

# Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



Trabajo Final de grado

Carrera Ingeniería Agronómica

**“Efecto antagónico del hongo *Epicoccum nigrum* y del extracto de ajo frente a la micoflora del grano de trigo candeal asociada al manchado. Su potencial empleo como biofungicidas.”**

**La Plata, 27 de Octubre de 2020.**

## **ALUMNA**

Camila Baeck. Legajo N° 26927/1.

## **DIRECTORA**

Ing. Agr. Marina Sisterna.

## **CO-DIRECTORA**

Dra. Paulina Moya.

## **LUGAR DE REALIZACIÓN**

CIDEFI. Curso de Fitopatología. Departamento de Ciencias Biológicas.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	7
Objetivos generales .....	7
Objetivos particulares .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
Aislamiento y selección de patógenos.....	8
Obtención del antagonista .....	9
Cultivos duales .....	10
Uso del extracto de ajo y su efecto sobre los hongos elegidos en ensayos “ <i>in vitro</i> ”. ...	11
Efecto de <i>E. nigrum</i> sobre la micoflora de las semillas. ....	12
Efecto del extracto de ajo sobre la micoflora de las semillas. ....	12
RESULTADOS .....	13
Relevamiento de micoflora. ....	13
Aislamiento y selección de patógenos.....	15
Obtención del antagonista. ....	15
Cultivos duales .....	17
Uso del extracto de ajo. ....	23
Efecto de <i>E. nigrum</i> sobre la micoflora de las semillas .....	24
Efecto del extracto de ajo sobre la micoflora de las semillas. ....	25
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	31
AGRADECIMIENTOS.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO .....	39

## RESUMEN

El manchado del grano/semilla de trigo produce una coloración parda o negra y su etiología está relacionada con un complejo fúngico. Provoca serias pérdidas al reducir la calidad comercial del grano y sus subproductos. El control con fungicidas es el método más utilizado en las enfermedades de semillas, aunque actualmente se exigen productos más naturales. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto biofungicida del hongo *Epicoccum nigrum* y del extracto de ajo sobre la micoflora del grano, asociada al manchado. De 6 variedades de trigo candeal provenientes de la Chacra Experimental Integrada de Barrow, se aislaron los patógenos más representativos. Se aisló *E. nigrum* de estas mismas muestras y se usaron otros aislamientos provenientes del cepario del CIDEFI. Se realizaron ensayos *in vitro* de cultivos duales que se evaluaron con la fórmula de Michereff et al. (1994). Se estudió el efecto de extracto de ajo acuoso (comercial), sembrando los patógenos en cajas de Petri con APG y distintas concentraciones (0,5; 0,7; 1; 3 y 5ml de extracto acuoso cada 10ml de APG). Se evaluó también el efecto sobre la micoflora en las semillas, inoculándolas con una suspensión de esporas ( $2 \times 10^4$  esporas/ml de agua destilada estéril) de *E. nigrum* y sembrándolas en cajas con APG, cuantificando los porcentajes de colonización del antagonista y de germinación de las semillas. Lo mismo se hizo con el extracto acuoso, con cuatro tratamientos: sumersión de las semillas en soluciones al 20% y 30%, durante 12 y 24 horas y luego se las sembró en cajas con APG. Los patógenos más relevantes fueron *Alternaria* spp., *Fusarium graminearum* y *Bipolaris sorokiniana*. Los aislamientos de *E.nigrum* inhibieron el crecimiento de *B. sorokiniana* un 21,84%, seguido por porcentajes similares de *Fusarium* (18,92%) y por último, con menor inhibición *Alternaria* (4,61%). El extracto de ajo controló por completo el crecimiento de *Bipolaris* y de *Alternaria* con 3ml de extracto acuoso en 10ml de APG, y a *Fusarium* con una concentración mayor, de 5ml/10ml APG.

## INTRODUCCIÓN

En la Argentina, el trigo candeal concentra su área de cultivo en el SE de la prov. de Buenos Aires, habiendo tenido fluctuaciones en su producción. Aunque el manchado del grano se ha registrado desde hace décadas, la incidencia natural de esta enfermedad ha aumentado en los últimos veinticinco años, probablemente debido a un efecto de interacción entre la fertilización nitrogenada y los sistemas de labranza conservacionista (Sisterna, 2014).

El manchado de la semilla/grano de trigo (*Triticum* spp.) y de otros cereales como arroz, cebada y centeno, 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 & Cunfer, 1993). 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 a partir de granos enfermos, frecuentemente contienen pecas negras y partículas coloreadas que pasan a la harina perdiendo valor comercial (Dexter & Matsuo, 1982; Lorenz, 1986). Esta patología que provoca el manchado del grano, más importante en trigo candeal que en pan, se ha relacionado con la infección por un complejo fúngico, en su mayoría hongos “dematiáceos” (estructuras negras) de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Drechslera* y otros patógenos como *Fusarium graminearum* (Özer, 2005; Wiese, 1987). También una micoflora débil con especies de *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Stemphylium* spp., puede co- parasitar las semillas junto a los géneros principales, difiriendo en agresividad (Warham *et al.*, 1999). Por otro lado, la micoflora patógena se transmite a la parte aérea produciendo manchas foliares, producidas por

*Alternaria* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *Curvularia* spp., siendo de esta forma la semilla una importante fuente de inóculo (Wiese, 1987).

El método más frecuentemente utilizado para el control de las enfermedades de semillas es el tratamiento con fungicidas, pero el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias puede conducir a la aparición de formas resistentes del patógeno además de afectar al ambiente y al hombre. La concientización ecológica globalizada exige productos más naturales lo que ha llevado a implementar el manejo integrado para una producción de semillas libres de residuos tóxicos. Dentro de éste, el control biológico y los derivados botánicos aparecen como nuevas alternativas que pueden contribuir a minimizar los daños causados por los patógenos y reducir el uso de productos químicos, ofreciendo seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica. Entre los hongos con posibilidades de biocontrol se encuentra *Epicoccum nigrum* Link (= *E. purpurascens* Ehrenb.). Es un anamorfo Ascomycota, común y ampliamente distribuido que coloniza distintos tipos de sustratos y es asociado en principio con el decaimiento de los tejidos vegetales (Andrews & Harris, 2000). Además, como otros hongos ubicuos, desarrolla un estilo de vida endofítico y usualmente se encuentra en los tejidos internos de las plantas (Schulz & Boyle, 2005). Como se dijo, está registrado como un biocontrolador habiendo antecedentes para *Sclerotinia sclerotiorum* en girasol (Pieckenstain *et al.*, 2001), *Pythium* en algodón (Hashem & Ali, 2004), *Monilinia* spp. en duraznero (Larena & Melgarejo, 2009), *Plasmopara* en vid (Kortekamp, 1997) y *Bipolaris miyabeanus*, *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Sarocladium oryzae* en arroz (Sena *et al.*, 2013). En trigo hay investigaciones con buenos resultados en grano contra *F. graminearum*, agente causal del golpe blanco (Jensen *et al.*, 2016). También se han realizado estudios en el manchado del grano con diversos microorganismos saprófitos, entre ellos *E. nigrum*, donde se comprobó que disminuyó significativamente la incidencia

de las enfermedades que causan manchas foliares transmitidas por semilla (El-Gremi *et al.*, 2017).

Relacionado con su acción frente a estos microorganismos han sido caracterizados algunos compuestos con propiedades antimicrobianas, como epicorazina, epirodina, flavipina, epicoccina, epipiridona, y epicocarina (Nighat *et al.*, 2016). Hay escasos estudios a nivel nacional sobre aislamientos nativos de *Epicoccum* spp. como biocontroladores de hongos patógenos (Pieckenstain *et al.*, 2001). Se han obtenido resultados “*in vitro*” mostrando un gran potencial de este hongo, aislado del filoplano de trigo, reduciendo el desarrollo de patógenos foliares de este cereal (Perelló *et al.*, 2001).

Entre los derivados botánicos, se ha señalado el efecto positivo que tiene el extracto de ajo (*Allium sativum* L.; Familia *Liliaceas*) como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, hipocolesterolémico y antiparasitario. Ha sido citada su acción fungicida sobre varios hongos fitopatógenos: *Penicillium* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp.; *Alternaria* sp.; *Colletotrichum* sp.; *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp. (Ahmed *et al.*, 2002; Lalitha *et al.*, 2011; Latif *et al.*, 2006;). En trigo, Hasan *et al.* (2005) demostró que el extracto alcohólico inhibía totalmente la infección de *B. sorokiniana* en semilla. En Argentina hay reportes preliminares de su efecto como estimulante del vigor en las plántulas y como biocontrolador de hongos patógenos (Perelló *et al.*, 2013 a, b; 2015). Estas cualidades son atribuidas a que el ajo posee sustancias azufradas bioactivas como la alicina y alil-sulfuros (Arévalo, 1990).

Considerando que esta micoflora del grano de trigo candeal, puede afectar la calidad del producto, su estudio y manejo sustentable podría presentar un avance para el logro de un mejor alimento.

La presente investigación representa un abordaje preliminar y la primera etapa en el control alternativo de los microorganismos asociados al manchado con miras a su posible aplicación.

## HIPÓTESIS

El hongo *Epicoccum nigrum* y el extracto de ajo pueden tener un efecto antagónico sobre la micoflora asociada al manchado del grano de trigo candeal.

### Objetivos generales

- Evaluar la capacidad antagónica de diferentes aislamientos de *E. nigrum* en la micoflora asociada al manchado del grano de trigo.
- Determinar el efecto del extracto de ajo sobre los hongos asociados al manchado del grano de trigo.

### Objetivos particulares

- Aislar e identificar los hongos asociados al manchado del grano de trigo.
- Seleccionar los hongos más representativos asociados al manchado.
- Obtención y selección de cepas antagonistas de *Epicoccum nigrum*.
- Analizar la interacción “*in vitro*” de *Epicoccum nigrum* con los hongos seleccionados.
- Analizar el efecto del extracto de ajo sobre los hongos elegidos en ensayos “*in vitro*”.
- Evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre la micoflora de los granos.
  - Con cepas de *E. nigrum*.

- Con extracto de ajo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las muestras de semillas de trigo candeal fueron provistas por la Chacra experimental Integrada de Barrow, Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires, provenientes de un ensayo conducido en 2017.

Las variedades utilizadas fueron las siguientes:

Muestra	Variedad
1	BON. INTA FACON
2	BUCK ESMERALDA
3	BUCK PLATINO
4	BUCK GRANATE
5	BON. INTA QUILLEN
6	BUCK ZAFIRO

Los ensayos de laboratorio fueron realizados en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales U.N.L.P.

