

Incidencia de *Neotyphodium coenophialum* en semillas comerciales de festuca alta en la región Pampeana

Santiago Germán Delgado^{1,3}; Mabel Noemí Colabelli¹; María Gloria Monterubbianesi¹; Sara Isabel Alonso¹; Anna Peretti¹ & José Pedro De Battista²

¹Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP. Unidad Integrada Balcarce. CC 276 (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina; ²INTA EEA-Concepción del Uruguay. CC 6 (3260) Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina; ³delgadosantiago@hotmail.com

Delgado, Santiago Germán; Mabel Noemí Colabelli; María Gloria Monterubbianesi; Sara Isabel Alonso; Anna Peretti; José Pedro De Battista (2013). Incidencia de *Neotyphodium coenophialum* en semillas comerciales de festuca alta en la región Pampeana. Rev. Fac. Agron. Vol 112 (2): 97-104

El objetivo del trabajo fue evaluar el porcentaje de infección del endófito *Neotyphodium coenophialum* en semillas comerciales de festuca alta en la región Pampeana Argentina durante la campaña 2007-2008. Se analizaron 45 muestras de semillas comerciales de festuca. De cada muestra, al menos 100 semillas fueron analizadas individualmente por coloración directa y observación microscópica para detectar el endófito. El porcentaje de muestras con infección inferior o igual al 5% fue de 87%, significativamente superior al valor reportado en año 2000 de 68% ($p=0,001$). Se aportó un dato más a favor de la tendencia de comercializar semillas de festuca alta que cumplan con la reglamentación vigente.

Palabras clave: hongo endófito, *Festuca arundinacea*, calidad de semillas, "festucosis".

Delgado, Santiago Germán; Mabel Noemí Colabelli; María Gloria Monterubbianesi; Sara Isabel Alonso; Anna Peretti; José Pedro De Battista (2013). *Neotyphodium coenophialum* incidence in tall fescue seeds trade in the Pampas region. Rev. Fac. Agron. Vol 112 (2): 97-104

The aim was to assess the percentage of *Neotyphodium coenophialum* infection of commercial seeds of tall fescue in the Argentinean Pampas during 2007/08. Forty-five samples of fescue seeds were analyzed. Of each sample, unless 100 seeds/sample were both stained and observed by microscope to detect the endophyte. The value of 87% of seed samples, which the infection did not exceed the 5%, was significantly higher than the reported value in 2000 of 68% ($p=0,001$). Data in favor of the trend of tall fescue seed market in line with current regulations was provided.

Key words: endophytic fungi, *Festuca arundinacea*, seed quality, "festucosis".

Recibido: 28/09/2012

Aceptado: 05/08/2013

Disponible on line: 28/08/2013

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

La asociación del hongo endófito presente en las pasturas de festuca alta, *Festuca arundinacea* Schreb., (= *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort), responsable de la toxicidad para el ganado en pastoreo, ha significado un cambio drástico en la producción agrícola-ganadera mundial (Bacon et al., 1977; Fletcher & Harvey, 1981). Desde su descubrimiento se ha incrementado el interés por conocer la relación endófito-pasto, que ha sido registrada en más de 200 especies de gramíneas, centrándose el estudio en los pastos de valor forrajero (White, 1987; Bacon & De Battista, 1991; De Battista et al., 1997; Colabelli & Torres, 2008). Los endófitos del género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin (Glenn et al., 1996), que se identifican por presentar hifas conspicuas que rara vez se ramifican (Siegel et al., 1987), son los más estudiados debido a que infectan forrajeras de importancia económica como festuca alta, raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) y raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). La festuca alta mantiene una asociación simbiótica mutualista con el hongo *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones & Gams) Glenn, Bacon & Hanlin. De igual manera, el raigrás perenne es colonizado por *N. lolii* (Latch, Samuels & Christensen) Glenn, Bacon & Hanlin y el raigrás anual por *N. occultans* Moon, Scott & Christensen.

