



Universidad Católica Argentina

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Trabajo final de graduación para optar el grado de Ingeniero Agrónomo

Eliminación del hongo endófito en plantas de festuca alta mediante un fungicida: resultados a campo

Estudiante: **Manuel Olarra**

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

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	11
1.3. Objetivos	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Diseño y conducción del experimento	13
2.2. Obtención de semillas de las panojas cosechadas.....	13
2.3. Variables medidas y evaluadas	15
2.4. Análisis estadístico	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Presencia del hongo endófito en semillas y viabilidad en plántulas.....	21
3.2. Efecto fitotóxico del fungicida sobre semillas y plántulas	23
4. CONCLUSIÓN	24
5. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pastura de festuca alta infectada con hongo endófito en estado vegetativo, ubicada en el Partido de General Guido.....	13
Figura 2. Momento de la determinación de las parcelas experimentales (a). Pastura de festuca alta en estado reproductivo (b).....	14
Figura 3. Cosecha manual de las panojas de las distintas plantas tratadas con fungicida.....	15
Figura 4. Diagnóstico de la presencia del endófito en semillas (a, b). Detalle de las hifas del endófito al microscopio óptico, en una semilla infectada (c). Aumento 400x.....	16
Figura 5. Siembra de semillas cosechadas de las plantas de festuca alta tratadas con fungicida a campo (a). Macetas con plántulas de festuca alta emergidas a los 15 días de la siembra (b).....	17
Figura 6. Extracción de plantas de festuca alta de las macetas para realizar el diagnóstico de endófito en los macollos (a, b). Detalle de las hifas del hongo endófito entre las células parenquimáticas en la base de la vaina del macollo (c). Aumento 400x.....	18
Figura 7. Siembra de semillas de festuca alta en bandejas de plástico (a). Determinación de categorías consideradas para el cálculo del poder germinativo: plántulas normales; plántulas anormales; semillas frescas y muertas (b, c, d).400x.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedio ($\pm$ desvío estándar) de la energía germinativa y poder germinativo de semillas provenientes de plantas de festuca alta tratadas con fungicida. T1 (testigo); T2: Dosis 1 (D1, indicada en el marbete); T3: Dosis 2 (D2, el doble de D1). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha=0,05$).....23

RESUMEN

El objetivo de este Tesis fue evaluar, en condiciones de campo, la eficacia de un fungicida sistémico en la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en plantas de festuca alta infectadas. Durante el año 2023, se realizó un experimento bajo condiciones de campo, en una pastura de festuca alta naturalizada infectada con endófito de un establecimiento dedicado a la cría y recría vacuna, ubicado en el Partido de General Guido. Se utilizó un fungicida comercial cuyos grupos químicos eran triazol, metoxiacrilato, imidazol más un coadyuvante. Se probaron tres tratamientos: T1 (testigo); T2: Dosis 1 (D1, indicada en el marbete); T3: Dosis 2 (D2, el doble de D1). Previa a la aplicación de los tratamientos, se marcaron 9 parcelas experimentales de 5,5 m de ancho x 10 m de largo. Dentro de cada parcela se marcaron 10 plantas de festuca alta mediante aros de alambre. Los tratamientos se aplicaron el 9 de abril de 2023. Una vez que las plantas cumplieron su ciclo reproductivo, el 27 de diciembre de 2023, se cosecharon las panojas de las plantas marcadas y se trillaron, a fin de obtener 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). 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 cinco semillas de cada planta en macetas conteniendo tierra del horizonte superficial de un suelo agrícola y se realizó el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las plantas obtenidas. Además, se evaluó la energía germinativa y el porcentaje de germinación de las semillas, a fin de evaluar el efecto fitotóxico del fungicida. Bajo nuestras condiciones experimentales, se constató que, ninguno de los tratamientos con fungicida aplicados en las plantas madres, fue eficaz en la remoción del endófito de las semillas y en las plántulas obtenidas de las mismas. Es decir que, ninguno de los tratamientos con fungicida permitió “frenar” el proceso de transmisión del endófito desde la planta madre a las semillas cosechas. La energía germinativa y el poder germinativo no fueron afectados significativamente por los tratamientos con fungicida empleados.

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

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Lucas Petigrosso, por su dedicación, predisposición y supervisión durante todo el desarrollo de la Tesis.

A mis padres, por apoyarme siempre, darme la oportunidad de estudiar una carrera universitaria y brindarme en todo tiempo lo que estuvo a su alcance.

A mi esposa Delfina e hijos Manucho, Cala y Amparo por su incondicional compañía en esta etapa de mi vida.

A mis amigos por su gran apoyo durante el transcurso de toda la carrera universitaria.

A la UCA, por brindarme herramientas y formarme para esta profesión la cual llevo con mucha felicidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición del problema

Festuca alta, *Festuca arundinacea* Schreb. [Syn. *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort, *Lolium arundinaceum* (Schreb.) S.J. Darbyshire, *Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub], es una especie C₃ originaria de las regiones templadas de Europa, Asia y Norte de África (Hannaway *et al.*, 1999; Fribourg y Hannaway, 2007). Es una gramínea perenne cespitosa 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). Las características agronómicas favorables que se le atribuyen a festuca alta incluyen su amplia adaptación geográfica, resistencia al pisoteo, adaptación a suelos pesados y pH relativamente elevados, resistencia a insectos y enfermedades y persistencia en condiciones de sequía (Maddaloni y Ferrari, 2005; Demanet, 2008). Presenta una buena velocidad de rebrote lo que permite pastoreos intensos y frecuentes (Demanet, 2008). Las pasturas que contienen festuca alta son utilizadas para la producción de carne y leche y por lo general, consociadas con leguminosas como alfalfa, tréboles y lotus (Rimieri *et al.*, 2002; Scheneiter, 2002).

