

Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Tesina

**Control biológico de *Claviceps paspali*
(ergot) con el hongo endófito *Trichoderma*
amazonicum en *Paspalum notatum***

Autor: Skuletich, Viviana Belén

Asesor: Ing. Agr. (Dra.) Marcón, Florencia

Año: 2022

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	3
Lugar de realización.....	4
Introducción.....	4
Objetivos.....	8
Materiales y métodos.....	8
Resultados y discusión.....	17
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	25

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por ser siempre mi guía, mi familia por haberme dado la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo momento.

También quiero brindar mi agradecimiento a la cátedra de Forrajicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE por haberme brindado el espacio y las herramientas necesarias para poder concluir con mi trabajo final.

Resumen

La producción de semillas de *Paspalum notatum* Flüggé, gramínea forrajera dominante en los campos del NEA, se ve limitada por *Claviceps paspali* (ergot). En la especie, se identificaron diversos hongos endófitos, destacándose *Trichoderma amazonicum* por promover el crecimiento y por su potencial como biocontrolador. El objetivo fue evaluar el efecto controlador del hongo endófito *Trichoderma amazonicum* sobre *Claviceps paspali* en *Paspalum notatum*. Así, 18 plantas fueron plantados a campo en octubre de 2019 siguiendo un diseño en bloques completos al azar con 3 tratamientos (T1: inoculo del endófito, T2: aplicación de fungicida y T3: testigo) y 6 repeticiones. Los T1 y T2 fueron aplicados el 13 de diciembre 2019 y 9 de enero 2020. Se evaluó la severidad de la enfermedad el 2, 7 y 22 de enero de 2020 mediante escala visual del 1 al 5. No se observaron diferencias significativas. El 9, 17 y 24 de enero 2020 se evaluó el porcentaje de llenado y producción de semillas, incidencia de la enfermedad, área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), porcentaje de llenado corregido y kg de semillas llenas sanas en 100 kg de semillas totales y poder germinativo (PG). Se observaron diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$) en el porcentaje de llenado de semillas el 9 de enero, siendo el T1 el que presentó un mayor llenado (51%). La producción de semillas mostró diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$) el 9 de enero. El T1

presento el valor más alto (0,81 grs). La incidencia de ergot se determinó mediante estimación visual y con ácido sulfúrico. Se observaron diferencias significativas solo para el segundo método el 9 de enero. El T2 presentó la menor incidencia (7,25%) mientras que el T1 la mayor (29,2%). El ABCPE se calculó a partir de los datos de incidencia. Se observaron diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$) siendo el T1 el de valores mayores en ambos casos. El porcentaje de llenado corregido y los kg de semillas llenas sanas calculados en 100 kg se semillas totales mostraron diferencias significativas ($p\text{-valor}<0,05$). Para ambas variables, el T1 presentó los valores más elevados (33% y 43 kg semillas sanas en 100 kg) para el 9 de enero. Por último, se evaluó el PG de las semillas llenas sanas en invernadero. No se observaron diferencias significativas. Estos resultados indican que la presencia del hongo endófito tuvo un efecto sobre ergot ya que permitió una mayor producción de semillas llenas sanas debido a un incremento en la proporción de semillas llenas.

Lugar de trabajo

Cátedra de Forrajicultura y campus de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.

Introducción

El término endófito se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos organismos fúngicos que viven dentro de las plantas, sin embargo, el significado de este término ha variado acorde con el avance del conocimiento en este campo (Gamboa, 2006). Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera sin causar daño evidente. El 'endofitismo' se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera como en espacios intercelulares en los conductos xilemáticos e incluso en raíces (Sánchez-Fernández et al., 2013).

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su hospedante contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), por medio de tres mecanismos: 1) directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito; 2) indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera; 3) ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación (Sanchez-Fernandez et al., 2013).

Las gramíneas del género *Paspalum* constituyen la base forrajera de numerosas explotaciones ganaderas subtropicales de América del Sur (Zuloaga y Morrone, 2005). Estas gramíneas, así como otras especies vegetales, establecen simbiosis con hongos que son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades de plantas (Sanchez Marquez, 2008).

Paspalum notatum Flüggé se destaca entre las especies del género por su abundancia y dominancia en los campos ganaderos de Suramérica incluyendo el nordeste argentino (Gates et al., 2004). Es una gramínea perenne, megatérmica, utilizada como forraje, césped y en suelos susceptibles a la erosión ya que contribuye a su estabilización. Se caracteriza por su adaptación a diversos tipos de suelos, pocos problemas con plagas y baja incidencia de enfermedades (Blount y Acuña, 2009). A pesar de ello, *Claviceps paspali* (ergot) ha sido informada como una de las enfermedades más importantes del género, ya que

reduce la producción y la calidad de las semillas de determinadas variedades (Rios et al., 2015), lo que limita el suministro de las mismas, incrementando el costo de implantación y afectando el establecimiento de las plantas. Además, en caso de ser ingerido por el ganado podría producir síndrome tremorgénico típico, el cual afecta el sistema nervioso central en la cual, si bien la mortalidad es casi nula, la pérdida de peso sería muy significativa (D'Esposito y López, 2000).

