



Universidad Católica Argentina

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Trabajo final de graduación para optar el grado de Ingeniero Agrónomo

Eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en plantas de festuca alta mediante el uso de un fungicida

Estudiante: **Carlos Girado Smart**

Tutor: **Ing. Agr. Lucas R. Petigrosso, M. Sc.**

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Definición del problema	8
1.2. Hipótesis	13
1.3. Objetivos	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1. Diseño y conducción del experimento	14
2.2. Tratamientos con fungicidas.....	15
2.3. Variables medidas y evaluadas	17
2.4. Análisis estadístico	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Presencia del hongo endófito en semillas.....	21
3.2. Presencia del hongo endófito en plantas.....	21
4. DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIÓN.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Festuca arundinacea* Schreb. a. planta al estado vegetativo; b. lígula y aurículas; c. inflorescencia; d. espiquilla; e. antecio (cariopse vestido) cara ventral mostrando resto de raquilla; f. antecio cara dorsal (Extraído de Maddaloni y Ferrari, 2005)7
- Figura 2.** Ciclo de vida de las formas asexuales de *Epichloë* spp. (Adaptado de Clay y Schardl, 2002)8
- Figura 3.** Pastura de festuca alta muestreada en un establecimiento del Partido de General Guido (a). Plantas madres (“matas”) recolectadas para su posterior fraccionamiento en macollos (c) para la realización del experimento.....12
- Figura 4.** Vista de algunas macetas con plantas de festuca alta infectadas (E+) de distintos genotipos, sobre las cuales se realizó la aplicación de los tratamiento con fungicida, en estado vegetativo (a, b, c) y en estado reproductivo (d) y cosecha manual de semillas de las panojas (e, f).....14
- Figura 5.** Momento del diagnóstico de la presencia del endófito en semillas de festuca alta (a, b) y detalle de una semilla libre de endófito (c) y de otra, infectada (d). Aumento 400x.....16
- Figura 6.** Siembra de semillas de festuca alta cosechadas de las plantas tratadas con fungicida, en macetas plásticas.....17
- Figura 7.** Extracción de plantas de festuca alta de cada maceta (a, b) y detalle de las hifas (flecha) del hongo endófito entre las células parenquimáticas (c). Aumento 400x.....18

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Eficacia (% , media \pm error estándar) de distintos tratamientos de un fungicida aplicados en plantas de festuca alta de distintos genotipos (G), en frenar la transmisión del hongo endófito a las semillas cosechadas (*i.e.*, el endófito no está presente en las semillas). Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)..... 19

Tabla 2. Presencia de endófito (% , media \pm error estándar) en plantas de tres genotipos (G) de festuca alta de festuca alta originadas de semillas cosechadas de plantas madres que recibieron distintos tratamientos de un fungicida para frenar la transmisión del hongo endófito. Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).....20

RESUMEN

El objetivo de la presente Tesis fue evaluar la eficacia de distintos tratamientos con fungicida sobre la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en distintos genotipos de plantas de festuca alta infectadas. Se colectaron en el campo tres “matas” (plantas madres, genotipos) de festuca alta en una pastura naturalizada (más de 10 años de implantación) en un establecimiento dedicado a la cría y recría vacuna, ubicado en el Partido de General Guido. De cada una de las matas recolectadas, se obtuvieron la mayor cantidad de macollos (clones) que se trasplantaron en macetas plásticas con suelo homogeneizado y se ubicaron en un invernáculo en la Unidad Integrada Balcarce. Se utilizó un fungicida comercial cuyos grupos químicos eran: triazol (1,6%), metoxiacrilato (0,96%), imidazol (45%) más un coadyuvante (20%). Se probaron siete tratamientos: T1 (testigo); T2: una sola aplicación de Dosis 1 (D1); T3: una sola aplicación de Dosis 2 (D2); T4: dos aplicaciones de D1; T5: dos aplicaciones de D2; T6: tres aplicaciones de D1; T7: tres aplicaciones de D2. Siendo D1 = 25 ml/planta y D2, el doble de la misma. Los tratamientos fueron aplicados con la ayuda de rociador sobre la planta. En total se utilizaron 84 macetas (7 tratamientos x 4 repeticiones x 3 genotipos). Las plantas se cultivaron hasta completar el ciclo reproductivo y, durante diciembre de 2023, se cosecharon las semillas de cada planta. Se realizó el análisis microscópico de 60 semillas cosechadas de cada planta de festuca alta para corroborar la condición de infección y corroborar así, la eficiencia de transmisión del endófito de la planta madre a su progenie (semillas). A fin de corroborar la viabilidad del hongo endófito en las semillas analizadas y evitar la “posible confusión entre hifas vivas y muertas”, se sembraron 5 semillas de cada planta en macetas plásticas conteniendo tierra del horizonte superficial de un suelo agrícola y se realizó el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las plantas obtenidas. Bajo nuestras condiciones experimentales, los tratamientos con fungicida evaluados fueron eficaces en la eliminación del endófito. La respuesta observada en el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las semillas también se reflejó en las plantas obtenidas. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos, dependió de la dosis aplicada y del número de aplicaciones.

Palabras clave: *Festuca arundinacea*, *Epichloë coenophiala*, fungicida, transmisión vertical, viabilidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis viejos, por haber apostado en mí, haberme dado la oportunidad de estudiar y acompañarme durante toda la carrera universitaria.

A Clara, mi Mujer, por todo su apoyo durante esta carrera, de principio a fin, siempre confiando en mí. Por haberme aguantado y acompañado durante esta etapa de mi vida con todos los viajes y días de estudio. A mi hija, por estar presente en esta última etapa de culminación de mis estudios universitarios.

A mi Director, Ing. Agr. Lucas Petigrosso, por su dedicación, predisposición y supervisión durante todo el desarrollo de la Tesis. Por su paciencia durante este proceso que gracias a él pude terminar.

A mis amigos por su gran apoyo durante el transcurso de toda la carrera universitaria. Por haberme acompañado tantas horas y noches enteras de estudio. Por haberme obligado cuando uno ya daba todo por perdido.

A la Universidad y a sus docentes, por haberme dado un ambiente adecuado para mi formación profesional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición del problema

Festuca alta es una gramínea C₃ perenne de crecimiento otoño-inverno-primaveral, cultivada para uso forrajero en ambientes templado-húmedos y sub-húmedos de todo el mundo (Mazzanti *et al.*, 1992; Gibson y Newman, 2001; Young *et al.*, 2013). En la actualidad se encuentra ampliamente difundida ya que ha sido comercialmente introducida en América del Norte y del Sur, y en Oceanía (Hannaway *et al.*, 1999; Fribourg y Hannaway, 2007). En Argentina, es uno de los componentes más importantes de los pastizales (Roitman y Preliasco, 2018) y una de las gramíneas más utilizadas en la siembra de pasturas (PGG Wrightson Seeds, 2018).

Entre las principales cualidades agronómicas de festuca alta se destacan su alta productividad, especialmente en invierno, alta palatabilidad en comparación con la mayoría de los pastos nativos, perennidad y plasticidad adaptativa frente a un amplio rango de condiciones climáticas y edáficas (Mazzanti *et al.*, 1992; Petigrosso *et al.*, 2019a). Es una forrajera que, manejada adecuadamente, puede alcanzar valores de digestibilidad de la materia seca de 70-75%, con contenidos de proteína bruta superiores al 15% y de fibra detergente neutro de 50% (Agnusdei y Di Marco, 2014). Por otra parte, presenta moderada tolerancia a la salinidad (Maas, 1986), por lo que su supervivencia es afectada con valores de conductividad eléctrica cercanos a 4 dS m⁻¹ (Shannon, 1997).