Esta especie es de lento establecimiento y es vulnerable a la competencia por otras especies. Además, a pesar del buen tamaño de sus semillas (mil semillas pesan entre 1,5 g y 2,4 g), las plántulas son poco vigorosas (Cabrera, 1970; Muslera Pardo y García, 1991; Maddaloni y Ferrari, 2005). No obstante, una vez establecida a partir de una siembra o de resiembra natural en ambientes favorables para su crecimiento, forma densas pasturas (Cabrera, 1970; Muslera Pardo y García, 1991), disminuyendo así la biodiversidad local de pastizales y arbustos templados. La inflorescencia es una panoja laxa o algo contraída, multiflora de 10 a 35 cm de longitud normalmente. Las “semillas” (cariopses) son de 2 a 4 mm de largo y 0,9 a 1,6 mm de ancho, y maduran antes que el follaje pierda su color verde (Cabrera, 1970; Muslera Pardo y García, 1991; Maddaloni y Ferrari, 2005). Una característica propia de la festuca alta es la importante cantidad de semillas caedizas a la madurez (Dell’Agostino, 2008).

Como otras gramíneas C₃, festuca alta puede establecer una relación simbiótica con hongos endófitos asexuales de transmisión vertical, es decir, a través de semillas infectadas de su hospedante (Clay y Schardl, 2002). La asociación entre hongos del género *Epichloë* (Leuchtmann *et al.*, 2014) y gramíneas (Poaceae) de estación fría está ampliamente documentada (Siegel *et al.*, 1987; White *et al.*, 1993; Clay y Schardl, 2002; De Battista,

2005; Iannone *et al.*, 2011; Petigrosso *et al.*, 2019a). La asociación es obligada para el endófito y facultativa para la planta (Clay y Schardl, 2002; White y Torres, 2009). En este sentido, la planta le proporciona al endófito nutrición, protección, medio de multiplicación y dispersión y el endófito le confiere a la planta protección, por medio de la producción de alcaloides, tolerancia al estrés oxidativo e incremento en la capacidad de crecimiento a través de una mayor resistencia de las plantas infectadas a estreses bióticos y abióticos (Clay, 1988; Arachevaleta *et al.*, 1989; Lyons *et al.*, 1990; Omacini *et al.*, 2013). Existen tres grupos de alcaloides asociados a la festuca, las lolinas (aminopirrolizidinas saturadas) y las peraminas (pirrolopirazinas) que aportan protección contra insectos y los ergoalcaloides, que confieren resistencia a la herbivoría (Evans *et al.*, 2012) y provocan toxicidad en el ganado que consume las plantas infectadas ocasionando la patología denominada “*festucosis*” (Bacon *et al.*, 1977; Hoveland, 1993; De Battista *et al.*, 1995).

El endófito que infecta festuca alta, *Epichloë coenophiala* (Leuchtmann *et al.*, 2014) ex *Neotyphodium coenophialum*, es asintomático y sólo se propaga vía semillas infectadas (White *et al.*, 1993). Este hongo desarrolla su ciclo de vida dentro de la planta huésped (en vástagos y semillas) y no produce síntomas de enfermedad como tampoco forma estructuras reproductivas externas (Clay y Schardl, 2002; Roberts *et al.*, 2005). Para infectar las semillas, el endófito debe producir un crecimiento vegetativo masivo de sus hifas durante el desarrollo del embrión (Philipson y Christey, 1986). Una vez que el endófito llega a las semillas, puede multiplicarse y dispersarse, dependiendo de su supervivencia hasta que las semillas germinan generando una nueva planta infectada. Después de germinadas las semillas, el endófito acompaña el desarrollo de la planta, a través del crecimiento de sus hifas en los tejidos de la misma hasta finalmente infectar las nuevas semillas durante la etapa reproductiva (Clay y Schardl, 2002). En base a esto, las medidas de control del hongo endófito *E. coenophiala* están orientadas a eliminar el endófito presente en la semilla debido a que es la única vía efectiva de diseminación (Siegel *et al.*, 1984; Hinton y Bacon, 1985; White *et al.*, 1993).

La importancia agronómica de la asociación endófito-gramínea fue reconocida cuando se relacionó la presencia de las formas asexuales de *Epichloë* en *Festuca arundinacea* Schreb. y en *Lolium perenne* L. con enfermedades del ganado de gran importancia económica (Hoveland, 1993; De Battista *et al.*, 1995) como intoxicación con festuca o *festucosis* y el tembleque o *ryegrass staggers*, respectivamente (Bacon *et al.*, 1977; Fletcher y Harvey, 1981).

Se han identificado tres tipos de síndromes relacionados con el consumo de forraje y semillas de festuca infectadas: *pie de festuca* (síndrome de otoño-invierno, Jacobson *et al.*, 1969), *necrosis grasa del bovino* (Stuedemann *et al.*, 1988) y *síndrome hipertérmico o asolamiento* (síndrome de primavera-verano, Schmidt y Osborn, 1993). El *síndrome hipertérmico* se manifiesta en el ganado vacuno que consume pasturas de festuca alta infectadas en verano con una caída de la producción láctea o un retraso de la ganancia de peso. El efecto depresor de la producción se acentúa cuando la temperatura ambiente es superior a 31°C (Evans *et al.*, 2012). En el caso del *síndrome pie de festuca*, los animales presentan gangrena en las extremidades, manifestándose con cojera, y en casos extremos hasta la pérdida de la pezuña, pudiendo también ocurrir gangrena en la punta de las orejas y en la cola (Jacobson *et al.*, 1969). Esta patología se presenta cuando animales se encuentran pastoreando festuca durante los meses de invierno, y en ambientes de baja temperatura (Evans *et al.*, 2012). El *síndrome de necrosis grasa o lipomatosis*, se caracteriza por la presencia de masas duras o necróticas en tejidos adiposos de la cavidad abdominal, provocando problemas digestivos y distocias, que en algunas situaciones provoca la muerte por estrangulación intestinal (Stuedemann y Hoveland, 1988; Evans *et al.*, 2012).