### **Aislamiento y selección de patógenos**

Se realizó con el método del agar, siguiendo las normas ISTA (International Seed Testing Association) (Neergaard, 1979).

El ensayo consistió en sembrar, en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2%, semillas previamente desinfectadas en hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos. Se



realizaron 3 repeticiones de cada variedad de trigo candeal, de 100 semillas cada una (10 semillas/caja de Petri).

Una vez sembradas, se dejaron incubar en cámara de cría, con condiciones controladas ( $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 75% HR; 12h de luz + UV/12 h de oscuridad) y luego de 5-7 días se procedió a la evaluación mediante lupa estereoscópica y se determinó el porcentaje de granos contaminados y/o patogenizados por agentes fúngicos. Se identificaron a nivel de género los principales hongos aislados, mediante la utilización de claves taxonómicas y bibliografía específica.

Una vez analizados los resultados, se seleccionaron 3 patógenos, los más relevantes en cuanto a su patogenicidad, y con mayor porcentaje de aparición en todas las muestras. Los mismos se repicaron para obtener colonias puras (repique a tubo de ensayo, con APG, incubando en estufa entre 5 y 7 días, a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 75%HR; en oscuridad) que luego se utilizaron para los ensayos con el antagonista y con el extracto de ajo.

### **Obtención del antagonista**

Se aisló *Epicoccum nigrum* de diferentes sustratos: a partir de los ensayos con el método del agar, se obtuvieron 12 aislamientos de las mismas semillas de trigo de las que se aislaron los patógenos y se contó con cepas provenientes del cepario del CIDEFI: 3 de semilla de cebada y 1 aislada del filoplano de *Juglans* sp.

Luego se realizó una selección de los aislamientos de trigo y cebada, en base a la velocidad de crecimiento en APG a los 7 días, incubados en estufa ( $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 75%HR; en oscuridad). Se transfirieron a cámara de cría ( $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 75% HR; 12h de luz + UV/12 h de oscuridad) y a los 3 días se hizo una evaluación de esporulación positiva o negativa. Para esta selección se sembraron 3 repeticiones de cada aislamiento. Se analizó

estadísticamente (Test de Fisher) a fin de diferenciar los aislamientos con mayor velocidad de crecimiento.

### **Cultivos duales**

El potencial antagónico de los aislamientos de *E. nigrum* se evaluó con la técnica del cultivo dual (Dal Bello *et al.*, 1994). La misma consiste en colocar, dentro de cajas de Petri conteniendo 9 ml de APG y a 4 cm uno del otro, dos discos de 5 mm de diámetro del patógeno y del antagonista, extraídos con un sacabocado. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento (combinación patógeno/antagonista) con sus respectivos testigos. Las cajas se incubaron en estufa a 25°C y en oscuridad por 6 días. Se analizaron los resultados a nivel macro y microscópico.

La evaluación se realizó, mediante la fórmula de Michereff *et al.* (1994)

$$MGI(\%) = \frac{(MGC - MGT)}{MGC} \times 100$$

Donde,

*MGI* = Porcentaje de inhibición micelar.

*MGC* = Long. Media del crecimiento micelar testigo

*MGT* = Long. Media del crecimiento micelar tratado.

## **Uso del extracto de ajo y su efecto sobre los hongos elegidos en ensayos “*in vitro*”.**

La Empresa FIDELITY SECURITY S.A (\*) facilitó el extracto acuoso de ajo al 100% siendo su composición: Disulfuro de alilo 4,9%, Trimetiltiourea 11,04%, Tiopental 3%, Trisulfuro de alilo 8,7 %, Otros csp 100%.

### *Ensayos de crecimiento micelial*

En cajas de Petri se incorporó el extracto de ajo al 100% en diferentes volúmenes: 0,5 ml, 07 ml, 1 ml, 3ml y 5ml y se agregaron 10 ml de APG fundido y enfriado a una temperatura de 25-30 °C. Las cajas con APG sin el producto se utilizaron como controles positivos. Se incluyeron en todos los casos 3 repeticiones por tratamiento. En el centro del agar solidificado se colocó un disco de 5 mm extraído de un cultivo de cada patógeno a ensayar. Las cajas se incubaron en estufa a 25 °C. La evaluación se realizó a los 3 y 6 días midiendo el crecimiento diametral de las colonias.

(\*) Acuerdo realizado entre la empresa Fidelity Security S.A – Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales- UNLP. Tema: "EMPLEO DE EXTRACTOS NATURALES PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS EN SEMILLAS DE CEREALES Y HORTÍCOLAS" N° Expediente 200-3290/17. Firma del Acuerdo 2 de Noviembre de 2017

### **Efecto de *E. nigrum* sobre la micoflora de las semillas.**

Las semillas de trigo candeal, variedad Buck Platino (muestra 3, elegida al azar) previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, se sumergieron en las suspensiones de los diferentes aislamientos de *E. nigrum* (trigo, cebada y *Juglans*) a una concentración de  $2 \times 10^4$  esporas/ml de agua destilada estéril (Jensen *et al.*, 2016) durante 30 min. Se realizó un control con agua destilada estéril. Por tratamiento,

se sembraron en APG, 10 semillas/caja de Petri (repetición), cada una con 5 cajas. Luego fueron incubadas en cámara de cría climatizada ( $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 75% HR; 12h de luz + UV/12 h de oscuridad).

A los 4 y 7 días se evaluó cuali-cuantitativamente la micoflora de cada uno de los tratamientos con el fin de confirmar el efecto antifúngico de los mismos. Esta evaluación se efectuó con lupa estereoscópica y microscopio. Además se obtuvo % de germinación.

### **Efecto del extracto de ajo sobre la micoflora de las semillas.**

Las semillas fueron sumergidas durante 12 y 24 horas en extracto de ajo al 20% y 30%. Luego se sembraron en APG, 50 semillas por tratamiento, a razón de 10 semillas/caja de Petri (repetición). Se realizó un testigo. Fueron incubadas en cámara de cría ( $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 75% HR; 12h de luz + UV/12 h de oscuridad).

A los 4 y 7 días se evaluó cuali-cuantitativamente la micoflora con el fin de confirmar el efecto antifúngico del extracto de ajo. Esta evaluación se efectuó con lupa estereoscópica. Además se obtuvo % de germinación.

## RESULTADOS

### Relevamiento de micoflora.

A partir del ensayo con las muestras de las 6 variedades, se observó la presencia de distintos géneros fúngicos (Tabla 1), siendo el de mayor frecuencia *Alternaria* spp., seguido por *Epicoccum*, especies de *Fusarium* (*graminearum*, *poae*) y *Bipolaris sorokiniana*. Además se pueden ver en el anexo, las tablas completas correspondientes a cada muestra.

Se observaron las colonias tanto macroscópicamente (Figura 1), como en microscopio (Figura 2).

Tabla 1: Micoflora encontrada en las semillas de trigo candeal (%)

Especie	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Promedio total
<i>Epicoccum sp.</i>	11,82	9,80	4,25	4,33	5,03	3,90	6,52
<i>Alternaria sp.</i>	76,36	72,55	85,95	89,00	84,56	88,96	82,90
<i>Fusarium sp.</i>	9,90	16,01	7,52	2,33	7,72	4,87	8,06
<i>Nigrospora</i>	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,65	0,16
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	1,28	1,63	1,31	2,00	1,01	1,62	1,47
<i>Cladosporium sp.</i>	0,64	0,00	0,98	2,00	1,68	0,00	0,88

Promedio de germinación	67,33	55,67	42,33	59,67	58	59,00	47,43
-------------------------	-------	-------	-------	-------	----	-------	-------

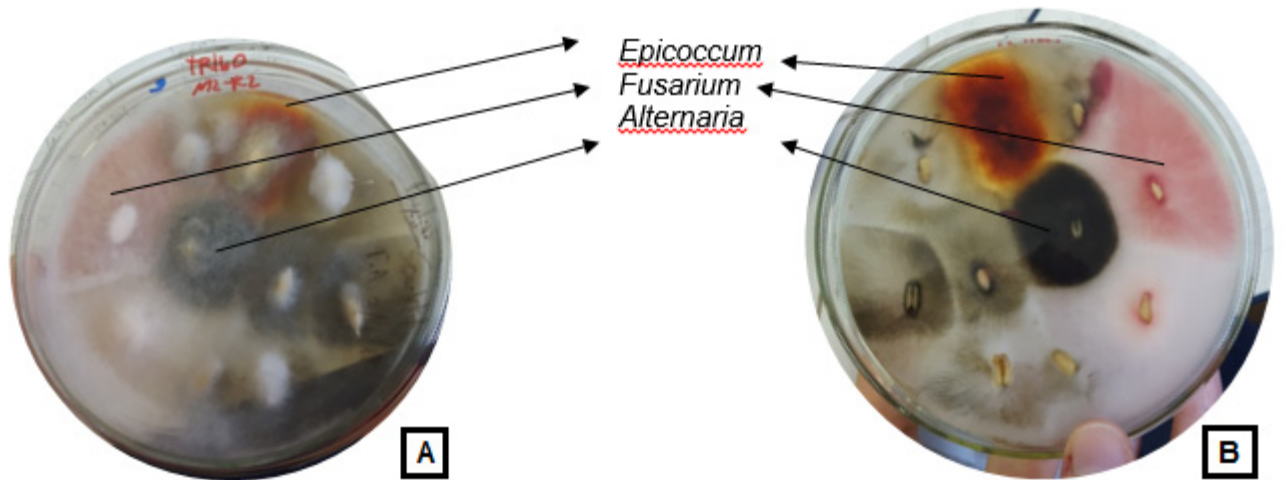


Figura 1, **A**: colonias sobre semillas de trigo, observadas desde arriba. **B**: mismas colonias, observadas desde la parte inferior de la caja de Petri.

