

CARACTERIZACIÓN MORFOCULTURAL DE NUEVOS GRUPOS TAXONÓMICOS DE *ALTERNARIA* ASOCIADOS A ENFERMEDADES DEL TRIGO EN ARGENTINA

MORPHOCULTURAL CHARACTERIZATION OF *ALTERNARIA* SPECIES-GROUPS ASOCIATED TO WHEAT DISEASES IN ARGENTINA

Analia PERELLÓ¹; Mónica AULICINO²; Clara MARTINELLI¹; Melina REGUEIRA¹; Virginia MORENO³; Sebastián STENGLIN³

1. CIDEFI-Fitopatología-CONICET. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 119 (CP 1900), La Plata, Argentina. 2. Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Lavallol, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. 3. BIOLAB- CONICET, Facultad de Agronomía de Azul.

RESUMEN.

Se caracterizaron 40 aislamientos de *Alternaria* procedentes de trigo, en grupos de morfo-especies en base a sus modelos de esporulación, morfología del conidio/conidióforo, color de la colonia sobre medios específicos (agar DRYES), patogenicidad y producción de toxinas. Se determinaron cuatro grupos-especie de *Alternaria* involucrados en patologías del trigo: *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. tenuissima*. La caracterización morfológica fue corroborada por comparación con cepas patrones standard de colecciones internacionales (Biopure Referenz Substeranzen GmbH, Tulln, Austria y HebIMI, Inglaterra). El análisis molecular de los aislamientos (extracción de DNA y secuenciación de la región ITS) corroboró la determinación morfo-cultural. La patogenicidad de los aislamientos se demostró por la producción de síntomas necróticos tales como manchas y atizonamiento foliar, manchado de granos, necrosis radicular y debilitamiento de las plántulas emergidas de granos inoculados. Cada grupo-especie se asoció a la producción de un síntoma o grupo de síntomas determinado siendo el grupo *infectoria* el más virulento respecto al resto de los grupos analizados. Las toxinas determinadas indican el riesgo micotoxicológico de estas cepas para la salud humana y animal ante el consumo de productos o subproductos que contengan dichos metabolitos. Su falta de regulación en alimentos en Argentina y en otras regiones del mundo es llamativa. *A. arborescens* se registra por primera vez en asociación a trigo para Argentina.

Palabras claves: *Alternaria*, hongo, patógeno, trigo, grupo-especie

ABSTRACT.

Forty isolates of *Alternaria* from wheat plants were characterized into species-group considering the sporulation pattern, morphology of conidia, pathogenicity and toxins production. For identification PCA media was used and the isolates were classified according the sporulation pattern, morphology of conidia/conidiophores and according the colony colour on DRYES medium. Four species-groups of *Alternaria* were determined, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima* groups. This is the first report of *A. arborescens* on wheat in Argentina. Morphocultural identification was corroborated by molecular analysis PCR- ITS and comparison of isolates with standard strains belonging to international culture collections. Inoculations on wheat grains showed the pathogenicity of isolates and symptoms of discoloration, blight and spots on leaves, radicular necrosis and weakness of emerged plants. Wheat cultivars showed different response to the infection according each particular isolate inoculated. In general a correlation between each species-group and each kind of symptom could be shown. The *infectoria* group has the most virulent strains that induce the highest severity on all tested cultivars. Toxins production highlight the micotoxicologic risk associated to this fungi considering they play a role in pathogenesis and no current regulations exist in Argentina or in the rest of the world. *A. arborescens* is registered by first time associated to wheat plants in Argentina.

Keywords: *Alternaria* complex, wheat, species-group

Recibido diciembre 8, 2014 - Aceptado marzo 21, 2015

* **Correspondencia de autor:** Analia Perelló. CIDEFI-Fitopatología-CONICET. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. Calle 60 y 119 (CP 1900). La Plata, Argentina. e-mail: anaperello2@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Importancia del género *Alternaria* como hongo patógeno de cultivos

Alternaria es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies saprófitas y patógenas ampliamente distribuidas en diversos cultivos de importancia agronómica, y en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies también se encuentran relacionadas con la aparición de infecciones humanas (1). Incluye especies patógenas que pueden invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y causar considerables pérdidas económicas debido a la reducción del rendimiento de las cosechas y producir alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento (2). Las especies del género *Alternaria* sintetizan además metabolitos secundarios tóxicos para las plantas, algunos de los cuales se han relacionado con la aparición de efectos adversos para la salud en personas y animales (1).

En trigo nos encontramos actualmente frente al crecimiento de enfermedades nuevas y emergentes ocasionadas por el complejo de especies de *Alternaria* (3, 4). Son además, productoras de compuestos biológicamente activos tales como micotoxinas (5, 6), aunque solo se ha demostrado la producción natural en los alimentos y piensos del ácido tenuazónico (TeA), alternariol (AOH), éter metilalternariol (AME), altenueno (ALT) y altertoxina-I (ATX-I), y más raramente de toxinas AAL (7, 8).

El "escudete negro" (*blackpoint*) es un problema de aparición frecuente en la mayoría de las regiones trigueras del mundo (9, 10). Se caracteriza por la presencia de una coloración parda o negra en la zona del germen del grano de trigo que, en casos severos, puede extenderse al área circundante y al surco (11). Se ha señalado, además, un considerable deterioro en la calidad visual de la

pasta, vinculado al aumento en la cantidad de puntos negros en las sémolas producto de la molienda de granos enfermos (12). Tradicionalmente, se ha asociado su ocurrencia con la infección de organismos tales como *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata*, entre otros hongos (11). *A. alternata* se reporta como el hongo subepidémico más común del grano de trigo (13, 14), en coincidencia con resultados de Argentina (15). Otros estudios indican que los grupos *Alternaria tenuissima* y *Alternaria infectoria* serían los dominantes en grano de trigo (con frecuencias de aparición del 79 y 69 % respectivamente) (4).

Durante las últimas campañas, las industrias semolera y fideera de nuestro país han alertado sobre la presencia de niveles excesivamente altos de grano de trigo con síntomas de escudete negro. Sin embargo, se carece de información actualizada en Argentina acerca de la composición taxonómica de especies de *Alternaria* asociadas al cultivo.

Alternaria en trigo: Enfermedades que ocasiona en hoja y grano

Alternaria ocasiona enfermedades foliares y en el grano de trigo (16-18). Algunas especies tales como *Alternaria triticina* causan pérdidas del rendimiento de hasta un 60% bajo condiciones favorables a la infección y desarrollo de la enfermedad (19-22). Esta especie fue citada por primera vez en nuestro país en 1992 (23). En los últimos años, los relevamientos efectuados a diferentes cultivares y regiones ecológicas trigueras, indican que el manchado por *A. triticina* incrementó notoriamente su incidencia y difusión, constituyéndose en una nueva adversidad para el cultivo de este cereal que necesita ser investigada especialmente dado su status de enfermedad cuarentenaria y que limitaría el ingreso del

grano de trigo a nuevos mercados (24, 25). Otros aislamientos de *Alternaria* obtenidos recientemente en muestras de las últimas campañas trigueras fueron coincidentes con la descripción morfo-biométrica de los miembros del grupo de especies de *A. infectoria* que constituirían nuevas taxa para Argentina (26, 27). El teleomorfo, un lóculo ascomicete del género *Lewia* Barr & Simmons (2, 28), ha sido identificado en Argentina en cultivos in vitro en conexión con el anamorfo (*Alternaria*) (29). Hasta la fecha, el grupo *infectoria* comprende las especies *Alternaria arbusti*, *Alternaria conjuncta*, *A. infectoria*, *Alternaria intercepta*, *Alternaria metachromatica*, *Alternaria novae-zelandiae*, *Alternaria oregonensis*, *Alternaria triticimaculans* y *Alternaria viburni*, más varios taxa aún desconocidos (13). Estudios moleculares demostraron que *A. triticina* pertenece genéticamente al grupo de especies de *infectoria* (30). En Argentina, *A. triticimaculans*, *A. infectoria* y *A. triticina* son las especies del grupo identificadas hasta el momento como patógenas del trigo (3, 27). Otras especies como *A. tenuissima* colectadas desde muestras de granos del SE de la provincia de Buenos Aires en las últimas temporadas, estarían también distribuidas en la microbiota del grano de trigo indicando una gran dinámica y plasticidad en el grupo en estudio (31, 32).

