RAPA Revista Argentina de Producción Animal

ELIMINACIÓN DEL HONGO ENDÓFITO *Epichloë coenophiala* EN PLANTAS DE FESTUCA ALTA MEDIANTE FUNGICIDAS

Elimination of the endophytic fungus Epichloë coenophiala in tall fescue plants using fungicides

Petigrosso LR[1,2]*, Girado Smart C[2], Olarra I[2], Braco M[3], Ezcurdia P[3], Lemme J[4], Parisi F[4], Poo J[5]

[1]Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina
[2]Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, CABA
[3]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Cuenca del Salado, AER Ayacucho, Argentina
[4]Actividad privada
[5]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, Argentina.
*E-mail de contacto: lpetigrosso@mdp.edu.ar; lucaspetigrosso@uca.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar i) la eficacia de distintos tratamientos con una mezcla de fungicidas sobre la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en distintos genotipos de festuca alta infectadas bajo condiciones controladas, y ii) el efecto fitotóxico del fungicida sobre la calidad de las semillas cosechadas, en variables asociadas a la germinación y emergencia. Se colectaron tres plantas (genotipos) infectadas de festuca alta de una pastura naturalizada (General Guido, Bs. As.). De cada una de las plantas, se obtuvieron 28 clones (macollos con raíces) que se trasplantaron individualmente a macetas y se ubicaron en un invernáculo en condiciones controladas. Cuando cada clon tenía ≈10 macollos, se aplicaron los tratamientos con fungicida. Se utilizó una mezcla de fungicida [triazol (1,6%), metoxiacrilato (0,96%), imidazol (45%) más un coadyuvante (20%)]. Se utilizaron dos dosis, D_1 25 ml/planta y D_2 50 ml/planta. Se probaron siete tratamientos: T_1 (testigo); T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1); T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2); T_4: dos aplicaciones de D_1; T_5: dos aplicaciones de D_2; T_6: tres aplicaciones de D_1; T_7: tres aplicaciones de D_2. Los tratamientos se aplicaron con un rociador sobre la planta. Las plantas se cultivaron hasta completar el ciclo reproductivo y cosechar semillas. Los tratamientos con fungicida fueron eficaces en la eliminación del endófito tanto en las semillas cosechadas como en las plantas obtenidas. La eficacia dependió de la dosis y del número de aplicaciones. La D_2 fue siempre efectiva en frenar la transmisión del endófito en los tres genotipos, en cambio, la D_1 fue efectiva desde dos aplicaciones, aunque con menor eficacia. Todos los tratamientos con fungicida provocaron una disminución (≈20%) de la longitud de radícula y de coleóptilo de las plántulas, respecto al control; sin embargo, no afectaron la energía germinativa ni poder germinativo de las semillas cosechadas. Los resultados son alentadores, dado que, los tratamientos evaluados resultaron eficaces para frenar la transmisión del endófito y no afectarían la calidad de las semillas.

Palabras clave. pasto, hongo endófito, infección, *festucosis*, fungicida

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate i) the efficacy of different treatments with a mixture of fungicides on the elimination of the endophytic fungus *Epichloë coenophiala* in various genotypes of infected tall fescue under controlled conditions, and ii) the phytotoxic effect of the fungicide on the quality of harvested seeds, in variables related to germination and emergence. Three infected plants (genotypes) of tall fescue were collected from a naturalized pasture (General Guido, Bs. As.). From each plant, 28 clones (tillers with roots) were obtained, transplanted individually into pots, and placed in a greenhouse under controlled conditions. When each clone had approximately 10 tillers, the fungicide treatments were applied. A mixture of fungicide was used [triazole (1.6%), methacrylate (0.96%), imidazole (45%) plus an adjuvant (20%)]. Two doses were used, D_1 25 ml/plant and D_2, 50 ml/plant. Seven treatments were tested: T_1 (control); T_2: a single application of Dose 1 (D_1); T_3: a single application of Dose 2 (D_2); T_4: two applications of D_1; T_5: two applications of D_2; T_6: three applications of D_1; T_7: three applications of D_2. The treatments were applied using a sprayer on the plants. The plants were grown until the completion of the reproductive cycle and seed harvesting. The fungicide treatments were effective in eliminating the endophyte both in the harvested seeds and the obtained plants. The effectiveness depended on the dose and the number of applications. D_2 was always effective in stopping the transmission of the endophyte in all three genotypes, while D_1 was effective after two applications, although with less efficacy. All fungicide treatments caused a reduction (≈20%) in the root and coleoptile length of the seedlings, compared to the control; however, they did not affect the germination energy or germination power of the harvested seeds. These results are promising, as the evaluated treatments would be effective in halting the transmission of the endophyte without affecting seed quality.

Key words. grass, endophytic fungus, infection, fescue toxicosis, fungicide

Recibido: febrero 2025
Aceptado: mayo 2025

Introducción

Festuca arundinacea Schreb. (festuca alta) es una gramínea C_3 perenne de crecimiento otoño-inverno-primaveral, cultivada para uso forrajero en ambientes templado-húmedos y sub-húmedos de todo el mundo (Gibson y Newman 2001; Young *et al*. 2013; Scheneiter *et al*. 2015; Scheneiter y Haufmann 2016). Es originaria del norte de Europa y de la región mediterránea y, en la actualidad se encuentra ampliamente difundida ya que ha sido comercialmente introducida en América del Norte y del Sur, y en Oceanía (Gibson y Newman 2001). En Argentina, es uno de los componentes más importantes de los pastizales pampeanos y una de las gramíneas más utilizadas en la siembra de pasturas, tanto puras como en mezclas (Principi *et al*. 2011; Scheneiter y Haufmann 2016). Entre las principales cualidades agronómicas de festuca alta se destacan alta productividad, especialmente en invierno, alta palatabilidad en comparación con la mayoría de los pastos nativos, perennidad y plasticidad adaptativa frente a un amplio rango de condiciones climáticas y edáficas (Mazzanti *et al.* 1992; Lattanzi *et al.* 2007; Insúa *et al.* 2013). Por otro lado, festuca alta puede establecer una asociación simbiótica con hongos endófitos del género *Epichloë* (Bacon *et al.* 1977; Leuchtmann *et al.* 2014).

El endófito que infecta a festuca alta, *Epichloë coenophiala* (Leuchtmann *et al*. 2014) (antes conocido como *Neotyphodium coenophialum*), es asintomático (*i.e*. cumple su ciclo de vida en el interior de la parte aérea de festuca alta, sin afectar el aspecto externo de la planta) y su dispersión se limita a semillas infectadas de su hospedante, lo que se conoce como "transmisión vertical" (Clay y Schardl 2002), permaneciendo viable en el suelo (Petigrosso *et al*. 2019a). Es un hongo que no se dispersa por esporas ni por el polen de las plantas infectadas (Clay y Schardl 2002). Los endófitos se benefician en la asociación de la cual obtienen nutrición y dispersión (Siegel *et al*. 1984) y, las plantas colonizadas con endófitos suelen mostrar mayor crecimiento y tolerancia a estreses bióticos y abióticos mediante la producción de diferentes alcaloides y la estimulación de síntesis de otros metabolitos como fitohormonas, compuestos fenólicos y antioxidantes (Clay 1987; De Battista *et al*. 1990; Malinowski y Belesky 2000; Saikkonen *et al*. 2013; Decunta *et al*. 2021).