Esta forrajera crece alcanzando de 50 a 150 cm de altura en estado reproductivo, presenta hojas ásperas por la parte superior y brillantes y suaves por el envés, aurículas y lígulas muy pequeñas (Figura 1). La lámina en su unión con la vaina tiene pelos pequeños, de prefoliación convolutada o enrollada. Las hojas aparecen en gran número en la base del tallo y son muy erectas y largas, lo cual da a la planta un aspecto característico inconfundible. En la base de la planta se forman pequeños rizomas en los cuales acumula las sustancias de reservas. La inflorescencia es una panoja laxa, con numerosas espiguillas, cada de una de las cuales posee entre 3 a 10 flores. El peso de 1000 semillas varía entre 1,5 y 2,2 g (Cabrera, 1970; De Battista, 1989; Maddaloni y Ferrari, 2005). Una característica propia de festuca alta es la importante cantidad de semillas caedizas a la madurez (Dell'Agostino, 2008). El sistema radicular es denso en superficie, a la vez que algunas raíces pueden descender más profundo, lo cual hace que sea utilizable en la conservación de suelos, dado que fija bien el terreno frente a la erosión. Esta especie se encuentra en suelos profundos y fértiles, pero tolera perfectamente suelos muy variados,

desde ácidos a básicos y de encharcados a muy secos (Maddaloni y Ferrari, 2005; Lattanzi *et al.*, 2007; Dell'Agostino, 2008).

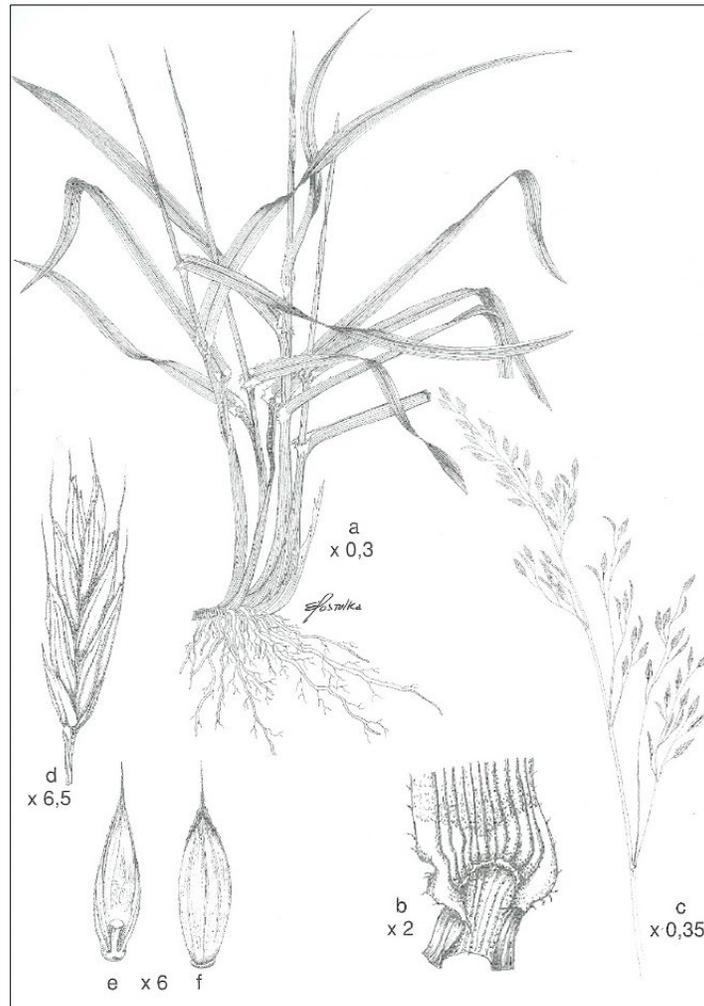


Figura 1. *Festuca arundinacea* Schreb. a. planta al estado vegetativo; b. lígula y aurículas; c. inflorescencia; d. espiquilla; e. antecio (cariopse vestido) cara ventral mostrando resto de raquilla; f. antecio cara dorsal (Extraído de Maddaloni y Ferrari, 2005).

Como otras gramíneas C₃, festuca alta puede establecer una relación simbiótica con hongos endófitos asexuales de transmisión vertical a través de semillas infectadas (Petigrosso *et al.*, 2019a). La asociación entre hongos del género *Epichloë* (Leuchtman *et al.*, 2014), anteriormente clasificado como *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin (= *Acremonium* Morgan-Jones & Gams) (Glenn *et al.*, 1996) y gramíneas otoño-invernales está ampliamente documentada (Siegel *et al.*, 1987; White, 1993; Clay y Schardl, 2002; Petigrosso *et al.*, 2019a). La importancia agronómica de esta asociación está dada, por un lado, por los efectos beneficiosos observados en la gramínea, sobre su crecimiento y la tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Malinowski y Belesky, 2000; White y Torres, 2009;

Omacini *et al.*, 2013) inducidos por la simbiosis gramínea-hongo, y por otro lado, evidencias de toxicidad provocadas en el ganado que consume plantas infectadas (Bacon *et al.*, 1977; Hoveland, 1993; De Battista *et al.*, 1995; Cantón *et al.*, 2016; García *et al.*, 2017) ocasionando la patología denominada “*festucosis*”.

El endófito que infecta a la festuca alta, *Epichloë coenophiala* (Leuchtmann *et al.*, 2014) (= *Neotyphodium coenophialum*) es asintomático y su dispersión se limita a semillas infectadas (Clay y Schardl, 2002; Figura 2) permaneciendo viable en el suelo (Fernández *et al.*, 2007). Es un hongo que no se dispersa por esporas ni por el polen de las plantas infectadas (Clay y Schardl, 2002). El micelio del endófito es abundante entre las células de la vaina de las hojas y presenta baja densidad en la lámina foliar (White *et al.*, 1993).

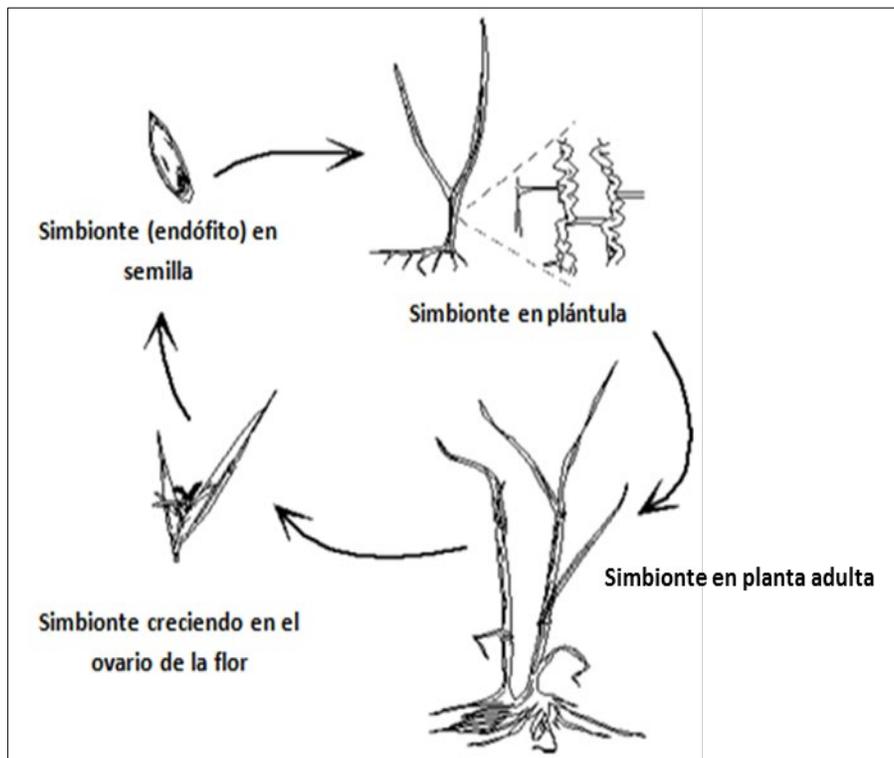


Figura 2. Ciclo de vida de las formas asexuales de *Epichloë* spp. (Adaptado de Clay y Schardl, 2002).

La asociación gramínea-endófito es del tipo simbiótica-mutualista (Siegel *et al.*, 1987; White y Torres, 2009; Petigrosso *et al.*, 2019a). Los endófitos se benefician en la asociación por tener asegurada su nutrición, dispersión y supervivencia (Siegel *et al.*, 1987), y dado que se localizan intercelularmente, se ha sugerido que podrían utilizar nutrientes del apoplasto, principalmente azúcares y compuestos nitrogenados que difunden desde el citoplasma (Bacon, 1993).

