



Beca de Entrenamiento

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

Becaria: Cipollone, María Josefina

Director: Ing. Agr. Sisterna, Marina

Lugar de realización: CIDEFI. Curso de Fitopatología. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP).

Período de beca: Octubre de 2015/Septiembre de 2016.

INDICE

RESÚMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	10
RESULTADOS.....	12
Incidencia.....	12
<i>La Dulce</i>	12
<i>Miramar</i>	12
Sanidad de las muestras.....	13
<i>La Dulce</i>	15
<i>Miramar</i>	16
Peroxidasas.....	17
CONCLUSIÓN.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXO 1	22
ANEXO 2	26
ANEXO 3	30

RESUMEN

La producción del trigo candeal está destinada a la obtención de harinas y sémolas para la elaboración de fideos frescos y secos principalmente, teniendo el manchado del grano de trigo una gran incidencia en la calidad harinera. El objetivo del trabajo fue cuantificar la incidencia de la enfermedad en nueve variedades de trigo candeal sembradas en La Dulce y Miramar en dos épocas de siembra, y aislar e identificar a nivel de género el complejo fúngico asociado a la enfermedad, a través del método de APG siguiendo las normas ISTA. Se determinó la actividad enzimática (peroxidasas) en granos de todas las variedades de la primer época de siembra en Miramar, tomando como testigo granos completamente sanos y totalmente enfermos, a través de la oxidación del guayacol (polifenol) por la acción de las peroxidasas lo que se visualizó con la aparición de una coloración rosa-marrón, y se cuantificó con espectrofotómetro a 470 nm.

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

La cuantificación de la actividad de peroxidasas no presentó diferencias en las variedades, como tampoco en los testigos granos machados y granos sanos, manteniéndose la variación de la absorbancia en un minuto en valores similares.

INTRODUCCIÓN

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

La siembra del trigo candeal en Argentina se realiza desde julio a mediados de agosto con la cosecha en diciembre. Su producción se localiza en el sudeste y centro sur de la provincia de Buenos Aires. El área de cultivo se divide en tres subregiones (Figura 1):

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

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

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

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

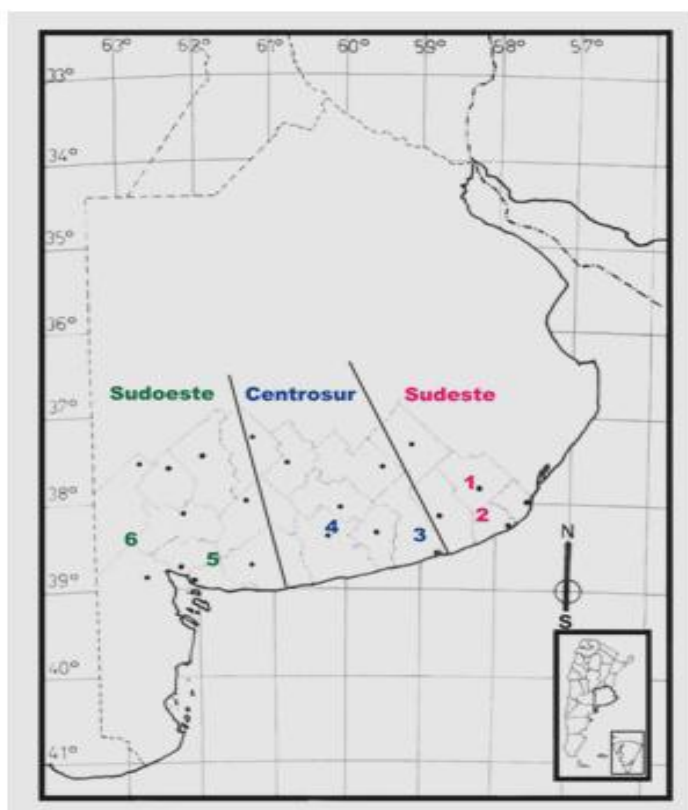


Figura 1: Subregiones de cultivo de trigo candeal.

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

Según datos del Ministerio de Agroindustria de la Nación (Figura 2), el promedio de la superficie sembrada en Argentina en los últimos años es de 55.000 hectáreas aproximadamente y la producción ronda las 150.000 tn/año, con variaciones interanuales importantes debido principalmente a las condiciones agroclimáticas.