Si bien es posible prevenir los riesgos de *festucosis* y el avance del porcentaje de infección en pasturas y pastizales de festuca alta mediante diferentes estrategias de manejo (Hoveland *et al.*, 1999; Bence *et al.*, 2015), algunos de estos manejos no siempre son posibles de aplicar o no son económicamente viable (Díaz Flores, 2015). Por un lado, se recomienda realizar cortes o pastoreo de festuca infectadas para mantenerla en estado vegetativo y evitar así, el estadio reproductivo y la producción de semillas infectadas (Petigrosso *et al.*, 2020a). Investigaciones recientes (Trevor *et al.*, 2016) también se han centrado en limitar la formación de inflorescencias y producción de semillas en pasturas de festuca infectadas mediante el uso de herbicidas como el metsulfuron (herbicida selectivo post-emergente). Por otro lado, algunos autores encontraron resultados transitorios en la erradicación de pasturas de festuca tóxicas usando glifosato (herbicida total de amplio espectro) sólo o combinado con otros herbicidas variando las épocas de aplicación, dosis y cultivos antecesores (Hoveland *et al.*, 1986; Bagegni *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 2010). Esta práctica es ineficiente debido a que la población de festuca se restablece, tanto en la pastura como en el pastizal (Defelice y Henning, 1990).

Por otro lado, 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 (Siegel *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1984; Costa y De Batista, 1988; Maddaloni *et al.*, 1989b). Sin embargo, en general, las aplicaciones de fungicidas sobre plantas de festuca infectadas evidencian escasa eficacia (Dernoeden *et al.*, 1990) y exigen tratamientos repetidos. Según trabajos previos (Saiga *et al.*, 2003; Leyronas *et al.*, 2006), existe sensibilidad diferencial de los diversos endófitos asexuales *Epichloë* a ciertos fungicidas. Esto sugiere que habría diferentes mecanismos metabólicos de tolerancia o resistencia en las especies de este género, e incluso en cepas de la misma especie, lo cual explicaría la variación en el nivel de eficacia para la eliminación de estos endófitos.

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 a campo que analizan la eliminación del hongo endófito *Epichloë* en 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.

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

En caso de no rechazar H1,

H3. La calidad de semillas de festuca alta provenientes de plantas tratadas con fungicida para eliminar el hongo endófito, depende de la dosis de fungicida empleada.

1.3. Objetivos

Objetivo General

Evaluar, en condiciones de campo, la eficacia de un fungicida sistémico en la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en 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.
- Determinar el posible efecto fitotóxico sobre la energía germinativa y poder germinativo de las semillas provenientes de las plantas tratadas con fungicida para eliminar el hongo endófito.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Diseño y conducción del experimento

Durante el año 2023, se realizó un experimento bajo condiciones de campo, en una pastura de festuca alta naturalizada (más de 10 años de implantación) de un establecimiento dedicado a la cría y recría vacuna, ubicado en el Partido de General Guido (Figura 1). Previamente, se corroboró la condición de infección (en adelante, E+) de plantas de festuca alta mediante el análisis microscópico en macollos (Card *et al.*, 2011), de acuerdo al protocolo de muestreo de Petigrosso *et al.* (2020b).



Figura 1. Pastura de festuca alta infectada con hongo endófito en estado vegetativo, ubicada en el Partido de General Guido.

Luego de corroborar la condición de infección de la pastura (100% E+), se marcaron 9 parcelas experimentales de 5,5 m de ancho x 10 m de largo (Figura 2). Se utilizó un fungicida comercial de acuerdo con ensayos previos (Petigrosso *et al.*, 2019b), cuyos grupos químicos eran: triazol, metoxiacrilato, imidazol más un coadyuvante. Se probaron tres tratamientos: T1 (testigo); T2: Dosis 1 (D1, indicada en el marbete); T3: Dosis 2 (D2, el doble de D1). Previa a la aplicación de los tratamientos, se marcaron 10 plantas de festuca alta en cada parcela (mediante aros de alambre). Los tratamientos se aplicaron el 9 de abril de 2023. Una vez que las plantas cumplieron su ciclo reproductivo (Figura 2), el 27 de diciembre de 2023, se cosecharon las panojas de las plantas marcadas.



Figura 2. Momento de la determinación de las parcelas experimentales (a). Pastura de festuca alta en estado reproductivo (b).

2.2. Obtención de semillas de las panojas cosechadas

Una vez cosechadas las panojas, las mismas se trillaron (manteniendo su identificación), a fin de obtener las semillas (Figura 3), sobre las cuales se realizaron las actividades que a continuación se describen en el inciso 2.2.



Figura 3. Cosecha manual de las panojas de las distintas plantas tratadas con fungicida.

2.3. Variables medidas y evaluadas

Diagnóstico de la presencia del hongo endófito en 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 4). Posteriormente, se colocó un cubreobjeto y se observó al microscopio óptico Olympus CHK (400x) la presencia de hifas del hongo endófito 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). En total se analizaron 5400 semillas (60 semillas x 10 plantas x 3 tratamientos x 3 repeticiones).