Claviceps paspali es un hongo biotrófico específico de gramíneas del género *Paspalum*, perteneciente al filo: Ascomycota, familia: Clavicipitaceae. Desde el punto de vista epidemiológico, se podría clasificar como una enfermedad policíclica, es decir que el patógeno cumple más de un ciclo de infección y producción de inóculo por estación de crecimiento y por lo tanto las estrategias de manejo apuntan principalmente a la disminución de la tasa de desarrollo de la enfermedad, básicamente a través de la reducción del inóculo secundario (Diaz, 1996). La fase sexual (*Claviceps paspali*) se inicia cuando el esclerocio (inóculo primario de la enfermedad) germina en el suelo y fructifica dando peritecios que encierran ascos, y dentro de ellos hay 8 ascosporas (esporas sexuales) que son transportadas por el viento y/o insectos (escarabajos) hasta las flores. Esto se da de forma sincronizada con la antesis floral de *P. notatum*, ya que la floración es el momento de mayor susceptibilidad para la infección del patógeno. La fase asexual (*Sphacelia deliquescens*) comienza cuando las ascosporas filiformes llegan a los órganos femeninos de la flor (gineceo),inician su germinación emitiendo hifas que avanzan por el tubo polínico, atraviesan el estilo, llegando por último al ovario de la flor, donde se desarrolla un micelio blanco, algodonoso y suave que termina con la necrosis del embrión. En su desarrollo el hongo produce una secreción densa, pegajosa, de color ámbar claro muy semejante a la miel, en la cual posteriormente van a desarrollarse numerosos conidios (esporas asexuales), constituyendo el inóculo secundario de la enfermedad. Esta "miel"

puede dar lugar a una infección secundaria al ser transportada por insectos hacia plantas sanas e iniciar un nuevo micelio (D'Esposito y López, 2000). Por último, esta secreción puede perder transparencia y dar lugar a la formación del esclerocio. Éste se caracteriza por ser de forma esférica, de consistencia dura, color pardo claro, de 2 a 5 mm de diámetro y ocupa en la espiga el lugar de la semilla. Los esclerocios pertenecientes a la fase sexual son los encargados de mantener el hongo viable hasta el verano siguiente.

En especies forrajeras, numerosos estudios sobre hongos endófitos fueron realizados principalmente en especies de ciclo otoño invierno primaveral como festuca alta (*Festuca arundinacea*), donde se detectó que el hongo endófito *Neotyphodium coenophialum* produce sustancias tóxicas para el ganado (Garcia Lemos, 2015). Sin embargo, en especies de crecimiento estival como las del género *Paspalum* poco se sabe acerca de la presencia de hongos endófitos. En respuesta a ello, muy recientemente investigadores de la Universidad Nacional del Nordeste y de la Universidad Nacional de Rosario han identificado 4 géneros de hongos endófitos (*Bipolaris*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma*) en *P. notatum* (Depetris et al., 2020).

Dentro de los géneros de hongos endófitos, *Trichoderma* ha demostrado evidencia sobre su efecto como antagónico en varios estudios. En cebolla *Trichoderma* sp. logró disminuir la incidencia de *Fusarium* sp. causante de la “podredumbre basal” y “podredumbre de raíces” (Sanchez et al., 2015). También en cebada (*Hordeum vulgare*) *Trichoderma* sp. se destacó por su control sobre *Dreshlera tritici* agente causal de la “mancha en red” (Moya, 2016). A su vez Depetris et al. (2020) observaron que el hongo endófito *Trichoderma amazonicum* promovió el crecimiento vegetativo de *P. notatum*.

Debido a lo mencionado anteriormente, se destaca la importancia de investigar el efecto de *Trichoderma amazonicum* como controlador de *C. paspali* (ergot) en *P. notatum* y evaluar su efecto en la producción de semillas.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el control de *Claviceps paspali* (ergot) como consecuencia de la presencia del hongo endófito *Trichoderma amazonicum* en *Paspalum notatum*.

Objetivos específicos

- Evaluar la producción de semillas de plantas de *P. notatum* que fueron tratadas con el hongo endófito (*Trichoderma amazonicum*), en plantas tratadas con fungicida y en plantas testigo.
- Determinar el porcentaje de incidencia y severidad de *C. paspali* en los tres tratamientos.
- Determinar el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) por tratamiento.
- Evaluar el poder germinativo de las semillas llenas obtenidas en cada tratamiento.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para este estudio se utilizó el cultivar Argentine de *P. notatum*, el que fue sometido a 3 tratamientos (T). T1 (potencial control): inóculo del endófito (*Trichoderma amazonicum*). T2 (control negativo): plantas sanas con aplicación de fungicida preventivo y curativo, acompañando las aplicaciones del T1 y

considerando la residualidad del producto. T3 (testigo): plantas que no han sido inoculadas con el hongo endófito ni han sido tratadas con fungicida.

El hongo que se utilizó como control biológico de *Claviceps paspali* (ergot) corresponde a cepas del endófito *Trichoderma amazonicum* que el grupo de trabajo aisló previamente de *P. notatum* (Depetris et al., 2020).

Se realizó la siembra de semillas de *P. notatum* en bandejas de germinación en julio de 2019. Cuando las plántulas tuvieron alrededor de 3 hojas fueron trasplantadas a bandejas de plantación (seedlings) de 25 x 25 celdas en el mes de agosto. Un mes después fueron llevadas a macetas de 10 cm de diámetro. Finalmente, cada planta en forma individual fue plantada en el campus de la FCA-UNNE a finales de octubre de 2019. Allí se realizaron labores de fertilización con fertilizante N-P-K activador de follaje (FertiFox) según dosis del proveedor, riego y eliminación de malezas de forma manual y con azadas.

Con el objetivo de obtener plantas libres del hongo endófito, previo a la aplicación de los T1 y T2, en noviembre de 2019, se realizó la aplicación del funguicida Bayleton WP de Bayer cuyo principio activo es Triadimefon con acción preventiva y curativa. Para corroborar el efecto del fungicida aplicado, se realizó el cultivo en un medio PDA (papa agar dextrosa) de porciones de lámina de una muestra representativa de cada tratamiento. Luego de 1 semana de incubación de las muestras, no se observó la presencia de *T. amazonicum*.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con 3 tratamientos y 6 repeticiones, donde la unidad experimental la conformó cada planta individual de *P. notatum* resultando en un total de 18 plantas.