Las plantas de festuca colonizadas con endófitos se benefician por la síntesis de alcaloides que le otorgan resistencia biótica y abiótica en condiciones de estrés (Clay, 1987; Omacini *et al.*, 2001; Decunta *et al.*, 2021). En este sentido, se ha observado un aumento de su crecimiento, biomasa, tolerancia a heladas y sequías y resistencia al estrés por déficit de nitrógeno (Arechavaleta *et al.*, 1989; De Battista, 1989; Lyons *et al.*, 1990; Malinowski y Belesky, 2000; Schardl *et al.*, 2004; Decunta *et al.*, 2021; Manzur *et al.*, 2022) lo que resulta en un aumento de la tolerancia a suelos marginales. Asimismo, el mutualismo se traduce en resistencia a insectos (Latch *et al.*, 1985; West y Gwinn, 1993; Arnold *et al.*, 2003), así como a vertebrados herbívoros (Cheplick y Clay, 1988; Penrose *et al.*, 2000; Schardl, 2010). Sin embargo, esta relación entre el endófito y la planta podría transformarse en parasítica dependiendo del genotipo de la asociación, de las condiciones ambientales y del costo que significaría a la planta mantener el hongo (Faeth y Sullivan, 2003; Petigrosso *et al.*, 2019a).

En la asociación, el endófito produce toxinas y estimula a su hospedante para que sintetice alcaloides y otros metabolitos secundarios, y de esta manera protegerse de insectos, nematodos, y ciertas enfermedades (De Battista, 1989; Schardl y Phillips, 1997; Young *et al.*, 2013). Los principales grupos de alcaloides, variando de acuerdo a la especie vegetal, son los ergocalcoides, las peraminas y las lolinas. Tanto las peraminas como las lolinas son los alcaloides más potentes contra insectos, y los ergocalcoides los más potentes contra los mamíferos herbívoros (Schardl y Phillips, 1997).

La toxicidad en el ganado vacuno suele expresarse en primavera-verano, y se la denomina “síndrome hipertérmico o asoleamiento”, siendo algunos de sus síntomas: disminución del peso, pelo hirsuto, fiebre, respiración agitada y menor ganancia de peso diaria de los animales (Stuedemann *et al.*, 1988; Peters *et al.*, 1989; Odriozola *et al.*, 1993). Si la enfermedad se expresa en otoño-invierno se la conoce como “pie de festuca” y los principales síntomas son, además de pelo hirsuto, diarrea, renguera y, en casos extremos, gangrena seca en las pezuñas (Jacobson *et al.*, 1969). En nuestro país los antecedentes de toxicidad en festuca alta se remontan al año 1972, cuando el Grupo de Patología de la EEA Balcarce del INTA efectuó el primer diagnóstico de “*festucosis*” (Campero, 1996).

Por otro lado, para evaluar el comportamiento de las diferentes poblaciones de festuca alta, donde encontramos individuos infectados con el hongo endófito (E+) y no infectados (E-), se requiere uniformidad genética a fin de minimizar interacciones genotipo-ambiente que pueden enmascarar o confundir las respuestas observadas. En este sentido, son escasos los estudios que han investigado los efectos de la aplicación de fungicidas sistémicos en la remoción del hongo endófito en plántulas y plantas de gramíneas,

posiblemente porque los antecedentes registrados, indican que estos tratamientos no han sido efectivos (Latch y Christensen, 1988, Dernoeden *et al.*, 1990; Hill y Brown, 2000). Si bien es posible eliminar el hongo endófito en plantas de raigrás perenne y de festuca alta, la efectividad de los tratamientos varía según el tipo de fungicida sistémico, tiempo de exposición y concentración del producto (Saiga *et al.*, 2003). Además, la aplicación de fungicida en macollos de festuca infectada puede provocar la mortalidad de algunos de ellos (Petigrosso *et al.*, 2012).

Hill y Brown (2000), en un estudio en condiciones controladas en invernáculo, encontraron que aplicaciones del fungicida sistémico propiconazol (5%), eliminó el endófito en plántulas de festuca, mientras que las aplicaciones de los fungicidas de contacto terrazole y chloroneb, no afectaron la viabilidad del endófito. Petigrosso *et al.* (2012) investigaron el posible efecto inhibitor de cuatro fungicidas (*i.e.*, fosetil aluminio, metconazole, azoxistrobina y carbendazim), aplicados en diferentes concentraciones y, hallaron que, el hongo endófito fue eliminado con los fungicidas metconazole y azoxistrobina y no hubo efecto con los restantes. No obstante, el primero presentó signos de fitotoxicidad comparado con el testigo y no se registraron interacciones fungicida por dosis. Recientemente, Petigrosso *et al.* (2019b) evaluaron el efecto de diferentes dosis de los fungicidas Almagor® (triazol + imidazol) y Amistar® (derivados del ácido β -metoxiacrílico) sobre la persistencia del hongo endófito en plantas de cuatro genotipos de festuca alta. Estos autores encontraron que, mientras el fungicida Amistar® no tuvo ningún efecto, Almagor® fue 100% efectivo en todas las dosis probadas. Por lo tanto, concluyeron que resulta promisorio el uso de Almagor® ya que, al interrumpir el proceso de transmisión vertical, podría aumentar la proporción de semillas libres de endófito en el banco de semillas del suelo.

En base a los antecedentes antes mencionados y, considerando que son escasos los experimentos que analizan la eliminación de hongos endófitos del género *Epichloë* en macollos de plantas de festuca alta mediante el uso de fungicidas sistémicos, se establecen las siguientes hipótesis de estudio:

1.2. Hipótesis

H1. La viabilidad del hongo endófito en plantas de festuca alta es anulada por los tratamientos con fungicida a evaluar, independientemente del genotipo de festuca alta.

H2. La eficacia en la eliminación del hongo endófito en plantas de festuca alta depende de la dosis de fungicida empleada y la cantidad de aplicaciones.

Objetivo General

Evaluar la eficacia de distintos tratamientos con fungicida sobre la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en distintos genotipos de plantas de festuca alta infectadas.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia del hongo endófito en semillas cosechadas de plantas de festuca alta infectadas bajo tratamiento con fungicida.
- Determinar la viabilidad del hongo endófito en plantas originadas de semillas cosechadas de plantas de festuca alta infectadas bajo tratamiento con fungicida.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Diseño y conducción del experimento

Durante el año 2023, se realizó un experimento bajo condiciones controladas en un invernáculo de la Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP – EEA Balcarce, INTA (latitud: 37° 45' 48" S; longitud: 58° 17' 51" O; altitud: 130 m.s.n.m.). Se colectaron en el campo tres “matas” (plantas madres, genotipos) de festuca alta en una pastura naturalizada (más de 10 años de implantación) en un establecimiento dedicado a la cría y recría vacuna, ubicado en el Partido de General Guido (Figura 3). Se corroboró la condición de infección (en adelante, E+) de las “matas” colectadas mediante el análisis microscópico en macollos (Belanger, 1996). De esas matas E+ se extrajo la mayor cantidad posible de macollos (clones, Figura 3), los que se acondicionaron en bandejas plantineras conteniendo sustrato 3:1 (tierra: enmienda orgánica). Después de un periodo de 30 días de aclimatación de los macollos al ambiente, se realizó el trasplante a una maceta más grande (de 3 L; Figura 4). Las macetas se mantuvieron libres de malezas y sin restricciones hídricas ni nutricionales durante el período experimental.