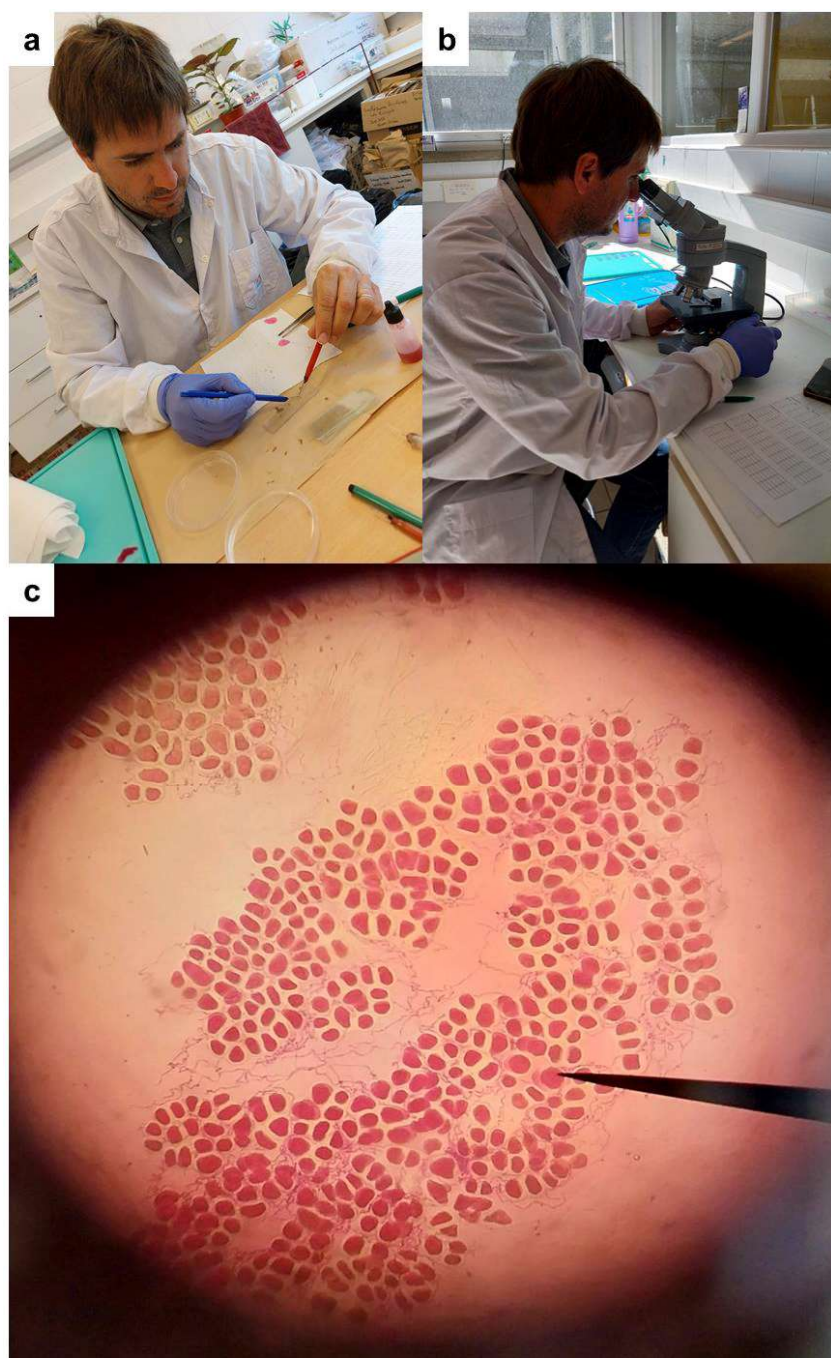


Figura 4. Diagnóstico de la presencia del endófito en semillas (a, b). Detalle de las hifas del endófito al microscopio óptico, en una semilla infectada (c). Aumento 400x.

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 cinco semillas de cada planta en macetas plásticas de 1 L conteniendo tierra del horizonte superficial (0-20 cm) de un suelo agrícola (Figura 5) y se realizó el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las plantas obtenidas. En total se analizaron 450 plántulas (5 semillas/planta x 10 plantas x 3 tratamientos x 3 repeticiones).

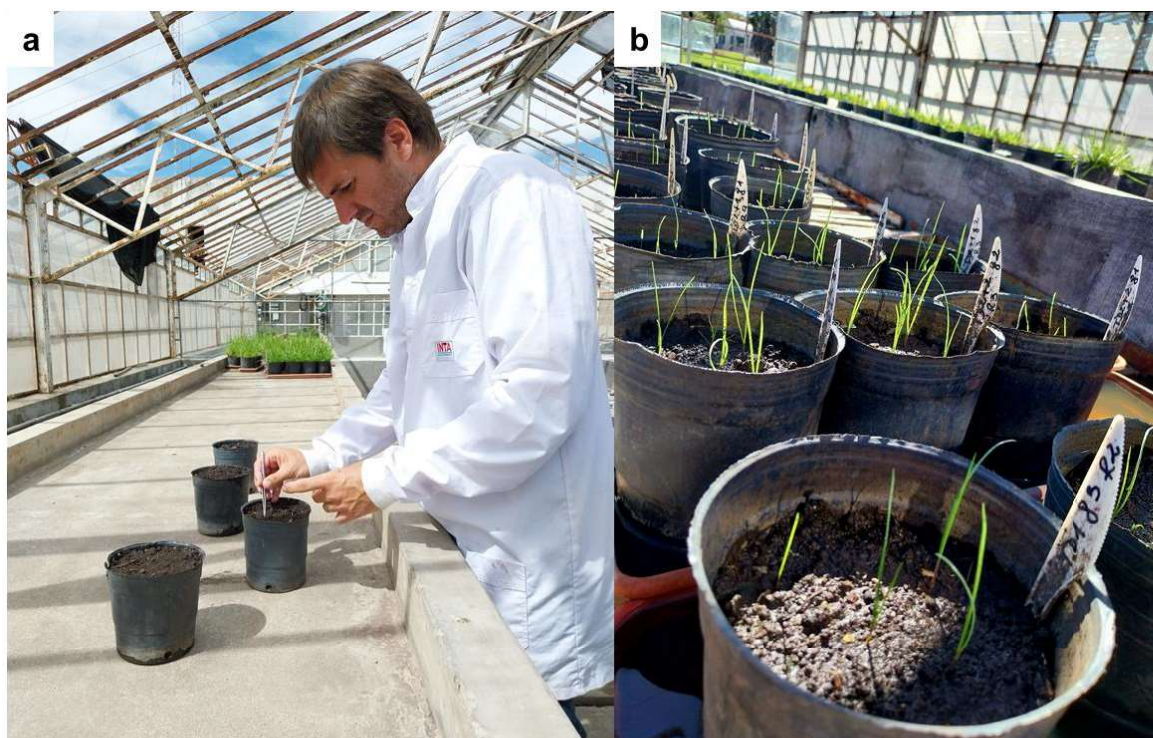


Figura 5. Siembra de semillas cosechadas de las plantas de festuca alta tratadas con fungicida a campo (a). Macetas con plántulas de festuca alta emergidas a los 15 días de la siembra (b).

Cuando las plantas tenían entre 45 y 60 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 6). 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 infectados aquellos que presentaron hifas del hongo endófito entre las células parenquimáticas de la vaina foliar (Figura 6).