Sistemática y taxonomía actual

La clasificación de las especies de *Alternaria* es compleja. Actualmente, diferentes estudios filogenéticos acuerdan en agrupar las especies de en dos grupos principales: especies de "esporas grandes" (con conidios de 60-100 µm) y especies de "esporas pequeñas" (tamaño de conidio inferior a 60 µm) (33-36), donde están comprendidos la mayoría de los miembros taxonómicos patógenos del trigo. Entre ellos, el grupo de *A. alternata*

está frecuentemente implicado en los síntomas de manchado de granos de cereales y engloba las principales especies productoras de micotoxinas (5). El grupo de *A. infectoria* se aísla con frecuencia de cereales y está citado también como productor de infecciones humanas (1, 37). Otros grupo-especie de esporas pequeñas son los grupos de *Alternaria arborescens* y *A. tenuissima* (38, 39). La identificación de especies del género *Alternaria* y su división en grupos, se realiza atendiendo las características morfológicas (28). La producción de metabolitos secundarios se emplea como otro marcador que permite caracterizar los diferentes aislamientos (39-42). También el análisis filogenético basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (1, 37), los perfiles de amplificación con cebadores aleatorios (RAPD) (43, 44), la técnica AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (45, 46), o la secuenciación de determinados marcadores genéticos, se utilizan en la actualidad en un intento de clasificar los aislamientos. Entre los marcadores genéticos empleados con este fin se destacan los espaciadores internos de la transcripción, ITS1 e ITS2 (33, 47-49), el gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GDP) (5), genes que codifican para la síntesis de micotoxinas (30) y el gen *Alt a 1* (34).

En Argentina, existen antecedentes del estudio comparativo de patrones isoenzimáticos de *A. infectoria* asociados al cultivo de trigo (50). Recientes reportes de estudios quimiotaxonómicos (perfil de metabolitos secundarios) se suman al intento de contribuir a la caracterización y diferenciación de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas (*A. alternata* y *A. tenuissima*) (39).

El objetivo del trabajo fue caracterizar morfo-biométrica y culturalmente 40 aislamientos de *Alternaria* obtenidos de diferentes cultivares y localidades trigueras, analizar su producción de toxinas, y cuantificar su efec-

to sobre la calidad (manchado) y sanidad (viabilidad y poder germinativo) de granos de trigo realizando pruebas de patogenicidad bajo invernáculo. Por último, esclarecer la taxonomía mediante un análisis molecular que corrobore la identificación y diferenciación de los grupos de especies del género *Alternaria* asociados al trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Origen de los aislamientos

Se trabajó con diferentes muestras de trigo pertenecientes a distintos cultivares y regiones agroecológicas trigueras de la provincia de Buenos Aires. Las muestras de grano procedieron de Estaciones Experimentales, semilleros, criaderos, INTA, y productores particulares. El material se remitió y procesó en el laboratorio del CIDEFI (Fig. 1). Las muestras se sometieron a un análisis micológico. Se aplicaron las normas ISTA (*International Seed Test Association*) para el análisis de semillas por el método de *blotter test* (51). Se efectuaron preparados microscópicos para la identificación taxonómica.

Colección de aislamientos de *Alternaria* en trigo

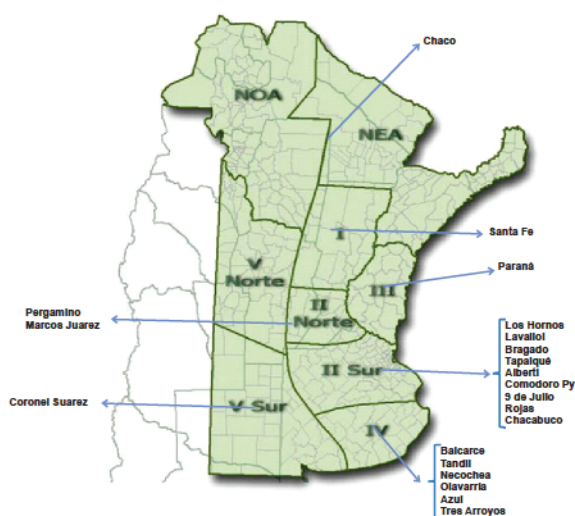


Figura 1. Colección reunida de aislamientos de *Alternaria* en trigo procedente de 7 áreas trigueras de Argentina.

Estudio morfo-cultural de los aislamientos

Se reunió una colección de 110 aislamientos de *Alternaria*, caracterizados en base a los rasgos morfobiométricos y culturales. Se consideró el largo de cadenas de conidios, el patrón de esporulación, la morfología de conidios y hábito de desarrollo en medios de cultivo. Los aislamientos obtenidos se repicaron en diferentes medios de cultivo: Agar de papa glucosado al 2% (APG), Agar papa zanahoria (APZ), Medio Dicloran Rosa de Bengala más extracto de levadura y sucrosa (DRYES) y se mantuvieron en frío (5°C) hasta su empleo. Se observó el patrón de esporulación 3D, crítico en la diferenciación de los grupos taxonómicos (28) bajo microscopio estereoscópico. Para su identificación, las colonias se observaron luego de 7 días de cultivo en Cajas de Petri de 90 mm de diámetro en APZ, incubadas a una temperatura de 22-25°C y ciclos de 8 hs. luz fluorescente y 16 hs. de oscuridad. Además se analizaron las características macroscópicas de las colonias (color y aspecto) y rasgos morfológicos microscópicos de los conidios y conidióforos considerados como criterios de clasificación, tales como: dimensiones y disposición de los conidios, conidióforo, aspecto, color, ornamentación, tabicación, presencia o no de rostro (prominencia del conidio en forma de apéndice) y mediciones. Se efectuaron comparaciones visuales y microscópicas con cepas tipo de cada grupo-especie solicitadas a una colección fúngica de referencia (HerbIMI, *Royal Botanical Garden, UK*).

Identificación Molecular

Se efectuó la extracción y análisis del DNA con la técnica indicada (52) para confirmar la identidad de los grupos de especies de *Alternaria* determinados con el estudio morfo-cultural y biométrico. Se secuenció toda la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) con los primers ITS4 e

ITS5 de cuatro aislamientos representativos de cada grupo morfológico determinado.