La infección de endófitos de este género es asintomática, se desarrolla intercelularmente en vástagos, en inflorescencias y en semillas de la planta huésped y sólo se propaga vía semillas infectadas (Clay & Schardl, 2002). La planta infectada tiene ventajas competitivas sobre la planta no infectada, bajo condiciones edáficas limitantes (Malinowski & Belesky, 2000). También se ha observado mayor macollaje y producción de semillas (Rice et al., 1990; De Battista et al., 2006) y tolerancia a estrés biótico y abiótico en las plantas infectadas respecto a las no infectadas, lo que favorece la persistencia de ellas (Cheplick & Clay, 1988; Malinowski et al., 1998; Schmid & Christensen, 1999; Vila Aiub et al., 2005; Assuero et al., 2006). A pesar de esos rasgos positivos de la asociación, las diferentes especies de endófito sintetizan alcaloides en diferentes niveles y combinaciones. En plantas de festuca alta infectadas se acumulan, en mayor nivel lolinas, luego ergoalcaloides, y peramina. En plantas de raigrás perenne se acumulan en mayor medida peramina en relación con ergoalcaloides y lolitremos (Bush et al., 1997). TePaske et al., (1993) han detectado la presencia de lolinas en plantas de raigrás anual infectadas con endófito. Los ergoalcaloides, como la ergovalina que se asocia con la "festucosis", son los responsables de la toxicidad en el ganado produciendo pérdidas en la ganancia de peso, elevación de la temperatura corporal, vasoconstricciones, pérdidas reproductivas y en producción de leche. Los lolitremos acumulados en raigrás perenne son los causantes del "temblequeo del raigrás" en el ganado. Tanto la peramina como las lolinas tienen su mayor efecto en la defensa de la planta contra los insectos (Bush et al., 1997). Se ha demostrado que *N. coenophialum* inicia la síntesis de alcaloides ante señales químicas que emite la festuca luego de un daño, aún cuando éste sea muy pequeño como ser una picadura de pulgón. La

estrategia de la planta estaría asociada a destinar compuestos nitrogenados al endófito no solo para la defensa de ambos individuos sino también para mantener un bajo porcentaje de nitrógeno en hojas lo que las haría menos palatable para el ganado (Sullivan et al., 2007).

La importancia agro-económica de la infección de endófitos del género *Neotyphodium* está relacionada con la distribución y el uso de los pastos de alto valor forrajero que se cultivan en Argentina. Se han realizado estudios sobre la calidad comercial de las semillas de festuca alta ofrecidas en el mercado y uno de sus enfoques ha sido la incidencia de endófito. Entre los años 1986 y 1988, para la zona del norte de Buenos Aires, más del 60 % de los lotes de semillas estaban fuera de condición para ser comercializados y la principal limitante era la infección con endófito (Bazzigalupi et al., 1993). A causa del efecto perjudicial de las pasturas de festuca alta infectadas con endófito sobre la producción ganadera, el Instituto Nacional de Semillas (INASE), en su Resolución 067/95 ha establecido niveles de tolerancia del hongo en semillas de festuca ofrecidas en el mercado; sólo se aceptan porcentajes de infección inferiores al 5%, y dicha información debe acompañar los rótulos de los lotes comercializados (INASE, 1995). De Battista et al., (1995) estudiaron la incidencia de *N. coenophialum* en la oferta de semilla de festuca alta en Argentina durante el período 1987-1994. Ellos observaron que en ese período hubo una importante disminución de muestras de semillas con elevado nivel de infección y a una tasa anual de 4,18 %. El 62% del total de las muestras analizadas tenían un nivel de infección bajo como para ser usado en la implantación de pasturas y que se encontraban por debajo del umbral de seguridad establecido por INASE para la comercialización de festuca alta. Estudios posteriores mostraron que el porcentaje de muestras con endófito inferior al 5% de infección incrementó a 68% para el período 1995-2000, a una tasa de disminución de 4,7 % anual de muestras con altos valores de infección (De Battista et al., 2001). Para el área templada húmeda, se desconocen los valores actuales de incidencia de *N. coenophialum* en los lotes de semilla comercial de festuca alta disponibles para la implantación de pasturas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de *N. coenophialum* en semillas comerciales de festuca alta, disponibles en la región Pampeana durante la campaña agrícola 2007-2008.