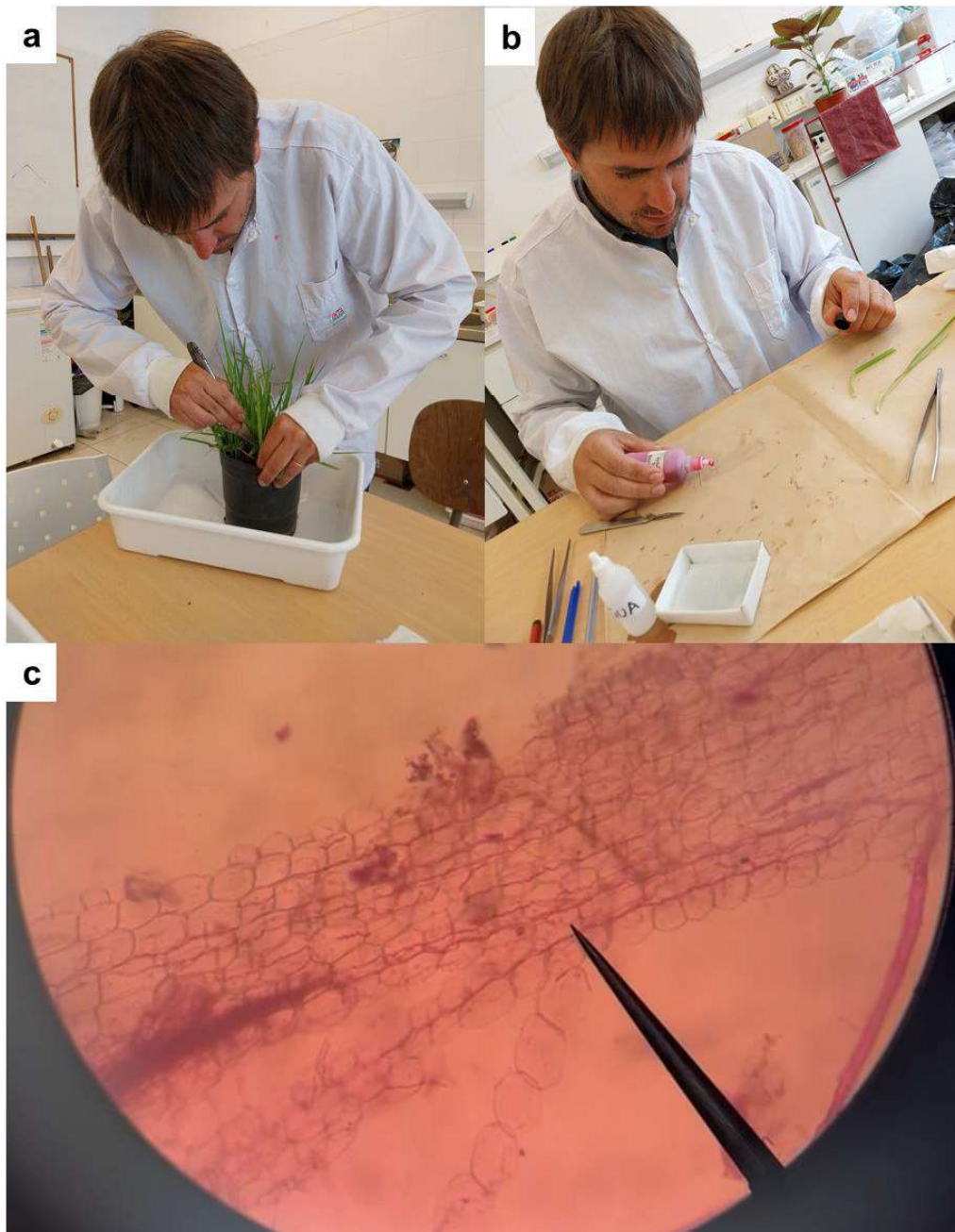


Figura 6. Extracción de plantas de festuca alta de las macetas para realizar el diagnóstico de endófito en los macollos (a, b). Detalle de las hifas del hongo endófito entre las células parenquimáticas en la base de la vaina del macollo (c). Aumento 400x.

Efecto fitotóxico del fungicida sobre las plántulas obtenidas

Se evaluó la energía germinativa (EG%) y el porcentaje de germinación (%PG) según las reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2020). Para ello, se sembraron 150 semillas por tratamiento en bandejas plásticas sobre papel de filtro humedecido con agua (3 repeticiones de 50 semillas/bandeja). Cada bandeja fue cubierta con una bolsa de polietileno transparente, para conservar la humedad y permitir el paso de la luz. Las bandejas se sometieron a pretratamiento (en heladera a 5°C por 48 h) y posteriormente se pasaron a una cámara de germinación a 25°C, y con fluctuaciones de 8 h - 16 h de luz-oscuridad.

En el caso de la energía germinativa, a los 7 días se abrieron los rollos y se contaron las semillas germinadas (ISTA, 2020). Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula presentó una longitud igual o mayor a 2 mm (Figura 7).

A los 14 días se identificaron las categorías de plántulas y semillas consideradas por los protocolos estandarizados provistos por dichas reglas al momento de realizar el recuento del PG: plántulas emergidas normales, anormales, semillas muertas y frescas (Figura 7). Los protocolos del ISTA definen como *plántulas normales* aquellas que muestran el potencial para un desarrollo continuo hacia plantas satisfactorias cuando crecen en suelo de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Se diferencian tres categorías de plántulas normales: 1) plántulas enteras; 2) plántulas ligeramente defectuosas y 3) plántulas infectadas secundariamente. Todas las partes esenciales de una plántula *entera* son: bien desarrolladas; completas; proporcionadas las unas con las otras; sanas. *Plántulas anormales* son aquellas “plántulas que no muestran potencialidad para un desarrollo continuo hacia plantas satisfactorias cuando crecen en suelo de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz”. Las plántulas anormales pueden ser: plántulas dañadas, con alguna estructura esencial ausente o dañada irreparablemente; plántulas deformes o desequilibradas, con desarrollo débil o disturbios fisiológicos y/o; plántulas decaídas, con alguna estructura esencial enferma o decaída por infección primaria.