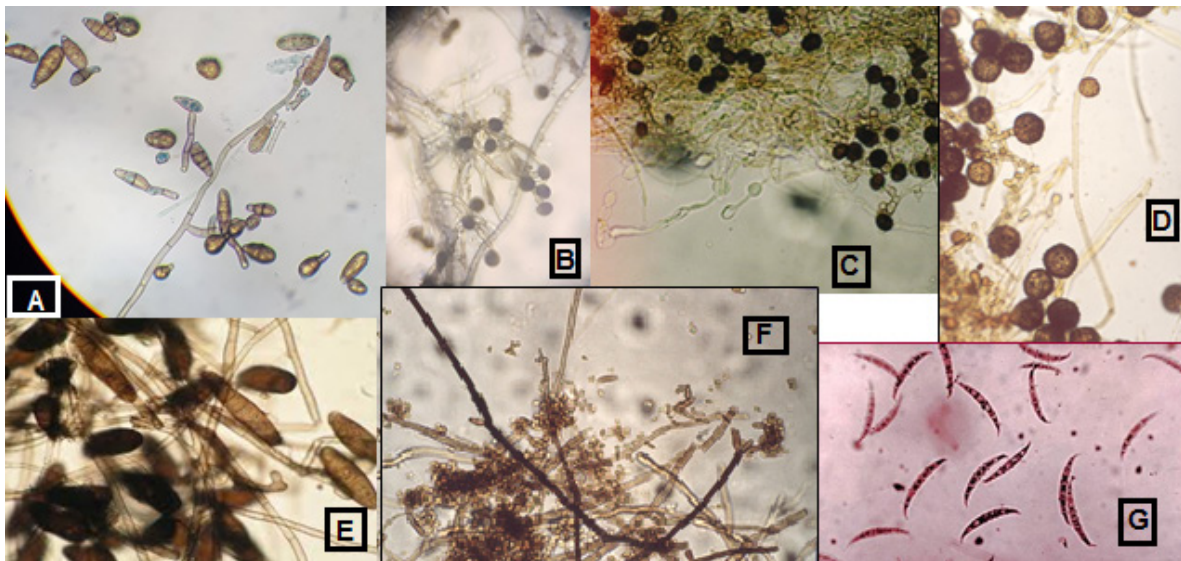


Figura 2: conidios y micelio de **A**: *Alternaria*; **B,C**: *Nigrospora*; **D**: *E. nigrum*; **E**: *B. sorokiniana*; **F**: *Cladosporium*; **G**: *F. graminearum*.

### **Aislamiento y selección de patógenos.**

Los patógenos más relevantes de la micoflora de semillas de trigo fueron: *Alternaria* spp., *Fusarium graminearum*, y *Bipolaris sorokiniana* los cuales se seleccionaron para evaluar el efecto de los tratamientos propuestos.

### **Obtención del antagonista.**

De los aislamientos obtenidos de trigo y cebada, primeramente se descartaron aquellos que no presentaron esporulación a los 10 días. Luego se seleccionó un aislamiento de cada hospedante, según velocidad de crecimiento (Tabla 2 y Figura 3). Además, se sumó el aislamiento de *Juglans*, debido a sus características de abundante esporulación y origen taxonómicamente alejado de las semillas analizadas.

Tabla 2: Aislamientos de *E. nigrum*. Esporulación y crecimiento.

<b>Aislamiento</b>	<b>Esporula</b>	<b>Promedio crecimiento (Ø en cm, luego de 7 días)</b>	<b>Origen</b>
1	Si	5.07	Cebada
11	No	3.72	Cebada
12	No	1.7	Cebada
7	Si	4.28	Trigo
9	Si	5.41	Trigo
13	Si	4.06	Trigo
16	Si	5.38	Trigo
17	Si	5.17	Trigo
18	Si	2.67	Trigo
19	Si	5.53	Trigo
20	No	4.06	Trigo
21	No	4.06	Trigo
22	Si	5.53	Trigo
24	No	2.6	Trigo

25	Si	5	Trigo
----	----	---	-------

De los datos analizados, se seleccionó el aislamiento 1 proveniente de cebada, (fue el único de este origen en esporular, y además mostró una alta velocidad de crecimiento, en comparación con los otros aislamientos). En cuanto a los aislamientos a partir de trigo, 3 no esporularon luego de 10 días, y 9 si lo hicieron. De estos 9, se realizó un análisis estadístico (test de Fisher, ver tabla en anexo), no habiendo diferencias significativas en cuanto a los valores promedio de crecimiento de los aislamientos 9, 16, 19 y 22. Los aislamientos 19 y 22, aunque la diferencia no sea estadísticamente significativa, tuvieron un crecimiento levemente mayor y, si bien ambos esporularon, se observó una mayor esporulación en el aislamiento 19, por lo que este fue seleccionado.

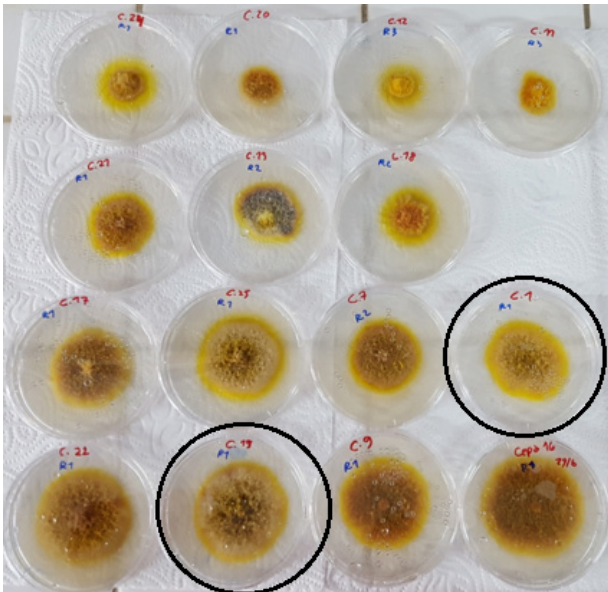


Figura 3: Aislamientos de *Epicoccum nigrum*. En círculo se indican los aislamientos seleccionados

Los aislamientos antagonistas se codificaron de la siguiente forma:

- aislamiento 19 de trigo: E1
- aislamiento 1 de cebada: E2



- aislamiento de *Juglans*: E3.

### Cultivos duales

Como resultado de este ensayo, se obtuvieron los siguientes porcentajes de inhibición del crecimiento miceliar (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentajes de inhibición miceliar

	E1	E2	E3
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	23,62	21,90	20
<i>Alternaria</i> spp.	3,72	5,78	4,34
<i>Fusarium graminearum</i>	17,08	24,79	14,91

Todos los aislamientos de *Epicoccum nigrum*, producen una mayor inhibición sobre el patógeno *B. sorokiniana*, seguido por *F. graminearum*. En cuanto a *Alternaria* spp., la inhibición es marcadamente menor.

Comparando los tres aislamientos de *E. nigrum*, podemos ver que hay ciertas diferencias, en cuanto al comportamiento con cada patógeno, inhibiendo en mayor medida E1 con respecto a *B. sorokiniana* y E2 con respecto a *Alternaria* y *F. graminearum*. A continuación, se detallan las observaciones realizadas para cada tratamiento patógeno-antagonista

#### *Cultivos duales entre los aislamientos E. nigrum y B. sorokiniana*

En la figura 4 se observa el mayor desarrollo de la colonia del hongo patógeno cuando se encuentra sembrado sin la presencia del antagonista (tratamiento testigo). En los demás tratamientos, se ve un halo de inhibición, el patógeno no crece hacia el lado de la colonia del antagonista, *E nigrum*.

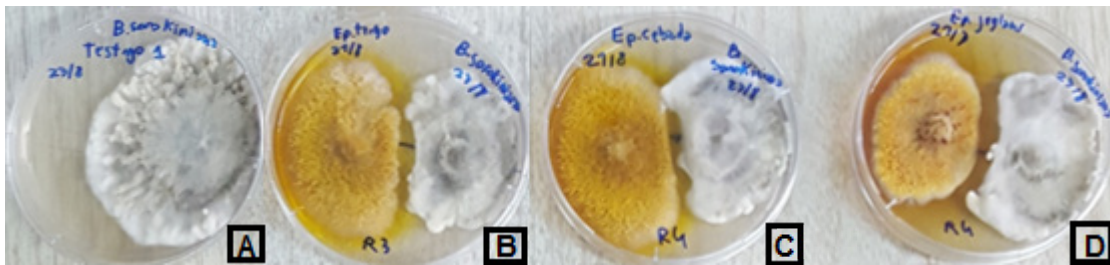


Figura 4: **A:** Testigo; **B:** E1-*B. sorokiniana*; **C:** E2-*B. sorokiniana*; **D:** E3-*B. sorokiniana*.

*Cultivos duales entre los aislamientos de E. nigrum y Alternaria spp.*

En este ensayo, podemos ver una menor inhibición del crecimiento del patógeno frente al antagonista, en comparación con testigo (Figura 5). Se puede apreciar que E3 (Figura 5 D), genera un halo de inhibición, que impide que el patógeno se desarrolle hacia ese lado. Este efecto no se presenta con E1, donde se puede observar que el patógeno crece por encima del antagonista (Figura 5 B y Figura 6). Por último, se observa un efecto intermedio del aislamiento E2: no hay un halo marcado de inhibición y tampoco crece el patógeno sobre el antagonista (Figura 5 C).

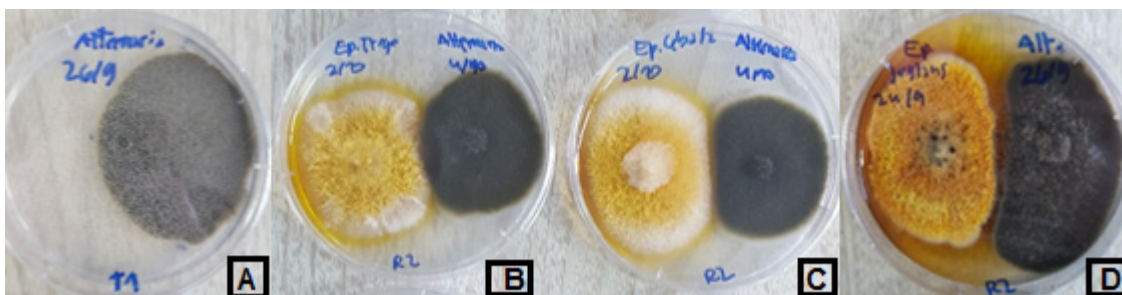


Figura 5 **A:** *Alternaria* (testigo); **B:** E1-*Alternaria*; **C:** E2-*Alternaria*; **D:** E3-*Alternaria*.

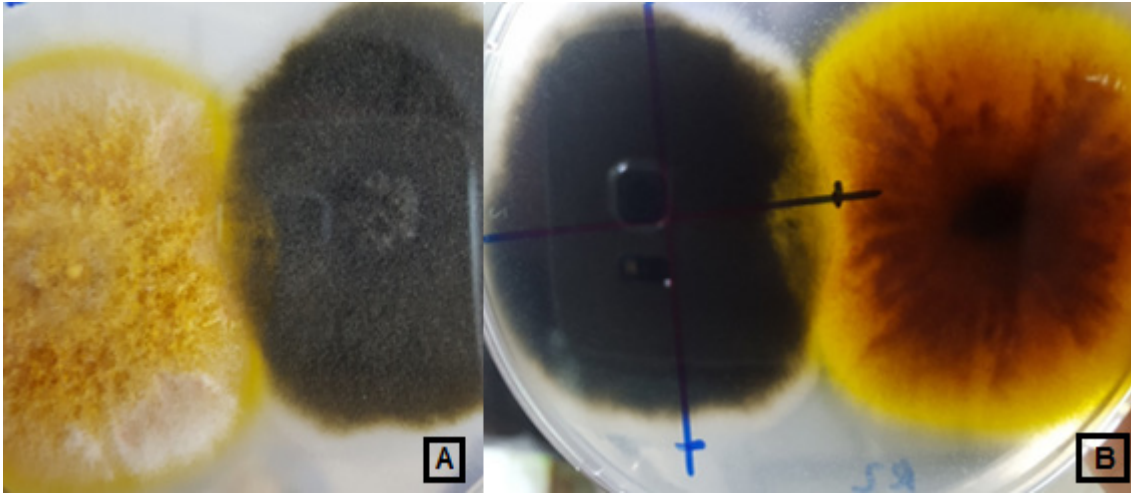


Figura 6: interacción entre E1 y *Alternaria*. **A**: visto desde arriba; **B**: visto desde abajo.

