo ($p\leq 0,05$); ns: No significativo.

El menor valor del Área bajo la Curva del progreso de la severidad del tizón foliar se registró en el tratamiento T5 (22,80) en la primera campaña y en el tratamiento T4 en la segunda campaña (Tabla 2.28).

Tabla 2.28. Medias estimadas y error estándar para la variable según la prueba de Tukey-Kramer para las campañas 2005-2006 y 2006-2007. Área bajo la Curva del progreso de la severidad del tizón foliar

CAMP1	T5	T6	T7	T3	T4	T2	T1
Prom est	22,80	33,80	33,90	41,30	44,90	55,80	137,92
SE	7,20	6,82	6,05	3,33	5,48	9,82	11,16
	a	a	a	a	a	a	b

CAMP2	T4	T6	T5	T7	T3	T2	T1
Prom est	22,70	25,80	26,20	31,20	36,00	37,90	63,91
SE	5,50	6,82	7,24	6,05	3,33	9,82	11,16
	a	a	a	a	a	a	b
		b	b	b	b	b	b

CAMP1 y CAMP2: campaña 1 y campaña 2; T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7; Prom est: promedio estimado ; SE: error estándar.

2.3.9.4.3. Altura de la planta a cosecha

El análisis estadístico indicó interacción entre campañas y tratamientos ($p=0,022$). A su vez, el análisis de contrastes ortogonales en la primera campaña mostró diferencias entre los tratamientos T3, T4 y T6 con el tratamiento T7 y entre los tratamientos T3 y T4. Sin embargo, en la segunda campaña, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2.29).

Tabla 2.29. Análisis de contrastes ortogonales para la variable Altura de planta a cosecha.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
CAMP1	6	24	2,51	0,0499	
T1 vs T2 a T7	1	24	0,00	0,9512	ns
T2 vs T3 a T7	1	24	0,73	0,4002	ns
T3, T4, T6 vs T7	1	24	4,83	0,0378	**
T3 vs T4	1	24	6,47	0,0178	**
CAMP2	6	24	2,51	0,3816	
T1 vs T2 a T7	1	24	0,62	0,4399	ns
T2 vs T3 a T7	1	24	0,18	0,6711	ns
T3, T4, T6 vs T7	1	24	1,30	0,2660	ns
T3 vs T4	1	24	0,01	0,9272	ns

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador, pr>F: CAMP1 y CAMP2: campaña 1 y campaña 2; **Altamente significativo ($p \leq 0,01$); *Significativo ($p \leq 0,05$); ns: No significativo.

La prueba de Tukey-Kramer mostró diferencias significativas en la campaña 2005-2006, entre los tratamientos T3 y T7 (Tabla 2.30).

Tabla 2.30. Medias estimadas y error estándar para la variable Altura de planta a cosecha según la prueba de Tukey- Kramer en la campaña 1 (2005-2006) y campaña 2 (2006-2007).

CAMP1	T7	T6	T4	T1	T5	T2	T3
prom est	219,63	225,96	226,77	230,65	233,33	235,00	245,24
SE	6,52	6,52	6,52	6,52	6,52	6,52	6,52
	a	a	a	a	a	a	
		b	b	b	b	b	b

CAMP2	Media	277,62
--------------	--------------	--------

	SE.	2,11
--	------------	------

CAMP1 y CAMP2: campañas 1 y 2; T1 a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7; prom est: promedio estimado; SE: error estándar.

El valor más elevado de altura de planta se registró en el tratamiento: T3 en la primera campaña. En la campaña 2006-2007 (Tabla 2.30), no se registraron diferencias entre los tratamientos ($p=0,38$).

2.3.9.4.4. Largo de la panoja

El análisis estadístico indicó diferencias no significativas entre tratamientos ($p=0,085$) y entre la interacción campañas por tratamientos ($p=0,1315$) y, diferencias significativas entre campañas ($p=0,017$).

Tabla 2.31. Promedio del largo de las_panojas en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.

CAMP	Media	± SE	
CAMP1	52,20	0,91	a
CAMP2	57,28	0,91	b

CAMP1: campaña 1; CAMP2: campaña 2; SE: error estándar.

El promedio del largo de la panoja para los tratamientos en la campaña 2005-2006 fue de $52,27 \pm 0,91$ cm y en la campaña 2006-2007 de $57,29 \pm 0,91$ cm (Tabla 2.31). El

rango de largo de panojas varió entre 48,41 a 59,02 cm. En la campaña 2006-2007 el promedio del largo de panoja superó en un 9,73 % a los de la campaña 2005-2006.

2.3.9.5. Rendimiento de las semillas por metro cuadrado

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,0001$) y campañas ($p = 0,0014$) y ausencia de interacción entre los tratamientos y las campañas ($p = 0,056$).

Además, en el análisis de contrastes ortogonales en la campaña 2005-2006, no se registraron diferencias estadísticas entre los grupos establecidos. Sin embargo, en la campaña 2006-2007 se detectaron diferencias entre todos los grupos establecidos (Tabla 2.32); es decir entre el tratamiento control y el resto de los tratamientos; entre el tratamiento T2 y los tratamientos integrados T3, T4, T5, T6 y T7 y, entre los tratamientos que incluyeron la aplicación de fungicidas en semillas T3, T4, T6 con respecto al tratamiento producto de la aplicación de *T. atroviride* en semillas T7.

Tabla 2.32. Análisis de los contrastes ortogonales para la variable Rendimiento en semillas en la campaña 2006-2007.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
T1 vs T2 a T7	1	24	33,1	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	16,3	0,0005	**
T3, T4, T6 vs T7	1	24	12,5	0,0017	**
T3 vs T4	1	24	7,47	0,0116	**

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador, **Altamente significativo ($p \leq 0,01$).

El rendimiento promedio de semillas en ambas campañas según los tratamientos fluctuó entre 89,20 a 127,34 g/m²; registrándose el máximo rendimiento en el tratamiento T5 (Tabla 2.33).

La prueba de Toker-Kramer mostró diferencias entre el tratamiento control T1=89,20 y los tratamientos T4=119,71, T7=122,03 y T5=127,34 (Tabla 2.33).

En la campaña 2005-2006, el rendimiento promedio de los tratamientos se incrementó en un 27,89 % con respecto al promedio del rendimiento de la campaña 2006-2007 (Tabla 2.34).

Tabla 2.33. Medias estimadas y error estándar para la variable rendimiento de semillas según la prueba de Tuckey- Kramer en las dos campañas.

CAMP12	T1	T2	T6	T3	T4	T7	T5
Prom est	89,20	94,70	96,32	103,91	119,72	122,03	127,34
SE	3,20	4,27	4,05	3,72	4,42	3,66	6,56
	a	a	a	a	b	b	b
				b			b
				c			c
					d	d	d

CAMP12: campaña 1 más 2; prom est: promedio estimado ; SE: error estándar; T1a T7: Tratamiento 1 al Tratamiento 7.

Tabla 2.34. Medias estimadas y error estándar para el rendimiento de semillas en las campañas 2005-2006 y 2006-2007.

	Prom est	± SE
CAMP12	120,78	2,40 a

CAMP12: campañas 1 más 2; prom est: promedio estimado; SE: error estándar.

2.3.9.6. Rendimiento de materia fresca por metro cuadrado

El análisis estadístico no registró diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,36$) y campañas ($p=0,096$) ni interacción entre tratamientos y campañas ($p=0,22$), con un comportamiento similar en las dos campañas (Tabla 2.35).

Tabla 2.35. Medias estimadas y error estándar para la variable: Materia fresca por metro cuadrado en las dos campañas.

MV/m ²			
Promedio	Desvío	Varianza	± SE
5270,21	769,28	591806,86	118,7

MV/m²: materia verde por m², SE: error estándar.

2.3.9.7. Rendimiento de biomasa seca

El análisis estadístico, indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,001$) y no significativas entre campañas ($p=0,358$) y en la interacción entre tratamientos y años ($p=0,3448$). A su vez, el análisis de contrastes ortogonales señaló diferencias entre el

tratamiento control y el resto de los tratamientos siendo no significativas el resto de los contrastes establecidos.(Tabla 2.36).

Tabla 2.36. Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Rendimiento de materia seca por metro cuadrado en las dos campañas.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
T1 vs T2 a T7	1	24	37,80	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	1,98	0,1720	ns
T3, T4, T6 vs T7	1	24	0,00	0,9972	ns
T3 vs T4	1	24	2,05	0,1648	ns

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador; T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; **Altamente significativo ($p \leq 0,01$); *Significativo ($p \leq 0,05$); ns: No significativo.

A su vez, la prueba de Tukey-Kramer mostró diferencias entre el tratamiento control=686,12 y los tratamientos T3=862,07; T4=922,83; T7=855,42 y T5=952,78, registrando este último tratamiento el mayor rendimiento (Tabla 2.37).

Tabla 2.37. Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable Rendimiento de materia seca por metro cuadrado, según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.

CAMP12	T1	T6	T2	T7	T3	T4	T5
Prom est	686,10	780,80	805,80	855,40	862,10	922,80	952,80
SE	24,11	39,89	46,14	44,96	36,15	22,16	37,98
	a	a	a				
		b	b	b	b	B	b

CAMP12: campaña 1 más campaña 2; T1a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; prom est: promedio estimado; SE: error estándar.

El incremento del rendimiento en materia seca, en los tratamientos con respecto al control osciló entre 13,80 a 38,87 % (Tabla 2.37).

Los tratamientos integrados T7, T3, T4 y T5 incrementaron en forma significativa la producción de materia seca en relación al control con valores promedio que oscilaron entre 24,67a 38,87 %, siendo la excepción los tratamientos T6 y T2 que tuvieron incrementos menores.

2.3.9.8. Poder germinativo de las semillas

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,001$) y entre campañas ($p = 0,012$) y, ausencia de interacción entre tratamientos y campañas ($p = 0,5043$). El análisis de contrastes ortogonales en la campaña 2005-2006, mostró diferencias entre todas las comparaciones establecidas (Tabla 2.38).

El poder germinativo osciló entre 58,90 % en el control a 86,20 % en el tratamiento T7. Los incrementos en el porcentaje de germinación en relación al control oscilaron entre 12 a 27,30 %.

Tabla 2.38. Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Poder germinativo de las semillas.

FV	gl num	gl den	F	pr>F	
T1 vs T2 a T7	1	24	103,0	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	43,9	<0,0001	**
T3, T4, T6 vs T7	1	24	64,0	<0,0001	**
T3 vs T4	1	24	20,4	<0,0001	**

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador; T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; **Altamente significativo ($p \leq 0,01$); *Significativo ($p \leq 0,05$); ns: No significativo

A su vez, la prueba de Tukey-Kramer mostró diferencias entre los tratamientos T1 y T2 del resto de los tratamientos exceptuando al tratamiento T5 (Tabla 2.39).

Tabla 2.39. Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Poder germinativo según la prueba de Tukey-Kramer para las dos campañas.

CAMP12	T1	T2	T5	T4	T3	T6	T7
Prom est	58,90	62,80	66,90	70,80	77,30	84,30	86,20
SE	1,40	2,05	2,64	1,22	0,76	1,54	0,83
	a	a	a	b	b	c	c
						d	d

CAMP12: campaña 1 más campaña 2; T1 a T7: tratamiento 1 a tratamiento 7; prom est: promedio estimado; SE: error estándar.

2.3.9.9. Incidencia de *Alternaria* spp. en las semillas

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,001$) y no significativas entre campañas ($p = 0,10$) y en la interacción entre tratamientos y

campañas ($p=0,9335$). A su vez, el análisis de contrastes ortogonales mostró diferencias entre todos los tratamientos (Tabla 2.40).

Tabla 2.40. Análisis de contrastes ortogonales para la variable: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas.

FV	gl num	gl den	F	pr>F
T1 vs T2 a T7	1	24	97	<0,0001 **
T2 vs T3 a T7	1	24	58	<0,0001 **
T4, T6 vs T7	1	24	50	<0,0001 **
T3 vs T4	1	24	27	<0,0001 **

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador; T1a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; **Altamente significativo ($p\leq 0,01$); *Significativo ($p\leq 0,05$); ns: No significativo.

El análisis de Tukey-Kramer para las dos campañas mostró diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos integrados T3, T4, T6 y T7 diferenciándose el tratamiento T7 por tener la menor incidencia de *Alternaria* spp. en las semillas (Tabla 2.41).

Se registraron diferencias entre el tratamiento control (38,33 %) y los tratamientos integrados T3 a T7, que tuvieron en promedio un 21,16 % de disminución de la incidencia de *A. alternata* en semillas con un valor máximo en el tratamiento T7 (26,50 %) y un valor mínimo en el tratamiento T4 (0,30 %).

Tabla 2.41. Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.

CAMP12	T7	T6	T3	T4	T5	T2	T1
Prom est	11,80	14,80	19,60	28,00	32,20	35,00	38,30
SE	1,06	1,20	0,87	1,30	2,71	1,70	1,36
	a	a	b	b	c	c	d
		b			d	d	D

CAMP12: promedio campaña 1 y campaña 2; prom est: promedio estimado; SE: error estándar; T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7.

2.3.9.10. Peso de 1000 semillas

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,001$) y campañas ($p=0,0045$) y no significativas para la interacción entre tratamientos y

campañas ($p=0,47$). El análisis de los contrastes ortogonales mostró a diferencias entre el tratamiento control (T1) y el resto de los tratamientos T2 a T7 y, entre el tratamiento T2 y los tratamientos integrados T3 a T7 (Tabla 2.42).

Tabla 2.42. Análisis de los contrastes ortogonales para la variable Peso de 1000 semillas.

FV	gl: num	gl den	F	pr>F	
T1vs T2 a T7	1	24	76,1	<0,0001	**
T2 vs T3 a T7	1	24	6,21	0,0200	**
T3, T4, T6 vs T7	1	24	0,17	0,6857	ns
T3 vs T4	1	24	0,71	0,4072	ns

FV: Fuente de variación; gl num: grados de libertad del numerador, gl den: grados de libertad del denominador; T1a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; **Altamente significativo ($p\leq 0,01$); *Significativo ($p\leq 0,05$); ns: No significativo.

El valor promedio del peso de 1000 semillas fue de 0,84 g con un valor mínimo de 0,81 y un máximo de 0,90 (Tabla 2.43).

El análisis de los valores promedio de tratamientos para las dos campañas mediante la prueba de Tukey-Kramer mostró diferencias entre el control (0,72) y el resto de los tratamientos (Tabla 2.43).

El incremento en el peso de 1000 semillas en relación al control osciló entre 12,50 a 25 %. De los tratamientos evaluados, se destacaron los tratamientos T5 y T4 por tener el mayor peso de 1000 semillas (0,87 y 0,90 g) (Tabla 2.43).

Tabla 2.43. Medias estimadas y error estándar de los tratamientos para la variable Peso de 1000 semillas según la prueba de Tukey-Kramer en las dos campañas.

CAMP12	T1	T2	T6	T3	T7	T5	T4
Prom est	0,72	0,81	0,81	0,84	0,85	0,87	0,90
SE	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01
	a	b	b	b	b	b	b

CAMP12: promedio campaña 1 y campaña 2; T1 a T7: Tratamiento T1 a Tratamiento T7; prom est: promedio estimado; SE: error estándar.

A su vez, se hallaron diferencias entre los promedios del peso de 1000 semillas para los tratamientos entre campañas obteniéndose el valor más alto en la campaña 2005-2006 con un incremento del 15,78 % en relación a la segunda campaña (Tabla 2.44).

Tabla 2.44. Promedio general estimado para la variable Peso de 1000 semillas.

	Prom est	SE	
CAMP1	0,88	0,01	a
CAMP2	0,76	0,01	b

CAMP1 y CAMP2: campaña 1 y campaña 2; Prom est: Promedio estimado; SE: error estándar.

2.3.10. Selección de tratamientos a través de los índices *ad hoc* IRV, IRPPVE, IRPPVA

2.3.10.1. Índice relativo de variables epidemiológicas y agronómicas

En la primera etapa de la selección, realizada sobre tres variables epidemiológicas MTIN, MTSE e IA1 y cuatro variables de interés agronómico REN, PM, MS y PG, los valores de los índices obtenidos destacaron a los tratamientos T4 y T7, del control en ambas campañas en siete y seis de las variables analizadas, teniendo los índices más altos de IRV (Tabla 2.45).

Tabla 2.45. Evaluación del índice relativo de variables para los siete tratamientos según las variables epidemiológicas y de interés agronómico.

Variables	Tratamientos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
MTIN	0	0	1	1	1	1	1
MTSE	0	0	0	1	0	0	0
IA1	0	0	1	1	0	1	1
REN	0	0	0	1	1	0	1
PM	0	1	1	1	1	0	1
MS	0	0	1	1	1	0	1
PG	0	0	1	1	0	1	1
IRV	0	1	5	7	4	3	6

T1 a T7: Tratamiento 1 a Tratamiento 7; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia de hojas atizonadas; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad de hojas atizonadas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas, REN: Rendimiento en semillas por m²; PM: Peso de 1000 semillas; MS: Materia seca por m²; PG: Poder germinativo de las semillas; IRV: Índice relativo de variables.

En una segunda selección solo se consideraron a los tratamientos seleccionados T4 y T7 para aplicar el segundo índice de selección IRPVE

2.3.10.2. Índice relativo porcentual promedio de variables epidemiológicas

En la Tabla 2.46 se presentan las diferencias relativas porcentuales de dos variables epidemiológicas MTIN e IA1 en los tratamientos T7 y T4 pre-seleccionados por tener los valores máximos del IRV calculado con respecto al tratamiento control .

Los resultados indicaron que los mayores valores cuantificables correspondieron al tratamiento T7 (fertilización en suelo más aplicación de *T. atroviride* en semillas) con un 69,45 % y en segundo lugar para el tratamiento T4 (fertilización en suelo más aplicación de carboxin+thiram en semillas) con un 46,29 %.

Tabla 2.46. Evaluación del índice relativo porcentual promedio de las variables epidemiológicas para los tratamientos T4 y T7.

Variables	Tratamientos	
	T4	T7
MTIN	65,70	69,71
IA1	26,90	69,19
IRPVE (%)	46,30	69,45

T4: Tratamiento 4; T7: Tratamiento 7; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar, IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; IRPVE: índice relativo porcentual promedio de las variables epidemiológicas.

2.3.10.3. Índice relativo porcentual promedio de las variables de interés agronómico para los tratamientos T4 y T7.

En la Tabla 2.47 se analizan los incrementos porcentuales relativos en las cuatro variables de interés agronómico en los tratamientos T4 y T7 con respecto al tratamiento control, teniendo un incremento de 28.48 % para el tratamiento T4 y de 31,47 % para el tratamiento T7.

Los tratamientos en los cuales se integró la aplicación de carboxin+thiram y el biofungicida *T. atroviride* en semillas con la fertilización previa del cultivo, en forma respectiva incrementaron en promedio los dos tratamientos la producción de las semillas en 35.5% y la producción de materia seca en 29.6%.

Según los índices de selección *ad hoc* IRPVE e IRPPVA, los tratamientos T4 y T7 se destacaron por: i) Disminuir los valores del Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; ii) Reducir la contaminación de semillas con *Alternaria* spp. e iii) Incrementar el rendimiento en semillas, materia seca, peso de 1000 semillas y el poder germinativo.

Tabla 2.47. Evaluación del índice relativo porcentual promedio de las variables de interés agronómico en los tratamientos T4 y T7.

Variables	Tratamientos	
	T4	T7
REN	34,21	36,79
PM	25,00	18,06
MS	34,49	24,67
PG	20,20	46,37
IRPPVA	28,48	31,47

T4: Tratamiento 4; T7: Tratamiento 7; REN: Rendimiento en semillas/m²; PM: Peso de 1000 semillas; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo; IRPPVA: Índice relativo porcentual promedio de las variables de interés agronómico.

2.4. DISCUSION

2.4.1. Evaluación *in vitro* de los fungicidas

2.4.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*

Las colonias de *A. alternata* fueron más sensibles al carboxin+thiram que al resto de los fungicidas (Tabla 2.4). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Suryawanshi et al. (2018) en cultivos de girasol y por Singh y Rai, (2003), en berenjena.

En orden decreciente, el fungicida menos eficiente fue el sulfato de cobre pentahidratado (700 y 500 ppm) con un promedio de inhibición del crecimiento micelial de 36,76 % y la dosis más baja prácticamente no lo controlaba (9,86 %).

El difenoconazole en la concentración intermedia (500 ppm) y máxima (700 ppm) controló en promedio el crecimiento micelial de *A. alternata* en un 30,77 % (Tabla 2.4), siendo inferior a lo hallado por Rajput y Chaudhari (2018), que con concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm obtuvieron una efectividad del 100 % de control en las colonias de *A. alternata* en el tizón de la papa y a Vijayalakshmi et al. (2018), que con una concentración de 500 ppm controló un 68 % del desarrollo micelial de *A. helianthi*.

La diferencia más notable, con respecto a los resultados obtenidos por Rajput y Chaudhari (2018), es que con dosis más bajas como por ejemplo 50 ppm controlaron el 100 % del desarrollo micelial de *A. alternata* del tizón de la papa y en cambio, en amaranto con 250 ppm la cepa de *A. alternata* solo fue controlada en un 14,67 % (Tabla 2.4).

2.4.1.2. Efecto de los fungicidas sobre la germinación de conidios de *Alternaria alternata*

Los tres fungicidas inhibieron la germinación de los conidios de *A. alternata* en más de un 80 %, luego de 6 h de incubación (Tabla 2.5).

Los tratamientos a base de sulfato de cobre pentahidratado tuvieron en promedio y en valores absolutos el mayor efecto inhibitorio de la germinación de los conidios de *A. alternata* (Tabla 2.5), resultados similares fueron obtenidos por Herrero (2005).

Los efectos del sulfato de cobre sobre la germinación de los conidios fueron descritos por Porterfield (2020) quien halló que el átomo de cobre del sulfato de cobre afecta el desarrollo micelial e impide la germinación de las esporas por alterar las membranas celulares, provocando la muerte celular.

El difenoconazole en sus tres concentraciones registró un promedio de inhibición de la germinación de los conidios *in vitro* de *A. alternata* de un 88,06 %, mientras que

Rajput y Chaudhari (2018) observaron un 100 % de control de *A. alternata* responsable de las manchas foliares en berenjena. Esto, podría deberse a la capacidad del difenoconazole de inhibir la respiración mitocondrial, previniendo la germinación de las esporas (FRAC, 2016).

El sulfato de cobre pentahidratado tuvo distinto comportamiento con respecto a la inhibición del micelio o de los conidios. Tuvo escaso control sobre el desarrollo micelial de las colonias de *A. alternata* y más control en la germinación de los conidios.

El carboxin+thiram en sus tres concentraciones se diferenció del resto de fungicidas por tener mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las colonias de *A. alternata* lo cual podría deberse al accionar conjunto de ambos principios activos sumándose el principio protector de uno y el sistémico del otro. En cambio el carboxin+thiram fue el menos eficiente en el control de la germinación de los conidios.

En términos generales, los fungicidas evaluados mostraron un comportamiento diferencial en relación a su efecto en el desarrollo de las colonias y la germinación de los conidios de *A. alternata*, siendo más eficientes en controlar la germinación de los conidios que el desarrollo de las colonias.

2.4.2. Efecto de los fungicidas sobre el hospedante

Si bien los fungicidas pueden ser efectivos para controlar a un determinado patógeno o grupos de patógenos se debe tener en cuenta que también pueden afectar la viabilidad de las semillas y el crecimiento de las plántulas. En general, para la evaluación de sustancias tóxicas en plantas, se emplean variables como germinación de las semillas y el largo de la radícula (de Souza y da Silva et al., 2015), debido a que las raíces constituyen el punto de contacto inicial en el crecimiento de la planta y el ingreso de las sustancias a través de la raíz (Hillis et al., 2010).

Los fungicidas evaluados incrementaron en forma significativa el poder germinativo de las semillas de amaranto, con valores promedios superiores al 30 % en relación al control.

El difenoconazole, incrementó la germinación de las semillas de amaranto hasta un 60 % con respecto al control (Tabla 2.8), comprobándose a su vez la inocuidad del mismo. Estos resultados son coincidentes con los de Nithyameenakshi Jeyaramraja y Manian, (2006) quienes reportaron incrementos en la germinación de las semillas de *Sesamum indicum* y *Phaseolus mungo*.

Con respecto al sulfato de cobre pentahidratado, incrementó la germinación de las semillas de amaranto y se comprobó su inocuidad en las tres concentraciones (Tabla 2.8), no habiéndose hallado referencias sobre los efectos en el poder germinativo de las semillas de amaranto, ni en otras especies vegetales.

La efectividad de los fungicidas evaluados podría estar relacionada con la capacidad de inhibir tanto el desarrollo del micelio como la germinación de los conidios aún en semillas desinfectadas.

Teniendo en cuenta, que *A. alternata* afecta la germinación de las semillas (Noelting et al., 2004; 2016) y sus propágulos pueden hallarse en las cubiertas seminales y en el embrión aún en semillas previamente desinfectadas (Noelting et al., 2016), es probable que los incrementos de germinación de las semillas tratadas con fungicidas se deban al control de los mismos sobre los propágulos del patógeno.

2.4.3. Efecto de los fungicidas en las plántulas de amaranto

Largo de radícula

De los fungicidas evaluados en sus distintas concentraciones podemos señalar que el difenoconazole (700 ppm) favoreció al crecimiento radicular de las plántulas.

Largo del hipocótilo

Con respecto al largo del hipocótilo no se registraron diferencias entre los fungicidas y el control pero sí entre los fungicidas.

Semillas tratadas con sulfato de cobre pentahidratado (250ppm) desarrollaron plántulas con un hipocotilo de menor tamaño que las semillas que fueron tratadas con difenocozanole (700 ppm), carboxin+thiram (700 ppm) y sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) y entre el sulfato de cobre pentahidratado (700 ppm y 500 ppm).

2.4.4. Incidencia de los fungicidas en el peso seco de las plántulas de amaranto

El peso seco de las plántulas, se lo ha utilizado en diversos cultivos, para determinar el vigor y el efecto de los tratamientos aplicados a las semillas (Ries y Everson, 1973; Buxton et al., 1977; Chinge et al., 1977; Porterfield, 2020).

Ninguno de los fungicidas en sus respectivas concentraciones afectó al peso seco de las plántulas de amaranto, razón por la cual se consideran que son inocuos con respecto a este parámetro.

2.4.5. Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas de amaranto.

Los fungicidas evaluados, con excepción del sulfato de cobre pentahidratado (250 ppm) redujeron el porcentaje de semillas infectadas por *Alternaria* spp. en valores superiores al 78 % (Tabla 2.12), siendo los más efectivos el carboxin+thiram (500 ppm) y difenoconazole (700 ppm).

2.4.6. Selección final de los fungicidas *in vitro*

Teniendo en cuenta los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, la inhibición de la germinación de los conidios de *A. alternata* a las 6 h de incubación, la germinación de las semillas de amaranto y la inhibición de la contaminación de las semillas de amaranto por *Alternaria* spp. (Tabla 2.13), podemos señalar que el fungicida carboxin+thiram en promedio en todas sus concentraciones fue el más eficiente para inhibir el crecimiento del micelio (67 %), y la germinación de conidios (81 %) además de disminuir la contaminación de las semillas por *Alternaria* spp. (86 %).

2.4.7. Efecto de los antagonistas sobre *Alternaria alternata*

2.4.7.1. Inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata in vitro*

De los antagonistas evaluados se destacó *T. atroviride* por ejercer el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* (50 %) y en orden decreciente *C. globosum* (26,90 %) y *E. nigrum* (21,11 %) (Tabla 2.14).

López et al. (2019) reportaron un porcentaje de inhibición de las colonias de *A. alternata* por *T. atroviride* inferior al 40 %, valor que fue inferior al obtenido en este trabajo.

2.4.7.2. Análisis de la zona de interacción entre *Alternaria alternata* y los antagonistas

En las zonas de interacción en cada uno de los cultivos duales a los siete días, se observaron enrollamientos de las hifas de *C. globosum* (Fig. 2.7a), *E. nigrum* (Fig 2.8c) y *T. atroviride* (Fig. 2.9b), alrededor de las hifas de *A. alternata*.

Resultados similares lo obtuvieron Cullen y Andrews (1984); Walther y Gindrat (1988); Di Pietro et al. (1992), con *C. globosum*, Brown et al. (1987) con *E. nigrum* y Chaitanya et al. (2018) con *T. atroviride*.

En la zona de interacción entre *A. alternata* y *T. atroviride* también se observaron estructuras similares a ganchos o apresorios, lisis de hifas de *A. alternata* y posterior

penetración (Fig. 2.9c y Fig. 2.9d); resultados similares fueron reportados por Víglaš y Olejníková (2019).

En relación a los halos de inhibición, solo se observaron en los cultivos duales entre *A. alternata* con *E. nigrum* y *T. atroviride*. Estos halos de inhibición indicarían que *E. nigrum* y *T. atroviride* estarían produciendo compuestos bioactivos que detendrían el crecimiento y/o la esporulación del patógeno.

En el caso de *E. nigrum*, los efectos antifúngicos son atribuidos a la producción de compuestos bioactivos (Burge et al., 1976; Baute et al., 1978; Brown et al., 1987; Madrigal et al., 1991) y en el caso de *T. atroviride* son atribuidos a la producción de antifúngicos solubles en el medio

En los cultivos duales entre *A. alternata* y *C. globosum* no se observaron halos de inhibición lo cual sugiere que la cepa utilizada de *C. globosum* no sería productora de antibióticos o bien si los produjo fue en una mínima cantidad. Estos resultados difieren de los hallados por Kohl et al. (1997) y Di Pietro et al (1992) quienes hallaron sustancias antibióticas producidas por *C. globosum* y que estarían involucradas en el biocontrol de los patógenos.

De los antagonistas evaluados, se destacó *T. atroviride* por desarrollar sobre *A. alternata*, los mecanismos de control de micoparasitismo, competencia y antibiosis, coincidiendo con lo reportado por Adams, (1990).

2.4.8. Efectos de los antagonistas de *Alternaria alternata* en las semillas de amaranto

Los antagonistas *C. globosum* y *E. nigrum* produjeron fitotoxicidad en las semillas de amaranto disminuyendo el poder germinativo *C. globosum* en un 49 % y *E. nigrum* en un 42 % (Tabla 2.15).

La fitotoxicidad producida en las semillas de amaranto por *C. globosum* es coincidente con lo citado por Nelum et al. (2015) en semillas de lechuga.

Por el contrario, en maíz *C. globosum* se utilizó para el control del tizón foliar causado por *Fusarium roseum* sp. *cerealis* var. *graminearum* no teniendo efectos adversos en el cultivo (Chang y Kommedahl, 1968).

La fitotoxicidad producida por *E. nigrum* en semillas de amaranto es coincidente con lo observado por Ou (1972) en semillas de arroz.

En cambio, *T. atroviride* no afectó la germinación de las semillas de amaranto (Tabla 2.15) y en plántulas incrementó el tamaño de la radícula en un 68 % (Tabla 2.16) y del hipocótilo en un 90 % (Tabla 2.17).

Los incrementos en el desarrollo radicular y en el largo de hipocótilo inducidos por *T. atroviride* podrían deberse a compuestos auxínicos producidos por *Trichoderma*.

Según Hernandez-Mendoza et al. (2012) las especies de *Trichoderma* secretan compuestos auxínicos como el ácido indolacético que estimulan la germinación, el crecimiento, el desarrollo radicular y mejora la asimilación de los nutrientes.

Resultados similares fueron observados por distintos autores en numerosos cultivos (Harman et al., 2004; Lorito, 2006; Martínez et al., 2008; Begum et al., 2010; Okoth et al., 2011). Por el contrario, los resultados no son coincidentes con los de Víglaš y Olejníkov (2019) quienes hallaron en *Lepidium* un incremento en el número de raíces pero no en su longitud.

2.4.9. Manejo del tizón foliar: Ensayos *in vivo*

2.4.9.1. Aparición de las primeras lesiones foliares

Las primeras lesiones foliares se manifestaron a los 34 días después de la emergencia del cultivo en la primera campaña y a los 27 días en la segunda campaña. Esto es coincidente con lo observado por Kgatle et al. (2020) en cultivos de girasol.

2.4.9.2. Escalas aplicadas de acuerdo al tipo de lesión

En el cultivo de amaranto se observaron dos tipos de lesiones foliares producidas por *Alternaria* spp.: unas más pequeñas con contornos regulares comúnmente asociadas con manchas foliares y otras confluyentes, grandes e irregulares normalmente asociadas con el tizón foliar producido por *Alternaria*. Por ese motivo, para evaluar la severidad del daño foliar se estimó conveniente aplicar el criterio convencional de utilizar dos escalas diferentes de acuerdo al grado de lesiones manifestado en las hojas.

Según Meena et al. (2017a), *Alternaria* spp. produce las toxinas TeA, AOH y AME que provocan alteración de la fotosíntesis, muerte celular y necrosis en los tejidos. Estan manchas necróticas se van incrementando cuanto más tiempo están expuestos los tejidos al accionar de las micotoxinas, fundamentalmente el TeA, que es la más destructora. Por esa razón, en el futuro, sería conveniente revisar este criterio de clasificación y no considerar como si fuesen dos enfermedades diferentes sino distintos grados de expresión de la misma enfermedad.

2.4.9.3. Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar según tratamientos

Los resultados de las dos campañas consecutivas revelaron que el genotipo de amaranto utilizado permitió detectar diferencias significativas entre los tratamientos y el control al evaluar el Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar.

Si se analiza el área bajo la Curva de progreso de la enfermedad, calculada en base a la incidencia del tizón foliar según los análisis exploratorios y confirmatorios (Tabla 2.28 y Tabla 2.30), los resultados de los tratamientos integrados por los fungicidas más la fertilización del suelo en las dos campañas se diferenciaron del control el cual registró los máximos valores de la enfermedad.

2.4.9.4 Condiciones ambientales que favorecieron al tizón foliar en el cultivo de amaranto

El desarrollo del tizón foliar en el cultivo de amaranto, se vió favorecido por períodos climáticos húmedos y cálidos. Según Galli (2006), *Alternaria* spp. comienza a desarrollarse y multiplicarse. cuando las condiciones de humedad ambiente son superiores al 85%. Las condiciones ambientales pueden influir en la incidencia de la enfermedad, la fisiología del cultivo y la efectividad de los tratamientos aplicados.

En relación a la precipitación, en las dos campañas se registraron condiciones ambientales diferentes no solo por la cantidad total de lluvia acumulada durante el ciclo del cultivo sino también en la distribución mensual de la misma (Fig. 2.10 y Fig. 2.11).

En la primera campaña la precipitación total acumulada (601,5 mm) fue menor en comparación a la segunda campaña (863,8 mm).

A su vez, en la primera campaña la precipitación máxima mensual se produjo en el mes de enero (261,1 mm) y en la segunda campaña en el mes de marzo (288,1 mm) (Fig. 2.10 y Fig. 2.11), lo que trajo aparejado un desarrollo y comportamiento de la enfermedad diferente en cada una de las campañas.

2.4.9.5 Incidencia del tizón foliar en amaranto

Los máximos valores de incidencia de tizón foliar se registraron en el tratamiento control a los 33 y 84 días después de la emergencia del cultivo en cada una de las campañas, coincidiendo con los máximos registros de precipitaciones mensuales (Fig. 2.10 y Fig. 2.11), lo que hace suponer que las precipitaciones tendrían incidencia directa sobre el tizón foliar del amaranto.

2.4.9.6 Severidad del tizón foliar en el cultivo

La máxima severidad del tizón foliar se registró en el tratamiento control en condiciones de temperaturas superiores a 28 °C y humedad relativa superior al 65 %. En la primera campaña, dichas condiciones se presentaron a los 62 días después de la emergencia del cultivo y en la segunda campaña a los 56 días (Tabla 2.30). En el resto de los tratamientos, la incidencia menor se debería al accionar de los fungicidas y/o los biocontroladores.

2.4.9.7. Selección de los tratamientos en función de las principales variables epidemiológicas y agronómicas

El análisis exploratorio de los datos correspondientes a las variables de interés epidemiológico y agronómico sumados a los análisis estadísticos confirmatorios no fueron suficientes para determinar los tratamientos más eficientes para reducir los daños generados por el tizón foliar en el cultivo en ambas campañas, por lo cual, se utilizaron los índices *ad hoc* (Tabla 2.47; Tabla 2.48 y Tabla 2.49).

El primer índice de selección (IRV), diferenció a los tratamientos con mayor efectividad en relación a las variables analizadas guiando la selección de los mismos (Tabla 2.47). Los análisis estadísticos utilizados son coincidentes con los utilizados por Costa et al. (2002), motivo por lo cual no solo se consideraron variables fitosanitarias sino también las agronómicas.

El segundo índice de selección (IRPPVE), fue utilizado para cuantificar las diferencias relativas porcentuales con respecto al control teniendo en cuenta las variables epidemiológicas y agronómicas (Tabla 2.48).

Perelló et al., (2015) también utilizó índices de daño basados en la incidencia y la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria* en trigo.

Según los índices *ad hoc* IRPPVE (Tabla 2.48) e IRPPVA (Tabla 2.49) se puede afirmar que el manejo del tizón foliar, al menos en las condiciones establecidas, puede realizarse con tratamientos combinados que integren la fertilización del suelo más la aplicación en semillas del fungicida carboxin+thiram (500 ppm) o con propágulos de *T. atroviride*.

2.4.9.8. Tratamientos seleccionados

Los tratamientos más efectivos para controlar el tizón foliar en amaranto fueron los tratamientos T4 y T7. El tratamiento T4 redujo tanto la incidencia como la severidad del

tizón foliar según el Área bajo la curva de progreso de la enfermedad en comparación al tratamiento control (Tablas 2.28 y 2.30). Los bajos niveles de incidencia y severidad del tizón foliar en el tratamiento T4 hacen suponer que la enfermedad fue retrasada por efecto del fungicida.

Posiblemente, los diferentes mecanismos de acción del carboxin+thiram y la actividad inhibitoria comprobada *in vitro* sobre el micelio (Tabla 2.4) y los conidios de *A. alternata* (Tabla 2.5) hayan contribuido a controlar al tizón foliar. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Kabir et al. (2006) en arroz y Malajer y Mian (2009) en trigo.

