



Universidad Católica Argentina

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Trabajo final de graduación para optar el grado de Ingeniero Agrónomo

***Variabilidad para la tolerancia a la salinidad de semillas
de festuca alta infectadas con el hongo endófito
Epichloë coenophiala***

Estudiante: **Lucio Segundo Bellocq**

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

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Definición del problema	9
1.2. Hipótesis	13
1.3. Objetivos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Obtención del material experimental.....	15
2.2. Determinaciones previas.....	15
2.2.1. Poder germinativo de las semillas.....	15
2.2.2. Diagnóstico de la presencia del hongo endófito en semillas.....	16
2.2.3. Peso de mil semillas.....	17
2.3. Diseño y conducción del experimento.....	18
2.4. Variables registradas	19
2.5. Análisis estadístico.....	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Efecto de los materiales genéticos de festuca alta, la condición salina e interacción	21
3.1.1. Energía germinativa (%EG).....	21
3.1.2. Poder germinativo (%PG).....	21
3.1.3. Longitud de coleóptilo (LC).....	22
3.1.4. Longitud de radícula (LR)	23
3.2. Efecto de tipo de endófito, la condición salina e interacción.....	24
4. DISCUSIÓN	26
5. CONCLUSIÓN	29
6. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Siembra de semillas de festuca alta en bandejas plásticas para la determinación del poder germinativo (A-B). Bandejas plásticas cubiertas con bolsas de polietileno transparente en cámara de germinación (C). Bandejas al momento de realizar el recuento de semillas germinadas y la clasificación de plántulas (D).....16
- Figura 2.** Observación microscópica del endófito en semillas de festuca alta (A). Detalle de las hifas del hongo endófito entre las células de aleurona en una semilla de festuca alta. Aumento 400x (B).....17
- Figura 3.** Conteo de 100 semillas de festuca alta de los cuatro materiales genéticos utilizados (A) y peso de semillas en balanza analítica (B).....17
- Figura 4.** Siembra de semillas de festuca alta en rollos de papel embebidos con agua o solución salina (A-B). Rollos sembrados en recipientes ubicados en cámara de germinación.....18
- Figura 5.** Clasificación de semillas y plántulas según normas ISTA (A). Detalle de plántulas de festuca alta al final del experimento para realizar la medición de longitud de radícula y coleóptilo (B-C-D).....19
- Figura 6.** Energía germinativa (EG%, media $\pm$ EE) de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).....21
- Figura 7.** Poder germinativo (PG%, media $\pm$ EE) de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).....22
- Figura 8.** Longitud de coleóptilo (LC, media $\pm$ EE) de plántulas originadas de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).....23
- Figura 9.** Longitud de radícula (LR, media $\pm$ EE) de plántulas originadas de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de

General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).....24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poder germinativo (% , media $\pm$ EE) y peso de mil semillas (g) de los cuatros materiales genéticos utilizados en el experimento. PMCE+: población naturalizada de festuca alta infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada de festuca alta infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584. Letras iguales, indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha=0,05$).....18

Tabla 2. Valores promedios ($\pm$ EE) de la energía germinativa (%EG), poder germinativo (%PG), longitud de radícula (LR) y longitud de coleóptilo (LC) de plántulas originadas de semillas de festuca alta infectadas con endófito seguro AR584 (promedio de los valores obtenidos en los cvs. Taita y Malma) e infectadas con endófito silvestre (promedio de los valores obtenidos para la población cosechada en Mar Chiquita y en General Guido) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$) entre tipos de endófitos en cada condición salina.....25

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue comparar la tolerancia a la salinidad a NaCl de semillas de distintos materiales genéticos de festuca alta infectados con el hongo endófito *Epichloë coenophiala*, en variables asociadas a la germinación. El experimento se realizó en una cámara de germinación de la Unidad Integrada Balcarce. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones en el tiempo (tandas), con un arreglo factorial. Los factores experimentales fueron: i) materiales genéticos de festuca alta, con cuatro niveles: dos poblaciones naturalizadas infectadas con endófito *E. coenophiala* silvestre [una cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita (PMCE+) y otra, en una pastura naturalizada de más de 10 años de implantación en el Partido de General Guido (PGGE+)] y dos cultivares infectados el endófito *E. coenophiala* seguro AR584 [cv. Malma (ME+) y cv. Taita (TE+)] y iii) condición salina, con cinco niveles: 0 (control), 40, 80, 120 y 200 mM de NaCl. En cada tanda, se sembraron 50 semillas en rollos de papel. Se determinaron las siguientes variables: energía germinativa (EG) y poder germinativo (PG) de las semillas, longitud de radícula (LR) y coleóptilo (LC). Bajo nuestras condiciones experimentales, se observó un efecto detrimental de la condición salina 200 mM de NaCl sobre las cuatro variables evaluadas. PMCE+ fue el material más afectado por el tratamiento salino 200 mM NaCl para %EG y %PG. En lo que respecta a LR y LC, PGGE+ fue el material más afectado en 200 mM NaCl. Por otro lado, al analizar el efecto del tipo de endófito, se observó que en altas concentraciones salinas (120 y 200 mM NaCl), la presencia del endófito seguro AR584 aumentó %EG, %PG, LR y LC, al compararlo con el endófito silvestre. Así, en los tratamientos 120 mM y 200 mM, se registró una superioridad del cv. ME+ para %EG y %PG, respecto del resto de los materiales de festuca alta. Los resultados obtenidos en el este trabajo indicarían la existencia de una gran variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre los materiales de festuca alta evaluados y que, de acuerdo al tipo de endófito presente en las semillas, silvestre o seguro, podría observarse un costo adicional en el genotipo del hospedante, al menos, en las etapas tempranas de desarrollo como es la germinación, o bien, un beneficio de la simbiosis.

Palabras clave: *Festuca arundinacea*, *Epichloë coenophiala*, semilla, salinidad, energía germinativa, poder germinativo.

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

A mi novia, por su incondicional compañía en esta última etapa de mi carrera.

A la Dra. Mercedes Echeverría, la Ing. Agr. Verónica Crovo y la Técnica Fernanda Buckley, por su ayuda en la parte experimental de esta Tesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición del problema

Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.), es una forrajera de clima templado muy importante dentro de los sistemas de producción extensivos ganaderos y se la cultiva con ese fin en varios lugares del mundo como Estados Unidos, Argentina, Uruguay y Australia (Mazzanti *et al.*, 1992; Hannaway *et al.*, 1999; Gibson y Newman, 2001; Fribourg y Hannaway, 2007; Milne, 2009). Entre sus principales características se destacan su tolerancia a la sequía y al calor, buen crecimiento estival, alta eficiencia en el uso del agua, gran profundidad de exploración del sistema radical y, tolerancia a insectos, a heladas, inundaciones, entre otras (Muslera Pardo y Ratera García, 1991; Maddaloni y Ferrari, 2005; Lattanzi *et al.*, 2007; Dell'Agostino, 2008; Petigrosso *et al.*, 2023).

Es una especie de gran rusticidad y plasticidad, lo que ha permitido adaptarse a un amplio rango de condiciones edáficas y climáticas (Maddaloni y Ferrari, 2005; Lattanzi *et al.*, 2007; Dell'Agostino, 2008). En ausencia de ganado, es una especie que domina las pasturas y también invade y domina pastizales en los que no ha sido sembrada (Clay y Holah, 1999; Gibson y Newman, 2001). Su calidad está dada por el contenido de proteína y por digestibilidad. Lattanzi *et al.* (2007) encontraron que una pastura de festuca en estado vegetativo posee valores de digestibilidad de la materia seca de 70-75%, con contenidos de proteína bruta superiores al 15% y de fibra detergente neutro (FDN) de 50%, obteniéndose ganancias de peso en el ganado vacuno de 0,7 a 1 kg/día. A pesar de ello, en algunas ocasiones, las ganancias de peso individual no se corresponden con estos valores debido a la presencia del hongo endófito *Epichloë coenophiala* (Bacon *et al.*, 1977; Clay y Schardl, 2002; Odriozola *et al.*, 2002; Leuchtman *et al.*, 2014).

El hongo endófito que infecta plantas de festuca alta, *Epichloë coenophiala* (Leuchtman *et al.*, 2014), crece sistémica y asintomáticamente en la parte aérea de la planta. Es un hongo asexual y la única forma de propagación es a través de las semillas de las plantas hospedantes, es decir, en forma vertical (Clay y Schardl, 2002). Este hongo desarrolla su ciclo de vida dentro de la planta hospedante (en vástagos y semillas) y no produce síntomas de enfermedad visibles desde el exterior como tampoco forma estructuras reproductivas externas (Clay y Schardl, 2002; Roberts *et al.*, 2005). Esta característica del ciclo de vida del hongo implica que la persistencia de la infección en la población natural o pastura implantada dependerá de la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas hospedantes (Clay y Schardl, 2002).