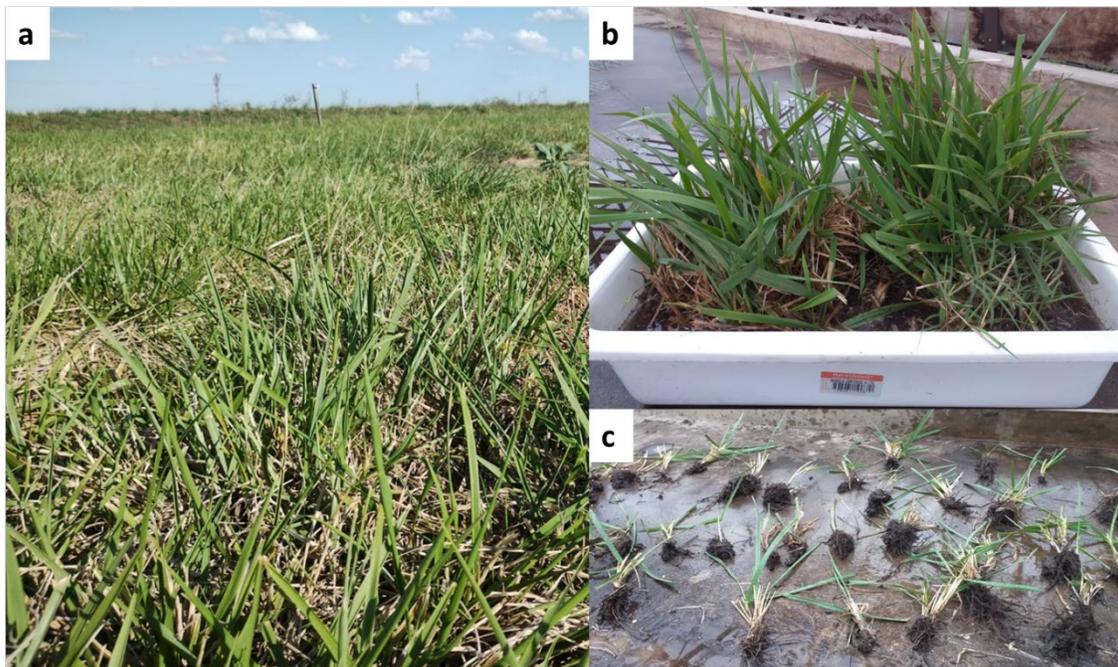


Figura 3. Pastura de festuca alta muestrada en un establecimiento del Partido de General Guido (a). Plantas madres (“matas”) recolectadas para su posterior fraccionamiento en macollos (c) para la realización del experimento.

2.2. Tratamientos con fungicidas

Cuando cada planta de festuca alta E+ tenía ≈ 10 macollos, se aplicaron distintos tratamientos de un fungicida para eliminar el hongo endófito (Figura 4). Se utilizó un fungicida comercial de acuerdo con ensayos previos (Petigrosso *et al.*, 2019b), cuyos grupos químicos eran: triazol (1,6%), metoxiacrilato (0,96%), imidazol (45%) más un coadyuvante (20%). Se probaron siete tratamientos: T1 (testigo); T2: una sola aplicación de Dosis 1 (D1); T3: una sola aplicación de Dosis 2 (D2); T4: dos aplicaciones de D1; T5: dos aplicaciones de D2; T6: tres aplicaciones de D1; T7: tres aplicaciones de D2. Siendo D1 = 25 ml/planta y D2, el doble de la misma.

Los tratamientos fueron aplicados con la ayuda de rociador sobre la planta. En total se utilizaron 84 macetas (7 tratamientos x 4 repeticiones x 3 genotipos). Las macetas se mantuvieron libres de malezas y sin restricciones hídricas ni nutricionales durante el período experimental. Las plantas se cultivaron hasta completar el ciclo reproductivo y, durante diciembre de 2023, se cosecharon las semillas de cada planta (Figura 4).

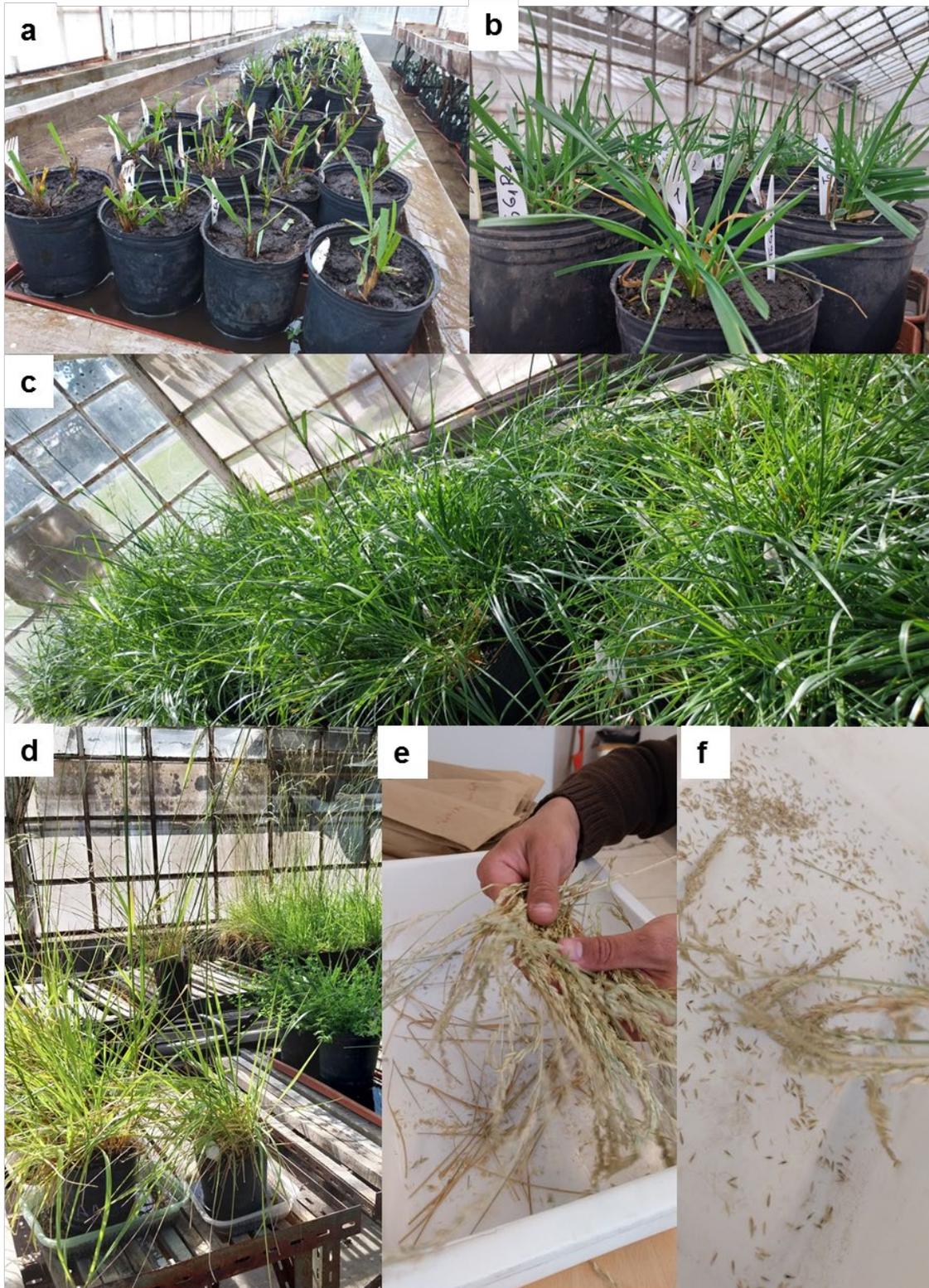


Figura 4. Vista de algunas macetas con plantas de festuca alta infectadas (E+) de distintos genotipos, sobre las cuales se realizó la aplicación de los tratamientos con fungicida, en estado vegetativo (a, b, c) y en estado reproductivo (d) y cosecha manual de semillas de las panojas (e, f).

2.3. Variables medidas y evaluadas

Diagnóstico de la presencia del hongo endófito en cariopses (semillas)

Se realizó el análisis microscópico de 60 semillas cosechadas de cada planta de festuca alta para corroborar la condición de infección y corroborar así, la eficiencia de transmisión del endófito de la planta madre a su progenie (semillas). Para ello, se realizó un pretratamiento que consistió en sumergir las semillas en hidróxido de sodio (Na OH) al 5 % a temperatura ambiente por 12 h. Luego de ese tiempo, las semillas se enjuagaron con agua y se colocaron individualmente sobre un portaobjeto para separar las glumelas y proceder a su tinción (coloración directa) con una gota del colorante rosa de bengala durante 2-3 minutos (Figura 5). Posteriormente, se colocó un cubreobjeto y se observó al microscopio óptico Olympus CHK (400x) la presencia de hifas del hongo asexual antes mencionado entre las células aleuroníferas del endosperma (Saha *et al.*, 1988). Así, se determinó la presencia o no del endófito en las semillas. La ausencia del endófito en las semillas cosechadas de las plantas tratadas, indica que el tratamiento con fungicida fue “eficaz”, es decir, permite “frenar” el proceso de transmisión del endófito desde la planta madre a las semillas cosechas (Petigrosso *et al.*, 2019b).