En el cultivo de algodón, Bhattiprolu (2017) y Monga et al. (2018) reportaron una reducción en la intensidad de las manchas foliares ocasionada por *Alternaria* por la aplicación del carboxin+thiram en semillas.

Además, los efectos del tratamiento T4 sobre el tizón foliar y el rendimiento del cultivo pueden deberse al efecto combinado de la fertilización del suelo y el tratamiento de las semillas con el fungicida carboxin+thiram, que tiene acción protectora y curativa.

El thiram tiene actividad sobre el control del desarrollo micelial como en la germinación de los conidios de hongos además de estimular el crecimiento de las plantas. Kabir et al. (2006) en arroz y Malajer y Mian (2009) en trigo, reportaron incrementos significativos en la producción de los cultivos por la aplicación de carboxin+thiram en semillas.

En estudios previos, Noelting et al. (2016) hallaron presencia de micelio en el embrión de las semillas de amaranto. Por dicho motivo es factible que el carboxin+thiram, al ser un fungicida sistémico haya controlado tanto al micelio como a los conidios en los embriones infectados, siendo este el motivo, por lo cual fue más efectivo en el control de *Alternaria* spp. en los ensayos a campo. El incremento registrado del 34,5 % de materia seca en las plántulas de amaranto (Tabla 2.37) en relación al control, en los tratamientos cuyas semillas fueron tratadas con carboxin+thiram es coincidente con los obtenidos por Rogério et al. (2012) en cultivos de cártamo.

A su vez, el tratamiento T7 redujo en relación al tratamiento control (T1) en promedio en ambas campañas el Área bajo la Curva de progreso de la enfermedad calculada en base a la severidad del tizón foliar en un 69.71 % (Tabla 2.29) e incrementó el rendimiento en semillas en un 36.80 % (Tabla 2.35).

En el presente estudio, la reducción de la severidad del tizón foliar podría deberse a un efecto directo sobre el patógeno en coincidencia con lo hallado por Vijayalakshmi et al.

(2018) con *T. atroviride* o a un fenómeno de resistencia inducida por *Trichoderma* (Harman et al., 2004). Resultados similares fueron hallados por Surekha et al. (2013) en cultivos de poroto mung (*Vigna radiata*), incrementándose los rendimientos al aplicar esporas de *Trichoderma* en las semillas (Chet et al., 1997).

El incremento en el rendimiento de las semillas de amaranto (Tabla 2.38) fue superior a los obtenidos por Björkman et al. (2010) en cultivos de soja y maíz. La cobertura de las semillas con microorganismos benéficos, es una alternativa, que aseguraría la colonización de las raíces de las plantas de una manera más efectiva (Harman, 2000).

En condiciones controladas *Trichoderma atroviride*, incrementó en relación al tratamiento control el largo de la radícula (68 %) y del hipocótilo (80,56 %) y a campo la producción de semillas (37 %) lo cual fue coincidente por lo reportado en diversos cultivos por Harman (2000). Los efectos bioestimulantes del crecimiento de *T. atroviride* observados en las plántulas de amaranto, en términos generales, son coincidentes con los resultados de Víglas y Olejníková (2019), siendo probable que el mayor crecimiento de las plantas se halla visto favorecido por el accionar de las hormonas (Arora et al., 1992).

La cepa de *Trichoderma atroviride* utilizada fue aislada de semillas de un genotipo de amaranto con escasa contaminación por *Alternaria* spp. y a su vez, recolectadas de plantas madres que tuvieron un buen comportamiento sanitario a campo. Este método de selección difiere del propuesto por Cook y Baker (1983) quienes consideran que los aislamientos efectivos de antagonistas de patógenos deberían ser extraídos de hospedantes susceptibles en los cuales el patógeno no produciría la enfermedad o la misma sería leve.

2.6. CONCLUSIONES

- En los ensayos *in vitro*, los fungicidas que tuvieron mejor comportamiento fueron: carboxin+thiram (500 ppm); difenoconazole (700 ppm) y sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) por ser inocuos para las semillas y plántulas de amaranto e inhibir el desarrollo micelial y la germinación de los conidios de *A. alternata*.
- De los antagonistas evaluados se destacó la cepa de *Trichoderma atroviride* por su capacidad de: a) Inhibir el crecimiento micelial de *A. alternata*, b) Micoparasitar sus hifas y c) Estimular el crecimiento de la raíz y del hipocótilo en plántulas de amaranto.
- En los ensayos *in vivo*, tuvieron mejor comportamiento los tratamientos en los cuales se integró la fertilización del suelo previo a la siembra junto con la aplicación en las semillas de carboxin+thiram 500 ppm (T4) o *Trichoderma atroviride* (T7). Ambos tratamientos redujeron en promedio en las dos campañas la incidencia del tizón foliar y la contaminación de las semillas por *Alternaria* spp. e incrementaron el poder germinativo, el rendimiento en materia seca y peso de 1000 semillas.

CAPITULO III

3. MANCHADO EN SEMILLAS DE AMARANTO

RESUMEN

En el presente capítulo se describe al manchado que afecta a las semillas de amaranto como una nueva patología que podría limitar su cultivo. El estudio se llevó a cabo con los objetivos de: a) Determinar la etiología de la patología que afectaba a las semillas de amaranto, b) Localizar al patógeno en las semillas, c) Determinar micotoxinas y d) Evaluar el comportamiento sanitario de la nueva patología en genotipos de distinto ciclo. Se realizaron análisis sanitarios de rutina (*blotter test* y APG test), histopatológicos y micológicos. Se efectuaron ensayos a campo para determinar el comportamiento sanitario de los genotipos de distinto ciclo a esta nueva patología. Los resultados *in vitro* y la identificación molecular del patógeno, indicaron que *Alternaria alternata* es el principal microorganismo asociado a las semillas manchadas con una incidencia del 41 %. Las pruebas de patogenicidad realizadas con este microorganismo demostraron su capacidad para producir el manchado de las semillas, reducir la germinación e inducir el desarrollo anormal de las plántulas. El análisis histopatológico y micológico de las semillas manchadas permitió a) Localizar los propágulos de *A. alternata* en todos los componentes seminales; b) Observar hipertrofias en perisperma y embrión; c) Detectar mayor concentración de micotoxinas en semillas manchadas y d) Diferenciar a genotipos de amaranto de distinto ciclo destacándose el genotipo de ciclo corto por producir semillas que tuvieron mayor poder germinativo, menor incidencia del manchado y escasa a nula contaminación por micotoxinas.

Palabras clave: *Alternaria* , manchado, germinación, hipertrofias, genotipos, micotoxinas.

3.1. INTRODUCCION

Las semillas pueden ser portadoras de microorganismos fúngicos que ingresan durante el cultivo o desarrollan en condiciones de almacenamiento (Christensen y Kauffman, 1965). Entre los primeros encontramos a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Drechslera* y *Bipolaris*, que pueden afectar el stand de plantas, tamaño, peso de granos y/o su calidad industrial (Neergaard, 1979), produciendo importantes pérdidas económicas. En cambio, las especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran entre los principales hongos de almacenamiento, los cuales se desarrollan con alto grado de humedad, teniendo una incidencia menor que los anteriormente mencionados.

En general los síntomas causados por los microorganismos en los granos y/o semillas pueden manifestarse en forma de pudriciones, esclerotizaciones, reducción del tamaño y manchados (Neegaard, 1979). Esta última alteración implica un cambio en la coloración parcial o total de las semillas, sumado a la pérdida de la viabilidad y calidad industrial debido a la acción toxicogénica de compuestos producidos por los microorganismos.

El manchado de granos es una alteración muy frecuente entre las gramíneas como trigo, cebada, avena y centeno. Entre los microorganismos asociados a esta patología se encuentran diversas especies de Dematiáceas que comprenden a los géneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Cladosporium* y *Curvularia*, entre otros (Barreto y Fortugno, 1994; Sisterna y Sarandón, 2000; Sisterna y Carranza, 2004; Sisterna y Minhot, 2004). De los mencionados, *Alternaria* es el género aislado con mayor frecuencia. Sus especies pueden producir una variedad de compuestos diferentes, algunos de los cuales son tóxicos para el hombre y los animales (micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas) (Minoletti et al., 2000, Dusemund et al., 2018).

En las Crucíferas tanto en *Raphanus sativus* como en *Sinapis alba* es muy común la decoloración grisácea de las semillas. Neergard (1945) y Jorgensen (1967) demostraron que la causa directa de esta decoloración es el hinchamiento del parénquima subepidérmico de las cubiertas lo cual facilitaría la penetración de *Alternaria* spp.

En *Coriandrum sativum* L., las semillas afectadas por *A. alternata* presentan una decoloración intensa que difiere del color café claro de las semillas sanas (Everhat et al., 2003; Sandoval et al., 2006).

En el trigo, *A. alternata* produce una enfermedad conocida como escudete negro, la misma afecta a los granos y se encuentra diseminada en todo el mundo (Mathur y Cunfer, 1993). Entre sus síntomas se destaca la coloración oscura alrededor del extremo del

embrión (Conner y Davison, 1988). El grano afectado tiene menor tasa de germinación y la harina es de mala calidad comercial con sabor desagradable y color oscuro (Lorenz, 1986).

Por otro lado, el oscurecimiento de los granos en sorgo y en trigo está correlacionada con la presencia de toxinas de *Alternaria* spp. (Carrillo, 2003).

Los metabolitos producidos por *Alternaria* como alternariol, alternariol monometil éter, ácido tenuazónico, altenueno y altertoxina son perjudiciales para los animales (Bottalico y Logrieco, 1992; Bensassi et al., 2012; Lee et al., 2015; Escriba et al., 2017) constituyen un riesgo potencial para los consumidores (Pavon et al., 2012).

Del análisis histológico de los granos afectados se demostró que *A. alternata* es la responsable de inducir alteraciones en los tejidos embrionarios, ocasionando oscurecimiento y pérdida del contenido celular, desarrollándose las hifas del hongo en todos los tejidos afectados (Agrawal et al., 1987).

3.1.1. Análisis de situación

Alternaria alternata ha sido el microorganismo aislado con mayor frecuencia en las semillas de especies cultivadas y silvestres de amaranto, (Weaver y McWilliams, 1980; Bartolini y Hampton, 1989; Noelting et al., 2004, 2016).

En el análisis de semillas de amaranto cosechadas en el año 2007 en Llavallol, realizado con un microscopio estereoscópico, se observaron distintas coloraciones en las mismas, variando desde marrón castaño hasta marrón castaño oscuro a negro.

En el cultivo de amaranto no se tiene información sobre análisis histológicos de semillas manchadas infectadas con *A. alternata* ni si dicho microorganismo induce alteraciones en los tejidos seminales colonizados como el tipo y contenido de micotoxinas en las semillas manchadas.

Teniendo en cuenta la falta de información con respecto al manchado en las semillas de amaranto, se realizó el siguiente estudio.

3.1.2 HIPOTESIS DE TRABAJO

- El manchado de las semillas tiene efectos negativos sobre la viabilidad y calidad sanitaria de las mismas siendo el principal agente etiológico *Alternaria alternata* responsable asimismo de producir lesiones foliares en el cultivo.
- A través del mejoramiento genético, se pueden obtener genotipos más tolerantes a la contaminación con *Alternaria* spp. y con menor contenido de micotóxicas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la etiología del manchado que afecta a las semillas de amaranto.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir la sintomatología que afecta a las semillas de amaranto.
- Identificar la micobiota asociada a las semillas manchadas de amaranto.
- Evaluar la actividad patógena del principal microorganismo aislado.
- Desarrollar y evaluar una técnica que produzca artificialmente el manchado de las semillas en amaranto.
- Identificar microorganismos fúngicos en los tejidos seminales.
- Analizar los tejidos seminales de las semillas asintomáticas y manchadas tanto natural como artificialmente.
- Determinar el tipo y concentración de metabolitos secundarios fúngicos en semillas de amaranto normales y manchadas.
- Analizar el comportamiento sanitario de cinco genotipos de amaranto cuatro de ciclo largo (160 días) y uno de ciclo precoz (79 días).

3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. Descripción de la sintomatología que afecta a las semillas de amaranto

3.3.1.1. Muestra de semillas

Se utilizaron semillas de *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* cosechadas en el año 2007 de un cultivo ubicado en la localidad de Llavallol, provincia de Buenos Aires, Argentina. Las semillas se examinaron en un microscopio estereoscópico marca Nikon 200 X para describir su apariencia.

3.3.1.2. Análisis sanitario de las semillas

Con el fin de evaluar la micoflora presente en las semillas de amaranto aspecto normal y manchadas, se utilizaron semillas de apariencia normal (S1) y manchadas (S2), sin desinfectar (D0) y desinfectadas (D1) con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y secaron entre papeles de filtro estériles y posteriormente se sembraron en los medios de cultivo *blotter test* (M1) y agar papa glucosado (APG) 2% (M2)

Por cada tratamiento se sembraron 400 semillas divididas en grupos de 25 por placa de Petri, en papeles de filtro humedecidos estériles (*blotter test*) o en APG, se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C con 16 h de fotoperiodo durante siete días.

Después del período de incubación, los microorganismos desarrollados fueron identificados utilizando claves taxonómicas (Ellis, 1971, 1976; Simmons, 1995; Barnett y Hunter, 1998; Leslie y Summerell, 2006; Booth, 1971; Pitt y Hocking, 1997) basadas en características morfológicas y culturales. La incidencia de las especies se expresó como frecuencia de los aislamientos (F) y densidad relativa (DR), según Clarke y Christensen (1981).

La frecuencia relativa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$F(\%) = \frac{N_s}{N_x} * 100$$

Donde

Ns: Número de semillas en donde el microorganismo está presente.

Nx: Número total de semillas.

La densidad relativa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DR(N1) = \frac{N1}{N1 + N2 + \dots + Nt} * 100$$

Donde:

DR (N1): Densidad relativa del microorganismo 1.

N1: Número total de semillas afectadas por el microorganismo 1.

N1+N2+...+Nt: Número total de semillas contaminadas por los microorganismos.

Las variables analizadas fueron: porcentaje de incidencia de semillas contaminadas con el microorganismo aislado con mayor frecuencia y porcentaje de germinación de las semillas.

3.3.1.3. Identificación del microorganismo principal aislado de semillas manchadas

Se realizó la identificación a nivel morfológico y molecular el principal microorganismo fúngico aislado de semillas manchadas.

3.3.1.4. Pruebas de patogenicidad

Inóculo:

Se utilizó como inóculo una suspensión de esporas obtenidas de colonias desarrolladas en placas de Petri con APG durante siete días de incubación en cámara de cultivo a 25±2 °C del principal microorganismo aislado de las semillas manchadas.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de apariencia normal las cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y secaron entre papeles de filtro estériles.

La inoculación se realizó con una suspensión conidial a una concentración de 1×10^5 esporas ml^{-1} . Las semillas inoculadas (100 por cada tratamiento) se sembraron en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido estéril incubándose en una cámara de crecimiento a 25±2 °C durante siete días.

Con posterioridad a la incubación, se evaluó el porcentaje de incidencia de semillas manchadas y de germinación de las mismas.

3.3.1.5. Análisis estadístico

El ensayo se realizó según un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (2x2x2) con una combinación de 8 tratamientos que incluyeron los dos tipos de

semillas, S1 (normales) y S2 (manchadas); dos métodos de análisis sanitarios, M1 (*blotter test*) y M2 (APG) y dos tipos de desinfección, D0 (sin desinfección) y D1 (con desinfección), con cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos.

Las variables analizadas fueron: porcentaje de incidencia de semillas tratadas con el microorganismo aislado con mayor frecuencia y porcentaje de germinación de las mismas.

En todos los casos se analizaron supuestos de homogeneidad de varianzas y de normalidad.

Los datos originales de incidencia de *A. alternata* debieron ser transformados previamente, (A los datos originales se le sumó 1 como constante ya que había muchos valores ceros y luego se aplicó la transformación arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de la incidencia más uno). En todos los casos se analizaron las interacciones significativas.

El análisis fue complementado con la aplicación de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significación ($p \leq 0,05$).

3.3.2. Análisis histopatológico y micológico de semillas

3.3.2.1. Puesta a punto de la técnica para inducir el manchado en forma artificial de las semillas de amaranto.

Con la finalidad de inducir el manchado en las semillas de amaranto en forma artificial, se tomaron semillas de aspecto normal, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % durante 5 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron entre papeles de filtro estériles, sembrándose en placas de Petri que contenían cuatro capas de papel de filtro humedecido con 5 ml de agua destilada estéril. Se incubaron en cámara de cultivo durante 24 h a 20 °C y con un fotoperiodo de 12 h luz.

Para inhibir la germinación de las semillas se colocaron en un freezer a -22 °C durante 24 h. Las semillas tratadas con frío, se sembraron sobre colonias de *A. alternata* y se incubaron a 20±2 °C a 12 h luz durante 7 días. El control tuvo el mismo tratamiento pero sin estar expuesto al patógeno. A los siete días después de la incubación, se evaluó la apariencia de las semillas tratadas (inoculadas) y sin tratar (control).

3.3.2.2. Componentes del plaqueo de semillas

Para identificar las especies fúngicas en cada uno de los componentes de las semillas de apariencia normal, manchadas en forma natural y manchadas por inoculación

previa con *A. alternata*, se tomaron cuarenta semillas de cada una de las muestra, se sumergieron en agua durante 10 h y se diseccionaron con una aguja de disección.

Las semillas se dividieron en cuatro componentes: episperma, cotiledones, radícula y perisperma. Cada componente se desinfectó por separado durante 5 minutos con hipoclorito de sodio al 1 %, se enjuagó con agua destilada estéril y se colocó en bandejas de poliestireno (15 cm de ancho por 21 cm de largo) con papel de filtro prehumedecido. Las bandejas se incubaron en una cámara de cultivo a 25 ± 2 °C durante siete días. Luego del período de incubación se identificaron los hongos en cada componente en base a claves taxonómicas generales (Barnett y Hunter, 1998) y específicas (Simmons, 2007) registrándose el porcentaje de la incidencia.

3.3.2.3. Análisis histopatológico de las semillas de amaranto

Se fijaron cuarenta semillas de amaranto de las muestras de apariencia normal, manchadas en forma natural y manchadas por inoculación previa con *A. alternata* en FAA (Formol, alcohol etílico, ácido acético) y se embebieron en parafina por el método de D'Ambroggio (1986).

Posteriormente, las semillas se cortaron con un micrótopo rotativo Minot, en secciones longitudinales y transversales de los tejidos seminales de 12 µm de espesor. Se colorearon con el método de doble tinción Safranina-fast green (D'Ambroggio, 1986; Reig Armiñana y García Breijo, 2016); se montaron en portaobjetos en un medio sintético (PMYR) y se observaron con microscopio óptico.

3.3.2.4. Análisis de los metabolitos secundarios

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (LC/MS-MS) con modificaciones del protocolo de Vishwanath et al. (2009) para identificar y cuantificar la presencia y concentración de seis metabolitos secundarios fúngicos: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico (TeA), altenueno (ALT), alertoxina I (ALTX-I) y tentoxina (TEN) en semillas de amaranto de aspecto normal (S1); manchadas en forma natural (S2) y manchadas artificialmente con la cepa de *A. alternata* (Nº 1085 SC) aislada de semillas naturalmente manchadas (S3).

Las semillas de cada grupo por separado, se mezclaron con 5 ml de disolvente de extracción acetonitrilo/agua/ácido acético (79:20:1) y se agitaron durante 10 minutos seguido de ultrasonido durante 10 minutos por muestra. Se tomó 100 µl de la muestra se

filtraron, secaron y redisolvieron en 1000 µl agua-acetonitrilo (1/1) y se analizó con el sistema LC-MS/MS.

El análisis de metabolitos secundarios fúngicos de la cepa de *A. alternata*, LPSC N°1085 y de las semillas de amaranto se realizó por el método de multidetección descrito por Malachova et al. (2014). La cepa *A. alternata*, LPSC N°1085, se multiplicó en agar extracto de levadura sacarosa (YES) a 25 °C en oscuridad durante 14 días, siguiendo el método descrito por Samson et al. (2002).

La separación cromatográfica se realizó a 25 °C en una columna Gemini C18, 150 x 4,6 mm ID., 5 µm de tamaño de partícula, equipado con C18 con cartucho de seguridad de 4x3 mm ID. (Phenomenex, CA, USA) y acoplado a un sistema HPLC 1290 Series (Agilent, Waldbronn, Germany).

Para detectar y cuantificar los metabolitos se utilizó el equipamiento QTrap Sistema LC-MS/MS 5500 (Biosystems, CA, USA) equipado con una fuente de ionización Turbo Ion Spray electrospray (ESI).

Las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en el Centre for Analytical Chemistry, Tulln, Austria bajo la supervisión del Dr. Michael Sulyok.

3.3.3. Respuesta de genotipos de distinto ciclo a patologías ocasionadas por *Alternaria* spp.

Los ensayos se llevaron a cabo durante las campañas 2013-2014 y 2014-2015. Se evaluaron cinco genotipos de *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* de distinto ciclo, uno precoz (79 días) y cuatro de ciclo largo (160 días).

Todos los genotipos se obtuvieron en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina a partir de una muestra de semillas de un cultivar de *A. mantegazzianus* cv Don Manuel proveniente de la provincia de La Pampa. Tras sucesivas generaciones de selección se obtuvieron poblaciones con distintas características fenotípicas y ciclos. En el caso del genotipo de ciclo precoz, se seleccionaban las plantas precoces y posteriormente se multiplicaban en parcelas aisladas.

Los ensayos se sembraron en la primer campaña el 21/12/2013 y en la segunda el 9/12/2014, manualmente a chorillo depositando las semillas en el fondo de los surcos a 2,5 cm de profundidad. La siembra se realizó según un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. La unidad experimental estaba conformada por 4 surcos de 4 m de largo cada uno separados entre sí a 0,50 m. El desmalezado y el aporque del cultivo se realizó manualmente.

Se cosecharon los dos surcos centrales de cada unidad experimental, eliminándose los laterales para evitar los efectos de las borduras.

3.3.3.1. Condiciones ambientales durante el ciclo de los cultivos

Los registros meteorológicos diarios correspondientes a temperatura, humedad y precipitación fueron cedidos por el Servicio Meteorológico Nacional.

3.3.4. Variables evaluadas y análisis realizados

3.3.4.1. Análisis de lesiones foliares

Al aparecer las primeras lesiones foliares en el cultivo se recolectaron muestras de hojas sintomáticas con el fin de identificar al agente etiológico. Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en bandejas sobre papeles esteriles humedecidos (cámara húmeda) y en placas de Petri con APG al 2 %.

La identificación de los microorganismos aislados de las lesiones foliares se realizó mediante la aplicación de técnicas de rutina y la utilización de claves taxonómicas.

Para la identificación taxonómica se tuvieron en cuenta caracteres morfobiométricos de las estructuras reproductivas desarrolladas en APG y el patrón de esporulación en APZ (Simmons 1995, 2007).

3.3.4.2. Variables evaluadas en las tres etapas del cultivo

Se evaluaron en el cultivo once variables divididas en tres etapas (cultivo, cosecha y post cosecha).

3.3.4.2.1. Primera etapa

En la primera etapa se evaluó la incidencia y severidad de las lesiones foliares a partir de su aparición en las plantas. Con este propósito, se realizaron cinco monitoreos cada siete días evaluándose número total de hojas, número de hojas afectadas por manchas y/o tizones y severidad de las lesiones de diez plantas tomadas al azar en cada unidad experimental.

La incidencia de manchas foliares (main), se determinó mediante el cociente entre el número de hojas afectadas por manchas y el número total de hojas por planta multiplicado por 100.

El grado de severidad de manchas foliares (mase) se calculó mediante una escala arbitraria de 9 grados de severidad utilizada en cultivos de girasol para evaluar la severidad de daño causado por *A.helianthi* (Leite et al., 2002).

A partir de los valores de incidencia y de severidad para manchas foliares se estimó el Área bajo la curva de progreso de enfermedad (ABCPE) calculado según el modelo de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{[I_i + I_{i+1}]}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

ABCPE: representa la enfermedad en un intervalo de tiempo expresada en este caso en proporción día⁻¹; n es el número de evaluaciones, I es la incidencia de la enfermedad y (t_{i+1} - t_i) es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas.

Con los datos de severidad se calculó el Área bajo la curva de progreso de la severidad de las manchas foliares (MASE) para lo cual se utilizó la misma fórmula a la cual se reemplazó el valor de incidencia por el valor de severidad. En cuanto al tizón foliar, tanto la severidad como la incidencia de hojas afectadas por manchas confluentes o atizonadas fueron escasamente representativas como para efectuar el análisis correspondiente en esta primera etapa.

3.3.4.2.2. Segunda etapa

En la segunda etapa (cosecha del cultivo) se tomaron diez plantas al azar en cada unidad experimental, evaluándose altura de la planta; longitud de panojas; diámetro basal de tallo; N° total de hojas por planta; N° total de hojas afectadas por manchas y/o tizón foliar producido por *Alternaria* spp. Con los datos de estas dos últimas variables se calculó la incidencia de hojas afectadas por lesiones necróticas (manchas y tizones) causadas por *Alternaria* spp. expresados en porcentaje.

3.3.4.2.3. Tercera etapa

En la tercera etapa (post-cosecha del cultivo) se evaluaron las siguientes variables:

-Rendimiento en semillas por metro cuadrado

Para su evaluación se cosecharon las panojas de tres subparcelas dentro de una parcela de 1 m² cada una. Las panojas se secaron sobre zarandas y se trillaron manualmente. Las impurezas se eliminaron zarandeando y aireando las semillas con un ventilador. Posteriormente se tomaron muestras para determinar el porcentaje de humedad de las semillas y ajustar el rendimiento por planta en base a un contenido de humedad equivalente al 12 %. Para cada parcela se promedió el peso de las semillas por m².

-Peso de 1000 semillas

Se pesaron muestras de 1000 semillas de cada uno de los genotipos y se secaron en estufa. Los valores se ajustaron a un contenido de humedad del 12 %.

-Poder germinativo

Se tomaron al azar 400 semillas por cada uno de los genotipos, se sembraron en bandejas con papel previamente humedecido (*blotter test*) y se colocaron en una cámara de cultivo a 25 °C con un fotoperíodo de 12/12 h luz-oscuridad durante siete días. Después del período de incubación, se realizó el recuento de semillas germinadas según las normas ISTA (2016).

-Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.

Se sembraron 300 semillas sin desinfectar por cada genotipo sobre papel húmedo contenido en bandejas plásticas e incubadas durante 7 días a 25 °C con un fotoperíodo 12/12 h luz-oscuridad. Luego del período de incubación, se observaron las semillas con una lupa para determinar la presencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.

Para confirmar la identificación se transfirió micelio y/o conidios de las semillas contaminadas a placas de Petri en un medio de APZ incubadas en cámara de cultivo a 25 °C con un fotoperíodo de 8 h luz y 16 h oscuridad.

La identificación se realizó utilizando claves taxonómicas (Simmons, 1995, 2007). Los datos se expresaron en porcentaje de incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.

-Incidencia del manchado en las semillas según su tamaño.

Para su evaluación se tamizaron las semillas de cada uno de los genotipos por separado con un tamiz de malla 1 mm², obteniéndose en todos los casos dos subgrupos de diferente tamaño, uno con semillas de un diámetro mayor a 1mm (SC) y otro con semillas de un diámetro igual o menor a 1 mm (SG).

Para calcular la incidencia de manchado en cada subgrupo se tomaron muestras al azar de 400 semillas, se las examinó con una lupa y se determinó la incidencia del

manchado mediante el cociente entre cantidad de semillas manchadas o descoloridas sobre el total de semillas analizadas por 100. A partir de las evaluaciones respectivas se registró la incidencia de semillas manchadas de mayor tamaño (SMG) y la incidencia de semillas manchadas de menor tamaño (SMC).

3.3.5. Análisis Multivariado.

3.3.5.1. Variables analizadas *in situ* en las tres etapas.

Los datos obtenidos, de las 11 variables, se sometieron al análisis multivariado (Cuadras, 2014), que comprendió: a) un análisis de correlaciones entre todas las variables, b) un análisis exploratorio de componentes principales sobre los promedios de los genotipos entre todas las variables que incluyó gráficos de biplots; c) un análisis de conglomerados sobre los promedios de los genotipos, entre las variables para cada campaña. Para el análisis de conglomerados se empleó la matriz de distancias Euclídeas. La selección del método jerárquico de agrupamiento se realizó a través de coeficiente de correlación cofenética (Sokal y Rohlf, 1962).

En segunda instancia se realizó un análisis de varianza para cada variable: En todos los casos se analizaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas y aditividad. Para cada una de las variables se efectuó un análisis de varianza de las campañas utilizando un modelo mixto (Mc Culloch y Searle, 2001).

El modelo incluyó en la parte fija a los genotipos de amaranto, las campañas, la interacción entre genotipo, campaña y en la parte aleatoria los bloques anidados en cada campaña. Cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, se emplearon modelos mixtos con una matriz de errores diagonal heterogénea según región, en el ANOVA (Mc Culloch y Searle, 2001).

Las diferencias entre tratamientos fueron calculadas mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (varianzas homogéneas) o Tukey-Kramer (varianzas heterogéneas). Todos los análisis fueron realizados con los programas estadísticos software InfoStat (Di Rienzo et al., 2018) y SAS (SAS, 2016) y trabajándose con un nivel de significación del 5%.

3.3.6. Análisis de metabolitos secundarios en semillas de genotipos de distinto ciclo

El análisis de seis metabolitos secundarios fúngicos (toxinas) viz alternariol, alternariol, mono metil éter, altenueno, tentoxina, ácido tenuazónico y altertoxina I en

semillas de amaranto se llevó a cabo utilizando el método de detección múltiple descrito por Malachová et al. (2014).

En todos los análisis se utilizaron semillas con mayor diámetro ≥ 1 mm (SG) y semillas de menor tamaño < 1 mm (SC) de los cinco genotipos de amaranto cosechadas en los años 2014 y 2015.

Se mezcló 1g de semillas de cada muestra con 5 ml de la extracción con disolvente de acetonitrilo/agua/ácido acético (79/20/1) y se agitó durante 10 minutos, seguido de ultrasonificación durante 10 minutos por muestra. Se tomaron 100 microlitros del filtrado, se secaron y redisolviéron en 1000 microlitros de acetonitrilo-agua (1/1).

Para detectar y cuantificar los metabolitos de las semillas se utilizó el equipamiento QTrap Sistema LC-MS/MS 5500 (Biosystems, CA, USA) equipado con una fuente de ionización Turbo Ion Spray electrospray (ESI) y un sistema HPLC 1290 Series (Agilent, Waldbronn, Germany). La separación cromatográfica se realizó a 25 °C en una columna Gemini C18, 150 x 4,6 mm i.d., 5 μ m de tamaño de partícula, equipado con C18 con cartucho de seguridad 4 x 3 mm i.d. (Phenomenex, CA, USA).

Las pruebas bioquímicas para la detección de las toxinas se llevaron a cabo en el Centro de Química analítica ubicado en Tulln, Austria por el Dr. Michael Sulyok.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Descripción de los síntomas que afectan a las semillas de amaranto

Las semillas de aspecto normal mostraron un color blanquecino a ocráceo (Fig. 3.1a); mientras que las manchadas presentaron una coloración que varió de marrón claro a negro (Fig. 3.1b). En la mayoría de las semillas afectadas, este síntoma se manifestó en toda la superficie, mientras que en otras estaba restringido al área basal próxima al embrión.

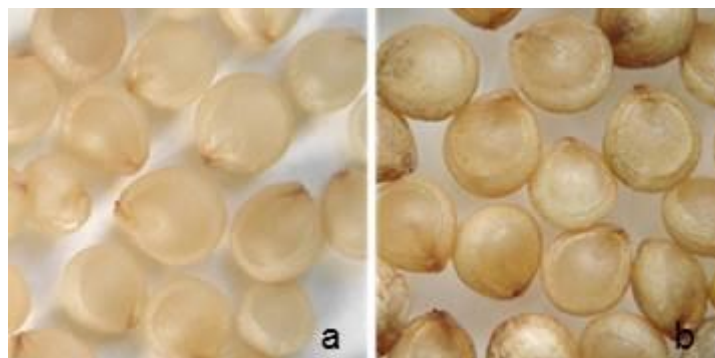


Figura 3.1. Semillas de amaranto de apariencia normal (a) y manchadas en forma natural (b).

3.4.2. Análisis sanitario de semillas manchadas y no manchadas de amaranto

Alternaria alternata fue el principal microorganismo aislado de las semillas manchadas teniendo el mayor porcentaje de incidencia y frecuencia relativa de aparición (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Micobiota aislada de semillas normales y manchadas de amaranto.

Tratamientos	<i>Alternaria</i> spp.		<i>Bipolaris</i> spp.		<i>Fusarium</i> <i>equiseti</i>		<i>Cladosporium</i> <i>Cladosporioides</i>		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Epicoccum</i> <i>nigrum</i>		<i>Phoma</i> spp.		<i>Rhizopus</i> <i>nigricans</i>	
	F	DR	F	DR	F	DR	F	DR	F	DR	F	DR	F	DR	F	DR
S1M1D0	1,75	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S1M1D1	0,20	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	7,15	0,20	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S1M2D0	9,25	30,00	0,00	0,00	1,00	6,20	1,00	5,42	6,25	33,43	1,00	4,90	0,00	0,00	0,00	0,00
S1M2D1	0,50	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	6,25	2,00	38,12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	4,56
S2M1D0	59,00	98,32	0,25	0,40	0,50	0,80	0,00	0,00	0,25	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2M1D1	24,75	96,00	0,00	0,00	1,00	3,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2M2D0	65,25	84,49	0,00	0,00	8,75	11,56	0,75	0,95	1,50	1,98	0,50	0,68	0,25	0,31	0,00	0,00
S2M2D1	17,50	51,44	0,00	0,00	3,25	9,62	1,00	2,98	10,00	29,31	0,50	1,47	0,00	0,00	1,75	5,14

F: Frecuencia de ocurrencia; DR: densidad relativa de cada microorganismo aislado de semilla de amaranto; S1: semillas normales, S2: semillas manchadas, M1: *blotter test*, M2: APG, D0: semillas sin desinfectar y D1: semillas desinfectadas.

Las colonias en medio APG, después de 7 días de incubación, tenían un aspecto afieltrado, color gris oscuro a negro con un diámetro de 45 mm (Fig. 3.2a); conidios de

forma ovoide a elipsoidal $24,6\pm 3,5 \mu\text{m} \times 14,6\pm 0,7 \mu\text{m}$ (Fig. 3.2b) con color marrón amarillento y septos transversales y longitudinales; conidióforos primarios solitarios ($32,4\pm 8,9 \mu\text{m}$) y el patrón de esporulación en Agar agua presentó más de tres ramas de conidios por cadena (Fig. 3.2c).

La identificación en base a caracteres morfobiométricos y culturales fue coincidente con la identificación a nivel molecular (Anexo 6.2).

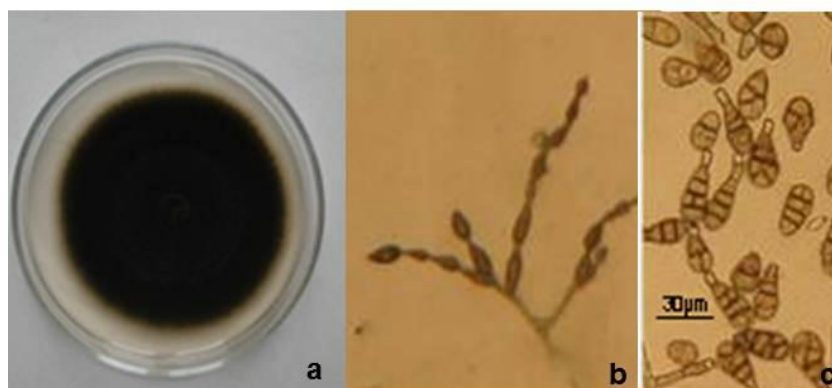


Figura 3.2. Colonia identificada morfológicamente y molecularmente como *A. alternata* en APG (a), patrón de esporulación (b) y conidios en Agar agua (c).

La cepa de *A. alternata* fue depositada en la colección de cultivos del Instituto Carlos Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, con el número de acceso LPSC N° 1085.

El resto de los microorganismos aislados (Tabla 3.1) fueron: *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc, *Rhizopus nigricans* Ehrenb., *Penicillium* spp. Link, *Phoma* sp. Westend, *Bipolaris* spp. y *Epicoccum nigrum* Link siendo estos dos últimos géneros ampliamente reportados en granos manchados de trigo (Sisterna, 1987; Carranza y Sisterna, 1993; Sisterna y Sarandón, 2000; Sisterna y Minhot, 2004; Sisterna y Lori, 2005).

3.4.3. Pruebas de patogenicidad

A los siete días de incubación, las semillas sin inocular no mostraron síntomas de manchado (Fig. 3.3a).

Sin embargo, en las semillas previamente inoculadas, el manchado en algunos casos cubrió toda la superficie de la cubierta seminal, mientras que en otros el síntoma estuvo restringido al área basal próxima al embrión (Fig. 3.3b). Las semillas manchadas registraron un menor porcentaje de germinación y un incremento en el número de plántulas anormales del 59 %.



Figura 3.3. Semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma artificial (b).

Entre los daños ocasionados por *A. alternata*, además del manchado en semillas (Fig. 3.4a) se observaron plántulas de amaranto con clorosis (Fig. 3.4b), plegado de los cotiledones (Fig. 3.4c y Fig. 3.4d), radícula atrofiada (Fig. 3.4d), manchado en los cotiledones (Fig. 3.4e) y cancro en el hipocótilo (Fig. 3.4f).

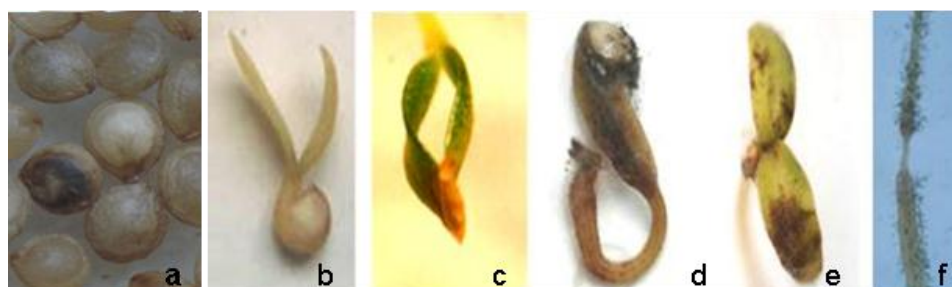


Figura 3.4. Daños ocasionados en amaranto por *A. alternata*: manchado de las semillas (a), clorosis en plántulas (b); plegado de cotiledones (c y d); radícula atrofiada (d); manchado en cotiledones (e); cancro en hipocótilo (f).