La presencia de endófitos del género *Epichloë* en gramíneas forrajeras se conoce desde mediados del siglo XX (Neil, 1941) y la interacción entre ellos y sus hospedantes ha sido considerada un mutualismo. La asociación es obligada para el endófito y facultativa para la planta (Siegel *et al.*, 1987; Clay y Schardl, 2002; White y Torres, 2009). Los endófitos se benefician por tener asegurada su nutrición, dispersión y supervivencia (Siegel *et al.*, 1987). Las plantas colonizadas se benefician por un aumento de su crecimiento, biomasa, tolerancia a heladas y sequías y resistencia al estrés por déficit de nitrógeno (Lyons *et al.*, 1990; Malinowski y Belesky, 2000) lo que resulta en un aumento de la tolerancia a suelos marginales. Asimismo, el mutualismo se traduce en resistencia a nematodos (West y Gwinn, 1993), insectos (Latch *et al.*, 1985), así como a vertebrados herbívoros (Cheplick y Clay, 1988).

La importancia agronómica de la asociación endófito-pasto fue reconocida después que se relacionó la presencia del endófito en festuca alta y raigrás perenne con enfermedades del ganado de gran importancia económica (Hoveland, 1993; De Battista *et al.*, 1995) como la *festucosis* o intoxicación con festuca y el tembleque o *ryegrass staggers* en raigrás (Bacon *et al.*, 1977; Fletcher y Harvey, 1981). El efecto de la toxicidad puede manifestarse a través de diferentes síndromes y afecta al ganado bovino, ovino y equino (Porter y Thompson, 1992; Campero, 1996). En la ganadería bovina se han identificado tres tipos de síndromes relacionados con el consumo de forraje o semillas de festuca infectadas: “*pie de festuca*” en otoño-inverno (Jacobson *et al.*, 1969), “*necrosis grasa del bovino*” (Stuedemann y Hoveland, 1988) y “*síndrome hipertérmico o asoleamiento*” en primavera-verano (Schmidt y Osborn, 1993).

Algunas estrategias para disminuir esta toxicidad sobre el ganado serían la siembra de cultivares de festuca libres de endófito o, alternativamente, usar cultivares que han sido inoculados con endófitos seguros o amigables (“*safe*” o “*non-toxic endophytes*”, Bouton *et al.*, 2002). Estos cultivares producen alcaloides de la familia de las lolinas y peraminas, que otorgan resistencia a insectos, en valores similares a los observados en materiales con el endófito silvestre, y niveles significativamente reducidos o nulos de toxinas (ergoalcaloides) para el ganado. Sin embargo, las combinaciones gramíneas–endófito generadas por el hombre a través de la inoculación de hifas, al no haber estado sometidas a “filtros ambientales naturales”, muestran distintos niveles de compatibilidad (do Valle Ribeiro, 1993). La falta de compatibilidad se manifiesta a través de reacciones que pueden provocar la muerte del tejido celular del hospedante, la muerte de las hifas y/o un retraso en el crecimiento del hospedante (Koga *et al.*, 1993). Las cepas AR542 y AR584 han sido

desarrolladas y comercializadas en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia (Lugtenberg *et al.*, 2016; Caradus y Johnson, 2020). Aunque estas nuevas asociaciones de hongos endófitos seguros y distintos cultivares de festuca alta han sido adoptadas por los consumidores, las consecuencias ecológicas de estas nuevas simbiosis siguen siendo en gran parte desconocidas (Belesky y Bacon, 2009). En Argentina, es posible disponer de semilla de los cultivares Taita, Malma y Royal Q200 infectados con endófito seguro AR584 a través de la empresa Gentos S.A.

La ganadería en Argentina, y particularmente en la Región Pampeana, ha sido desplazada hacia suelos con restricciones, donde se alternan los salinos con los alcalinos, y la cubierta vegetal es escasa y las especies tienen baja producción y calidad de forraje (Roitman y Preliasco, 2018). Además, el pastoreo continuo provoca alteraciones en las características físicas y químicas de los suelos, como, por ejemplo, disminuye el contenido hídrico y aumenta la densidad aparente y conductividad eléctrica a través del ascenso de sales en superficie (Rodríguez y Jacobo, 2012). La salinidad afecta 320.000 km² de suelo, que en la provincia de Buenos Aires representa el 24 % de su superficie agrícola (Maddaloni, 1986). El cloruro de sodio (NaCl) es la sal más importante que causa salinidad en los suelos, pero cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de magnesio, calcio y potasio, son otras posibles fuentes que ocasionan este problema (Bahizire, 2007). Para determinar el grado de salinidad de un suelo, se lleva a cabo la medición de la conductividad eléctrica (CE) del horizonte superficial. Se consideran salinos a los suelos que poseen una CE superior a 4 dS m⁻¹ (Tal, 1985) y dicho valor supera a los registrados en los suelos en los que festuca crece (Roitman y Preliasco, 2018). Sin embargo, los suelos se están salinizando cada vez más y las evidencias del cambio climático son también cada vez más convincentes (IPCC, 2023). Las tendencias actuales del mismo pronostican un aumento en la severidad y frecuencia de fenómenos climáticos y condiciones ambientales adversas como la sequía, la concentración de sales en el suelo y en el agua, temperaturas extremas, entre otras (Taleisnik *et al.*, 2021; IPCC, 2023). En este contexto, se hace necesario conducir el mejoramiento genético de plantas hacia la obtención de cultivares tolerantes a estos estreses.

El estrés salino tiene tres componentes principales: a) estrés hídrico causado por efecto osmótico; b) toxicidad iónica; y c) desbalance en la nutrición normal de la planta (Munns y Tester, 2008; Munns y Gilliam, 2015; Flowers *et al.*, 2015; Sandhu *et al.*, 2017). La acumulación de sales en el citoplasma interfiere con el metabolismo inactivando enzimas e inhibiendo la síntesis de proteínas, a su vez, la permeabilidad de la membrana se ve

afectada (Muns y Termatt, 1986). En la pared celular una excesiva concentración iónica puede causar pérdida de agua desde la célula y, por lo tanto, de la turgencia (Muns y Termatt, 1986). La tasa de fotosíntesis se reduce cuando existe una alta concentración de Na^+ y Cl^- en la hoja, especialmente cuando se altera la relación iónica en el cloroplasto (Seeman y Critchley, 1985). La elevada presión osmótica que se genera en la solución alrededor de las raíces reduce la capacidad de las plantas para absorber agua, causando una marcada disminución en la tasa de crecimiento (Shannon, 1997; Munns y Tester, 2008), y alteraciones en el desarrollo vegetal (Grieve *et al.*, 1994). Los efectos osmóticos se observan inmediatamente durante la exposición a la salinidad (Zeng *et al.*, 2001), ya que se produce pérdida de agua en las hojas, reduciendo el volumen y la turgencia celular. Este efecto es transitorio, y, si bien las células pueden recuperar su volumen original en poco tiempo, la tasa de elongación foliar disminuye (Passioura y Munns, 2000; Fricke y Peters, 2002). También, la presencia de sales disminuye el potencial osmótico del suelo, limitando el ingreso de agua hacia la semilla durante la germinación (Ashraf y Harris, 2004; Cardamone *et al.*, 2018). Así, al disminuir el potencial osmótico del medio, se reduce la absorción de agua por parte de la semilla y se generan condiciones que favorecen la entrada de iones tóxicos, lo que afecta al embrión y al desarrollo de las plántulas (Yokoi *et al.*, 2002; Bahizire, 2007). En general, se acepta que la germinación, el establecimiento y el rebrote en las especies forrajeras son las etapas de desarrollo más afectadas por la salinidad (Francois y Maas, 1993; Marcum, 2002).

La tolerancia a las sales es un carácter poligénico, heredable, que involucra respuestas al estrés iónico y osmótico a nivel celular (Yeo *et al.*, 1991) y es la capacidad de las plantas de crecer y completar su ciclo de vida en un ambiente que contiene elevados niveles de sales solubles (Parida y Das, 2005). Una tolerancia diferencial a la salinidad puede redundar en ventajas competitivas (Grime, 1979). La tolerancia a la salinidad (TS) de cada especie dependerá de las condiciones ambientales y de la habilidad que posea para controlar la absorción y el transporte de Na^+ al tejido fotosintético (Lastiri Hernández *et al.*, 2017), principalmente durante la fase de germinación, donde se producen cambios y adaptaciones que pueden afectar no sólo al proceso germinativo en sí, sino también al crecimiento y desarrollo futuro de las plantas (Ruiz y Terenti, 2012).