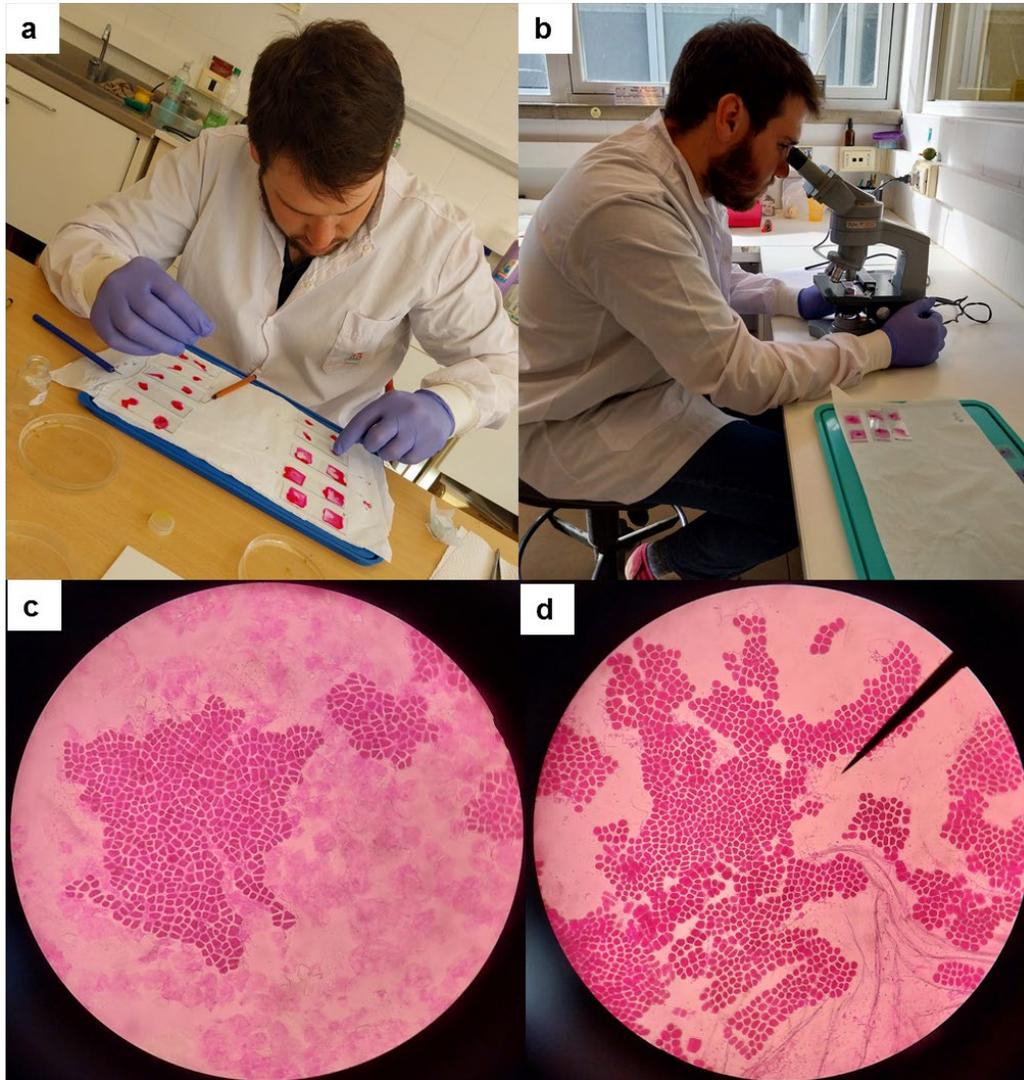


Figura 5. Momento del diagnóstico de la presencia del endófito en semillas (a,b) y, detalle de una semilla libre de endófito (c) y de otra, infectada (d). Aumento 400x.

Viabilidad del hongo endófito en plantas originadas a partir de semillas cosechadas de plantas tratadas con fungicidas

A fin de corroborar la viabilidad del hongo endófito en las semillas analizadas y evitar la “posible confusión entre hifas vivas y muertas”, tal como lo postula Vinton y Horning (2001), se sembraron 5 semillas de cada planta en macetas plásticas de 1 L conteniendo tierra del horizonte superficial (0-20 cm) de un suelo agrícola (Figura 6) y se realizó el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las plantas obtenidas.



Figura 6. Siembra de semillas de festuca alta cosechadas de las plantas tratadas con fungicida, en macetas plásticas.

Cuando las plantas tenían entre 30 y 45 días de emergidas, se determinó la viabilidad del endófito mediante la observación microscópica de hifas entre las células parenquimáticas en las vainas de las hojas de las plantas, mediante coloración directa (Belanger, 1996). Para ello, primeramente, se extrajo cada planta de festuca alta de su respectiva maceta, manteniendo su identificación (Figura 7). Luego, se trabajó con los primeros milímetros de la base de cada vaina foliar del macollo, donde se raspó el tejido parenquimático de la base de la vaina sobre un portaobjeto (Belanger, 1996). Posteriormente, se agregó colorante (rosa de bengala), se cubrió la muestra con el cubreobjeto y se observó al microscopio óptico (400x). Se consideraron macollos E+ aquellos que presentaron hifas del hongo endófito entre las células parenquimáticas de la vaina foliar (Figura 7).

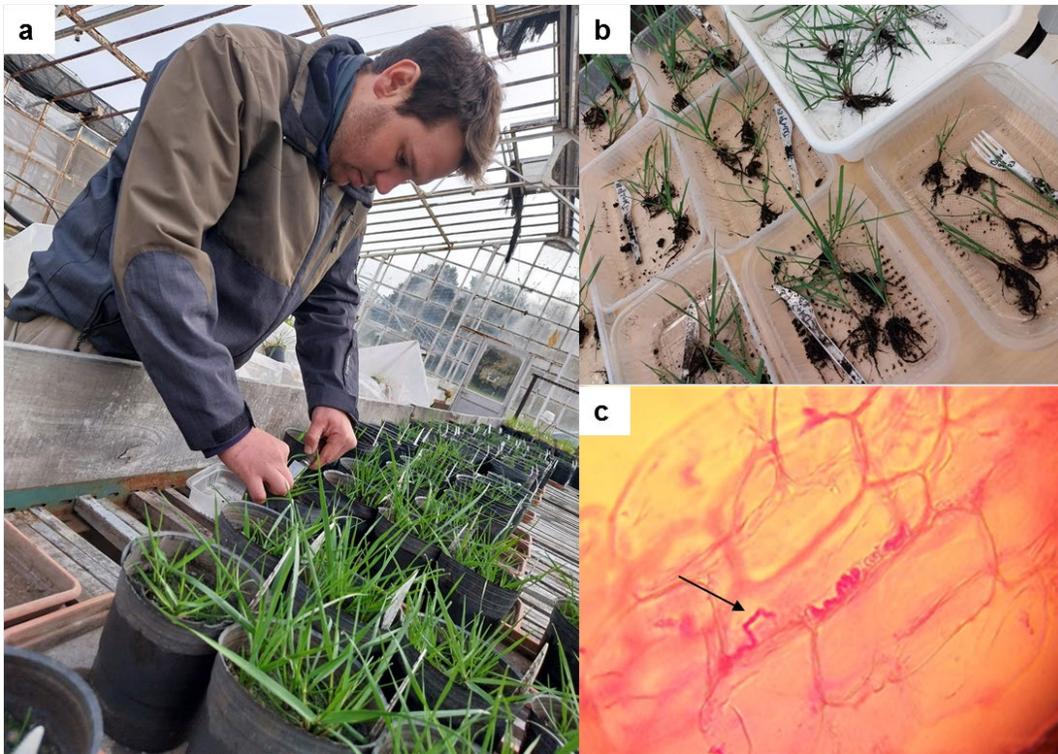


Figura 7. Extracción de plantas de festuca alta de cada maceta (a, b) y detalle de las hifas (flecha) del hongo endófito entre las células parenquimáticas (c). Aumento 400x.