La parcela donde se llevó a cabo el ensayo tenía 10 metros de largo por 5 metros de ancho, además un borde de plantas de la especie fue cultivado alrededor de la misma para eliminar el “efecto bordura” (Figura 1).



Figura 1. Plantas de *P. notatum* cv Argentine dispuestas en el campo siguiendo un diseño en bloques completos al azar con 3 Tratamientos (T1: inoculado con el endófito; T2: aplicación del fungicida y T3: testigo) y 6 repeticiones.

Preparación del inóculo

Se utilizó cultivos del hongo endófito *Trichoderma amazonicum* en medio PDA de 15 días de crecimiento en placas de Petri, previamente aislado de *P. notatum*, siguiendo el procedimiento que dicta Larran et al. (2016), el cual consistió en colocar 10 ml de H₂O estéril en un tubo Falcon de 50 ml, agregando el contenido de las placas de Petri (raspando con un bisturí suavemente). Posteriormente se colocó una gota de solución en la cámara de Newbauer y se hizo el recuento del número de esporas promedio utilizando un microscopio, para luego calcular la concentración deseada. En este caso se utilizó una concentración promedio de 3.446.666 esporas/mL. Finalmente se llevó la preparación a un aspersor a presión con el agregado de un tensioactivo (Tween 20) para una mejor adherencia en la superficie vegetal, teniendo la precaución del correcto agitado antes de su aplicación.

Aplicación de los tratamientos

Seguido a la preparación del inóculo se realizó la aplicación del T1 comenzando alrededor de las 17:30 horas, momento del día en el cual las condiciones ambientales eran las más propicias para la inoculación del hongo endófito. La aspersión se efectuó con un aspersor a presión de manera homogénea asegurándose un buen humedecimiento del área foliar. El T1 se aplicó en las fechas del 13 y 17 de diciembre de 2019 y 9 de enero de 2020 (pre antesis y post antesis, respectivamente). La aplicación del 17 de enero se realizó para reforzar la del 13 de enero ya que previamente ocurrió una tormenta que ocasionó el lavado de las hojas. Posterior a la aplicación del tratamiento 1, las plantas inoculadas se cubrieron con bolsas plásticas, previamente humedecidas, consiguiendo así formar una cámara húmeda y con ella un ambiente más propicio para la colonización del endófito, además el área contaba con una media sombra de 90% de cobertura para ayudar a este proceso (Figura 2). Pasadas las 48 horas se procedió a retirar la cámara húmeda y la media sombra. Este procedimiento se repitió en todas las inoculaciones.

Para el T2, se utilizó el funguicida sistémico residual Consist WG de Bayer cuyos principios activos son Trifloxistrobina y Tebuconazole, con acción preventiva, curativa y erradicante. La dosis utilizada fue la indicada en el marbete (30 grs/hl). Para ello se midió el volumen necesario para humedecer completamente cada planta, y en base a esto se realizó la mezcla. Las aplicaciones se realizaron el 13 de diciembre del 2019 (pre antesis) y el 9 de enero del 2020 (post antesis).



Figura 2. Cámara húmeda generada sobre las plantas de *P. notatum* cv Argentine correspondientes al Tratamiento 1 (inoculo del endófito), y media sombra de 90% de cobertura utilizada para generar un ambiente más propicio para la infestación del endófito.

Información meteorológica del mes de enero de 2020

Los siguientes registros corresponden a la ciudad de Corrientes, los cuales fueron extraídos de la estación meteorológica automática instalada en la sede del Instituto Correntino del Agua y del Ambiente (ICAA).

Precipitaciones: las lluvias alcanzaron un total de 335,4 mm. El día con mayor registro de precipitación fue el día 16 con 132,8mm, seguido por el día 29 con una marca de 96,5mm y el día 21 de enero con 87,6mm; el resto de los días con registro no alcanzaron la marca de 5mm. En el mes se registraron un total de 10 días de precipitación.

Temperatura: La temperatura máxima registrada fue de 40,9°C el día 15 de Enero, a las 17:50 horas. Mientras que la temperatura mínima mensual fue de 18,7°C registrada el día 17 de Enero a las 06:40hs. El día 15 de Enero la amplitud térmica alcanzó los 16,5°C, siendo este día el de mayor variación térmica del mes.

Evaluaciones agronómicas

Severidad de la enfermedad

Se realizó en las fechas del 2, 7 y 22 de enero de 2020 mediante estimación visual, el cual se basó en una escala del 1 al 5 tal como lo describen Rios et al. (2015), donde 1= sin presencia de miel o esclerocios, 2= <10% de la inflorescencia cubierta de miel o esclerocios, 3= 11-50% de la inflorescencia cubierta de miel o esclerocios, 4= 51- 80% de la inflorescencia cubierta con miel o esclerocios y 5= >80% de la inflorescencia cubierta con miel o esclerocios. (Figura 3)



Figura 3. Inflorescencia de *Paspalum notatum* cv Argentine infectada por *Claviceps paspali* (ergot), observada en el momento de análisis de severidad. La flecha indica la secreción densa, pegajosa (miel), producto del patógeno.

Llenado y producción de semillas

Se procedió a realizar la cosecha de las inflorescencias maduras en las fechas 9, 17 y 24 de enero del 2020 de manera manual utilizando tijeras. Esta actividad se realizó de forma escalonada, debido a la característica que presenta dicha especie con respecto a la aparición de las inflorescencias.