3.4.4.1 Incidencia de *Alternaria* spp.

Se observaron interacciones significativas entre métodos de análisis sanitarios, niveles de desinfección y tipos de semillas (Tabla 3.2), cuando se analizó el porcentaje de incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp. (M*S gl: 31; CM: 82,1; F: 26,78; p: 0,0000; M*D gl: 31 CM: 120,71; F: 39,35; p: 0,0000; S*D gl: 31; CM: 529,67; F: 172,65 p: 0,0000; CV: 6.99 %).

3. 4.4.2. Porcentaje de germinación de las semillas.

En la Tabla 3.2 se observaron interacciones significativas entre los métodos de análisis sanitarios, tipos de semillas y niveles de desinfección aplicados a las semillas, cuando se analizó el porcentaje de germinación de las semillas (M*S gl:31; CM: 180,5;

F:13.69; p:0,0011; M*D gl:31;CM:1568 F:118,9; p:0,0000; S*D gl:31;CM:1352; F: 102,52; p: 0,0000; CV:5,97%).

Tabla 3.2. Análisis de las interacciones significativas entre tipo de semillas, método de análisis y nivel de desinfección para las variables: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas y poder germinativo

Interacciones	IA (%)	PG (%)
a) SxM		
S1 M1	7,85 a	87,12 a
S1 M2	12,71 b	82,00 b
S2 M2	39,07 c	39,37 c
S2 M1	40,62 c	35,00 c
b) SxD		
S1 D1	6,53 a	89,00 a
S1 D0	14,03 b	80,12 b
S2 D1	27,96 c	54,62 c
S2 D0	51,73 d	19,75 d
c) MxD		
M2 D0	35,61 a	42,75 a
M1 D0	30,11 b	57,12 b
M1 D1	18,36 c	65,00 c
M2 D1	16,13 c	78,62 d

S: semillas de amaranto, S1: semillas de apariencia normal, S2: semillas manchadas; M: Métodos de análisis, M1: *blotter test*, M2: APG; D: desinfección, D0: semillas sin desinfectar, D1: semillas desinfectadas. IA: Incidencia de *Alternaria* spp. más 1; PG: Porcentaje de germinación. Los valores dentro de la misma columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey.

A continuación se describen los resultados de las interacciones:

3.4.4.3. Interacción entre tipo de semillas y método de análisis sanitarios

VARIABLES EVALUADAS

a) Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas: Las semillas manchadas registraron en promedio el mayor porcentaje de incidencia de *Alternaria* spp., independientemente de los métodos de análisis sanitarios utilizados ya sea *blotter test* o en APG (Tabla 3.2a). Por el contrario, las semillas de aspecto normal registraron mayor incidencia de *Alternaria* spp. (12,71 %) en APG y una menor incidencia (7,85 %) en *blotter test*. (Tabla 3.2a).

b) Porcentaje de germinación de las semillas: Las semillas de apariencia normal registraron un mayor porcentaje de germinación en el *blotter test* con respecto a las semillas manchadas. El porcentaje de germinación en promedio para semillas de aspecto normal fue de 84,56 % en comparación con el porcentaje de germinación de las semillas manchadas que fue de 37,18 % (Tabla 3.2a).

3.4.4.4. Interacción entre tipos de semillas y niveles de desinfección

VARIABLES EVALUADAS

Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas

La desinfección redujo la incidencia de *Alternaria* spp. en un 53,45 % en las semillas de aspecto normal y 45,95 % en las semillas manchadas (Tabla 3.2b). Si se compara las semillas normales y desinfectadas con las semillas manchadas y desinfectadas el porcentaje de incidencia de *Alternaria* spp. se incrementó en un 62,94 % en las semillas manchadas.

Porcentaje de germinación de las semillas

La desinfección aplicada tanto en semillas de apariencia normal como manchadas incrementó la germinación en un 11,08 % en semillas de aspecto normal y de un 176,55 % en semillas manchadas (Tabla 3.2b).

3.4.4.5. Interacción entre métodos análisis sanitarios de y niveles de desinfección

VARIABLES EVALUADAS

Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas

Analizando la interacción entre los métodos de análisis y los niveles de desinfección de las semillas (Tabla 3.2c), se observa en semillas no desinfectadas registraron mayor incidencia de *Alternaria* spp. en APG (36,61) que en el *blotter test* (30,61).

Por el contrario, en las semillas desinfectadas, la incidencia de *Alternaria* fue menor en comparación de las no desinfectadas, no habiendo diferencias significativas entre los métodos de análisis sanitarios (Tabla 3.2c).

Porcentaje de germinación de las semillas

Con respecto a la germinación de las semillas hubo diferencias significativas entre los cuatro tratamientos (Tabla 3.2c). En los tratamientos sin desinfección las semillas tuvieron menor poder germinativo que en los tratamientos con desinfección. En las semillas sin desinfección el menor poder germinativo fue en APG y por el contrario con

las semillas desinfectadas el poder germinativo fue superior en APG que en el *blotter test* (Tabla 3.2c).

3.4.5. Análisis histopatológicos y micológicos de las semillas de amaranto

3.4.5.1. Evaluación de una nueva técnica para inducir el manchado artificialmente en las semillas

Las semillas normales no inoculadas (tratamiento control), siete días después de la incubación, no mostraron síntomas de manchado (Fig. 3.5a).



Figura 3.5. Semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma natural (b) y manchadas por inoculación con *Alternaria alternata* (c).

Las semillas de aspecto normal (Fig 3.5a) depositadas sobre colonias de *A. alternata* mostraron mayor decoloración y manchado (Fig.3.5c) que las semillas manchadas naturalmente (Fig. 3.5b).

3.4.5.2 Componentes del plaqueo de semillas

En la Tabla 3.3, se observa que *A. alternata* está presente en todos los tejidos seminales incluido el embrión, tanto en semillas manchadas en forma natural como en forma artificial. En cambio, *C. globosum*, *C. cladosporioides*, *E. nigrum* y *Mucor* sp. se hallaron en el episperma de las semillas de aspecto normal y *F. oxysporum* en el episperma de las semillas manchadas naturalmente.

La mayor diversidad de microorganismos fúngicos, aunque en concentraciones relativamente bajas, se los encontró en el episperma de las semillas de aspecto normal; en el perisperma solo desarrolló *A. alternata* y en el embrión no se observó ningún microorganismo (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Microorganismos fúngicos aislados en tejidos seminales (episperma, perisperma y embrión), de semillas de aspecto normal (S1), manchadas naturalmente con *Alternaria* spp. (S2) y manchadas por inoculación artificial con *A. alternata* (S3).

Microorganismos	Episperma			Perisperma			Embrión		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
<i>Alternaria</i> spp. / <i>A. alternata</i>	1,00	7,84	10,00	0,50	5,00	6,00	0,00	2,50	3,00
<i>Chaetomium globosum</i>	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Epicoccum nigrum</i>	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,00	2,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Mucor</i> sp.	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
No identificados	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

3.4.5.3. Análisis histopatológico de las semillas de amaranto de aspecto normal y manchadas

En los cortes histológicos realizados en semillas de aspecto normal, no se observaron alteraciones en el perisperma (p), radícula (ra) y cotiledones (co), (Fig. 3.6a). En cambio, en las semillas manchadas tanto en forma natural (Fig. 3.6b) como artificial (Fig. 3.6c) se manifestaron alteraciones en el perisperma, radícula y cotiledones, observándose hifas de *Alternaria* en el episperma, perisperma, radícula y cotiledones.

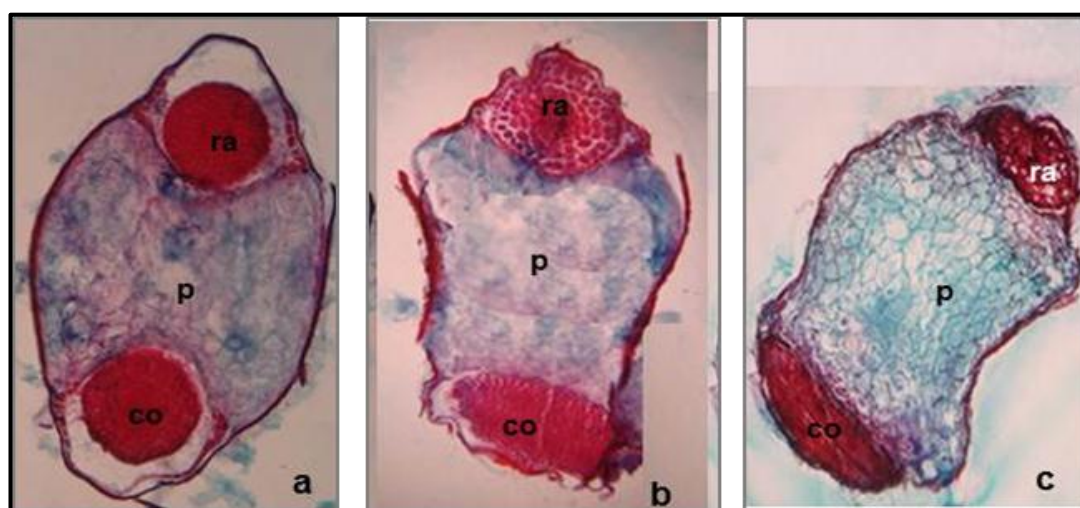


Figura 3.6. Cortes longitudinales de semillas de amaranto de aspecto normal (a), manchadas en forma natural (b) y artificial (c); perisperma (p), radícula (ra) y cotiledones (co).

3.4.6. Análisis de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios identificados y cuantificados en la cepa de *A. alternata* LPSC N°1085 y en semillas de amaranto de aspecto normal, manchadas naturalmente y

artificialmente fueron: alternariol, alternariol mono-metil éter, ácido tenuazónico, altenueno, altertoxina I y tentoxina. (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenido de metabolitos secundarios en semillas de amaranto normales, manchadas naturalmente y artificialmente con *A. alternata* y en la cepa LPSC N°1085 de *A. alternata*.

Metabolitos secundarios						
Muestras	AOH	AME	TeA	ALT	ALTX -1	TEN
S1	0,001	0,006	1,23	<LOD	<LOD	0,09
S2	0,923	16,880	4,66	0,03	<LOD	0,43
S3	128,000	95,000	3.902,00	33,00	9,40	0,94
LPSC N°1085	154,800	103,450	1.155,50	69,45	2,34	<LOD
<LOD* (µg/g)	0,0001	0,0002	0,1091	0,0015	0,0015	1E-04

Concentración de metabolitos en µg/kg de semillas de amaranto de aspecto normal (S1); manchadas en forma natural (S2), manchadas artificialmente (S3) y en la cepa de *A. alternata* LPSC N° 1085 (µg/g de medio). Metabolitos: AOH, alternariol; AME, alternariol mono-metil éter; TeA, ácido tenuazónico; ALT, altenueno; ALTX-I, altertoxina I; TEN tentoxina. LOD: Límite de detección. Valores determinados para LOD (en µg/g) para maíz siguiendo la guía EURACHEM (Sulyok et al., 2020).

Las semillas de aspecto normal registraron una menor concentración de metabolitos secundarios fúngicos en relación a las semillas manchadas en forma natural y manchadas artificialmente (Tabla 3.4).

El ácido tenuazónico fue el metabolito hallado en concentraciones más elevadas en las semillas manchadas en forma artificial y en la cepa de *A. alternata* (LPSC N°1085) desarrollada en medio APG, utilizada para inducir el manchado artificial en las semillas de amaranto. El resto de metabolitos secundarios fúngicos hallados, aunque en bajas concentraciones fueron AME, AOH, ALT, ALTX-1 y TEN (Tabla 3.4).

3.4.7. Condiciones ambientales durante las campañas: 2013-2014 y 2014-2015

En la Fig. 3.7 se observa el promedio mensual de las temperaturas máximas y mínimas, humedad relativa y precipitación correspondientes a la localidad de Llavallol, Buenos Aires, desde diciembre del 2013 a junio del 2014 donde se llevó a cabo la primera campaña del cultivo de amaranto (Fig. 3.7a) y diciembre del 2014 a junio del 2015 cuando se desarrolló la segunda campaña (Fig. 3.7b).

En la primer campaña (Fig. 3.7a), la temperatura máxima fue de 32,23 °C en el mes de diciembre y la mínima (1,1 °C) en mayo, la humedad relativa fue baja durante diciembre de 2013 y enero de 2014 incrementándose posteriormente y manteniéndose constante hasta la cosecha del cultivo. La humedad relativa máxima fue de 98 % en el mes

de abril. La precipitación total fue de 763,40 mm con una precipitación mensual máxima de 215 mm en enero (Tabla 3.5).

Durante la segunda campaña (Fig. 3.7b), la temperatura máxima fue 29 °C en enero, la humedad relativa fue baja durante todo el ciclo del cultivo, aunque la diferencia más notable con respecto al primer ciclo (Fig. 3.7a) es la precipitación ya que tuvo un promedio de 255,60 mm en contraste de los 763,40 mm de la primer campaña (Tabla 3.5).

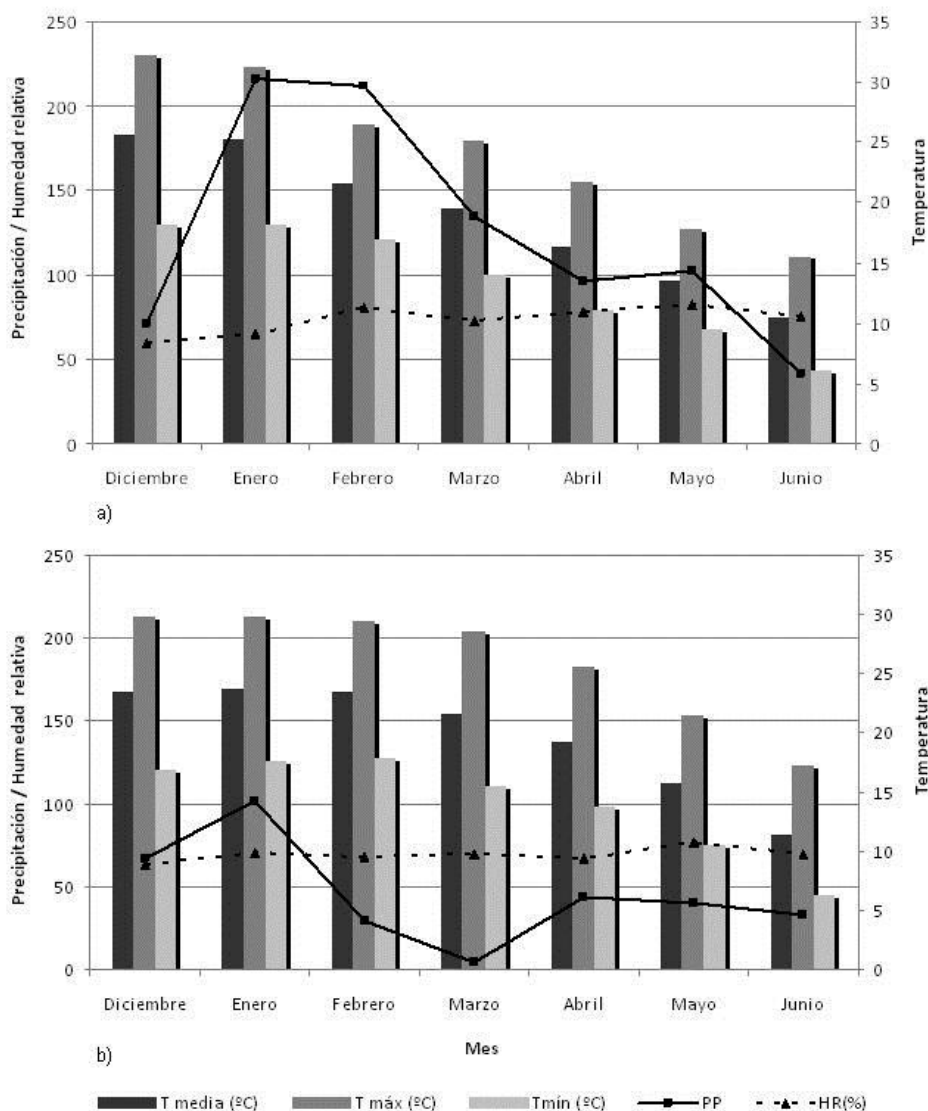


Figura 3.7. Promedios mensuales de temperatura máxima, mínima; humedad relativa y precipitación correspondientes a las campañas: a) 2013-2014 y b) 2014-2015, localidad de Llavallol, Buenos Aires. Fuente Servicio Meteorológico Nacional, Ezeiza.

En la Tabla 3.5 se reportan los valores promedio correspondientes a la temperatura total, máxima, mínima; humedad relativa y precipitación acumulada de siembra a cosecha de los cinco genotipos de amaranto, uno de ciclo corto (siembra a cosecha de 79 días) y 4 de ciclo largo (siembra a cosecha 160 días), durante las campañas 2013-2014 y 2014-2015.

Tabla 3.5. Promedios de temperaturas máxima, mínima, promedio, humedad relativa y precipitación acumulada, durante las campañas: 2013-2014 y 2014-2015, Llavallol, Buenos Aires.

Campañas	genotipo	T. máx (°C)	T. prom (°C)	T. mín (°C)	HR (%)	PP (mm)
CAMP1	CP	29,43	23,74	17,90	70,74	481,90
CAMP1	CL	25,34	20,03	14,61	74,50	763,40
CAMP2	CP	29,34	23,50	17,20	67,24	140,70
CAMP2	CL	27,81	21,16	15,65	68,16	255,60

CAMP1: campaña 2013-2014; CAMP2: campaña 2014-2015; CP: genotipo de ciclo precoz; CL: genotipos de ciclo largo; T. máx: temperatura máxima; T. prom: temperatura promedio; T. mín: temperatura mínima; HR: Humedad relativa media y PP: precipitación total acumulada. Fuente Servicio Meteorológico Nacional, Ezeiza.

3.4.8. Evaluación de lesiones foliares

Se realizaron cinco monitoreos en el cultivo de amaranto. En ambas campañas se observaron manchas foliares de contornos regulares rodeadas en algunos casos por un halo clorótico. Las lesiones se iniciaron en las hojas basales y posteriormente se extendieron a las hojas intermedias. *Alternaria* spp. fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia de hojas sintomáticas en ambas campañas.

3.4.8.1. Detección de los primeros síntomas de las manchas foliares

Los primeros síntomas se observaron en las hojas inferiores del cultivo a partir de los 34 días de la emergencia de las plantas en la primer campaña y a los 42 días en la segunda. En algunas hojas, se observaron manchas foliares de contornos regulares rodeadas en algunos casos por un halo clorótico.

Los aislamientos de *Alternaria* spp. en APG 2 %, tuvieron un crecimiento rápido (tres o cuatro días) desarrollando colonias filitradas de color gris oscuro a negro en el haz y color negro más claro en el envés. En el medio APZ desarrollaron un patrón de esporulación con 2 a 3 ramificaciones por cadena, teniendo un promedio de 14 conidios.

3.4.8.2. Incidencia de las Manchas foliares

En la primera campaña el genotipo de ciclo precoz, fue el más afectado por manchas foliares con valores que oscilaron entre 6,25 a 25,43 %, mientras que los genotipos de ciclo largo tuvieron en promedio una incidencia que fluctuó entre 2,54 a 14,40 %.

En la segunda campaña el porcentaje de incidencia de manchas foliares en el genotipo precoz osciló entre 12,20 a 21,40 %, mientras que los genotipos de ciclo largo registraron una incidencia que fluctuó entre 2,79 a 12,20 %.

3.4.8.3. Severidad de las Manchas foliares

La severidad de las manchas foliares fue muy reducida, en ambas campañas, en los genotipos analizados tuvieron un promedio inferior al 1 % de la superficie foliar afectada por planta.

En la primer campaña, la severidad promedio de hojas afectadas por manchas foliares osciló entre 0,01 a 0,61 % para el genotipo de ciclo precoz y de 0,003 a 0,11 % para los genotipos de ciclo largo.

En la segunda campaña, el porcentaje de severidad de manchas aisladas en el genotipo de ciclo precoz, osciló entre 0,05 y 0,12 % y en los genotipos de ciclo largo entre 0,01 y 0,11 %.

3.4.9 Análisis de los datos

3.4.9.1 Análisis Multivariado: campaña 1 (2013-2014)

3.4.9.1.1 Análisis de correlación entre las variables evaluadas en las tres etapas.

Los resultados del primer análisis exploratorio se presentan en la Tabla 3.6, en la cual se observa que variables evaluadas en la primera etapa están correlacionadas con variables evaluadas en el resto de las etapas.

A su vez, las variables Área bajo la curva de progreso de enfermedad en base a la incidencia; la severidad de manchas foliares y la Incidencia de hojas afectadas por manchas y/o tizón foliar causado por *Alternaria* spp. en la cosecha estuvieron correlacionadas con las variables Incidencia de *Alternaria* spp. y la Incidencia de manchado en semillas de mayor tamaño.

Las variables epidemiológicas evaluadas en la primera etapa como el Área bajo la curva de progreso de la incidencia y de la severidad de las manchas foliares, se

correlacionaron en forma negativa pero no significativamente con el rendimiento de las semillas.

De las variables agronómicas, la altura de planta a cosecha se correlacionó en forma positiva y altamente significativa con variables epidemiológicas evaluadas en semillas, como la incidencia de *Alternaria* spp. y la incidencia de manchado en las semillas de mayor tamaño (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Coeficientes de correlación de Pearson de once variables evaluadas en cinco genotipos de amaranto expuestos en forma natural a la infección con *Alternaria* spp. en la localidad de Llavallol, Buenos Aires, en la campaña del 2013-2014.

	MAIN	MASE	ALT	DBT	LP	NTA	REN	PM	PG	IN1	SMG
MAIN	1,00										
MASE	0,97 **	1,00									
ALT	-0,97 **	-1,00 **	1,00								
DBT	0,34 ns	0,50 ns	-0,48 ns	1,00							
LP	0,02 ns	-0,05 ns	0,06 ns	0,02 ns	1,00						
NTA	-0,97 **	-1,00 **	1,00 **	-0,47 ns	0,06 ns	1,00					
REN	-0,65 ns	-0,69 ns	0,71 ns	-0,07 ns	-0,19 ns	0,71 ns	1,00				
PM	-0,95 *	-0,90 *	0,89 *	-0,43 ns	-0,28 ns	0,90 *	0,54 ns	1,00			
PG	0,97 **	1,00 **	-1,00 **	0,46 ns	-0,04 ns	-1,00 **	-0,73 ns	-0,90 *	1,00		
IN1	-0,97 **	-1,00 **	1,00 **	-0,45 ns	0,04 ns	1,00 **	0,73 ns	0,90 *	-1,00 **	1,00	
SMG	-0,97 **	-0,99 **	0,98 **	-0,54 ns	-0,07 ns	0,98 **	0,63 ns	0,96 *	-0,98 **	0,98 **	1,00

MAIN: Área bajo la curva de progreso de la incidencia de Manchas foliares; MASE: Área bajo la curva de progreso de la severidad de manchas foliares; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en granos por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Poder germinativo; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm; **:Altamente significativo ($p \leq 0,01$); *Significativo ($p \leq 0,05$), ns: No significativo.

3.4.9.1.2. Análisis de Componentes Principales

Los dos primeros componentes principales, explicaron el 88 % de la variación total (Tabla 3.7).

En el análisis de los componentes principales (Tabla 3.8, Fig. 3.8), el primer componente diferenció a los genotipos según su ciclo. Los genotipos de ciclo largo registraron mayor sanidad del follaje durante la primera etapa del cultivo, menor incidencia y severidad de manchas aisladas causadas por *Alternaria* spp., mayor altura de la planta a la cosecha y mayor peso de 1000 semillas. Sin embargo, tuvieron mayor incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp. y mayor incidencia del manchado en semillas de

mayor y menor tamaño. De los genotipos evaluados, el genotipo de ciclo largo G2 tuvo el mayor rendimiento en semillas

Tabla 3.7. Contribución de los dos componentes principales a la variabilidad total en la campaña 2013-2014.

CP	Vp	Pe	Pa
CP1	8,50	0,77	0,77
CP2	1,14	0,10	0,88

CP: componente principal, CP1: componente principal 1, CP2: componente principal 2, Vp: Valores propios, Pe: Proporción de varianza explicada por cada componente principal, Pa: Proporción acumulada.

En la Tabla 3.8 se observa que el primer componente quedó asociado en forma negativa a las variables ALT, NTA, IN1, SMC, SMG, y REN y en forma positiva a las variables MASE, MAIN, DBT y PG. El segundo componente se asoció positivamente a la variable LP y el resto de las variables no tuvieron mayor incidencia en este componente.

Tabla 3.8. Correlaciones de los componentes principales con las variables analizadas en la campaña 2013-2014.

VAR	CP1	CP2
MAIN	0,98	0,02
MASE	1,00	-0,09
ALT	-1,00	0,08
DBT	0,49	-0,23
LP	0,03	0,96
NTA	-1,00	0,08
REN	-0,71	-0,31
PM	-0,93	-0,22
PG	1,00	-0,06
IN1	-1,00	0,06
SMG	-0,99	-0,01

MAIN: Área bajo la curva de progreso de manchas foliares; MASE: Área bajo la curva de progreso de la severidad de manchas foliares ; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en granos por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Poder germinativo; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm.

En la distribución espacial de los tratamientos en base a los dos primeros componentes principales (Fig. 3.8) se observa que el primer componente diferenció a los

genotipos de distinto ciclo según: a) Área bajo la curva de progreso de la incidencia y severidad de manchas foliares , b) Altura de planta a cosecha, c) Incidencia de semillas contaminadas con *Alternaria* spp, d) Incidencia de manchado de semillas de mayor tamaño y e) Peso de 1000 semillas .

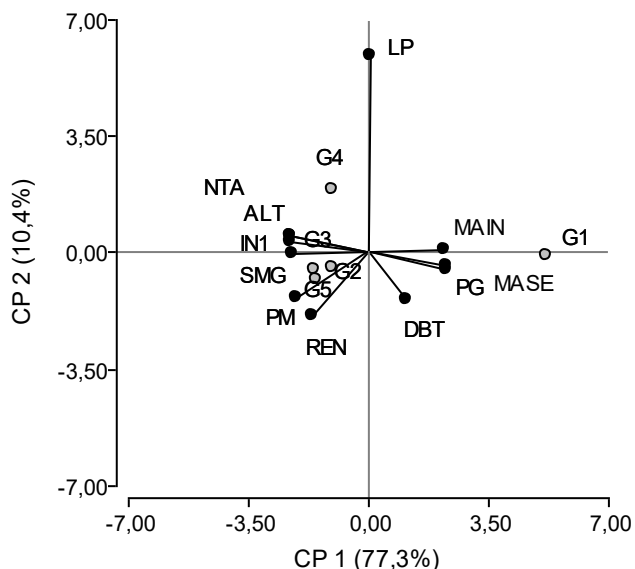


Figura 3.8. Biplot de genotipos de amaranto en función de las variables evaluadas en la campaña 2013-2014.

MAIN: Área bajo la curva de progreso de la incidencia de manchas foliares; MASE: Área bajo la curva de progreso de la severidad de manchas foliares; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en granos por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Poder germinativo; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm. G1: genotipo de ciclo corto y G2 a G5: Genotipos de ciclo largo.

3.4.9.1.3 Análisis de Conglomerados o cluster

En el dendrograma asociado a las variables evaluadas en las tres etapas (Fig. 3.9) se observan dos grupos, uno integrado por el genotipo de ciclo precoz y el segundo por los genotipos de ciclo largo .

A su vez, dentro de este último grupo hay un subgrupo integrado por los genotipos G3 y G5 que son más semejantes entre sí.

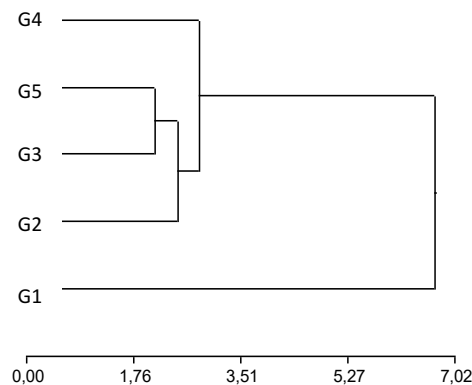


Figura 3.7. Dendrograma asociado a las variables evaluadas en el cultivo en la campaña 2013-2014, según el método jerárquico de agrupamiento promedio (Average linkage o UPGMA). G1: genotipo de ciclo corto y G2 a G5: Genotipos de ciclo largo.

3.4.10. Análisis conjunto de las variables evaluadas en las tres etapas del cultivo

3.4.10.1. Análisis de correlación entre las variables evaluadas en la campaña 2014-2015

En los resultados del primer análisis exploratorio (Tabla 3.9) se observa que el Área bajo la curva de progreso de la incidencia y severidad de manchas foliares evaluadas en la primera etapa están correlacionadas con la mayoría de las variables evaluadas en el resto de las etapas.

Las variables epidemiológicas evaluadas en el follaje, como el Área bajo la curva de progreso de la incidencia y severidad estuvieron correlacionadas con variables evaluadas en semillas como la incidencia de *Alternaria* spp. (IN1) y la incidencia de manchado en semillas de mayor tamaño (SMG) (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Coeficientes de correlación de Pearson de once variables evaluadas en un genotipo de ciclo precoz y cuatro genotipos de ciclo largo de amaranto expuestos naturalmente a la infección con *Alternaria* spp. en la localidad de Llavallol, Buenos Aires, en la campaña 2014-2015.

	MAIN	MASE	ALT	DBT	LP	NTA	REN	PM	PG	IN1	SMG
MAIN	1,00										
MASE	0,99 **	1,00									
ALT	-0,96 **	-0,96 *	1,00								
DBT	-0,96 **	-0,98 **	0,94 *	1,00							
LP	-0,73 ns	-0,71 ns	0,88 *	0,74 ns	1,00						
NTA	-0,97 **	-0,97 **	1,00 **	0,96 *	0,86 *	1,00					
REN	-0,88 *	-0,89 *	0,79 ns	0,8 ns	0,41 ns	0,79 ns	1,00				
PM	-0,01 ns	-0,13 ns	0,22 ns	0,19 ns	0,43 ns	0,24 ns	-0,06 ns	1,00			
PG	0,91 ns	0,95 *	-0,93 *	-0,98 **	-0,78 ns	-0,95 *	-0,74 ns	-0,37 ns	1,00		
IN1	-0,96 **	-0,93 *	0,95 *	0,94 *	0,81 ns	0,95 *	0,71 ns	-0,01 ns	-0,88 *	1,00	
SMG	-0,85 *	-0,81 ns	0,68 ns	0,78 ns	0,31 ns	0,69 ns	0,82 ns	-0,46 ns	-0,64 ns	0,8 ns	1,00

MAIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia de manchas foliares; MASE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad de manchas foliares; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en semillas por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Germinación de semillas; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm.

3.4.10.2. Análisis de componentes principales

Los dos primeros componentes explican el 94 % de la variabilidad total de las medias de las once variables (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Contribución de los dos primeros componentes principales a la variabilidad total (campaña 2014-2015).

CP	VP	PE	Pa
CP1	8,66	0,79	0,79
CP2	1,67	0,15	0,94

CP: componente principal; CP1: componente principal 1, CP2: componente principal 2; Vp: Valores propios; PE: Proporción de varianza explicada por cada componente principal; Pa: Proporción acumulada.

En la Tabla 3.11, se observa la relación entre los dos componentes principales y las variables analizadas.

Tabla 3.11. Correlaciones entre los componentes principales y las variables evaluadas en la campaña 2014-2015.

VAR	CP1	CP2
MAIN	0,99	0,13
MASE	0,99	0,04
ALT	-0,98	0,12
DBT	-0,98	0,03
LP	-0,79	0,47
NTA	-0,99	0,13
REN	-0,84	-0,29
PM	-0,14	0,94
PG	0,95	-0,21
IN1	-0,96	-0,07
SMG	-0,78	-0,61

MAIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia de las manchas foliares; MASE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad de manchas foliares; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en granos por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Germinación de semillas; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm. Correlación cofenética= 0,995.

El primer componente se correlacionó en forma positiva con el área bajo la curva de progreso de la incidencia, la severidad de manchas foliares y el poder germinativo. En forma negativa con la altura de plantas a cosecha, diámetro basal de tallo a cosecha, largo de panoja, incidencia de hojas afectadas por manchas foliares y tizón foliar a cosecha, rendimiento en semillas, peso de 1000 semillas, incidencia de *Alternaria* spp. en semillas e incidencia del manchado de semillas de mayor tamaño. El segundo componente se correlacionó positivamente con peso de mil semillas (Tabla 3.11).

En la Fig. 3.10 se observa la representación gráfica del análisis de los componentes principales, en la cual puede observarse que el primer componente diferenció al genotipo de ciclo precoz de los genotipos de ciclo largo.

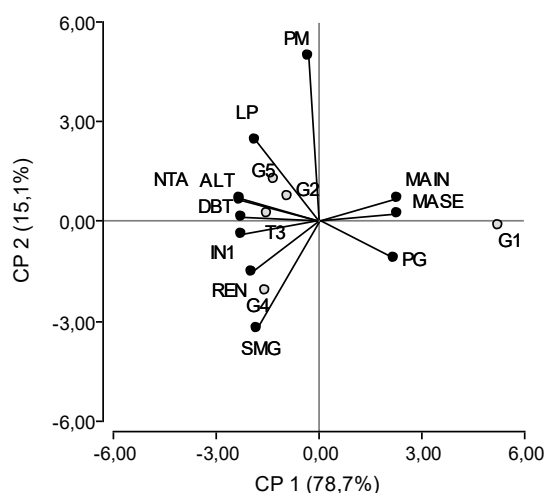


Figura 3.10. Biplot de genotipos de amaranto en función de las variables evaluadas en las tres etapas: monitoreo de las lesiones foliares en la etapa de cultivo, cosecha y post-cosecha, campaña 2014-2015.

MAIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia de manchas foliares; MASE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad de manchas foliares; ALT: Altura de planta a cosecha; DBT: diámetro basal de tallo a cosecha; LP: Largo de panoja; NTA: Incidencia de hojas afectadas por lesiones causadas por *Alternaria* spp. a la cosecha; REN: Rendimiento en granos por metro cuadrado; PM: Peso de 1000 semillas; PG: Poder germinativo; IN1: Incidencia de semillas contaminadas por *Alternaria* spp.; SMG: Incidencia de manchado en semillas con un diámetro ≥ 1 mm. Correlación cofenética= 0,995; G1: genotipo de ciclo corto y G2 a G5: Genotipos de ciclo largo.

El genotipo de ciclo precoz en relación a los genotipos de ciclo largo registró el mayor Área bajo la curva de progreso de la incidencia y severidad de manchas foliares, y mayor poder germinativo de las semillas, y menor altura de planta a cosecha diámetro basal de tallo, largo de panoja, rendimiento, peso de 1000 semillas y menor e incidencia de *Alternaria* spp. en semillas y de manchado en las semillas de mayor tamaño.

3.4.10.3. Análisis de conglomerados campaña

En el dendrograma asociado a las variables evaluadas en las tres etapas (cultivo, cosecha y post-cosecha), construido según el método de Encadenamiento Promedio (UPGMA) con distancia Euclídea en la campaña 2014-2015 se observa que los cinco genotipos se han separado en dos grupos (Fig. 3.11).

El primer grupo está integrado por el genotipo de ciclo precoz y el segundo por los genotipos de ciclo largo G2, G4 y G5, G3 y dentro de este grupo se separa un subgrupo que está integrado por los genotipos G2 y G5 (Fig. 3.11).

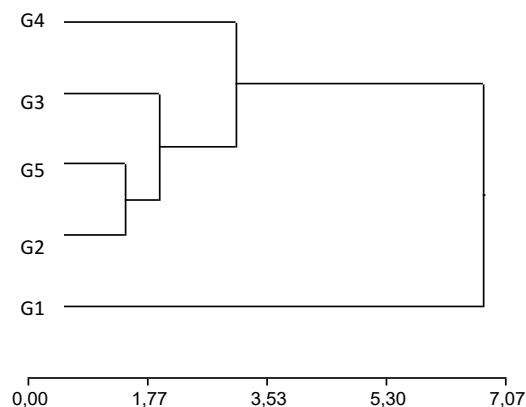


Figura 3.11. Dendrograma asociado a las variables evaluadas en las tres etapas (cultivo, cosecha y post-cosecha), construido según el método de Encadenamiento Promedio (UPGMA) con distancia Euclídea; campaña 2014-2015. G1: genotipo de ciclo precoz, G2 a G5: genotipos de ciclo largo.

3.4.11. Análisis de la varianza para cada una de las variables y separación de medias en conjunto en las campañas 2013-2014 y 2014-2015

3.4.11.1. Interacciones significativas entre genotipos y campañas

3.4.11.2. Area bajo la Curva de progreso de la severidad de manchas foliares

El análisis de la varianza mostró heterogeneidad entre las mismas, por ese motivo se utilizó un análisis de varianza empleando modelos mixtos.

El resultado del análisis de modelos mixtos, mostró interacción significativa entre genotipos y campañas ($F=15,16$; $p<0,0001$) en consecuencia se analizaron los promedios de los genotipos en cada campaña.

En las dos campañas se registraron diferencias significativas entre los genotipos de distinto ciclo (Fig. 3.12) registrando el genotipo precoz los valores mas altos de severidad.