2.4. Análisis estadísticos

Los valores de las variables medidas en los diferentes tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza y ante diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0,05$) las medias se compararon mediante el test de mínima diferencia significativa (MDS, $p<0,05$). Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico R (R Development Core Team, 2020).

3. RESULTADOS

3.1. Presencia del hongo endófito en semillas

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se halló interacción significativa entre el tratamiento con fungicida aplicado y el genotipo de festuca alta ($F_{12} = 0,580$; $p = 0,849$), ni efecto simple del genotipo ($F_2 = 0,741$; $p = 0,481$). Solamente se registró efecto simple del tratamiento con fungicida ($F_6 = 182,471$; $p < 0,001$). Así, el tratamiento T2 (*i.e.*, una sola aplicación de D1) fue el tratamiento con menor efectividad ($\approx 31\%$, Tabla 1) en frenar la transmisión del endófito desde la planta madre a las semillas, independientemente del genotipo evaluado. Sin embargo, cuando se realizaron dos y tres aplicaciones de D1 (T4 y T6, respectivamente) la eficacia de control fue mayor, entre 74% - 82% (Tabla 1). Los tratamientos T3, T5 y T7 (*i.e.*, una, dos y tres aplicaciones, respectivamente de D2) fueron más efectivos en frenar la transmisión del endófito (entre 97% - 100%), en los tres genotipos (Tabla 1). Las semillas del tratamiento testigo (T1) dieron 100% al diagnóstico de la presencia del endófito.

Tabla 1. Eficacia (% , media \pm error estándar) de distintos tratamientos de un fungicida aplicados en plantas de festuca alta de distintos genotipos (G), en frenar la transmisión del hongo endófito a las semillas cosechadas (*i.e.*, el endófito no está presente en las semillas). Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Eficacia (%)				
	G1	G2	G3	Promedio	
T1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	d
T2	32,8 \pm 2,9	29,8 \pm 3,9	29,7 \pm 3,8	30,8 \pm 2,8	c
T3	75,5 \pm 1,8	72,5 \pm 1,1	73,1 \pm 1,3	73,7 \pm 1,3	b
T4	80,2 \pm 1,3	83,5 \pm 1,5	81,5 \pm 1,0	81,7 \pm 1,2	b
T5	94,6 \pm 1,1	96,0 \pm 2,0	100 \pm 0	96,9 \pm 1,0	a
T6	100 \pm 0	100 \pm 0	98,5 \pm 1,1	99,5 \pm 0,4	a
T7	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	a

3.2. Presencia del hongo endófito en plantas

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se halló interacción significativa entre el tratamiento con fungicida aplicado y el genotipo de festuca alta ($F_{12} = 0,798$; $p = 0,650$), ni efecto simple del genotipo ($F_2 = 0,276$; $p = 0,759$) sobre la presencia del hongo endófito en las plantas. Solamente se registró efecto simple del tratamiento con fungicida ($F_6 = 82,998$; $p < 0,0001$). El mayor porcentaje de presencia de endófito en las plantas de festuca alta se registró en el tratamiento T2 (Tabla 2), es decir, en las plantas originadas de semillas

cosechadas de plantas que recibieron una sola aplicación de D1. En los tratamientos T3, T5 y T7 (*i.e.*, una, dos y tres aplicaciones, respectivamente de D2) se observaron los menores porcentajes de presencia del endófito en las plantas (Tabla 2). Las plantas obtenidas de las semillas cosechadas de las plantas del tratamiento testigo (T1) dieron 100% al diagnóstico de la presencia del endófito.

Tabla 2. Presencia de endófito (% , media \pm error estándar) en plantas de tres genotipos (G) de festuca alta de festuca alta originadas de semillas cosechadas de plantas madres que recibieron distintos tratamientos de un fungicida para frenar la transmisión del hongo endófito. Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Presencia de endófito en plantas (%)				
	G1	G2	G3	Promedio	
T1	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	a
T2	90 \pm 5,2	100 \pm 0	100 \pm 0	96,7 \pm 3,5	a
T3	72,5 \pm 10,7	50,0 \pm 5,2	80,0 \pm 12,8	67,5 \pm 10,5	b
T4	37,5 \pm 5,7	42,5 \pm 1,5	35,0 \pm 11,3	38,3 \pm 12,2	c
T5	10,0 \pm 3,9	5,0 \pm 2,0	10 \pm 3,6	8,33 \pm 2,9	d
T6	5,0 \pm 2,6	5,0 \pm 3,5	5,0 \pm 1,1	5,00 \pm 1,4	d
T7	5,0 \pm 2,8	5,0 \pm 1,9	0 \pm 0	3,33 \pm 1,8	d

4. DISCUSIÓN

Existe información, aunque escasa y no reciente, que muestra resultados positivos en el control del hongo endófito en semillas de festuca alta por medio de fungicidas sistémicos (Williams *et al.*, 1984; Costa y De Batista, 1988; Maddaloni *et al.*, 1989b). Sin embargo, como fue mencionado anteriormente (**ver Introducción**), muchos fungicidas han sido ineficaces en controlar al endófito cuando fueron aplicados en plantas (Latch y Christensen, 1988, Dernoeden *et al.*, 1990; Petigrosso *et al.*, 2012).

Bajo nuestras condiciones experimentales, los tratamientos con fungicida evaluados fueron eficaces en la eliminación del endófito (Tablas 1 y 2). La respuesta observada en el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las semillas también se reflejó en las plantas obtenidas. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos, dependió de la dosis aplicada y del número de aplicaciones (Saiga *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en el marco de esta Tesis son alentadores en la temática en cuestión, pero no podemos asegurar (con las variables respuesta analizadas), que las plantas madres, luego de la aplicación de los tratamientos con fungicida quedaran completamente libres del hongo endófito. A pesar de esto, más allá de comprender lo que exactamente ocurrió, es decir, si hubo una erradicación del hongo en toda la planta o, si simplemente se interrumpió el proceso de transmisión vertical, nuestros resultados indican que el hongo endófito *Epichloë coenophiala* presentó susceptibilidad al fungicida utilizado en este Experimento, durante el estado vegetativo de las plantas madres y no afectó el crecimiento de las mismas. Esto es importante aclararlo, dado que, bajo ciertas condiciones, los agroquímicos pueden producir daños en las plantas tratadas, provocando fitotoxicidad. Algunos de estos síntomas pueden ser la aparición de manchas negras, necrosis en las hojas, amarillamiento foliar, retraso en el crecimiento o, eventualmente, la muerte de las plantas. Según Herzfeld y Sargent (2008), la fitotoxicidad en las plantas puede surgir como consecuencia de la sensibilidad específica de la planta al producto químico aplicado; del uso de una dosis excesiva de aplicación, aplicaciones demasiado frecuentes, dilución inadecuada del producto, mezclas inadecuadas de productos y/o la aplicación de productos en un estadio de desarrollo inadecuado del cultivo.

Por otro lado, es importante tener presente que los tratamientos con fungicida se aplicaron cuando las plantas estaban en estado vegetativo (**ver Materiales y Métodos**). En esta etapa fenológica de la planta, existe una alta relación entre el área foliar y el micelio del hongo, asegurando que el fungicida sea absorbido y traslocado a los meristemas

(Petigrosso *et al.*, 2019b). Durante el periodo experimental, las plantas fueron regadas y los fungicidas se aplicaron a media mañana, por lo que las plantas estaban “fisiológicamente activas” en términos de fotosíntesis y transpiración. Todos estos aspectos, deben tenerse en cuenta para aumentar las posibilidades de aplicar con éxito esta técnica, dado que, como fue mencionado anteriormente (**ver Introducción**), existen estudios que demuestran diferencias en la efectividad de fungicidas para eliminar el hongo endófito de plantas de festuca de alta. Esto podría deberse a un modo de acción diferente del fungicida, mecanismos de tolerancia o resistencia presentes en el hongo endófito, así como el genotipo de la planta y las condiciones ambientales bajo las cuales crecieron (Saiga *et al.*, 2003; Petigrosso *et al.*, 2019b).