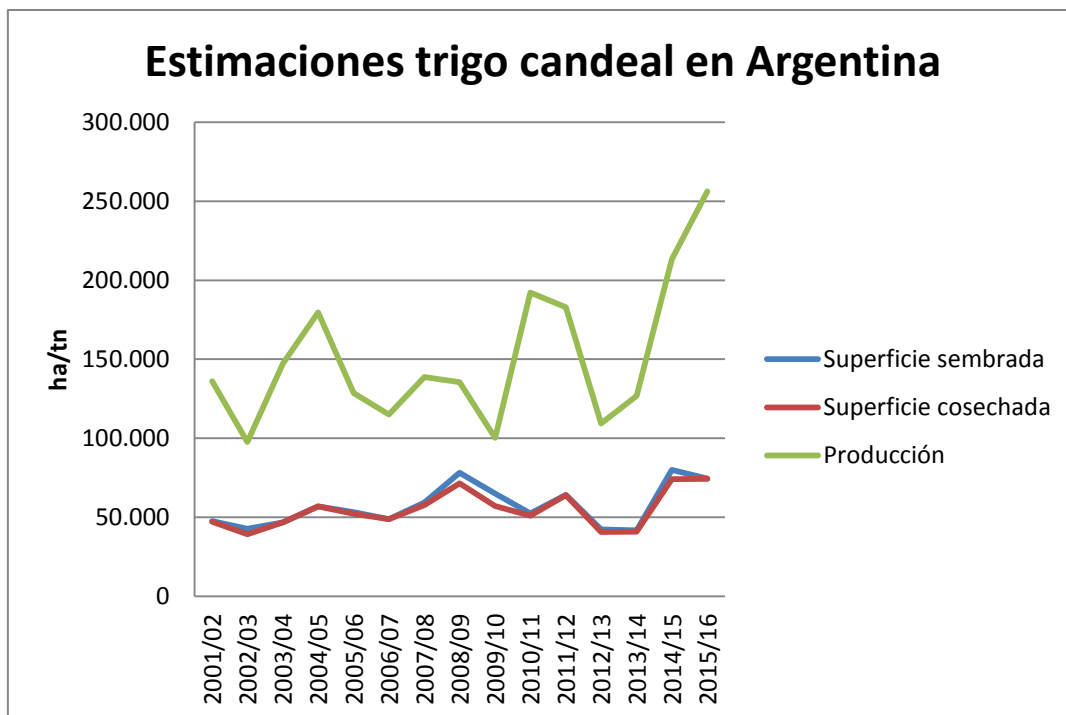


Figura 2: Estimaciones de la producción, y superficie sembrada y cosechada de trigo candeal (Ministerio de Agroindustria de la Nación, 2016).

La producción del trigo candeal está destinada a la obtención de harinas y sémolas para la elaboración de fideos frescos y secos, principalmente porque presenta el doble de pigmento amarillo que el trigo pan, lo que garantiza el color amarillo buscado en los fideos. Además los trigos candeales, por las características del endosperma dan mayor rendimiento de sémola, requieren menor cantidad de agua para su amasado (siendo esto una ventaja cuando las pastas se secan), y los fideos realizados no se desintegran al ser hervidos debido a que tienen una mayor estabilidad. Por lo mencionado anteriormente un grano de calidad molinera debe ser grande, uniforme y de endosperma vítreo. La presencia de granos dañados, descoloridos y de panza blanca reducen el rendimiento y la calidad de las sémolas.

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

El manchado del grano de trigo (Figura 3) se caracteriza por una coloración parda o negra en áreas próximas al embrión, conocida como “escudete negro” (blackpoint),

aunque en ataques importantes también puede extenderse al área circundante, al surco o al cepillo (kernel smudge) (Mathur y Cunfer, 1993). El trigo candeal generalmente es más afectado que el trigo pan (Machacek y Greaney 1938; Graney y Wallace, 1943).

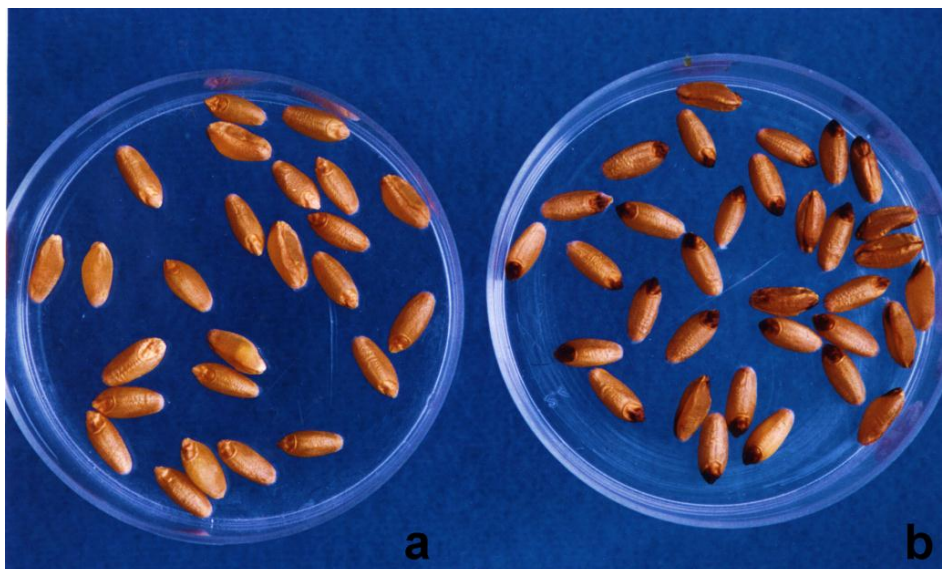


Figura 3: Granos sanos (a) vs. Granos con síntoma de manchado (b).