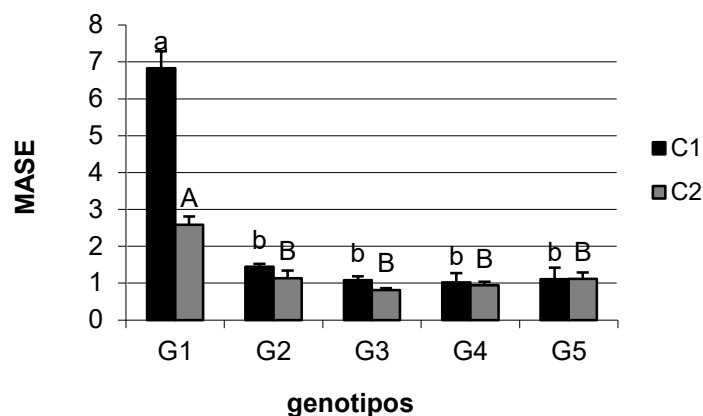


Figura 3.12. Promedio del Área bajo la curva de progreso de la severidad de manchas aisladas, (MASE±SE) en cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: promedio de la campaña 2013-2014; C2: promedio de la campaña 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.4.11.3. Poder germinativo

El análisis de la varianza mostró interacción significativa entre genotipos y campañas ($F=13,99$, $p < 0,0006$).

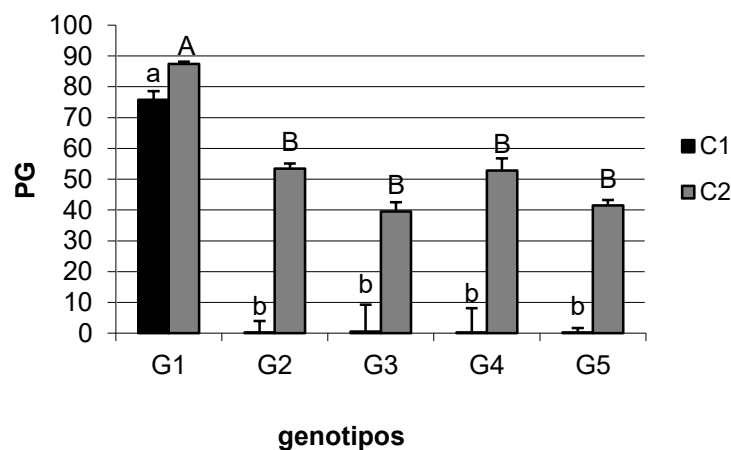


Figura 3.13. Promedio del porcentaje de germinación (PG±SE) en semillas de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

En la primera campaña, el porcentaje de germinación fue de 75,75 % para el genotipo de ciclo precoz y de 0,32 % el promedio de los genotipos de ciclo largo (Fig. 3.13). Por el contrario, en la segunda campaña, el porcentaje de germinación fue de

87,41 % para el genotipo de ciclo precoz y 46,81 % el promedio de los genotipos de ciclo largo (Fig. 3.13).

3.4.11.4. Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas

Los resultados de la incidencia de *Alternaria* spp. en semillas (IN1), mostraron interacción significativa entre los genotipos y las campañas (F: 433,84, $p < 0,0001$).

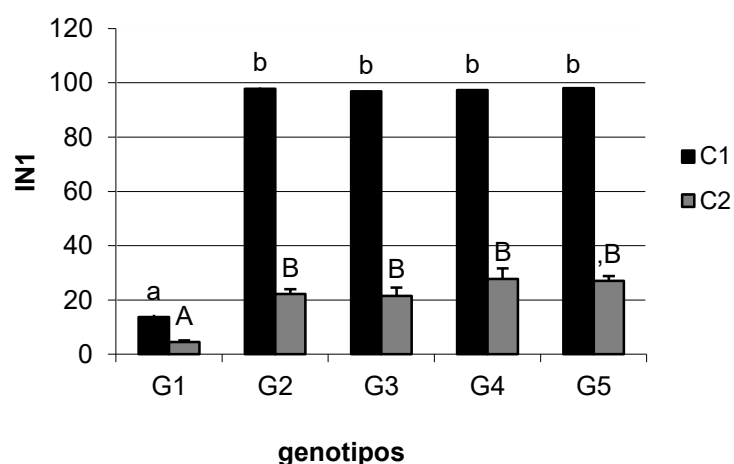


Figura 3.14. Promedio de incidencia de *Alternaria* spp. en semillas (IN1±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

En la primera campaña, el porcentaje de incidencia de *Alternaria* spp. en semillas fue de 13,67 % para el genotipo de ciclo precoz y 97,54 % el promedio para los genotipos de ciclo largo (Fig. 3.14).

En la segunda campaña todos los genotipos registraron una menor incidencia de *Alternaria* spp. en las semillas. Los genotipos de ciclo largo registraron en promedio una incidencia de 24,63 %, diferenciándose del genotipo de ciclo precoz de tan solo 4,47 % (Fig. 3.14).

4.11.5. Incidencia del manchado en semillas de mayor tamaño

El análisis de la varianza para el manchado de las semillas de mayor tamaño detectó heterogeneidad de varianzas, razón por lo cual, se utilizó un análisis de varianza de modelos mixtos. Los resultados mostraron interacción significativa entre genotipos y

campañas ($F=323,8$; $p<0,0001$), en consecuencia se analizaron los promedios de los genotipos en cada una de las campañas (Fig. 3.15).

En la campaña 2013-2014 se observó una diferencia notoria en el porcentaje de incidencia de semillas manchadas de mayor tamaño en los genotipos de ciclo largo promedio (43,40 %), con respecto a la escasa incidencia de semillas manchadas del genotipo de ciclo precoz (1,33 %).

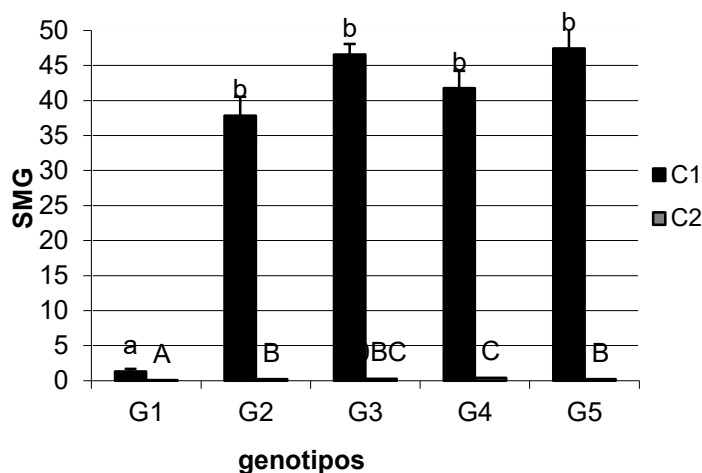


Figura 3.15. Promedio de incidencia del manchado en semillas de mayor tamaño, ($SMG \pm SE$) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015; Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

En cambio, en la campaña, 2014-2015, todos los genotipos registraron una escasa incidencia de semillas manchadas.

En ambas campañas el genotipo precoz registró la menor incidencia de manchado de las semillas.

3.4.11.6. Largo de la panoja

El análisis de la varianza detectó heterogeneidad de varianzas por ese motivo se utilizó un análisis de varianza de modelos mixtos.

Los resultados mostraron interacción significativa entre genotipos y campañas ($F=8,64$; $p>0,0002$), en consecuencia se analizaron los promedios de los genotipos en cada una de las campañas (Fig. 3.16).

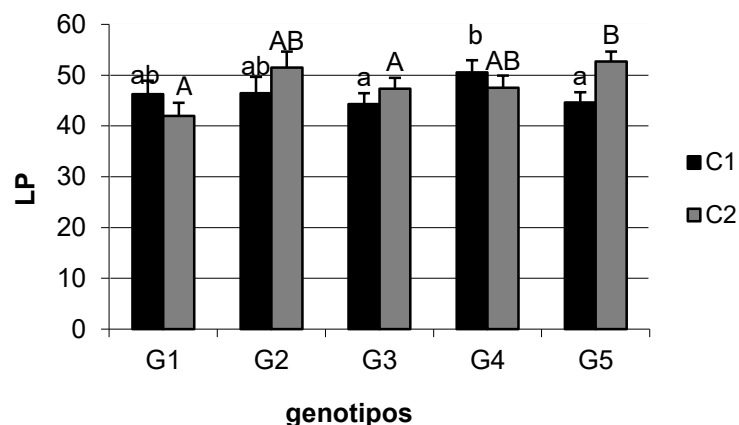


Figura 3.16. Valores promedio de largo de panoja (LP±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015; Letras iguales indican diferencias no significativas.

En la primer campaña el genotipo de ciclo largo G4 se diferenció del resto de los genotipos por tener mayor tamaño de panojas. En cambio, en la segunda campaña el genotipo G5 fue el que tuvo mayor tamaño de panoja.

3.4.11.7. Incidencia del manchado en semillas de menor tamaño

El análisis de la varianza señaló heterogeneidad de varianzas, razón por lo cual, se utilizó el análisis de la varianza de modelos mixtos. Los resultados mostraron interacción significativa entre genotipos y campañas ($F=115$; $p<0,0001$), en consecuencia se analizaron los promedios de los genotipos en cada una de las campañas (Fig. 3.17).

En la primer campaña las semillas del genotipo de ciclo precoz fueron las menos afectadas y entre las semillas de los genotipos de ciclo largo las menos afectadas fue las del genotipo G2.

En la segunda campaña el manchado en las semillas de menor tamaño de todos los genotipos no tuvo mayor incidencia (<3 %) registrándose diferencias significativas entre el genotipo de ciclo largo G2 y los genotipos G1 y G5. (Fig. 3.17).

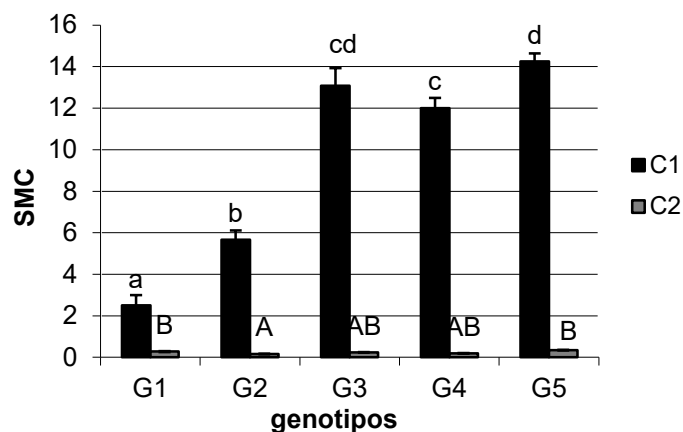


Figura 3.17. Promedio de la Incidencia del manchado en semillas de menor tamaño, (SMC±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo); C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.4.11.8. Diámetro basal del tallo a la cosecha

El análisis de la varianza mostró interacción significativa entre genotipos y campañas ($F=10,73$; $p < 0,0002$), en consecuencia se analizaron los promedios de los genotipos en cada una de las campañas (Fig.3.18).

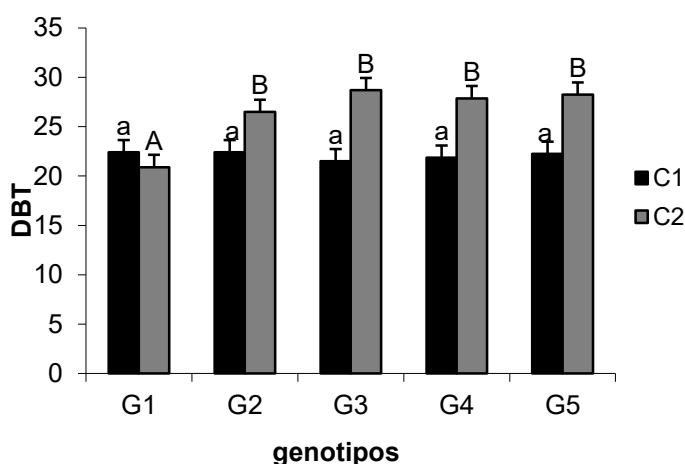


Figura 3.18. Promedio del diámetro basal de tallo: (DBT±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C1: campaña 2013-2014; C2: campaña 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

En la campaña 2013-2014 no se registraron diferencias entre los genotipos de distinto ciclo. En cambio, en la segunda campaña (2014-2015), los genotipos de ciclo largo

registraron mayor diámetro basal de tallo diferenciándose del genotipo de ciclo precoz que tuvo un diámetro menor (Fig. 3.18).

3.4.11.9. Area bajo la Curva de progreso de la incidencia de manchas foliares

El análisis de la varianza mostró interacción no significativa entre genotipos y campañas ($F=1,94$; $p>0,152$) y diferencias significativas entre las medias de los genotipos.

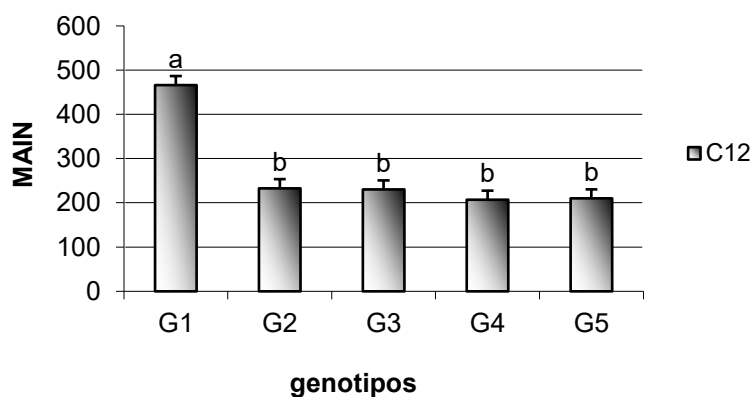


Figura 3.19. Promedio de Incidencia de manchas aisladas (ABCPE) MAIN \pm SE, en cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C12: Promedio de las campañas 2013-2014 y 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

Los genotipos de ciclo largo registraron una menor ABCPE (220,32), diferenciándose del genotipo precoz (466,61) (Fig. 3.19).

3.4.11.10. Altura de planta a cosecha

El análisis de la varianza mostró interacción no significativa entre genotipos y campañas ($F=2,17$; $p=0,11$) y diferencias entre las medias de los genotipos ($p>0,0001$).

Los genotipos de ciclo largo alcanzaron en las dos campañas, la mayor altura promedio (261,63 cm), diferenciándose significativamente del genotipo de ciclo precoz (157,29 cm) (Fig. 3.20).

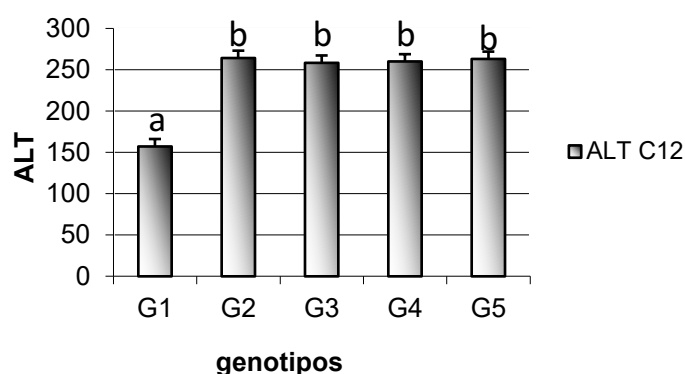


Figura 3.20. Promedio de altura de la planta a cosecha (ALT±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo, C12 Promedio de las dos campañas. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.4.11.11. Incidencia de manchas y/o tizón foliara la cosecha

El análisis de la varianza mostró heterogeneidad de varianzas, por ese motivo se utilizó un análisis de varianza empleando modelos mixtos.

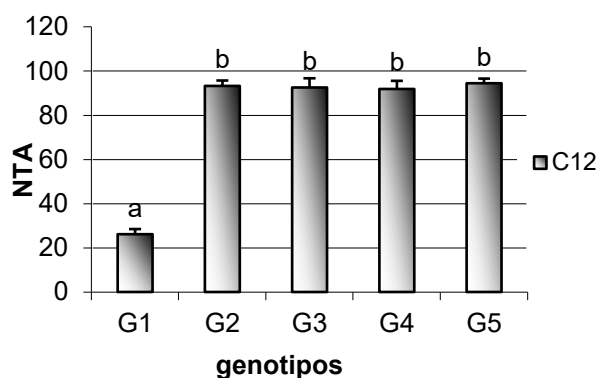


Figura 3.21. Promedio de Incidencia de manchas y/o tizón foliar al momento de la cosecha (NTA±SE) en cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C12 Promedio de las campañas 2013-2014 y 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Los resultados señalaron interacción no significativa entre genotipos y campañas ($F=0,49$; $p > 0,74$) y diferencias entre las medias de los genotipos ($p < 0,0001$). El genotipo de ciclo precoz registró en promedio de las dos campañas la menor incidencia de lesiones

foliares al momento de la cosecha (26,15 %) diferenciándose de los genotipos de ciclo largo, que en promedio registraron una incidencia del 93,05 %.

3.4.11.12. Rendimiento en semillas por metro cuadrado

El análisis de la varianza detectó heterogeneidad de varianzas, por ese motivo se utilizó un análisis de varianza empleando modelos mixtos.

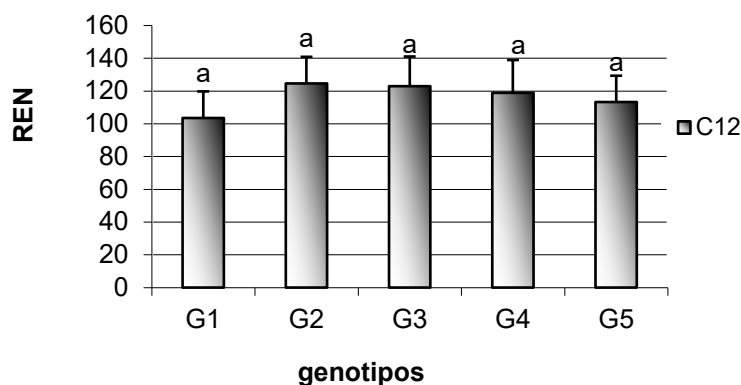


Figura 3.22. Promedio de rendimiento de semillas por metro cuadrado (REN±SE) de cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C12 Promedio de las campañas 2013-2014 y 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Los resultados mostraron interacción no significativa entre genotipos y campañas ($F=0,61$; $p > 0,66$) como entre genotipos ($p > 0,06$) y diferencias significativas entre campañas ($p > 0,0002$) (Fig. 3.22).

Si bien no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos, se observan mayores rendimientos en valores absolutos para los genotipos de ciclo largo que, en promedio tuvieron un rendimiento de $119,91 \text{ g/m}^2$ en relación al genotipo de ciclo precoz de $103,51 \text{ g/m}^2$; es decir un incremento del 15,85 %.

3.4.11.13. Peso de 1000 semillas

El análisis de la varianza señaló interacción no significativa entre genotipos y campañas ($F=1,7$; $p > 0,198$) como entre campañas ($p=0,39$) y diferencias significativas entre genotipos ($p > 0,038$). Según la prueba de Tukey se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de ciclo largo G4 y G5 (Fig. 3.23).

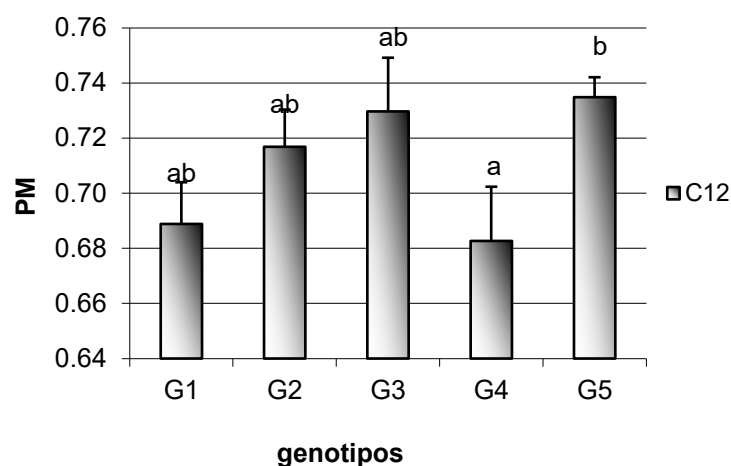


Figura 3.23. Promedio del Peso de 1000 semillas de genotipos de amaranto \pm error estándar en cinco genotipos de amaranto.

G1: genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; C12 Promedio de las campañas 2013-2014 y 2014-2015. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.4.12. Análisis de metabolitos secundarios en semillas de amaranto

Los principales metabolitos hallados en semillas de amaranto en ambas campañas son el ácido tenuazónico y la tentoxina, hallándose en mayor concentración en semillas de genotipos de amaranto de ciclo largo (Tabla 3.12, Tabla 3.13).

En la campaña 2013-2014, se observa una diferencia notoria en el contenido de las toxinas analizadas entre el genotipo de ciclo precoz y los genotipos de ciclo largo, tanto en semillas grandes como en semillas chicas (Tabla 3.12). Los metabolitos alternariol; monometil éter y ácido tenuazónico se registraron en mayor concentración en semillas de mayor tamaño de los genotipos de ciclo largo a diferencia de las semillas de mayor tamaño del genotipo de ciclo precoz que tuvieron una escasa a nula contaminación (Tabla 3.12).

Por el contrario, en la campaña 2014-2015 fue escasa o nula la presencia de micotoxinas en semillas manchadas de distinto tamaño siendo la única excepción la tentoxina y el ácido tenuazónico que estaban presentes en mayor concentración que el resto de los metabolitos (Tabla 3.13).

Tabla 3.12. Concentración de metabolitos fúngicos secundarios o micotoxinas hallados en semillas de amaranto de diferente tamaño, de un genotipo de ciclo corto y cuatro genotipos de ciclo largo; cultivados en Llavallol, Buenos Aires, durante 2013-2014.

G	DIA	MICOTOXINAS ($\mu\text{g/g}$)				
		AOH	AME	ALTX-I	TEN	TeA
G1	SMG	<LOD	<LOD	<LOD	22	<LOD
G2	SMG	56,3	105	6,23	45	281
G3	SMG	84,2	119	11,94	34	556
G4	SMG	150	137	11,34	62	398
G5	SMG	79,2	122	9,47	67	356
G1	SMC	0,23	0,36	<LOD	17	62
G2	SMC	7,37	3,24	1,95	44	245
G3	SMC	6,3	11,7	2,48	43	197
G4	SMC	7,44	12,9	2,2	61	77
G5	SMC	10,2	24,6	1,9	67	220

<LOD* ($\mu\text{g/g}$) 0,0001 0,0002 0,0015 1E-04 0,1091

* Valores determinados para el límite de detección ($\mu\text{g/g}$) para maíz siguiendo la guía EURACHEM (Sulyok et al., 2020).

Tabla 3.13. Concentración de metabolitos fúngicos secundarios o micotoxinas hallados en semillas de amaranto de diferentes tamaños, de un genotipo de ciclo precoz y cuatro de ciclo largo cultivados en Llavallol, Buenos Aires en la campaña 2014-2015.

G	DIA	MICOTOXINAS ($\mu\text{g/g}$)				
		AOH	AME	ALTX 1	TEN	TeA
G1	SMG	0,72	1,07	<LOD	5,9	<LOD
G2	SMG	0,75	1,85	<LOD	164	11
G3	SMG	0,5	2,48	<LOD	177	27
G4	SMG	0,49	0,58	<LOD	151	25
G5	SMG	<LOD	0,03	<LOD	119	12
G1	SMC	3,31	1,00	<LOD	0,2	64
G2	SMC	<LOD	<LOD	<LOD	76	8,6
G3	SMC	<LOD	0,03	<LOD	132	16
G4	SMC	<LOD	0,15	<LOD	77	17
G5	SMC	<LOD	<LOD	0,82	136	19

<LOD * ($\mu\text{g/g}$) 0,0001 0,0002 0,0015 0,0001 0,1091

G: genotipos de amaranto; G1 genotipo de ciclo precoz; G2 a G5: genotipos de ciclo largo; DIA: Diámetro de semillas; SMG: $\geq 1\text{mm}$; SMC: $\leq 1\text{mm}$; AOH: alternariol; AME: monometil éter; ALTX I: altertoxina I; TEN: tentoxina; TeA: ácido tenuazónico; <LOD: Menor al límite detectable. Valores determinados para límite de detección ($\mu\text{g/g}$) para maíz siguiendo la guía EURACHEM (Sulyok et al., 2020).

3.5. DISCUSION

3.5.1. Análisis sanitario de semillas de amaranto

Entre los microorganismos fúngicos aislados en semillas de amaranto, *A. alternata* fue el principal patógeno contaminante. Resultados similares fueron hallados en Argentina por nuestro grupo de investigación (Noelting et al., 2004) y por otros autores en Nueva Zelanda, México y Polonia. (Bartolini y Hampton, 1989; Moreno-Velazquez et al., 2005; Pusz, 2009a).

El manchado que afecta a las semillas de amaranto es probable que se produzca en distintas áreas cultivadas de Argentina como en otras partes del mundo. La falta de antecedentes sobre esta patología en semillas de amaranto podría deberse a la dificultad en la detección de la misma a simple vista, debido al reducido tamaño de las semillas.

3.5.2. Determinación del agente etiológico responsable del manchado de semillas

Las pruebas de patogenicidad realizadas permitieron determinar que *A. alternata* es responsable de producir el manchado de las semillas de amaranto, reducir la germinación e incrementar el número de plántulas anormales en un 47,5 %, lo cual confirmaría el carácter patógeno de este microorganismo.

En los ensayos de transmisión, realizados con semillas de amaranto previamente desinfectadas e inoculadas con *A. alternata*, desarrollaron plántulas con diversos síntomas que se evidenciaron en forma de pudrición en el sistema radicular, clorosis, canchros en hipocótilos, manchas y tizones en cotiledones y hojas verdaderas, resultando la tasa de transmisión superior al 30 % (datos no publicados). Estos resultados demostrarían la importancia epidemiológica de las semillas de amaranto como fuente de inóculo de *A. alternata*.

3.5.3. Daños en semillas y plántulas

3.5.3.1. Germinación

La menor germinación de las semillas manchadas, es probable que se produzca por la elevada concentración de micotoxinas como el alternariol, monometil éter y el ácido tenuazónico que afectaría al embrión (Tabla 3.4). Resultados similares fueron reportados en otras especies por varios autores (Tylkowska et al., 2003; Patriarca et al., 2007; Meena et al., 2017a y b).

Según Tylkowska et al. (2003); Patriarca et al. (2007); Meena et al. (2017a y b), el alternariol monometil éter y el ácido tenuazónico serían las principales micotoxinas que

afectarían la germinación de las semillas en distintas especies, siendo el daño mayor cuanto más tiempo están expuestas las semillas a las mismas.

Esta puede ser una de las razones, por lo cual en la primera campaña y muy especialmente en las semillas de ciclo largo, hayan registrado una disminución notable de su poder germinativo.

Según Hassan (1999), los hongos de las semillas reducen la germinación debido a que producen toxinas que dañan al embrión y Tylkowska et al. (2003) menciona que en semillas de especies cultivadas el ácido tenuazónico es una de las principales micotoxinas que afectaría la germinación de las semillas de zanahoria.

Witsenboer et al. (1998); Li et al. (2001); Scott (2001) hallaron que las micotoxinas alternariol, alternariol monometil éter, altenueno, altertoxinas I, II, III y el ácido tenuazónico producido por *A. alternata* afectaba a las hojas, brotes, callos, suspensiones de células y protoplastos.

3.5.3.2. Anormalidades en las plántulas

Las anormalidades en plántulas producidas por los hongos transmitidos por las semillas son muy comunes y a menudo responsables de grandes pérdidas en los cultivos (Varshney, 1990).

Las hipertrofias en los tejidos seminales de las semillas de amaranto observadas estarían asociadas a metabolitos secundarios producidos por *A. alternata*. Según Knoche y Duvick, (1987), la mayoría de las toxinas producidas por *Alternaria* tienen bajo peso molecular y pueden causar cambios fisiológicos y patológicos en el huésped por inducir mutaciones e intoxicaciones citológicas (Patriarca et al., 2007; Meena et al., 2018; Ramirez et al., 2018), siendo el ácido tenuazónico la toxina que produciría el mayor porcentaje de daño celular (Pavon Moreno et al.; 2012, Meena et al., 2017a y b; Ramirez et al., 2018).

Es posible, que los cambios morfológicos (hipertrofias) observados en el embrión y perisperma de las semillas manchadas de amaranto sean el resultado del accionar de las micotoxinas producidas por *A. alternata*, teniendo efectos perjudiciales sobre la germinación (Perelló et al., 2015) induciendo el desarrollo anormal de las plantas (Herrera Parra et al., 2011).

3.5.4. Poder germinativo de las semillas de amaranto vs incidencia de *Alternaria alternata*

Las semillas de amaranto inoculadas con *A. alternata* presentaron síntomas de manchado de sus cubiertas seminales, una disminución en la germinación y un incremento en las anormalidades de las plántulas de hasta un 59 %.

Correlaciones negativas entre el poder germinativo y la incidencia de *A. alternata* han sido reportados en semillas de tabaco por Ishizuka et al. (2018).

La pérdida de viabilidad de las semillas manchadas, registrada en el presente estudio, pone en evidencia la necesidad de realizar análisis sanitarios previos en lotes de semillas destinados a la producción del cultivo (Lee et. al., 2015).

3.5.5. Técnica para inducir el manchado en forma artificial en las semillas de amaranto

La aplicación de una nueva técnica para reproducir el manchado en las semillas de amaranto que consistió en pregerminar a las mismas, exponerlas posteriormente a -20 °C para evitar la germinación y sembrarlas sobre colonias de *A. alternata* fue muy efectiva. Por un lado evitó que la germinación interfiriera en el proceso del manchado y por el otro, las semillas inoculadas con *A. alternata* reprodujeron los síntomas del manchado y las hipertrofias en los tejidos seminales, similares a las observadas en forma natural, lo cual confirmaría que *A. alternata* es uno de los principales microorganismos que ocasiona el manchado de las semillas de amaranto.

3.5.6. Componentes del plaqueo de semillas en amaranto

La separación y análisis de los componentes de las semillas de amaranto en episperma, perisperma y embrión permitió confirmar la presencia de *Alternaria* spp. en los distintos componentes (Tabla 3.1), siendo notoria la menor diversidad de microorganismos en las semillas normales en comparación con las manchadas ya sea en forma natural o artificial por inoculación con *A. alternata*.

En las semillas normales se observaron distintos microorganismos en el episperma, y una relación relativamente baja de *Alternaria* spp. en comparación con las semillas manchadas. Es posible, que la menor incidencia de *Alternaria* spp. en el episperma de las semillas de apariencia normal, pueda relacionarse con la presencia de *C. globosum* Kunze ex Fr. y de *E. nigrum* Link, microorganismos reportados por Larran (2016) y Moya et al. (2016), por sus efectos antagónicos sobre los microorganismos patógenos.

3.5.7. Análisis histopatológico de las estructuras de las semillas normales y manchadas natural y artificialmente

Las hipertrofias observadas en el embrión y perisperma de las semillas manchadas naturalmente, estarían asociadas con una infección más severa de *Alternaria* spp. con mayor producción de micotoxinas, especialmente si se dan condiciones de alta humedad durante la formación del grano (Meena et al., 2017a y b; Ramires et al., 2018).

En las semillas manchadas artificialmente, se observó una mayor concentración de conidios de *A. alternata* próximos a la región hilar, lo que hace suponer que sería esta región uno de los sitios propicios para el ingreso y colonización de los tejidos seminales por el patógeno.

De los resultados obtenidos se pudo inferir que: i) la infección por *A. alternata* puede producirse en las primeras etapas de desarrollo de la semilla o con posterioridad al desarrollo de las mismas, ii) *Alternaria alternata* es un hongo contaminante e infeccioso, siendo las semillas una de las fuentes de inóculo de las patologías foliares (manchas y tizón foliar) que afectan al cultivo de amaranto, iii) los análisis histopatológicos y de componentes de plaqueo realizados permitieron determinar la presencia de propágulos de *A. alternata* en todos los tejidos seminales de las semillas manchadas en forma artificial.

Estos resultados son coincidentes a los hallados por Agrawal et al. (1987) en granos de trigo afectados por el escudete negro.

Con respecto al cultivo, producción y consumo del amaranto en Argentina, es de suma importancia la aplicación de estrategias que permitan reducir la concentración de metabolitos secundarios producidos por *Alternaria* spp. tanto en el cultivo como en la producción de las semillas, especialmente si se destina para consumo humano o animal.

3.5.8. Metabolitos secundarios en semillas de amaranto

El tipo y concentración de los metabolitos hallados en semillas de aspecto normal de *A. mantegazzianus*, se encuentran dentro del mismo rango que los mencionados por Biasi et al. (2013), en semillas de especies cultivadas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

En relación al análisis micológico de las semillas, la mayor concentración de ácido tenuazónico en las semillas manchadas artificialmente podría estar asociado con el método de inoculación utilizado, el cual habría favorecido la rápida colonización de las semillas por el hongo.

Teniendo en cuenta, que las especies de *Alternaria* spp. pueden producir más de 70 metabolitos secundarios tóxicos, algunos de los cuales lo son para los mamíferos y aves

(micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas) y, considerando los últimos informes de EFSA donde se debe tener en cuenta la toxicidad de las mismas para la salud humana, el manchado que afecta las semillas de amaranto, sería una enfermedad a tener en cuenta sobre todo con el incremento de su consumo en la dieta macrobiótica.

La exposición a las toxinas de *Alternaria* se ha relacionado con la aparición de efectos adversos para la salud en personas y animales y en muchos casos, se ha demostrado que tienen capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica, citotóxica y alergénica (Pavon et al., 2012; Ramirez et al., 2018).

La necesidad de establecer estrategias o métodos que permitan reducir la contaminación por metabolitos secundarios (micotoxinas) en semillas de amaranto y establecer una norma para los mismo en Argentina, han sido sugeridos por Biasi et al. (2013) y Noelting et al. (2016), sobre todo teniendo en cuenta las últimas normativas de EFSA.

3.5.9. Relación entre la presencia de micotoxinas y las condiciones ambientales

La diferencia en la concentración de toxinas en las dos campañas analizadas puede haber estado influenciada por las condiciones ambientales que fueron muy diferentes entre sí. En términos generales todos los genotipos en la primera campaña estuvieron expuestos a un mayor régimen pluviométrico registrando una mayor concentración de micotoxinas en sus semillas en relación a la segunda campaña que fue menos lluviosa (Fig. 3.7 y Tabla 3.5).

Si se tiene en cuenta el ciclo de cultivo de los genotipos de amaranto, se observa que en la primera campaña, los genotipos de ciclo largo recibieron 763 mm y la concentración en promedio de micotoxinas en las semillas fue 672,90 µg/kg en relación al genotipo de ciclo precoz que recibió una precipitación 481,40 mm resultado la concentración de micotoxinas de 21,85 µg/kg es decir 30 veces inferior a la concentración registrada en las semillas de genotipos de ciclo largo.

Sin embargo, en la segunda campaña los genotipos de ciclo largo recibieron 205,56 mm registrando en promedio una concentración de micotoxinas en las semillas de 174,11 µg/kg en relación al genotipo de ciclo precoz que recibió 140,70 mm conteniendo sus semillas una concentración de micotoxinas de 6,93 µg/kg. Es decir, que las semillas del genotipo de ciclo precoz, tuvieron un nivel de micotoxinas que fue de 25 a 30 veces inferior a la concentración total de micotoxinas de los genotipos de ciclo largo.

Es importante señalar, que si bien las condiciones climáticas fueron diferentes entre las campañas, la calidad de las semillas del genotipo de ciclo precoz fue superior a las semillas de los genotipos de ciclo largo. La mejor calidad fisiológica y sanitaria de las semillas del genotipo precoz en relación al resto de los genotipos de ciclo largo, podría ser atribuida a las condiciones ambientales de mayor radiación, mayor temperatura y menor humedad registrada durante la etapa de formación a cosecha de las semillas en ambas campañas.

3.5.10. Micotoxinas en semillas de distinto tamaño

La contaminación por micotoxinas en las semillas de amaranto de los genotipos de ciclo largo fue más elevada en las semillas de mayor tamaño.

Los cambios de concentración de micotoxinas según el tamaño de las semillas en los genotipos de ciclo largo, podría deberse a que las semillas estuvieron expuestas a condiciones de mayor humedad por un período más prolongado, lo cual favoreció la colonización de *Alternaria* spp. produciendo mayor cantidad de micotoxinas. Resultados similares fueron obtenidos por Meena et al. (2017a y b). En el genotipo de ciclo precoz, las semillas de mayor tamaño fueron menos afectadas por micotoxinas en relación a las de menor tamaño.

3.5.11. Acido tenuazónico asociado al manchado de semillas

El ácido tenuazónico fue el metabolito que se registró en mayor concentración en la campaña mas húmeda (2013-2014) en la cual en forma coincidente las semillas registraron un mayor incidencia de manchado, resultados que son coincidentes con los reportados previamente (Noelting et al., 2016). La elevada incidencia del manchado y de contenido de ácido tenuazónico sugiere que esta micotoxina podría estar involucrada en el manchado de las semilla y que afecte el poder germinativo de las mismas (Meena et al., 2017a y b).

Si se compara la incidencia de *Alternaria* spp. en semillas, (Fig. 3.14), la incidencia del manchado en semillas de mayor tamaño (Fig.3.15) y el contenido de ácido tenuazónico en ambas campañas en los genotipos de ciclo largo (Tabla 3.12 y Tabla 3.13) se observa que en la primera campaña que registró una precipitación total acumulada de 763,40 mm, hubo mayor incidencia *Alternaria* spp en las semillas, en el manchado de las semillas de mayor tamaño y mayor concentración de ácido tenuazónico.

No ocurrió lo mismo con la tentoxina, aunque en la segunda campaña tuvo mayor concentración en las semillas, el manchado fue menor. Es posible, que los requerimientos ambientales para la producción de tentoxina difieran de los del ácido tenuazónico.

En la actualidad, a nivel mundial no existen límites legales o criterios establecidos para metabolitos secundarios producidos por las especies de *Alternaria* ya que se considera que la contaminación de los productos naturales por este microorganismo no tienen importancia (EFSA, 2011).

3.5.12. Manchas foliares

En los monitoreos realizados en la etapa de crecimiento del cultivo, se observaron manchas foliares, en todos los genotipos. El desarrollo de lesiones foliares podría deberse al accionar de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. Según Chen y Qiang (2017), el ácido tenuazónico estaría involucrado en la producción de las manchas foliares ya que es considerado como un posible herbicida debido a que puede causar manchas pardas a marrones y matar plántulas tanto de mono como dicotiledóneas.