Los endófitos producen y dotan a las plantas de una serie de metabolitos secundarios, dentro de los cuales los más estudiados son los alcaloides (Realini *et al*. 2024). Las principales micotoxinas generadas por el endófito son los ergoalcaloides, los indol-diterpenos, la peramina y las lolinas (Schardl y Phillips 1997; Young *et al*. 2013; Realini *et al*. 2024). Tanto las peraminas como las lolinas son los alcaloides más potentes contra insectos, y los indol diterpenos y ergoalcaloides afectan a los mamíferos herbívoros (Bacon *et al.* 1977; Schardl y Phillips 1997; Evans *et al*. 2012; Bastias *et al*. 2017; Realini *et al*. 2024) llegando a ocasionar elevadas pérdidas económicas en los sistemas de producción ganadera (Evans *et al*. 2012; Kallenbach 2015). En la ganadería bovina se han identificado tres tipos de síndromes relacionados con el consumo de festuca alta con hongo endófito: "síndrome gangrenoso o pie de festuca" en invierno (Plumlee 2004; Klotz *et al*. 2016), "necrosis grasa del bovino" (Haschek y Voss 2013; Klotz 2015) y "asoleamiento o síndrome distérmico" en primavera-verano, siendo este último el que más pérdidas económicas ocasiona (Campero 1996; Strickland *et al.* 2011; Rivera *et al*. 2017; Alfaro *et al*. 2021).

Diversos relevamientos han indicado que las poblaciones de festuca alta de la Región Pampeana presentan niveles de infección cercanos al 100% (Colabelli *et al*. 2006; Petigrosso *et al*. 2013; Lacoste *et al*. 2018; Graff *et al*. 2020; Poo *et al*. 2020). Los altos porcentajes de infección y el aumento de la frecuencia de plantas infectadas en pasturas implantadas con semilla libre de endófito podría explicarse por diferencias en la producción de biomasa y semillas de las plantas libres e infectadas, variaciones en la eficiencia de trasmisión, y por migraciones de semillas infectadas (Petigrosso *et al*. 2019a). Además, existen diversos mecanismos de contaminación con endófito, entre los cuales encontramos el inadecuado manejo del pastoreo en primavera que origina la resiembra natural de lotes previamente ocupados por festuca infectada; la dispersión de semillas por suministro de rollos confeccionados con forraje de pasturas de festuca infectadas, la dispersión por el viento o agua, por maquinaria agrícola o bien por animales domésticos y silvestres, la germinación de semillas infectadas presentes en el del banco del suelo, la diseminación por heces de semillas infectadas que sobreviven al pasaje del tracto digestivo (Petigrosso *et al*. 2019a).

Si bien en Argentina existen investigaciones sobre el manejo y control de pasturas de festuca alta infectada con hongos endófitos (Petigrosso *et al*. 2019abc; Petigrosso y Cantón 2022), en los últimos años se ha observado un creciente nivel de casos de *festucosis* en los animales que consumen festuca alta infectada en la Cuenca del Salado (Cantón *et al*. 2016; García *et al*. 2017). Una de las estrategias para disminuir la toxicidad de las plantas es la remoción del endófito mediante la aplicación de fungicidas sistémicos en plantas (Latch y Christensen 1988; Dernoeden *et al*. 1990; Saiga *et al*. 2003). Sin embargo, estos tratamientos con fungicidas han sido poco eficaces, exigen tratamientos repetidos, presentan riesgo de fitotoxicidad y tienen un costo elevado (Bilotti *et al*. 1988; Dernoeden *et al*. 1990; Hill y Brown 2000). La baja efectividad de los fungicidas sobre los endófitos podría deberse a diferentes modos de acción de los mismos y/o diferentes mecanismos metabólicos de tolerancia o resistencia presentes en el hongo endófito, así como al genotipo de la planta hospedante y las condiciones ambientales en las que crecen (Saiga *et al*. 2003). También existe información, aunque escasa y no reciente, que muestra resultados positivos en el control del hongo endófito en semillas por medio de fungicidas, siendo el triadimenol el ingrediente activo utilizado con más éxito (Siegel *et al*. 1984; Williams *et al*. 1984; Costa y De Battista 1988; Maddaloni *et al*. 1989). Posiblemente, los escasos antecedentes del uso fungicidas en semillas se expliquen por el mayor impacto que generaría la eliminación del hongo endófito en plantas establecidas (*i.e*. se evitaría posteriormente la competencia entre plantas de festuca alta infectadas y libres, tanto entre las libres establecidas o bien aquellas que se establecen por resiembra natural), y además, porque en estos trabajos se ha señalado que algunos de los fungicidas producen cierto grado de fitotoxicidad sobre la calidad de las semillas, que se expresa en una disminución de la energía

y/o del poder germinativo de la semilla, menor crecimiento y deformación de las plántulas.

En base a los antecedentes sobre la eliminación de los hongos endófitos en plantas y semillas, y dado que no existe una clara comprensión de los efectos de los tratamientos con fungicida sobre el ciclo de vida de las plantas y su progenie (semillas y plántulas), en este estudio sometimos a plantas de festuca alta adultas a diferentes dosis de una mezcla de fungicidas y verificamos la presencia del endófito en las semillas cosechadas y las plantas producidas. El objetivo de este trabajo fue evaluar i) la eficacia de distintos tratamientos con una mezcla de fungicidas sobre la eliminación del hongo endófito *Epichloë coenophiala* en distintos genotipos de plantas de festuca alta infectadas bajo condiciones controladas, y ii) el efecto fitotóxico del fungicida sobre la calidad de semillas cosechadas de las plantas tratadas, en variables asociadas a la germinación y emergencia.

Materiales y Métodos

Sitio de recolección de plantas de festuca alta

El 15/05/2023 tres plantas (genotipos) de festuca alta en estado vegetativo fueron recolectadas con raíces, mediante excavación a 30 cm de profundidad, en una pastura naturalizada con más de 10 años de implantación, ubicada en el establecimiento ganadero "El Pampa" (Partido de General Guido, Buenos Aires, Argentina). Para asegurar que cada planta fuera un genotipo diferente, había al menos más de 100 m entre sí.