No habría una sola causa relacionada con los síntomas de manchado. A través de los años, las evidencias más fuertes se han inclinado hacia la infección fúngica. Se ha registrado un complejo de hongos, en su mayoría dematiaceos (hongos con estructuras vegetativas y reproductivas de color pardo oscuro), como *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Exserohilum* spp., y el género *Fusarium* spp. (con micelio y esporas hialinas) (Mathur y Cunfer, 1993; Özer, 2005; Wiese, 1987). Una microflore débil acompaña estos patógenos en los granos de trigo (Sisterna y Lori, 2005), coparasitando la semilla. Los géneros más comúnmente registrados son *Acremonium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Stemphylium*, *Torula*, *Trichothecium*, *Ulocladium* (Neergaard, 1979; Warham *et al.*, 1999; Wiese, 1987). También, otros géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*, pueden causar coloración de la semilla en almacenamiento resultando en fallas de germinación, embriones dañados y producción de micotoxinas (Malaker *et al.* 2008).

El género *Alternaria* abarca especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tales como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados (Carrillo, 2003). En los cultivos de cereales las hojas y los granos son

colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración subepidérmica, si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. El hongo se localiza en las glumas y causa manchas negras y cuando coloniza el endosperma contribuye a reducir la calidad del grano.

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

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

El género ***Bipolaris*** incluye importantes patógenos de plantas con distribución mundial. La característica distintiva de las especies del género *Bipolaris* es la producción de macroconidios multicelulares, elípticos a ovalados, de pared gruesa con superficies lisas, nacidos de conidióforos geniculados en una disposición simpodial. La designación *Bipolaris* surge de la propiedad de formar tubos germinales que se originan desde ambos extremos de los macroconidios en paralelo con el eje longitudinal de la célula (Koneman *et al.*, 2008). Las colonias en medio de cultivo varían en coloración, desde tonalidades blanquecinas o claras, hasta gris oscuro siendo la más frecuente la coloración marrón olivácea oscura. Esta pigmentación oscura de la colonia ha mostrado una fuerte correlación con la agresividad del patógeno.

Las especies de ***Drechslera*** también se caracterizan por la producción de macroconidios multicelulares y cilíndricos que nacen en conidióforos geniculados pero, a diferencia de *Bipolaris*, los conidios germinan por el ápice y los laterales de las células que los componen. Resulta difícil aislar y hacer esporular los hongos de este

género en medios de cultivo ya que en la mayoría de los casos tiende a formar rápidamente la fase sexual (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005). Los macroconidios del género ***Curvularia*** son más fáciles de reconocer en comparación a los de *Bipolaris* y *Drechslera* debido a que tienen cuatro a cinco células separadas por tabiques transversales con la célula central más grande que la de los extremos dándole apariencia curva.

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

Con respecto a la micoflora débil podemos mencionar al género ***Nigrospora*** que desarrolla conidios unicelulares, castaños, de forma globosa o subglobosa, sobre conidióforos simple cortos, oscuros y algo ensanchados, con micelio aéreo de crecimiento radial, blanquecino a grisáceo (Batalla, 2014). El género ***Epicoccum spp.*** que presenta formación de esporodoquios pequeños de color castaño rojizo a oscuros; los conidios son unicelulares, globosos a subglobosos, multiseptados, de color castaño rojizo, con la pared espinuléscente; conidióforos cortos, de color castaño oscuro (Batalla, 2014). ***Stemphylium spp.*** produce macroconidios muriformes (con tabiques transversales y longitudinales), que nacen de modo individual de un conidióforo no geniculado y recto, levemente dilatados y redondeados en la punta mientras que ***Cladosporium spp.*** presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena.

La evidencia de la asociación fúngica con el síntoma fue con frecuencia contradictoria dentro de la literatura (Jacobs y Rabie, 1987; Kaan *et al.*, 1995). Los estudios del origen de esta patología se comenzaron a enfocar entonces hacia la bioquímica de la coloración (Hadaway, 2002; Sulman *et al.* 2001). Numerosos trabajos en tejidos vegetales sugieren que muchas de las reacciones de coloración pueden ser debidas a la oxidación de compuestos fenólicos (Kaan *et al.* 1995). Los síntomas de escudete se encuentran usualmente en el embrión del grano y se ha sugerido que esto puede ser debido a que enzimas como las peroxidasas, conocidas por catalizar la formación de

productos fenólicos coloreados, se localizan en esta región del grano (Williamson, 1997). Existen fuertes evidencias de que estas enzimas estarían implicadas en respuestas de defensa a la entrada de microorganismos patógenos mediante su rol en la formación de lignina y suber (Morohashi, 2002).

En la Argentina, si bien el manchado del grano se ha registrado desde hace muchos años, la incidencia natural de esta enfermedad ha aumentado, probablemente debido a un efecto de interacción entre la fertilización nitrogenada y los sistemas de labranza. El presente trabajo permitió estudiar varios aspectos relacionados con la enfermedad, como la incidencia de la misma en la zona de producción típica de trigo candeal y la micoflora asociada a esta patología. Además se estudió el mecanismo bioquímico del manchado, mediante el rol que cumplen las enzimas peroxidasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

- En laboratorio:

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

- 1- Se cuantificó la incidencia de la enfermedad (porcentaje de granos enfermos en relación al total) en muestras de 200 granos por cada repetición, evaluando en cada muestra la presencia o ausencia de la enfermedad, para lo cual se

realiza el promedio de las tres repeticiones obteniendo el porcentaje de granos manchados de la variedad.