Estudios realizados en *Festuca rubra* mostraron que el aumento de la concentración salina de los suelos provocó una disminución en parámetros de crecimiento (e.g., producción de biomasa área y subterránea, contenido en agua de hojas), y que dicha disminución fue mayor en plantas infectadas con endófito tipo silvestre que en plantas libres

de endófito (Vázquez de Aldana *et al.*, 2011). Estos resultados son contradictorios con otras investigaciones que han demostrado que el endófito le confiere a la planta tolerancia a condiciones de estrés (Omacini *et al.*, 2013). Recientemente Thomas *et al.* (2022) hallaron que en altas concentraciones salinas (*i.e.*, 200 mM de NaCl), la presencia del endófito silvestre en semillas de festuca alta de una población naturalizada aumentaría la energía germinativa. Esto sugiere que, en suelos con alta salinidad, los genotipos infectados con endófito silvestre tendrían mejor comportamiento en la germinación que los cultivares comerciales y genotipos silvestres y sin endófitos.

Dado que son escasos los trabajos que evalúan los efectos de la presencia de hongos endófitos asexuales del género *Epichloë* sobre la tolerancia a la salinidad en gramíneas templadas (Vázquez de Aldana *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2017; Soto *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2022; Goya *et al.*, 2023), y que existen en el mercado cultivares de festuca alta infectados con endófito seguro AR584, este trabajo apunta a brindar información sobre la variabilidad en la tolerancia de semillas de estos cultivares a condiciones de salinidad durante la germinación, en relación a poblaciones naturalizadas de festuca alta con endófito silvestre. Estos resultados adquieren particular importancia considerando que las predicciones de cambio climático global indican una tendencia creciente en la frecuencia de exposición de las plantas a condiciones de estrés salino (Taleisnik *et al.*, 2021; IPCC, 2023).

1.2. Hipótesis (H)

- H1)** Semillas de festuca alta infectadas con el hongo endófito *Epichloë coenophiala* (silvestre o seguro AR584) germinadas en medio salino presentan menor: i) energía germinativa, ii) poder germinativo, y iii) longitud del coleóptilo y la radícula de plántulas, en comparación con aquéllas germinadas en medio no salino.
- H2)** En condiciones de salinidad, la asociación de festuca alta con el hongo endófito silvestre, aumenta: i) la energía germinativa, ii) el poder germinativo, y iii) la longitud del coleóptilo y de la radícula de plántulas, en relación a aquéllas con endófito seguro AR584.

1.3. Objetivos

Objetivo General

Comparar la tolerancia a la salinidad a NaCl de semillas de distintos materiales genéticos de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) infectados con el hongo endófito *Epichloë coenophiala*, en variables asociadas a la germinación.

Objetivo Específico

Determinar los efectos que distintas concentraciones salinas producen sobre la energía germinativa, el poder germinativo, la longitud del coleóptilo y de la radícula de plántulas de distintos materiales genéticos de festuca alta infectados con el hongo endófito *Epichloë coenophiala*,

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Obtención del material experimental

Se trabajó con semillas de cuatro materiales genéticos de festuca alta: dos poblaciones naturalizadas infectadas con endófito *E. coenophiala* silvestre [una cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita (PMCE+) y otra, en una pastura naturalizada de más de 10 años de implantación en el Partido de General Guido (PGGE+)] y dos cultivares infectados el endófito *E. coenophiala* seguro AR584 (Grasslanz Technology Limited, Palmerston North, Nueva Zelanda) provistos por GENTOS S.A. [cv. Malma (ME+) y cv. Taita (TE+)].

2.2. Determinaciones previas

2.2.1. Poder germinativo de las semillas

Se determinó el poder germinativo de las semillas de festuca alta de los distintos cultivares, según las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2020). Para ello, se sembraron 100 semillas (dos bandejas de 50 semillas cada una, Figura 1A) sobre papel de filtro humedecido con agua destilada. Una vez sembradas las semillas, las bandejas plásticas se sometieron a un pretratamiento de frío (en heladera a 5 °C por 48 h). Posteriormente, fueron cubiertas cada una con una bolsa de polietileno transparente, para conservar la humedad y permitir el paso de la luz, y se ubicaron en una cámara de germinación a 20 °C con un fotoperíodo de 8 h (Figura 1B). Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula tuvo una longitud mayor a 2 mm. A los 14 días se efectuó el recuento final de semillas y plántulas de acuerdo con la clasificación propuesta por ISTA (2020): plántulas normales, plántulas anormales, semillas frescas no germinadas y semillas muertas (Figura 1C-D). Los protocolos del ISTA definen como *plántulas normales* aquellas que muestran potencial para un desarrollo continuo cuando crecen en suelo de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz. Son plántulas enteras o plántulas ligeramente defectuosas, en las cuales las partes esenciales están bien desarrolladas, completas, proporcionadas las unas con las otras y sanas. Las *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 poder germinativo (PG%) se calculó como el porcentaje de plántulas normales desarrolladas con respecto al total de semillas sembradas. De esta manera, se comprobó que el PG de las semillas de los distintos cultivares, era similar y oscilaba entre 90–94 % (Tabla 1).

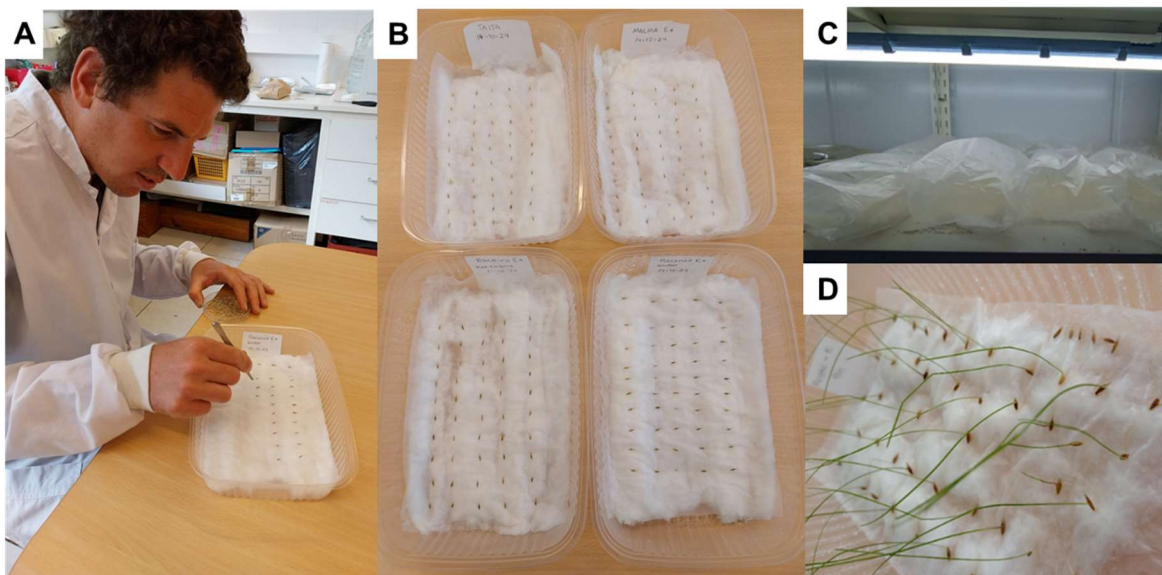


Figura 1. Siembra de semillas de festuca alta en bandejas plásticas para la determinación del poder germinativo (A-B). Bandejas plásticas cubiertas con bolsas de polietileno transparente en cámara de germinación (C). Bandejas al momento de realizar el recuento de semillas germinadas y la clasificación de plántulas (D).

2.2.2. Diagnóstico de la presencia del hongo endófito en semillas

Se corroboró la condición endofítica de las semillas de festuca alta mediante el análisis microscópico de las mismas (Figura 2A). Para ello, se realizó un pretratamiento que consistió en sumergir las semillas en hidróxido de sodio (NaOH) al 5 % a temperatura ambiente por 12 h. Al cabo de este 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 colorante rosa de bengala durante 2-3 minutos. Posteriormente, se observó al microscopio óptico Olympus CHK (400x) la presencia de hifas del hongo endófito (Figura 2B) entre las células aleuroníferas del endosperma (Saha *et al.*, 1988).

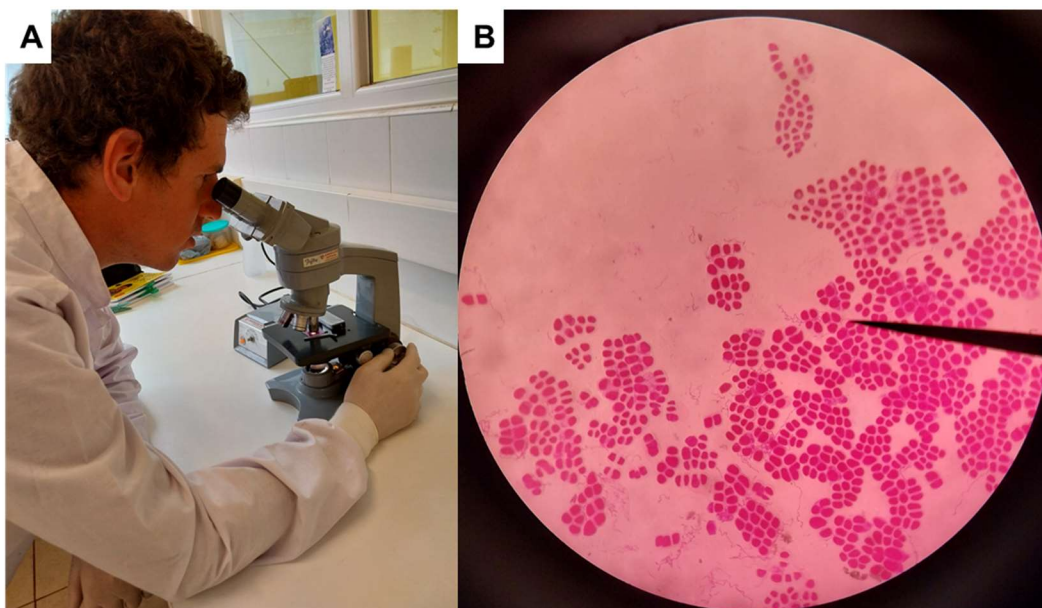


Figura 2. Observación microscópica del endófito en semillas de festuca alta (A). Detalle de las hifas del hongo endófito entre las células de aleurona en una semilla de festuca alta. Aumento 400x (B).