Otro de las micotoxinas detectadas en semillas de amaranto fue la tentoxina, siendo su porcentaje alto en la campaña 2014-2015. Este metabolito fue aislado y caracterizado por Templeton et al. 1967, observando que inducía clorosis en las plantas, por lo que es muy factible que sea el responsable de las plantas cloróticas observadas en algunos ensayos a campo y en condiciones controladas.

El alternariol también fue detectado en semillas de amaranto el cual según Bensassi et al. 2012. afecta la viabilidad de la célula al inducir apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis inducida por el alternariol se produciría por la activación del gen p53 (Bensassi et al., 2012) o por una fragmentación del ADN en células moribundas (Wang et al., 1996).

En cuanto a los valores parciales del Área bajo la Curva de progreso de la incidencia y de la severidad del tizón foliar en forma respectiva, los genotipos de ciclo largo tuvieron valores más bajos que el de ciclo precoz. Esto podría deberse más a un fenómeno de escape de la enfermedad que a una resistencia genética

Los genotipos de ciclo largo, los últimos meses, no tuvieron las condiciones necesarias para la producción de AOH debido a que las temperaturas son más bajas y por lo tanto no se produciría AOH ni se desencadenaría la apoptosis celular (Lee et al., 2015)..

También, podría estar asociada a la característica fisiológica que le confiere a los genotipos de ciclo largo la capacidad de producir mayor cantidad de hojas en relación al

genotipo de ciclo precoz, lo que haría que cuando se evalúan los parámetros de incidencia y severidad esta sea menor que en el genotipo de ciclo precoz.

3.5.13. Estado sanitario de las semillas de genotipos de distinto ciclo

Es posible que las condiciones de mayor humedad a las que estuvieron expuestos los genotipos de ciclo largo en la primera campaña, hayan tenido mayor influencia en el deterioro de las semillas, asociado a mayor incidencia de *Alternaria* spp. con mayor incidencia de manchado; menor poder germinativo y mayor contenido de metabolitos secundarios como el ácido tenuazónico.

Las toxinas producidas por *A. alternata* son fundamentalmente ácido tenuazónico, alternariol y alternariol metil éter, teniendo su producción, una íntima relación con la temperatura, la actividad de agua (a_w) y el tiempo que está expuesto el cultivo a las condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Patriarca et al., 2007; Lee et al., 2015).

Las condiciones óptimas de producción del ácido tenuazónico en cultivos como la soja o el tomate son una a_w de 0,982, una temperatura de 21 a 25 °C durante 21 días. Si la actividad del agua es inferior a 0,954 o tiene un rango de temperatura inferior entre 6 a 15 °C o superior a 30-35 °C, según el cultivo, se desactiva la producción de la micotoxina (Lee et al., 2015).

En el caso del alternariol la producción óptima se produce luego de 28 días expuestos a temperaturas entre 21 a 25 °C y un rango de a_w que oscila entre 0,922 y 0,982 por debajo o encima de esos valores deja de producir. La máxima concentración de alternariol monometil éter se produce con a_w de 0,954 y 35 °C, pudiendo producir hasta una temperatura de 21 °C (Lee et al., 2015).

Pavon Moreno et al. (2012), Meena et al. (2017), Ramires et al. (2018), hallaron que la producción de metabolitos secundarios por parte de *A. alternata*, afectaba la germinación de las semillas lo cual es coincidente con los resultados obtenidos.

En la Tabla 3.6, se observa que la contaminación de las semillas por *Alternaria* spp. se correlacionó en forma positiva y altamente significativa con la incidencia del manchado de semillas para la campaña 2013-2014 (IN1-SMG $r=0,94^{**}$) y de $0,74^{**}$ para la campaña 2014-2015 (Tabla 3.9), lo cual señalaría que *A. alternata* no solamente es un contaminante sino que actuaría también como patógeno, resultados que son coincidentes con los obtenidos en estudios previos (Noelting et al., 2011, 2016).

3.5.14. Calidad sanitaria y fisiológica de las semillas de amaranto asociada a la estructura de la panoja

Otro factor a tener en cuenta, en la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas de amaranto es la estructura de las panojas, la cual puede guardar una estrecha relación con el grado de contaminación de las semillas. Las panojas más densas como las de *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* retienen mayor humedad y son más susceptibles a la colonización por hongos en el campo que las panojas más laxas como las de *A. hypochondriacus* o *A. cruentus*. La concentración total de metabolitos hallados en las semillas de genotipos de ciclo largo de *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* fue más elevada a los hallados en semillas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* (Biasi et al., 2013).

3.5.15. Genotipo de ciclo precoz

La obtención en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina de un genotipo precoz con un ciclo de 79 días a cosecha ha sido sumamente importante ya que mejoró el criterio de selección con un ciclo de siembra a cosecha de 135 a 140 días como máximo en lugar de 179 días de los de ciclo largo (Espitia, 1992).

La ventaja de los materiales precoces es que pueden incluirse en rotaciones cortas. Por otro lado, la menor altura favorece la cosecha mecánica y reduce el vuelco potencial de las plantas por efecto del viento (Torres Saldaña et al., 2006).

El genotipo precoz produjo semillas de óptima calidad fisiológica y sanitaria, lo cual se vió reflejado en un mayor poder germinativo, menor contaminación por *Alternaria* spp., menor incidencia de manchado y menor concentración de micotoxinas en las semillas.

3.5.16 Análisis de datos

En forma coincidente el análisis de componentes principales y el análisis de la varianza permitieron diferenciar a los genotipos de distinto ciclo a partir de las variables: Area bajo la curva de progreso de enfermedad en base a la incidencia y severidad de las manchas foliares, incidencia de hojas afectadas por manchas y tizón foliar al momento de la cosecha, altura de planta a cosecha y, en semillas por la incidencia de *Alternaria* spp., poder germinativo e incidencia de manchado en semillas de mayor tamaño.

3.6. CONCLUSIONES

- Se reporta por primera vez en Argentina el manchado de semillas como una nueva enfermedad que afecta al cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* producido por *Alternaria alternata*.
- El manchado implica no solo un cambio en la coloración de las semillas, sino también una disminución de la calidad sanitaria y fisiológica, factor relevante a tener en cuenta al decidir las semillas que se utilizarán para la siembra.
- *Alternaria alternata* induce hipertrofias en los tejidos seminales lo cual genera disminución del porcentaje de germinación e incremento de plántulas anormales.
- El ácido tenuazónico fue el metabolito secundario hallado en mayor concentración en las semillas manchadas de amaranto.
- Los genotipos de amaranto evaluados, respondieron de manera diferente a los daños ocasionados por *Alternaria* spp. tanto en el follaje como en las semillas. Los genotipos de ciclo largo tuvieron mayor sanidad en el follaje que el genotipo de ciclo precoz, teniendo este último mejor calidad sanitaria y fisiológica de sus semillas.

CAPITULO IV

4. FITOPLASMOSIS EN EL CULTIVO DE AMARANTO

RESUMEN

En el presente capítulo se analiza una patología del cultivo de amaranto por la cual las plantas manifiestan alteraciones en su crecimiento como: acortamiento de entrenudos, proliferación de brotes y panículas deformes, necrosis del floema y escaso desarrollo radicular. Con el objetivo de determinar la etiología de la patología, la distribución espacio temporal de plantas sintomáticas en el lote y el rol de las semillas en la transmisión se llevó a cabo el presente estudio. La metodología utilizada para su estudio fue: análisis de PCR directo y anidado, análisis de polimorfismos (RFLP) simulada por computadora, análisis filogenético y de transmisión por semillas. En el cultivo las plantas sintomáticas se distribuyeron en forma uniforme registrando una incidencia que osciló entre 49 % a 96 % para la primera y segunda fecha de evaluación. Los hallazgos reportan al *Amaranthus mantegazzianus* como un nuevo huésped para el subgrupo de fitoplasmas 16Sr XIII-A y como un reservorio potencial del patógeno para otras especies cultivadas. La tasa de transmisión por semillas fue del 92 %, valor relevante por lo cual se considera que las semillas infectadas naturalmente constituyen un importante vehículo de diseminación del patógeno, que amenazaría la expansión del cultivo en nuevas áreas geográficas. La detección del fitoplasma *Ca phytoplasma hispanicum* (subgrupo 16Sr XIII-A) en *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* (Pass) Hanelt constituye la primera referencia en este hospedante en Argentina y, la tercera referencia en América siendo transmitido por semillas.

Palabras clave: amaranto, fitoplasma, análisis molecular, transmisión

4.1. INTRODUCCION

En relación a los aspectos fitosanitarios del cultivo de amaranto, además de los hongos y virus, los fitoplasmas se han reportado en México (Rojas-Martínez et al., 2009 y Ochoa-Sánchez et al., 2009) y China (Yang et al., 2011).

Los fitoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes, son patógenos que afectan a más de 1000 especies vegetales, siendo la mayoría dicotiledóneas (Seemüller et al., 2002). Tienen la capacidad de multiplicarse tanto en insectos como en el floema de las plantas ocasionando alteraciones vegetativas en plantas vasculares al habitar en el interior de las células e interferir con el metabolismo de hormonas vegetales ocasionando malformaciones (Lee et al., 2000).

Durante décadas muchas enfermedades de las plantas fueron erróneamente consideradas como causadas por virus, actualmente se conoce que han sido producidas por fitoplasmas (Davis et al., 2016).

Entre los síntomas inducidos por los fitoplasmas se mencionan a clorosis, coloración púrpura de hojas, alta proliferación de brotes, retraso del crecimiento, declinación general, esterilidad de las flores, elongación o acortamiento de entrenudos, filodia y en algunos casos muerte de la planta (Dickinson et al., 2013; Bertaccini et al., 2014).

Las enfermedades ocasionadas por fitoplasmas pueden limitar la producción de los cultivos de importancia económica por el daño que les ocasionan y por la forma de dispersión.

En condiciones naturales, la transmisión de los fitoplasmas ocurre principalmente por insectos vectores, por propagación vegetativa del material infectado y excepcionalmente, a través de las semillas (Cordova et al., 2003).

En relación al cultivo de amaranto, en México, Ochoa-Sánchez et al. (2009) identificaron a *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*, del grupo 16Sr II en plantas de *Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus* que mostraba una coloración inusual de su tejidos además de la proliferación excesiva de tallos y brotes.

También en México, (Rojas-Martínez et al., 2009) identificaron al fitoplasma “*Ca Phytoplasma pruni*” del grupo 16Sr III en plantas de *A. hypochondriacus* que exhibían diversos síntomas como proliferación de panojas, amarillamiento de las hojas, acortamiento de los entrenudos y, en algunas plantas brotes atrofiados.

En el año 2005, en el predio ubicado en la localidad de Llavallol, se observaron plantas de amaranto con alteraciones similares a las reportadas en el presente estudio que fueron atribuidas a efectos ocasionados por herbicidas hormonales.

Sin embargo, en años posteriores se repetían las anormalidades de las plantas de amaranto sin haberse utilizados herbicidas hormonales razón por la cual se consideró que los síntomas manifestados por las plantas podrían ser atribuidos a un fitoplasma.

Teniendo en cuenta la gravedad de los síntomas observados en el cultivo y el escaso conocimiento de la enfermedad en Argentina, se llevó a cabo el presente estudio.

4.2. HPOTESIS DE TRABAJO

- En plantas de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* el agente etiológico que produciría alteraciones en su crecimiento sería un fitoplasma transmitido por semillas.

4.3. OBJETIVOS

4.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el agente etiológico que produce anomalías en plantas de amaranto.

4.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estimar la incidencia de la enfermedad en el cultivo.
- Analizar el patrón de distribución de plantas sintomáticas en el lote.
- Caracterizar al agente etiológico mediante análisis moleculares.
- Realizar estudios filogenéticos del agente etiológico.
- Evaluar la transmisión del agente etiológico por semillas.

4.4. MATERIALES Y METODOS

4.4.1. Lugar del estudio

La investigación se realizó en el año 2016 en un lote de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*, ubicado en la localidad de Llavallol, pcia de Buenos Aires.

4.4.2. Material vegetal.

Se utilizaron muestras de plantas de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* que presentaron alteración generalizada de su crecimiento, acortamiento de entrenudos, proliferación de rebrotes y de panojas axilares, necrosis del floema y escaso desarrollo radicular.

4.4.3. Evaluación de la incidencia y distribución de plantas de amaranto sintomáticas en el cultivo.

La evaluación de la incidencia de plantas sintomáticas se realizó a los 64 y 129 días después de la emergencia del cultivo mediante inspección visual de las plantas.

El porcentaje de incidencia de plantas sintomáticas se calculó utilizando la fórmula:

$$I(\%) = \frac{S}{T} * 100$$

Donde:

I (%): porcentaje de incidencia de plantas sintomáticas.

S: número de plantas sintomáticas.

T: número total de plantas.

4.4.4. Extracción de ADN

Material vegetal:

La extracción del ADN total se realizó a partir de las nervaduras de las hojas de brotes jóvenes de dos plantas sintomáticas (Arg1 y Arg2) y una planta asintomática (Arg5) cultivadas en el campo experimental de Santa Catalina y de dos plantas (Arg3 y Arg4) cultivadas en condiciones controladas (cámara de cultivo) que manifestaron síntomas de la enfermedad. El ADN fue extraído mediante la utilización de un kit de Promega (The Wizard® Genomic DNA Purification), y posteriormente se liofilizó.

4.4.5. Análisis moleculares

Debido a que los síntomas manifestados por las plantas observadas en condiciones de campo, como en condiciones controladas como retraso o alteración en el crecimiento y necrosis de tejidos podrían estar relacionados con la presencia de fitoplasmas, se realizaron los análisis moleculares para su determinación.

El análisis molecular del fitoplasma se realizó a través de la clonación y la secuenciación directa, en la Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; Universidade de São Paulo; Piracicaba, San Pablo, Brasil a cargo del Dr. Ivan Bedendo.

4.4.6. Reacciones de PCR

Para la PCR directa se utilizaron los pares de cebadores universales P1 y P7.

P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'

P7: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'

En el caso de la PCR anidada, se utilizaron los cebadores R16F2n y R16R2.

R16F2n 5'-AAACGACTGCTAAGACTGG-3'

R16R2 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'.

Los cebadores universales P1 y P7 amplificaron 1830 pares de bases mientras que los primers R16F2N y R16R2 amplificaron un producto de 1250 pares de bases.

El análisis de PCR virtual se realizó con 17 enzimas de restricción.

La desnaturalización del ADN y su amplificación se realizaron en un termociclador programado para 35 ciclos para reacciones preparadas para P1/P7, de acuerdo al siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 min, hibridación a 50 °C durante 2 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min.

Como control positivo se utilizó el ADN del fitoplasma extraído de las plantas infectadas de vinca (*Catharanthus roseus*) y como aislamiento a cada una de las muestras de *Amaranthus* con fitoplasma.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se tiñeron con Sybr Safe (Invitrogen). Las bandas se visualizaron con un transiluminador de UV.

4.4.7 Secuenciación

Los aislamientos Arg1, Arg2 y Arg3 se seleccionaron para la secuenciación del gen 16Sr RNA.

4.4.8 Caracterización molecular

La caracterización molecular del fitoplasma de amaranto hallado en las muestras Arg1, Arg3 y Arg5, se realizó después de la secuenciación del gen 16Sr RNA.

Las secuencias de ADN de 1,2 Kb se clonaron utilizando pGEM Easy Vector System 1 (Promega), se transformaron en la cepa DH5 de *Escherichia coli* y se secuenciaron los plásmidos resultantes.

Se secuenciaron tres clones para cada cepa y se seleccionó una secuencia consenso mayoritaria para cada cepa. Posteriormente, los fragmentos de ADN se alinearon y compararon entre sí y con secuencias de fitoplasmas que pertenecían a distintos grupos de fitoplasmas utilizando los programas de software de ADN (Bioedit, Blast y Múltiple Sequence Alignment- CLUSTALW). PGEM I (Promega).

4.4.9. Estudio filogenético

Las relaciones filogenéticas entre el fitoplasma hallado en rebrotes de cuatro plantas de amaranto sintomáticas y una planta asintomática, con aislamientos de otros grupos de fitoplasmas se determinaron en base a la secuencia del gen que codifica para 16Sr XIII.

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron secuencias consenso mayoritarias de cada cepa (Arg1, Arg3 y Arg5) presentes en las muestras de amaranto y secuencias del gen 16Sr RNA pertenecientes a diferentes fitoplasmas de los grupos 16Sr I, 16Sr III, 16Sr VII y 16Sr XIII, empleando el Programa MEGA con el método neighbor-joining.

El "bootstrapping" (método de parsimonia y máxima verosimilitud) se llevó a cabo 1000 veces para evaluar la importancia de las ramas internas en el árbol y como grupo externo se utilizó la secuencia de *Acholeplasma laidlawii*.

4.4.10. Identificación mediante análisis virtual de RFLP

Se utilizó un análisis RFLP simulado por computadora del gen 16Sr RNA, empleando secuencias, de aproximadamente 1.250 Kb, pertenecientes a las cepas aisladas de amaranto.

La digestión en sílice de cada fragmento de ADN alineado se procesó con 17 enzimas de restricción y se trazó una imagen virtual de electroforesis en gel de agarosa al 3 % (Wei et al., 2007).

Las secuencias recortadas y alineadas se exportaron al programa pDRAW32 (Aca Clone Software) para la digestión de restricción simulada por computadora y el trazado virtual de geles (Wei et al., 2007).

Los perfiles de RFLP virtuales generados por las cepas representativas del fitoplasma hallado en las plantas de amaranto se compararon con los reportados para varios fitoplasmas pertenecientes a diferentes subgrupos dentro del grupo 16Sr XIII. Posteriormente se calculó un coeficiente de similitud (F) para cada par de fitoplasmas basado en los patrones virtuales de restricción (Lee et al., 1998; Nei y Li, 1979).

4.4.11. Ensayo de transmisión por semillas

Para evaluar la transmisión del agente etiológico, se utilizaron semillas de dos de las plantas madres de amaranto sintomáticas analizadas molecularmente y que eran positivas para el fitoplasma. Como control, se utilizaron semillas procedentes de plantas madres asintomáticas cosechadas en el año 2015 en Llavallol, Buenos Aires y un genotipo de la provincia de Córdoba.

Las semillas se desinfectaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron entre papeles de filtro estériles. La siembra se realizó en bandejas de 72 celdas con sustrato estéril, utilizando 80 semillas de las dos plantas sintomáticas positivas para fitoplasma y 200 semillas de las plantas madres asintomáticas. La incubación se realizó en cámara de cultivo para evitar el ingreso de posibles insectos vectores, a 25 °C y con un fotoperiodo de 12 h luz, durante 120 días. Las plantas una vez desarrolladas se transplantaron en contenedores de telgopor de 120 cc de capacidad.

La transmisión se determinó en base al porcentaje de incidencia de plántulas sintomáticas y al análisis molecular realizado a partir de las dos plantas sintomáticas elegidas al azar.

Para calcular el porcentaje de incidencia de plantas sintomáticas, se utilizó la fórmula:

$$\text{Incidencia(\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plantas sintomáticas}}{\text{Total de plantas}} * 100$$

4.5. RESULTADOS Y DISCUSION

4.5.1. Evaluación de plantas sintomáticas en el cultivo

En el cultivo, tres días después de la emergencia, se observaron plántulas anormales con cotiledones cloróticos enrollados hacia adentro. Los síntomas fueron progresivos, acentuándose durante el desarrollo de las plantas.

A los 64 días de la emergencia del cultivo, etapa coincidente con el inicio de la formación de las panojas, se observaron plantas asintomáticas (Fig. 4.1a) y plantas sintomáticas con rebrotes axilares de menor tamaño con hojas curvadas hacia adentro; entrenudos cortos, numerosas hojas de tamaño reducido con nervaduras centrales engrosadas (Fig. 4.1b), panojas laterales de menor tamaño (Fig. 4.1c) y hojas cloróticas con márgenes necróticos.

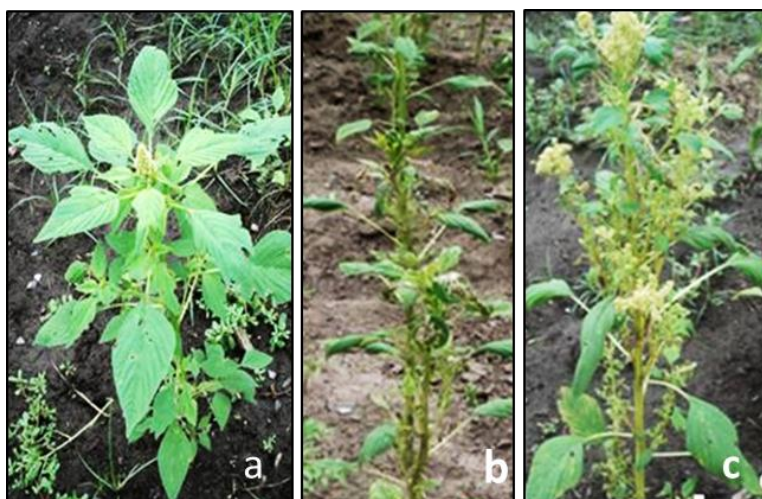


Figura 4.1. Planta de amaranto asintomática (a), Plantas sintomáticas con entrenudos cortos, hojas atrofiadas y numerosas panojas laterales de menor tamaño (b y c).

Algunos de los síntomas identificados en este estudio son coincidentes con los descritos en México en plantas de amaranto infectadas con distintos fitoplasmas, como proliferación excesiva de brotes, clorosis en hojas, acortamiento de los entrenudos y brotes atrofiados (Ochoa-Sánchez et al., 2009; Rojas-Martínez et al., 2009).

En algunos casos las plantas exhibieron un color amarillento del follaje (Fig. 4.2a), necrosis del floema (Fig. 4.2b) y pobre desarrollo de las raíces.



Figura 4.2. Planta de amaranto con brotes atrofiados y amarillamiento de sus hojas (a); Detalle de un brote afectado (b).

4.5.2. Incidencia de plantas sintomáticas

A los 64 y 129 días después de la emergencia del cultivo, la incidencia de plantas sintomáticas fue de 49 % en la primera evaluación a 96 % en la segunda. Fue notorio el avance de la enfermedad en el cultivo ya que en tan solo 65 días de transcurridos entre una evaluación y la siguiente se duplicó prácticamente el número de plantas enfermas, lo cual da un indicio de la gravedad de esta patología.

Este incremento podría deberse a que un porcentaje de las plantas asintomáticas posteriormente manifestaron la enfermedad (Reveles-Torres et al., 2014) o bien que fue transmitida de plantas enfermas a sanas por insectos vectores (Camarena Gutiérrez y De La Torre Almaraz, 2008; Reveles-Torres et al., 2014).

En condiciones a campo, por lo general los síntomas se manifiestan cercanos al período de floración que es cuando la planta comienza a emitir los rebrotes axilares.

4.5.3. Distribución de las plantas sintomáticas en el cultivo

En el cultivo, las plantas sintomáticas se distribuyeron en forma uniforme (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Resultados similares, de distribución de las plantas sintomáticas en un cultivo de *A. hypochondriacus* afectado por *Ca. Phytoplasma pruni* fueron reportados por Rojas-Martínez et al. (2009).

Estos resultados son coincidentes con los hallados en México en *Amaranthus hypochondriacus* por Rojas-Martínez et al. (2009), donde comprobaron la relación de los fitoplasmas y las plantas enfermas de amaranto.

Yang et al. (2011) hallaron en plantas asintomáticas de *Amaranthus retroflexus* el fitoplasma *Ca* Phytoplasma ziziphi perteneciente al grupo 16Sr V. Olivier y Galka (2008) reportaron al fitoplasma Aster yellows con una elevada proporción de plantas de canola asintomáticas.

4.5.5. Análisis filogenético Gen 16Sr DNA

El árbol filogenético generado en base a la secuencia de 16Sr ADN del fitoplasma denominado proliferación de brotes de amaranto (ASP-Ar1); cepas representativas del fitoplasma de subgrupos clasificados dentro del grupo 16Sr XIII, y de fitoplasmas pertenecientes a diferentes grupos y subgrupos se muestra en la Fig. 4.3.

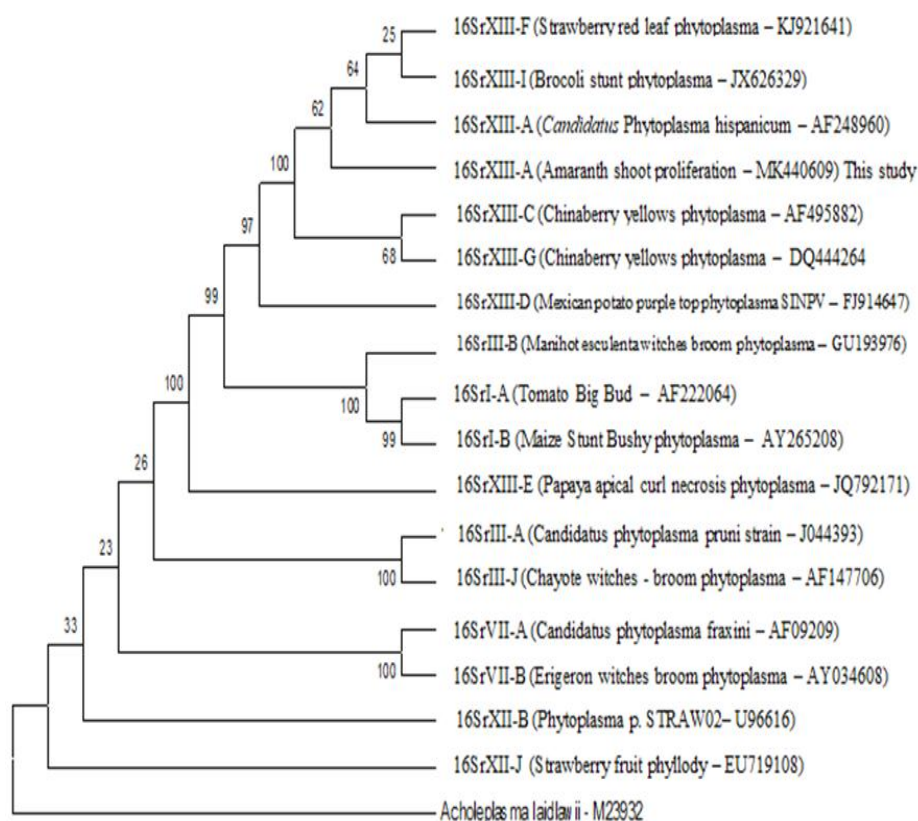


Figura. 4.3. Árbol filogenético construido en base a la secuencia de 16Sr ADN del fitoplasma de proliferación de brotes de amaranto (ASP-Ar1) y cepas representativas de fitoplasma de subgrupos clasificados dentro del grupo 16Sr XIII.

La secuencia obtenida identificada como Amaranth Shoot Proliferation (ASP) cepa N° MK440609 muestra una clara agrupación con los miembros del grupo 16Sr XIII y su consecuente separación evolutiva de los demás grupos y subgrupos.

4.5.6. Caracterización molecular

Los análisis de las secuencias de nucleótidos del 16Sr ADN de los tres clones obtenidos de cada fitoplasma hallados en las muestras Ag1, Ag3 y Ag5, permitieron seleccionar una secuencia de consenso principal para cada uno.

Las secuencias se denominaron: Amaranth Shoot Proliferation (ASP), clasificándolas como ASP-Ar1, ASP-Ar3 y ASP-Ar5, representando a los clones Ag1, Ag3 y Ag5 del fitoplasma. Estas secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank, con el número de acceso MK440609, MK440610 y MK440611, respectivamente.

Las tres secuencias mayoritarias representativas de las tres cepas fueron idénticas entre sí, por ese motivo, se seleccionó a la secuencia ASP-Ar1 como secuencia del fitoplasma hallado en las plantas de amaranto.

4.5.7. Comparación de patrones de RFLP y cálculo de coeficientes de similitud entre secuencias de distintos subgrupos de fitoplasmas 16Sr XIII

Comparando los patrones generados con enzimas de restricción de los productos amplificados por PCR y las secuencias de los productos obtenidos, se detectó la presencia de un fitoplasma perteneciente al grupo filogenético 16Sr XIII *Candidatus* Phytoplasma hispanicum el cual fue previamente reportado en los géneros *Catharanthus* en México (Davis et al., 2016) y *Thunbergia* en Brasil (Alves et al., 2016). En ambos géneros el fitoplasma produce anormalidades en el crecimiento y viriscencia con enverdecimiento de las flores en *Catharanthus* (Davis et al., 2016).

La secuencia del fitoplasma ASP-Ar1 compartió un 98,80 % de similitud con la secuencia del fitoplasma de referencia del grupo 16Sr XIII, fitoplasma mexicano de la viriscencia de la vinca (*Catharanthus roseus*) denominada *Ca.* Phytoplasma hispanicum (Davis et al., 2016).

De acuerdo con los patrones de RFLP, se obtuvo un coeficiente de similitud de 0,98 entre la muestra identificada como ASP-Ar1 y un representante del subgrupo 16Sr XIII-A (Tabla 4.3). Según los resultados obtenidos, el fitoplasma de *Amaranthus* (ASP-Ar1) pertenece al subgrupo 16Sr XIII-A aunque este aislamiento no es totalmente idéntico al fitoplasma patrón representante del subgrupo 16Sr XIII. La diferencia entre los subgrupos

esta en el patrón de restricción de la enzima MseI, utilizada para diferenciar a los fitoplasmas del grupo 16Sr XIII.

Tabla 4.3 Valores de coeficientes de similitud (F) obtenidos del fitoplasma de proliferación de brotes de amaranto (ASP-Ar1) y fitoplasmas afiliados a distintos subgrupos pertenecientes al grupo 16Sr XIII.

Subgrupos	16Sr XIII -A	16Sr XIII -B	16Sr XIII -C	16Sr XIII -D	16Sr XIII -E	16Sr XIII -F	ASP Ar1
16Sr XIII -A	1,00						
16Sr XIII -B	0,95	1,00					
16Sr XIII -C	0,86	0,82	1,00				
16Sr XIII -D	0,92	0,89	0,82	1,00			
16Sr XIII -E	0,92	0,87	0,79	0,70	1,00		
16Sr XIII -F	0,89	0,80	0,74	0,83	0,81	1,00	
ASP Ar1	0,98	0,95	0,88	0,89	0,95	0,89	1,00

De acuerdo con el esquema actual adoptado para la clasificación de los fitoplasmas, los valores F superiores a 0,97 agruparían a las cepas en un mismo subgrupo (Wei et al., 2007).

Los valores de similitud de secuencia y coeficiente de similitud están en concordancia para considerar al fitoplasma asociado con la Proliferación de Brotes de Amaranto como perteneciente al subgrupo 16Sr XIII-A.

Por otro lado, el patrón de ramificación del árbol filogenético confirmaría que el fitoplasma denominado Amaranth Shoot Proliferation (ASP) cepa N° MK440609 ASP-Ar1 está estrechamente relacionado con el representante del subgrupo 16Sr XIII-A (Fig. 2).

Con respecto a la clasificación del fitoplasma basada en 16Sr DNA, se reconocen pocos subgrupos dentro del grupo 16Sr XIII y se han identificado a pocas especies vegetales como representantes de este grupo (Pérez-López et al., 2016; Pérez-López y Dumonceaux, 2016; Melo et al., 2018).

Llamativamente, las especies del grupo 16Sr XIII se limitan al continente americano con fitoplasmas reportados en Argentina, Bolivia, Brasil, México, Paraguay y Estados Unidos (Melo et al., 2018). En Argentina los fitoplasmas del grupo XIII se han registrado en cultivos de frutilla (Fernández et al., 2015) y en árboles de paraíso identificado como *Ca. Phytoplasma meliae* (Fernández et al., 2016).

La identificación de un fitoplasma 16Sr XIII-A reveló que el amaranto es un nuevo huésped para este subgrupo, lo que contribuye a ampliar el conocimiento sobre la diversidad de plantas hospedadoras.

4.5.8. Transmisión del fitoplasma 16Sr XIII-A

En el ensayo de transmisión, se registró una tasa de germinación del 100 %. Sin embargo, después de la emergencia, se identificaron 257 plántulas sintomáticas derivadas de plantas madre tanto sintomáticas como asintomáticas, lo que correspondía al 92 % del total de plántulas emergidas. Estas plántulas mostraron síntomas de clorosis y enrollamiento de los cotiledones (Fig. 4.4a) al igual que los observados en el cultivo.

A los 109 días de la emergencia de las plantas en la cámara de cultivo, el 100 % de las plantas tenían hojas con láminas estrechas y curvadas hacia adentro, proliferación excesiva de brotes axilares y panojas laterales (Fig. 4.4b); confirmándose la presencia de *Ca. Phytoplasma hispanicum* en dos plantas sintomáticas seleccionadas al azar.

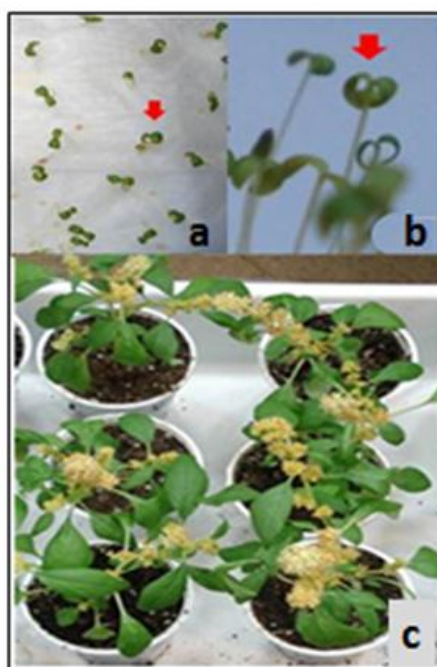


Figura 4.4. Plántulas de amaranto con cotiledones enrollados (a y b); plantas con rebrotes y panojas deformes (c).

Para realizar el análisis de transmisión se utilizaron semillas cosechadas en el 2015, las cuales produjeron plantas sintomáticas cuyo análisis molecular fue positivo para *Ca. Phytoplasma hispanicum*, lo cual sugiere que el fitoplasma permaneció latente en las semillas almacenadas en condiciones de laboratorio durante 300 días. Los resultados obtenidos demuestran que el fitoplasma no afectó el poder germinativo de las semillas.

Por otro lado, se comprobó que el fitoplasma *Ca. Phytoplasma hispanicum* se transmite a través de las semillas de amaranto ya que los síntomas que se habían

observado a campo fueron similares a los de las plantas cultivadas en cámara de cultivo libre de potenciales insectos vectores. Rojas-Martínez et al. (2009) obtuvieron resultados similares, sugiriendo la posibilidad de que *Ca. Phytoplasma pruni* se transmitiese por las semillas de *A. hypochondriacus*.

La tasa de transmisión por semillas fue del 92 %, valor relevante por lo cual se considera que las semillas infectadas naturalmente constituyen un importante vehículo de diseminación del patógeno, que amenazaría la expansión del cultivo en nuevas áreas geográficas.

La transmisión de los fitoplasmas por semillas, se consideraba que era prácticamente imposible debido a la falta de conexión directa entre el floema y el embrión (Menon y Pandalai, 1960). Sin embargo, varios autores como Khan et al. (2002); Botti y Bertaccini (2006); Calari et al. (2011); Chung y Jeong (2014), demostraron la transmisión de fitoplasmas por semillas en varios cultivos como alfalfa, tomate, maíz y colza de invierno y en algunas especies leñosas (Satta et al., 2019) y en Canadá, se detectó al fitoplasma de Aster yellow en plántulas obtenidas a partir de semillas deformes (Lee et al., 2004).

El incremento de fitoplasmas en varios cultivos en todo el mundo, es posible que se deba a su transmisión por semillas, aspecto que hasta el presente no se había tenido en cuenta, habiéndose considerado sus efectos solo sobre el vigor de las plántulas y la producción.

En alfalfa, el fitoplasma conocido como el amarillamiento de la alfalfa australiana (AluY) tiene un efecto severo en la producción y en el vigor de las semillas (Pilkington et al., 2003).

En el duraznero, el fitoplasma que causa el amarillamiento de los frutales de carozo (ESFY) reduce la germinación de las semillas (Nečas et al., 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se observó disminución del poder germinativo de las semillas.

Si bien los fitoplasmas se transmiten principalmente por insectos vectores de las familias Cicadellidae, Fulgoridae y Psyllidae (Weintraub y Beanland, 2016), es probable que *Ca. Phytoplasma hispanicum* pueda ser transmitido por otros insectos vectores que pueden estar presentes en especies perennes, lo cual agravaría la situación sanitaria del cultivo de amaranto y potencialmente de otros cultivos adyacentes.

Teniendo en cuenta que el fitoplasma *Ca. Phytoplasma hispanicum* afecta el normal desarrollo de las plantas; se transmite por semillas y puede estar presente tanto en plantas

sintomáticas como asintomáticas, se debería priorizar el uso de semillas certificadas y de genotipos de amaranto tolerantes, a fin de incrementar la productividad del cultivo.

Con los resultados aportados en el presente capítulo fue posible confirmar la presencia de una enfermedad fitoplásmica en plantas de amaranto que muy posiblemente afectaron al cultivo hace varios años en el mismo predio.

Los hallazgos reportan a *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* como un nuevo huésped para el subgrupo de fitoplasmas 16Sr XIII-A y como un reservorio potencial del patógeno para otras especies cultivadas.

4.6. CONCLUSIONES

- La presencia del fitoplasma *Ca. Phytoplasma hispanicum* 16Sr XIII-A, constituye la primera referencia en el cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* en Argentina y la tercera en América.
- Sobrevive por períodos prolongados, manteniendo su capacidad infectiva en semillas sintomáticas y asintomáticas.
- Se transmite por semillas y no afecta el poder germinativo.

5 CONCLUSIONES GENERALES

Dos de las estrategias de manejo integrado del tizón foliar, las cuales se basaron en la aplicación de la fertilización en suelo con la aplicación en semillas de carboxin+thiram (500 ppm) y de *Trichoderma atroviride* en forma respectiva, resultaron ser las más efectivas para minimizar la incidencia del tizón foliar, además de incrementar el rendimiento en semillas y en materia seca, disminuir la contaminación en semillas por *Alternaria* spp. e incrementar el poder germinativo de las semillas.