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

Reacciones bioquímicas:

- 1- Se evaluó la actividad enzimática a través de la aparición de una coloración rosa-marrón como resultado de la actividad de la oxidación del guayacol en presencia de las peroxidasas (Dann and Deverall, 2000; Hadaway *et al.*, 2003). Se analizaron granos de todas las variedades de la primera época de siembra en Miramar, tomando como testigos granos totalmente enfermos y granos totalmente sanos. Para ello se utilizaron 5 gr. de granos de cada variedad, los cuales se molieron. Del resultado de la molienda se tomó 0,2 gr. de cada tratamiento los cuales se colocaron en un Eppendorf, tubo de microcentrífuga, con 1 ml de una solución de Sacarosa al 20%. Se obtuvo el extracto de grano, luego de una hora en un agitador rotatorio (Shaker) y posteriormente 5 minutos en una centrífuga a 10.000 rpm. Se tomó 25 μL de dicho extracto y se colocó en una cubeta a la cual se le añadió 0,25 mL de H_2O_2 0,38 M, 1 mL de fosfato de sodio buffer pH 5,8 0,2 M y 25 μL de guayacol 0,02 M. Se determinó en forma cuantitativa la absorbancia, midiéndose con espectrofotómetro Shimadzu con una longitud de onda de 470 nm, durante 150 segundos con intervalos de 10 segundos, determinándose la variación de absorbancia en un minuto.
- Análisis de los datos: Se realizó el análisis de la varianza (ANNOVA) de los valores medias de incidencia a través del programa Infostat (2008), para todas las variedades en ambas localidades en las dos épocas de siembra.

RESULTADOS

Incidencia

La incidencia promedio registrada para todas las muestras en ambas localidades para las dos épocas de siembra fue de **27,2%**. Comparando los resultados de incidencia de ambas localidades, en la primera época de siembra se observó una mayor incidencia en Miramar (promedio 30,11%) mientras que en la segunda época de siembra donde se presentó mayor incidencia fue en La Dulce (promedio 28,30%).

La Dulce

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

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

Miramar

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

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

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

Sanidad de las muestras

En los ensayos *in vitro* en APG predominó la infección fúngica con hongos del género *Alternaria*. Se visualizó cierta variabilidad entre las cepas (Figura 4), siendo *A. alternata* la especie más frecuente.