Diseño y conducción del experimento

Las plantas colectadas fueron llevadas al laboratorio de la Unidad Integrada Balcarce (Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Mar del Plata – Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce; 37°45' S, 58°17' O, 130 m s.n.m.) donde se corroboró la condición de infección mediante el análisis microscópico del endófito en macollos (Belanger 1996). De cada una de las matas, se obtuvieron 28 clones (macollos con raíces) que se trasplantaron individualmente a macetas plásticas de 3 L (13,5 cm de diámetro x 14 cm de profundidad) con suelo homogeneizado del horizonte A de un Argiudol típico (9,6 ppm de P Bray I; 5,9% MO y 9,3 ppm N- NO_3-) y se ubicaron en un invernáculo en la Unidad Integrada Balcarce. El 06/06/2023, cuando cada clon de festuca alta infectado (en adelante E+) tenía ≈10 macollos, se realizó un corte a 15 cm desde el nivel del suelo para homogenizar la altura de las plantas previa a la aplicación de los tratamientos con fungicidas. Se utilizó una mezcla de fungicidas de acuerdo con ensayos previos (Petigrosso *et al*. 2019c), cuyos grupos químicos eran: triazol (1,6%), metoxiacrilato (0,96%), imidazol (45%) más un coadyuvante (20%). Se utilizaron dos dosis, D_1 25 ml/planta y D_2, 50 ml/planta. Se probaron siete tratamientos: T_1 (testigo, sin aplicación de fungicida); T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1); T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2); T_4: dos aplicaciones de D_1; T_5: dos aplicaciones de D_2; T_6: tres aplicaciones de D_1; y T_7: tres aplicaciones de D_2. Los tratamientos fueron aplicados con la ayuda de rociador sobre las plantas el 07/06/2023; el 05/07/2023 y el 07/08/2023, respectivamente, según el tratamiento. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones, con arreglo factorial. Los factores experimentales fueron: i) tratamientos con fungicida (con siete niveles) y ii) genotipos de festuca alta (con tres niveles). En total se utilizaron 84 macetas (unidad experimental), resultantes de siete tratamientos con fungicida, tres genotipos de festuca alta y cuatro repeticiones (bloques). Las macetas se mantuvieron libres de malezas y sin restricciones hídricas ni nutricionales durante el período experimental. Las plantas se cultivaron hasta completar el ciclo reproductivo. Durante el mes de diciembre de 2023, cuando el raquis de las panojas era de color amarillento, se cosecharon las semillas de cada planta, y almacenaron en bolsas de papel a 7°C en heladera, hasta su posterior análisis.

Transmisión vertical del endófito a las semillas

Durante los meses de enero y febrero del año 2024, se realizó el análisis microscópico de 60 semillas cosechadas de cada planta de festuca alta tratada experimentalmente, para corroborar la condición de infección (*i.e*. presencia o ausencia del endófito) y 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 (NaOH) 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 colorante rosa de bengala durante 2-3 minutos. 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). La ausencia del endófito en las semillas cosechadas, indica que el tratamiento con fungicida fue eficaz, es decir, permite frenar el proceso de transmisión vertical del endófito desde la planta madre a las semillas cosechas (Petigrosso *et al*. 2019b). En total se analizaron 5040 semillas (84 plantas x 60 semillas/planta). A partir del porcentaje de infección de cada planta [%E+ = (semillas infectadas/60) x 100], se calculó la Eficacia del fungicida en la eliminación del endófito (%) = 100 - %E+.

Viabilidad del hongo endófito en plantas

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), el 12/03/2024 se sembraron 5 semillas cosechadas de cada planta en macetas plásticas de 1 L conteniendo tierra del horizonte superficial (0-20 cm) de un suelo agrícola para realizar posteriormente el diagnóstico de la presencia o ausencia de hongos endófitos en las plantas obtenidas. Para ello, cuando las plantas tenían entre 30 y 45 días de emergidas, se determinó la viabilidad del endófito mediante la observación microscópica de hifas entre las células parenquimáticas en las vainas de las hojas de las plantas, mediante coloración directa (Belanger 1996). Primeramente, se extrajo cada planta de festuca alta de su respectiva maceta, manteniendo su identificación. Luego, se raspó el tejido parenquimático de los primeros 10 mm de la base de la vaina sobre un portaobjeto (Belanger 1996). Se agregó colorante rosa de bengala, se cubrió la muestra con el

cubreobjeto y se observó al microscopio óptico (400x). Se consideraron macollos E+ aquellos que presentaron hifas del hongo endófito entre las células parenquimáticas de la vaina foliar. En total se analizaron 420 plantas (84 plantas x 5 semillas/planta).

Efecto fitotóxico del fungicida sobre la calidad de las semillas cosechadas

Para analizar el posible efecto fitotóxico del fungicida sobre la calidad de las semillas cosechadas, durante los meses de julio y septiembre de 2024 se realizó un experimento bajo condiciones controladas en una cámara de germinación de la Unidad Integrada Balcarce. Se sembraron 50 semillas por cada una de las 84 unidades experimentales, en rollos de papel (Maguire 1962), embebidos en agua destilada (25 ml aplicados con rociador). Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones en el tiempo (tandas), con un arreglo factorial. Los factores experimentales fueron i) genotipos de festuca (con tres niveles) y ii) tratamientos con fungicida (con siete niveles). En total se sembraron 84 rollos (unidades experimentales), resultantes de los siete tratamientos con fungicida, tres genotipos y cuatro repeticiones. 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. Se realizaron las siguientes determinaciones:

1-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 presentó una longitud igual o mayor a 2 mm. Esta variable, da idea del vigor de la semilla.

2-Poder germinativo (PG): a los 14 días se volvieron a abrir los rollos y se contaron las semillas germinadas. En este recuento, las semillas y plántulas se clasificaron en plántulas normales (*i.e*. sistema radicular bien desarrollado y coleóptilo intacto sin daño), plántulas anormales (*i.e*. plántulas que no mostraron capacidad para continuar desarrollándose debido a que son 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), semillas frescas (*i.e*. semillas no germinadas durante el ensayo, aunque permanecen en estado latente con potencial para germinar y desarrollar una plántula normal) y semillas muertas (*i.e*. semillas en pudrición con presencia de moho), según las reglas ISTA (2020). El poder germinativo se determinó como el cociente de plántulas normales desarrolladas con respecto al total de semillas sembradas (50). Es importante aclarar que no hubo diferencias en las semillas muertas entre los tratamientos (datos no mostrados) y no realizamos ninguna prueba (*e.g*. tetrazolio) para separar las semillas latentes de las muertas dentro de la categoría de “semillas frescas”.

3-Longitud de radícula y coleóptilo: el mismo día del recuento de PG, se midió, con una regla milimetrada, la longitud de la radícula (LR) y del coleóptilo (LC) de una muestra aleatoria de 10 plántulas por unidad experimental.

4-Para evaluar el posible efecto fitotóxico sobre las semillas, se analizó el peso de 1000 semillas cosechadas en diciembre del año 2023 de las 84 unidades experimentales. Para ello, a partir de tres 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.