En forma complementaria se reportaron dos nuevas patologías que podrían limitar la producción del cultivo:

El manchado que afecta a las semillas causado por *A. alternata*, patógeno que reduce la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas. Los resultados del presente estudio indican que una de las soluciones a la presente problemática derivada de esta enfermedad está dada por un genotipo de ciclo corto caracterizado por producir semillas de excelente calidad sanitaria y fisiológica.

La segunda patología: Fitoplasmosis en amaranto es ocasionada por *Ca. phytoplasma hispanicum* responsable de producir alteraciones en el crecimiento de las plantas. Se reporta por primera vez en Argentina constituyendo el segundo reporte en América y la primera referencia en el cultivo de amaranto *A. caudatus* subsp. *mantegazzianus* en Argentina y en América del Sur destacando su transmisión por semillas.

5 BIBLIOGRAFIA

- Achicano y López, H. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 54(1-2): 1251-1273.
- Adams, P.B. 1990 The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 59-72.
- Adebanjo, A., Ikotun, T. 1994. Effect of harvest seasons on the incidence of seed-borne mycoflora of three *Amaranthus* cultivars. *Mycopathologia*. 128(1): 25-32.
- Afolabi A.O., Oke O.L., Umoh B. 1981. Preliminary studies on the nutritive value of some cereal-like grains. *Nutrition Reports International* 24: 389-394.
- Agrawal K., Sharma J., Singh T., Singh D. 1987. Histopathology of *Alternaria tenuis* infected black pointed kernels of wheat. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 28: 123-130.
- Aguiar, R.A., Cunha, M.G., Lobo Junior, M. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biol Control* 74:1-5.
- Aguilar Hernández, H.S. 2012. Perfil de expresión a nivel transcripcional en respuesta a estrés salino en dos especies de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. y *Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis Doctoral. TDIPICYTA3P42012%20(1).pdf. Disponible 7/7/ 2020.
- Ajayabhai, C.D., Nath, K., Bekriwala, T., Bala, M. 2018. Management of *Alternaria* leaf blight of groundnut caused by *Alternaria alternata*. *Indian Phytopathol.* 71: 543-548. doi:10.1007/s42360-018-0083-2. Disponible 1/7/2020.
- Alcalde de Lanfranco, M.A. 1995. Patógenos del amaranto (*Amaranthus* sp.) en el sur de la provincia de Córdoba. En Actas de Resúmenes IX Jornadas Fitosanitarias Argentinas: 95. Mendoza, 13,14 y 15 de noviembre de 1999.
- Alcalde de Lanfranco, M.A. 1996. Relevamiento de microorganismos patógenos del amaranto (*Amaranthus* sp.) en el sur de la provincia de Córdoba, Argentina. En Actas Taller Iberoamericano Amaranto'96. Rosario, 17 y 18 de octubre de 1996.
- Alcalde, M., Kearney, M., Peiretti, G. 2012. Micoflora asociada a la semilla de amaranto (*Amaranthus* spp.). En Actas de Resúmenes XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas: 58. San Luis, 3, 4 y 5 de octubre de 2012.
- Alcalde, M., Peiretti, G. 2018. Enfermedades del amaranto (*Amaranthus* sp.) en el sur de Córdoba, Argentina. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus*, 1(1): 27-36.
- Alves, M.S., Souza, N.A de, Ribeiro, G.M., Xavier, A. da S., Carvalho, C.M. 2016. A 16SrXIII-E subgroup phytoplasma is associated with *Thunbergia erecta* yellow leaf in Brazil. *Australasian Plant Disease* 11: 34.
- Amerio, N.S., Catrillo, M., Bich, G., Zapata, P., Villalva, L. 2020. *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. Asociación Argentina de Ecología: *Ecología Austral* 30(11): 3-124.
- Andersen, B., Kroger, E., Roberts, R.G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105: 291-299.
- Andrango Tunal, J. 2016. Evaluación preliminar agronómica y morfológica de 170 entradas de amaranto (*Amaranthus* spp.). Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina.
- Anno-Nyako, F.O., Adebanjo, A., Agunloye, O. 1993. Brown rot and die-back disease induced by a curculionid (*Lixus camerunus* Klobe) in amaranth (*Amaranthus hybridus* L.) Nigeria. Ghana. *Jnl Agric. Sci.* 24(37): 87-91.
- Arora, D.K., Elander, R.P., Mukerji, K.G. 1992. Handbook of applied mycology. *Fungal Biotechnology* 4, New York, Marcel Dekker, 1114 p.
- Arx, J.A von; Guarro, J., Figuera, M.J.1986. The Ascomycete genus *Chaetomium* Beihefte zur Nova Hedwigia 84:1-162.

- Bajaree, L., Tsutomu, M.; Saipin, C. 2013. Biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by the cellulolytic actinomycetes *Streptomyces rubrolavendulae* S4 *Science Asia* 39: 584-590 <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.584> Disponible 23/5/2021.
- Baker, K. F. 1984. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.
- Bale, J. R., Kauffman, C.S. (eds.). 1992. Special issue on grain amaranth: New potential for an old crop. *Food Rev. Int.* 8: 1-190.
- Bansal, G. L., Rana, M. C., Upadhyay, G. 1995. Response of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) to plant density. *Indian J. Agric. Sci.* 65: 818-820.
- Barantes del Aguila, F. 1991. Enfermedades de la kiwicha (*Amaranthus caudatus*) en Ayacucho (2750 m.s.n.m.) Actas del VII Congreso Internacional sobre cultivos andinos. La Paz Bolivia Res. 163-168.
- Barclay, G.M., Murphy, H.J., Manzer, F.E., Hutchinson, F.E. 1973. Effects of differential rates of nitrogen and phosphorus on early blight in potatoes *American Potato Journal* 50: 42-48 <https://doi.org/10.1007/BF02855367> Disponible 19/8/2016.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: *The American Phytopathological Society*.
- Barreto, D.; Fortugno, C. 1994. Drechslera verticillata, patógenos de cereales. *RIA* 25: 71-79.
- Baute, M.A., Deffieux, G., Baute, R., Neveu, A. 1978. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. *The Journal of Antibiotics* 31(11): 1099-1101.
- Bayón, N.A., Torena, K., Guanco, J.J.C., Puche, R. 2019. Evaluación Agronómica. En VII Congreso Mundial de la Quinua y Otros Granos Andinos, Chile. <http://www.indap.gob.cl> Disponible 23/11/2020.
- Becker, R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A.E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A., Saunders, R.M. 1981. A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science* 46(4): 1175-1180.
- Begum, M.F., Rahman, M.A., Alam, M.F. 2010. Biological control of *Alternaria* fruit rot of chili by *Trichoderma* species under field conditions. *Mycobiology* 38: 113-117. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.2.113. Disponible 23/10/2020.
- Bejosano, F.P., Corke, H. 1998. Protein quality evaluation of *Amaranthus* whole meal flours and protein concentrates. *J. Sci. Food Agric.* 76: 100-106.
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Hajlaoui, M. R., Bacha, H., Lemaire, C. 2012. Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicol. In Vitro* 26: 915-923.
- Bernal-Muñoz, R., Rodríguez-Vallejo, J., Estrada-Gómez, A., Hernández-Livera, A., Gática-Vásquez, M. 2000. Micoflora asociada a la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 23(1): 109-118.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am J Pl Sci* 5: 1763-1788.
- Berti, M., Serri, H., Wilckens, R., Figueroa, I. 1997. Field evaluation of grain amaranth (*Amaranthus* spp.) in Chile, p. 223-226. En: J. Janick (ed.). *Progress in New Crops*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Bhattiprolu, S.L. 2017. Field Efficacy of Seed Dressing Fungicides against Seed Borne Diseases of Cotton. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 6(8): 3661-3667.
- Biasi, A., Zchetti, V., Oviedo, M.S., Reynoso, M.M., Ramirez, M.L. 2013. Presencia de especies de *Alternaria* y sus micotoxinas en semillas de amaranto. [Presence of *Alternaria* species and mycotoxins on amaranth seeds]. 101. In: *Proceedings of VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología*, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 2-6 December 2013, 190 pp.

- Biniek, A., Tylkowska, K. 1987. Germination and mycoflora of carrot seeds treated with thiram and conditioned in polyethylene glycol (PEG 6000). *Acta Horticulturae*, 215: 411-416.
- Bjorkman, M., Hamback, P.A., Hopkins, R.J., Ramert, B. 2010. Evaluating the enemies hypothesis in a clover-cabbage intercrop: effects of generalist and specialist natural enemies on the turnip root fly (*Delia floralis*). *Agric. Forest Entomol.* 12: 123-132.
- Blachinski, D., Shtienberg, D., Dinooor, A., Kafkafi, U., Sujkowski, LS., Zitter. T.A., Fry, W.E. 1996. Influence of foliar application of nitrogen and potassium on *Alternaria* diseases in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica* 24: 281-292.
- Bliss, L.A. 1934. The methods of probit. *Science*, 79(2037): 38-39.
- Blodgett, J. T., Swart, W. J., Chen, W. 1999. First report of *Alternaria tenuissima* as a leaf pathogen of *Amaranthus hybridus*. *Plant Dis.* 83: 87.
- Blodgett, J.T., Swart, W.J., Louw, S. 2004. Identification of fungi and fungal pathogens associated with *Hypoxilus haerens* and decayed and cankered stems of *Amaranthus hybridus*. *Plant Dis.* 88: 333-337.
- Bonelli, M., Alcalde, M., Kearney, M.I.T. 2014. Enfermedades foliares y fechas de siembra sobre el rendimiento de cultivares de amaranto. Libro de Resúmenes del 3° Congreso Argentino de Fitopatología. 330.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey Engl.
- Botti, S., Bertaccini, A. 2006. Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. *16th Congress IOM*, 9-14 July, Cambridge, UK, 76: 113.
- Brandán de Antoni, E.Z.I., González, A.G., Seco, E. del C., Alemán, P., Tapia, A.M., Romero, A.A., Murúa, F., Ribera, D., Nieva, E. 2013. Comportamiento del amaranto en diferentes fechas de siembra en Tafí del Valle, Tucumán, Argentina *Biología en Agronomía* 3(2): 22-30.
- Brandenburger, W. 1985. Parasitische Pilze a Gefässpflanzen in Europa. Gustav Fischer Verlag. ISBN978-3-437-30433-0.
- Breene, W.M. 1991. Food uses of grain amaranth. *Cereal Foods World* 36: 426-430.
- Brenner, D. 1990. The grain amaranth gene pools 193-194 In: Proc 4th Symp: Perspectives and production, processing and marketing Mime Ext Serv Univ Minnesota St Paul.
- Brenner, D.M., Baltensperger, D.D., Kulakow, P.A., Lehmann, J.W., Yers, R.L., Slabbert, M.M., Sleugh, B.B. 2000. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Reviews* 19: 227-285.
- Bresler, G., Brizzio, S.B., Vaamonde, G. 1995. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 25(1): 101-108.
- Bressani, R. 2003. *Amaranth* In: Encyclopedia of food sciences and nutrition (Caballero B, ed.), pp 166-173. Oxford, Academic Press.
- Brown, A., Finlay, R., Ward, J.S. 1987. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 657-664.
- Burge, W.R., Buckley, L.J., Sullivan, J.R., Mcgrattan, C.J; Ikawa, M. 1976. Isolation and biological activity of the pigments of the mold *Epicoccum nigrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(3): 555-559.
- Buxton, D.R., Melick, P.J., Patterson, L.L., Godinez, C.A. 1977. Evaluation of seed treatments to enhance pima cotton seedling emergence. *Agronomy Journal* 69: 672-676.
- Cabrera-Nieto, C.C. 1989. El cultivo de amaranto, *Amaranthus* spp. una alternativa agronómica para Ecuador. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, Quito Ecuador. Publicación miscelánea 52: 28.

- Calari, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Sakalieva, D., Mori, N., Duduk, B., Bertaccini, A. 2011. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): 157-158.
- Camarena-Gutiérrez, G., De La Torre-Almaraz, R. 2008. Fitoplasmas: síntomas y características moleculares. Revista Chapingo. Serie *Ciencias Forestales y del Ambiente* 14.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. 1990 Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons New York.
- Carlsson, R. 1980. Quantity and quality Amaranths grain from plants in temperate, cold and hot and subtropical climates. A review. In *Proceedings of the Second Amaranth Conference*, Rodale Press, Emmaus, 48 pp.
- Carranza, M.R., Sisterna, M.N. 1993. Bipolaris papendorffii, un nuevo patógeno de semillas de trigo. *Fitopatol. Bras.* 18: 404-406.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Pub. Universidad Nacional de Salta pág 81-86.
- Casenave de Sanfilippo, E.C., Toselli, M.E., Meloni, D. 1993. Adaptabilidad de cultivares graníferos y forrajeros de Amaranthos (*Amaranthus* spp.) y evaluación de su calidad alimentaria. *Actas XX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. San Carlos de Bariloche.
- Cervantes, A. 2007. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. <http://infoagro.comhortalizasmicroorganismo> Disponible 23/4/2016.
- Ciocchini, F. 2013. Análisis de la factibilidad de la incorporación del cultivo de "amaranto" por parte de horticultores familiares de La Plata y sus alrededores. Tesis de grado Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.
- Clarke, D. C., Christensen, M. 1981. The soil microfungus community of a South Dakota grassl. *Canadian Journal of Botany* 59: 1950-1960.
- Coca Morante, M. 2015. Enfermedades nuevas y emergentes de granos y tubérculos andinos de Bolivia. Guía para su identificación y manejo p 207.
- 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.
- Cook, J., Baker, K. 1983. The Nature and Practice of Biological control of Plant Pathogens St Pau, Mn. *The American Phytopathological Society* 5.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N., Oropeza, C. 2003. In situ detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* 4: 99-108.
- Costa L.C., de Jesús Junior Waldir C, Ribeiro do Vale F.X. 2002. Modelos aplicados en Fitopatología. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXIV 1: 81-92.
- Covas, G. 1994. Perspectiva del cultivo de los amarantos en la República Argentina. EEA, Inta Anguil. Santa Rosa, La Pampa, Argentina, Publicación Miscelánea. N°13, 10 p.
- Cuadras, C. M. 2014. "Nuevos Métodos de Análisis Multivariante". Barcelona: CMC Editions, España. <http://www.ub.edu/stat/personal/cuadras/metodos.pdf> Disponible 30/03/2014.
- Cullen, D., Andrews, J.H. 1984. Evidence for the role of antibiosis in the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Can. J. Bot.* 62: 1819-1923.
- Chaitanya, K.V.M.S., Masih, H., Abhiram, P. 2018. Isolation of *Trichoderma harzianum* and Evaluation of Antagonistic Potential against *Alternaria alternata*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 7(10): 2910-2918.
- Chang, I., Kommedahl, T. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 58: 1395-1401.
- Chen S., Qiang S. 2017. Recent advances in tenuazonic acid as a potential herbicide *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143: 252-257.

- Chen, S.K., Edwards, C.A 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biol Biochem* 33:1981-1991. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00132-8) Disponible 2/2/2018.
- Chen, S.K., Clive, A. E., Subler, S. 2001. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Applied Soil Ecology*. 18(1): 69-80.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Ching, T.M., Hedtke, S., Boulger, M.C; Kronstad, W.E. 1977. Correlation of field emergence rate and seed vigor criteria in barley cultivars. *Crop Science* 17: 312- 314.
- Christensen, C.M., Kaufmann, H.H. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 69-84.
- Chung, B.N., Jeong, M.I. 2014. Identification of “stolbur” phytoplasmas in Petunia hybrid seedlings. *Phytopathogenic Mollicutes* 4(1): 5-8. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00135-4). Disponible 20/10/2020
- D'Ambroggio, de A.A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal Manual Techniques in Plant Histology. Hemisferio Sur Editorial, Buenos Aires, Argentina, 83 p.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L. 2016. Candidatus Phytoplasma hispanicum, a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of Catharanthus roseus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 3463-3467.
- De Sansón, M.P. 1989. Tres enfermedades de los amarantos registradas en la provincia de la Pampa, República Argentina. *Amarantos Novedades e Informaciones* 1: 3.
- Del Valle, R.A., Del Valle P.D. 2017. Estudio ecofisiológico del cultivo de amaranto en La Plata (provincia de Buenos Aires). Trabajo Final de la FCAyF-UNLP. 1-53. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/69375/> Disponible 4/11/2021.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina* *Universidad Federal de Viçosa*, Brasil P166.
- Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P; Schinn, F.J. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* 82: 131-135.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini ,M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo C.W. 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.URL <http://www.infostat.com.ar>. DOI:10.3923/ajpp.2006.89.98. Disponible 30/9/2020.
- Dickinson, M., Tuffen, M., Hodgetts, J. 2013. The Phytoplasmas: An Introduction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 938. 1-14. DOI: [10.1007/978-1-62703-089-2_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_1) Disponible 22/11/2017
- Docampo, C., Conci, L.R. 2015. Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup Phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(8): 2741-2747.
- Domsch, K.H., Gams ,W., Anderson,T.H 1980. Compendium of soil fungi. Vol 1. Academic Press. London. UK.
- Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. *Agron Sustain Dev* 28: 33-46.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schafer, " B., & Lampen, A. 2018. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 63–72. Disponible 30/ 12/ 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.005>.

- EFSA. 2011. Panel on Contaminants in the Food Chain Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *European Food Safety Authority (EFSA)* 9(10): 2407.
- Elbehri, A., Putnam, D. H., Schmitt, M. 1993. Nitrogen fertilizer y cultivar effects on yield y nitrogen use efficiency of grain amaranth. *Agron. J.* 85: 120-128.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes Commonwealth Mycological Institute England.
- Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Oxford University Press, Oxford.
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., Manyes, L. 2017. *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *J. Food Qual* 48: 20.
- Espitia Rangel, E., Colin, M., Castillo, S., Gonzalez, F. 1992. Genetic variability and the relationship between grain yield and its components in (*Amaranthus* spp.). AGRIS. <https://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=MX9700381>. Disponible 20/7/ 2020.
- Espitia, E. 1992. *Amaranth* germplasm development and agronomic studies in México. *Food Reviews International*. 8(1): 71-86.
- Espitia-Rangel, E. 1994. Breeding of Grain Amaranth. In: *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-Lopez O. (Ed.). 23-38. CRC, ISBN 0-8493-5374-2, Boca Raton, USA.
- Espitia-Rangel, R.E. 1986. Plagas y enfermedades del cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.) en México. Primer Seminario Nacional de Amaranto. Chapingo Mex. 223-238.
- Estrada Zúniga, R., Gonza Cusipuma, V., Gutierrez Galdos, J.L. 2014 Guía práctica: Plagas y enfermedades del cultivo de Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) PROYECTOS “Especies Olvidadas y Subutilizadas” NUS IFAD II Proyecto Kiwicha - Consorcio andino p36.
- Eveleigh, D.E., Demain, A.L., Solomon, N. 1986. Trichoderma: Biology of industrial microorganisms. *Biotech Ser. (Ed)*. Cap.16: 489-500.
- Everhar, E., Haynes, C., Jauron, R. 2003. Cilantro. En Guía de Horticultura de IOWA State University PM/893 Mexico. En: J.R. Bale y C.S. Kauffman (Eds.) Special issue on grain amaranth: new potential for an old crop. *Food Reviews International* 8: 71-86.
- FAO III Adaptación del amaranto en los países de América latina <http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTPfaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro01/Cap3.htm>. <http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTPfaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro01/Cap3.htm> Disponible 5/6/2020.
- Faria, A.Y.K., Albuquerque, M.C.F., Cassetari; Neto, D. 2003. Physiological quality of cotton seeds submitted to chemical and biological treatments. *Rev. Bras. Sement.* 25: 121-127. doi.org/10.1590/S0101-31222009000400010 Disponible 5/6/2018.
- Fasina, A.S., Awe, G.O., Aruleba, J.O. 2008. Irrigation suitability evaluation y crop yield-An example with *Amaranthus cruentus* in Southwestern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*. 2(7): 61-66.
- Fernández, F.D., Galdeano, E., Kornowski, M.V., Arneodo, J. D., Conci, L. R. 2016. Description of Candidatus *Phytoplasma meliae*, a phytoplasma associated with Chinaberry (*Melia azedarach* L.) yellowing in South America *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (12):5244-5251. doi: 10.1099/ijsem.0.001503. Disponible el 23/6/2016.
- Fernández, M. 2015. Identificación y caracterización de grupos de especies de *Alternaria* y *Pithomyces* asociados a enfermedades del trigo en Argentina Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.
- Fokkema, N., Lorbeer, W. 1974. Interaction between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology* 64: 1128-1133.
- Fomsgaard, I.S., Añon, M.C., Barba de la Rosa, A.P., Christophersen, C., Dusek, K., Délano-Frier, J., Espinoza Pérez, J., Fonseca, A., Janovská, D., Kudsk, P., Labouriau, R.S., Lacayo Romero,

- M.L., Martínez, N., Matus, F., Matusová, K., Mathiassen, S.K., Noellemeyer, E.J., Pedersen, H.A., Stavelikova, H., Steffensen, S.K., de Troiani, R.M., Taberner, A. 2010. *Amaranth*; Future and Food Denmark. ISBN 978-87-91949-62-3. 79 p.
- Fuentes Fernandez, W., Mollo Porco, N., Correa, W. 2011. Plagas y enfermedades del cultivo de amaranto. Fundación PROINPA Imprenta Editorial "Tupac Katari" 11.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2016. List of Fungicide Common Names. en: <http://www.frac.info/what-s-new/2016/02/15/publication-of-the-fraccode-list-2016> Disponible 10/6/2021.
- Gally, T. 2007. Enfermedades de las semillas de soja en Argentina. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 78: 86-90.
- González, T.F., Rojo, H.C. 2005. Prontuario de Agricultura. Cultivos Agrícolas. Editorial: Grupo Mundi-Prensa. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). ISBN 84-491-0669-9 (MAPA). ISBN 84-8476-248-3 (Mundi-Prensa). Madrid, España; 154.
- Goodman, R.N., Kiraly, Z., Wood, K.R. 1986. The Biochemistry and Physiology of Plant Diseases. University of Missouri Press, Columbia, MO, USA.
- Green, P., Cellier, C. 2007. Celiac Disease. *N. Engl. J. Med.* 357(17): 1731-1743.
- Guitton, H. 1960. Índices e indicadores. *Revista de Economía y Estadística*. Tercera época. 4(1-2-3-4): 9-23.
- Gupta, S.K., Rai, A.K., Kanwar, S.S., Chand, D., Singh, N.K., Sharma, T.R. 2012. The single functional blast resistance gene Pi54 activates a complex defence mechanism in rice. *J. Exp. Bot.* 63: 757-772.
- Gür, N., Karamanoglu, S., Gür, S. 2008. Effects of *Alternaria alternata* toxins (AOH, AME and TA) on Apple (*Malus sylvestris* Miller cv Golden) Pollen. *World Applied Sciences Journal* 3(5): 781-784.
- Hampton, J.G., 1995. Methods of viability and vigour testing: a critical appraisal. In: A.S. Basra (Ed.), Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications. *Food Product Press*, New York, pp 81-118.
- Haram, S. S. 1996. Molecular mechanisms of lectin enzymes involved in the biocontrol activity of trichoderma harzianum. *Microbiology* 142: 2321-2333.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* Species Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts, *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Harman, G.E. 2000. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84: 377-393.
- Harman, G.E., Obregón, M.A., Samuels, G.J., Lorito, M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease* 94 (8): 928-939.
- Hassan, H.A. 1999. Phytotoxicity of pathogenic fungi their mycotoxins to cereal seedling viability. *Mycopathologia* 148: 149-155.
- He, Q., Park, Y.J. 2013. Evaluation of Genetic Structure of *Amaranth* Accessions from the United States. *Weed Turfgrass Sci.* 2: 230-235.
- Heller, W., Theiler-Hedtrich, R. 1994. Antagonism of *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* and *Trichoderma viride* to four soil-borne Phytophthora species. *J. Phytopathology* 141: 390-394.
- Henderson, T.L., Schneiter, A.A., Rively, N. 1993. Row spacing y population effects on yield of grain amaranth in North Dakota. In: Janick J & Simon JE (Eds.) *New crops*. New York, Wiley. p.219-221.
- Hernández, R., Herrerías, G. 1998. Amaranto: Historia y promesa. Tehuacán: *Horizonte del Tiempo*, 1: 529-545.

- Hernandez-Mendoza, J.L., Sánchez Pérez, M.I., González Prieto, J.M., Quiroz Velásquez J.D., García Olivares, G.J., Gill Langarica, H.R. 2015. Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(4): 1093-1101.
- Herrera Parra, E., Bacab Pérez, I.M., Cristóbal Alejo, J., Tun Suárez, J.M., Ruíz Sánchez, E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (mart.) sacc.y *Alternaria alternata* (fries) keissler en thevetia peruviana (pers.) k. schum. y su control in vitro. *Fitosanidad* 15(4): 231-236.
- Herrero, J. 2005. Flora de Iberia. <http://floradeiberia.com> Disponible 5/4/2018
- Hillis, D.G., Fletcher, J., Solomon, K.R., Sibley, P.K. 2011. Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species Archives of *Environmental Contamination and Toxicology* 60(2): 220-232.
- Holcomb, G.E. 1978. *Alternaria alternantherae* from Alligatorweed also is pathogenic on ornamental Amaranthaceae species. *Phytopathology* 68: 265-266.
- Huber, D.M., Watson, R.D. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 12: 139-165.
- Ikedigwu, F.E.O. 1981. A shoot disease of *Amaranthus* spp. in Nigeria associated with *Choanephora cucurbitarum*. *J. Hort. Sci.* 56: 289-293 <https://doi.org/10.1080/00221589.1981.11515004> Disponible 3/9/2020.
- Introcaso, R.M., Wasinger, E.G., Iodice, R.A. 2015. Producción de amaranto en un predio orgánico en la zona de Luján, Buenos Aires, Argentina. Memorias del V Congreso Latinoamericano de Agroecología.
- Irving, D.W., Betschart, A.A., Saunders, R.M. 1981. Morphologic studies on *Amaranthus cruentus*. *J. Foods Science* 46: 1170-1173.
- Ishizuka, M.S; Duarte de Moraes, M., Carmignani Pescarin Chamma, M.H; Pulcinelli E, Machado Menten, J.O. 2018. Effect of fungal incidence on physiological quality of tobacco seeds used in Brazil *Arquivos do Instituto Biológico* 85: 1-6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000352017> Disponible 6/10/20.
- Jacobsen, S. E., Shewood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Quito, Ecuador, FAO-Centro Internacional de la Papa- Catholic Relief Service. 14.
- Jacquelin, L.M., Llovet, A., Elisei, J. 2011. El cultivo de amaranto. *Estación Experimental Agropecuaria Pergamino*. Disponible 3/11/2017. <http://www.todoagro.com.ar/todoagro2/archivo/amaranto2011.pdf>.
- Johnson, B. L., Henderson, T. L. 2002. Water Use Patterns of Grain Amaranth in the Northern Great Plains. *Agron. J.* 94: 1437-1443.
- Jorgensen J. 1967. Nogle undersøgelser over årsagerne til gråfarvningen af frøaf gul sennep (*Sinapsis alba*) (In) *Statsfrokontrollen København* 78-97.
- Joshi B.D., Rana, R.S. 1992. Grain Amaranths: The future food crop. NBPGR, Shimla *Sci. Monogr.* 3: 117-119.
- Kabir, M.H., Islam, S.M.A., Sultana, N., Zad, M.A.K., Fakir, G.A. 2006. Effect of seed cleaning, washing and treating with Vitavax on incidence and severity of Boro rice diseases. *International Journal of Sustainable Agricultural Technology* 2(2): 27-31.
- Kamala, N., Gokulapalan, C., Nair, M.C. 1996. A new foliar blight of *Amaranthus* caused by *Rhizoctonia solani* *Indian Phytopathol.* 49: 407.
- Kauffman, C. S. 1992. Realizing the potential of grain amaranth. *Food Reviews International.* 8: 5-21.

- Kearney, M., Alcalde, M., Bonelli, N y Peiretti, G. 2012. Evaluación de enfermedades que afectan al cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.) en el sur de Córdoba XIV *Jornadas Fitosanitarias Argentinas* 31.
- Keinath, A.P. 2003. First Report of White Rust Caused by *Albugo bliti* on Seabeach Amaranth in the United States. *Plant Dis.* 87: 602.
- Kgatle, M., Flett, B., Truter, M., Aveling, T. 2020. Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*: 105146.
- Khan, A.J., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, A.M., Bertaccini, A. 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? *XIII Congress IOM*, July 07-12, Vienna: 6.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D. 1987. Indian medicinal plants, (2nd Edn.); International Book Distributors, India, Dehra Dun 2061-2062.
- Knoche, H.W., Duvick, J.P. 1987. The role of fungal toxins in plant disease. 158–192. In: “Fungal Infection of Plants” (G.F.Pegg, P.G. Ayres, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 430 p.
- Kohl, J., Belanger, R.R., Fokkema, N.J. 1997. Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: a comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathology* 87: 634-642.
- Komen, J. 1992. Grains for the tropical regions. Biotechnology and Development Monitor. Publication of the Ministry of Foreign Affairs and the University of Amsterdam. The Netherlands. 10: 3.
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenechini, P., Bellini, A., Mandrin, J., Lichou, J., De Eribe, X.O. 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control* 32(2): 305-310.
- Larran, S. 2016. Estudio de la microbiota endofítica asociada a trigo y soja y su significancia en la interacción con patógenos fúngicos. *Tesis Doctoral de la UNLP*. <https://doi.org/10.35537/10915/54499> Disponible 30/4/2018.
- Lee, H B., Patriarca, A., Magan, N. 2015 *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology, *Mycobiology* 43(2): 93-106. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93> Disponible 22/10/2017.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48: 1153-1169.
- Lee, I.M. 1998. Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54: 221-255.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Marcone, C., Seemuller, E., Bottner, K.D., 2004 „Candidatus Phytoplasma asteris”, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1037-1048. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02843-0> Disponible 24/12/2016
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R; Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
- Lehmann, J., Putnam, D., Qureshi, A. 1994 Vitamin E isomers in grain amaranths (*Amaranthus* spp.). *Lipids* 29: 177-181. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02536726> Disponible 24/10/2017.
- Lehmann, J.W. 1990. The potential of grain *amaranths* in the 1990 and beyond. en: Proc. 4th National Amaranth Symposium: Perspectives on production, processing, y marketing. Minneapolis, MN. 23-25. Univ. Minn., St. Paul, MN. p. 1-7.

- Leite R.M., Amorim L. 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. *Summa Phytopathologica* 28: 14-19.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. (Blackwell Publishing, Ames, USA).
- Lezcano, E. 2013. Dirección de Agroalimentos Área de Sectores Alimentarios Cadena Quínoa y Amaranto 25.
- Li, B.C., Sutton, J.C. 1995. Evaluation of leaf-associated microorganisms for biocontrol of tan spot in wheat foliage. *Fitopatologia Brasileira* 20: 545-552.
- Li, F.Q., Toyazaki, N., Yoshizawa, T. 2001. Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather damaged wheat. *Journal of Food Protection* 64: 567-571.
- Li, Y., Xia, L., Wang, Y., Liu, X., Zhang, C., Hu, T., Cao, K. 2013. The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. *Biological Control* 67(3): 462-468.
- Lineau, C. 1753. Species Plantarum. Tomo II.
<http://mbgserv18.mobot.org/djatoka/images/blank.gif>. Disponible 3/7/2020.
- Liu, F., Stützel, H. 2002. Leaf water relations of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *Eur J Agron* 16: 137-150.
- Lopez, A., Alvarenga, A.E; Zapata, P.D., Luna, M.F., Villalba, L. 2019. *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil; Taylor & Francis; *Mycology: An International Journal on Fungal*; 10(4): 210-221. <https://doi.org/10.1080/21501203.1606860> Disponible 1/3/2020.
- 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.
- Lorito, M. 2006. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma*, Phytopathogenic Fungi and Plants: Oportunities for Developing Novel Disease Control Methods», Memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y Otros Antagonistas, marzo 28-31, La Habana, *Fitosanidad* 10(2): 139-140.
- Madhav, C.K., Sivaji, K., Tulasi, R.K. 2008. Flowering plants of Chitoor district, (1st Edn.); Students Offset Printers, Tirupati, p. 291.
- Madrigal, C., Tadeo, J., Melgarejo, P. 1991. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research* 5(12): 1375-1381.
- Magalhaes, F.H.L., Machado, J. da C., Vieira, M. das G.G.C., Guimaraes, R.M., Oliveira, J.A., Ledo, C.A. da S. 2004. Desempenho de sementes de cenoura portadoras de especies de *Alternaria* apos o condicionamento fisiológico com adição de tiram. *Ciencia e Agrotecnologia*, 28(5): 1007-1014.
- Mahapatra, S., Saha, P., Das, S. 2014. Effect of different levels of nitrogen in field on *Alternaria* blight severity of mustard. *J. Mycopathol, Res*, 52(1): 35-40.
- Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., Krska, R. 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A*. 3;1362: 145-56. Disponible 17/11/2020 doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.037
- Malajer, P.K., Mian, I.H. 2009. Effect of seed treatments and foliar spray with fungicides in controlling black point diseases of wheat. *Bangladesh J. Agril. Res.* 34(3): 425-434.
- Manandhar, H.K., Timila, R.D., Sharma, S., Joshi, S., Manandhar, S., Gurung, S.B., Sthapit, S., Palikhey, E., Pandey, A., Joshi, B.K., Manandhar, G., Gauchan, D., Jarvis, D.I., Sthapit, B.R. 2016. A field guide for identification and scoring methods of diseases in the mountain crops of Nepal. NARC, DoA, LI-BIRD and Bioversity International, Nepal, 77.

- Mapes Sánchez, E.C., Espitia, E.R. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Amaranthus* cultivadas y de sus posibles parientes silvestres en México. IB-UNAM, INIFAP-CE Bajío.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J.F., Lichou, J., Arena, I., De Cal, M.A., Melgarejo, P., Usall, J. 2007. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(7): 1271-1277.
- Marini, N., Tunes, L.M., Silva, J.I; Moraes D.M., Olivo F; Cantos A.A. 2011. Carboxim Tiram fungicide effect in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds physiological quality. *Rev. Bras. Ciênc. Agrárias* 6: 17-22. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i1a737>. Disponible 12/2/2016.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition, Academic Press, London.
- Martín de Troiani, R., Sánchez, T., Antón de Ferramola, L. 2005. Incidencia de la fertilización en amaranto. Zona semiárida pampeana (Argentina) *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXVII. 2: 65-71.
- Martínez, B., Fernández, L., Solano, T. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. *Cultivos Tropicales*. 15(3): 54.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* 28(1): 1-11.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a bios para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz, *Rev. Protección Veg.* 23(2): 118-125.
- Martinez, E.S., Mátar, I.D. 2017. Elaboración de harina de amaranto Estudio de prefactibilidad Proyecto Final Ingeniería Industrial UTN Facultad Regional San Rafael Mendoza. 278 p.
- Masoni, A., Ercoli, L. 1994. Influencia de la época de cosecha sobre el rendimiento de concentrado de proteína foliar de amaranto. *El amaranto y su potencial* 1: 17-23.
- Mathur, S.B., Cunfer B. 1993. Black point. pp 13-21. In: "Seedborne Diseases and Seed Health Testing of Wheat" (S.B.Mathur, B. Cunfer, eds.). Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Denmark, 168 p.
- Matteucci, S.D. 1998. Potencial productivo del amaranto en la pampa ondulada, Argentina: Comportamiento de seis germoplasmas. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*. 15: 560-570.
- Mazur, S., Kurzawińska, H., Nadziakiewicz, M., Nawrocki, J. 2015. Redroot pigweed as a host for *Alternaria* alternate the causal agent of *Alternaria* leaf blight in potato. *Zemdirbyste-Agriculture* 102: 115-118. <https://doi.org/10.13080/Z-A.2015.102.015> Disponible 30/3/2019.
- Mc Culloch, C.E, Searle, S.R. 2000. Generalized, Linear and Mixed Models. *Wiley Series in Probability and Statistics* 156.
- Meena, M., Gupta, S.K., Swapnil, P., Zehra A., Dubey, K., Upadhyay, R.S. 2017a. *Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology* 8: 1451.
- Meena, M., Swapnil, P., Upadhyay R. 2017b. Isolation, characterization and toxicological potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in different *Alternaria* species from various regions of India. *Scientific Reports* 7: 8777. DOI:10.1038/s41598-017-09138-9 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/s41598-017-09138-9.pdf>. Disponible 30/3/2021.
- Melo, L.A., Ventura, J.A., Costa, H., Kitajima, E.W., Ferreira, J., Bedendo, I.P. 2018. Delineation of a novel subgroup 16SrXIII-J phytoplasma, a „*Candidatus* Phytoplasma hispanicum“-related strain, based on computer-simulated RFLP and phylogenetic analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 962-966.
- Meng, X., Miao, Y., Liu, Q., Ma, L., Guo, K., Liu, D., Ran, W., & Shen, Q. 2019. TgSWO from *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 promotes growth in cucumber plants by modifying the

- root morphology and the cell wall architecture. *Microbial cell factories* 18(1): 148. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1196-8>. Disponible 15/8/2020.
- Menon, K.P.V., Pandalai, K.M. 1960. The coconut palm, a monograph. *Indian Central Coconut Committee, Ernakulam, India*. Vol 133.
- Mihail, J.D., Champaco, E.R. 1993. Diseases of *Amaranthus* spp. caused by *Pythium aphanidematum* and *Macrophomina phaseolina*. *Can J. Bot.* 71: 1219-1223.
- Minoletti, C et al. 2000. 3D Model of the F1 part of chloroplast ATP-synthase interacting with the phytotoxin tentoxin. resumen 198, EBEC <http://www.ebec2000.com/abstracts/198.htm>. Disponible 4/12/2015.
- Mónaco, C. 1997. Presencia y frecuencia de la micoflora saprobia del filoplano de tomate y su posible uso para el control biológico de *Alternaria solani* (Ell & Mart) Jones & Grout. Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae en Protección Vegetal. Fac. Cs. Agrarias y Ftiles (UNLP). La Plata, Buenos Aires, 60 p.
- Mónaco, C., Nico A., Alippi, H., Mitidieri, I. 1999. Saprobic fungi inhabiting phylloplane as possible antagonists of *Alternaria solani*. *Acta Agronomica Hungarica* 47: 397-403.
- Mondal, K.K., Dhiman, K.C., Agarwal, D.K. 2002. *Alternaria* leaf spot of grain amaranth. *Indian Phytopathology* 55(2): 248.
- Monga, D., Sain, S.K., Nakkeeran, S., Bhattiprolu, S.L., Rajani, V.V., Kulkarni, V., Rao, M.S.L. 2018. Effectiveness of seed treatment with recommended fungicides on seed, soil borne diseases and productivity of cotton. *J Mycol Pl Pathol* 48(3): 311-323.
- Montemurro, N., Visconti, A. 1992. *Alternaria* metabolites-chemical and biological data. pp. 449–541. In: *Alternaria: Biology Plant Diseases and Metabolites* (J. Chelkowski, A. Visconti, eds.).
- Moreno-Velázquez, M., Yáñez-Morales, M.J., Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Trinidad-Santos, A., Arellano-Vázquez, J.L. 2005. Diversidad de hongos en semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 111-118.
- Mosyakin, S. G., Kenneth, R., Robertson, J.R. 1996. New infrageneric taxa and combinations in *Amaranthus* Amaranthaceae *Ann. Bot. Fennici* 33: 275-281.
- Moya, P., Pedemonte, D., Amengual, S., Franco, M. E. E., Sisterna, M.N. 2016. Antagonismo y mecanismos de acción de hongos del grupo de especies *Chaetomium globosum*, potenciales biocontroladores de enfermedades fúngicas foliares de la cebada. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica* 51(4): 569-578. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v51.n4.16334>. Disponible 22/7/2017
- Mujica Sánchez, A., Berti D az, M., Izquierdo, J. 1997. El cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización. Editorial Puno, Perú Universidad Nacional del Altiplano (UNA); Chillán (Chile) Universidad de Concepción (UDEC) Roma Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Mujica, A., Berti, M. 1997. El cultivo del Amaranto (*Amaranthus* spp.): Producción, Mejoramiento Genético y Utilización. FAO. Red de Cooperación Técnica en Producción de Cultivos Alimenticios. Roma, Italia. 145 p.
- Mujica, A., Izquierdo J., Jacobsen, S. E. 1999. Prueba americana de cultivares de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus hypocondriacus* L. y *Amaranthus cruentos* L.). In: Reunión Técnica y Taller de Formulación de Proyecto Regional sobre Producción y Nutrición Humana en base a Cultivos Andinos (eds. Mujica, A., J. Izquierdo, J. P., Marathee, C. Morón y Jacobsen,S.E). Arequipa, Perú, 20-24 julio, 1998. pp. 47-54.
- Mujica, S.A., Quillahuaman, A. 1989. Fenología del cultivo de la kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). pp. 29-31. En: Curso taller fenología de cultivos andinos y uso de la información agrometeorológica. Puno, 7-10 agosto. INIA, PICA. Perú.