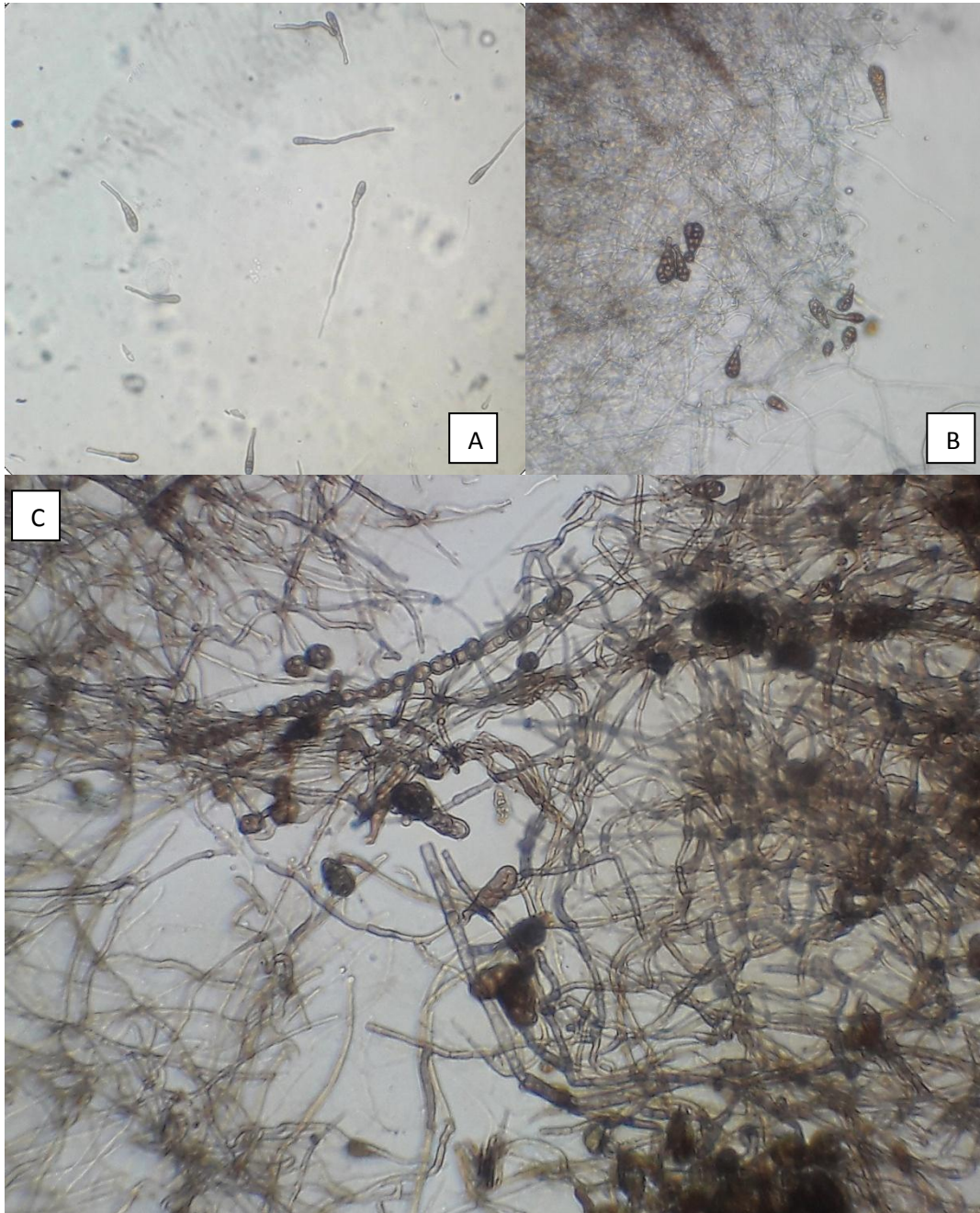


Figura 4: A-B: conidios de *Alternaria* spp. C: conidios y clamidosporas de *Alternaria* spp.

Con respecto a otras dematiaceas, se registraron diversas especies de *Bipolaris*, *Curvularia* y *Drechslera* (Figura 5). Si bien *Bipolaris sorokiniana* no se registró en

porcentajes elevados, su importancia radicó en la agresividad infectiva, impidiendo en muchos casos la germinación de la semilla (Figura 6).

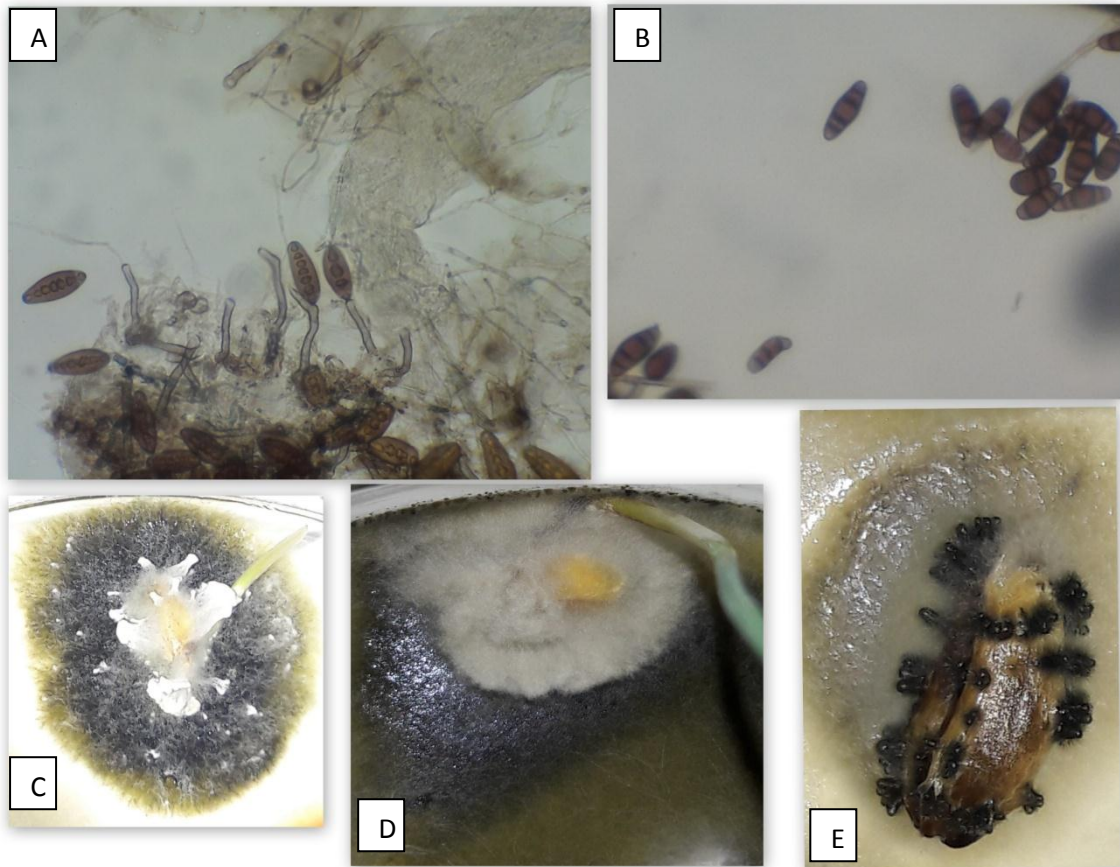


Figura 5: A- Conidios de *Bipolaris nodulosa*. B- Conidios de *Curvularia lunata*. C- Colonia de *Drechslera* spp. D- Colonia de *Drechslera siccans*. E- Estromas de *Drechslera campanulata* en semilla.