Análisis estadísticos

El experimento se realizó mediante un diseño en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones, con arreglo factorial. Los valores de las variables respuesta medidas en los diferentes tratamientos (*i.e.* proporción de semillas y plantas con endófito, proporción de semillas germinadas a las 7 y 14 días, peso de mil semillas, longitud de radícula y coleóptilo), 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, $P<0,05$). Previamente al análisis, realizó la verificación del cumplimiento de los supuestos del ANOVA (normalidad de los residuos y la homogeneidad de varianzas). Los resultados referidos a la transmisión del endófito, como a la energía y el poder germinativo de las semillas se expresan como porcentajes en la sección de resultados. Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico R (R Core Team 2020).

Resultados

Efectos sobre la transmisión vertical del endófito

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se halló interacción significativa entre el tratamiento con fungicida aplicado y el genotipo de festuca alta ($P=0,849$), ni efecto simple del genotipo ($P=0,481$) sobre la presencia del hongo endófito en las semillas cosechadas (*i.e*. eficiencia en la transmisión vertical del endófito). Solamente se registró efecto simple del tratamiento con fungicida aplicado ($P<0,001$). Los tratamientos T_3, T_5 y T_7 (*i.e*. una, dos y tres aplicaciones de D_2, respectivamente) fueron más efectivos en frenar la transmisión del endófito (eficacia entre 97% - 100%) en los tres genotipos (Tabla 1). En el tratamiento T_2 (*i.e*. una sola aplicación de D1) se registró la menor eficacia (≈ 31%; Tabla 1) en frenar la transmisión del endófito desde la planta madre a las semillas, independientemente del genotipo evaluado. Sin embargo, cuando se realizaron dos y tres aplicaciones de D_1 (T_4 y T_6, respectivamente) la eficacia de control fue mayor, entre 74% - 82% (Tabla 1). Las semillas del tratamiento testigo (T_1) dieron 100% al diagnóstico de la presencia del endófito.

Efectos sobre la viabilidad del hongo endófito en plantas

No se halló interacción significativa entre el tratamiento con fungicida aplicado y el genotipo de festuca alta ($P=0,650$), ni efecto simple del genotipo ($P=0,759$) sobre la presencia del hongo endófito en las plantas originadas de las semillas cosechadas. Solamente se registró efecto simple del tratamiento con fungicida aplicado ($P<0,0001$). El mayor porcentaje de la presencia de endófito se registró en las plantas originadas de las semillas cosechadas de plantas que recibieron una sola aplicación de D_1 (T_2; Tabla 2). En los tratamientos T_3, T_5 y T_7 (*i.e*. una, dos y tres aplicaciones de D_2, respectivamente) se observaron los menores

Tabla 1. Eficacia (%) de los distintos tratamientos con fungicida en la eliminación del hongo endófito en semillas cosechadas de plantas de festuca alta de tres genotipos (G). T_1: testigo, sin aplicación de fungicida. T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1). T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2). T_4: dos aplicaciones de D_1. T_5: dos aplicaciones de D_2. T_6: tres aplicaciones de D1. T_7: tres aplicaciones de D_2. D_1 = 25 ml/planta y D_2 = 50 ml/planta. Los valores son medias ± ES. Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos (*P*<0,05).

Table 1. *Efficacy (%) of different fungicide treatments in eliminating the endophytic fungus in seeds harvested from tall fescue plants of three genotypes (G). T_1: control, no fungicide application. T_2: a single application of Dose 1 (D_1). T_3: a single application of Dose 2 (D_2). T_4: two applications of D_1. T_5: two applications of D_2. T_6: three applications of D_1. T_7: three applications of D_2. D_1 = 25 ml/plant and D_2 = 50 ml/plant. Values are mean ± SE. Equal letters indicate non-significant differences between treatments (P<0.05).*

Tratamiento	Eficacia en la eliminación del endófito (%)				
	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Promedio	
T1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	d
T2	32,8 ± 2,9	29,8 ± 3,9	29,7 ± 3,8	30,8 ± 2,8	c
T3	94,6 ± 1,1	96,0 ± 2,0	100 ± 0	96,9 ± 1,0	a
T4	75,5 ± 1,8	72,5 ± 1,1	73,1 ± 1,3	73,7 ± 1,3	b
T5	100 ± 0	100 ± 0	98,5 ± 1,1	99,5 ± 0,4	a
T6	80,2 ± 1,3	83,5 ± 1,5	81,5 ± 1,0	81,7 ± 1,2	b
T7	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	a

Tabla 2. Presencia de endófito (%) en plantas de tres genotipos de festuca alta originadas de semillas cosechadas de plantas madres tratadas con distintos tratamientos con fungicidas para frenar la transmisión del hongo endófito. T_1: testigo, sin aplicación de fungicida. T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1). T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2). T_4: dos aplicaciones de D_1. T_5: dos aplicaciones de D_2. T_6: tres aplicaciones de D_1. T_7: tres aplicaciones de D_2. D_1 = 25 ml/planta y D_2 = 50 ml/planta. Los valores son medias ± ES. Letras iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos (*P*<0,05).

Table 2. *Presence of endophyte (%) in plants of three tall fescue genotypes originating from seeds harvested from mother plants treated with different fungicide treatments to stop the transmission of the endophytic fungus. T_1: control, no fungicide application. T_2: a single application of Dose 1 (D_1). T_3: a single application of Dose 2 (D_2). T_4: two applications of D_1. T_5: two applications of D_2. T_6: three applications of D_1. T_7: three applications of D_2. D_1 = 25 ml/plant and D_2 = 50 ml/plant. Values are mean ± SE. Equal letters indicate non-significant differences between treatments (P<0.05).*

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

porcentajes de endófito (Tabla 2). Las plantas obtenidas de las semillas cosechadas de las plantas testigo (T_1) dieron 100% al diagnóstico de la presencia del endófito.

Efectos sobre las semillas cosechadas y plántulas obtenidas

El peso de mil semillas fue afectado por el tratamiento con fungicida aplicado en interacción con el genotipo de festuca alta (*P*<0,0001). Al comparar el peso de mil semillas de los tres genotipos dentro de cada tratamiento con fungicida (Tabla 3), se observó que el genotipo 1 fue superior en los tratamientos T_1 (testigo) y T_3 (una sola aplicación de D_2); y que el genotipo 2 fue superior en el tratamiento T_5 (dos aplicaciones de D_2). En el resto de los tratamientos no hubo diferencias significativas entre genotipos (Tabla 3). Al analizar los promedios de esta variable para los tratamientos con fungicida, se observó que T_1, T_5 y T_7 fueron los tratamientos que presentaron semillas más pesadas y que no difirieron entre sí (Tabla 3). Las semillas del genotipo 1 presentaron mayor peso de mil, aunque no difirió significativamente del genotipo 2 (Tabla 3).