- Muñiz, M.F.B., Porto, M.D.M. 1999. Presença de *Alternaria* spp. em diferentes partes da semente de cenoura e em resíduos culturais e efeito do tratamento de sementes na sua transmissão. *Revista Brasileira de Sementes* 21(1): 187-193.
- National Academy of Sciences. 1985. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. *Natl. Acad. Sci.*, Washington DC.
- National Research Council (NRC). 1989. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation Washington DC The National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/1398>. Disponible 26/4/2016.
- National Research Council. 1984. Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/1938>. Disponible 3/9/2016.
- National Research Council. 2006. Amaranth (Amaranthus species. In: Lost Crops of Africa: Volume II: *Vegetables*. National Academies Press, Washington D.C.). p. 33-51.
- Nečas, T., Mašková, V., Krška, B. 2008. The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. *Acta Horticulturae* 781: 443-448.
- Neergaard, P. 1979. Seed Pathology 1. The Macmillan Press 839 p.
- Nei, M., Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 76: 5269-5273.
- Nelum K. G., Piyasena P., Wickramarachchi W. A. R. T, Kumar N. S., Jayasinghe L. ,Fujimoto Y. 2015. Two phytotoxic azaphilone derivatives from *Chaetomium globosum*, a fungal endophyte isolated from *Amaranthus viridis* leaves, *Mycology*, 6(3-4): 158-160.
- Nene, Y.L., Thapliyal, P.N. 1979. Fungicides in plant disease control (2nd ed.). New Delhi, India: Oxford and IBH Publication Co.
- Nieto, C. 1990. El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp*) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelánea N° 52. Quito, Ecuador.
- Nithyameenakshi, S., Jeyaramraja, P.R; Manian, S. 2006. Investigations on Phytotoxicity of Two New Fungicides, Azoxystrobin and Difenconazole. *American Journal of Plant Physiology* 1: 89-98. Disponible 30/12/2017. URL:<https://scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2006.89.98>
- Noelting, M.C. 2010. Enfermedades de *Amaranthus mantegazzianus* Pass. (Ataco, chaclión, trigo inca). En: *Atlas Fitopatológico Argentino*. 3(1). Marzo 2010. Eds: Nome, S.F.; Docampo, D.M.; Conci, Córdoba, Argentina. Disponible 30/4/2021. URL:<http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=1031>
- Noelting, M.C., Astiz Gasó, M.M. 2005. Presencia de *Thecaphora amaranthi* en diversas especies cultivadas de amaranto (*Amaranthus spp.*). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 40 Suplemento: 164-165.
- Noelting, M.C., Mónaco, C.I., Sandoval, M.C., Molina M.C. 2006. Estrategias de manejo integrado del tizón foliar (*Alternaria alternata*) en un cultivo de amaranto (*Amaranthus spp.*). *XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. Libro de Resúmenes: 310-311.
- Noelting, M.C., Rojas-Martínez, R.I., Molina, M.C. 2015. Detección molecular de „*Candidatus* Phytoplasma pruni“ en semillas de amaranto en Argentina. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(S): 236-237.
- Noelting, M.C., Sandoval, M.C. 2003. Biocontrol de *Pythium aphanidermatum*, patógeno de amaranto: pruebas preliminares. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 38 (Supl): 273.
- Noelting, M.C., Sandoval, M.C. 2003. Patógenos fúngicos en amarantos cultivados. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 38(Supl): 273.
- Noelting, M.C., Sandoval, M.C., Abiatti, N.N. 2004. Determinación de microorganismos en semillas de amaranto en diferentes medios de cultivo. *Revista Peruana de Biología*, 11(2): 169-178.

- Noelting, M.C., Sandoval, M.C., Astiz Gassó, M. 2005. Primer reporte en Argentina de *Thecaphora amaranthicola* como agente responsable del carbón en *Amaranthus mantegazzianus*. *Fitopatología* (Res). 40(2): 76.
- Noelting, M.C., Sandoval, M.C., Astiz Gassó, M.M., Molina, M.C. 2010. Review of *Thecaphora amaranthicola*, M. Piepenbr. Responsible agent of smut on *Amaranthus mantegazzianus* (Pass). Management of fungal plant diseases: *Current Trends and Progress*. Editorial Scientific Publishers. www.scientificpub.com Eds. A. Arya & A. Perello. 311-317.
- Noelting, M.C., Sandoval, M.C., Molina, M.C. 2009. Revisión de las principales patologías de origen fúngico que afectan al cultivo de amaranto en Argentina. *Jornadas Amaranto*, Actas de resúmenes 25.
- Noelting, M.C., Sisterna, M.N., Lori, G., Sandoval, M.C., Molina, M.; Mónaco, C.I. 2011. First report of *Alternaria alternata* causing discolouration on *Amaranthus* seeds in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 6(1): 1-2. DOI 10.1007/s13314-011-0001-2 Disponible 17/5/2016.
- Noelting, M.C., Sisterna, M.N., Lovisoló, M., Molla-Kralj, A., Lori, G., Sandoval, M.C., Sulyok, M., Molina, M.C. 2016. Discoloured seeds of amaranth plant infected by *Alternaria alternata*: physiological, histopathological alterations and fungal secondary metabolites associated. *Journal of Plant Protection Research* 56 (3): 244-249.
- Noelting, M.C., Vega, O.D., Sandoval, M.C. 2001. Comportamiento de dos aislamientos de *Trichoderma harzianum* Rifai empleados en el control de *Alternaria alternata* (FR) Keissler en semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* Cv. G. Covas) *Fitopatología Brasileira*. 26: 466.
- Noelting, M.C., Vega, O.D., Sandoval, M.C. 2001. Presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en cultivo de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus* cv. don Manuel). *Fitopatología* 37: 60-61.
- Noelting, M.C.; Mónaco, C.I.; Sandoval, M.C., Molina, M.C. 2006. Estrategias de manejo integrado del tizón foliar (*Alternaria alternata*) en un cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.). *XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. Libro de Resúmenes: 310-311.
- Noelting, M.C.I., Sandoval, M. C., Astiz Gassó, M.M., Molina, M.C. 2007. Detección de biocontroladores nativos de los carbones (*Thecaphora amaranthi* y *T. amaranthicola*) *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. (Res) 42(Supl): 220-221.
- Noelting, M.C.I., Sandoval, M.C. 2005. Evaluación in vitro de cepas de *Trichoderma* sobre **Sclerotinia sclerotiorum** patógeno en cultivos de amaranto (*Amaranthus* spp.) *Amarantos*. 24: 3-8.
- Noelting, M.C.I., Sandoval, M.C. 2007. First report of stem canker affecting *Amaranthus caudatus* in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 2(1): 55.
- Noelting, M.C.I., Sandoval, M.C., Molina M.C. 2009. Primera cita de *Albugo bliti* micoparasitado por *Epicoccum nigrum*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 44 Suplemento: 125-126.
- Novo, R.J., Viglianco, A., Perez, M.A., Cavallo, A. 2009. Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su relación con la calidad fisiológica *Revista Brasileira de Sementes* 31(4): 160-167.
- Ochoa-Sánchez, J.C., Parra-Cota, F.I., Aviña-Padilla, K., Délano-Frier, J. Martínez-Soriano, J.P. 2009. *Amaranthus* spp.: a new host of „Candidatus Phytoplasma aurantifolia *Phytoparasitica* 137: 381-384.
- Ogórek, R., Plaskowska, E. 2011. *Epicoccum nigrum* for biocontrol agents in vitro of plant fungal pathogens. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 76. 691-697.
- Okoth, S.A., Otadoh, J.A., Ochanda, J.O. 2011. Improved seedling emergence and growth of maize and beans by *Trichoderma harziunum* *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 65-71.

- Olivier, C., Galka, B. 2008. Consequences of phytoplasma infection on canola crop production in the Canadian prairies. In: Proceedings of endure international conference, diversifying crop protection, 12-15 October, La GrandeMotte, France, and 1-47, pp 1-4.
- Omami, E.N., Hammes, P.S. 2010. Interactive effects of salinity y water stress on growth, leaf wáter relations, y gas exchange in amaranth (*Amaranthus* spp.) *New Zealy. Journal of Crop y Horticultural Science* 34: 33-34.
- Ou, S.H. 1972. Rice Diseases. CAB Internacional Mycological Institute Kew, Surrey, England, 368 p.
- Pankaj, S., Singh, N., Verma, O.P. 2011. First Report of *Curvularia lunata* Associated with Leaf Spot of *Amaranthus spinosus*. *Asian Journal of Plant Pathology* 5: 100-101. <https://dx.doi.org/10.3923/ajppaj.2011.100.101>. Disponible 15/11/2016.
- Pant, S. 2006. Mycopathological Studies on *Amaranthus paniculatus* Linn. In Almora 2006. Thesis Submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Botany Kumaun University, Nainital Laboratory of Microbial Ecology and Plant Pathology Department of Botany Kumaun University, S.S.J. Campus, Almora (Uttaranchal), India shodhganga.inflibnet.ac.in <http://hdl.handle.net/10603/172291>. Disponible 18/11/2008.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- Paredes, C.M., Sato, V. 2011. Proyecto Kiwicha en Argentina (Amaranto) “Agricultura Autóctona para el desarrollo humano y social como única alternativa para la lucha contra el hambre en la región Salta-Argentina” (AID N° 8961/CIPSI/ARG) <https://www.unl.edu.ar/iberoextension/dvd/archivos/ponencias/mesa1/agricultura-autoctona-para-e.pdf>. Disponible 29/3/2017.
- Patriarca, A., Azcarate, P., Terminiello, L., Fernandez Pinto, V. 2007. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119(3): 219-222. Disponible 8/12/2020. http://hdl.handle.net/20.500.12110/paper_01681605_v119_n3_p219_Patriarca.
- Pavón Moreno, M.Á., González Alonso I., Martín de Santos R., García Lacarra T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp.* 27(6): 1772-1781.
- Peiretti, E.G., Gesumaria, J.J. 1998. Influencia de la distancia entre líneas sobre el crecimiento y rendimiento de amaranto granífero (*Amaranthus* spp). *Invest. Agr Prod. Veg.* 13(1-2): 139-151.
- Peiretti, P. G. 2018. *Amaranth* in animal nutrition: A review. *Livestock Research for Rural Development.* 30. 21 p.
- Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
- Perello, A.E., Aulicino, M.B., Martinelli, C., Regueira, M., Moreno, M.V. 2015. Caracterización morfo-cultural de nuevos grupos taxonómicos de *Alternaria* asociados a enfermedades del trigo en Argentina; Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata; *Revista Ciencias Morfológicas* 1-15. <http://hdl.handle.net/11336/28672>. Disponible 23/3/2020.
- Pérez Fernández, J., Vargas López, J. 1991. Dos enfermedades nuevas de amarantos cultivados en la región pampeana. *Amarantos Novedades e Informaciones* 8: 4-5.
- Pérez-López, E., Dumonceaux, T.J. 2016. Detection and identification of the heterogeneous novel subgroup 16SrXIII-(A/D)I phytoplasma associated with strawberry green petal disease and Mexican periwinkle virescence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 4406-4415.

- Pilkington, J.L., Gibb, K.S., Gurr, G.M., Fletcher, M.J., Nikandrow, A., Elliot, E., Van de Ven, R., Read, D.M.Y. 2003. Detection and identification of a phytoplasma from lucerne with Australian lucerne yellows disease. *Plant Pathology* 52: 754-762.
- Pitt J.I; Hocking A.D. 1997. Fungi Food Spoilage. (London, Blackie Academic and Professional).
- Porr, M. 2012. El amaranto: pequeñas semillas con fuerzas colosales http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004 Disponible 28/5/2014.
- Porterfield, A. 2020. Viewpoint: Organic fungicide copper sulfate and other copper products widely used by wine growers endangers humans, animals and insects. <https://geneticliteracyproject.org/>. Disponible el 30/10/2021.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities Potentials and challenges. *Food Control* 47: 381-391.
- Primavesi, A. 1990. Manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Nobel, 1990. 549 p.
- Pusz, W. 2009a. Fungi from seeds of *Amaranthus* spp. *Phytopathologia* 54: 15-21.
- Pusz, W. 2009b. Valuation of the healthiness of *Amaranthus* leaves. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu -Rolnictwo* 95(574): 51-61.
- Pusz, W., Plaskowska, E., Yildirim, I., Weber, R. 2015. Fungi occurring on the plants of the genus *Amaranthus* L. *Turkish Journal of Botany* 39: 147-161.
- Rajput, R.B., Chaudhari, S.R. 2018. Screening of fungicides against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler In vitro condition International. *Journal of Chemical Studies* 6(4): 971-974.
- Ramires, F. A., Masiello, M., Somma, S., Villani, A., Susca, A., Logrieco, A. F., Luz, C., Meca, G., Moretti, A. 2018. Phylogeny and mycotoxin characterization of *Alternaria* species isolated from wheat grown in Tuscany, Italy. *Toxins*, 10 (11): 472.
- Rangaswami, G., Mahadevan, A. 1988. Diseases of crop plant in India 4th edition Published by Asoke K; Ghosh 507 p.
- Rapussi, M.C.C., Eckstein, B., Flôres, D., Haas, I.C.R., Amorim, L., Bedendo, I.P. 2012. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. *European Journal of Plant Pathology* 133: 829-840.
- Rastogi, A y Shukla, S. 2013. *Amaranth*: A new millenium crop of nutraceutical values, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:2,109-125 <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1080%2F10408398.2010.517876>. Disponible 25/4/2015.
- Reguera, M., Haros, C. M. 2017. Structure and Composition of Kernels. En C. Haros & R. Schoenlechner (Eds.), *Pseudocereals: Chemistry and Technology* (pp. 28-48). Ohn Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118938256.ch2>. Disponible 2/2/2018.
- Reig Armiñana, J., García Breij, F. 2016. Técnicas de histología vegetal 40 p.
- Reinaudi, N., Repollo, R., Janovská, D., Délamo Frier, J., Martín de Troiani, R. 2011. Evaluación de genotipos de amaranto (*Amaranthus* spp.) para la adaptabilidad productiva en el área de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de la Pampa, Argentina. *Revista Científica UDO Agrícola*. 11(1): 50- 57.
- Reino, J.L., Guerrero, R.G., Hernández-Galán, Collado, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev.* 7: 89-123. doi: <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>. Disponible 3/6/2016.
- Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., Mauricio-Castillo, J.A. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. *Folleto Técnico Núm 56. Campo Experimental Zacatecas*. CIRNOC-INIFAP, 41 p.

- Ries, S.K., Everson, E.H. 1973. Protein content and seedsize relationship with seedling vigor of wheat cultivar. *Agronomy Journal* 65: 884-886.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Res Mycol.* 116: 1-56.
- Rivas-Valencia, P., Muñiz-Reyes, E., Espitia-Rangel, E. 2012. Cap IX Aspectos fitosanitarios en el cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.) In: Espitia Rangel E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología. Libro Científico No. 2. INIFAP/SINAREFI. México pp. 269-290.
- Robertson, K. 1981. The genera of Amaranthaceae in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 62: 268-294.
- Rogério, F., Benetoli da Silva, T.R., dos Santos, J.I., Alenbrant Migliavacca, R., Dias Arieira, C.R., de Castro Salvestro, A., de Oliveira, V.B; Silva Lima, W. 2012. Seed treatment influence with carboxin + Thiram to initial development of safflower plants. *Journal of Food Agriculture and Environment.* 10(2): 675-676.
- Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Lee, I., Aragón-García, A. 2009. Identificación de un aislamiento del grupo 16SRIII, *Candidatus* Phytoplasma pruni en plantas y semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L. en México. *Agrociencia* 43: 851-860.
- Roque-Siguas, O. J. 2019. Requerimiento térmico de las fases fenológicas de dos variedades de amaranto (*Amaranthus caudatus* L): precoz y tardía en Ayacucho. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(1): 18-31. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592019000100003&lng=es&tlng=es. Disponible 9/11/2022.
- Roskopf, En: Charudattan, R., Shabana, Y.M., Benny, G.L. 2000. *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. *Mycologia* 92(1): 114-122. The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology and Pathogenicity *American Phytopathological Society Press*, St. Paul, MN, USA.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J.C. 2002. Method for the detection, isolation and characterization Tion of food-borne fungi. p. 283–297. In: “Introduction to Food and Airborne Fungi” (R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C.Frisvad, O. Filtenborg, eds.). Centraalbureau voor Schimmecultures Utrecht, Utrecht, The Netherlands, 389 p.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100: 923-35.
- Sánchez, E., Osada, K.D., Téliz, O.E. Espitia, R., Rendón, G.S. 1990. Etiología e incidencia de la mancha negra del tallo en *Amaranthus* sp. y otras enfermedades. *Rev. Mex. Fitopatol.* 8: 102-106.
- Sánchez, E.M., Espitia, R.E., Osada, K.S. 1991. Etiología del Tizón (*Alternaria tenuis*) en Amaranto (*Amaranthus* sp.). p. 66. In Primer Congreso Internacional del Amaranto. September 22-27. Oaxtepec, Morelos, México.
- Sandoval, M.C., Fállico, L. M., Noelting, M.C., Corcuera, V.R., Cid, P., Raggio, G. 2006. Estrategia de control biológico de *Alternaria alternata* Keissler patógeno de *Coriandrum sativum* con *Trichoderma harzianum* Rifai *Rev. Protección Veg.* 21(1): 31-36.
- Sarasola, A.A., Rocca de Sarasola, M.A. 1975. Fitopatología Curso Moderno. Tomo II Micosis. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 374 p.
- SAS Institute Inc. 2016. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., USA.
- Satta, E., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. 2019. Phytoplasma Transmission by Seed: Transmission and Management of Phytoplasma Associated Diseases. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-2832-9_6 Disponible 22/10/2020
- Sauer, J.D. 1950. The grain amaranth: a survey of their history y classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-616.

- Sauer, J.D. 1967. The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 54: 103-137.
- Scott, P.M. 2001. Analysis of agricultural commodities of foods for *Alternaria* mycotoxins. *J. AOAC Inter.*, 6: 1809-1817.
- Schmidt, D. 1977. Grain amaranth: A look at some potentials. In: «the Proceedings of the First Amaranth Conference». Rodale Press, Emmaus, PA. 121 p.
- Seemüller, E., Garnier, M., Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. En S. Razin y R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, Nueva York, NY (Estados Unidos de América). pp. 91-115.
- Simmonds, E.G. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon*, 55: 55-163.
- Simmons, E.G. 2007. *Alternaria*, An Identification Manual. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 775 p. Disponible 14/2/2017 [https://www.scirp.org/\(S\(vtj3fa45qm1ean45vvffcz55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=839427](https://www.scirp.org/(S(vtj3fa45qm1ean45vvffcz55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=839427).
- Singh, K., Rai, M. 2003. Evaluation of chemicals against *Alternaria* leaf spot of brinjal. *Ann. Plant Prot. Sci.*, 11: 394-395.
- Singh, R. S. 2002. *Introduction to Principles of Plant Pathology*, 4th ed, Oxford IBH Publishing Co. Pvt.Ltd, New Delhi, 398 p.
- Singhal, B.Y. 1984. Inicios de la investigación en amaranto, como cultivo alimenticio, en el subcontinente Hindu. Washington D.C.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 1988. *Amaranths—an underutilized resource*. *International Journal of Food Science & Technology* 23: 125-139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00559.x>. Disponible 7/9/2018.
- Sisterna, M., Sarandón, S.J. 2000. Blackpoint incidence on durum wheat in Argentina: influence of cultivar and location. *Acta Agron. Hung.* 48: 395-401.
- Sisterna, M.N. 1987. Especies Graminícolas de los Géneros *Drechslera*, *Bipolaris* y *Exserohilum* en Argentina. *Turrialba* 37: 45-51.
- Sisterna, M.N., Carranza, M.R. 2004. Occurrence of *Drechslera avenae* on durum wheat (*Triticum durum*) seed in Argentina. *Australasian Plant Pathol.* 33: 459-460.
- 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: 464. Villa Carlos Paz, Córdoba.
- Sisterna, M.N., Minhot, R.D. 2004. Dos nuevas especies de Dematiaceas asociadas al manchado del grano de trigo en Argentina. Actas del VI Congreso Nacional de Trigo: 275. Bahía Blanca, Buenos Aires.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1962. The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. *International Association for Plant Taxonomy*, 11: 33-40.
- Soltanpour, P.N., Harrison, M.D. 1974 Interrelations between nitrogen and phosphorus fertilization and early blight control of potatoes. *Am. Potato J.* 51:1-7
- Statistix for Windows. 1985-2003. Analytical Software version 8.
- Sulyok M, Stadler D, Steiner D, Krska R. 2020. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Anal Bioanal Chem.* 412(11): 2607-2620. doi: 10.1007/s00216-020-02489-9. PMID: 32078002; PMCID: PMC7136310.
- Sumar Kalinowski, L. 1993. La kiwicha y su cultivo. Editorial(es): Centro Bartolomé de las Casas 82.

- Suquilanda-Valdivieso, M.B. 2007. Producción orgánica del amaranto (Cap. 9) en Producción Orgánica de Cultivos Andinos. UNOCANC Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 192 p.
- Surekha, C., Neelapu, N.R.R; Kamala, G; Siva Prasad, B; Sankar Ganesh P. 2013. Efficacy of *Trichoderma viride* to induce disease resistance and antioxidant response in legume vigna mungo infested by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)* 3(2): 285-294.
- Suryawanshi, A.P., Patil, A.C., Anbhule, K.A., Hurule, S.S and Raner, R.B. 2018. Efficacy of Seed Dressing Fungicides against Major Seed borne Fungi of Sunflower *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences Special*. 6: 2521-2526.
- Tapia, M. 1997. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- Templeton, G.E., Grable, I.C., Fulton, N.D., Meyer, W.L. 1967. Tentoxin from *Alternaria tenuis*: its isolation and characterization. Proceedings of the Mycotoxin Research Seminar, Washington, D. C., June 8-9. United States Department of Agriculture. pp. 27-29.
- Teri, J.M., Mlasani, D K. 1994. *Choanephora blight* and *Alternaria* leaf spot of Amaranth in Tanzania. *Plant Pathology* 43: 228-229.
- Thejakumar, M.B., Devappa, V. 2016. Efficacy of different fungicides against *Alternaria alternata* and *Cercospora capsici* under in-vitro conditions. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(5): 126-129.
- Torres Saldaña, G., Santos, T.A., Trujillo Reyna, H., Castillo Juárez, A., Estrada Escalante, A., León, González, A. 2006. Respuesta de germoplasmas de amaranto a densidades de población. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(4): 307-312.
- Tort, N., Turkyilmaz, B. 2003. Physiological Effects of Captan Fungicide on Pepper (*Capsicum annuum* L.) *Plant. Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6: 2026-2029. <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2003.2026.2029> Disponible el 01/06/2021.
- Transue, D.K., Fairbanks, D., Robison, L., Andersen, W. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop Sci* 34: 1385- 1389. *Technol* 31: 309-316. Disponible 20/11/2020. URL:<https://scialert.net/abstract/?doi=ajppaj.2011.100.101>.
- Uzo, J.O., Okorie, A.U. 1983. *Amaranthus hybridus*. A potential grain crop for West Africa. *Nutr. Rep. Intl.* 27:519.
- Van der Plank, J.E. 1963. Plant Diseases: Epidemics and Control, Academic Press, New York, 349.
- Varshney, J.L. 1990. Seed-borne diseases of wheat their impact in relation to production and productivity. *Int. J. Trop. Dis.* 8: 173 -192.
- Ventakrishnaiad, N.S. 1952. Blight of *Amaranthus paniculatus* L. caused by *Alternaria* *Phytopathology* 42: 668-669.
- Vígláš, J., Olejníková, P. 2019. *Trichoderma atroviride*: an isolate from forest environment *Acta Chimica Slovaca* 12(1): 46-55. Disponible 23/4/2020 <https://sciendo.com/article/10.2478/acs-2019-0008>.
- Vijayalakshmi, G., Karuna, K., Mahadevaswamy, G. 2018. Evaluation of Microbial Biocontrol Agents and Fungicides against *Alternaria helianthi* causing Leaf Blight of Sunflower. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 2726-2730. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.326> Disponible 4/12/2020.
- Vishwanath, V., Sulyok, M., Labuda, R., Bicker, W., Krska, R. 2009. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 1355-1372.
- Waghunde, R.R., Shelake, R.M., Sabalpara, A.N. 2016. *Trichoderma*: a significant fungus for agriculture and environment. *Afr J Agric Res.* 11: 1952-1965. .
- Walter, C.W. 2001. Eat, drink and be healthy. *Free Press New York* 132 p.

- Walther, D., Gindrat, D. 1988. Biological control of damping-off of sugarbeet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas* sp. *Can J Microbiol* 34: 631-637.
- Wang, H., Li, J., Bostock R.M., Gilchrista D.G. 1996. Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *The Plant Cell* 8: 375-391.
- Weaver, S.E., McWilliams, R.L. 1980. The biology of Canadian weeds 44. *Amaranthus retroflexus* L: A. powelli Wats and A. hybridus L. *Canadian Journal of Plant Science*, 60: 1215-1234.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.
- Weintraub, P.G., Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51:91-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>. Disponible 20/7/2019.
- Wildermuth, G.B., Radford, B.J. 1988. Effect of carboxin seed dressing on emergence, coleoptile length and primary leaf growth of wheat and barley *Plant Protection Quarterly* 3(3): 1-3.
- Witsenboer, H.M.A., Van Shaik, C.E., Bino, R.J., Löffler, H.J.M., Hille, J. 1988. Effects of *Alternaria alternata* sp lycopersici toxins at different levels of tomato plant cell development. *Plant Science* 56: 253-260.
- Yang, Y., Zhao, W., Li, Z., Zhu, S. 2011. Molecular identification of a „Candidatus Phytoplasma ziziphi“ related strain infecting amaranth (*Amaranthus retroflexus* L) in China. *Journal of Phytopathology* 159: 635-637.
- Yue, S., Sun, H. 1993. The research and development of grain amaranth in China. In: The research and development of grain amaranth in China (ed. S. Yue). Inst. Of Crop Breeding and Cultivation, *Chinese Acad. Agr. Sciences* 119.
- Zapata, S.R., Silva, E.F., Murillo, B., Soriano, MR. 2009. Enfermedades de la quiwicha en Salta, Argentina. Libro de Resúmenes Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santiago del Estero 111.
- Zhao, S.S., Zhang, Y.Y., Yan, W., Cao, L.L., Xiao, Y., Ye, Y.H. 2017. *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. *FEMS Microbiol Lett.* 364(3): 1-6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw287>. Disponible 20/4/2021.
- Zimand, G., Elad, Y., Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255-1260.
- Zubillaga, F., Kiehr, M., Supiciche, L., Delhey, R. 2012. Mancha del tallo en amaranto granífero (*Amaranthus* ssp.) Libro de Resúmenes las *Jornadas Fitosanitarias Argentinas*, San Luis Res 70.
- Zubillaga, M.F. 2017. Comportamiento del cultivo de amaranto en el Valle Inferior del Río Negro, Argentina. Optimización de las condiciones del cultivo. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Sur. 316 p. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/handle/123456789/4132/Tesis%20Zubillaga.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Disponible el 4/11/2021.

6. ANEXOS

6.1. Medios de cultivo

-Agar agua (AA)

Es un medio pobre en azúcar que favorece el desarrollo de los conidios de los patógenos necrotróficos donde el micelio crece en forma muy rala. Es especialmente usado para hacer aislamientos de punta de hifa. De acuerdo a la consistencia que se quiera dar al medio, se puede hacer con mayor o menor cantidad de agar.

Composición

Ingrediente	Cantidad
agar	15 g
Agua destilada	1 l

Modo de preparación

Disolver 15 g del Agar agar en un litro de agua destilada. Dejar reposar cinco minutos Calentar hasta ebullición con agitación continua. Transferir el medio a tubos, erlenmeyers o frascos, etc. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

-Agar papa glucosado (APG)

Es un medio rico en azúcar que favorece el desarrollo de colonias de patógenos de diferentes grupos taxonómicos

Composición

Ingrediente	Cantidad
papa	200 g
agar	20 g
glucosa	15 g
Agua destilada	1 l

Modo de preparación

Lavar las papas (200 g) cortarlas en trozos pequeños y hervirlas en un litro de agua destilada por 20 min, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 15 libras de presión.

Preparación del medio sintético comercial

Disolver 39 g del Agar papa comercial en un litro de agua destilada. Dejar reposar cinco minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua. Transferir el medio a tubos, erlenmeyers o frascos, etc. esterilizar a 121 °C durante 15 min.

-Agar papa zanahoria (APZ)

Es un medio pobre en azúcar que favorece la esporulación de patógenos necrotrófos como es el caso de *A. alternata*.

Composición

Ingrediente	Cantidad
papa	20 g
zanahoria	20 g
agar	20 g
agua destilada	1 l

Modo de preparación

Cortar papas (20g) y la zanahoria (20g) en trozos pequeños. Colocarlos en un recipiente con 100 ml de agua destilada y llevar a ebullición durante 15 minutos. Filtrar a través de muselina ejerciendo presión sobre los vegetales cocidos para permitir el paso de pequeñas cantidades de los mismos. Colectar el líquido y descartar los trozos de vegetales que permanecieron en la muselina. Agregar agua destilada hasta completar 1 litro. Añadir 20 g de agar y mezclar. Calentar hasta ebullición agitando. Transferir el medio a tubos, Erlemeyers o frascos, etc. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

-Diclorán Rosa de bengala sacarosa y extracto de levadura (DRYES)

Este medio permite diferenciar según el color de las colonias las especies de *Alternaria infectoria* por desarrollar colonias de color beige claro y *A. tenuissima* por desarrollar colonias de color verde oscuro.

Composición

Ingrediente	Cantidad
Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	150 g
Dicloran (0,2 % en etanol)	1 ml
Rosa de bengala (5 % sc., p/v)	0,5 ml
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 l

Modo de preparación

Disolver todos los ingredientes sólidos en el agua destilada, posteriormente agregar los ingredientes líquidos. Calentar hasta ebullición con agitación. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

-FAA

Sirve para fijar y endurecer los tejidos.

Composición

Ingrediente	Cantidad
Formaldehido 40 %	5 ml,
Ácido acético glacial	5 ml
Alcohol etílico 50-70	90 ml.

Coloración de Safranina-Verde rápido

Es una coloración sencilla de realizar y de buen contraste.

Modo de empleo

- 1.- Tinción con Safranina 1 a 2 min.
- 2.- Lavar con abundante agua.
- 3.- Diferenciar con alcohol y ácido acético y lavar con agua.
- 4.- Deshidratar el corte con unas gotas de alcohol 96, antes de la segunda tinción.
- 5.- Tinción con verde rápido.
- 6.- Deshidratar con alcohol etílico absoluto.

7.- Aclarar


8.- Montar con bálsamo de Canadá o en el medio sintético (PMyR)

6.2 Análisis Moleculares

Alternaria alternata

(cepa utilizada en ensayos realizados en el capítulo II)

Standard ID

ITS Region Sequencing 

ITS region service report

Order Number : 190315FN-013
Sample name : 1_config_1

Information

Primer Information

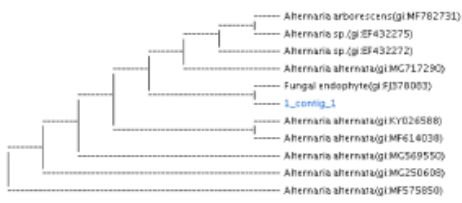
Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5'	(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5'	(TCC TCG GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5'	(TCC TCG GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject

Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	MatchTotal	Pct. (n)
MF575850.1	<i>Alternaria alternata</i>	597	7	580	96	1053	0.0	573/574	99

Kingdom

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Pileosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>



Characterization

Alternaria is a genus of ascomycete fungi. *Alternaria* species are known as major plant pathogens. They are also common allergens in humans, growing indoors and causing hay fever or hypersensitivity reactions that sometimes lead to asthma. They readily cause opportunistic infections in immunocompromised people such as AIDS patients.

Alternaria alternata is a fungus which has been recorded causing leaf spot and other diseases on over 380 host species of plant. It is an opportunistic pathogen on numerous hosts causing leaf spots, rots and blights on many plant parts. It can also cause upper respiratory tract infections and asthma in humans with compromised immunity.