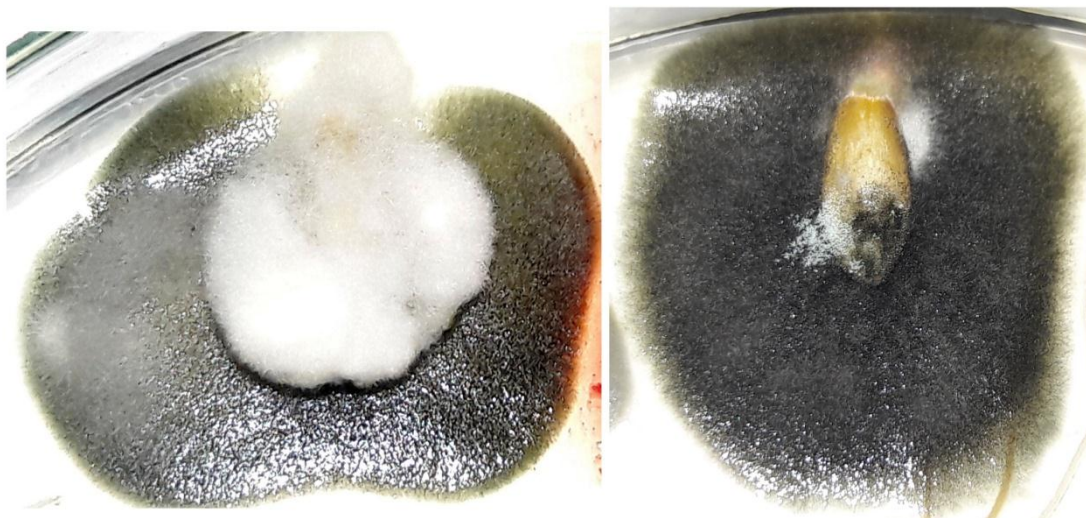


Figura 6: *Bipolaris sorokiniana* infectando semillas.

Por otro lado, coparasitaron las semillas, géneros como *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Stemphylium* y *Epicoccum* (Figura 7).

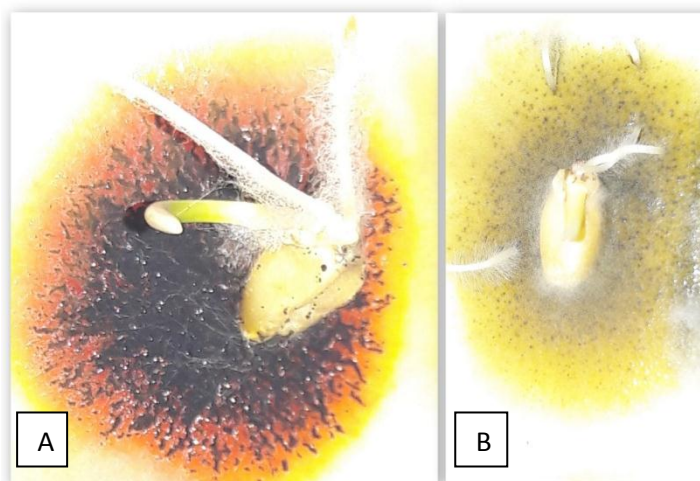


Figura 7: A- Colonia de *Epicoccum* spp. B- Colonia de *Stemphylium* sp.

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

A nivel cuantitativo (Anexo 2), en todas las muestras en ambas localidades para las dos épocas de siembra, *Alternaria* spp. tuvo un promedio de infección del 79,02 %. Le siguieron en importancia *Fusarium graminearum* (8,83%) y *Epicoccum* spp. (5,39%). Además fueron registrados *Bipolaris sorokiniana* (0,83%), *Cladosporium* sp. (0,66%), *Stemphylium* sp. (1,41%), entre otros.

La Dulce

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

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

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

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

Miramar

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

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

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

1º Época de siembra	TOTAL (%)	2ª Época de siembra	TOTAL (%)
<i>Alternaria spp.</i>	75,04	<i>Alternaria spp.</i>	78,28
<i>Aspergillus sp.</i>	0,04	<i>Aspergillus sp.</i>	0,03
<i>Bipolaris cynodontis</i>	0,04	<i>Bipolaris cynodontis</i>	0,03
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,26	<i>Bipolaris nodulosa</i>	0,08
<i>Cladosporium sp.</i>	0,15	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,82
<i>Drechslera siccans</i>	0,07	<i>Bipolaris sp.</i>	0,19
<i>Epicoccum sp.</i>	5,67	<i>Cladosporium sp.</i>	0,37
<i>F. graminearum</i>	11,22	<i>Curvularia inaequalis</i>	0,04
<i>Fusarium poae</i>	0,04	<i>Curvularia lunata</i>	0,11
<i>Fusarium sp.</i>	1,81	<i>Drechslera campanulata</i>	0,06
<i>Marielliotia biseptata</i>	0,04	<i>Drechslera siccans</i>	0,04
<i>Nigrospora sp.</i>	0,33	<i>Drechslera sp.</i>	0,04
<i>Penicillium sp.</i>	1,96	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	0,04
<i>Stemphylium sp.</i>	2,30	<i>Epicoccum sp.</i>	4,83
Sin identificar	0,48	<i>Fusarium graminearum</i>	8,50
		<i>Fusarium poae</i>	0,29
		<i>Fusarium sp.</i>	0,81
		<i>Nigrospora sp.</i>	0,40
		<i>Penicillium sp.</i>	0,81
		<i>Stemphylium sp.</i>	2,71
		Sin identificar	0,54

Peroxidasas

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

Cabe destacar que la variedad N°7 presentó el menor valor, siendo importante continuar con estos estudios para confirmar los presentes resultados (Figura 8).