METODOLOGÍA

En el Laboratorio de Análisis de Semillas de la Unidad Integrada Balcarce (Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP / EEA INTA Balcarce) fueron analizadas 45 muestras de semillas de 31 cultivares de festuca alta identificados y 7 cultivares no identificados. Las muestras fueron proporcionadas por diferentes entidades públicas y privadas (Tabla 1).

Previo al diagnóstico del hongo endófito, se realizó el análisis de pureza físico-botánica; para ello se pesaron 5 g de semillas/muestra, se las pasó por un soplador y posteriormente se analizó cada fracción utilizando un microscopio estereoscópico (lupa) con aumento 40x.

Tabla 1. Datos de referencia de los cultivares de festuca alta analizados. Referencias: NZ= Nueva Zelanda; USA= Estados Unidos; FRA= Francia; SWE= Suecia; ARG=Argentina; s/d= sin dato.

Nº muestra	Cultivar	Obtendor del cultivar en INASE	Origen	Nº muestra	Cultivar	Obtendor del cultivar en INASE	Origen
1	Belfine	Semillería Guasch S.R.L.	SWE	24	GFM 10	Gentos S.A.	s/d
2	Brava INTA a	INTA	ARG	25	Grassland Advance a	Gentos S.A.	NZ
3	Brava INTA b	INTA	ARG	26	Grassland Advance b	Gentos S.A.	NZ
4	Carona	Semillas Biscayart S.A	ARG	27	Grassland Advance c	Gentos S.A.	NZ
5	Don Armando	Romat Armando M.	ARG	28	KWS Keops a	KWS Argentina S.A.	ARG
6	Enforcer	KWS Argentina S.A.	USA	29	KWS Keops b	KWS Argentina S.A.	ARG
7	Forager	Criadero SPS S.A.	USA	30	Martín II	Semillas Biscayart S.A.	USA
8	Fawn	Criadero SPS S.A.	USA	31	Maximize	Turf Seed, INC	USA
9	Festival	Fer Cooperative	USA	32	Mylena	Societe RAGT	FRA
10	Sin identificar	s/d	s/d	33	Palenque Plus	INTA EEA Pergamino	ARG
11	Sin identificar	s/d	s/d	34	Quantum	Wrightson Seeds LTD.	NZ
12	Sin identificar	s/d	s/d	35	Reina a	Enrique O. Ducos e Hijos	ARG
13	Sin identificar	s/d	s/d	36	Reina b	Enrique O. Ducos e Hijos	ARG
14	Sin identificar	s/d	s/d	37	Royal Q 100 a	Gentos S.A.	ARG
15	Sin identificar	s/d	s/d	38	Royal Q 100 b	Gentos S.A.	ARG
16	Sin identificar	s/d	s/d	39	Savory	s/d	s/d
17	Flecha a	Gentos S.A.	ARG	40	SJ Pampera	Semillería Jáuregui S.R.L.	ARG
18	Flecha b	Gentos S.A.	ARG	41	Taita	Gentos S.A.	ARG
19	Flexible FCAR	Facultad Cs. As. Rosario	ARG	42	Tar hell	Turf Seed, INC	USA
20	G - 501 - 03	Gentos S.A.	s/d	43	Vaquera	s/d	s/d
21	GDF 23	Gentos S.A.	s/d	44	Vegas	Semillería Guasch S.R.L.	USA
22	GFAL 40	Gentos S.A.	s/d	45	Vulcan	Wrightson Seeds LTD.	NZ
23	GFM 04	Gentos S.A.	s/d				