El PG se determinó como el porcentaje de plántulas normales desarrolladas con respecto al total de semillas sembradas por bandeja (50).

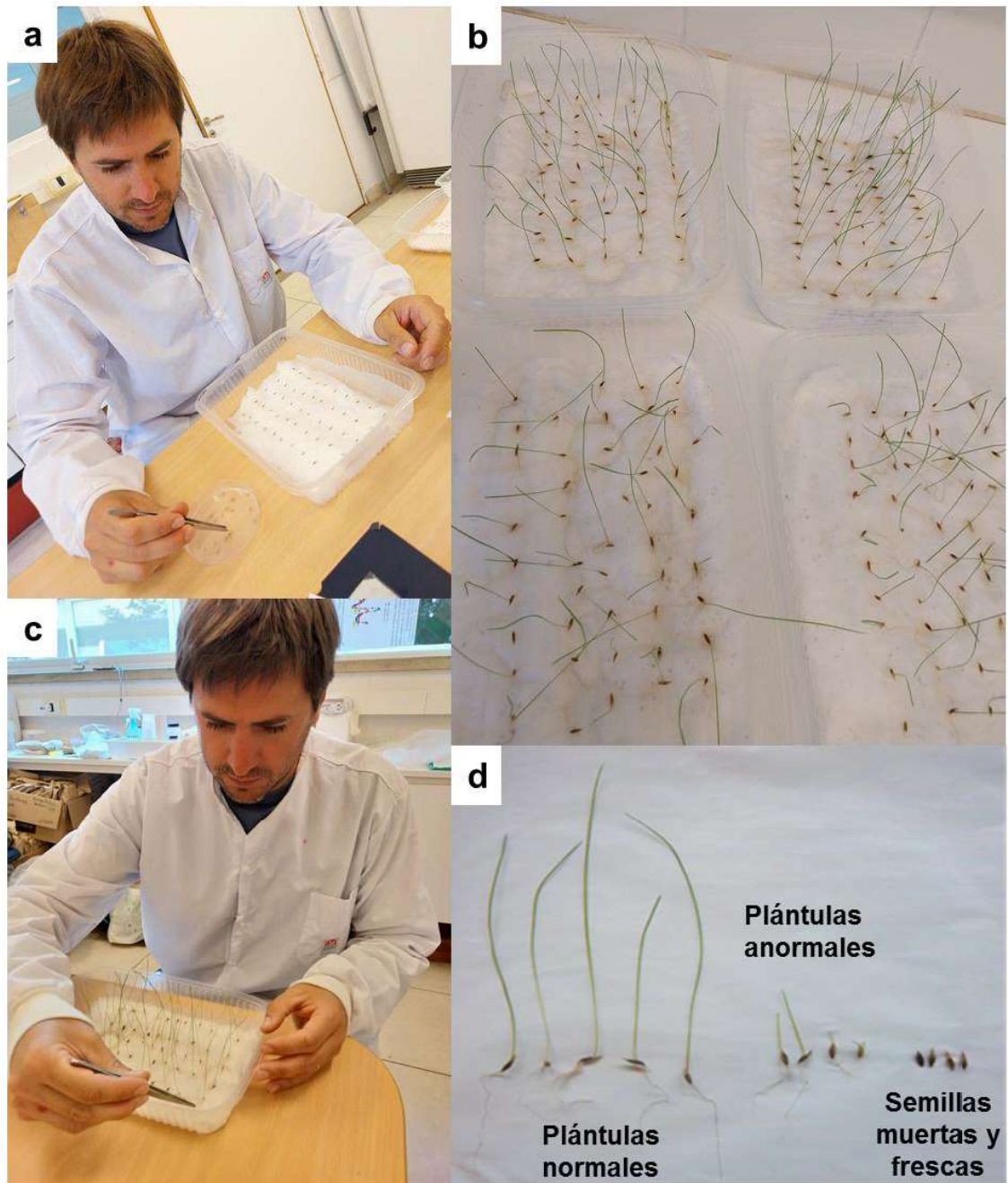


Figura 7. Siembra de semillas de festuca alta en bandejas de plástico (a). Determinación de categorías consideradas para el cálculo del poder germinativo: plántulas normales; plántulas anormales; semillas frescas y muertas (b, c, d).

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 Y DISCUSIÓN

3.1. Presencia del hongo endófito en semillas y viabilidad en plántulas

Se constató mediante el diagnóstico microscópico del endófito en las semillas que, ninguno de los tratamientos con fungicida aplicados en las plantas madres, fue eficaz en la remoción del endófito (*i.e.*, 100 % presencia de hifas en las semillas = 100 % de infección). También, al analizar las plantas originadas de las semillas tratadas, se registró la presencia de hifas en todas las plantas (*i.e.*, 100% de infección), indicando la viabilidad del hongo endófito. Es decir que, bajo nuestras condiciones experimentales, ninguno de los tratamientos con fungicida permitió “frenar” el proceso de transmisión del endófito desde la planta madre a las semillas cosechas (Petigrosso *et al.*, 2019b). Estos resultados no coinciden con los registrados por Petigrosso *et al.* (2024). Según estos autores, al evaluar la eficacia de los mismos tratamientos con fungicida que los utilizados en esta Tesis, pero en condiciones controladas de invernáculo, encontraron que ambos tratamientos (T2 y T3, respectivamente) fueron efectivos en la eliminación del endófito en un 31% y 74%, respectivamente.

Sin embargo, es importante mencionar que, en el caso del tratamiento T3 (*i.e.*, doble dosis del fungicida) se observó una disminución en el número y tamaño de las hifas tanto en las semillas como en las plantas originadas de las mismas, dado que resultó más dificultoso observarlas al microscopio. En este sentido, y considerando que, la eficacia de los tratamientos con fungicida depende, entre otros factores, de la dosis utilizada y del número de aplicaciones (Saiga *et al.*, 2003), en futuros ensayos a campo, se deberá evaluar un mayor número de aplicaciones en el tiempo. Así, Petigrosso *et al.* (2024), concluyeron, al evaluar el mismo fungicida que en esta Tesis, que el porcentaje de efectividad del fungicida en la eliminación del hongo endófito, aumentaba con la dosis y el número de aplicaciones.