Con respecto a la energía germinativa, independientemente del genotipo de festuca alta (*P*=0,522) y del tratamiento con fungicida aplicado (*P*=0,969), a los 7 días de incubación germinaron ≈88% de las semillas. Del mismo modo, el poder germinativo tampoco fue afectado por el genotipo de festuca alta (*P*=0,639) ni el tratamiento con fungicida (*P*=0,471). A los 14 días de incubación, ≈83% de las semillas dieron origen a plántulas normales. Por otro lado, la longitud de radícula de las plántulas fue afectada por el tratamiento con fungicida en interacción con el genotipo de festuca alta (*P*<0,0001). El genotipo 1 fue superior en T_1 (testigo) y T_6 (tres aplicaciones de D_1) respecto al resto de los genotipos (Tabla 4). En T_5 (dos aplicaciones de D_2), las plántulas del genotipo 2 presentaron mayor longitud de radícula que el resto de los genotipos (Tabla 4). Las plántulas del testigo (T_1) presentaron mayor longitud de radícula que el resto de los

Tabla 3. Valores promedio (± error estándar del modelo = 0,103) del peso de mil semillas (g) provenientes de plantas de tres genotipos de festuca alta tratadas con fungicida. T_1: testigo, sin aplicación de fungicida. T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1). T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2). T_4: dos aplicaciones de D_1. T_5: dos aplicaciones de D_2. T_6: tres aplicaciones de D_1. T_7: tres aplicaciones de D_2. D_1 = 25 ml/planta y D_2 = 50 ml/planta. Letras minúsculas iguales en una fila indican que no hay diferencias significativas entre genotipos dentro de un tratamiento (MDS, α = 0,05). Letras mayúsculas iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS (α = 0,05) entre los tratamientos con fungicida y entre genotipos, respectivamente.

Table 3. *Mean values (± standard error of the model = 0.103) of weight of a thousand seeds (g) from plants of three tall fescue genotypes treated with fungicide. T_1: control, no fungicide application. T_2: a single application of Dose 1 (D_1). T_3: a single application of Dose 2 (D_2). T4: two applications of D_1. T_5: two applications of D_2. T6: three applications of D_1. T7: three applications of D_2. D_1 = 25 ml/plant and D_2 = 50 ml/plant. Equal lowercase letters in a row indicate non-significant differences between genotypes within a treatment (MDS, α = 0.05). Equal uppercase letters indicate non-significant differences according to the MDS test (α = 0.05) between fungicide treatments and between genotypes, respectively.*

Tratamiento	Peso de mil semillas (g)			
	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Promedio
T1	2,18 a	1,46 b	1,60 b	1,75 A
T2	1,65 a	1,58 a	1,52 a	1,58 B
T3	2,12 a	1,65 b	1,28 b	1,68 AB
T4	1,42 a	1,60 a	1,59 a	1,54 B
T5	1,37 b	1,92 a	1,44 b	1,57 B
T6	1,56 a	1,39 a	1,66 a	1,53 B
T7	1,59 a	1,73 a	1,73 a	1,68 AB
Promedio	1,70 A	1,62 AB	1,55 B	

Tabla 4. Valores promedio (± error estándar del modelo = 0,499) de longitud de radícula (cm) en plántulas originadas de semillas provenientes de plantas de tres genotipos de festuca alta tratadas con fungicida. T_1: testigo, sin aplicación de fungicida. T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1). T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2). T_4: dos aplicaciones de D_1. T_5: dos aplicaciones de D_2. T_6: tres aplicaciones de D_1. T_7: tres aplicaciones de D_2. D_1 = 25 ml/planta y D_2 = 50 ml/planta. Letras minúsculas iguales en una fila indican que no hay diferencias significativas entre genotipos dentro de un tratamiento (MDS, α = 0,05). Letras mayúsculas iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS (α = 0,05) entre los tratamientos con fungicida y entre genotipos, respectivamente.

Table 4. *Mean values (± standard error of the model = 0.499) of radicle length (cm) of seedlings originating from seeds from plants of three tall fescue genotypes treated with fungicide. T_1: control, no fungicide application. T_2: a single application of Dose 1 (D_1). T_3: a single application of Dose 2 (D_2). T_4: two applications of D_1. T_5: two applications of D_2. T_6: three applications of D_1. T_7: three applications of D_2. D_1 = 25 ml/plant and D_2 = 50 ml/plant. Equal lowercase letters in a row indicate non-significant differences between genotypes within a treatment (MDS, α = 0.05). Equal uppercase letters indicate non-significant differences according to the MDS test (α = 0.05) between fungicide treatments and between genotypes, respectively.*

Tratamiento	Longitud de radícula (cm)			
	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Promedio
T1	10,36 a	7,03 b	7,58 b	8,32 A
T2	6,79 a	6,42 a	6,78 a	6,66 B
T3	7,76 a	6,80 a	6,85 a	7,13 B
T4	7,42 a	7,54 a	7,34 a	7,43 B
T5	6,26 b	8,01 a	6,79 b	7,02 B
T6	8,80 a	6,76 b	6,74 b	7,42 B
T7	6,30 a	7,67 a	7,06 a	7,01 B
Promedio	7,67 A	7,17 AB	7,01 B	

tratamientos (Tabla 4). Las plántulas del genotipo 1 presentaron mayor longitud de radícula, aunque no difirieron significativamente de las del genotipo 2 (Tabla 4).

La longitud de coleóptilo de las plántulas también fue afectada por el tratamiento con fungicida en interacción con el genotipo de festuca alta (*P*<0,0001). La longitud de coleóptilo del genotipo 2 fue inferior en T_1 (testigo) respecto al resto de los genotipos (Tabla 5). En T_6 (tres aplicaciones de D_1) y T_3 (una sola aplicación de D_2) las plántulas del genotipo 1 presentaron mayor longitud de coleóptilo que el resto de los genotipos (Tabla 5). En T_5 (dos aplicaciones de D_2) el genotipo 1 presentó menor longitud de coleóptilo que el resto de los genotipos (Tabla 5). Las plántulas del testigo (T_1) presentaron mayor longitud de coleóptilo que el resto de los tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores promedio (± error estándar del modelo = 0,444) de longitud de coleóptilo en plántulas originadas de semillas provenientes de plantas de tres genotipos de festuca alta tratadas con fungicida. T_1: testigo, sin aplicación de fungicida. T_2: una sola aplicación de Dosis 1 (D_1). T_3: una sola aplicación de Dosis 2 (D_2). T_4: dos aplicaciones de D_1. T_5: dos aplicaciones de D_2. T_6: tres aplicaciones de D_1. T_7: tres aplicaciones de D_2. D_1 = 25 ml/planta y D_2 = 50 ml/planta. Letras minúsculas iguales en una fila indican que no hay diferencias significativas entre genotipos dentro de un tratamiento (MDS, α = 0,05). Letras mayúsculas iguales indican diferencias no significativas según la prueba de MDS (α = 0,05) entre los tratamientos con fungicida y entre genotipos, respectivamente.