2.2.3. Peso de mil semillas

Se determinó el peso de 1000 semillas de los cuatro materiales genéticos de festuca utilizados. Para ello, a partir de seis submuestras de 100 semillas, se estimó el peso promedio de esas 100 semillas y, con este dato, se calculó el peso de mil semillas por planta (Figura 3). Así, los pesos de 1000 semillas oscilaron entre 1,63 g y 2,03 g (Tabla 1).

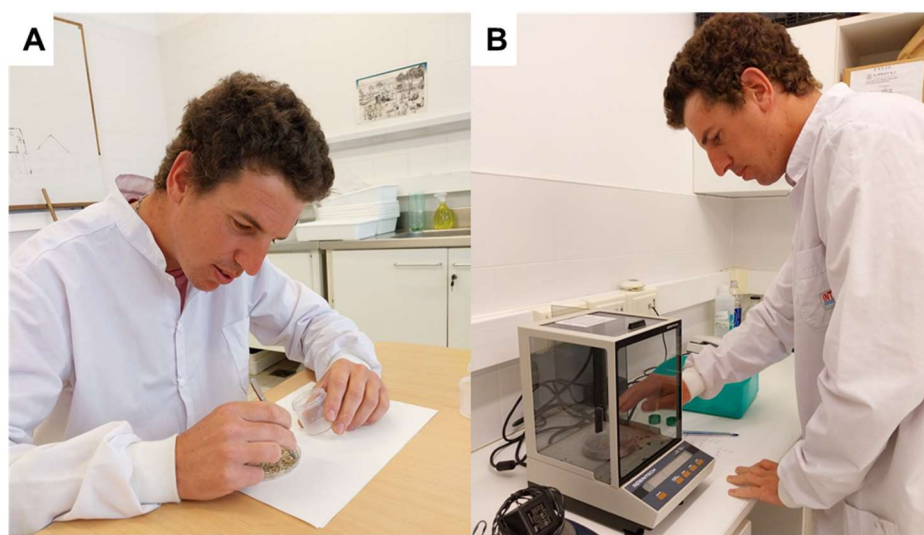


Figura 3. Conteo de 100 semillas de festuca alta de los cuatro materiales genéticos utilizados (A) y peso de semillas en balanza analítica (B).

Tabla 1. Poder germinativo (% , media $\pm$ EE) y peso de mil semillas (g) de los cuatro materiales genéticos utilizados en el experimento. PMCE+: población naturalizada de festuca alta infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada de festuca alta infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584. Letras iguales, indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha=0,05$).

Material de festuca alta	Poder germinativo (%)	Peso de 1000 semillas (g)
PMCE+	90,00 $\pm$ 2,50 a	1,635 $\pm$ 0,057 b
PGGE+	92,00 $\pm$ 3,00 a	1,889 $\pm$ 0,289 a
TE+	92,00 $\pm$ 1,50 a	2,032 $\pm$ 0,086 a
ME+	94,00 $\pm$ 2,75 a	1,851 $\pm$ 0,037 a

2.3. Diseño y conducción del experimento

Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones en el tiempo (tandas), con un arreglo factorial. Los factores experimentales fueron: i) materiales genéticos de festuca alta, con cuatro niveles: dos poblaciones naturalizadas infectadas con endófito *E. coenophiala* silvestre y dos cultivares infectados el endófito *E. coenophiala* seguro AR584, y iii) condición salina, con cinco niveles: 0 (control), 40, 80, 120 y 200 mM de NaCl. En cada tanda, se sembraron 50 semillas de cada uno de los cultivares, en rollos de papel (Maguire, 1962), embebidos en agua o solución salina (25 ml aplicados con rociador, Figura 4A-B). Una vez formados los rollos, se trasladaron a una cámara de germinación donde permanecieron 14 días a 20 °C con un fotoperiodo de 8 h para que germinen (Figura 4C).



Figura 4. Siembra de semillas de festuca alta en rollos de papel embebidos con agua o solución salina (A-B). Rollos sembrados en recipientes ubicados en cámara de germinación.

2.4. Variables registradas

- *Energía germinativa* (EG): a los 7 días se abrieron los rollos y se contaron las semillas germinadas (ISTA, 2020). Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula tenía una longitud igual o mayor a 2 mm. Esta variable, da idea del vigor de la semilla.

- *Poder germinativo* (PG): a los 14 días se abrieron los rollos y se contaron las semillas germinadas. En este recuento, las semillas y plántulas se clasificaron en plántulas normales, plántulas anormales, semillas frescas no germinadas y semillas muertas (ISTA, 2020; Figura 5). El poder germinativo se determinó como el porcentaje (%PG) de plántulas normales desarrolladas con respecto al total de semillas sembradas (50).

- *Longitud de radícula y coleoptilo*: el mismo día del recuento del PG, se midió, con una regla milimetrada, la longitud de la radícula (LR) y del coleoptilo (LC) de una de una muestra aleatoria de 10 plántulas normales (Figura 5).

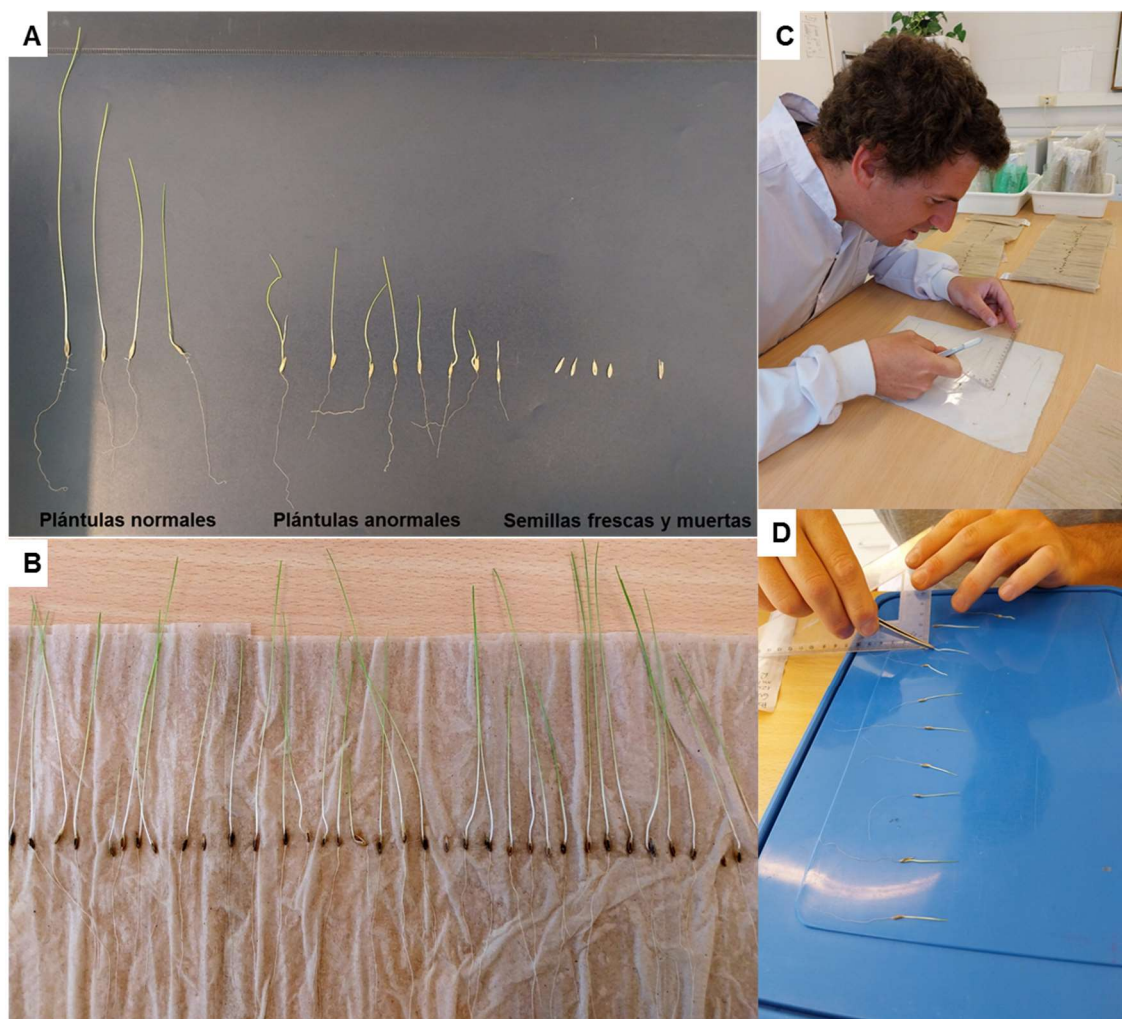


Figura 5. Clasificación de semillas y plántulas según normas ISTA (A). Detalle de plántulas de festuca alta al final del experimento para realizar la medición de longitud de radícula y coleóptilo (B-C-D).