Por otro lado, nuestros resultados corroboran lo hallado por Saiga *et al.* (2003). Estos autores probando diferentes fungicidas en la remoción del hongo endófito en macollos de raigrás perenne y festuca alta, concluyeron que el porcentaje de remoción del hongo aumentaba con la dosis de fungicida. En nuestro caso, cuando se analizaron las semillas de las plantas tratadas (Tabla 1) y las plantas obtenidas (Tabla 2), los porcentajes de eliminación del endófito fueron más altos cuando se aplicó una dosis mayor y se realizaron más de una aplicación.

Comentarios finales

El objetivo de esta Tesis apuntó a proveer conocimientos sobre la eficacia de diferentes tratamientos con un fungicida sistémico sobre la eliminación del hongo endófito en plantas de distintos genotipos de festuca alta infectados. La información generada es de gran importancia agronómica, dado que muchos pastizales y pasturas del sudeste de la provincia de Buenos Aires se encuentran infectados con este hongo endófito, ocasionando importantes pérdidas económicas (*festucosis*). Además, los resultados obtenidos son gran interés para su aplicabilidad en investigaciones que requieren disponer de semillas tanto libres como infectadas de una misma población (genotipo).

Es importante aclarar que, la información obtenida de esta Tesis, debe ser complementada con el análisis de la calidad de las semillas obtenidas. Esto es necesario dado que, existen trabajos científicos que indican que algunos fungicidas provocan una disminución de la energía y/o del poder germinativo de la semilla, menor crecimiento y deformación de las plántulas (Petigrosso *et al.*, 2019b). Por último, los resultados obtenidos deberán corroborarse con ensayos a campo y contemplar otros factores propios del

ambiente como de la aplicación (e.g., calibración de la máquina, momento de aplicación, velocidad del viento, tamaño de las plantas).

5. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos para nuestras condiciones experimentales, y en base a las hipótesis planteadas, podemos concluir que:

- No rechazamos la Hipótesis 1, *“La viabilidad del hongo endófito en plantas de festuca alta es anulada por los tratamientos con fungicida a evaluar, independientemente del genotipo de festuca alta”*.
- No rechazamos la Hipótesis 2, *“La eficacia en la eliminación del hongo endófito en plantas de festuca alta depende de la dosis de fungicida empleada y la cantidad de aplicaciones”*.

Esto se fundamenta en que todos los tratamientos con fungicida evaluados fueron eficaces en la eliminación del endófito en las plantas de los tres genotipos de festuca alta. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos, dependió de la dosis aplicada y del número de aplicaciones.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agnusdei, M.G.; Di Marco, O. 2014. Más producción de carne, menos riesgo y más flexibilidad con pasturas perennes en suelos bajos. Guía práctica para su implementación. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_cartilla_colombo_y_magliano_ult.pdf. [consulta: 15 febrero de 2021].
- Arechavaleta, M.; Bacon, C.W.; Hoveland, C.S.; Radcliffe, D.E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron J.* 81:83-90.
- Arnold, A.E.; Mejía, L.C.; Kyllö, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100:15649-15654.
- Bacon, C.W.; Porter, J.K.; Robbins, J.D.; Luttrell, E.S. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *App. Environ. Microbiol.* 34:576-581.
- Bacon, C.W. 1993. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte infected tall fescue. *Agr. Ecosys. Environ.* 44: 123-141.
- Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Sci.* 36: 460-462.
- Cabrera, A. 1970. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Tomo 4, Parte 2a INTA. Buenos Aires Argentina. Colección Científica. pp. 120-156.
- Campero, C. M. 1996. Efectos de la festuca tóxica sobre el desempeño reproductivo y producción en bovinos. Una revisión. *Therios* 25: 306-316.
- Cantón, G.J.; Bence, A.R.; Olmos, L.; Llada, I.; Mazzanti, M.; Migliavacca, J.I.; Armendano, J.I.; Odriozola, E.R. 2016. Porcentaje de infestación con endófito en festucas (*Lolium arundinaceum*) analizadas en INTA EEA Balcarce. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 36 (Supl. 1): 34.
- Cheplick, G.P.; Clay, K. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*. 3 (52): 309-318.
- Clay, K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am. Nat.* 160: 99-127.
- Clay, K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium prene* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*. 73: 358-362.
- Costa, M.C.; De Battista, J.P. 1988. Tratamiento de semillas para control de *Acremonium coenophialum* en *Festuca arundinacea*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8:289-294.
- De Battista, J.P. 1989. El endófito de la festuca. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9:447-456.
- De Battista, J.; Peretti, A.; Carletti, S.; Ramirez, A., Costa, M.; Schultz, L. 1995. Evolución De La Incidencia De La Infección De *Acremonium coenophialum* en la oferta de

- semilla de festuca alta en Argentina. Período 1987-1994. Rev. Arg. Prod. Anim. 15: 300-302.
- Decunta, F.A.; Perez, L.I.; Malinowski, D.P.; Molina-Montenegro, M.A.; Gundel, P.E. 2021. A systematic review on the effects of *Epichloë* fungal endophytes on drought tolerance in cool-season grasses. Front. Plant Sci. 12: 644731.
- Dell' Agostino, E. 2008. Producción de semilla de especies forrajeras de clima templado. INTA, Centro Regional Buenos Aires Norte, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Buenos Aires, Argentina 82 p.
- Dernoeden, P.H.; Krusberg, L.R.; Sardanelli, S. 1990. Fungicide Effects On *Acremonium* endophyte, plant parasitic nematodes, and thatch in Kentucky bluegrass and perennial ryegrass. Plant Dis. 74: 879-881.
- Faeth, S. H.; Sullivan, T. J. 2003. Mutualistic Asexual Endophytes In: A Native Grass Are Usually parasitic. Am. Nat. 161: 310–325.
- Fernández, O.N.; Colabelli, M.N.; Petigrosso, L.; Cauhépé, M. 2007. Persistencia del endosimbionte *Neotyphodium coenophialum* en el banco de semillas de festuca. Rev. Arg. Prod. Anim. 27 (Supl. I): 142-143.
- Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B. 2007. Tall Fescue. On-Line Monograph, Forage Information System. [En línea] <<http://forages.oregonstate.edu/is/tfis/monograph.html>>[consulta: 08 de Marzo de 2013].
- García, J.A.; Cantón, J.C.; García, B.L.; Micheloud, J.F.; Campero, C.M.; Spath, E.J.A.; Odrizola, E.R. 2017. Retrospective analysis of cattle poisoning in Argentina (2000-2013). Rev. Pesq. Vet. Bras. 37:210-214.
- Gibson, D.J.; Newman, J.A. 2001. Biological Floral of the British Isles: *Festuca arundinacea* Schreb. (*F. elatior* subsp. *arundinacea* (Schreb.) Hackel). J. Ecol. 89: 304-324.
- Glenn, A.E.; Bacon, C.W.; Price, R.; Handil, R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycología 88: 369-383.
- Hannaway, D.; Fransen, S.; Cropper, J.; Teel, M.; Chaney. M.; Griggs, T.; Halse, R.; Hart, J.; Cheeke, P.; Hansen, D.; Klinger, R.; Lane, W. 1999. Tall Fescue Oregon State University. Oregon. U.S.A. Pnw 504: 1-20
- Herzfeld, D.; Sargent, K. 2008. Pesticide Formulations. In: Private Pesticide Applicator training manual. 19th ed. University of Minnesota Extension. Minnesota, USA. pp. 85-108.
- Hill, N.S.; Brown, E. 2000. Endophyte viability in seedling tall fescue treated with fungicides. Crop Sci. 40(5): 1490-1491.
- Hoveland, C.S. 1993. Economic importance of *Acremonium* endophytes. Agr. Ecosyst. Environ. 44: 3-12.