>_1 ITS1.ab1 1242

```
CCCGTAGGGACTGCGGAGGGACATTACACAAATATGAAGCGGGCTGGAA  
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTA  
CTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCT  
TTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAA  
CAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
AAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGT
```

ACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGA
GACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC
ACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTT
TCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCATAAGCCGGGAGGAAAAAAAAAATGGTTTCGTTTCCCTGCGCCTTGCA
TCCTCCCCCGGTCCACCCCTGAAAGTTCGTTAAGGTTAGACGTCACCG
GTGGAACATTTTTCCCCCCCCGGGCCCAAGGGAGGGTGGGGAAACTCC
GGGGGCAAATAAATTGGGGAAAACCCAATATGGGCCATAAAATCCGGGTT
TCCCGGAATTATCCCCCTGGTTAGGGAAGTTTTTCCCGAGGGTAATCACC
CGTCTCCCCTTGACCCCTCCCCAAAACCTGCGCTTGGGCCACCCATAC
CCTTGCCTTTTTTAAGCCTGGCGCCAAACCTCCTCCCGAGCGAAAAAAC
TTACCAAAAAAATTTAAAAATTGGCCGGGCCATATAATTACAAAAAA
ATTGGTATTCCCCCATCCTTTTTTAAAAATTACACTTTTATCAAAAA
CTTTTCCCCGGGGATCCTCTTTACCCCCACCCCTTTTACCCAGGCGCAA
CCTAATTTTCAATATTTACTTTCAGAATTTTTTTAAAAATAAAGCTCCA
CCCAATCCATAGCCTCCCACCACACTTATACCGCTGTTTTAAAATTAATT
ACATTGAAAATTATTTAAAAAAAAAAAAATATGCCCCCCCCCTTAAACCAT
TTTCTCCCCCTACCTCCCCGCCTTAAAACGCTAAAAACGA

>_1_ITS4.ab1 1617

AGGGGGATCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGA
TGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACC
AGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAG
ACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAA
CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC
GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTA
TTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCC
TAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGG
GTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCA
TATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACA

TTTTACTTTCCAAAAAAGAGGAAGGTGTGGTTTCGGGGGGC
CTTTGGCCTCCCACCCCGTCGAACCCTCTGGAATCCCCCTAAGGGT
TTGTCATACCCCGAGGAAAGCTATTGTTTCCCCTATCCTTTTCTTCAA
GGAAGTGTGGGGGAAGACTCCGGGGGGCTCATTAAGTTCTGGGAAAAACC
CCAATATGTTTTCCCCTCAACGCACGGGGGTGGGCCGGAATTCCTTCCC
CCCTGGGTTAGGGGAAAATCTTTTCCCCGAGGGGTGAAAACCACCCCAA
GTTTCCCGGATAAAACAAATCTTTCCCAAATTCATGGGGGATACTTTA
AAATATTTTAAACATTAAGACTTTATTTTAAACCCCAAGGCTTACAAAA
ACCCCCCCCCCTATGCGTTATAATGTTTTTTTTTTAAAATAACCTT
TTTTTTATATTTTTTCGCCAACAGTCCAATTTTTTTTTTCCAAAAA
AAATATTTTATATATAAACTTCCCCCCTGGGGTCCTTTTTCTTCTC
CAGTAATATTTAACCTATTCTTTTTTACCCCAAAGAAAAAACTGTTATG
ACAAGGGGGGGGGGGGGGGGCGACCCTGGTTAAATTTAAACCCCCCCCCC
ACCCCGCCTTCTTTTTTTTTACGGCCGGGGGCATGGTAATTTAACTACC
CTAATTTTTATATTTGGAATTAACCTATTTATGTTTTTTTTCTATAATTAT
ACGGTTACCTGCCTTTGTTTTTTTTCTCTTGACGGTATATAAAGGTGCACG
GGGCCGCGGGCGGGTGTTTAACCTTGTTTACCGTCCAAACCGCTGCCAC
AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCGCGTTTTTCTTTTATTTGAATTTTTT
TTATTTACCCTTTGCTGTTGCGTGATTTTACCGCATTTTAAACAAAAAT
AAAATATATTAATAAACCCCCCCCTCTCCCCTGTTTTGTAATTTAAA
AATAACCTGGCCTGCAACTTTCAATTTTGCCACCCGGCTTTACAATTCAC
ACCGTTTTTACACCACC

Trichoderma atroviride
(Cepa utilizada en ensayos realizados en el capítulo II)

>_T1_EF1.ab1 959

TTAACACCAATAATTGACTCAGGCTTACTATCCTCTCTACTGTCGTGGGG
GGTTCTCTAAGCCGTTGAGGTGCTGAGGGTGAGATTTGCTGAAATCGTC
CCTGGGGGTTCTTATTTGTCGTCAAACAGCTTTCAATCGACTCGGTACTG
ACTTGCCACAACGGGCACGTCGATACCTGAGGGCTACCACCGGGAGGGGA

CCCAATCCCTCGAGCCCTAAAGCCCTCGACTCTGCCGTCGGTGCAGGGGC
CTTCCTCATGAACGCATCGCCATGAGATCTTCCCAAGGCACTGGTCGCTT
GATCTACCAGTGCAGGGTGGTGTGACAAGCGTACCATCAAGAAATTCGAG
AAGGCAGCACATTTTCGGCTTTTTACGCGCTCCCCTGAGCACCATCGTG
TCACGACGATTCTGTACGTGGGCCGTGTCTCTTTTTACCATCACAACT
CACATGCACGCTACAGCGGTTTTACCCCCCTTGACCACAAAAAATATGA
TCAGTACTCTGCGCGGCCTTTCTTCGAGTCCCCACCCCTTGTTTTCTTAG
CCGCAGGCATACAATGCTGCTCGGTCACCGCCACCGAAAAAGAACTAAC
TGGGACCCAGCCTGACGACGCGAGCTCGTCCTCTATCAGCAGTATGCTGA
TCTCGCCCCGGGGAGGAGAACGAAGGTTGGCAGGGGTCTTTCCGATAAT
GGGGGTCTTAGAAAGACCAGGAGGCGCAGGTGGGGCGGGGAGTCCACAAT
CTACAACAATATGGCCGCTCTGTGCAGATTTTCGGAGACTCTCAAAGAAG
CAAGGTCCACCACGTGCATGGTGTATAGTTTTACATTGCCCTCAATAG
ATACACATGGGAAACAGAATCTGACGGGTTCCCCCGAGTACACCCCTCCC
GGCACCCTGGGATGGCCACTAAGAGAATGAGGACGTGGAACCTCTCAGA
AAATGCTGC

>_T1_EF2.ab1 916

TTACCAAACCTAATAGTGATACCGTCTCATTACGGTAGTTGTGTCTCGTT
ACCTATGCTGTGGGGAGAAGGAAAAAATGCTTGACGGGGAGATAAACT
TGGGAGTCTCCGTCTTCCAGAGGGCCTGTCGATGGTGATACCGTCGTATC
GGACGGCCGTGATGTTGTCAAGAACCACGGATACTTGAAAAAACCTTG
CTGAGCTCTTCCGCTTCTAAGATTGAAGCATGATTAGCTCACTGAACCA
CACGGACATGGCGACCACGAGGCTATTGAGTACTCTTCGTTGGGACGGGA
CAGGGGCGATATCGGGGTTGCAGCCAAACAAAAAAGTTGGCACCCAC
TAAAAGCCAAGCAAGGCGGCCAGAGGATTTTGCTGTGCCCCGAGGGGTA
GACAGGTCGGAGGGGTGTGATGCTGCGGCGAAAACAAGTGACGGGACCGA
CGACCCCATAGTCGGACAACATTGTGCTTAGGGAAGTTAGTCAAAAAGA
AAAAGAACTTTGCTTCTTTCGAGTTCCTCGATGGTACACGTTGTCAAACC
GCAGAGCTGGTAGTGCTGTGCCCCACCTCTTGGGAAAAAACCTGCGAG
GCCGCCCTAAGACGGGATGCCCCCCCCACCACAAAAATCGATGTGCTGC

GTGTGGGGGGTAGAGGAAATACACCCCCGGGGTGAATTTCCGGAGCGAC
 TCGGTTTTTGTGTGCAGTCAGGATATGAGATCATTCAAACCTTGTCTGAC
 GGGTGAAATTCTTCCCCCATAACCAAGTTAAGTCTGCCCAAATGGTCTA
 ACACCCCCACTTGTCTACCGCTTAAAGAAATGTCCGTTTCACGAAGGAAT
 GACGAATGGCAAACCTCCCCATGACGACCGACTTGATGTGAGTCTTGCTC
 CTTTACCCTACTACG

Query= 190911-R02_G05_T1_EF2 1 916


Length=916

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
KX463440.1	Trichoderma atroviride strain DAOM242935 translation ...	392	9e-105	
KX463436.1	Trichoderma atroviride strain DAOM242940 translation ...	392	9e-105	
KX463435.1	Trichoderma atroviride strain DAOM242938 translation ...	392	9e-105	
KU738443.1	Trichoderma atroviride isolate ER031 translation elon...	392	9e-105	
KJ871114.1	Trichoderma atroviride culture-collection DAOM:230835...	392	9e-105	
KJ871101.1	Trichoderma atroviride culture-collection BMCC:LU500 ...	392	9e-105	
AB558914.1	Trichoderma atroviride eEF1a1 gene for translation el...	392	9e-105	
AB558906.1	Trichoderma atroviride eEF1a1 gene for translation el...	392	9e-105	
EU280024.1	Trichoderma atroviride strain DAOM 233966 translation...	392	9e-105	
KX463439.1	Trichoderma atroviride strain DAOM242934 translation ...	381	2e-101	
KX603782.1	Trichoderma atroviride isolate POST18 translation elo...	381	2e-101	
KX603781.1	Trichoderma atroviride isolate POST20 translation elo...	381	2e-101	
KJ871109.1	Trichoderma atroviride culture-collection BMCC:LU664 ...	381	2e-101	
KF889262.1	Trichoderma atroviride isolate 158L elongation factor...	381	2e-101	
JN580492.1	Trichoderma atroviride strain PT1 translation elongat...	381	2e-101	
FJ860611.1	Hypocrea atroviridis strain CBS 119499 translation el...	381	2e-101	
AY376051.1	Trichoderma atroviride strain CBS 142.95 translation ...	381	2e-101	
AF456889.1	Trichoderma atroviride isolate DAOM 222144 translatio...	381	2e-101	
AF456886.1	Trichoderma atroviride isolate C.T.R. 81-50 translati...	381	2e-101	
KT619073.1	Trichoderma atroviride strain 33 translation elongati...	379	7e-101	
KJ665422.1	Trichoderma atroviride strain S383 translation elonga...	377	2e-100	
KJ665417.1	Trichoderma atroviride strain S264 translation elonga...	377	2e-100	
KJ871107.1	Trichoderma atroviride culture-collection DAOM:230838...	377	2e-100	
KJ871093.1	Trichoderma atroviride culture-collection DAOM:238037...	377	2e-100	
JN387051.1	Trichoderma atroviride strain TUCIM N154 transcriptio...	377	2e-100	
AB373735.1	Trichoderma sp. TBK-3 EF-1 alpha gene for translation...	377	2e-100	
KF889263.1	Trichoderma atroviride isolate 98L elongation factor ...	375	9e-100	
AF456882.1	Trichoderma atroviride isolate G.J.S. 96-200 translat...	375	9e-100	
KJ665419.1	Trichoderma atroviride strain S360 translation elonga...	372	1e-98	
KJ871100.1	Trichoderma atroviride culture-collection DAOM:230475...	372	1e-98	
FJ629374.1	Trichoderma atroviride strain OY3807 translation elon...	372	1e-98	
EU280011.1	Trichoderma atroviride strain DAOM 179514 translation...	372	1e-98	
KJ871090.1	Trichoderma atroviride culture-collection DAOM:230833...	370	4e-98	
AF456893.1	Trichoderma atroviride isolate G.J.S. 94-105 translat...	370	4e-98	
AF456887.1	Trichoderma atroviride isolate G.J.S. 98-134 translat...	370	4e-98	
AF456883.1	Trichoderma atroviride isolate G.J.S. 95-113 translat...	370	4e-98	

Alternaria alternata
(cepa utilizada en ensayos realizados en el capítulo III)

Standard ID

ITS region service report



Order Number : HC00645176
 Sample name : STRAIN1_contig_1

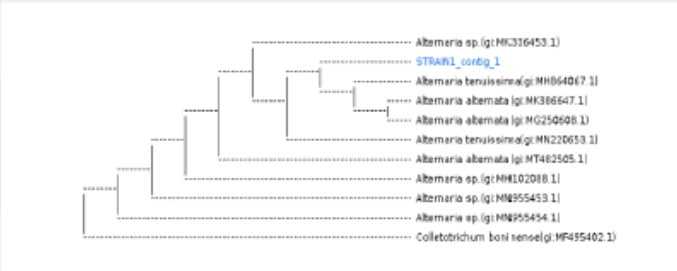
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS5	5' (TCC GTA GGT GAA OCT GCG G) 3'	ITS5	5' (TCC GTA GGT GAA OCT GCG G) 3'
ITS4	5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4	5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
MT482505.1	<i>Alternaria alternata</i>	584	19	584	96	1040	0.0	566/567	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>



Characterization

Alternaria is a genus of ascomycete fungi. Alternaria species are known as major plant pathogens. They are also common allergens in humans, growing indoors and causing hay fever or hypersensitivity reactions that sometimes lead to asthma. They rarely cause opportunistic infections in immunocompetent people with an AIDS-related deficiency.
 Alternaria alternata is a fungus which has been recorded causing leaf and other diseases on over 200 host species of plants. It is an opportunistic pathogen on numerous foods causing leaf spots, rots and blights on many plant parts. It can also cause upper respiratory tract infections and asthma in humans with compromised immunity.

BLASTN 2.13.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
 86,584,084 sequences; 888,082,006,011 total letters

Query= STRAIN1_contig_1

Length=567

Sequences producing significant alignments:

	Score	E
	(Bits)	Value
MT482505.1 <i>Alternaria alternata</i> isolate H9 small subunit ribosoma...	1040	0.0
MK336453.1 <i>Alternaria</i> sp. 2 YHY-2018 strain Y. H. Yeh I0619 small...	1040	0.0
MN955454.1 <i>Alternaria</i> sp. isolate DL01L-9.14 small subunit riboso...	1040	0.0
MN955453.1 <i>Alternaria</i> sp. isolate LD1T-1.15 small subunit ribosom...	1040	0.0
MN220653.1 <i>Alternaria tenuissima</i> isolate NOU759 small subunit rib...	1040	0.0
MK386647.1 <i>Alternaria alternata</i> isolate TAG15L small subunit ribo...	1040	0.0
MF495402.1 <i>Colletotrichum boninense</i> strain LCM853.01 small subuni...	1040	0.0
MH102088.1 <i>Alternaria</i> sp. strain FP-027-B2 18S ribosomal RNA gene...	1040	0.0
MG250608.1 <i>Alternaria alternata</i> isolate RG3 small subunit ribosom...	1040	0.0

MH864067.1	Alternaria tenuissima culture CBS:126072 strain CBS 12...	1040	0.0
NR_163686.1	Alternaria alstroemeriae CBS 118809 ITS region; from ...	1040	0.0
MH862797.1	Alternaria gossypina culture CBS:102597 strain CBS 102...	1040	0.0
MK460969.1	Alternaria sp. strain ISK3_9 small subunit ribosomal R...	1040	0.0
MK460964.1	Alternaria sp. strain ISK3_2 small subunit ribosomal R...	1040	0.0
MK460944.1	Alternaria sp. strain ISK1_11 small subunit ribosomal ...	1040	0.0
MK460794.1	Alternaria arborescens strain CSK2_6 small subunit rib...	1040	0.0
MK432746.1	Alternaria alternata isolate JAC13120 small subunit ri...	1040	0.0
MK432742.1	Alternaria alternata isolate JAC12721 small subunit ri...	1040	0.0
MK432736.1	Alternaria alternata isolate JAC12711 small subunit ri...	1040	0.0
KY977546.1	Alternaria sp. isolate 103_LI.ST53.IZV1 small subunit ...	1040	0.0
MF767407.1	Alternaria alternata isolate CF2.1B small subunit ribo...	1040	0.0
MF575850.1	Alternaria alternata isolate DYT320 small subunit ribo...	1040	0.0
MF435129.1	Alternaria sp. isolate ECU81 small subunit ribosomal R...	1040	0.0
MF435090.1	Alternaria sp. isolate ECU42 small subunit ribosomal R...	1040	0.0
MF435063.1	Alternaria arborescens isolate ECU15 small subunit rib...	1040	0.0
MF435050.1	Alternaria sp. isolate ECU1 small subunit ribosomal RN...	1040	0.0
KY075667.1	Alternaria alternata isolate 30 small subunit ribosoma...	1040	0.0
KX768144.1	Alternaria arborescens isolate NAS-3 small subunit rib...	1040	0.0
KX270745.1	Alternaria sp. isolate FAA1 18S ribosomal RNA gene, pa...	1040	0.0
KU059951.1	Alternaria alternata isolate E-530.1 18S ribosomal RNA...	1040	0.0
KU164017.1	Uncultured fungus clone S211T_11 18S ribosomal RNA gen...	1040	0.0
KR094438.1	Alternaria sp. G326 18S ribosomal RNA gene, partial se...	1040	0.0
KM520362.1	Alternaria sp. TIE 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	1040	0.0
QP445267.1	Alternaria sp. strain ZHKUCC22-0248 small subunit ribo...	1040	0.0
KM215624.1	Alternaria sp. G57 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	1040	0.0
KM215615.1	Alternaria sp. G40 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	1040	0.0
KM246282.1	Alternaria arborescens isolate C3/05 18S ribosomal RNA...	1040	0.0
OW987984.1	Alternaria arborescens genomic DNA sequence contains 1...	1040	0.0
OW986627.1	Alternaria alternata genomic DNA sequence contains 18S...	1040	0.0
OW984535.1	Alternaria arborescens genomic DNA sequence contains 1...	1040	0.0
OW984533.1	Alternaria arborescens genomic DNA sequence contains 1...	1040	0.0
OW984532.1	Alternaria arborescens genomic DNA sequence contains 1...	1040	0.0
OW984464.1	Alternaria alternata genomic DNA sequence contains 18S...	1040	0.0
OW983070.1	Alternaria arborescens genomic DNA sequence contains 1...	1040	0.0
ON413667.1	Alternaria alternata isolate H67 small subunit ribosom...	1040	0.0
ON413666.1	Alternaria alternata isolate H61 small subunit ribosom...	1040	0.0
ON413664.1	Alternaria alternata isolate H75 small subunit ribosom...	1040	0.0
ON413662.1	Alternaria alternata isolate H73 small subunit ribosom...	1040	0.0
ON413660.1	Alternaria alternata isolate H66 small subunit ribosom...	1040	0.0
ON413659.1	Alternaria alternata isolate H49 small subunit ribosom...	1040	0.0
EF504952.1	Uncultured endophytic fungus clone 45-12-71 18S riboso...	1040	0.0
OM048931.1	Alternaria sp. strain M56P4 small subunit ribosomal RN...	1040	0.0
MT818389.1	Alternaria alternata isolate UM1272 small subunit ribo...	1040	0.0
MW880914.1	Alternaria alternata isolate PPF-9 small subunit ribos...	1040	0.0
KF731832.1	Alternaria alternata strain BL-7 18S ribosomal RNA gen...	1040	0.0
MW729120.1	Alternaria sp. isolate C2_244-G12_579 small subunit ri...	1040	0.0
MW729106.1	Alternaria sp. isolate C2_167-A11_583 small subunit ri...	1040	0.0
MW580400.1	Alternaria alternata isolate 3 small subunit ribosomal...	1040	0.0
JN867438.1	Alternaria sp. KJ-2012 strain GZU-BCEC15-5 18S ribosom...	1040	0.0
JX454533.1	Alternaria arborescens strain 42 18S ribosomal RNA gen...	1040	0.0
MW376492.1	Alternaria sp. strain Yeh 0007 small subunit ribosomal...	1040	0.0
JQ936187.1	Alternaria arborescens strain C47.1 18S ribosomal RNA ...	1040	0.0
JQ910882.1	Uncultured fungus clone FE5 18S ribosomal RNA gene, pa...	1040	0.0
MW017709.1	Alternaria alternata isolate LemidPRPac19 small subuni...	1040	0.0
MT804603.1	Alternaria alstroemeriae strain FNBRI_HR1 small subun...	1040	0.0
MT883437.1	Alternaria arborescens isolate iso2 small subunit ribo...	1040	0.0
GU584946.1	Alternaria sp. I461 18S ribosomal RNA gene, partial se...	1040	0.0
AY154682.1	Alternaria alternata 18S ribosomal RNA gene, partial s...	1040	0.0
MT482506.1	Alternaria alternata isolate H10 small subunit ribosom...	1038	0.0
MK386645.1	Alternaria alternata isolate CBL3 small subunit riboso...	1038	0.0
MH141276.1	Alternaria alternata strain Y.H. Yeh V0401 small subun...	1038	0.0
MF435161.1	Alternaria arborescens isolate ECU113 small subunit ri...	1038	0.0
MF435123.1	Alternaria sp. isolate ECU75 small subunit ribosomal R...	1038	0.0
MF435081.1	Alternaria arborescens isolate ECU33 small subunit rib...	1038	0.0
MF435068.1	Alternaria sp. isolate ECU20 small subunit ribosomal R...	1038	0.0
ON705327.1	Alternaria sp. XJ-2022c strain YMF1.07338 small subuni...	1038	0.0
ON226887.1	Alternaria alternata strain T25 small subunit ribosoma...	1038	0.0
MW880916.1	Alternaria alternata isolate PPF-11 small subunit ribo...	1038	0.0
MW729115.1	Alternaria sp. isolate C2_199-A7_578 small subunit rib...	1038	0.0
MW729064.1	Alternaria sp. isolate C1_239-D12_575 small subunit ri...	1038	0.0
MW729056.1	Alternaria sp. isolate C1_180-B10_576 small subunit ri...	1038	0.0
MN912308.1	Alternaria sp. isolate B51 small subunit ribosomal RNA...	1038	0.0
MN615420.1	Alternaria alternata strain YZU 191238 18S ribosomal R...	1037	0.0
MT573466.1	Alternaria tenuissima isolate 4 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MT573464.1	Alternaria alternata isolate 2 small subunit ribosomal...	1037	0.0
MT548677.1	Alternaria alternata isolate F_HDL_5 small subunit rib...	1037	0.0
MK972907.1	Alternaria alternata strain BQSZ9 small subunit riboso...	1037	0.0

MK968038.1	Alternaria alternata strain YC10 small subunit ribosom...	1037	0.0
MK972909.1	Alternaria alternata strain YC9 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MK972908.1	Alternaria tenuissima strain YC6 small subunit ribosom...	1037	0.0
MK972906.1	Alternaria alternata strain YC8 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MK968044.1	Alternaria alternata strain BQSZ13 small subunit ribos...	1037	0.0
MK968042.1	Alternaria alternata strain BQSZ6 small subunit riboso...	1037	0.0
MT495455.1	Alternaria alternata strain EX2019-M2 small subunit ri...	1037	0.0
MK805511.1	Alternaria alternata strain MSS623 small subunit ribos...	1037	0.0
MT453271.1	Alternaria alternata isolate DSM100286_DF09_RLCS10 sma...	1037	0.0
MN402464.1	Alternaria alternata isolate SQCM-03 small subunit rib...	1037	0.0
MN341242.1	Alternaria alternata isolate KoRLI047366 small subunit...	1037	0.0
MN341241.1	Alternaria alternata isolate KoRLI047365 small subunit...	1037	0.0
MN341240.1	Alternaria alternata isolate KoRLI047135 small subunit...	1037	0.0
MN341239.1	Alternaria alternata isolate KoRLI046185 small subunit...	1037	0.0
MT269274.1	Alternaria alternata isolate S2 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MN547372.1	Alternaria alternata isolate RS2-S1-01 small subunit r...	1037	0.0
MT133285.1	Alternaria alternata isolate BRD3-085E small subunit r...	1037	0.0
MT133282.1	Alternaria alternata isolate BRD3-084B small subunit r...	1037	0.0
MT133269.1	Alternaria alternata isolate BRD3-079B small subunit r...	1037	0.0
MT133263.1	Alternaria alternata isolate BRD3-078F small subunit r...	1037	0.0
MT133262.1	Alternaria alternata isolate BRD3-078E small subunit r...	1037	0.0
MT133260.1	Alternaria alternata isolate BRD3-078B small subunit r...	1037	0.0
MT089989.1	Alternaria alternata isolate TY172-17 small subunit ri...	1037	0.0
MT089982.1	Alternaria sp. isolate TY172-10 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MT035960.1	Alternaria sp. isolate PE_29 small subunit ribosomal R...	1037	0.0
MK336585.1	Alternaria sp. 2 YHY-2018 strain Y. H. Yeh I0803 small...	1037	0.0
MK336458.1	Alternaria sp. 2 YHY-2018 strain Y. H. Yeh I0629 small...	1037	0.0
MK336623.1	Alternaria sp. 2 YHY-2018 strain Y. H. Yeh I0508 small...	1037	0.0
MK336484.1	Alternaria sp. 2 YHY-2018 strain Y. H. Yeh I0311 small...	1037	0.0
MN944587.1	Alternaria alternata isolate ALT8 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944586.1	Alternaria alternata isolate ALT7 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944585.1	Alternaria alternata isolate ALT6 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944584.1	Alternaria alternata isolate ALT5 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944583.1	Alternaria alternata isolate ALT4 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944582.1	Alternaria alternata isolate ALT3 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944581.1	Alternaria alternata isolate ALT2 small subunit riboso...	1037	0.0
MN944580.1	Alternaria alternata isolate ALT1 small subunit riboso...	1037	0.0
MN460669.1	Alternaria alternata strain Col-3 small subunit riboso...	1037	0.0
MN795758.1	Alternaria alternata isolate P289 small subunit riboso...	1037	0.0
MN685225.1	Alternaria tenuissima strain LJJ2-3 small subunit ribo...	1037	0.0
MN596828.1	Alternaria alternata voucher PVUM-1243 small subunit r...	1037	0.0
MN594810.1	Alternaria alternata isolate JN2 small subunit ribosom...	1037	0.0
MN593339.1	Alternaria tenuissima strain 16 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MN593338.1	Alternaria tenuissima strain JLCB3 small subunit ribos...	1037	0.0
MN593337.1	Alternaria tenuissima strain 3JP9 small subunit riboso...	1037	0.0
MN593336.1	Alternaria alternata strain SJHJ5 small subunit riboso...	1037	0.0
MN593335.1	Alternaria tenuissima strain JLCB2 small subunit ribos...	1037	0.0
MN589744.1	Alternaria alternata isolate JN10 small subunit riboso...	1037	0.0
MN589713.1	Alternaria tenuissima strain MRY19 small subunit ribos...	1037	0.0
MN589684.1	Alternaria alternata strain SJHJ4 small subunit riboso...	1037	0.0
MN589683.1	Alternaria alternata strain BQSZ1 small subunit riboso...	1037	0.0
MN589682.1	Alternaria alternata isolate BQSZ15 small subunit ribo...	1037	0.0
MN589681.1	Alternaria tenuissima isolate JLCB4 small subunit ribo...	1037	0.0
MN559433.1	Alternaria alternata strain B2 small subunit ribosomal...	1037	0.0
MN249628.1	Alternaria alternata strain 19-24 small subunit riboso...	1037	0.0
MN200940.1	Alternaria solani isolate gel small subunit ribosomal ...	1037	0.0
MN077449.1	Alternaria sp. strain GBC-Fungus47 small subunit ribos...	1037	0.0
MN044802.1	Alternaria alternata isolate Alt-C81 small subunit rib...	1037	0.0
MN031262.1	Alternaria alternata isolate Alt-C7 small subunit ribo...	1037	0.0
MK972905.1	Alternaria alternata strain YC1 small subunit ribosoma...	1037	0.0
MK967997.1	Alternaria tenuissima strain YC3 small subunit ribosom...	1037	0.0
MK910070.1	Alternaria angustiovoidea isolate BM15 small subunit r...	1037	0.0

>MT482505.1 Alternaria alternata isolate H9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=584

Score = 1040 bits (563), Expect = 0.0
Identities = 566/567 (99%), Gaps = 1/567 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGC 60
          |||
Sbjct 19  GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGC 78
```

```

Query 61  TGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGCTTTTGCCTACTTCT 120
          |||
Sbjct 79  TGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGCTTTTGCCTACTTCT 138

Query 121 TGTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATC 180
          |||
Sbjct 139 TGTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATC 198

Query 181  AGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC 240
          |||
Sbjct 199  AGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC 258

Query 241  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG 300
          |||
Sbjct 259  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG 318

Query 301  AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA 360
          |||
Sbjct 319  AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA 378

Query 361  TTTGTACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTC 420
          |||
Sbjct 379  TTTGTACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTC 438

Query 421  GCCTTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTC 480
          |||
Sbjct 439  GCCTTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTC 498

Query 481  TATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA 540
          |||
Sbjct 499  TATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA 558

Query 541  GGGATACCGCTGAACTTAAGACATAT 567
          |||
Sbjct 559  GGGATACCGCTGAACTTAAG-CATAT 584

```

6.3. Análisis descriptivo de variables: CAPITULO II. Ensayos a campo

Tabla 6.3.1. Area bajo la curva de progreso de la incidencia del tizón foliar.

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP 1	T1	MTIN	791,73	108,00	62,35	677,38	891,99
CAMP 1	T2	MTIN	277,90	11,55	6,67	270,77	291,22
CAMP 1	T3	MTIN	205,11	64,75	37,38	148,16	275,54
CAMP 1	T4	MTIN	221,36	34,08	19,68	192,04	258,75
CAMP 1	T5	MTIN	174,43	10,36	5,98	163,21	183,62
CAMP 1	T6	MTIN	142,95	62,56	36,12	71,44	187,56
CAMP 1	T7	MTIN	187,24	71,80	41,45	111,21	253,88
CAMP 2	T1	MTIN	345,94	35,71	20,62	318,85	386,40
CAMP 2	T2	MTIN	241,92	46,52	26,86	209,71	295,26
CAMP 2	T3	MTIN	244,78	30,43	17,57	216,04	276,65
CAMP 2	T4	MTIN	168,83	41,61	24,02	135,26	215,38
CAMP 2	T5	MTIN	179,09	33,68	19,45	155,76	217,71
CAMP 2	T6	MTIN	175,51	20,82	12,02	151,47	187,84
CAMP 2	T7	MTIN	157,41	16,12	9,31	139,53	170,83

Tabla 6.3.2. Area bajo la curva de progreso de la severidad del tizón foliar.

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	MTSE	137,92	23,90	13,80	110,48	154,12
CAMP1	T2	MTSE	55,82	7,64	4,41	50,93	64,62
CAMP1	T3	MTSE	41,33	2,29	1,32	39,11	43,68
CAMP1	T4	MTSE	44,95	13,82	7,98	32,86	60,01
CAMP1	T5	MTSE	22,81	18,39	10,62	1,68	35,22
CAMP1	T6	MTSE	33,78	11,57	6,68	24,15	46,61
CAMP1	T7	MTSE	33,93	14,03	8,10	18,24	45,27
CAMP2	T1	MTSE	63,91	1,34	0,77	62,97	65,45
CAMP2	T2	MTSE	37,86	20,23	11,68	22,21	60,70
CAMP2	T3	MTSE	35,98	7,49	4,33	30,85	44,58
CAMP2	T4	MTSE	22,70	3,15	1,82	19,19	25,26
CAMP2	T5	MTSE	26,22	3,23	1,86	23,67	29,85
CAMP2	T6	MTSE	25,77	14,19	8,19	16,22	42,08
CAMP2	T7	MTSE	31,21	6,88	3,97	24,46	38,21

Tabla 6.3.3. Diámetro basal del tallo a cosecha (mm).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	DBT	19,31	0,65	0,37	18,94	20,06
CAMP1	T2	DBT	20,70	0,80	0,46	19,78	21,22
CAMP1	T3	DBT	23,30	1,88	1,09	21,28	25,00
CAMP1	T4	DBT	22,02	0,56	0,32	21,44	22,56
CAMP1	T5	DBT	22,43	1,45	0,84	20,89	23,78
CAMP1	T6	DBT	21,59	0,78	0,45	20,78	22,33
CAMP1	T7	DBT	21,84	0,25	0,15	21,56	22,06
CAMP2	T1	DBT	22,24	2,22	1,28	20,44	24,72
CAMP2	T2	DBT	22,26	2,96	1,71	20,33	25,67
CAMP2	T3	DBT	21,78	1,06	0,61	20,67	22,78
CAMP2	T4	DBT	23,50	1,90	1,10	22,11	25,67
CAMP2	T5	DBT	23,78	1,61	0,93	22,11	25,33
CAMP2	T6	DBT	22,92	1,32	0,76	22,00	24,44
CAMP2	T7	DBT	24,26	1,58	0,91	22,56	25,67

Tabla 6.3.4. Altura de las plantas a cosecha (cm).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	ALT	230,65	16,62	9,59	212,44	245,00
CAMP1	T2	ALT	235,00	11,84	6,84	226,67	248,56
CAMP1	T3	ALT	245,24	17,32	10,00	227,50	262,11
CAMP1	T4	ALT	226,77	7,77	4,48	220,44	235,44
CAMP1	T5	ALT	233,33	13,64	7,87	219,22	246,44
CAMP1	T6	ALT	225,96	12,17	7,02	213,67	238,00
CAMP1	T7	ALT	219,63	2,44	1,41	218,22	222,44
CAMP2	T1	ALT	273,89	14,95	8,63	264,33	291,11
CAMP2	T2	ALT	276,23	15,04	8,69	266,56	293,56
CAMP2	T3	ALT	268,63	4,95	2,86	265,44	274,33
CAMP2	T4	ALT	283,04	9,59	5,54	274,78	293,56
CAMP2	T5	ALT	282,37	4,50	2,60	278,56	287,33
CAMP2	T6	ALT	276,41	7,89	4,55	267,67	283,00
CAMP2	T7	ALT	282,78	4,99	2,88	278,67	288,33

Tabla 6.3.5. Largo de panoja (cm).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	LP	48,41	2,51	1,45	45,56	50,28
CAMP1	T2	LP	50,35	2,96	1,71	47,06	52,78
CAMP1	T3	LP	53,54	4,53	2,62	48,33	56,61
CAMP1	T4	LP	53,79	5,12	2,96	49,44	59,44
CAMP1	T5	LP	49,81	0,35	0,20	49,61	50,22
CAMP1	T6	LP	50,52	2,70	1,56	47,89	53,28
CAMP1	T7	LP	59,02	6,80	3,92	51,17	62,94
CAMP2	T1	LP	54,33	2,11	1,22	52,22	56,44
CAMP2	T2	LP	55,70	2,34	1,35	53,11	57,67
CAMP2	T3	LP	57,59	4,91	2,84	52,44	62,22
CAMP2	T4	LP	58,78	1,31	0,76	57,67	60,22
CAMP2	T5	LP	59,78	3,45	1,99	56,33	63,22
CAMP2	T6	LP	58,37	1,83	1,06	56,56	60,22
CAMP2	T7	LP	56,48	4,11	2,37	54,00	61,22

Tabla 6.3.6. Rendimiento en materia verde.

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	MV	4528,67	206,39	119,16	4330	4742
CAMP1	T2	MV	4757,67	479,49	276,83	4390	5300
CAMP1	T3	MV	5391,67	989,63	571,36	4300	6230
CAMP1	T4	MV	4918,67	492,15	284,14	4362	5296
CAMP1	T5	MV	4892,00	668,41	385,91	4306	5620
CAMP1	T6	MV	4437,00	741,69	428,22	3636	5100
CAMP1	T7	MV	4903,33	758,31	437,81	4050	5500
CAMP2	T1	MV	5458,00	872,11	503,51	4744	6430
CAMP2	T2	MV	5521,67	1045,99	603,91	4821	6724
CAMP2	T3	MV	5315,67	322,72	186,32	5000	5645
CAMP2	T4	MV	6039,33	177,13	102,26	5850	6201
CAMP2	T5	MV	5635,33	615,26	355,22	4925	6001
CAMP2	T6	MV	5736,33	525,72	303,52	5300	6320
CAMP2	T7	MV	6247,67	734,54	424,09	5530	6998

Tabla 6.3.7. Rendimiento en materia seca (g).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	MS	705,67	72,57	41,90	635	780
CAMP1	T2	MS	767,00	101,47	58,59	650	831
CAMP1	T3	MS	892,00	94,49	54,56	820	999
CAMP1	T4	MS	873,67	71,28	41,16	815	953
CAMP1	T5	MS	903,33	15,28	8,82	890	920
CAMP1	T6	MS	770,67	75,39	43,53	705	853
CAMP1	T7	MS	852,00	61,83	35,70	810	923
CAMP2	T1	MS	666,57	65,65	37,90	605,5	736,0
CAMP2	T2	MS	844,53	134,15	77,45	754,4	998,7
CAMP2	T3	MS	832,13	23,71	13,69	807,2	854,4
CAMP2	T4	MS	972,00	57,66	33,29	908,2	1020,4
CAMP2	T5	MS	1002,23	102,77	59,33	930,7	1120,0
CAMP2	T6	MS	791,00	127,01	73,33	679,0	929,0
CAMP2	T7	MS	858,83	151,97	87,74	741,5	1030,5

Tabla 6.3.8. Poder germinativo de las semillas (%).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP1	T1	PG	58,22	1,39	0,80	56,67	59,33
CAMP1	T2	PG	61,11	2,04	1,18	59,33	63,33
CAMP1	T3	PG	73,56	1,54	0,89	72,67	75,33
CAMP1	T4	PG	67,78	3,08	1,78	66,00	71,33
CAMP1	T5	PG	64,44	7,07	4,08	58,00	72,00
CAMP1	T6	PG	81,56	4,82	2,79	76,00	84,67
CAMP1	T7	PG	82,22	2,04	1,18	80,00	84,00
CAMP2	T1	PG	59,56	4,68	2,70	54,67	64,00
CAMP2	T2	PG	64,44	6,81	3,93	56,67	69,33
CAMP2	T3	PG	81,11	2,14	1,24	78,67	82,67
CAMP2	T4	PG	73,89	2,91	1,68	70,67	76,33
CAMP2	T5	PG	69,33	5,81	3,36	65,33	76,00
CAMP2	T6	PG	87,11	2,34	1,35	84,67	89,33
CAMP2	T7	PG	90,22	2,04	1,18	88,00	92,00

Tabla 6.3.9. Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas (%).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP 1	T1	IA	38,67	2,91	1,68	35,33	40,67
CAMP 1	T2	IA	35,78	3,67	2,12	33,33	40,00
CAMP 1	T3	IA	20,22	2,14	1,24	18,67	22,67
CAMP 1	T4	IA	28,89	3,29	1,90	26,67	32,67
CAMP 1	T5	IA	33,78	7,38	4,26	26,00	40,67
CAMP 1	T6	IA	16,67	3,46	2,00	14,67	20,67
CAMP 1	T7	IA	13,78	3,08	1,78	12,00	17,33
CAMP 2	T1	IA	38,00	3,71	2,14	34,00	41,33
CAMP 2	T2	IA	34,22	4,53	2,62	30,67	39,33
CAMP 2	T3	IA	18,89	2,14	1,24	17,33	21,33
CAMP 2	T4	IA	26,11	2,91	1,68	23,67	29,33
CAMP 2	T5	IA	30,67	5,81	3,36	24,00	34,67
CAMP 2	T6	IA	12,89	2,34	1,35	10,67	15,33
CAMP 2	T7	IA	9,78	2,04	1,18	8,00	12,00

Tabla 6.3.10. Peso de 1000 semillas (g).

CAMP	TRAT	Variable	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máx
CAMP 1	T1	PM	0,78	0,05	0,03	0,75	0,84
CAMP 1	T2	PM	0,85	0,06	0,03	0,80	0,91
CAMP 1	T3	PM	0,91	0,03	0,01	0,89	0,94
CAMP 1	T4	PM	0,90	0,02	0,01	0,89	0,92
CAMP 1	T5	PM	0,94	0,01	0,01	0,93	0,95
CAMP 1	T6	PM	0,89	0,07	0,04	0,85	0,97
CAMP 1	T7	PM	0,93	0,03	0,02	0,89	0,95
CAMP 2	T1	PM	0,67	0,01	3,30E-03	0,67	0,68
CAMP 2	T2	PM	0,77	0,03	0,02	0,74	0,79
CAMP 2	T3	PM	0,78	0,02	0,01	0,76	0,80
CAMP 2	T4	PM	0,84	0,09	0,05	0,74	0,92
CAMP 2	T5	PM	0,80	0,06	0,03	0,75	0,86
CAMP 2	T6	PM	0,74	0,05	0,03	0,70	0,79
CAMP 2	T7	PM	0,78	0,04	0,02	0,74	0,82

TRAT: tratamientos, T1 a T7: tratamiento 1 a tratamiento 7; MTIN: Área bajo la Curva de progreso de la incidencia del tizón foliar; MTSE: Área bajo la Curva de progreso de la severidad del tizón foliar; ALT: Altura de planta a cosecha; LP: Largo de panoja; REN: Rendimiento en semillas/m²; MV: Materia fresca/m²; MS: Materia seca/m²; PG: Poder germinativo de semillas; IA1: Incidencia de *Alternaria* spp. en semillas; PM: Peso de 1000 semillas.