Luego el material cosechado se dejó secar de manera natural a temperatura ambiente para poder realizar la trilla de forma manual, separando así los cariopses de sus correspondientes inflorescencias. Una vez finalizada esta actividad, mediante un soplador a pequeña escala (Seedburo Equipment Company, 1022 w), se separó las semillas llenas de las vacías. Por último, se pesó en una balanza de precisión 100 semillas llenas y 100 semillas vacías, repitiendo el mismo procedimiento 3 veces para así de esta manera obtener un promedio. Se pesó y se calculó el porcentaje de semillas llenas y de semillas vacías.

Para la producción de semillas se utilizó el valor del peso de semillas llenas obtenidas de cada planta individual.

Incidencia de la enfermedad

Esta evaluación se realizó el 9, 17 y 24 de enero del 2020 mediante dos métodos, uno de estimación visual y el otro mediante el uso de ácido sulfúrico (Burton, 1945).

Para la estimación visual, se tomaron en promedio 100 semillas llenas por muestra. Se observó con lupa estereoscópica binocular (Leica EZ4) cada una de

ellas para evidenciar la presencia de esclerocios y/o miel (producto del patógeno) (Figura 4), y con ello poder calcular el porcentaje de semillas infectadas con *Claviceps paspali*.

En la técnica con ácido sulfúrico, las semillas fueron colocadas en tubos Falcon de 15 ml con el agregado de ácido sulfúrico al 66% hasta cubrir la totalidad de las mismas, controlando de mantener en contacto mediante el agitado durante 50 minutos, luego se retiraron del mismo con un colador y se lavaron con abundante agua corriente en una bacha. Se dejaron secar en papel absorbente correctamente rotulado, para luego poder realizar el conteo de las semillas y también poder visualizar la presencia de esclerocios. En dicha técnica Burton destaca la eficiencia del método debido a que aquellos cariopsis que estén totalmente infectados por el patógeno serían desintegrados con el ácido, y en otros cariopsis facilitaría su observación, así de esta manera se tendría un dato más fehaciente de la totalidad de semillas infectadas por *Claviceps paspali*.



Figura 4. Semillas de *Paspalum notatum* cv Argentine infectadas por *Claviceps paspali* (ergot), vistas bajo lupa estereoscópica binocular en el análisis de incidencia visual (**A**) y en el análisis con ácido sulfúrico al 66% (**B**). Las flechas indican la presión ejercida por el esclerocio, forzando la separación de las glumas.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

El ABCPE es una variable que estima la cantidad de enfermedad a lo largo del tiempo. El ABCPE se expresa en proporción de enfermedad por días y se interpreta directamente sin transformación (Andrade Piedra et al., 2014).

Esta variable se calculó utilizando los valores de incidencia (y) de cada tratamiento medido por estimación visual y con el método del ácido sulfúrico en las distintas fechas (t) de las cosechas de las inflorescencias, es decir 9/01, 17/01 y 24/01 del 2020, utilizando la siguiente fórmula:

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

Porcentaje de semillas llenas sanas

Para poder determinar el principal efecto del endófito en la producción de semillas se determinó el número de semillas llenas sanas realizando los siguientes cálculos:

- $Nº \text{ de semillas llenas} = \text{Porcentaje de semillas llenas}/100 * 1000$
- $Nº \text{ de semillas llenas con ergot} = Nº \text{ de semillas llenas} * \% \text{ de incidencia con ácido}/100$
- $Nº \text{ de semillas llenas sanas} = Nº \text{ de semillas llenas} - Nº \text{ de semillas llenas con ergot}$

Luego se corrigió el porcentaje de semillas llenas antes calculado mediante la siguiente fórmula:

- $\text{Porcentaje de llenado corregido} = Nº \text{ de semillas llenas sanas} * 100/1000.$

Finalmente, se determinó el peso en kg de semillas sanas. Para ello se realizaron los siguientes cálculos:

- *Peso semillas llenas* = N° de semillas llenas * peso promedio de 1000 semillas llenas/1000.
- *Peso semillas vacías* = (1000 - N° de semillas llenas) * peso promedio de 1000 semillas vacías/1000.
- *Peso total (1000 semillas)* = Peso semillas llenas + Peso semillas vacías.
- *Peso semillas llenas sanas* = N° de semillas llenas sanas * peso promedio de 1000 semillas llenas/1000.
- *Kg de semillas llenas sanas en 100 kg de semillas* = Peso semillas llenas sanas * 100 / Peso total (1000 semillas).

Poder germinativo

El poder germinativo se evaluó en aquellas semillas identificadas como llenas sanas en cada tratamiento y para cada fecha evaluada luego de ser tratadas con ácido sulfúrico.

Para ello alrededor de 100 semillas tratadas con ácido sulfúrico al 66% se pusieron a germinar en bandejas plásticas con sustrato estéril el 13 de septiembre del 2021 bajo invernadero a temperatura ambiente. Se procedió a regar cuando fue necesario. El recuento del número de plántulas emergidas se realizó diariamente hasta que cesó la aparición de nuevas plántulas.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos para cada variable se realizó análisis de la varianza y separación de medias con el test de Tukey para observar si existían diferencias significativas entre los tratamientos analizados. Para ello se utilizó el software de InfoStat.

Resultados y discusión

Severidad de la enfermedad

Con respecto a la severidad de la enfermedad, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las fechas evaluadas. (Tabla 1). Los valores promedios fueron de 1,61, 1,66 y 1,94 para los Tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente. Estos resultados se podrían deber a la contaminación de las semillas sanas con el exudado azucarado (miel) proveniente de las semillas enfermas lo cual dificulta su identificación, tal cual lo indica Burton (1945).