- Jacobson, D. R.; Carr, S.B.; Hatton, R.H.; Buckner, R.C.; Graden, A.P.; Dowden, D.R.; Miller, W.M. 1969. Growth physiological responses and evidence of toxicity in yearling dairy cattle grazing different grasses. *J. Dairy. Sci.* 53: 575-587.
- Latch, G.C.M.; Christensen, M.J. 1988. Effects of myclobutanil and propiconazole on endophyte and rust fungi in ryegrass. *Proc. 41 st N.Z. Weed and Pest Control Conference.* pp. 126-128.
- Latch, G.C.M.; Hunt, W.F.; Musgrave, D.R. 1985. Endophytic fungi affect Growth of Perennial Ryegrass. *N. Z. J. Agr. Res.* 28:165-168.
- Lattanzi, F.A.; Mazzanti, A.; Wade, M.H. 2007. Seasonal animal production of temperate and mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 203-213.
- Leuchtman, A.; Bacon, C.W.; Schardl, C.L.; White, J.F.; Tadych, M. 2014 . Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycol.* 106: 202–215.
- Lyons, P.C.; Evans, J.J.; Bacon, C.W. 1990. Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue. *Plant Physiol.* 92: 726-732.
- Maas, E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Int. J. Appl. Agr. Res.* 1: 12– 26.
- Maddaloni, J.; Ferrari, L. 2005. *Festuca alta*. En: Forrajas y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina (Forage species and pastures of the humid temperate ecosystem of Argentina), Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina. pp. 165 –182.
- Maddaloni, J.; Sala, M.; Carletti, S. 1989. Viabilidad del hongo endófito (*Acremonium coenophialum*, Morgan-Jones y Gams) en semilla de festuca (*Festuca arundinacea*, Schreb.) INTA EEA Pergamino. Buenos Aires, Argentina. Informe Técnico N° 224. 12 p.
- Malinowski, D.; Belesky, D. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* 40: 923 - 940.
- Manzur, M.E.; Garello, F.A.; Omacini, M.; Schnyder, H.; Sutka, M.R.; García-Parisi, P.A. 2022. Endophytic fungi and drought tolerance: ecophysiological adjustment in shoot and root of an annual mesophytic host grass. *Funct. Plant Biol.* 49(3): 272 - 282.
- Mazzanti, A.; Castaño J.; Sevilla, C.; Orbea, J. 1992. Características Agronómicas De Especies Y Cultivares de gramíneas y leguminosas forrajas adaptadas al sudeste de la Provincia de Buenos Aires. INTA. EEA Balcarce. Buenos Aires, Argentina 73p.
- Odriozola, E.; Lopez, T.C.; Campero, C.; Gimenez Placeres, C. 1993. Ryegrass staggers In: Heifers: A New Mycotoxicosis in Argentina. *Vet. Hum. Toxicol.* 35: 144-146.
- Omacini, M., Gundel, P.; Semmartin M. G. 2013. Huellas de la simbiosis pasto-endófito en el agroecosistema. En: García de Salamone, I.E.; Vázquez, S.; Penna, C.; Cassan,

- F. (eds.). Rizósfera, biodiversidad y agricultura sustentable. División de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 73 p.
- PGG Wrightson Seeds. 2018. Pasturas N°4: "Festucas: requerimientos de manejo acordes a una persistencia productiva". [en línea] <http://gallery.mailchimp.com/> [consulta: 10 de diciembre de 2018].
- Penrose, C.D., Sulc, R.M.; Vollborn, E.M. 2000. A three-year report of animal preference, stockpile, yield and quality of fescue and orchardgrass. In: Proceedings American Forage and Grassland Council, Madison, WI. July 2000. American Forage and Grassland Council, Georgetown, TX. pp. 213–217.
- Peters, C.W.; Grisgsby, K. N.; Paterson, J.A.; Lipsey, R. J.; Kerley, M.S. 1989. Effect of high and low endophyte tall fescue and orchardgrass pasture on intake and digestibility by cows, performance of cow-calf pairs and subjective evaluation of symptoms related to fescue toxicosis. American Society of Animal Science, Western Section-Proceedings. 40: 237.
- Petigrosso, L.R.; Fernández, O.N.; Colabelli, M.N. 2012. Inhibición del endófito en macollos de festuca infectada mediante fungicidas. 7° Encuentro de Biólogos en Red. FCEyN-UNMdP. Mar del Plata, noviembre 15-16 pp. 68.
- Petigrosso, L.R.; Vignolio, O.R.; Damiano, I.; Echeverria, M.; Colabelli, M.N.; Gundel, P.E. 2019b. Eradication of the fungus *Epichloë coenophiala* from *Schedonorus arundinaceus* (tall fescue) seeds by interrupting the vertical transmission process. Ecología Austral. 29:055-062.
- Petigrosso, L.R. Gundel, P.; Colabelli, M.N.; Fernández, O.N.; Assuero, S.G. 2019a. Hongos endófitos en festuca alta: del problema a las soluciones. RIA 45(2): 292-303.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [en línea]. <URL <https://www.R-project.org/>> [consulta: 23 agosto 2020].
- Roitman, G.; Preliasco, P. 2018. Guía de reconocimiento de herbáceas de la Pampa Deprimida. Buenas prácticas para una ganadería sustentable de pastizal. Características para su manejo. Disponible en: https://www.avesargentinas.org.ar/sites/default/files/kit_pampas_guia_de_reconocimiento_de_herbaceas_de_la_pampa_deprimida_segunda_edicion.pdf. [consulta: 10 de marzo de 2021].
- Saha, C.D., Jackson, M.A.; Johnson-Cicalese, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. Phytopathol. 78:237-239.
- Saiga, S., Kodoma, Y., Takahashi, H.; Tsuiki, M. 2003. Endophyte removal by fungicides from ramets of perennial ryegrass and tall fescue. Grassl. Sci. 48:504-509.

- Schardl, C.L.; Phillips T.D. 1997. Protective Grass Endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Dis.* 81: 430 - 438.
- Schardl, C.L.; Leuchtman, A.; Spiering, M.J. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 315 - 340.
- Schardl, C.L. 2010. The *Epichlöe*, Symbionts of the grass subfamily Poideae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 97: 646-665.
- Siegel, M.R.; Johnson, M.C.; Varney, D.R.; Nesmith, W.C.; Buckner, R.C.; Bush, L.P.; Burrus, P.B.; Jones, T.A.; Boiling, J.A. 1987. A fungal endophyte of tall fescue: incidence and dissemination. *Phytopathol.* 74: 932 - 937.
- Shannon, M. C. 1997. Adaptation of plant to salinity. *Adv. Agron.* 60: 75-120.
- Stuedemann, J.A.; Hoveland, C.S, 1988. Fescue endophyte: history and impact on animal agriculture. *J. Prod. Agr.*1: 39-44.
- Vinton, M.A.; Horning, J.L. 2001. A Fungal endophyte in Canada Wild Rye: Studies on its occurrence, detection and elimination. *Prc. 17 th. N.A. Prairie Conference.* 79-84.
- West, C.P.; Gwinn, K.D. 1993. Role of *Acromonium* in drought, pest, and disease tolerances of grasses. In: Hume, D.E; Latch, G.CM.; Easton, H.S. (eds.). *Proceedings of the 2^o International Symposium *Acromonium*/ Grass Interactions.* Palmerston North, New Zealand. pp. 131-140.
- White, J.F. Jr.; Torres, M. 2009. *Defensive mutualism in microbial symbiosis.* CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 333-334.
- White, J.F. Jr.; Morgan-Jones, G.; Morrow, A.C. 1993. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acromonium* endophytes. *Agr. Ecosys. Environ.* 44: 13-37.
- Williams, M.J.; Backman, P.A.; Crawford, M.A.; Schmidt, S.P.; King, C.C. Jr., 1984. Chemical control of the tall fescue endophyte and its relationship to cattle performance. *N. Z. J. Exp. Agr.* 12: 165-171.
- Young, C. A.; Hume, D. E.; Mcculley, R.L. 2013. Forages and pastures symposium: fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: pasture friend or foe? *J. Anim. Sci.* 91(5): 2379-2394.