*Cultivos duales entre los aislamientos de E. nigrum y Fusarium graminearum*

En esta confrontación (Figura 7), se observa una inhibición del crecimiento micelial. Comparado con el testigo, *Fusarium graminearum* presenta la capacidad de crecer sobre el antagonista, pero de manera débil. Con ninguno de los aislamientos de *E. nigrum* se observa halo de inhibición, pero sí una zona de contacto o confrontación de diferentes coloraciones rojo-anaranjadas.

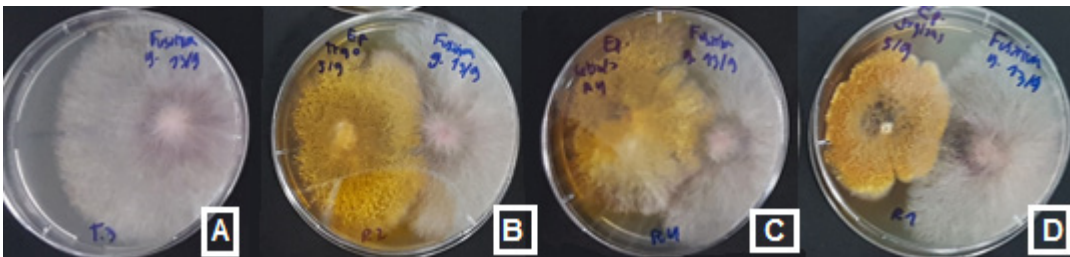


Figura 7 **A**: *Fusarium* (testigo); **B**: E1-*Fusarium*; **C**: E2-*Fusarium*; **D**: E3-*Fusarium*.

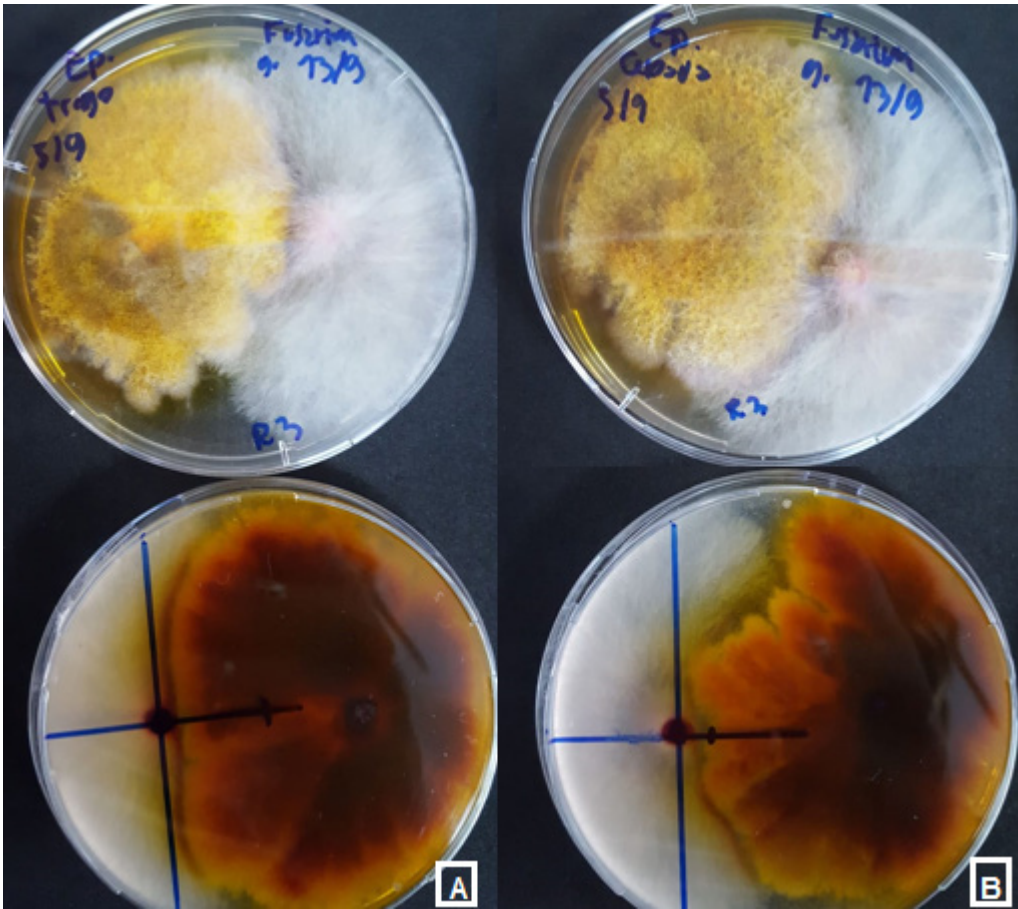


Figura 8 A: E1-Fusarium; B: E2-Fusarium.

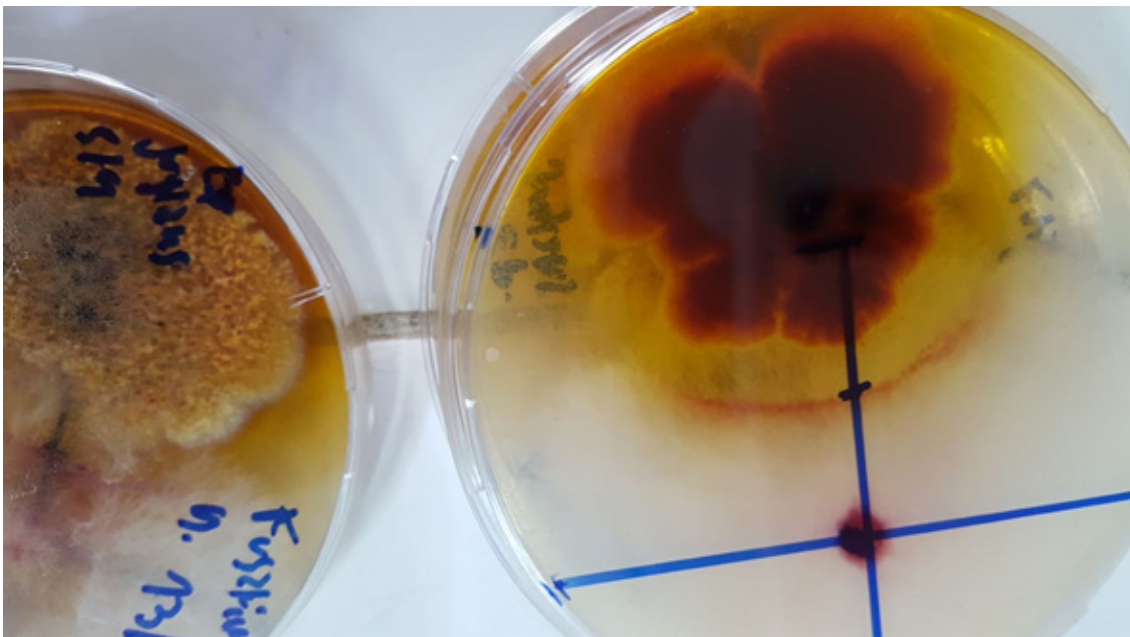


Figura 9: E3-Fusarium.

Los aislamientos E1 y E2 (provenientes de semillas de trigo y cebada respectivamente), parecen poseer un mayor poder de inhibición en cuanto al crecimiento micelial, seguramente relacionado a una mayor velocidad de crecimiento (Figura 8). En cambio, el aislamiento E3 (proveniente del filoplano de *Juglans*), tiene una menor velocidad de crecimiento, aunque en este caso se observa una zona de contacto más marcada que para E1 y E2 (Figura 9).

#### *Alteraciones morfológicas microscópicas*

Se realizaron preparados de las colonias de hongos, en la zona de interacción patógeno-antagonista para su observación al microscopio óptico.

En el caso de *B. sorokiniana*, como resultado de la interacción con E1, se observa micelio anormal, más hialino y con vacuolización y en cuanto a los conidios, los mismos son normales y están presentes en gran cantidad. (Figura 10 A).

El aislamiento E2 por su parte, genera alteraciones en el micelio provocando segmentaciones y en cuanto a los conidios, si bien son normales, están presentes en menor cantidad (Figura 10 B). Por último, E3, provocó también alteraciones en el micelio y formación de vesículas. Los conidios fueron normales, pero pocos (Figura 10 C).



Figura 10: micelio de *Bipolaris*, de la zona de interacción con: **A**: E1; **B**: E2; **C**: E3.

En el caso de *Alternaria*, pudimos observar efectos parecidos de los aislamientos E1 y E2. En cuanto al micelio, E1 generó un enrulamiento (Figura 11 A), mientras que E2 no generó alteraciones. En cuanto a E3, el micelio presentó vacuolización (Figura 11 C). Los conidios se observan normales y en abundante cantidad en los tres casos (Figura 11 B).



Figura 11 micelio de *Alternaria*, de la zona de interacción con: **A:** E1; **B:** E2; **C:** E3

Con respecto a los efectos observados en el micelio de *Fusarium*, aparece enrulamiento (Figura 12 B;C) y también se puede ver, en la Figura 12 A, otra anomalía: el micelio con citoplasma discontinuo.