Por otro lado, estudios recientes resaltan la importancia del efecto genotipo del hospedante sobre la concentración de micelio endófito y sobre los niveles de expresión de metabolitos secundarios derivados de los endófitos (Edwards *et al.*, 1993; di Menna y Waller, 1986; Ball *et al.*, 1997; Cosgrove *et al.*, 2002). La existencia de esta variabilidad de respuestas entre materiales de festuca alta y asociaciones gramínea-endófito, indican que los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales (*i.e.*, eficacia de tratamientos con fungicida sobre una población de festuca alta naturalizada ubicado en el Partido de General Guido) no podrían extrapolarse a otras poblaciones de festuca alta

infectadas. Por esta razón, en futuros experimentos también se debería evaluar un mayor número de poblaciones de festuca alta infectadas con endófito silvestre.

3.2. Efecto fitotóxico del fungicida sobre semillas y plántulas

Como fue mencionado anteriormente, los tratamientos con fungicida evaluados no fueron eficaces en la eliminación del hongo endófito. Sin embargo, este resultado se debe complementar 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). Bajo nuestras condiciones experimentales ni la energía germinativa ni el poder germinativo de las semillas fue afectado significativamente por el tratamiento con fungicida empleado ($p > 0,05$). Si bien con la Dosis 2, ambas variables tendieron a ser menores, no fueron diferentes significativamente del testigo (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio ($\pm$ desvío estándar) de la energía germinativa y poder germinativo de semillas provenientes de plantas de festuca alta tratadas con fungicida. T1 (testigo); T2: Dosis 1 (D1, indicada en el marbete); T3: Dosis 2 (D2, el doble de D1). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).

Tratamiento	Energía germinativa (%)	Poder germinativo (%)
T1	92,00 $\pm$ 2,00 a	90,67 $\pm$ 3,05 a
T2	81,33 $\pm$ 4,16 a	87,33 $\pm$ 2,31 a
T3	85,33 $\pm$ 9,86 a	80,00 $\pm$ 8,72 a

Comentarios finales

A pesar que los resultados obtenidos en el marco de esta Tesis no fueron los esperados, siguen siendo alentadores en la temática en cuestión, por dos motivos. Primero, porque en los tratamientos con doble dosis, la cantidad y tamaño de las hifas del endófito fueron menores, indicando un posible efecto de esta dosis sobre el crecimiento del micelio del endófito. Segundo, porque la calidad de las semillas, medida a través de la energía y poder germinativo, no se vio afectada por los tratamientos con fungicida. En futuros ensayos, deberían evaluarse otras dosis de este fungicida o bien, las mismas dosis, pero con más aplicaciones en el tiempo.

4. CONCLUSIÓN

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

- Se rechaza la Hipótesis 1, *“La viabilidad del hongo endófito en plantas de festuca alta es anulada por los tratamientos con fungicida a evaluar”*.
- Se rechaza la Hipótesis 2, *“La eficacia en la eliminación del hongo endófito en plantas de festuca alta depende de la dosis de fungicida empleada.”*

Esto se fundamenta en que todos los tratamientos con fungicida evaluados no fueron eficaces en la eliminación del endófito en las plantas de festuca alta.

Por otro lado, también se rechaza la Hipótesis 3, *“La calidad de semillas de festuca alta provenientes de plantas tratadas con fungicida para eliminar el hongo endófito, depende de la dosis de fungicida empleada”*. En este sentido, a pesar de que los tratamientos con fungicida no fueron efectivos en la eliminación del endófito, la calidad de las semillas no fue afectada por dichos tratamientos.

5. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- Bagegni, A.M.; Kerr, H.D.; Sieper, D.A. 1994. Herbicides with crop competition replace endophytic tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Weed Technol.* 8 (4): 689-695
- Ball, O.J.P.; Barker, G.M.; Prestidge, R.A.; Lauren, D.R. 1997. Distribution and accumulation of the alkaloid peramine in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *J. Chem. Ecol.* 23: 1419-1434. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006473.26175.19>
- Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Sci.* 36: 460-462.
- Bence, A.; Cantón, G.; Odriozola E. 2015. Festucas tóxicas. Información y recomendaciones de manejo. *Visión Rural.* 22(108):34-3.
- Cabrera, A. 1970. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Tomo 4, Parte 2a INTA. Buenos Aires Argentina. Colección Científica. pp. 120-156.
- Card, S.D., Rolston, M.P., Park, Z., Cox, N., Hume, D.E. 2011. Fungal endophyte detection in pasture grass seed utilizing the infection layer and comparison to other detection techniques. *Seed Sci. Technol.* 39 (3): 581–592.
- Clay, K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am. Nat.* 160: 99-127.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69: 10-16. <https://doi.org/10.2307/1943155>
- Cosgrove, G.P.; Anderson, C.B.; Phillot, M.; Nyfeler, D.; Hume, D.E.; Parson, A.J.; Lane, G.A. 2002. The effect of endophyte alkaloids on diet selection by sheep. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 62: 167–170.
- 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.; 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.
- De Battista, J.P. 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. In: Roberts, C.; West, C.; Spiers, D. (eds.). *Neotyphodium* in cool season grasses. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. pp. 63-69.