2.5. 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. Efecto de los materiales genéticos de festuca alta, la condición salina e interacción

3.1.1. Energía germinativa (%EG)

Se halló interacción entre los materiales genéticos de festuca alta y la condición salina para %EG ($p = 0,015$). Por esta razón, se analizó por separado que ocurrió para cada material genético de festuca alta, en cada condición salina (Figura 7). En los tratamientos salinos 0 mM y 40 mM no se registraron diferencias entre los materiales genéticos (Figura 6), mientras que, en el tratamiento 80 mM, la PMCE+ y el cv. ME+ presentaron los mayores %EG que el resto de los materiales (Figura 6). En los tratamientos 120 mM y 200 mM, se registró una superioridad del cv. ME+ para esta variable, respecto del resto de los materiales de festuca alta (Figura 6). PMCE+ fue el material más afectado por el tratamiento salino 200 mM NaCl (Figura 6).

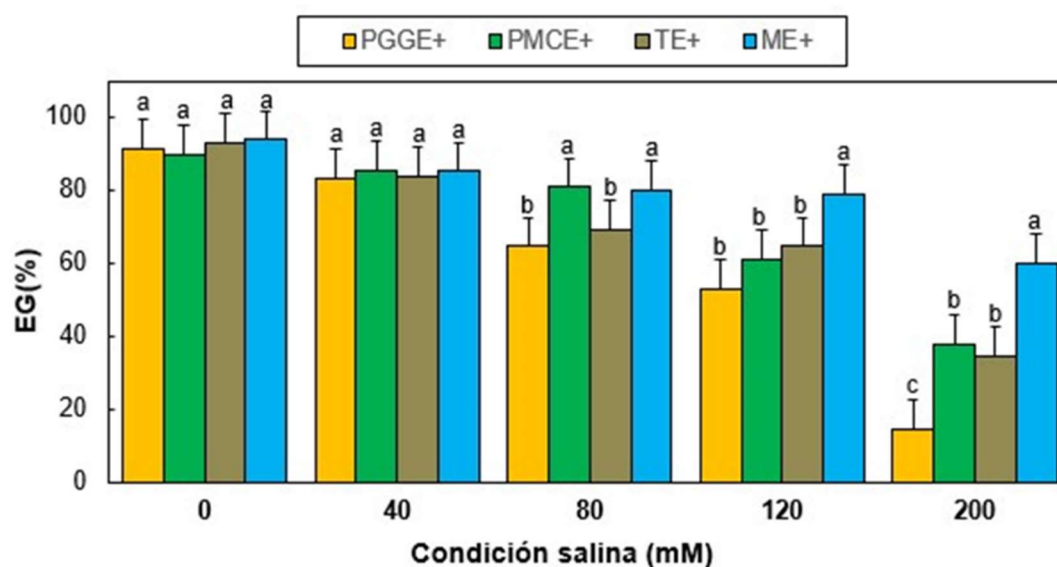


Figura 6. Energía germinativa (EG%, media $\pm$ EE) de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).

3.1.2. Poder germinativo (%PG)

Se halló interacción entre los materiales genéticos de festuca alta y la condición salina para %PG ($p = 0,015$). Por esta razón, se analizó por separado que ocurrió para cada

material genético de festuca alta, en cada condición salina (Figura 7). Al igual que la variable anterior, en los tratamientos salinos 0 mM y 40 mM no se registraron diferencias entre los materiales genéticos (Figura 7), mientras que, en el tratamiento 80 mM, la PMCE+ y el cv. ME+ presentaron los mayores %PG que el resto de los materiales (Figura 7). En los tratamientos 120 mM y 200 mM, se registró una superioridad del cv. ME+ para esta variable, respecto del resto de los materiales de festuca alta (Figura 7). PMCE+ fue el material más afectado por el tratamiento salino 200 mM NaCl (Figura 7).

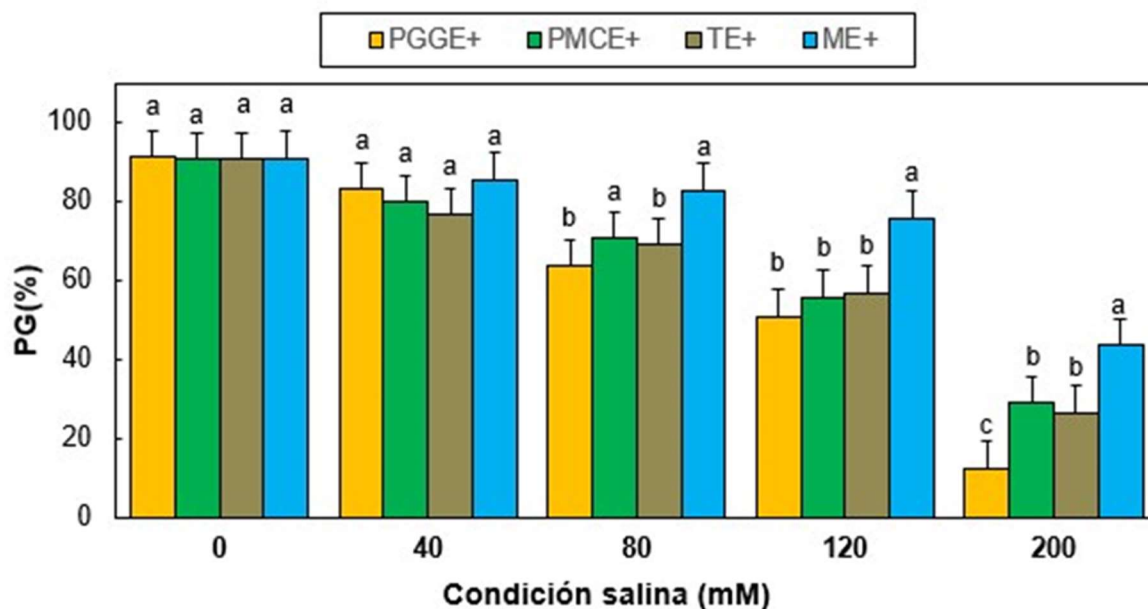


Figura 7. Poder germinativo (PG%, media $\pm$ EE) de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).

3.1.3. Longitud de coleóptilo (LC)

Se halló interacción entre los materiales genéticos de festuca alta y la condición salina para la LC ($p < 0,0001$). Por esta razón, se analizó por separado que ocurrió para cada material genético de festuca alta, en cada condición salina (Figura 8). En los tratamientos salinos 0 mM y 40 mM no se registraron diferencias entre los materiales genéticos (Figura 8), mientras que, en los tratamientos 80 mM, 120 mM y 200 mM NaCl, se observó que la PGGE+ fue el material más afectado por la salinidad (Figura 8).

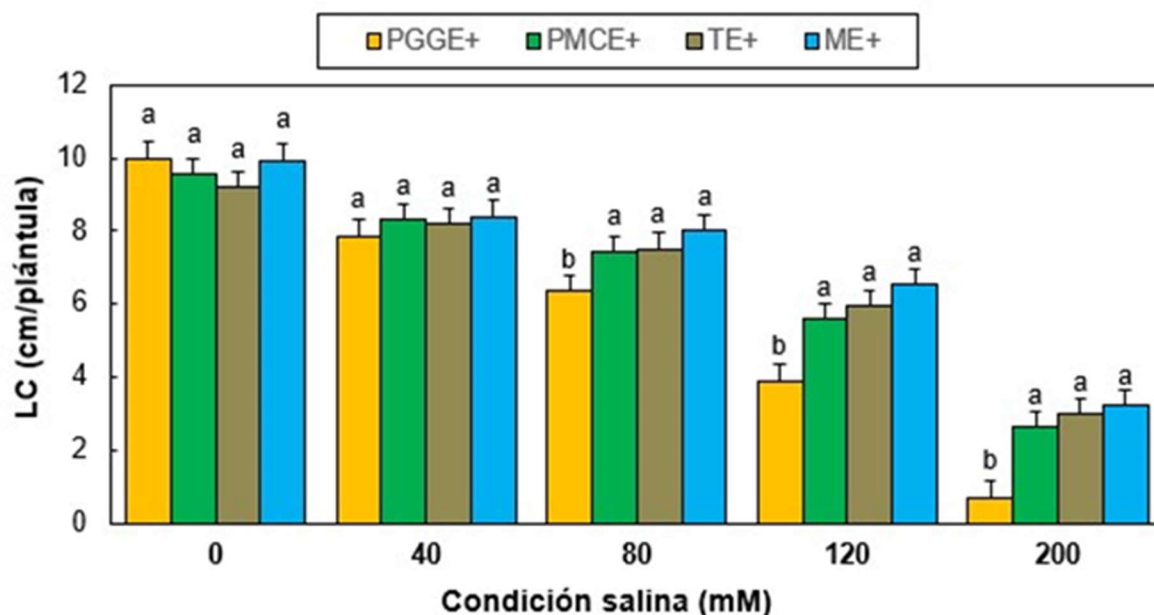


Figura 8. Longitud de coleóptilo (LC, media $\pm$ EE) de plántulas originadas de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).