Micotoxinas analizadas

Se analizó la producción de las toxinas alternariol (AOH), alternariolmonometiléter (AME), altenueno (ALT), Alvertoxina I y II (ATX-I, ATX-II), ácido tenuazoico (TeA) y tentoxina (TEN) en 40 aislamientos *Alternaria* previamente identificados por sus características morfo-biométricas y culturales. Se empleó la técnica LC/MS-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masa-masa) adaptando los protocolos previos (53). Las pruebas bioquímicas para la detección de las toxinas se llevaron a cabo en el IFA-Tulln, *Centre for Analytical Chemistry*, Tulln, Austria bajo la coordinación y supervisión del Dr. Labuda. Los aislamientos crecieron en el medio *yeast sucrose extract agar* (YES) a 25°C en oscuridad durante 14 días. El micelio del hongo fue mezclado con 5 ml de solvente de extracción acetonitrilo/agua/ácido acético (79/20/1) agitado durante 10 minutos seguido por la ultrasonicación por más de 10 min/muestra y 100 µlts. filtrados, secados y redisueltos en 1000 µlts. de agua-acetonitrilo (1/1) y aplicados sobre el sistema LC-MS/MS. La separación cromatográfica fue realizada a 25°C on a Gemini C18, 150 x 4,6 mm ID, 5 µm de tamaño de partícula, equipo C18 con 4 mm ID 170 x 3 *security guard cartridge* (Phenomenex CA,

USA. UU), 1290 Series HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany). QTRAP LC-MS/MS Sistema 5500 (Biosystems, CA, USA) equipado con una fuente de Turbo Ion Spray electrospray ionización (ESI) que fue usado para detectar y cuantificar los metabolitos del hongo. Los datos se expresan en mg Kg⁻¹ (Tabla 1).

Pruebas de patogenicidad. Ensayos de inoculación en hojas de plántulas de trigo en invernáculo

Se evaluó la patogenicidad en 40 aislamientos de *Alternaria* seleccionados, sobre los siguientes cultivares comerciales de trigo: ACA 906 (Trigo 1); Buck Sy 100 (Trigo 2); Klein Chajá (Trigo 3); Baguette 9 (Trigo 4); Bio INTA 1005 (Trigo 5). Los aislamientos inoculados se identificaron previamente como miembros taxonómicos pertenecientes a los grupos de *A. alternata* (10 cepas) *A. arborescens* (10 cepas), *A. infectoria* (10 cepas) y *A. tenuissima* (10 cepas). Las plántulas de trigo se mantuvieron en un invernáculo en multimacetas plásticas negras hasta que alcanzaron el estadio de tres hojas verdaderas y cuarta emergente en la que se llevó a cabo la inoculación. El diseño consistió en 5 plántulas/maceta y 10 repeticiones por tratamiento. En ese estadio (plántulas de 3 hojas) se inocularon por aspersion hasta chorreo con los 40 aislamientos de *Alternaria* en una concentración de 2 x 10⁵ esporas/ml. Se mantuvo una cámara húmeda por 48 hs. A los 18 días se evaluó la

<i>Alternaria</i> species-group	AOH	AME	ALT	ATX-I	ATX-II	TEN	TeA
<i>A. infectoria</i>	----	----	----	0,13-0,60	0,61-8,36	0,01-0,40	----
<i>A. arborescens</i>	1,94-17,54	0,76-11,70	5,62-8,45	2,81-10,36	0,57-2,85	0,57-2,37	17,41-55,87
<i>A. alternata</i>	0,17-19,83	0,78-8,05	0,05-9,86	0,41-8,90	0,57-8,90	0,11-2,84	43,99-50,01
<i>A. tenuissima</i>	7,51-18,66	2,91-6,28	1,11-7,01	0,38-6,69	0,13-2,45	0,40-3,11	18,57-53,02

Tabla 1. Producción de toxinas de 40 cepas del complejo *Alternaria*, grupos *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. arborescens*. AOH=alternariol; AME=alternariolmonometiléter; ALT= altenueno; ATX-I= alvertoxin I; ATX-II= alvertoxin II; TEN= tentoxina; TeA= ácido tenuazoico

incidencia y la severidad medida a través del cálculo del índice de daño (ID) en 150 hojas de cada combinación aislamiento x cultivar aplicando la siguiente fórmula:

$$DI = \frac{\sum N1 + 2N2 + 3N3}{3N} \times 100$$

DI= Índice de daño (severidad)

N= Número total de hojas

N1, N2, N3 = Cantidad de hojas examinadas por cada grado de incidencia.

1, 2, 3 = grado de intensidad de los daños.

Las categorías de severidad consideradas fueron: 0=hoja sana; 1= severidad baja (hoja con menos del 10% de la superficie foliar afectada); 2= severidad media (hoja con un 10 a 50% de superficie foliar afectada); 3= severidad alta (hoja con más del 50% de la superficie foliar afectada).

Para el análisis estadístico de los datos, se realizaron pruebas normalidad y homogeneidad de varianza aplicando el test de Barlett (54). Se comprobó que no existe normalidad ni homogeneidad de varianzas. La técnica consistió en aplicar un análisis de varianza de una vía no paramétrica, Kruskal Wallis para probar si la media de los grupos era similar. Se realizó un Análisis factorial de dos vías sin interacción. Los factores fueron: Cultivares de trigo (i=5), grupos de *Alternaria* (J=4). Se aplicó para comparar medias de los efectos principales el test de LSD (54). Para comparar medias de interacción de los aislamientos de *Alternaria* evaluados a través de los cultivares se realizó un test de Scheffe ($p < 0,05$) para los parámetros Incidencia e Índice de severidad.

Ensayo de inoculación en granos de trigo

Se sembraron granos de los 5 cultivares de trigo a testear en bandejas plásticas transparentes de 12x16 cm,

que contenían algodón humedecido y papel de filtro en superficie. Se dispusieron 20 granos/bandeja/cultivar/cepa. Se efectuaron dos repeticiones. Los granos de los 5 cultivares fueron previamente inoculados por inmersión en una suspensión de esporas y micelio de cada una de los aislamientos durante 30 minutos. Se realizó un testigo por cada cultivar con sus 2 repeticiones inoculadas de la misma manera con agua destilada. El diseño consistió en un total de 40 bandejas, cada una inoculada con un aislamiento del hongo. Al cabo de 14 días se evaluaron los siguientes parámetros en porcentaje (%): Granos germinados (GG); Granos manchados (GM); Coleóptilo debilitado (CD); Coleóptilo acortado (CA); Radícula acortada + debilitada (RDYA) y Radícula necrosada (RN).

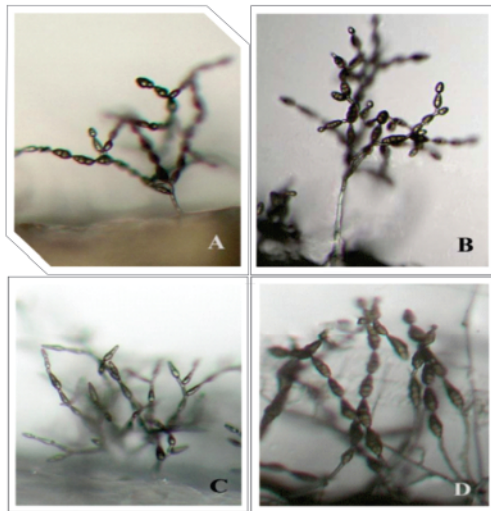
RESULTADOS

Estudio morfo-cultural de los aislamientos

Las características y rasgos morfobiométricos considerados como criterios de clasificación tenidos en cuenta, permitieron distinguir la presencia de aislamientos pertenecientes a los grupos taxonómicos de las morfoespecies *alternata*, *infectoria* y *tenuissima*. Apareció discriminado claramente el grupo *arborescens* dadas las características particulares de su conidióforo, que sería una nueva determinación taxonómica para el trigo en Argentina. Las comparaciones visuales con las especies tipo procedentes de colecciones internacionales, también ayudaron a discriminar y organizar los grupos taxonómicos, considerando similitudes y diferencias (Fig. 2).

En el caso de los aislamientos del grupo de *A. infectoria*, fue común observar un determinado conjunto de caracteres, como la formación de estructuras teleomórficas inmaduras en medios de cultivo artificial.