Tabla 1. Valores estimados promedio de severidad de ergot (*Claviceps paspali*) y error estándar (E.E) en *Paspalum notatum* cv Argentine medidos durante tres fechas a partir de una escala del 1 al 5 en los distintos tratamientos (T1: control con el endófito; T2: control con fungicida; T3: testigo).

Tratamiento	Fechas evaluadas					
	07-enero		22-enero		30-enero	
	Severidad	E.E	Severidad	E.E	Severidad	E.E
T1	2	0,27	1	0,34	1,83	0,45
T2	1,5	0,27	1,67	0,34	1,83	0,45
T3	1,83	0,27	2,17	0,34	1,83	0,45

Llenado y producción de semillas

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p\text{-val}<0,05$) para el llenado de semillas en la fecha del 9 de enero, siendo el tratamiento 1 el que presentó un llenado de 3,3 veces mayor al control. El llenado promedio de semillas fue de 51%, 12% y 15,5% para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 6). Para las fechas restantes no se observaron diferencias significativas.

Clay (1987) en su estudio con Festuca alta (*Festuca arundinacea*) observó que en plantas infectadas con hongos endófitos el porcentaje de semillas llenas era dos veces mayor con respecto a plantas no infectadas. Los resultados obtenidos se relacionan con lo antes expuesto, y se podría decir que la presencia de *T. amazonicum* en *P. notatum* potenció este mayor llenado.

En la producción de semillas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p\text{-valor}<0,05$) en la fecha del 9 de enero (Figura 5). El tratamiento 1 mostró una mayor producción de semillas llenas. Depetris et al. (2020) al estudiar el efecto de la presencia de *T. amazonicum* en *P. notatum* observaron un incremento en el crecimiento vegetativo, por lo tanto, se podría esperar que este parámetro vaya acompañado de una mayor producción de semillas (grs/planta). Los resultados obtenidos en la fecha del 9 de enero se relacionan con lo antes expuesto. Las fechas restantes no presentaron diferencias significativas y esto se podría estar debiendo a que las condiciones ambientales de temperatura, radiación y humedad que indica el informe meteorológico alrededor de las fechas de análisis concuerdan con lo expuesto por (Rios et al., 2015) ya que las mismas se dieron en el momento de mayor susceptibilidad de *P. notatum* contribuyendo a una mayor presión por parte del patógeno requiriéndose tal vez, un refuerzo de la aplicación del endófito.

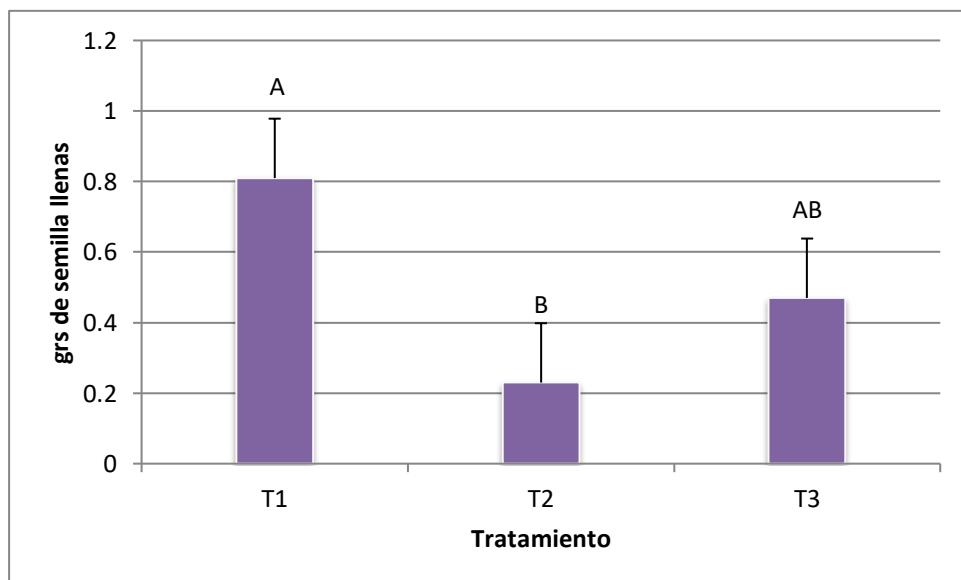


Figura 5. Gramos de semillas llenas por planta en *Paspalum notatum* cv Argentine analizadas para la fecha del 9 de enero entre los diferentes tratamientos (T1: control con el endófito; T2: control con fungicida; T3: testigo). Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Tukey al 5%. ns= diferencias no significativas.

Incidencia de la enfermedad

En el análisis de la incidencia de la enfermedad para el método de estimación visual no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las 3 fechas evaluadas, por lo tanto se podría decir, al igual que en la estimación de la severidad, que el nivel de presencia de ergot es difícil de percibirlo a simple vista, requiriéndose de análisis más específicos como lo indica Burton (1945), así, mediante el método con ácido sulfúrico se lograron observar diferencias significativas ($p\text{-val}<0,05$) para la fecha del 9 de enero. El tratamiento 2 fue el que mostró menor incidencia de ergot (7,25%), mientras que el tratamiento 1 mostró los mayores valores (29,2%) (Figura 6).

La mayor incidencia observada el 9 de enero en el Tratamiento 1 se podría deber a que, en el mismo, el porcentaje de semillas llenas también fue mayor. Además, si bien el Tratamiento con fungicida sistémico (T2) logró reducir la incidencia en dicha fecha no sería biológicamente significativo y debería probarse la realización de más aplicaciones como lo indica Rios et al., 2015, y también podría incluirse un análisis de costos para analizar si el número de aplicaciones se justificaría económicoamente.