Para un confiable diagnóstico de infección de endófito en cuanto al número de semillas a analizar, se consideró lo propuesto por Peretti (1994) y se tomaron al menos 100 semillas de cada fracción de semilla pura para ser analizadas individualmente a fin de detectar la presencia del endófito. El diagnóstico del hongo se realizó mediante el protocolo de Saha et al. (1988), que consistió en sumergir las 100 semillas de festuca seleccionadas en hidróxido de sodio (Na (OH) al 5%) a temperatura ambiente por 12 horas; luego se enjuagaron con agua, se colocaron, cada una, en un portaobjetos, se separaron las glumelas de cada antecio maduro y se las tiñó (coloración directa) con una gota de colorante rosa de bengala durante unos minutos. Posteriormente se colocó un cubreobjetos y cada una de las semillas fue observada al microscopio

óptico con un aumento de 10x, 40x y 400x. Se registró la presencia o ausencia de hifas del hongo teñidas entre las células de la capa de aleurona de la cubierta seminal. Las semillas que contenían el endófito fueron diagnosticadas como positivas (E+) y las no infectadas como negativas (E-).

A través de la metodología de prueba de hipótesis sobre la proporción de una distribución binomial basada en la distribución exacta (Infante Gil & Zárate de Lara, 1990), se probó que la proporción de muestras con porcentaje de E+ menor o igual al 5% supera el 68%, referenciado por De Battista et al. (2001). Se utilizó un nivel de significancia de 0,05 ($\alpha= 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el programa R 2.15.1. (R Core Team, 2012).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Del análisis físico-botánico surgió que 18 muestras (40%) estaban libres de semillas de otras especies (Tabla 2). De las 27 muestras que presentaron semillas extrañas (60%), solamente en 6 de ellas se encontraron semillas de *Lolium* spp., aunque en porcentajes bajos (de 0,2 a 1,3%).

Se detectó a través del microscopio la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* entre las células con aleurona de las semillas, con hifas de aspecto sinuoso y ausencia de ramificaciones, como puede

observarse en la Figura 1 en semillas del cultivar Vaquera.

En base a los rangos de infección establecidos por De Battista et al. (2001), los porcentajes de infección con el endófito que presentaban las muestras se ubicaron en los siguientes cinco rangos: 0; 0,1-5; 5,1-20; 20,1-40 y > 40 % de infección y se estableció la frecuencia de cada uno de ellos (Figura 2). El porcentaje de muestras de cultivares de festuca con semillas con infección no mayor al 5% provenientes de la región pampeana aumentó, pasando de 68% a 87%, siendo este último registro significativamente superior ($p=0,001$) al valor reportado por De Battista et al. (2001).

Tabla 2. Resultado de los análisis de pureza físico-botánica en las muestras de semillas de festuca alta y diagnóstico de *N. coenophialum* en las mismas. Referencias: s/d: sin dato debido a que la muestra de semilla provenía curada lo cual dificultó la identificación.

Cultivar	Infección (%)	Pureza (%)	Materia Inerte (%)	Semillas extrañas (%)	Especies de semillas extrañas
Belfine	1	96	3,1	0,4	<i>Echinochloa crus-galli</i>
Brava INTA	0	94	1,5	3,8	<i>Rumex crispus</i> L.; <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
Brava INTA	0	98	0,5	0,5	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
Carona	0	95	4,4	0	---
Don Armando	0	98	0,9	0,7	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Airy-Shaw; <i>Calystegia soldanella</i> (L.)
Enforcer	0	97	2,5	0,2	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Airy-Shaw
Forager	0	98	1,4	0,3	<i>Cynara cardunculus</i> L.
Fawn	0	97	1,9	0,5	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
Festival	0	99	0,9	0	---
Sin identificar	0	97	2	1	<i>Eragrostis virescens</i>
Sin identificar	0	99	1	0	---
Sin identificar	0	99	1	0	---
Sin identificar	0	98	1	1	<i>Eragrostis virescens</i>
Sin identificar	0	97	2	0	---
Sin identificar	69	98	1,3	0,4	<i>Cynara cardunculus</i> L.; <i>Eragrostis virescens</i>
Sin identificar	2	98	1,6	0	---
Flecha	0	99	0,9	0	---
Flecha	0	99	0,4	0,2	s/d
Flexible FCAR	0	93	5,9	0,3	<i>Cynara cardunculus</i> L.; <i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Airy-Shaw
G – 501 – 03	0	97	2,3	0,1	s/d