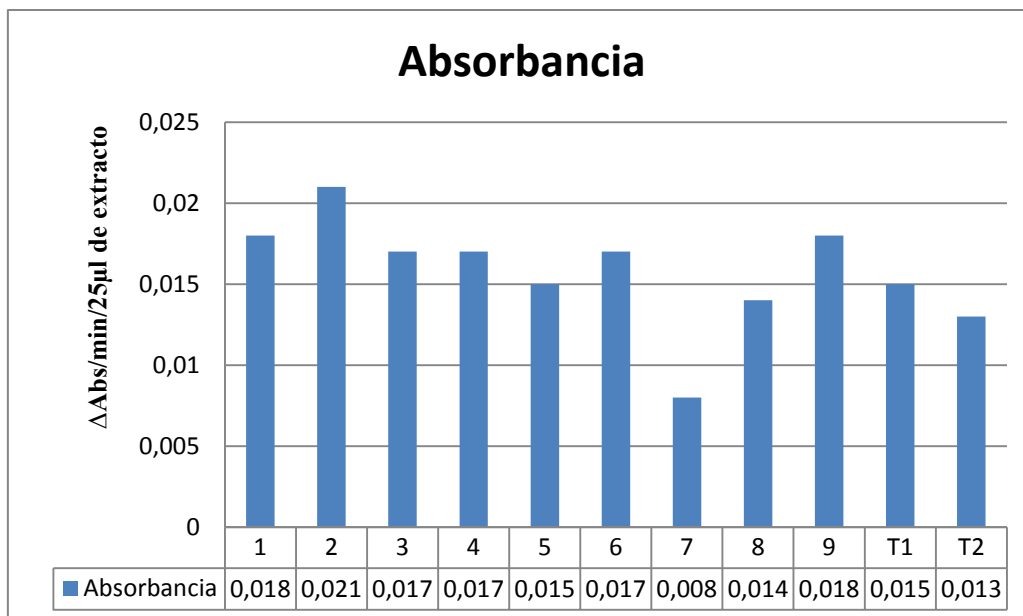


Figura 8: Variación de la absorbancia en un minuto.

CONCLUSIÓN

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

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer la valiosa colaboración del Dr. Mario Saparrat y las Ings. Agrs. Gladys Lampugnani y Anahí Musso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatte P.E., Carbajo H. L., Jensen C., 2001. Trigo Candeal, Manual Técnico. Chacra Experimental Barrow (Convenio entre INTA y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación).
- Batalla A., 2014. Incidencia del manchado de grano en arroz. Ingeniero Agrónomo y Asesor técnico en cultivo de arroz. Argentina. Disponible en: http://www.lafranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/Incidencia_del_manchado_de_grano_en_arroz.pdf. Fecha de consulta: 15-3-2016.
- Carrillo L., 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes, pp. 81-86. Disponible en: <http://unicencia.ambientalex.info/infoCT/Honaliforalt.pdf>. Fecha consulta: 3-3-2016.
- Dann E.K., Deverall B.J., 2000. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Path.* 49: 324-332.
- Dexter J.E., Matsuo R.R., 1982. Effect of smudge and blackpoint, mildewed kernels and ergot on durum wheat quality. *Cereal Chemistry* 59: 63-69.
- Ellis M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. 608 pp. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK.
- Fernández M.R., Clarke J.M., DePauw R.M., Irvine R.B., Knox R.E., 1994. Black point and red smudge in irrigated durum wheat in southern Saskatchewan in 1990–1992. *Canadian Journal of Plant Pathology* 1: 221-227.
- Gilchrist-Saavedra L., Fuentes-Dávila G., Martínez-Cano C., López-Atilano R.M., Duveiller E., Singh R.P., Henry M., García A. I., 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México D.F.: CIMMYT.
- Greaney F.J., Wallace H.A.H., 1943. Varietal susceptibility to kernel smudge in wheat. *Phytopathology* 33: 4-5.
- Hadaway T., 2002. The genetic and biochemical basis of black point in barley (*Hordeum vulgare* L.), Department of Plant Science, University of Adelaide, Honours Thesis.
- Hadaway T.K., March T.J., Able J., 2003. The involvement of peroxidases in the formation of black point in barley. Conference in 11 th. Australian Barley Technical Symposium and the 53 rd. Australian Cereal Chemistry Conference,