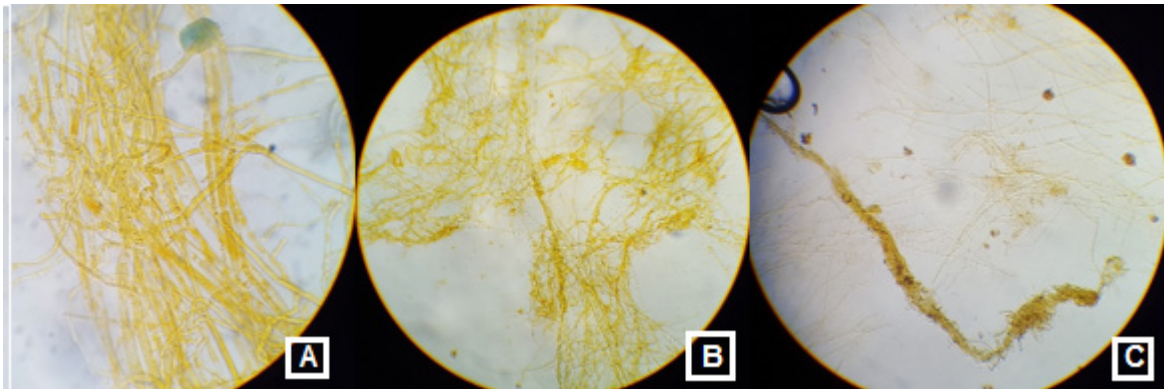


Figura 12: micelio de *Fusarium*, de la zona de interacción con: **A:** E1; **B:** E2; **C:** E3.

## Uso del extracto de ajo.

Evaluando los resultados obtenidos, se puede destacar que tanto para los patógenos *Bipolaris* (Figura 13) como *Alternaria* (Figura 14), el efecto de inhibición del crecimiento micelial, se encuentra entre 1 y 3 ml del extracto de ajo, por cada 10ml de APG, debiendo ajustarse el valor en ese intervalo. En cuanto al patógeno *Fusarium* (Figura 15), la dosis necesaria fue mayor, encontrándose dicho valor, entre 3 y 5 ml.

Tabla 4: crecimiento en cm del diámetro de la colonia del patógeno luego de 6 días (promedio de las 3 repeticiones).

	<i>B. sorokiniana</i>	<i>Alternaria</i>	<i>F. graminearum</i>
ml ajo/10 ml APG	Ø promedio	Ø promedio	Ø promedio
<b>0(testigo)</b>	4,50	4,52	c.t.
<b>0,5</b>	4,47	4,60	c.t.
<b>0,7</b>	5,10	4,67	c.t.
<b>1</b>	1,48	3,62	7,97
<b>3</b>	0,00	0,43	6,50
<b>5</b>	-	-	0,00

c.t.= crecimiento total (el micelio cubre toda la caja de petri)



Figura 13: crecimiento de *Bipolaris* con extracto de ajo, **A:** 3ml; **B:**1ml; **C:**0,7ml; **D:** 0,5ml; **E:** testigo.

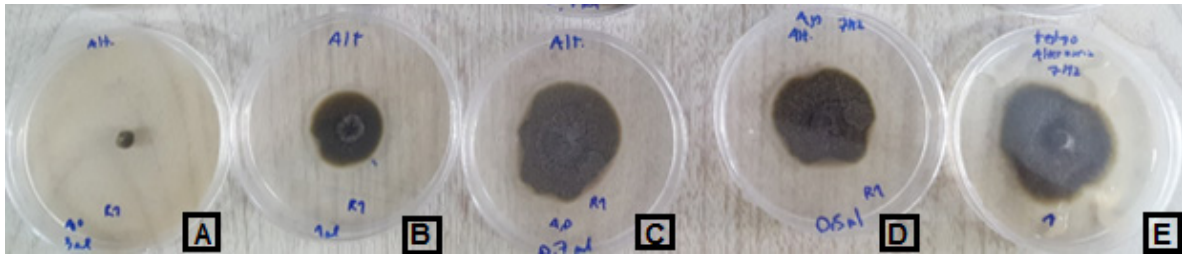


Figura 14: crecimiento de *Alternaria* con extracto de ajo, **A:** 3ml; **B:**1ml; **C:**0,7ml; **D:** 0,5ml; **E:** testigo.

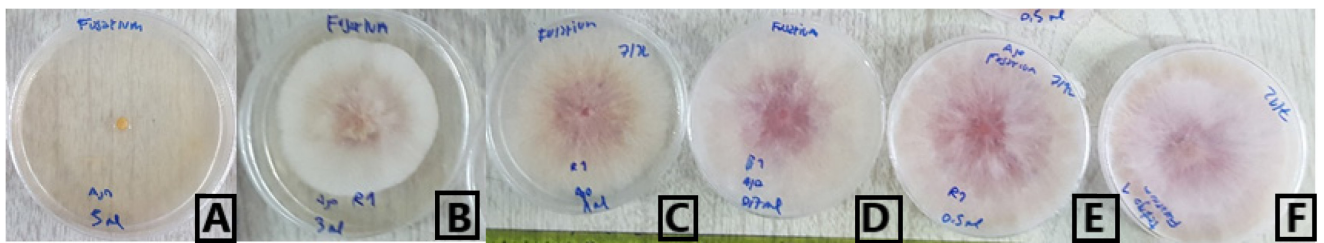


Figura 15: crecimiento de *Fusarium* con extracto de ajo, **A:** 5ml; **B:** 3ml; **C:**1ml; **D:**0,7ml; **E:** 0,5ml; **F:** testigo.

### Efecto de *E. nigrum* sobre la micoflora de las semillas

Como resultado de la inoculación de las semillas de trigo con los distintos aislamientos del hongo antagonista, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5 y Figura 16).

Tabla 5: inoculación de semillas de trigo con los aislamientos de *Epicoccum nigrum*.

Tratamiento	% control por <i>Epicoccum</i>	% germinación semillas
Inoculación con E1	80%	70%
Inoculación con E2	100%	74%
Inoculación con E3	100%	88%
Testigo	4%	70%



Se puede observar que tanto el aislamiento E2 como E3, tuvieron un excelente porcentaje de colonización de las semillas, no presentando en ningun caso aparición de colonias de hongos patógenos. Con respecto al aislamiento E1, el porcentaje de colonización por parte del antagonista fue algo menor, pero de todas maneras, elevado (80%).

También podemos observar que la inoculación de semillas con *Epicoccum* no trajo inconvenientes con respecto a la germinación de las mismas, por el contrario, se elevó este valor (E3 y E2) o se mantuvo (E1).

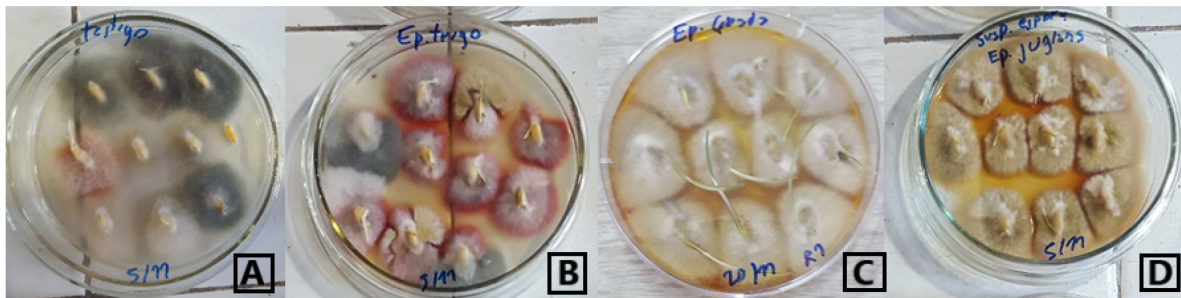


Figura 16 **A:** testigo; **B:** inoculadas con E1; **C:** inoculadas con E2; **D:** inoculadas con E3.

### **Efecto del extracto de ajo sobre la micoflora de las semillas.**

Los resultados obtenidos mediante este ensayo se pueden ver en la Tabla 6. Las distintas combinaciones entre dilución del extracto de ajo y tiempo de las semillas sumergidas en las soluciones, evidencian que cuando el tiempo y la concentración son mayores, la semilla no logra germinar; y por el contrario, cuando se exponen las semillas a una concentración menor o a un menor tiempo de inmersión en las soluciones, el efecto antifúngico se reduce drásticamente (Figura 17).

Cuando se logra efecto antifúngico, también se anula la germinación de las semillas.

Tabla 6: control de patógenos y germinación de semillas en los distintos tratamientos con extracto de ajo:

Tratamiento	% semillas colonizadas por patógenos	% germinación
Testigo	100	80
Ajo al 20% / 12 hs	58	68
Ajo al 30% / 12 hs	12	62
Ajo al 20% / 24 hs	2	22
Ajo al 30% / 24 hs	0	0

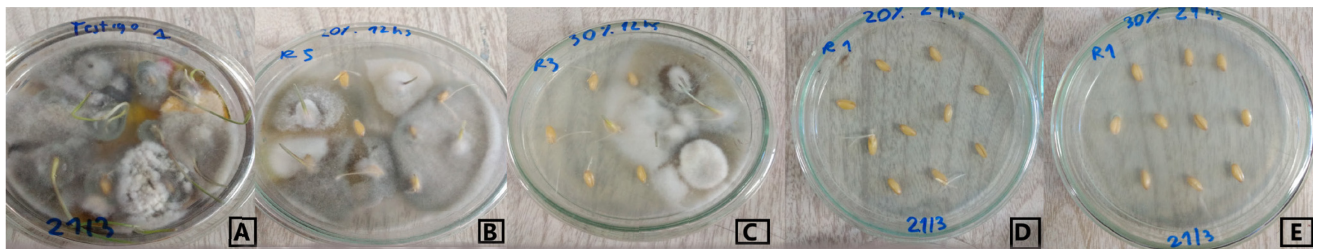


Figura 17: **A:** Testigo; **B:** 20% 12hs; **C:** 30% 12hs; **D:** 20% 24 hs; **E:** 30% 24hs.

## DISCUSIÓN

La micoflora observada en las muestras analizadas de trigo fue similar a la registrada a nivel mundial y local (Mathur & Cunfer, 1993; Sisterna, 2014; Wiese, 1987). Los patógenos más relevantes relacionados con el escudete negro o “black point”, en valores decrecientes fueron *Alternaria* spp., *Fusarium graminearum* y *Bipolaris sorokiniana*. Estos patógenos concuerdan con los encontrados a nivel internacional (Fernandez & Conner, 2011; Pathak & Zaidi, 2013; Srivastava *et al.*, 2015) y también en nuestro país (Cipollone *et al.*, 2020; Sisterna & Sarandón, 2000; 2005). El género *Alternaria* fue el que tuvo mayor presencia, seguido por *Fusarium*, coincidiendo con los trabajos de Gargouri-Kammoun *et al.* (2014) y Toklu *et al.* (2008). En cuanto a *B. sorokiniana* fue aislado en menor frecuencia, resultado similar al obtenido por Cipollone *et al.* (2020) y Sisterna & Sarandón (2000). A pesar de la baja infección, este es un patógeno importante debido a sus efectos en la germinación ya que reduce tanto la emergencia de plántulas como el rendimiento en el cultivo subsiguiente (Cipollone *et al.*, 2020; Ozer, 2005), siendo más agresivo que *Alternaria* spp. (Mathur & Cunfer, 1993).