Table 5. *Mean values (± standard error of the model = 0.444) of coleoptile length of seedlings originating from seeds from plants of three tall fescue genotypes treated with fungicide. T_1: control, no fungicide application. T_2: a single application of Dose 1 (D_1). T_3: a single application of Dose 2 (D_2). T_4: two applications of D_1. T_5: two applications of D_2. T_6: three applications of D_1. T_7: three applications of D_2. D_1 = 25 ml/plant and D_2 = 50 ml/plant. Equal lowercase letters in a row indicate non-significant differences between genotypes within a treatment (MDS, α = 0.05). Equal uppercase letters indicate non-significant differences according to the MDS test (α = 0.05) between fungicide treatments and between genotypes, respectively.*

Tratamiento	Longitud de coleóptilo (cm)			
	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Promedio
T1	7,88 a	5,49 b	8,09 a	7,15 A
T2	5,75 a	5,55 a	5,69 a	5,66 C
T3	7,19 a	5,85 b	6,22 b	6,42 B
T4	5,74 a	6,81 a	6,42 a	6,32 BC
T5	4,84 b	6,47 a	6,29 a	5,86 BC
T6	7,62 a	5,72 b	5,64 b	6,33 BC
T7	6,00 a	6,35 a	6,28 a	6,21 BC
Promedio	6,43 A	6,37 A	6,04 A	

Discusión

Bajo nuestras condiciones experimentales, los tratamientos con fungicida evaluados fueron eficaces en la eliminación del endófito. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos dependió de la dosis aplicada y del número de aplicaciones. La D_2 fue siempre efectiva en frenar la transmisión del endófito en los tres genotipos, en cambio, la D_1 fue efectiva desde dos aplicaciones, aunque con menor eficacia. La respuesta observada en el diagnóstico de la presencia del hongo endófito en las semillas (Tabla 1) se reflejó en las plantas obtenidas (Tabla 2). Aunque no podemos asegurar si hubo una erradicación del hongo en toda la planta o, si simplemente se interrumpió el proceso de transmisión vertical, estos resultados son alentadores, e indican que el hongo endófito *Epichloë coenophiala* presentó susceptibilidad al fungicida utilizado durante el estado vegetativo de las plantas madre y no afectó el crecimiento de las mismas (dado que todas llegaron a estado reproductivo). Esto es importante aclararlo, dado que, bajo ciertas condiciones, la aplicación de fitosanitarios puede producir daños en las plantas tratadas, provocando fitotoxicidad (Herzfeld y Sargent 2008). Algunos de estos síntomas pueden ser la aparición de manchas negras, necrosis en las hojas, amarillamiento foliar, retraso en el crecimiento o, eventualmente, la muerte de las plantas. Según Herzfeld y Sargent (2008), la fitotoxicidad en las plantas puede surgir como consecuencia de la sensibilidad específica de la planta al producto químico aplicado; del uso de una dosis excesiva de aplicación, aplicaciones demasiado frecuentes, dilución inadecuada del producto, mezclas inadecuadas de productos y/o la aplicación de productos en un estadio de desarrollo inadecuado del cultivo.

Por otro lado, los tratamientos con fungicida se aplicaron cuando las plantas estaban en estado vegetativo. En esta etapa fenológica, existe una alta relación entre el área foliar de la planta y el micelio del hongo, asegurando que el fungicida sea absorbido y traslocado a los meristemas (Rottinghaus *et al*. 1991; Rogers *et al*. 2011). Durante el periodo experimental, las plantas fueron regadas y los fungicidas se aplicaron a media mañana, por lo que las plantas estaban activas en términos de fotosíntesis y transpiración. Todos estos aspectos, deben tenerse en cuenta para aumentar las posibilidades de aplicar con éxito esta técnica, dado que, existen estudios que demuestran diferencias en la efectividad de fungicidas para eliminar el hongo endófito de plantas de festuca alta (Saiga *et al*. 2003; Petigrosso et al. 2019c). En este sentido, los resultados encontrados corroboran lo hallado por Saiga *et al*. (2003). Estos autores probando diferentes fungicidas en la remoción del hongo endófito en macollos de raigrás perenne y festuca alta, concluyeron que el porcentaje de remoción del hongo aumentaba con la dosis de fungicida. En nuestro caso, cuando se analizaron las semillas de las plantas tratadas (Tabla 1) y las plantas obtenidas (Tabla 2), los porcentajes de eliminación del endófito fueron más altos cuando se aplicó una dosis mayor y se realizaron más de una aplicación.

Al analizar la calidad de las semillas cosechadas, se observó que los tratamientos con fungicida, influyeron sobre el peso de mil semillas (Tabla 3) pero no afectaron la energía germinativa ni poder germinativo de las mismas. Estos resultados coinciden con los hallados por Petigrosso *et al.* (2019c). Estos autores, al comparar la eficacia y fitotoxicidad de dos fungicidas sistémicos [Amistar® (Azoxistrobina) y Almagor® (Tebuconazole + Azoxistrobina + Procloraz)] aplicados en plantas de festuca alta,

hallaron que el poder germinativo de las semillas obtenidas de plantas tratadas no disminuyó como resultado de los tratamientos evaluados. Por otro lado, si bien los tratamientos con fungicida fueron aplicados en plantas en estado vegetativo y no directamente sobre las semillas, la ausencia de fitotoxicidad bajo nuestras condiciones experimentales no coincide con lo reportado por otros estudios, en los que se ha observado una reducción del poder germinativo de las semillas (Siegel *et al*. 1984; Williams *et al.* 1984; Costa y De Battista 1988; Ramírez de Gulielmone *et al*. 1988; Maddaloni *et al*. 1989). Al analizar la longitud de radícula (Tabla 4) y de coleóptilo (Tabla 5) de las plántulas, se registró un efecto detrimental de los tratamientos con fungicida, que dependió del genotipo (Saiga *et al*. 2003; Petigrosso *et al*. 2019c). Sin embargo, la disminución observada en dichas variables no fue superior al 20% comparado con el tratamiento control. Estos resultados permiten reforzar la idea de que la mezcla de fungicidas utilizada posee baja fitotoxicidad.

Los resultados registrados deberán corroborarse en un mayor número de genotipos y bajo condiciones de campo. Esto se debe a que, las respuestas de los hongos endófitos a las condiciones ambientales suelen ser específicas del genotipo de la planta (Belesky *et al*. 1989; Belesky y Fedders 1996); y, por otro lado, existen antecedentes que los resultados obtenidos en condiciones controladas no siempre son directamente extrapolables a condiciones de campo. Por ejemplo, Williams *et al*. (1984) detectaron reducciones del poder germinativo (del orden del 30%) cuando evaluaron la efectividad de un fungicida (triadimenol, dosis de 4,8 g. p.a/kg) en semillas de festuca alta ubicadas en cajas de Petri. Sin embargo, estos autores no observaron estos resultados en siembras a campo. Es probable que, en condiciones de campo, la dilución y arrastre del fungicida por el agua de riego o por la lluvia, junto a características del suelo (tales como: pH, contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico) sean responsables de estas respuestas diferenciales (Costa y De Battista 1988).