- 7-10 Sept. 2013. Disponible en:
<http://www.proceedings.com.au/abts2003/papers/031HadawayT.pdf>
- Jacobs B., Rabie C.J., 1987. The correlation between mycelia presence and black point on barley. *Phytolactica* 19: 77-81.
- Kaan F., Régnier T., Macheix J.J., Souyris I., 1995. Recent advances in breeding for black point resistance in durum wheat. Nachit MM, Baum M, Porceddu E, Monneveux, Picard E (eds) 1998. SEWANA (South Europe, West Asia and North Africa) *Proceedings of the SEWANA Durum Network Workshop*, ICARDA, Aleppo, Syria 1995: 324-328.
- Kikot Gisele, 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Tesis doctoral en Ciencias exactas, área Química, UNLP, La Plata, Argentina. Pp: 15-20. Disponible en:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18266/l_-_Aislamiento_e_identificaci%C3%B3n_de_Fusarium_spp._a_partir_de_granos_de_trigo.pdf?sequence=6. Fecha de consulta: 15-07-2016
- Koneman E., Winn W. Jr., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., 2008. "Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color (6ª ed.)". Buenos Aires: Médica Panamericana S.A. Pp: 1158-1159.
- Larsen A., Jensen C., 2016. Presentación de trigo Candeal. A todo trigo y cultivos de invierno (Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina). Disponible en:
<http://www.atodotrigo.com.ar/presentaciones.php>. Fecha de consulta: 15-08-2016.
- Lorenz K., 1986. Effects of black point on grain composition and baking quality of New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 29: 711–718.
- Machacek J.E., Greaney F.J., 1938. The 'black point' or 'kernel smudge' disease of cereals. *Canadian Journal of Research* 16: 84–113.
- Malaker P.K., Mian I.H., Bhuiyan K.A., Akanda A.M., Reza M.M.A., 2008. Effect of storage containers and time on seed quality of wheat. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 33: 469-477.
- Mathur S.B., Cunfer B., 1993. Black Point. In: Mathur SB, Cunfer B (Eds). *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, pp. 13-21, Copenhagen, Denmark.
- Ministerio de Agroindustria de la Nación, Argentina. Datos Abiertos, Estimaciones de la producción. Disponible en:
<https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Fecha de consulta: 15-8-2016.
- Morohashi Yukio, 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, vol.53, No.374, pp:1643-1650.

- Moschini R.C., Sisterna M.N., Carmona M.A., 2006. Modelling of wheat black point incidence based on meteorological variables in the southern Argentinean Pampas región. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 1151-1156.
- Neergaard P., 1979. *Seed Pathology*, vol. I and II. Revised Edition, Mac Millan Press, London, 1191pp.
- Özer N., 2005. Determination of the fungi responsible for black point in bread wheat and effects of the disease on emergence and seedling vigour. *Trakya University Journal of Science* 6: 35-40.
- Perelló A.E., Moreno, M. V and M.N. Sisterna. *Alternaria infectoria* species group associated to black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology* 57 (2): 379 (2008)
- Perelló A; Stenglein S; Moreno V; Labuda R., 2012. "Alternaria species-groups en trigo: identificación, patogenicidad y toxinas involucradas". Segunda Jornada Temática del INBA. La investigación científico-técnica en cereales de Invierno; 2012.
- Seghezzo M. Laura, 2015. Calidad en trigo candeal. Laboratorio de calidad industrial de granos. Chacra experimental integrada Barrow, INTA. Ediciones INTA.
- Sisterna M.N., Lori G.A., 2005. Hongos parásitos débiles asociados al manchado del grano de trigo. *Actas del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina*, 2005: 464.
- Sisterna M.N., Sarandón S.J., 2000. Blackpoint incidence on durum wheat in Argentina: Influence of cultivar and location. *Acta Agronómica Hungarica*, 48 (4), pp. 395-401.
- Sulman A., Fox G., Osman A., Inkerman A., Williamson P., Michalowicz M., 2001. Relationship between total peroxidase activity and susceptibility to black point in mature grain of some barley cultivars. *Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium, Canberra, Australia*.
- Warham E.J., Butler L.D., Sutton B.C., 1999. *Seed Testing of Maize and wheat. A Laboratory Guide*. CIMMYT-CAB, 84p.
- Wiese M.V., 1987. *Compendium of wheat diseases*. American Phytopathological Society: St Paul, MN, 112pp.
- Williamson P.M., 1997. Black point of wheat: *in vitro* production of symptoms, enzymes involved and association with *Alternaria alternata*. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 13–19.

ANEXO 1

LA DULCE PRIMERA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

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

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

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

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

Error: 35,1245 gl: 43

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

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

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

Error: 35,1245 gl: 43

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

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

LA DULCE SEGUNDA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

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

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

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

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

Error: 21,3415 gl: 43

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

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

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

Error: 21,3415 gl: 43

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

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

MIRAMAR PRIMERA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

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

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

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

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

Error: 20,0853 gl: 43

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

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

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

Error: 20,0853 gl: 43

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

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

MIRAMAR SEGUNDA ÉPOCA DE SIEMBRA

Análisis de la varianza

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

*Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!*

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

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

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

Error: 59,9022 gl: 41

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

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

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

Error: 59,9022 gl: 41

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

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

ANEXO 2

Descripción de la micoflora fúngica por variedad en ambas localidades.

La Dulce

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

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

Miramar

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

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

ANEXO 3

Datos de absorbancia

VARIEDAD 1

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

Δ Abs en 1min 0,018

VARIEDAD 2

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

Δ Abs en 1min 0,021

VARIEDAD 3

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

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 4

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

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 5

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

Δ Abs en 1min 0,015

VARIEDAD 6

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

Δ Abs en 1min 0,017

VARIEDAD 7

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

Δ Abs en 1min 0,008

VARIEDAD 8

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

Δ Abs en 1min 0,014

VARIEDAD 9

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

Δ Abs en 1min 0,018

TESTIGO 1: SANOS

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

Δ Abs en 1min 0,015

**TESTIGO 2:
ENFERMOS**

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

Δ Abs en 1min 0,013