Es bien conocido el efecto antagonista de ciertos géneros fúngicos como *Chaetomium*, *Epicoccum* y *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos (El-Gremi *et al.*, 2017; Istifadah *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 1999; Moya *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2013). Esta capacidad antagónica puede ser utilizada como potencial fuente de recursos en la investigación de agentes de biocontrol.

En trigo, *Epicoccum* spp., además de ser estudiado como endófito en sus diversos órganos (Crous *et al.*, 1995; Larrán *et al.*, 2007) y aislado del filoplano (Perelló *et al.*, 2001), fue investigado enfrentando como antagonista a varios patógenos tanto de este cereal, como de otros hospedantes (Ogórek & Plaskowska, 2011; Pieckenstain *et al.*, 2001), reportándose la producción de compuestos antifúngicos por parte de este hongo (Elkhateeb & Daba, 2019; Nighat *et al.*, 2016).

Particularmente en trigo, *Epicoccum* spp. redujo la germinación de esporas de patógenos como *Zymoseptoria tritici* y *Drechslera tritici-repentis* y la severidad de la enfermedad que causan estos dos hongos bajo condiciones de invernáculo (Perelló *et al.*, 2002; Larran *et al.*, 2016).

Los efectos antagónicos de *Epicoccum nigrum* encontrados en este trabajo varían según el patógeno con el que se confrontó. Con respecto a la interacción con *Alternaria* spp., el efecto antagónico fue bajo, provocando una inhibición del crecimiento micelial del 4,61% en promedio. Este resultado coincide con lo encontrado por Ducid *et al.* (2015), quienes lo enfrentaron a patógenos de kiwi, y hallaron poca inhibición en la interacción con *Alternaria*. En contraposición, El-Gremi *et al.* (2017), obtuvieron buenos resultados, hallando inhibición tanto con *Alternaria* como con *Fusarium* y *B. sorokiniana*.

La inhibición del crecimiento micelial con *Fusarium graminearum* fue alta, (en promedio 18,93%). Este resultado coincide además con Ogórek y Plaskowska (2011), quienes encontraron que todas las cepas de *Epicoccum* que utilizaron, limitaron el crecimiento del patógeno. Al igual que Jensen *et al.* (2016), que en ensayos de cultivos duales obtuvieron gran reducción del patógeno con cepas endófitas de *Epicoccum* obtenidas de trigo.

Por último, la inhibición más alta la encontramos en la confrontación con *Bipolaris sorokiniana*, con un promedio de 21,8%. Estos valores son similares a los hallados por El-Gremi *et al.* (2017) para este patógeno. También Dal Bello *et al.* (2003) obtuvieron resultados positivos en cuanto a la inhibición de *B. sorokiniana*, aunque con porcentajes de hasta 33,25 %.

En los cultivos duales se observan diferentes fenómenos de interacción. Por un lado en el caso de *E. nigrum* - *F. graminearum* se halló una competencia por nutrientes y hubo reducción en el crecimiento del patógeno con respecto al testigo. Este mismo comportamiento fue observado por Ogórek & Plaskowska (2011), para igual interacción.

Además en la zona de contacto se formó un frente de coloraciones naranja-rojizas, resultado de la liberación de pigmentos, muy común en el género *Epicoccum* que pueden ser del tipo carotenoides como  $\beta$  caroteno,  $\gamma$  caroteno, rodoxantina y torularodina (Gribanovski-Sassu & Foppen, 1967), el pigmento amarillo flavipina (Bamford *et al.*, 1961, Burge *et al.*, 1976) y otros (Elkhateeb & Daba, 2019). En la confrontación con *Alternaria* también hubo competencia, pero en uno de los aislamientos (E3) se observó la formación de una zona de antibiosis, que concuerda con los resultados encontrados por El-Gremi *et al.* (2017) y Perelló *et al.* (2001). Este mismo fenómeno se vió con respecto a *B. sorokiniana*, con todos los aislamientos de *E. nigrum*. La antibiosis relacionada con este patógeno es muy frecuente aún enfrentado con otros antagonistas como *Chaetomium* spp. (Aggarwal *et al.*, 2004; Moya *et al.*, 2016) o con microorganismos del filoplano de cereales (Fokkema, 1973) y en el caso de *E. nigrum* también fue observado por otros investigadores (El-Gremi *et al.*, 2017; Perelló *et al.*, 2001). *Epicoccum* sp. es conocido por producir compuestos antimicrobianos como epicolactona, flavipina, melleína, etc. (Elkhateeb & Daba 2019).

En distintas interacciones patógeno –antagonistas, es muy frecuente encontrar en la zona de contacto varios tipos de alteraciones morfológicas como plasmólisis, vacuolización y aspecto “toruloso” o segmentado del micelio; conidios anormales o en menor cantidad y enrulamiento (“coiling”) del micelio del antagonista sobre el patógeno (Larran *et al.* 2016; Moya *et al.* 2016; Moya *et al.* 2018; Perelló *et al.* 2003; Mónaco *et al.* 2004).

En nuestros resultados se observó que *E. nigrum* produjo diversas alteraciones, encontradas también para otras interacciones de este antagonista con *Pythium*, *Plasmopara*, *Magnaporthe*, *Sclerotinia*, etc. (Brown *et al.* 1987; Kortekamp 1997; Pieckenstain *et al.* 2001; Sena *et al.* 2013). En este caso en particular, algunas de estas alteraciones como reducción en la cantidad de conidios en *B. sorokiniana* coincidieron con otros resultados observados por Bandhari *et al.* (2010) y enrulamiento o “coiling” en

*Alternaria*, que fue registrado por Perelló *et al.* (2002). Para *F. graminearum* se han citado anormalidades en hifas como ramificaciones (Jensen *et al.*, 2016), fenómeno que no fue observado en este trabajo.

En cuanto el efecto de *Epicoccum* en la micoflora de la semilla, los resultados fueron positivos ya que no se observaron colonias de hongos patógenos, habiendo un gran porcentaje de colonización por parte del antagonista. Además, respecto de la germinación, según la cepa probada fue igual o superior al testigo. Este resultado coincide con lo encontrado por El-Gremi *et al.* (2017) para este mismo antagonista. Por otro lado, Perelló *et al.* (2016) en ensayos con diversos tratamientos alternativos naturales frente al patógeno *Alternaria arborescens*, observaron que la inoculación sólo con *E. nigrum*, aumentó la germinación con respecto al testigo (agua destilada).

Entre los derivados botánicos, el extracto de ajo es bien conocido como antioxidante, antibacteriano y antifúngico (Dal Bello & Sisterna, 2015). Este último efecto ha sido registrado en diversos hongos fitopatógenos como *Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Macrophomina* (Dal Bello & Sisterna, 2010). En el tratamiento de semillas se han realizado diversas investigaciones en hospedantes como mostaza, tomate, maní, arroz, sorgo, trigo, etc. (Ahmed *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2005; Latif *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 2010; Syed *et al.*, 2012). En trigo, sin embargo, los estudios de los efectos del ajo son limitados (Perelló *et al.*, 2013).

En ensayos *in vitro*, se ha registrado el efecto en varios fitopatógenos con resultados diversos (Ahmed & Shultana, 1984; Hubert *et al.*, 2015; Upadhyaya & Gupta, 1990). En este trabajo, en los ensayos *in vitro* para los patógenos *Alternaria* y *B. sorokiniana* hubo una inhibición total del crecimiento micelial con 3ml de extracto /10 ml APG (concentraciones de 23%). Para *Alternaria*, hay antecedentes similares para las especies *A. alternata* y *A. tenuissima* (Rani *et al.*, 2018), *A. brassicae* (Wang & Wang, 2008) y *A.*

*solani* (Ahmad *et al.*, 2017). En el caso de *B. sorokiniana*, los mismos resultados positivos fueron encontrados por Perelló *et al.* (2013a) y Silva *et al.*, (2001). Ahmed *et al.* (2002) encontraron una reducción de hasta el 38% del crecimiento micelial en la especie *oryzae*. Con *Fusarium graminearum* se logró una inhibición total del crecimiento con 5 ml de extracto / 10 ml APG (33%). Este resultado concuerda con lo hallado por Nicoldi-Camera *et al.* (2017), quienes lograron inhibición total de *F. graminearum* pero con un 20% de concentración. Otros investigadores para otras especies de *Fusarium*, como *F. moniliforme*, encontraron que el extracto de ajo redujo un 100 % el crecimiento micelial con 20% de concentración (Marcondes *et al.*, 2014).

Con respecto al efecto sobre la micoflora de semillas de trigo, hay escasas investigaciones realizadas. Hasan *et al.* (2005) demostró que el extracto alcohólico inhibía totalmente la infección de *B. sorokiniana* en semilla. En tanto Perelló *et al.* (2013b) obtuvieron más del 50% de reducción de infección de este mismo patógeno con la mayor concentración, de las tres que probaron. En Argentina hay reportes preliminares de su efecto como estimulante del vigor en las plántulas y como biocontrolador de hongos patógenos (Perelló *et al.*, 2013 a, b; 2016). Estas cualidades son atribuidas a que el ajo posee sustancias azufradas bioactivas como la alicina y alil-sulfuros (Arévalo, 1990). En nuestro caso, solo observamos el porcentaje de germinación, y el mismo no solo no se mejoró, sino que disminuyó.

## **CONCLUSIÓN**

Los géneros mas relevantes de la micoflora encontrada en las semillas de trigo fueron predominantemente *Alternaria*, seguido con valores notablemente menores por *Epicoccum*, *Fusarium* y *Bipolaris*.

Los aislamientos de *Epicocum* presentaron buenos resultados *in vitro*, como antagonistas de los tres patógenos seleccionados, aunque con mayor efecto sobre *Bipolaris*. Los

ensayos de inoculación de semillas con esporas de *Epicoccum* también fueron muy satisfactorios.

El extracto de ajo mostró un excelente poder antifúngico *in vitro*, pero presentó inconvenientes en relación con la germinación de las semillas.