En conclusión, los tratamientos con fungicidas evaluados mostraron alta efectividad en frenar la trasmisión del hongo endófito *Epichloë coenophiala* de las plantas de festuca alta a la progenie (semillas) en condiciones controladas. Sin embargo, dicha eficacia dependería de la dosis y el número de aplicaciones. La D_2 fue siempre efectiva en frenar la transmisión del endófito en los tres genotipos, en cambio, la D_1 fue efectiva desde dos aplicaciones, aunque con menor eficacia. Estos resultados son alentadores y deberán corroborarse con ensayos a campo, dado que muchos pastizales y pasturas del sudeste de la provincia de Buenos Aires se encuentran infectados con este hongo endófito, ocasionando importantes pérdidas económicas. Además, la información obtenida será de gran interés para su aplicabilidad en investigaciones que requieren disponer de semillas tanto libres como infectadas de un mismo genotipo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado económicamente por la Cartera de Proyectos 2023 del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Agradecemos al Sr. Fermín Parisi por permitir realizar la recolección de plantas de festuca alta en su establecimiento y a los Laboratorios de Ecología y de Toxicología Veterinaria de la Unidad Integrada Balcarce por brindar el equipamiento necesario para las determinaciones. Finalmente agradecemos a los revisores de este trabajo por sus valiosas sugerencias que permitieron mejorar el manuscrito.

Contribuciones de los autores

Petigrosso LR: formulación de las preguntas/ideas propias de la investigación, escritura protagónica del artículo, ejecución de experimento, obtención de muestras, procesamiento de datos y análisis e interpretación de resultados, responsabilidad por la integridad y coherencia del artículo. *Girado Smart C*: análisis de muestras, procesamiento de datos y análisis e interpretación de resultados. *Olarra I*: análisis de muestras, procesamiento de datos y análisis e interpretación de resultados. *Braco M*: toma de muestras, interpretación de resultados. *Ezcurdia P*: toma de muestras, interpretación de resultados. *Lemme J*: toma de muestras, interpretación de resultados. *Parisi F*: toma de muestras, interpretación de resultados. *Poo J*: formulación de las preguntas/ideas propias de la investigación, ejecución de experimento, análisis de muestras, procesamiento de datos y análisis e interpretación de resultados.

Bibliografía

Alfaro GF, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Muntifering RB, Rodning SP, Pacheco WJ, Moisá SJ (2021) Complete blood count analysis on beef cattle exposed to fescue toxicity and rumen-protected niacin supplementation. *Animals* **11**, 988.

Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES (1977) *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* **34**, 576-581.

Bastias DA, Martínez-Ghersa MA, Ballaré CL, Gundel PE (2017) *Epichloë* fungal endophytes and plant defenses: Not just alkaloids. *Trends in Plant Science* **22**, 939-948.

Belanger FC (1996) A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Science* **36**, 460-462.

Belesky DP, Stringer WC, Hill S (1989) Influence of endophyte and water regimen upon tall fescue accessions. I. Growth characteristics. *Annals of Botany* **63**, 495-503.

Belesky DP, Fedders JM (1996) Does endophyte influence regrowth of tall fescue? *Annals of Botany* **78**, 499-505.

Bilotti LG, Nouges AT, Segal GJ, Guglielmoni MB, Cossu ME, Ramírez de Guglielmone AE (1988) Toxicidad de festuca: Estudio de la dosis mínima efectiva de triadimenol para el control de *Acremonium coenophialum* en semilla. *Revista Argentina de Producción Animal* **8** Supl. 1, 113-114.

Campero CM (1996) Efectos de la festuca tóxica sobre el desempeño reproductivo y producción en bovinos. Una revisión. *Therios* **25**, 306-316.

Cantón GJ, Bence AR, Olmos L, Llada I, Mazzanti M, Migliavacca JI, Armendano JI, Odriozola ER (2016) Porcentaje de infestación con endófito en festucas (*Lolium arundinaceum*) analizadas en INTA EEA Balcarce. *Revista Argentina de Producción Animal* **36** Supl. 1, 34.

Colabelli MN, Salomone L, Fernández F, San Martino S (2006) Niveles de infección de *Neotyphodium coenophialum* en poblaciones de festuca naturalizadas en el sudeste bonaerense. *Revista Argentina de Producción Animal* **26** Supl. 1, 239-240.

Clay K (1987) Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea.* Oecologia **73**, 358-362.

Clay K, Schardl C (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**, 99-127.

Costa MC, De Battista JP (1988) Tratamiento de semillas para control de *Acremonium coenophialum* en *Festuca arundinacea*. *Revista Argentina de Producción Animal* **8**, 289-294.

De Battista JP, Bouton JH, Bacon CW, Siegel MC (1990) Rhizome and herbage production of endophyte-removed tall fescue clones and populations. *Agronomy Journal* **82**, 651-654.

Decunta FA, Perez LI, Malinowski DP, Molina-Montenegro MA, Gundel PE (2021) A systematic review on the effects of *Epichloë* fungal endophytes on drought tolerance in cool-season grasses. *Frontiers in Plant Science* **12**, 644731.

Dernoeden PH, Krusberg LR, Sardanelli S (1990) Fungicide effects on *Acremonium* endophyte, plant parasitic nematodes, and thatch in Kentucky bluegrass and perennial ryegrass. *Plant Disease* **74**, 879-881.

Evans TJ, Blodgett DJ, Rottinghaus GE (2012) Fescue toxicosis. *Veterinary Toxicology* **87**, 1166-1177.

García JA, Cantón JC, García BL, Micheloud JF, Campero CM, Spath EJA, Odrizola ER (2017) Retrospective analysis of cattle poisoning in Argentina (2000-2013). *Pesquisa Veterinária Brasileira* **37**, 210-214.

Gibson DJ, Newman JA (2001) Biological Floral of the British Isles: *Festuca arundinacea* Schreb. (*F. elatior* subsp. *arundinacea* (Schreb.) Hackel). *Journal of Ecology* **89**, 304-324.

Graff P, Gundel PE, Salvat A, Cristos D, Chaneton EJ (2020) Protection offered by leaf fungal endophytes to an invasive species against native herbivores depends on soil nutrients. *Journal of Ecology* **108**, 1592-1604.

Haschek WM, Voss KA (2013) Mycotoxins. En `Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology´. Vol. II. Pp. 1187-1258. (Academic Press: London).

Herzfeld D, Sargent K (2008) Pesticide Formulations. En `Private Pesticide Applicator training manual´. 19th ed. Pp. 85-108. (University of Minnesota Extension: Minesotta, USA).

Hill NS, Brown E (2000) Endophyte viability in seedling tall fescue treated with fungicides. *Crop Science* **40**, 1490-1491.

Insúa JR, Marco OD, Agnusdei MG (2013) Nutritional quality of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in summer and autumn regrowth. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **39**, 267-272.

[ISTA] International Seed Testing Association (2020) International Rules for Seed Testing. (ISTA: Bassersdorf).