3.1.4. Longitud de radícula (LR)

Se halló interacción entre los materiales genéticos de festuca alta y la condición salina para la LC ($p < 0,0001$). Por esta razón, se analizó por separado que ocurrió para cada material genético de festuca alta, en cada condición salina (Figura 9). En general, en los tratamientos salinos 0 mM, 40 mM y 80 mM se observó una superioridad de la PGGE+ para la LR respecto al resto de los materiales (Figura 9). Sin embargo, en 200 mM, este material fue el más afectado por el tratamiento salino. En el tratamiento 120 mM, no se registraron diferencias entre los materiales genéticos para LR (Figura 9).

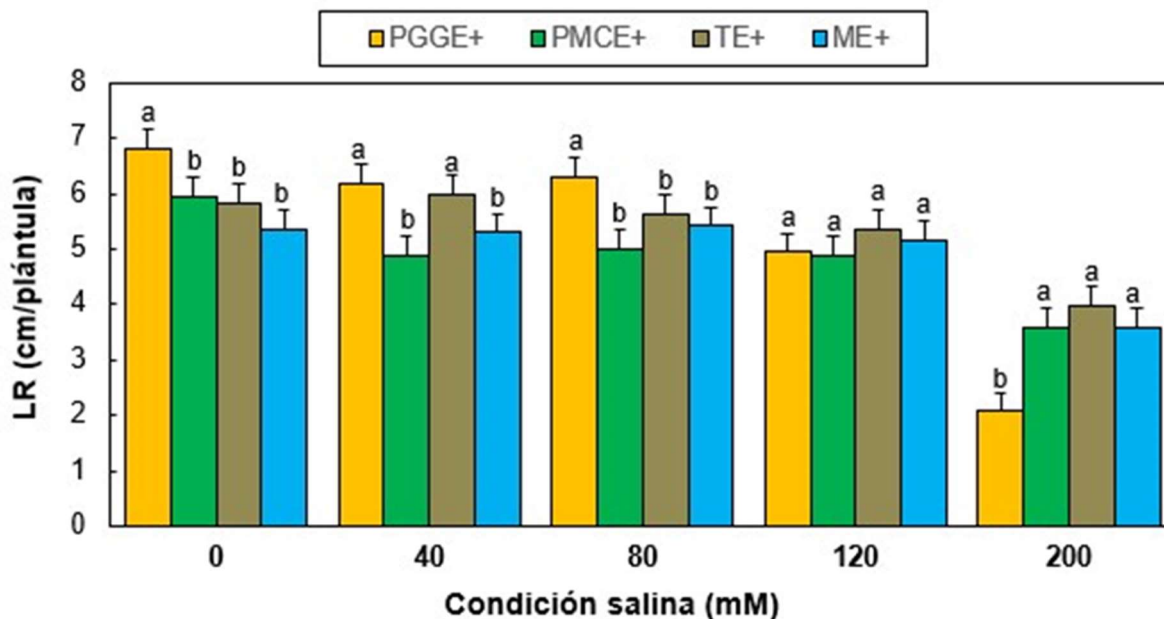


Figura 9. Longitud de radícula (LR, media $\pm$ EE) de plántulas originadas de semillas de cuatro materiales de festuca alta (PMCE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en un pastizal del Partido de Mar Chiquita. PGGE+: población naturalizada infectada con endófito silvestre cosechada en una pastura en el Partido de General Guido. TE+: cv. Taita infectado con endófito seguro AR584. ME+: cv. Malma infectado con endófito seguro AR584) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$).

3.2. Efecto de tipo de endófito, la condición salina e interacción

Al comparar el efecto del tipo de endófito (*i.e.*, endófito silvestre vs el endófito seguro) y de la condición salina, se halló interacción significativa entre estos factores para las cuatro variables respuesta evaluadas: %EG ($p = 0,034$), %PG ($p = 0,027$), longitud de radícula (LR, $p < 0,0001$) y longitud de coleóptilo (LC, $p = 0,0003$). En este sentido se observó que para las variables %EG, %PG y LR, no hubo diferencias entre ambos tipos de endófitos en los tratamientos 0, 40 y 80 mM (Tabla 2). Sin embargo, en la condición 120 y 200 mM, la presencia del endófito seguro aumentó la EG, PG y LR, al compararlo con el endófito silvestre (Tabla 2). En el caso de la LC, también se observó un aumento de esta variable en presencia del endófito seguro en las condiciones 80, 120 y 200 mM NaCl, al compararlo con el endófito silvestre (Tabla 2). No se observó diferencias entre ambos tipos de endófitos para esta variable en los tratamientos 0 y 40 mM (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedios ($\pm$ EE) de la energía germinativa (%EG), poder germinativo (%PG), longitud de radícula (LR) y longitud de coleóptilo (LC) de plántulas originadas de semillas de festuca alta infectadas con endófito seguro AR584 (promedio de los valores obtenidos en los cvs. Taita y Malma) e infectadas con endófito silvestre (promedio de los valores obtenidos para la población cosechada en Mar Chiquita y en General Guido) sometidas a cinco tratamientos salinos (0, 40, 80, 120, 200 mM NaCl). Letras iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS ($\alpha = 0,05$) entre tipos de endófitos en cada condición salina.

Condición salina (mM NaCl)	Tipo de endófito	%EG	%PG	Long. radícula (cm)	Long. coleóptilo (cm)
0	Seguro	83,7 a	80,7 a	6,5 a	9,6 a
	Silvestre	93,0 a	91,0 a	6,4 a	9,8 a
40	Seguro	87,7 a	83,7 a	5,6 a	8,5 a
	Silvestre	84,3 a	81,7 a	5,5 a	8,1 a
80	Seguro	79,7 a	78,7 a	5,5 a	8,0 a
	Silvestre	73,1 a	68,0 a	5,7 a	6,9 b
120	Seguro	73,0 a	67,0 a	5,4 a	6,3 a
	Silvestre	57,3 b	53,7 b	4,9 b	4,8 b
200	Seguro	51,0 a	38,7 a	3,8 a	3,1 a
	Silvestre	26,3 b	21,0 b	2,8 b	1,7 b
EE		5,5	4,5	0,2	0,3

4. DISCUSIÓN

Las gramíneas muestran un amplio rango de tolerancia a la salinidad, que incluye desde especies altamente sensibles hasta muy tolerantes. Las especies sensibles y las medianamente tolerantes, generalmente muestran una caída de los rendimientos a medida que se incrementan los niveles de salinidad, a diferencia de las especies muy tolerantes que muestran una estimulación del crecimiento del tallo y la raíz a concentraciones medias de salinidad (Marcum, 2006). Según Kusvuran *et al.* (2014), la tasa de germinación, la longitud y peso fresco del pseudotallo y de la raíz de plántulas de festuca alta de nueve cultivares, disminuyeron al aumentar la concentración de sal y la tolerancia varió según el cultivar evaluado. En general, estos autores registraron disminuciones considerables con tratamientos de 100 mM de NaCl y los valores más bajos se obtuvieron con la concentración 200 mM.