Se puede afirmar entonces, que ambos antagonistas podrían ser usados como potenciales Biofungicidas y merecen seguir siendo investigados. En este sentido, se acepta la hipótesis planteada en esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a mi directora, Marina, por tanta enseñanza pero particularmente por su calidad humana. También a mi co directora, Paulina y a las personas que trabajan en el CIDEFI, por haberme compartido su espacio durante mi período de realización de esta tesina.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, R., Tewari A. K., Srivastava K. D., Singh D.V.** 2004. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* 157: 369-377.
- Ahmed F., Khalequzzaman K.M., Islam N., Anam M.K., Islam M.T.** 2002. Effect of plant extracts against *Bipolaris oryzae* of rice under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5: 442-445.
- Ahmad F., Raziqa F., Ullaha N., Khana H., Dina N.** 2017. *In vitro* and *in vivo* bio-assay of phytobiocidal effect of plant extracts on *Alternaria solani* causing agent of early blight disease in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*  
DOI: 10.1080/03235408.2017.1352247
- Ahmed, N. and Shultana, K.** 1984. Fungitoxic effect of garlic on treatment of jute seed. *Bangladesh Journal of Botany* 13, 130–136.
- Andrews J.H., Harris R.F.** 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145–180.
- Arévalo C., H. A.** 1990. Olerresinas Componentes de las especies. *Alimentaria. Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 6: 26-30. Bogotá, Colombia.
- Bamford P.C., Norris G.L.F., Ward G.** 1961. Flavipin production by *Epicoccum* spp. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 44 (3), 354-356 (1961).
- Bhandari D., Ranamukhaarachchi S.L., Shrestha S.M.** 2010. Interactive influences between spot blotch pathogen and saprophytic fungi of wheat at the most hot spot location of South Asia. *Recent Research in Science and Technology* 2010: 01–07.
- Brown A., Finlay R., J.S.Ward J.S.** 1987. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 657-664.
- Burge WR, Buckley L.J., Sullivan J.D., McGrattan C.J., Ikawa M.** 1976. Isolation and biological activity of the pigments of the mold *Epicoccum nigrum*. *J. Agric Food Chem* 24(3): 555-559.
- Cipollone M. J., Moya P., Martínez I., Saparrat M., Sisterna M.** 2020. Grain discoloration in different genotypes of durum wheat (*Triticum durum* L.) in Argentina: associated mycobiota and peroxidase activity *Journal of Plant Protection Research* 60: 14–20.
- Crous, P. W., Petrini, O., Marais, G. F., Pretorius, Z. A., & Rehder, F.** 1995. Occurrence of fungal endophytes in cultivars of *Triticum aestivum* in South Africa. *Mycoscience*, 36: 105–111.
- Dal Bello, G.M., Mónaco, C.I., Sisterna, M.N.** 1994. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatologia Brasileira*, 19: 394-400. Brasil.

**Dal Bello, G.M., Sisterna, M.N.** 2010. Use of plant extracts as natural fungicides in the management of seed borne diseases. p. 51-66. En: "Management of fungal plant pathogens" CABI International. Ed. Arun Arya, A. Perelló. 388 pp. ISBN-13: 978 1 84593 603 7

**Dal Bello G. M., Sisterna M. N.** 2015 Use of natural plant compounds against fungal diseases of grains. p. 35-48. En: Sustainable crop disease management using natural products. CABI International. Ed. S. Ganesan, K. Vadivel, J. Jayaraman. 413 pp. ISBN – 1-3: 978 1 78064 323 6

**Dal bello G.M., Sisterna M.N., Mónaco C.I.** 2003. Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. International Journal of Pest Management 49: 313–317.

**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.

**Ducid M.G., Mónaco C.I., Perelló A.E.** 2015. Potenciales agentes de biocontrol de las principales enfermedades de poscosecha del Kiwi en Argentina. ISBN 978-950-34-1265-7

**El-Gremi S. M., Draz I. S., W. A-E. Youssef.** 2017. Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. Crop Protection 91: 13-19.

**Elkhateeb W.A., Daba G.M.** 2019. *Epicoccum* Species as Potent Factories for the Production of Compounds of Industrial, Medical, and Biological Control Applications. Biomed J Sci & Tech Res 14: 10616-10620. ISSN: 2574 -1241- DOI: 10.26717.BJSTR.2019.14.002541.

**Fernandez M.R., Conner, R.L.** 2011. Black Point and Smudge in Wheat. Prairie Soils and Crops 4: 158-164.

**Fokkema N.J.** 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology 3, 195-205.

**Gargouri-Kammoun L., Bensassi F., Mnari-Hattab M., Rhouma A., Bacha H., Hajlaoui M.R.** 2014. Identification of *Alternaria* species recovered from stored durum wheat kernels in Tunisia. Tunisian Journal of Plant Protection 9: 119–129.

**Gribanovski-Sassu O., Foppen F.H.** 1967. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link. Phytochemistry 6: 907 to 909.

**Hasan MM, SP Chowdhury, A Shahidul, B Hossain and MS Alam,** 2005. Antifungal effects of plant extracts on seed-borne fungi of wheat seed regarding seed germination, seedling health and vigor index. Pakistan Journal of Biological Sciences 8: 1284-1289.

**Hashem M., Ali E.** 2004. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings. Archives of Phytopathology and Plant Protection 37: 283–297.

**Hubert J., Robert B. Mabagala R.B., Mamiro D.P.** 2015. Efficacy of Selected Plant Extracts against *Pyricularia grisea*, Causal Agent of Rice Blast Disease American Journal of Plant Sciences 6: 602-611.

**Istifadah N., Saleeba J., McGee P. A.** 2006. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* *in vitro*. Canadian Journal of Botany 84: 1148-1155.

**Jensen B.D., Knorr K., Nicolaisen M.** 2016. *In vitro* competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoccum nigrum* on media and wheat grains. European Journal of Plant Pathology. DOI 10.1007/s10658-016-0950-6.

**Kortekamp A.** 1997. *Epicoccum nigrum* Link: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Vitis 36: 215-216.

**Lalitha, V., Kiran, B., Raveesha, K.A.** 2011. Antifungal and antibacterial potentiality of six essential oils extracted from plant source. Int. J. Eng. Sci. Technol. (IJEST), 3: 3029-3038.

**Larena I., Melgarejo P.** 2009. Development of a new strategy for monitoring *Epicoccum nigrum* 282, a biological control agent used against brown rot caused by *Monilinia* spp. in peaches. Postharvest Biology and Technology 54: 63–71.

**Larran S., Perello A., Simón M.R., Moreno V.** 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). World J Microbiol Biotechnol 23:565–572.

**Larran S., Simón M.R., Moreno M.V. , Santamarina Siurana M.P. ,Perelló A.** 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease biological control 92:17-23.

**Latif MA, AKM Saleh, MAI Khan, H Rahman and MA Hossain,** 2006. Efficacy of some plant extracts in controlling seed-borne fungal infections of mustard. Bangladesh Journal of Microbiology 23: 168-170.

**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.

**Mandal S., Srivastava K.D., Aggarwal R., Singh D.V.** 1999. Mycoparasitic action of some fungi on spot blotch pathogen (*Drechslera sorokiniana*) of wheat IndianPhytopath. 52 (1): 39-43

**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.

**Marcondes, M.M.; Martins Marcondes, M.; Baldin I.; Maia, A.J.; Leite, C.D.; Faria, C.M.D.R.** 2014. Influence of different aqueous extracts of medicinal plants in the development of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium moniliforme*. Revista brasileira de plantas medicinais 16 (4) Botucatu Oct./Dec. 2014.

- Mónaco C., Sisterna, M.N., Perelló, A. and Dal Bello, G.** 2004. Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World Journal of Microbiology and* 20 (3):285-290.
- Michereff S.J., Silveira N.S.S., Reis A., & Mariano R.L.R.** 1994. Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of Yam. *Microbial Ecology* 28: 101-110.
- Moya P., Pedemonte D, Amengual S & Sisterna M.** 2016. Antagonism and modes of action of *Chaetomium* spp. fungus, potential biocontrol agent of barley foliar fungal diseases. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 51: 569-578. ISSN 0373-580X
- Moya P., Girotti J.R., Toledo A. V., Sisterna M.N.** 2018. Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch *Journal of Plant Protection Research* 58: 45–53.
- Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Singh U.S., Mukherjee M., Schmoll M.** 2013. *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. p. 1–9. In: “*Trichoderma* biology and applications” (P.K. Mukherjee, B.A. Horwitz, U.S. Singh, M. Mukherjee, M. Schmoll, eds.). CAB International, Boston, USA, 327 pp.
- Neergaard P.,** 1979. *Seed Pathology*, vol. I and II. Revised Edition, Mac Millan Press, London, 1191pp.
- Nicolodi-Camera J., Koefender J., Ferreira-Fernandes A. M., Wagner-Soder E. M.** 2017. Antifungal activity of aqueous extracts of medicinal plants on the mycelial growth of *Fusarium graminearum* Schwabe. ISSN e: 2447-9276. *Multitemas* vol. 23.
- Nighat F., Tariq I., Syed A. M., Muniba J., Safia A., Saira A. and A. Mumtaz.** 2016. *Epicoccum* sp., an emerging source of unique bioactive metabolites. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 73: 13-21.
- Ogórek R., Plaskowska E.** 2011. *Epicoccum nigrum* for biocontrol agents *in vitro* of plant fungal pathogens. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 76: 691 – 697
- 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.
- Pathak N., Zaidi R.K.** 2013. Fungi associated with wheat seed discolouration and abnormalities in in-vitro study *Agricultural Sciences* 9: 516-520
- Perelló A.E., M.N. Sisterna, M.R. Simón, Arambarri A.M.** 2001. Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in biological control of foliar pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108: 459-471.
- Perelló A., Gruhke M., Slusarenko A.** 2013a. Effect of garlic extract on seed germination, seedling, health and vigour of pathogen- infested wheat. *Journal of Plant Protection Research*. 53 8(4): 317-323.

**Perelló A., Noll, U., Slusarenko A.** 2013b. *In vitro* efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plant Research* 7:1809-1817.

**Perelló A., Lampugnani G., Abramoff C., Fusé C., Dal Bello G.** 2015. Seed-applied bioprotectants for control of seedborne *Alternaria arborescens* and growth enhancement of wheat. *Integrated Protection of Stored Products IOBC-WPRS Bulletin* Vol. 111 pp. 411-415.

**Perello A., Lampugnani G., Abramoff C., Slusarenko A., Dal Bello G.** 2016. Suppression of seed-borne *Alternaria arborescens* and growth enhancement of wheat with biorational fungicides. *International Journal of Pest Management*. <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2016.1252478>.

**Perelló A.E., Mónaco C.I., Simón M.R., Sisterna M.N. and Dal Bello G. M.** 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for Tan Spot of wheat in Argentina. *Crop Protection* 22: 1099-1106.

**Perelló, A., Simón, M. R., Arambarri, A. M.** 2002. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. *Journal of Phytopathology*, 150, 232–243.

**Pieckenstain F.L., Bazzalo M.E., Roberts A.M.I., Ugalde R.A.** 2001. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. *Mycological Research* 105: 77–84.