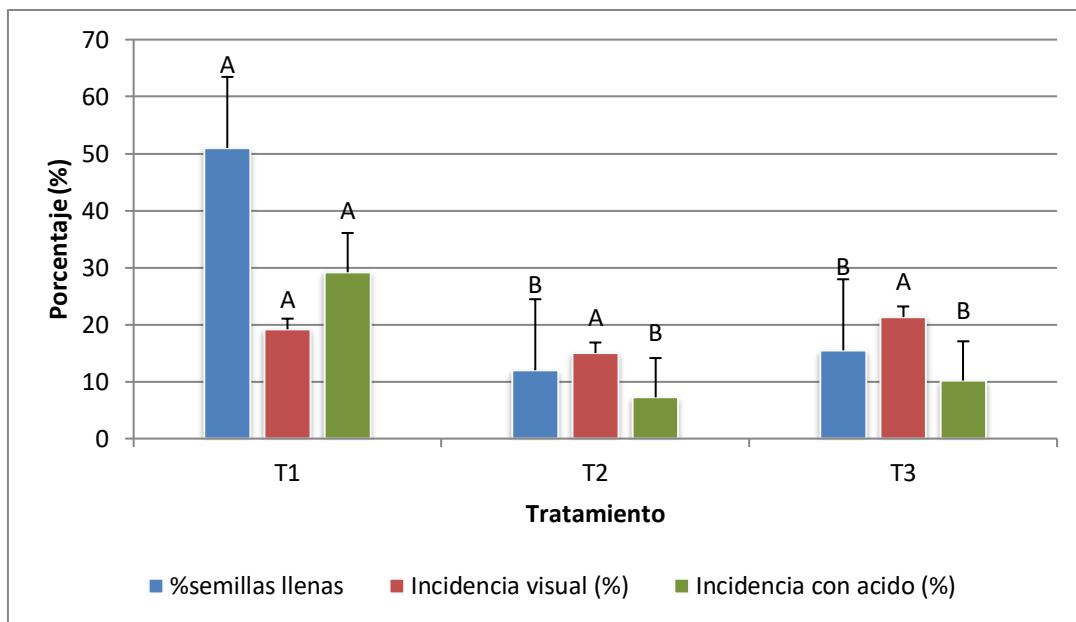


Figura 6. Semillas llenas (%), incidencia de ergot (*Claviceps paspali*) visual e incidencia con ácido sulfúrico en *Paspalum notatum* cv Argentine para cada tratamiento (T1: control con el endófito; T2: control con fungicida; T3: testigo) medidos en la fecha del 9 de enero del 2020. Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Tukey al 5%.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

Los valores del área bajo la curva del progreso de la enfermedad obtenidos de acuerdo a la incidencia visual y con ácido demostraron diferencias significativas (p -valor<0,05). En ambos casos el Tratamiento 1 fue el que presentó un valor más elevado. (Figura 7).

López (2000) destaca el análisis del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) como una medida para estimar la cantidad de enfermedad entre observaciones en el transcurso del tiempo, y así facilitar las comparaciones entre tratamientos. Si bien los valores de incidencia analizados por fecha solo mostraron diferencias estadísticamente significativas en una de ellas (9 de enero), con este parámetro se incorpora los valores de las fechas analizadas a uno solo de una manera acumulativa. Así, se pudo observar un

mayor ABCPE en el tratamiento 1, lo cual estaría indicando que la enfermedad tuvo un mayor desarrollo en dicho tratamiento. Esto también podría estar asociado a un mayor porcentaje de semillas llenas, tal como se mencionó anteriormente.

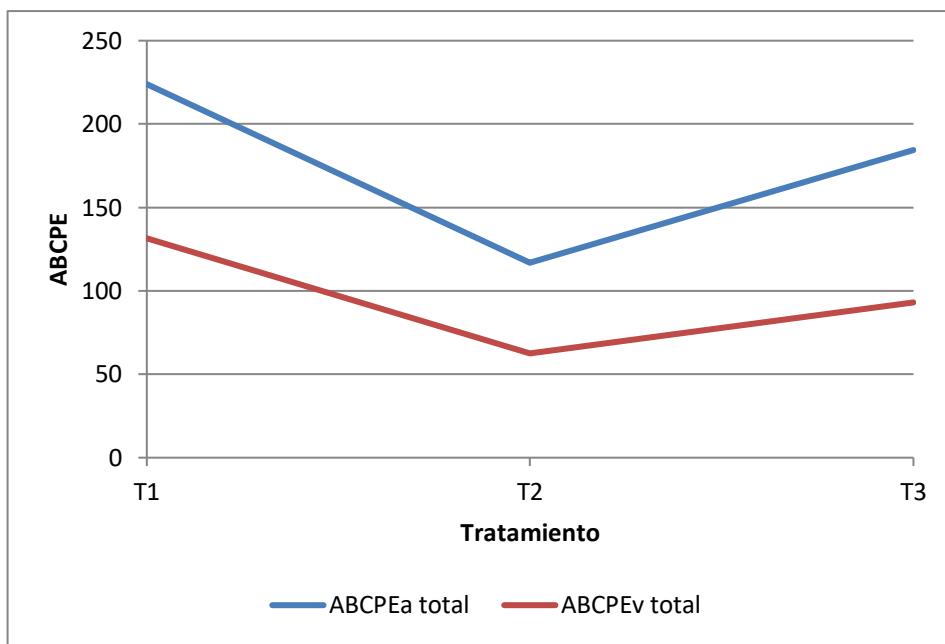


Figura 7. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ergot) calculada en base a la incidencia visual (ABCPEv total) e incidencia con el método del ácido sulfúrico (ABCPEa total) en *Paspalum notatum* cv Argentine para cada tratamiento (T1: control con el endófito; T2: control con fungicida; T3: testigo). Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Tukey al 5%.