Patrones de esporulación 3-D típicos de cada grupo de especies



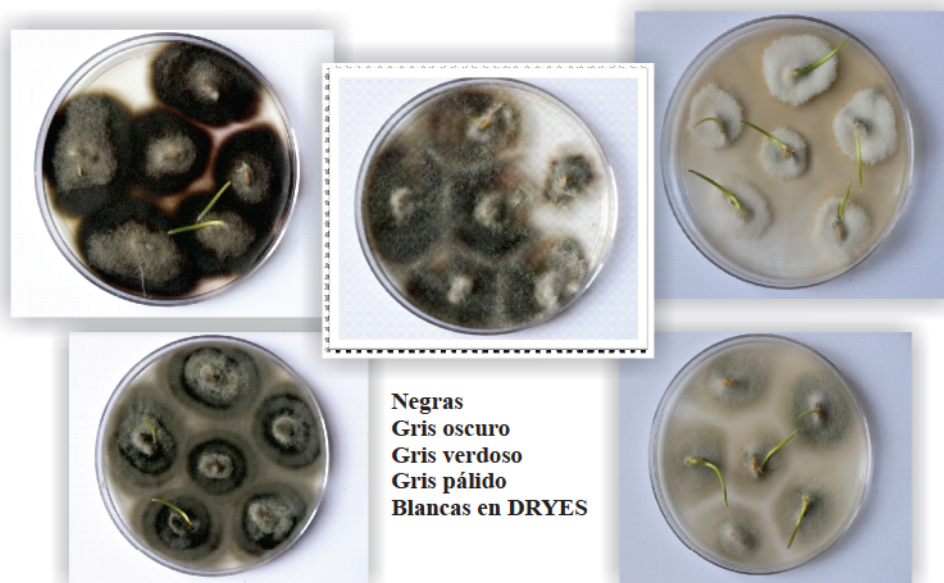
- A. Grupo *alternata* (EGS 34-016)
- B. Grupo *arborescens* (EGS 39-128)
- C. Grupo *infectoria* (EGS 27-193)
- D. Grupo *tenuissima* (EGS 34-015)

Figura 2. Patrones de esporulación 3-D típicos de cada grupo de especies (A. *alternata*, B. *arborescens*, C. *infectoria* y D. *tenuissima*) observados bajo lupa en cada cepa patrón (EGS 30-016; EGS-128, EGS 27-193 y EGS 34-015).

Asimismo, *A. infectoria* y los miembros del grupo, produjeron colonias blancas en determinados sustratos como el medio de cultivo DRYES (Fig. 3). Es

destacable la formación de anillos en las colonias de *Alternaria* de los 4 grupos determinados, bajo exposición de ciclos de luz-oscuridad en el medio APZ (Fig. 4).

Colonias



- Negras
- Gris oscuro
- Gris verdoso
- Gris pálido
- Blancas en DRYES

Figura 3. Colonias de diferentes aislamientos de *Alternaria*. Obsérvese las colonias de *A. infectoria* color blanco en medio DRYES (derecha).

Colonias de *Alternaria* PCA 25°C
8 hs. luz - 16 hs. oscuridad

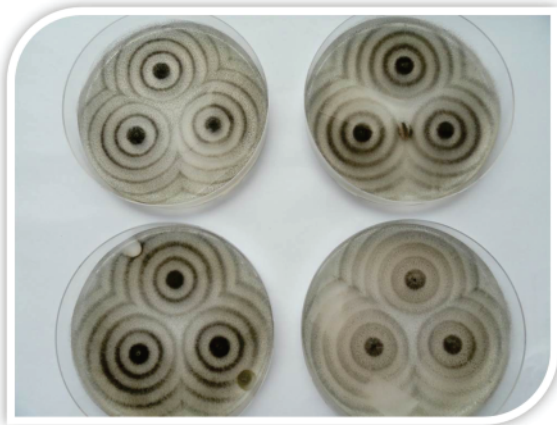


Figura 4. Colonias de *Alternaria* en APZ (agar papa zanahoria) a 25 °C y ciclos de 8 hs. luz - 16 hs. oscuridad. Formación de anillos concéntricos.

Identificación Molecular

La información suministrada por el GenBank indica su correspondencia con los siguientes organismos, registrados con el código indicado a continuación:

ACCESSION JX454534 Organismo *Alternaria alternata*

```

1 tccgtaggfgaactgcggaggatcattacacaatatgaagcgggctggaacctc
61 ggggttacagcctgctgaattaccctgtctttgctactctgttctctgg
121 tgggtcgcaccactaggacaacataaacctttgtaattgcaatcagcgtagtaa
181 caaataataatacaacttcaacaacggatctctggttctggcatcagaaagc
241 cagcgaatgcgataagtagtgaattgcaatcagtgatcagcaatcttgaac
301 gcacattgcaccttggattccaaggcagcctgtcagcgtcattgtaccctc
361 aagcttctgggttgggctctgtctagcttggctggagactgccttaagta
421 attggcagccgctactggttggagcgcagcacaagtcgactctatcagcaag
481 gtctagcatcattaagcctttttcaactttgacctggatcagtaggataccg
541 ctgaacttaagcatcaataa
    
```

ACCESSION JX454533 Organismo *Alternaria arborescens*

```

1 tcatagaggaagtaaaagtcgtaacaaggctccgtaggtgaacctgcggaggatcatt
61 acacaaatgaagcgggctggaacctctcggggttacagccttctgtaattacc
121 cttgcttttgcgacttctgttcttctggtgggtcggccaccactaggacaacata
181 aacctttgtaattgcaatcagcgtcagtaacaataataatacaacttcaacaagc
241 gatctctggtctggcatcagtaagaacgcagcgaatgcgataagtagtgaattg
301 cagaattcagtgatcagcaatcttgaacgcacattgcaccttgggtattcaaaagc
361 gcagcctgtcgcagctcattgtacctcaagcttggctggtggcgtcttgc
421 tctagcttctggagactgccttaagtaattggcagccgcctactggttccgagc
481 gcagcacaagtcgactctatcagcaaggctcagcatcattaagcctttttcaac
541 tttgacctggatcagtagggataccgctgaacttaagcatatca
    
```

ACCESSION JX454532 Organismo: *Alternaria infectoria*

```

1 ggaagtaaaagtcgtaacaaggctccgtaggtgaacctgcggaggatcattacacaat
61 aacaaggcgggctggacacccccctggcactgcttccagcgtcgcggcggggcgcg
121 gccctgtaattattaccctgtcttttgcgactcttcttctgggtgggctcgc
181 ccgacctcaggaccaaccacaacactttgcaatgcaatcagcgtcagtaacaagtaa
241 ttaattacaacttcaacaacggatcttggcttggcatcagtaagaacgcagcga
301 atgcgatacgtagtgtaattgcaaatcagtgatcagcaatcttgaacgcacatt
361 gcgaccttggattccaaggcagcctgtcgcagccttggcttacctcaagctt
421 gcttgggttgggctcttcttccagctcgtggagactgccttaagcttggc
481 agccgctactggttggagcgcagcacaagtcgcttcttccagccaaggctcagc
541 gtccagcaagcctttttcaactttgacctggatcagtagggataccgctgaact
601 taagcatcaataagcggaggcaca
    
```

ACCESSION JX454535 Organismo *Alternaria tenuissima*

```

1 ggaagtaaaagtcgtaacaaggctccgtaggtgaacctgcggaggatcattacacaaa
61 tatgaagcgggctggaacctctcggggttacagccttctgtaattacccttctct
121 ttgcgactcttcttcttgggtgggtcggccaccactaggacaacataaaccttt
181 tgaattgcaatcagcgtcagtaacaataataatacaacttcaacaacgcgatctc
241 tggcttggcatcagtaagaacgcagcgaatgcgataagtagtgaattgcaagatt
301 cagtgatcagcaatcttgaacgcacattgcaccttggattccaaggcagctgc
361 tggctgagcgtattgtacctcaagcttcttgggttgggctctgtctagct
421 ttgctggagactgccttaagtaattggcagccgcctactggttccgagcgcagcac
481 aagtcgactctatcagcaaggctcagcaatcattaagcctttttcaactttgta
541 cctcggatcagtagggataccgctgaacttaagcatatcaattaagcgtgaggaa
    
```


Micotoxinas analizadas

Las pruebas bioquímicas efectuadas indican la alta habilidad de producción de micotoxinas de los aislamientos testeados, tales como AOH, AME, ALT, ATX-I, ATX-II, TEN y TeA (Tabla 1). Todos los aislamientos analizados produjeron al menos una de dichas toxinas, o una combinación de ellas.