Bajo nuestras condiciones experimentales, se observó un efecto detrimental de la condición salina 200 mM de NaCl sobre las cuatro variables respuestas evaluadas (Figuras 6 a 9). PMCE+ fue el material más afectado por el tratamiento salino 200 mM NaCl para el %EG (Figura 6) y el %PG (Figura 7). En lo que respecta a LR y LC, PGGE+ fue el material más afectado en 200 mM NaCl. Según Wang *et al.* (2020), los efectos del hongo endófito *Epichloë bromicola* sobre la germinación de semillas de *Hordeum brevisubulatum* en condiciones de estrés salino, estarían determinados por la concentración de NaCl. Según estos autores cuando las semillas fueron expuestas a 100 mM de NaCl, no se registraron efectos significativos sobre la tasa de germinación y longitud de radícula y de coleóptilo. Sin embargo, a concentraciones salinas más elevadas (*i.e.*, 200 y 300 mM de NaCl), la presencia del endófito aumentó significativamente la tasa de germinación y la longitud de la radícula y del coleóptilo. Por otro lado, Song *et al.* (2015) analizando también los efectos del endófito *E. bromicola* sobre el crecimiento y la germinación de semillas de *H. brevisubulatum* bajo estrés salino, observaron que la germinación de las semillas de plantas infectadas fue significativamente mayor que las de plantas libres de endófito en soluciones 200 y 300 mM de NaCl. Soto *et al.* (2021) al comparar la tolerancia a la salinidad durante la germinación de materiales de festuca alta libres e infectados con endófito silvestre en concentraciones salinas de 40 y 80 mM de NaCl, hallaron que los materiales de festuca alta no diferían en la tolerancia a la salinidad, dado que presentaron valores similares de %EG, LC, LR y peso fresco de plántulas; y que, aunque la población infectada con endófito silvestre presentó el mayor %PG, no difirió de la misma población libre de endófito. La

existencia de resultados contradictorios podría indicar que, por un lado, el efecto del endófito en la tolerancia de la planta a la salinidad es genotipo-dependiente, es decir, que sólo en determinadas combinaciones endófitos-gramíneas se observaría una respuesta de tipo mutualista, por lo que no se podría generalizar para todas las asociaciones y, por otro lado, que la respuesta es contexto-dependiente (Thomas *et al.*, 2022).

Por otro lado, se ha demostrado que en gramíneas infectadas con hongo endófito *Epichloë*, el efecto tóxico del Na^+ puede ser contrarrestado a través del aumento de la concentración de K^+ y de la relación $\text{K}^+:\text{Na}^+$ en las plantas (Reza Sabzalian y Mirlohi, 2010). Además, la tolerancia a la salinidad en las plantas infectadas podría deberse a que el endófito, bajo condiciones de estrés, puede reducir la acumulación de osmolitos que limitan el crecimiento (Munns y Tester 2008) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 2002). Esto resulta importante dado que se ha demostrado que el estrés salino afecta las relaciones planta-agua y esto podría desencadenar una mayor producción de osmolitos (Bohnert *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2003) y provocar el marchitamiento, la desecación y la muerte de las plantas (Rodríguez *et al.* 2002). De todas maneras, los mecanismos involucrados en el aumento de la tolerancia al estrés ambiental por parte del endófito son complejos y dependen de la genética del hospedante y del endófito, así como de las condiciones ambientales y sus interacciones (Davitt *et al.*, 2010).

Por otro lado, en este experimento, al analizar el efecto del tipo de endófito, se observó que en altas concentraciones salinas (120 y 200 mM NaCl), la presencia del endófito seguro AR584 aumentó %EG, %PG, LR y LC, al compararlo con el endófito silvestre (Tabla 1). Así, en los tratamientos 120 mM y 200 mM, se registró una superioridad del cv. ME+ para %EG y %PG, respecto del resto de los materiales de festuca alta. Esta superioridad hallada bajo en condiciones de salinidad es interesante, ya que, si bien en un periodo determinado todas las semillas pueden germinar, un alto valor de EG (relativo al vigor de la semilla) indicaría que una mayor cantidad de ellas germinan más rápido y esto, reduce la posibilidad de que los potenciales ataques de hongos, insectos y demás integrantes de la microflora y fauna del suelo interfieran en el proceso de germinación (Maguire, 1962).

Comentarios finales

Bajo nuestras condiciones experimentales, los resultados indicarían la existencia de una gran variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre los materiales de festuca alta evaluados y que, de acuerdo al tipo de endófito presente en las semillas, silvestre o seguro,

podría observarse un costo adicional en el genotipo del hospedante, al menos, en la etapa de desarrollo de la germinación, o bien, un beneficio de la simbiosis (Goya *et al.*, 2023). Por otro lado, considerando que las predicciones de cambio climático global indican una tendencia creciente en la frecuencia de exposición de las plantas a condiciones de estrés salino (Lúquez, 2021; IPCC, 2023), y que el medio en el que las semillas germinan puede afectar el porcentaje de germinación debido a la acumulación de iones (Harivandi *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 2011; Serena *et al.*, 2012), futuros experimentos deberían realizarse a campo para evaluar un mayor número de materiales de festuca alta para determinar los efectos del genotipo como así también, deberían llevarse a cabo en estados más avanzados de desarrollo de las plantas que incluyan la etapa reproductiva (producción y cosecha de semillas).

5. CONCLUSIONES

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

- No se rechaza **H1** “Semillas de festuca alta infectadas con el hongo endófito *Epichloë coenophiala* (silvestre o seguro AR584) germinadas en medio salino presentan menor: i) energía germinativa, ii) poder germinativo, y iii) longitud del coleóptilo y la radícula de plántulas, en comparación con aquéllas germinadas en medio no salino”.

Esto se fundamenta en que, las semillas de festuca alta infectadas con hongo endófito germinadas en medio salino presentaron menor %EG, %PG, LC y LR de plántulas, en comparación con aquéllas germinadas en medio no salino. Este efecto fue muy marcado en la concentración 200 mM de NaCl.

- Se rechaza **H2** “En condiciones de salinidad, la asociación de festuca alta con el hongo endófito silvestre, aumenta: i) la energía germinativa, ii) el poder germinativo, y iii) la longitud del coleóptilo y de la radícula de plántulas, en relación a aquéllas con endófito seguro AR584”.

Esto se fundamenta en que, en condiciones de salinidad, la presencia del endófito silvestre disminuyó las variables respuesta evaluadas, respecto a aquéllas con endófito seguro AR584.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ashraf, M.; Harris P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16.
- 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.
- Bahizire, F.B. 2007. Effect of salinity on germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.). Thesis for the degree of Master of Agricultural Sciences, University of Stellenbosch, Sudáfrica. 73 p.
- Belesky, D. P.; Bacon, C. W. 2009. Tall fescue and associated mutualistic toxic fungal endophytes in agroecosystems. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 102-117.
- Bohnert, H.J.; Nelson, D.E.; Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* 7(7): 1099.
- Bouton, J. 2002. Tall Fescue Toxicity Leads to the Development of 'Max Q'. [en línea] <<http://www.noble.org/ag/research/Articles/TallFescueToxicity/Index.htm>> [consulta: 20 enero 2011].
- Campero, C. M. 1996. Efectos de la festuca tóxica sobre el desempeño reproductivo y producción en bovinos. Una revisión. *Therios.* 25:306-316.
- Caradus, J.R.; Johnson, L.J. 2020. *Epichloë* fungal endophytes – from a biological curiosity in wild grasses to an essential component of resilient high performing ryegrass and fescue pastures. *J. Fungi* 6(4): 322
- Cardamone, L.; Cuatrín, A.; Grunberg, K.; Tomás, M.A. 2018. Variability for salt tolerance in a collection of *Panicum coloratum* var. makarikariense during early growth stages. *Trop. Grassl.* 6 (3):134–147.
- Cheplick, G.P.; Clay, K. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 3 (52): 309-318.
- Clay, K.; Holah, J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285: 1742–1744.
- Clay, K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am. Nat.* 160: 99-127.
- Davitt, A.J.; Stansberry, M.; Rudgers, J.A. 2010. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist* 188(3): 824-834.
- 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.

- Dell' Agostino, E. 2008. Producción de semilla de especies forrajeras de clima templado. INTA: Buenos Aires, Argentina. 82 p.
- Do Valle Ribeiro, M. A. M. 1993. Transmission and survival of *Acremonium* and the implications for grass breeding. *Agr. Ecosyst. Environ.* 44:195–213.
- Fletcher, L.R; Harvey, I.C. 1981. An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *N. Z. Vet. J.* 29:185-186.
- Flowers, T. J.; Munns, R.; Colmer, T.D. 2015. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann. Bot.* 115: 419–431.
- Francois, L. E.; Maas, E.V. 1993. Crops Response and management on salt affected soils. In: M. Pessarakli (ed.). *Plant and Crops Stress*. Univ. Of Arizona. Tucson, Arizona. pp. 149-181.
- 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].
- Fricke, W.; Peters, W.S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol.* 129 (1): 374-388.
- 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.
- Grieve, C.M.; Francois, L.; Maas, E.V. 1994. Salinity affects the timing of phasic development in spring wheat. *Crop Sci.* 34: 1544- 1549.
- Goya, M.V.; Petigrosso, L.R.; Eyherabide, G.; Miri, S.; Castaño, J.A.; Lúquez, J. 2023. Tall fescue cultivars response to salinity as influenced by inoculation with non-livestock-toxic endophyte AR584. 11th International Herbage Seed Group Conference (IHSG). 11-18 de Junio de 2023. Loire Valley, France. pp. 177-178.
- Grime, J.P. 1979. *Plant strategies and vegetation process*. Chichester, New York. pp. 50-74.
- 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.
- Harivandi, M.A.; Butler, J.D.; Soltanpour, P.M. 1982. Salt influence on germination and seedling survival of six cool season turfgrass species. *Comm Soil Sci Plant Analysis* 13:519-529.
- Hoveland, C. S. 1993. Economic importance of *Acremonium* endophytes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 44: 3-12.