Porcentaje de semillas llenas sanas

En el porcentaje de semillas llenas corregido (% de semillas llenas sanas) se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor<0,05) para la fecha del 9, pudiendo visualizarse valores mayores para el tratamiento 1 (Figura 8).

En los kg de semillas llenas sanas calculados en un total de 100 kg de semillas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor<0,05) para el 9 de enero, siendo el tratamiento 1 el que presentó los valores mayores (Figura 8).

Tanto los valores de porcentaje de llenado corregido, como los de producción de semillas tendrían estrecha relación con lo analizado por Depetris et al. (2020), en el cual se demuestra que la presencia del hongo endófito *Trichoderma amazonicum* tiene un efecto positivo en *Paspalum notatum*, en este caso, aumentando el número y peso de las semillas llenas sanas. Además, también se puede decir que la aplicación del fungicida no logra incrementar significativamente la calidad de las semillas, tal cual lo demostró Rios et al., 2015.

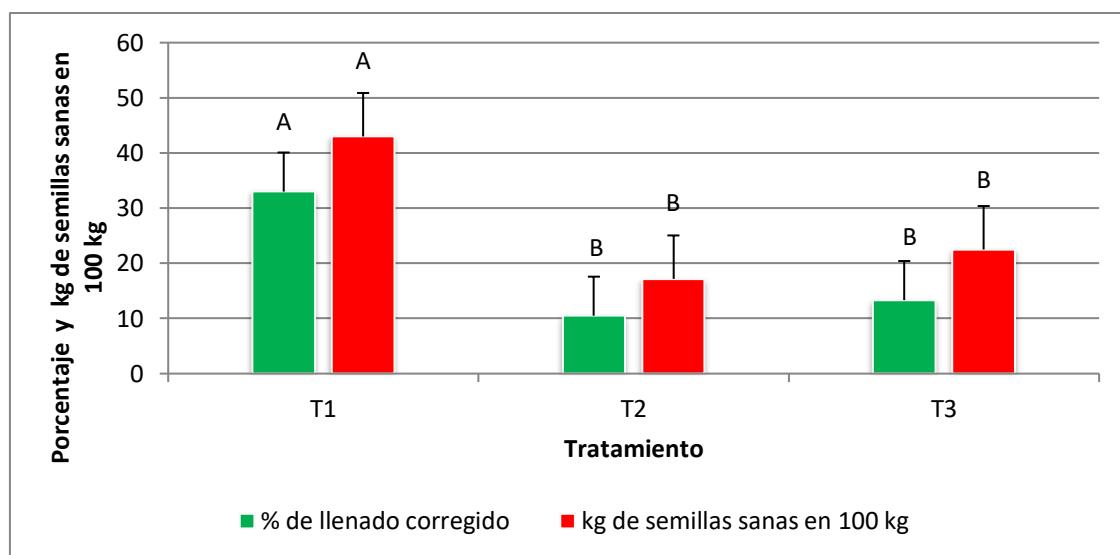


Figura 8. Porcentaje de llenado corregido (% de semillas llenas sanas) y Kilogramos de semillas llenas sanas calculados en 100 kg de semillas totales de *Paspalum notatum* cv Argentine, en cada tratamiento (T1: control con el endófito, T2: control con fungicida y T3: testigo) analizado para la fecha del 9 de enero. Letras distintas indican diferencias significativas mediante el test de Tukey al 5%.

Poder germinativo

No se evidenciaron diferencias significativas en el poder germinativo para los tratamientos en las distintas fechas analizadas. Sin embargo, en la figura 10 se observa una tendencia positiva en el tratamiento 1, dando valores mayores de PG en la segunda y tercera fecha de análisis (17 y 24 de enero).

Clay (1987) en su estudio con Festuca alta (*Festuca arundinacea*) y Ryegrass (*Lolium perenne*) pudo observar que las semillas de las plantas infectadas con endófitos demostraban tener un porcentaje de germinación mayor que las semillas de las plantas no infectadas, desconociéndose el mecanismo de acción. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo no demostraron tener diferencias significativas, la tendencia de los mismos se relaciona con los datos hallados por Clay (1987).