Pruebas de patogenicidad

Ensayos de inoculación en hojas de plántulas de trigo en invernáculo

Se encontraron diferencias en el índice de severidad de la enfermedad y en la incidencia en los 5 cultivares de trigo testeados de acuerdo a los resultados obtenidos al aplicar el ANOVA y test LSD. El test de comparaciones múltiples clasificó a las mismas en 2 grupos diferenciados significativamente, *A. infectoria* de *A. alternata* (Fig. 5). También se probaron las diferencias mínimas significativas para los cultivares analizados. Hubo diferencias en el comportamiento de los cultivares de trigo frente a los aislamientos del hongo en cuanto a la severidad e incidencia de la enfermedad (Fig. 6, Fig. 7).

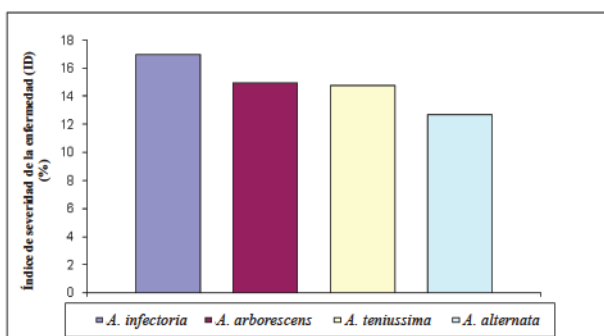


Figura 5. Índice de severidad (%) ocasionado por los miembros taxonómicos de los cuatro grupos de *Alternaria* en cinco cultivares de trigo.

Ensayo de inoculación en granos de trigo

Se construyó una matriz a partir de los valores promedios de los 40 aislamientos, con los datos promedios

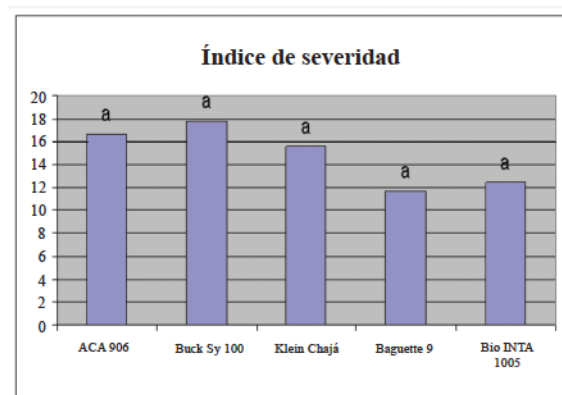


Figura 6. Índice de severidad (%) ocasionado por los cuarenta aislamientos de *Alternaria* testeados en hojas de cinco cultivares de trigo.

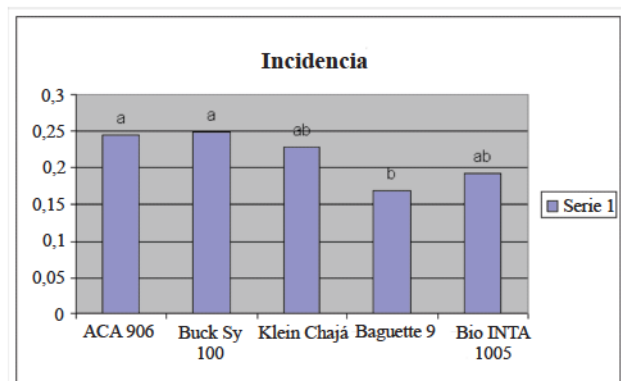


Figura 7. Incidencia de la enfermedad ocasionada por los cuarenta aislamientos de *Alternaria* spp.-grupos en hojas de cinco cultivares de trigo.

de los 5 cultivares para cada una de las 6 variables testeadas: grano germinado (GG), grano manchado (GM), radícula debilitada y acortada (RDYA), coleoptile debilitado (CD), radícula necrosada (RN) y coleóptilo acortado (CA). A la matriz se le aplicó un análisis multivariado de componentes principales, previa estandarización de los datos (52). Los primeros y segundos componentes se utilizaron para construir un biplot que permitió explicar, considerando todos los atributos evaluados, las variaciones presentes. En la Fig. 8 se observa el diagrama de dispersión de los 5 cultivares analizados en cuanto a las variables medidas (indicadas

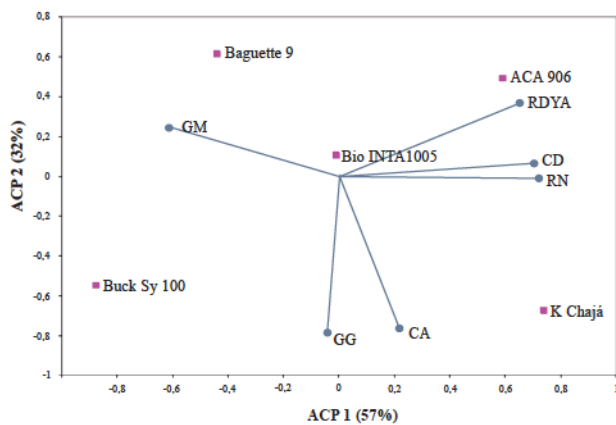


Figura 8. Biplot de caracterización de los cinco cultivares de trigo frente a las cuarenta cepas de *Alternaria* analizadas.

por los 6 vectores). Se observa que cada uno de los cultivares se comporta de forma diferente entre sí, respecto a cada uno de los 6 parámetros analizados. De los 5 cultivares, ACA 906 es el que se asocia con al menos 3 variables negativas, ya que fue el que mayores síntomas de radícula necrosada, debilitada, acortada y coleóptilo debilitado presentó, siendo Buck Sy 100 el cultivar que mejor se comportó ante estas variables. El cultivar Baguette 9 obtuvo el menor porcentaje de coleóptilo acortado y un comportamiento inferior en cuanto a grano germinado en comparación con el resto

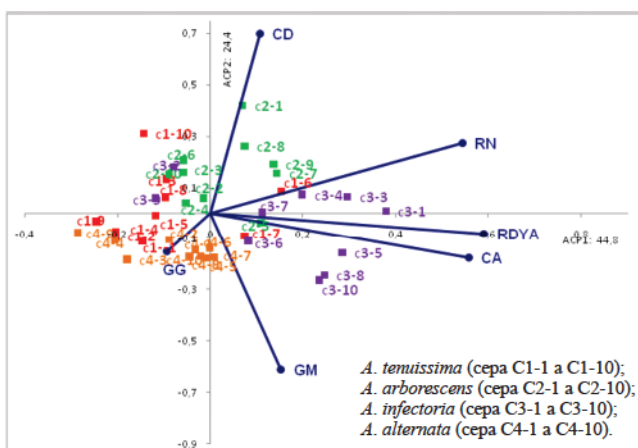


Figura 9. Biplot de los síntomas inducidos en trigo por las cuarenta cepas de *Alternaria* analizadas.