- Kusvuran, A.; Nazli, R.I.; Kusvuran, S. 2014. Salinity Effects on Seed Germination in Different Tall Fescue (*Festuca arundinaceae* Schreb.) Varieties. *Tarim Bilimleri Araştırma Dergisi* 7 (2): 8-12.
- IPCC. 2023. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34.
- ISTA, International Seed Testing Association. 2008. *International Rules for Seed Testing*. 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.
- Koch, E.D.; Honig, J.; Vaiciunas, J.; Meyer, W.A.; Bonos, S.A. 2017. Effect of Endophyte on Salinity Tolerance in Perennial Ryegrass. *ITSRJ.* 13: 459–465.
- Koga, H.; Christensen, M. J.; Bennett, R. J. 1993. Incompatibility of some grass/*Acremonium* endophyte associations. *Mycol. Res.* 97:1237–1244.
- Lastiri Hernández, M.A.; Álvarez Bernal, D.; Soria Martínez, L.H.; Ochoa Estrada, S.; Cruz-Cárdenaz, G. 2017. Efecto de la salinidad y la germinación y emergencia de siete especies forrajeras. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 8: 1245-1257.
- 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 temperature and Mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 203-213.
- 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.
- Lugtenberg, B.J.J.; Caradus, J.R.; Johnson, L.J. 2016. Fungal endophytes for sustainable crop production. *Microbiol. Ecol.* 92: 1-17.
- Lúquez, J. 2021. Estreses abióticos: una aproximación para mitigar sus efectos a través del mejoramiento genético en un contexto de cambio climático. XVIII Congreso Latinoamericano de la Asociación Latinoamericana de Genética (ALAG). Valdivia, Chile. Octubre, 2021. Vol. XXXII. Supl. 1: 66.
- 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. 1986. Forage production on saline and alkaline soil in the humid region of Argentina. *Reclam. Reveg. Res.* 5: 11-16.

- 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.
- Maguire, J. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177
- 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.
- Marcum, K. B. 2002. *Growth and physiological adaptations of grasses to salinity stress*. In: M. Pessaraki (ed.) *Handbook of Plant and Crop Physiology*. University of Arizona, pp. 623-626.
- Marcum, K.B. 2006. Use of saline and non-potable water in the turfgrass industry: Constraints and developments. *Agric. Water Manage.* 80:132–146.
- 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. Centro Regional Buenos Aires Sur. EEA Balcarce. 73 p.
- Milne, G.D. 2009. Management in New Zealand, Australia and South America. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). *Tall fescue for the twenty-first century*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. *Agronomy Monograph* 53. pp. 101-118.
- Munns, R.; Termatt, A. 1986. Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160.
- Munns, R.; Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681.
- Munns R.; Gilliam, M. 2015. Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytol.* 208: 668–673.
- 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.
- Neil, J.C 1941. The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. *New Zeal. J. Sci.* 23: 185-193.
- Odriozola, E.; Iraguen Pagate I.; Lloberas, M. M.; Cosentino, I; Portey R.; Oromí, J. 2002. *Festuca* tóxica. Su efecto en diferentes razas bovinas. *Rev. Vet. Arg.* 19:12-21.
- Omacini, M.; Gundel, P.; Semmartin M. G. 2013. Huellas de la simbiosis pasto-endófito en el agroecosistema. División de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 73 p.

- Passioura, J. B.; Munns, R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol.* 27 (10): 941-948.
- Petigrosso, L.R. Vignolio, O.; Gundel, P.; Monterubbianessi, M.G.; Assuero, S.G. 2023. Performance of endophyte-free and endophyte-infected young tall fescue plants under partial and total submergence. *Crop Pasture Sci.* 75(1). <https://doi.org/10.1071/CP23061>
- Porter, J.K.; Thompson J.R. 1992. Effects of fescue toxicosis on reproduction in Livestock. *J. Anim. Sci.* 70 (5): 1594-1603.
- R Core Team. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Reza Sabzalian, M.; Mirlohi, A. 2010. *Neotyphodium* endophytes trigger salt resistance in tall and meadow fescues. *J Plant Nutrition Soil Sci* 173: 952–957.
- Roberts, C.A.; West, C.P.; Spiers, D.E. 2005. *Neotyphodium* in cool-season Grasses. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 379 p.
- Rodríguez, A.; Jacobo, E. 2012. Manejo de pastizales naturales para una ganadería sustentable en la Pampa Deprimida. Buenas prácticas para una ganadería sustentable del pastizal. Fundación Vida Silvestre Argentina; Aves Argentinas. 1ª. ed. Buenos Aires. Argentina. 104 p.
- Rodríguez, A.; Grunberg, K.; Taleisnik, E. 2002. Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology* 129: 1627-1632.
- 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: 12 de marzo 2021].
- Ruiz, M.; Terenti, O. 2012. Evaluación comparativa de cuatro especies forrajeras bajo condiciones de estrés hídrico y salino durante la germinación. *Agriscientia* 29: 91-97.
- 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.
- Sandhu, D.; Cornacchione, M.V.; Ferreira, J.F.S.; Suarez, D.L. 2017. Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt response genes. *Sci. Rep.* 7: 42958. <https://doi.org/10.1038/srep42958>
- Schmidt, S.P.; Osborn, T.G. 1993. Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agric. Ecosyst. Environ.* 44(1-4): 233–262.
- Shannon, M. C. 1997. Adaptation of plant to salinity. *Adv. Agron.* 60: 75-120.

- Seemann, J. R.; Critchley, C. 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 164: 151-162.
- Serena, M.; Leinauer, B.; Sallenave, R.; Schiavon, M.; Maier, B. 2012. Media selection and seed coating influence germination of turfgrasses under salinity. *HortScience* 47(1): 116-120.
- Siegel, M.R.; Latch, G.C.M.; Johnson, M.C. 1987. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 193-315.
- Song, M. L.; Chai, Q.; Li, X. Z.; Yao, X.; Li, C.J.; Christensen, M. J.; Nan, Z. B. 2015. An asexual *Epichloë* endophyte modifies the nutrient stoichiometry of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress. *Plant Soil.* 387: 153–165.
- Soto, M.B.; Echeverría, M.M.; Lúquez, J.; San Martino, S.; Assuero, S.G.; Petigrosso, L.R. 2021. Tolerancia a la salinidad de festuca alta, naturalizada y comercial, libre e infectada con endófitos durante la germinación. *Rev. Fac. Agron. La Plata.* 121 (1):1-15.
- Stuedemann, J.A.; Hoveland, C.S. 1988. Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. *J. Prod. Agr.* 1: 39-44.
- Tal, M. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant Soil* 89: 199-226.
- Taleisnik, E.; Rodríguez, A.A.; Bustos, D.A.; Luna, D.F. 2021. Saline and alkaline soils in Latin America. In: E. Taleisnik; R.S. Lavado. Springer, Cham. pp. 381-397.
- Thomas, J.I.; Petigrosso, L.R.; Echeverría, M.M; Vignolio, O.R.; Eyherabide, G.A.; Lúquez, J.E. 2022. Germinación de semillas de festuca alta libre e infectada con endófito silvestre o seguro en condiciones de salinidad. *RAPA.* 42(1): 29-36.
- Vázquez de Aldana, B.R.; Álvarez martín, A.; García Ciudad, A.; Zabalgogezcoa, I.; García Criado, B. 2011. El hongo endofítico *Epichloë festucae* y la tolerancia al estrés salino en *Festuca rubra*. *SEEP, Toledo.* pp. 183-188.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218: 1-14.
- Wang, Z.; Li, C.; White, J. 2020. Effects of *Epichloë* endophyte infection on growth, physiological properties and seed germination of wild barley under saline conditions. *J. Agron. Crop Sci.* 206: 43-51.
- West, C.P.; Gwinn, K.D. 1993. Role of *Acromonium* in drought, pest, and disease tolerances of grasses. In: Hume, D.E; Latch, GCM.; Easton, H.S. (eds.). *Proceedings of the 2nd. International Symposium Acremonium/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.
- Yeo, A. R.; Lee, S.; Izard, L.; Boursier, P.J.; Flowers, T.J. 1991. Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bot. 42 (7): 881-889.
- Yokoi, S.; Bressab, R.A.; Mike, H.P. 2002. Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report. pp. 25-33.
- Zhang, Q.; Wang, S.; Rue, K. 2011. Salinity tolerance of 12 turfgrass in three germination media. HortScience 46: 651-654.
- Zeng, L.; Shannon, M.C.; Lesch, S.M. 2001. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. Agric. Water Manag. 48:191-206.