**Rani N., Lal H.C., Kumar P., Ekka S., Kumar N.** 2018. In-Vitro Evaluation of Fungicides, Bioagents and Plant Extracts against *Alternaria* sp. infecting Pigeonpea. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* Special Issue-7: 5112-5118.

**Rashid, M.M., Ruhul Amin, A.B.M. and Rahman, F.** 2010. Determination of effective dose of garlic for controlling seedborne fungal disease of tomato. *Journal of Yeast and Fungal Research* 1, 183–187.

**Schulz B., Boyle C.** 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661–686.

**Sena A.P.A., Chaibub A.A., Côrtes M.V, Silva G.B., Silva-Lobo V.L., Prabhu A.S., Filippi M.C.C., Araújo L.G.** 2013. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. *Tropical Plant Pathology*, 38: 387-397.

**Silva A.A.O., Rodrigues E., Antomiazzi N., Milanez A., Bach E.E.** 2001. Allicin effect for control *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Summa Phytopathol.* 27:95.

**Sisterna M.N., Sarandón S.J.** 2000. Blackpoint incidence on durum wheat in Argentina: Influence of cultivar and location. *Acta Agronómica Hungarica* 48 (4): 395–401.

**Sisterna M.N., Sarandón S.J.** 2005. Preliminary studies on the natural incidence of wheat blackpoint under different nitrogen fertilization levels and tillage systems in Argentina. *Plant Pathology Journal* 4, 26-28

**Sisterna, M.** 2014. Manchado de la semilla/ grano de trigo. p .77-91. En: Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina. Eds. C. Cordo, M. Sisterna. Editorial de la Universidad de La Plata (EDULP). 416 pp. ISBN: 978-987-1985-35-7.

**Srivastava J. P., Kushwaha G. D., Shukla D. N.** 2015. Black point disease of wheat and its implications on seed quality. *Crop Research* 47: 21-23.

**Syed, D.Y., Mengesteab, T., Robiel, N., Robiel, W. and Tekle, Z.** 2012. Efficiency of garlic extract and mancozeb against seed borne fungal pathogen of farmer saved sorghum (*Sorghum bicolor*) and groundnut (*Arachis hypogaea*) seeds (2010–2011). *Greener Journal of Agricultural Sciences* 2, 31–36.

**Toklu F., Akgül D.S., Biçici M., Karaköy T.** 2008. The relationship between black point and fungi species and effects of black point on seed germination properties in bread wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32: 267–272.

**Upadhyaya, M.L., Gupta, R.C.** 1990. Effect of extracts of some medicinal plants on the growth of *Curvularia lunata*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 20: 144-145.

**Wang Yun-fan, Wang Gang.** 2008. Study on Control of *Alternaria brassicae* by Garlic Extract. *Journal of Chongqing University of Science and Technology (Natural Sciences Edition)*.

**Warham E. J., Butler L.D., y Sutton R.C.** 1999. Ensayos para la semilla de maíz y trigo. Manual de laboratorio. CYMMYT, México, D. F.

**Wiese M.V.,** 1987. Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society: St Paul, MN, 112pp.

## ANEXO

### Datos estadísticos sobre la velocidad de crecimiento de las cepas de *Epicoccum*.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
medidas	36	0,83	0,76	12,24

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36,08	11	3,28	10,89	<0,0001
cepa	36,08	11	3,28	10,89	<0,0001
Error	7,23	24	0,30		
Total	43,31	35			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,92471

Error: 0,3011 gl: 24

cepa	Medias	n	E.E.	
24,00	2,60	3	0,32	A
18,00	2,67	3	0,32	A
20,00	4,07	3	0,32	B
21,00	4,07	3	0,32	B
13,00	4,07	3	0,32	B
7,00	4,28	3	0,32	B C
25,00	5,00	3	0,32	C D
17,00	5,17	3	0,32	C D
16,00	5,38	3	0,32	D
9,00	5,42	3	0,32	D
19,00	5,53	3	0,32	D
22,00	5,53	3	0,32	D

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

## Cultivos Duales

PATÓGENO:	<i>Bipolaris</i>	26-ago			31-ago			Prom total
		Ø1	Ø2	PROM	Ø1	Ø2	PROM	
Testigo	R1	4,4	4,2	4,3	7,5	6,7	7,1	6,5625
	R2	4	4	4	6,8	6,1	6,45	
	R3	4,4	4,4	4,4	7,2	7,2	7,2	
	R4	3,7	3,2	3,45	6	5	5,5	
EP. Juglans (E3)	R1	3,4	3,4	3,4	7	4,3	5,65	5,25
	R2	3,7	3,5	3,6	6,5	4	5,25	
	R3	3,7	3,3	3,5	6,4	3,8	5,1	
	R4	3,7	3,4	3,55	6,4	3,6	5	
EP. Cebada (E2)	R1	3,7	3,6	3,65	6,4	4,4	5,4	5,125
	R2	3,3	3	3,15	6,8	3,9	5,35	
	R3	3,5	3,4	3,45	5,5	3,9	4,7	
	R4	3,7	3,2	3,45	6,2	3,9	5,05	
EP. Trigo (E1)	R1	3,3	3	3,15	6,2	4	5,1	5,0125
	R2	3,5	3,2	3,35	6,2	3,7	4,95	
	R3	3,3	3,3	3,3	5,8	3,6	4,7	
	R4	3,4	3,4	3,4	6,4	4,2	5,3	

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PROM	16	0,71	0,64	8,46

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,28	3	2,09	9,71	0,0016
tratamiento	6,28	3	2,09	9,71	0,0016
Error	2,59	12	0,22		
Total	8,86	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,97460

Error: 0,2155 gl: 12

tratamiento	Medias	n	E.E.
3,00	5,01	4	0,23 A
2,00	5,13	4	0,23 A
1,00	5,25	4	0,23 A
0,00	6,56	4	0,23 B

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



PATÓGENO:	Alternaria	1-oct			4-oct			Prom total
		Ø1	Ø2	PROM	Ø1	Ø2	PROM	
Testigo	R1	5,3	4,6	4,95	6,8	5,7	6,25	6,05
	R2	5	4,6	4,8	6,1	5,4	5,75	
	R3	5,2	4,6	4,9	6,3	5,3	5,8	
	R4	5,3	5	5,15	6,8	6	6,4	
EP. Juglans (E3)	R1	5,8	4,5	5,15	8	4,5	6,25	5,7875
	R2	5,9	3,8	4,85	7	3,8	5,4	
	R3	5,3	4	4,65	7,3	4	5,65	
	R4	5,1	4,2	4,65	7,5	4,2	5,85	
EP. Trigo (E1)	R1	5,8	4,2	5	7	4,2	5,6	5,825
	R2	5,4	4,4	4,9	7,4	4,4	5,9	
	R3	5,6	4,3	4,95	7,7	4,3	6	
	R4	5,3	4,1	4,7	7,5	4,1	5,8	
EP. Cebada (E2)	R1	5,5	3,9	4,7	7	3,9	5,45	5,7
	R2	5,4	4,1	4,75	7,4	4,1	5,75	
	R3	4,9	4,3	4,6	6,8	4,3	5,55	
	R4	6	4,2	5,1	7,9	4,2	6,05	

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
 Columna2 16 0,21 0,01 4,94

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,27	3	0,09	1,07	0,3993
Columnal	0,27	3	0,09	1,07	0,3993
Error	1,00	12	0,08		
Total	1,27	15			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,44461

Error: 0,0833 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
3	5,70	4	0,14 A
1	5,79	4	0,14 A
2	5,83	4	0,14 A
0	6,05	4	0,14 A

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

PATÓGENO: <i>Fusarium</i>		17-sep			Prom total
		Ø1	Ø2	PROM	
Testigo	R1	7,5	6,5	7	7,4625
	R2	8	7,5	7,75	
	R3	8	7	7,5	
	R4	7,7	7,5	7,6	
EP. Juglans (E3)	R1	7,6	4,7	6,15	6,35
	R2	7,5	5,7	6,6	
	R3	7,8	5	6,4	
	R4	7,7	4,8	6,25	
EP. Cebada (E2)	R1	7,7	3,8	5,75	5,6125
	R2	7,6	4,1	5,85	
	R3	7,8	3,3	5,55	
	R4	7,6	3	5,3	
EP. Trigo (E1)	R1	7,6	5,6	6,6	6,1875
	R2	7,7	4,5	6,1	
	R3	7,6	4,7	6,15	
	R4	7,5	4,3	5,9	

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
 Columna2 16 0,89 0,86 4,21

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,19	3	2,40	33,02	<0,0001
Columnal	7,19	3	2,40	33,02	<0,0001
Error	0,87	12	0,07		
Total	8,06	15			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,41498

Error: 0,0726 gl: 12

Columnal Medias	n	E.E.	
2	5,61	4 0,13	A
3	6,19	4 0,13	B
1	6,35	4 0,13	B
0	7,46	4 0,13	C

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



Inoculación de semillas de trigo con esporas de Epicoccum

Tratamiento	Repetición	% germinación	<i>Epicoccum</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Bipolaris</i>	Promedio colonizado por antagonista	Promedio germinación
Ep. Juglans (E3)	1	90%	10	0	0	0	100%	82%
	2	80%	10	0	0	0		
	3	60%	10	0	0	0		
	4	90%	10	0	0	0		
	5	90%	10	0	0	0		
Ep. Trigo (E1)	1	70%	9	1	0	0	80%	70%
	2	80%	8	2	0	0		
	3	80%	10	0	0	0		
	4	70%	6	4	0	0		
	5	50%	7	3	0	0		
Ep. Cebada (E2)	1	100%	10	0	0	0	100%	74%
	2	80%	10	0	0	0		
	3	80%	10	0	0	0		
	4	60%	10	0	0	0		
	5	50%	10	1	1	0		
Testigo	1	70%	1	8	0	1	4%	70%
	2	80%	0	10	0	0		
	3	80%	0	10	0	0		
	4	70%	0	9	1	0		
	5	50%	1	8	1	0		

Efecto del extracto de ajo en las semillas de trigo

sembrado 21/3	Observación	25/3 (4 dias)		28/3 (7 dias)	
	Repetición	germinación	colonias	germinación	colonias
testigo	1	8	10	8	10
	2	8	10	8	10
	3	9	10	9	10
	4	9	10	9	10
	5	6	10	6	10
20% 12 hs	1	7	8	5	8
	2	7	3	7	3
	3	8	6	7	8
	4	8	4	8	5
	5	7	4	7	5
30% 12 hs	1	5	3	6	3
	2	6	3	7	4
	3	5	3	7	4
	4	6	2	6	3
	5	4	0	5	2
20% 24hs	1	2	0	2	0
	2	1	0	1	0
	3	3	0	3	0
	4	3	1	3	1
	5	2	0	2	0
30% 24hs	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0