de los trigos testeados. Klein Chajá presentó el mayor porcentaje de coleóptilo acortado y menor porcentaje de grano manchado. Por su parte, Bio INTA 1005 fue el cultivar más estable ante todas las variables analizadas. A su vez, se realizó una matriz de medias para los 40 aislamientos de *Alternaria* en función de las 6 variables consideradas (Fig. 9). Se observa que una gran parte de los aislamientos analizados no afecta sustancialmente la germinación del grano, y si lo hacen, los valores de incidencia son bajos. Sin embargo, los aislamientos son infectivos en grano, produciendo síntomas de manchado o alteraciones a nivel de coleoptile y radícula. Dos parámetros que se encuentran particularmente muy cercanos en su representación gráfica son CA y RDYA. No se desprende una fuerte asociación entre grano germinado y grano manchado. Por lo que gran parte de la semilla contaminada con *Alternaria* spp. y portadora del hongo, germinaría normalmente a campo pero instalaría al patógeno desde el punto de vista epidemiológico en el área de producción. De este modo, aunque la semilla sobrepase la infección, podrían verse comprometidos otros estadios fenológicos del cultivo, por ejemplo, el tejido foliar, con la aparición potencial de síntomas de manchado o atizonamiento, y sumarse también el riesgo de la producción de micotoxinas del hongo. El grupo de aislamientos que indujeron los mayores porcentajes de grano manchado (C4) pertenecen al grupo de *A. alternata*. Por otra parte, el grupo de miembros taxonómicos de *A. infectoria* (C3) aparecen asociados con las variables radícula necrosada, debilitada y acortada y coleóptilo acortado. Los aislamientos del grupo *A. arborescens* (C2) se asociaron más con parámetros tales como la producción de coleoptile debilitado y radícula necrosada. Es destacable que gran parte de las especies que pertenecen al grupo *tenuissima* (C1) tuvieron el

mejor comportamiento ante todas las variables, incluso por no alterar la germinación del grano.

Se observa en el biplot que en general, cada grupo de aislamientos analizado, se asociaría a un determinado síntoma, a saber: en el grupo A, *arborescens* a la presencia de coleóptilo debilitado; los integrantes del grupo *infectoria*, a radícula debilitada, acortada, necrosada y coleóptilo debilitado; el grupo de *A. alternata*, con grano manchado, y por último el grupo de spp. de *A. tenuissima* no se asociaría a ninguna variable negativa, destacándose por su mejor comportamiento relativo ante las variables evaluadas. Si bien el porcentaje de granos germinados no es afectado significativamente, es destacable el rol epidemiológico del inóculo fúngico portado en la semilla que implica la presencia e introducción de *Alternaria* en campos de siembra con los riesgos sanitarios que ello ocasiona para el cultivo, y para la salud del hombre y animales por la producción de micotoxinas. El fenograma de la Fig. 10 muestra los

aislamientos clasificados en dos grandes grupos, 1 y 2. El grupo uno, involucra a los subgrupos A y B. El subgrupo A reúne principalmente integrantes de los grupos *alternata* y *tenuissima*. El grupo B incluye en su mayoría integrantes del grupo *arborescens*. El grupo 2 está constituido principalmente por representantes del grupo *infectoria*, diferenciándose notablemente del otro. Análogamente a lo explicado en los análisis de los biplots, se observa en el fenograma, una diferenciación marcada de cada grupo de especies de *Alternaria*, donde, dentro de cada uno de ellos, se encuentran los aislamientos correspondientes, determinando así un patrón de comportamiento similar y distintivo entre sí. En la Fig. 11 se presenta la interacción entre los grupos de aislamientos de *Alternaria* y los cultivares de trigo en función de la variable analizada, a saber: A: Coleóptilo Debilitado; B: Coleóptilo Acortado; C: Radícula Debilitada y Acortada; D: Radícula Necrosada. En A, B, C y D se muestran los patrones diferenciales de comportamiento

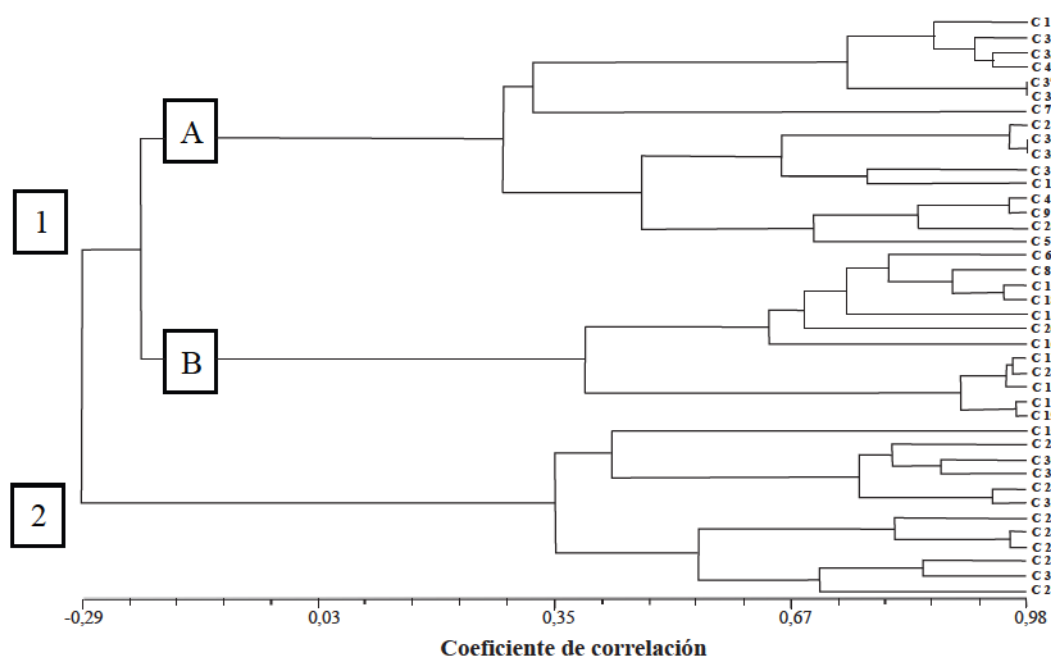


Figura 10. Fenograma de la agrupación de las 40 cepas de *Alternaria*.