Kallenbach RL (2015) Coping with tall fescue toxicosis: solutions and realities. *Journal of Animal Science* **93**, 5487-5495.

Klotz JL (2015) Activities and effects of ergot alkaloids on livestock physiology and production. *Toxins* **7**, 2801-2821.

Klotz JL, Aiken GE, Bussard JR, Foote AP, Harmon DL, Goff BM, Schrick FN, Strickland JR (2016) Vasoactivity and vasoconstriction changes in cattle related to time off toxic endophyte-infected tall fescue. *Toxins* **8**, E271.

Lacoste L, Petigrosso L, Jaimes FR, Borrajo C, Castaño J, Colabelli M (2018) Caracterización del porcentaje de infección con endófito de pasturas de festuca en establecimientos ganaderos de la Cuenca del Salado. VIII Congreso Nacional y IV Congreso del Mercosur de Pastizales Naturales. pp. 102.

Latch GCM, Christensen MJ (1988) Effects of myclobutanil and propiconazole on endophyte and rust fungi in ryegrass. Proc. 41st New Zealand Weed and Pest Control Conference. Pp. 126-128.

Lattanzi FA, Mazzanti A, Wade MH (2007) Seasonal animal production of temperature and mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**, 203-213.

Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White JF, Tadych M (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë. Journal of Mycology* **106**, 202–215.

Maddaloni J, Sala M, Carletti S (1989) Viabilidad del hongo endófito (*Acremonium conophialum* Morgan-Jones y Gams) en semilla de festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) Informe Técnico **224**, 12 p. INTA EEA Pergamino, Argentina. (INTA Ediciones: Buenos Aires).

Maguire JD (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* **2**, 176-177.

Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* **40**, 923-940.

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. 73p. INTA. EEA Balcarce. Buenos Aires, Argentina.

Petigrosso LR, Colabelli MN, Fernández ON, Ispizúa V, Cendoya MG (2013) Incidence of the endophyte fungus *Neotyphodium coenophialum* in pastures of tall fescue differing in age and soil characteristics. *African Journal of Agricultural Research* **8**, 2655-2662.

Petigrosso LR, Laboranti MA, Vignolio OR, Echeverría MM, Castaño JA (2019a) Impacto de diferentes tratamientos de remoción de la vegetación en pasturas de festuca alta infectada con endófito asexual. *Revista Argentina de Producción Animal* **38**, 49-61.

Petigrosso LR, Gundel P, Colabelli MN, Fernández ON, Assuero SG (2019b) Hongos endófitos en festuca alta: del problema a las soluciones. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **45**, 292-303.

Petigrosso LR, Vignolio OR, Damiano I, Echeverria M, Colabelli MN, Gundel PE (2019c) Erradication of the fungus *Epichloë*

coenophiala from *Schedonorus arundinaceus* (tall fescue) seeds by interrupting the vertical transmission process. *Ecología Austral* **29**, 55-62.

Petigrosso LR, Cantón G (2022) Estrategias de manejo de festuca tóxica. ALPA en el Campo **1**, 11-13.

Plumlee KH (2004) Mycotoxins. En ´Clinical Veterinary Toxicology´. (Ed. KH Plumlee) pp. 231-281. (Mosby: St. Louis, MO).

Poo JI, Lobo JI, Cantón G, Moreno F, Urtizbiria FN (2020) Distribución de festuca alta infectada con el endófito *Epichloë coenophiala* en la Provincia de Buenos Aires. *Revista Argentina de Producción Animal* **40** Supl. 1**,** 11.

Principi MA, Mattana RR, Cardinali OP, Colodro JL (2011) Diseño y prestaciones de un prototipo de siembra directa para intersiembra de pasturas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **37**, 54-61.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ramírez de Gulielmone AE, Segal GL, Bilotti LG, Cossu ME, Nougus AT (1988) Fungicidas sistémicos para el control del endófito de festuca en semilla. *Revista CREA* **129**, 47-53.

Realini FM, Escobedo VM, Ueno AC, Bastías DA, Schardl CL, Biganzoli F, Gundel PE (2024) Anti-herbivory defences delivered by *Epichloë* fungal endophytes: a quantitative review of alkaloid concentration variation among hosts and plant parts. *Annals of Botany* **133**, 509-520.

Rivera M, Dorsch M, Cheuquepán F, Artía L, Cantón G, Odriozola E (2017) Análisis retrospectivo de brotes de síndrome distérmico en bovinos de la región pampeana (1998-2017). 1º Congreso Regional de Toxicología Veterinaria. Montevideo, Uruguay.

Rogers WM, Roberts CA, Andrae JG, Davis DK, Rottinghaus GE, Hill NS, Kallenbach RL, Spiers DE (2011) Seasonal fluctuation of ergovaline and total ergot alkaloid concentrations in tall fescue regrowth. *Crop Science* **51**, 1291-1296.

Rottinghaus GE, Garner GB, Cornell CN, Ellis JL (1991) HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 112-115.

Saha CD, Jackson MA, Johnson-Cicalese JM (1988) A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. *Phytopathology* **78**, 237-239.

Saiga S, Kodoma Y, Takahashi H, Tsuiki M (2003) Endophyte removal by fungicides from ramets of perennial ryegrass and tall fescue. *Grass and Forage Science* **48**, 504-509.

Saikkonen K, Gundel P, Helander M (2013) Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology* **39**, 962-968.

Schardl CL, Phillips TD (1997) Protective Grass Endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Disease* **81**, 430-438.

Scheneiter JO, Kaufmann II, Ferreyra AR, Llorente RT (2015) The herbage productivity of tall fescue in the Pampas region of Argentina is correlated to its ecological niche. *Grass and Forage Science* **71**, 403-412.

Scheneiter JO, Kaufmann II (2016) La zona óptima de productividad forrajera de festuca alta en la región pampeana. *Revista de Tecnología Agropecuaria* **10**, 38-42.

Siegel MR, Johnson MC, Varney DR, Nesmith WC, Buckner RC, Bush LP, Burrus PB, Jones TA, Boiling JA (1984) A fungal endophyte of tall fescue: incidence and dissemination. *Phytopathology* **74**, 932-937.

Strickland JR, Looper ML, Matthews JC, Rosenkrans CF, Flythe MD, Brown KR (2011) St. Anthony's fire in livestock: Causes, mechanisms, and potential solutions. *Journal of Animal Science* **89**, 1603-1626.

Vinton MA, Horning JL (2001) A Fungal endophyte in Canada Wild Rye: Studies on its occurrence, detection and elimination. Proocedings 17th N.A. Prairie Conference. pp. 79-84.

Williams MJ, Backman PA, Crawford MA, Schmidt SP, King CC (1984) Chemical control of the tall fescue endophyte and its relationship to cattle performance. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **12**, 165-171.

Young CA, Hume DE, Mcculley RL (2013) Forages and pastures symposium: fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: pasture friend or foe? *Journal of Animal Science* **91**, 2379-2394.