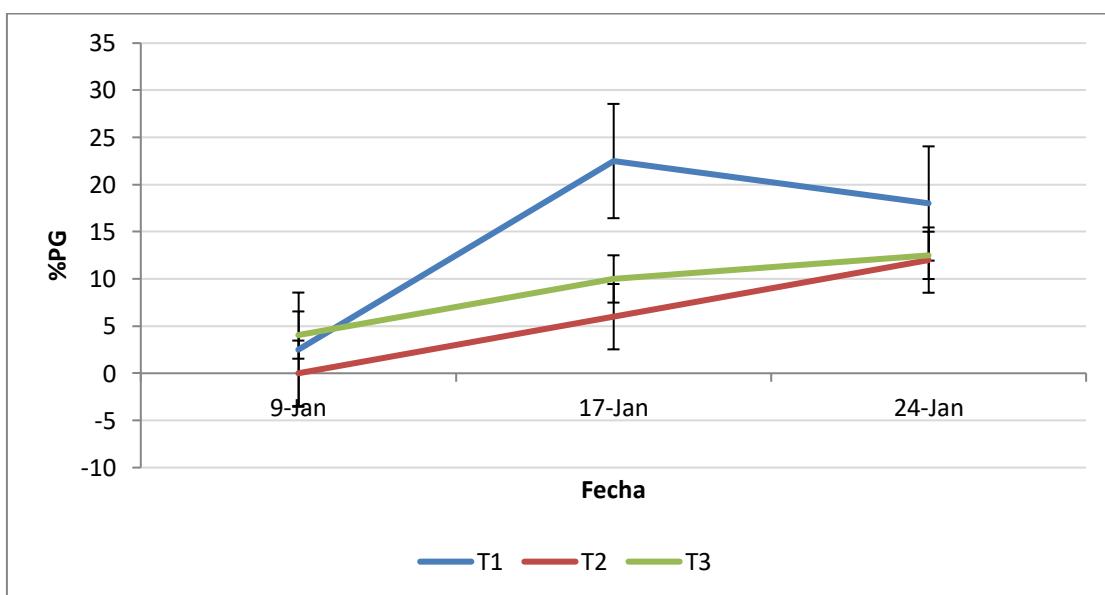


Figura 9. Poder germinativo (%PG) de semillas llenas sanas de *Paspalum notatum* cv Argentine previamente tratado con el hongo endófito *Trichoderma amazonicum* (T1), un fungicida sistémico (T2) y el tratamiento control (T3) y cosechadas en 3 fechas distintas.

Conclusiones

La presencia del hongo endófito *Trichoderma amazonicum* tuvo un impacto en la producción de semillas de *Paspalum notatum* cv Argentine ya que permitió incrementar el número de semillas llenas sanas, como así también su peso. Esto traería beneficios en los sistemas de producción ganaderos, considerando que una de las principales vías de implantación del cultivo es la utilización de semillas para la siembra.

En cuanto a las estimaciones visuales de severidad e incidencia visual, presentan baja eficiencia debido a que las semillas sanas se contaminan con las semillas enfermas, por lo tanto, el patógeno no llega a ser perceptible a simple vista. Sin embargo, el análisis de la incidencia con ácido sulfúrico al 66 % permitió realizar una mejor visualización de las semillas infectadas con ergot, demostrando que los tratamientos evaluados tuvieron un efecto en la incidencia de la enfermedad, siendo el T2 el que menor incidencia al patógeno tuvo.

El ABCPE permitió realizar un análisis integrado del progreso de la enfermedad en los distintos tratamientos a partir de los valores de incidencia. El fungicida (T2) no logró evitar que la enfermedad se desarrollara, y tampoco logró mejorar la calidad de las semillas.

El valor del poder germinativo si bien no mostró diferencias significativas, tuvo una tendencia positiva en las semillas de plantas tratadas con el endófito.

Bibliografía

- Blount A.R.; Acuña C.A. 2009. Bahiagrass. En: Singh R.J., (ed.), Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: Forage crops - Volume 5. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 81–101.
- Burton G.W. 1945. A technic for measuring ergot resistance in *Paspalum* species. *Agronomy Journal*, 37(2):160-162.
- Clay K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 73:358-362.

- D'Esposito R.; Lopez C. 2001. Biological characteristics of *Claviceps paspali* Stev & Hall. Boletin Micologico, 16:1-8.
- Depetris M.; Acuña C.; Gutierrez S.; Marcón F.; Felitti S. 2020. Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. Grass and Forage Science, 00:1–10.
- Diaz M. 1996. Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo – Uruguay. INIA. ISBN: 9974-38-062-6.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Forbes G.; Pérez W.; Andrade Piedra J. 2014. Procedimiento para Evaluación Estándar y Manejo de Datos de Clones Avanzados de Papa. Modulo 3: Evaluación de la resistencia en genotipos de papa a *Phytophthora infestans* bajo condiciones de campo. Guía para Colaboradores Internacionales. Lima (Perú). Centro Internacional de la Papa (CIP). p. 50.
- Gamboa M. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Acta Biológica Colombiana, 11: 3 – 20.
- Garcia Lemos A. 2015. Hongos endófitos presentes en especies forrajeras de la región pampeana, evaluación de su potencial como agentes antagónicos y productores de metabolitos bioactivos. Tesis para optar el título de doctor en ciencias agrarias de la Universidad Nacional de Rosario.
- Gates R.N.; Quarin C.L.; Pedreira CG. 2004. Bahiagrass. En: Moser L.E et al. (eds.), Warm-season (C4) grasses, ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA. 45: 651-680.
- Moya P. 2016. Antagonismo y efecto biocontrolador de *Trichoderma spp.* sobre *Drechslera teres*, agente causal de la "mancha en red" de la cebada (*Hordeum vulgare L. var. vulgare*). Tesis para optar el título de doctora en ciencias agrarias en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP.
- Larran S.; Simón M.R.; Moreno M.V.; Siurana M.P.S.; Perelló A. 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. Biological Control, 92:17–23.

- López H.A. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Rev. Fac. Nal. Agr. Vol 53(1): 941-968. 200.
- Rios E.; Blount A.; Harmon P.; Mackowiak C.; Kenworthy K.; Quesenberry K. 2015. Ergot resistant tetraploid bahiagrass and fungicide effects. Plant health progress, 16(2): 56-62.
- Sánchez Márquez S.; Bills G.F.; Zabalzogeaizcoa I. 2008. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. Fungal Diversity, 33:87–100.
- Sánchez A.D.; Barrera V.; Reybet G.E.; Sosa M.C. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Rev. Fac. Agron. Vol 114 (1):61-70.
- Sánchez-Fernández R.; Sánchez-Ortiz B.; Sandoval-Espinosa Y.; Ulloa-Benítez A.; Armendáriz Guillén B.; García-Méndez M.; Macías-Rubalcava M. 2013. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2):132-146.
- Zuloaga F.; Morrone O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). 102. 1-297.
-