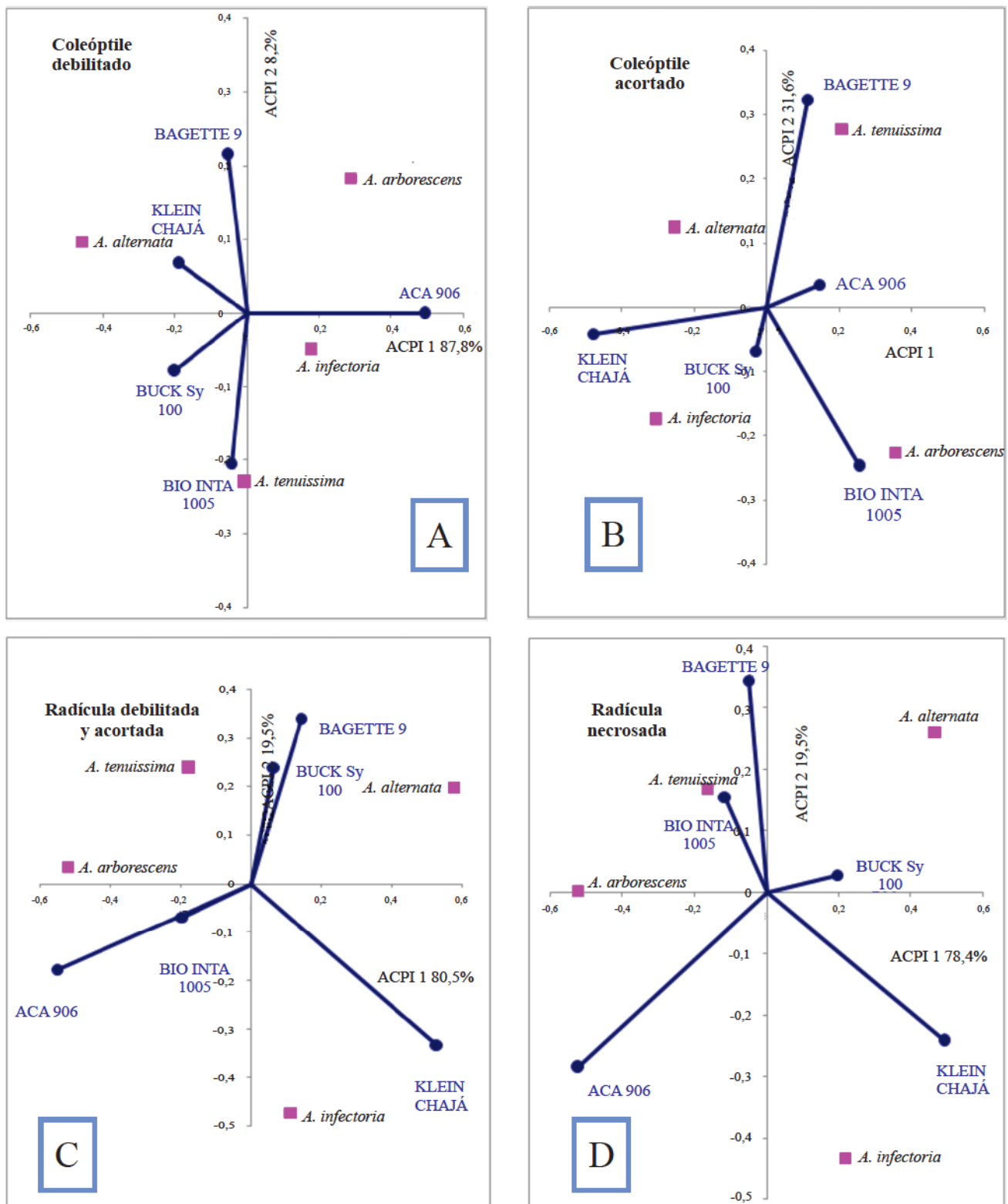


Figura 11. Biplots de la interacción grupo de cepa de *Alternaria*/cultivar de trigo, en función de las variables analizadas A: Coleóptile Debilitado; B: Coleóptile Acortado; C: Radícula Debilitada y Acortada; D: Radícula Necrosada.

de los trigos analizados en función de cada una de las variables evaluadas. Los distintos grupos de aislamientos de *Alternaria* presentan diferente grado de virulencia según el cultivar de trigo inoculado. Por ejemplo, Klein Chajá presentó los síntomas RN, RDYA y CN inoculado con miembros del grupo *infectoria*. Por otro lado, los cultivares Bio INTA y ACA fueron más susceptibles frente a representantes taxonómicos del grupo *arborescens*, mientras que los aislamientos agrupados dentro de *A. alternata* manifestaron un incremento de la frecuencia de ataque en el cultivar Baguette9.

DISCUSIÓN

Los tizones foliares y manchado del grano por *Alternaria* spp., constituyen enfermedades del trigo de importancia en el mundo (19). En Argentina, hoy día, el complejo *Alternaria*-trigo y sus miembros taxonómicos están en revisión (3, 4, 23-27, 29, 31, 32, 50, 55). *Alternaria* constituye una amenaza para el trigo bajo condiciones conducivas, de riesgo sanitario potencial para el cultivo y para la cadena agroalimentaria por tratarse en su gran mayoría, de especies con status cuarentenario, productoras de toxinas, o patógenos agresivos cuyos efectos se desconocen. Un ejemplo de ello lo constituye *Alternaria triticina*, de gran importancia en el marco de nuestras exportaciones de trigo y cebada (20). La evaluación sanitaria de los cultivares integrantes de ensayos comparativos de rendimiento y viveros de observación sanitaria en distintas localidades para el año 2010, indican su presencia y distribución actual a campo (3). El nivel de consultas por el aumento en la aparición del complejo *Alternaria* en grano de trigo, confirma su detección con mayor relevancia, y su aumento en forma sostenida en los últimos años. *Alternaria* spp. son im-

portantes productores de metabolitos secundarios tóxicos, peligrosos tanto para la salud humana como animal (micotoxinas). Las especies de *Alternaria* son capaces de producir una variedad de compuestos diferentes (ácido alternárico, alenueno, alternariol, alternariol-monometil-éter, altertoxina I, ácido tenuazónico), algunos de los cuales son tóxicos para los mamíferos y aves (micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas). Estudios recientes han demostrado que el grupo *infectoria* produce un rango de metabolitos secundarios únicos y muy diferentes a los otros grupos de especies de *Alternaria* ya estudiados (41) lo cual necesita ser investigado en profundidad en los aislamientos de Argentina. La bibliografía respecto a las especies de *Alternaria* asociadas al trigo es confusa, con una gran controversia en lo que se refiere a su clasificación. Se describen actualmente 6 grupos mayoritarios: *alternata*, *A. arborescens*, *A. dauci*, *A. gaisen*, *A. infectoria*, y *A. tenuissima*; los cuatro últimos asociados al trigo (28). Estos mismos grupos se aíslan con frecuencia en otras áreas productoras de trigo (49). En Argentina, si bien el grupo *alternata* es descrito como mayoritario, muchas especies podrían haber sido confundidas y erróneamente incluidas en el grupo, o bien tratarse de nuevos miembros taxonómicos de reciente aparición, tal es el caso de los miembros del grupo de *A. arborescens*. Este grupo presenta además, el riesgo potencial de producir toxinas AAL asociadas a cáncer esofágico en humanos. La distribución de este grupo en granos de trigo indicaría el riesgo toxicológico asociado, si estos metabolitos ingresan en la cadena alimentaria, por lo que debe ser investigado.

El presente trabajo presenta información sobre nuevas problemáticas fúngicas en la zona productora triguera argentina, abordado mediante el análisis

morfo-cultural, patogénico y bioquímico-molecular del hongo bajo estudio.

CONCLUSIÓN

Un total de 4 grupos de especies del género *Alternaria* fueron identificados en trigo, por técnicas fitopatológicas clásicas basadas en la caracterización morfobiométrica y cultural y corroborada por técnicas moleculares. Dichos grupos contienen miembros taxonómicos que son patógenos del trigo y están distribuidos en todas las áreas trigueras argentinas.