- Defelice, M.S.; Henning, J.C. 1990. Renovation of endophyte (*Acremonium coenophialum*) infected tall fescue (*Festuca arundinacea*) pastures with herbicides. *Weed Sci.* 38: 628-633.
- 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.
- Demagnet, R. 2008. Festuca (*Festuca arundinacea*). Disponible en: http://www.praderasypasturas.com/images/stories/Documentos/Pasturas/Gramineas_Forrajeras/Festuca_Festuca_arundinacea_Schreb.pdf [consulta 15 de abril de 2024].
- 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.
- di Menna, M. E.; Waller, J. E. 1986. Visual assessment of seasonal changes in amount of mycelium of *Acremonium loliae* in leaf sheaths of perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.* 29: 111-116. <https://doi.org/10.1080/00288233.1986.10417982>
- Díaz Florez, I. 2015. Festucosis y respuesta animal ante el consumo de festuca contaminada con endófitos amigables. Monografía para optar por el título de Especialista en Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Mar del Plata. 69 p.
- Edwards, G.R.; Lucas, R. J.; Johnson, M. R. 1993. Grazing preference for pasture species by sheep is affected by endophyte and nitrogen fertility. *Proceedings New Zealand Grassland Association.* 55: 137–141. <https://doi.org/10.33584/jnzg.1993.55.2074>
- Evans, T.J.; Blodgett, D.J.; Rottinghaus, G.E. 2012. Fescue toxicosis. *Vet Toxicol.* 87: 1166-1177.
- Fletcher, L.R; Harvey, I.C. 1981. An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *N. Z. Vet. J.* 29:185-186.
- 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].
- 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.
- 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
- Hill, N.S.; Brown, E. 2000. Endophyte viability in seedling tall fescue treated with fungicides. *Crop Sci.* 40(5): 1490-1491.

- Hinton, D.M.; Bacon, C.W. 1985. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. Can. J. Bot. 63: 36-42. <https://doi.org/10.1139/b85-006>
- Hoveland, C.S.; Allison, M. W.; Durham, R.G.; Worley, P.C.; Worley, E.E.; Dobson, J. W. Jr.; Newsome, J.F.; Calvert, G. V. 1986. Suppression of tall fescue sod with herbicides for planting of endophyte free seed. Georgia Agric. Res. Rep. N° 516. 9 p
- Hoveland, C.S. 1993. Economic importance of *Acremonium* endophytes. Agr. Ecosyst. Environ. 44: 3-12.
- Hoveland, C.S.; Bouton, J.H.; Durham, R.G. 1999. Fungal endophyte effects on production of legumes in association with tall fescue. Agron. J. 91: 897-903.
- Iannone, L.J., White, J.F. Jr., Giussani, L.M., Cabral, D.; Novas, M.V. 2011. Diversity and distributiton of *Neotyphodium* infected grasses in Argentina. Mycol. Prog. 10: 9–19.
- Ista (International Seed Testing Association). 2020. International Rules for Seed Testing. ISTA. Bassersdorf, 280 p.
- 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.
- Leuchtmann, 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.
- Leyronas, C., Mériaux, B.; Raynal, G. 2006. Chemical control of species endophytes in perennial ryegrass and tall fescue seeds. Crop Sci. 46 (1):98-104.
- 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.
- Maddaloni, J.; Ferrari, L. 2005. Festuca alta. En: Forrajeras 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.
- Mazzanti, A.; Castaño J.; Sevilla, C.; Orbea, J. 1992. Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires. INTA. EEA Balcarce. Buenos Aires, Argentina 73 p.
- Muslera Pardo, E.; Ratera García, C. 1991. Las gramíneas. En: Muslera Pardo, E.; Ratera García, C. (eds.). Praderas y forrajes: producción y aprovechamiento. Mundi-Prensa, Madrid. España pp. 29-114.

- Petigrosso, L.R.; Fernández, O.N.; Colabelli, M.N. 2012. Inhibición del endófito en macollos de festuca infectada mediante fungicidas. 7º 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.
- Petigrosso, L. R.; Navarro, D.; Assuero, S. G.; Vignolio, O. R.; Castaño, J.; Colabelli, M. 2020a. Respuesta a la frecuencia de defoliación de plantas de festuca alta de una población naturalizada infectada con endófito silvestre y un cultivar comercial libre. *RIA*, 46(2), 195-202.
- Petigrosso, L.R.; Colabelli, M.; Poo, J. 2020b. ¿Cómo muestrear pasturas de festuca infectada con hongo endófito? *Visión Rural*. Año XXVII N° 132. pp. 32-33.
- Petigrosso, L.R.; Casamayouret, N.; Braco, M.; Ezcurdia, P.; Lemme, J.; Parisi, F.; Poo, J. 2024. Eliminación del hongo endófito en plantas de festuca alta mediante un fungicida: resultados preliminares. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 47 Supl. 1: 309.
- Philipson, M.N.; Christey, M.C. 1986. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *N. Z. J. Bot.* 24: 125–134.
- 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 de 2020].
- Rimieri, P.; Scheneiter, O. J.; Carrete, J. R. 2002. Pasturas cultivadas en la Región Pampeana húmeda. *IDIA XXI* N° 2: 19-22.
- Roberts, C.A.; West, C.P.; Spiers, D.E. 2005. *Neotyphodium* in cool-season Grasses. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp. 271-290.
- 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.
- Scheneiter, J. O. 2002. Producción de forraje y de carne en pasturas de festuca alta fertilizadas con N o asociadas con trébol blanco. Reunión Anual de forrajeras. EEA Pergamino. INTA. Pergamino, 8 de noviembre de 2002.

- Schmidt, S.P.; Osborn, T.G. 1993. Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agric. Ecosyst. Environ.* 44(1-4): 233-262.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105206>
- Siegel, M.R.; Johnson, M. C.; Varney, D. R.; Nesmith, W.C; Buc, R. C.; Bush, L.; Burrus, F.; Jones, P.B; Boling, J. K. 1984. A fungal endophyte in tall fescue: Incidence and dissemination. *Phytopathol.* 74: 932-937.
- 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.
- Stuedemann, J.A.; Hoveland, C.S, 1988. Fescue endophyte: history and impact on animal agriculture. *J. Prod. Agr.* 1: 39-44.
- Trevor, D. I.; Bates, G.E.; Mueller, C.T.; Waller, J. C.; Rhodes, G. N. 2016. Effects of Aminocyclopyrachlor Plus Metsulfuron on tall fescue yield, forage quality, and ergot alkaloid concentration. *Weed Technol.* 30(1): 171-180.
- Vinton, M.A.; Horning, J.L. 2001. A Fungal endophyte in Canada Wild Rye: Studies on its occurrence, detection and elimination. *Proc. 17th. N.A. Prairie Conference.* 79-84.
- 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 *Acremonium* 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.