A. arborescens se registra por primera vez en asocia-

ción a trigo para Argentina. Considerando su habilidad de producir micotoxinas, merece atención debido a la falta de regulaciones en alimentos en Argentina y otras regiones del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto CONICET PIP 525 y Proyecto de Incentivos a docentes investigadores de la FCAYF, UNLP por el financiamiento. Al Dr. Román Labuda del Biopure Referenz Substeranzen GmbH, Tulln, Austria por su colaboración en la determinación de las toxinas de *Alternaria*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pavón Moreno MÁ, 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: 1772-1781.
- Rotem J (1994) The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society, St. Paul, EEUU.
- Perelló A (2014) Enfermedades nuevas y emergentes del trigo. En: Cordo CA, Sisterna MN (eds). *Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina*. Edulp, pp. 186-193.
- Perelló A, Larrán S (2013) Nature and effect of *Alternaria* spp complex from wheat grain on germination and disease transmission. *Pak J Bot* 45: 1817-1842.
- Andersen B, Kroger E, Roberts R (2001) Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol Res* 105: 291-299.
- Ostry V (2008) *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1: 175-188.
- Patriarca M, Terminiello LA, Azcarate P, Fernandez Pinto V (2006) Producción de micotoxinas por cepas de *Alternaria* aisladas de trigo argentino. III Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos Buenos Aires, 8 al 10 de noviembre de 2006.
- Patriarca A, Azcarate MP, Terminiello L, Fernández Pinto V (2007) Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *Int J Food Microbiol* 119: 219-222.
- Wiese MV (1977) Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, EEUU.
- Zillinsky F (1983) Common Diseases of Small Grain Cereals: A Guide to Identification. CIMMYT, México DF, México.
- Mathur SB, Cunfer BM (1993) Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Dinamarca.
- Melo Reis E, Barreto D, Carmona M (1999) Patología de semillas en cereales de Invierno. Gráfica Condal, Buenos Aires.
- Christensen CH (1958) Fungi on and in wheat seed. *Cereal Chem* 28: 408-415.
- Hyde M, Galleymore HB (1951) The sub-epidermal fungi of cereal grains. II. The nature, identity and origin of the mycelium in wheat. *Ann Appl Biol* 38: 348-358.
- Broggi L, Gonzalez H, Resnik S, Pacin A (2007) *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 24: 47-51.
- Bhowmik J (1969) *Alternaria* seed infection of wheat. *Plant Disease Reporter* 53: 77-80.
- Dieckmann M, Putter C, (eds) (1995) FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm N° 14. Small Grain Temperate Cereals. FAO/PGRI, Roma, Italia.
- Mercado D, Renard E, Duveiller E, Maraitte H (2002) Pathogenicity on wheat of *Alternaria* spp associated with leaf blight symptoms. 4th International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop, North Dakota State University, 21-24 de julio de 2002.
- Agarwal V, Chahal S, Mathur S (1993) *Alternaria* leaf blight. En: Mathur S, Cunfer B (eds). *Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat*. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Dinamarca, pp. 9-11.
- Anahosur K (1978) *Alternaria triticina*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 583. Commonwealth mycological Institute Ferry Lane, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Nema K (1986) Foliar disease of wheat leaf spot and blights. En: Joshi S, Singh D, Srivastava K (eds). *Problems and progress of wheat pathology in south Asia*. Malhotra Publishing House, Nueva Delhi, pp. 162-175.
- Raut J, Guldhe S, Wangikar P (1983) Seed-borne infection of *Alternaria triticina* in wheat and its control. *Indian Phytopathol* 36: 274-277.

23. Perelló A, Cordo C, Alippi H (1992) Tizón de la Hoja del Trigo (*Triticum aestivum* L.) ocasionado por *Alternaria triticina* Pras. & Prab. H. VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas Facultad de Ciencias Agropecuarias, Paraná, Entre Ríos, 7 al 11 de septiembre de 1992.
24. Perelló A, Moreno M (2004) Relevamiento de enfermedades del trigo e identificación de sus agentes causales. VI Congreso Nacional de Trigo, Bahía Blanca, 20 al 22 de octubre de 2004.
25. Perelló A, Carranza M, Larran S (2005) Patógenos de semillas asociados al manchado del grano de trigo. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Villa Carlos Paz, 19 al 22 de abril de 2005.
26. Perelló A, Sisterna MN, Moreno M (2002) Manchas foliares del trigo causadas por el complejo *Alternaria infectoria* en la Argentina. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto 26 al 28 junio de 2002.
27. Perelló A, Moreno M, Sisterna M (2008) *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathol* 57: 379-379.
28. Simmons EG (2007) *Alternaria: An Identification Manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos.
29. Perelló AE, Sisterna MN (2006) Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathol* 55: 303-303.
30. Andersen B, Sørensen JL, Nielsen KF, van den Ende BG, de Hoog S (2009) A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology* 46: 642-656.
31. Perelló A (2010) *Alternaria* Leaf Blight. En: Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD et al. (eds). *Compendium of Wheat Diseases and Pests, Third Edition*. Published by APS (American Phytopathological Society), Minnesota, USA, pp. 16-17.
32. Perelló A (2010) New and emerging fungal pathogens associated with leaf blight symptoms on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. En: Arya A, Perelló AE (eds). *Management of Fungal Plant Pathogens*. CAB International, Reino Unido, pp. 231-243.
33. Chou H-H, Wu W-S (2002) Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycol Res* 106: 164-169.
34. Hong SG, Cramer RA, Lawrence CB, Pryor BM (2005) Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet Biol* 42: 119-129.
35. Simmons E (1992) *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. En: Chelkowski J, Visconti A (eds). *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-35.
36. Simmons E (1967) Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
37. Pavón MÁ, González I, Pegels N, Martín R, García T (2010) PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control* 21: 1745-1756.
38. Andersen B, Kroger E, Roberts G (2002) Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-group. *Mycol Res* 106: 170-182.
39. Benavidez M, Patriarca A, Cabrera G, Fernandez Pinto V (2011) Perfil de metabolitos secundarios de *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuissima* determinado por HPLC-MS. XII Congreso Argentino de Micología.
40. Andersen B, Thrae U (1996) Differentiation of *Alternaria infectoria* and *A. alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Can J Microbiol* 42: 685-689.
41. Andersen B, Thrae U (1996) Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Res* 12: 54-60.
42. Larsen T, Andersen B (2002) Isolation and characterization of unknown fungal metabolites from *Alternaria infectoria* species group. www.levnedsmiddelcentret.dk/2002.
43. Kim BR, Cho S, Yu H (2001) RAPD-PCR analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species. KSPP International Conference, Korea 25-30 de octubre de 2001 Abstract H-90.
44. Roberts R, Reymond S, Andersen B (2000) RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycol Res* 104: 151-160.
45. Gannibal P, Klemsdal S, Levitin M (2007) AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. *Eur J Plant Pathol* 119: 175-182.
46. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, et al. (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed* 3: 381-390.
47. Konstantinova P, Bonants P, Gent-Pelzer M, Zouwen P, Bulk R (2002) Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol Res* 106: 23-33.
48. Pryor BM, Gilbertson RL (2000) Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol Res* 104: 1312-1321.
49. Zur G, Shimoni E, Hallerman E, Kashi Y (2002) Detection of *Alternaria* Fungal Contamination in Cereal Grains by a Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *J Food Prot* 65: 1433-1440.
50. Perelló A, Tacaliti M, Moreno V, Castro A (2003) Análisis comparativo de patrones isoenzimáticos en aislamientos de *Alternaria infectoria* asociados a tizones foliares del trigo. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica, San Luis.
51. Neergaard P (1983) *Seed Pathology*. Vol. I-II. Macmillan, Londres, Inglaterra.
52. Mercado Vergnes D, Renard ME, Duveiller E, Maraite H (2006) Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathol* 55: 485-493.
53. 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. *Anal Bioanal Chem* 395: 1355-1372.
54. Sokal RR, Rohlf FJ (1986) *Introducción a la bioestadística*. Reverté, Barcelona, España.
55. Perelló A, Cordo C, Simon M (1996) A new disease of wheat caused by *Alternaria triticimaculans* in Argentina. *Agronomie* 16: 107-112.