Tabla 2. Continuación

Cultivar	Infección (%)	Pureza (%)	Materia Inerte (%)	Semillas extrañas (%)	Especies de semillas extrañas
GDF 23	0	99	0,9	0	---
GFAL 40	0	97	0,6	1,9	<i>Cynara cardunculus</i> L.; <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn
GFM 04	1	99	0,5	0	---
GFM 10	0	98	0,8	0,7	<i>Eragrostis virescens</i> ; <i>Setaria</i> sp.; <i>Lolium</i> spp.
Grassland Advance	0	98	0,6	0,7	<i>Cynara cardunculus</i> L.
Grassland Advance	14	89	10	1	<i>Eragrostis virescens</i> ; <i>Lolium</i> spp.; <i>Portulaca oleracea</i> L.; <i>Dactylis glomerata</i> L.
Grassland Advance	1	98	1,1	0,3	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn; <i>Lamium amplexicaule</i> L.
KWS Keops	0	97	2,9	0	---
KWS Keops	0	96	3,2	0,2	<i>Tagetes minuta</i> L.
Martín II	0	95	0,9	3,6	<i>Cynara cardunculus</i> L.; <i>Eragrostis virescens</i>
Maximize	0	98	1,5	0	---
Mylena	0	98	1,3	0	---
Palenque Plus	0	97	2,1	0	---
Quantum	0	98	1,4	0,3	<i>Lolium</i> spp.
Reina	0	98	1,5	0,5	<i>Eragrostis virescens</i>
Reina	0	93	6,1	0,3	<i>Lolium</i> spp.
Royal Q 100	0	99	0,9	0	---
Royal Q 100	0	99	0,8	0	---
Savory	0	98	0,4	1,3	<i>Lolium</i> spp.
SJ Pampera	0	97	2,8	0	---
Taita	0	98	1	0	---
Tar hell	56	99	1	0	---
Vaquera	38	99	0,3	0,3	<i>Cynara cardunculus</i> L.
Vegas	16	98	1,7	0,2	<i>Lolium</i> spp.
Vulcan	6	98	0,9	0,9	<i>Brassica campestris</i> L.

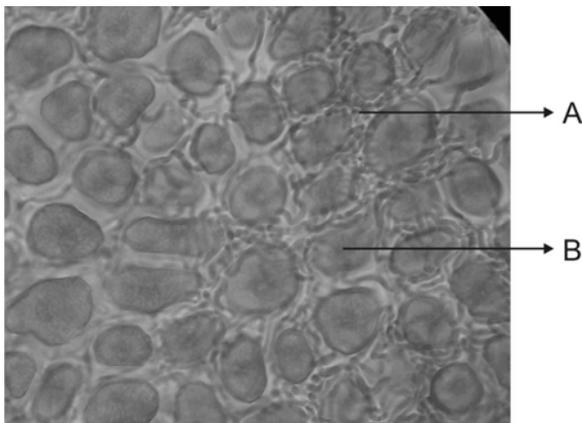


Figura 1. A: Hifas del hongo endófito *Neotyphodium coenophialum*. B: Células con aleurona. La foto corresponde a una semilla del cultivar Vaquera. Aumento: 400 x.

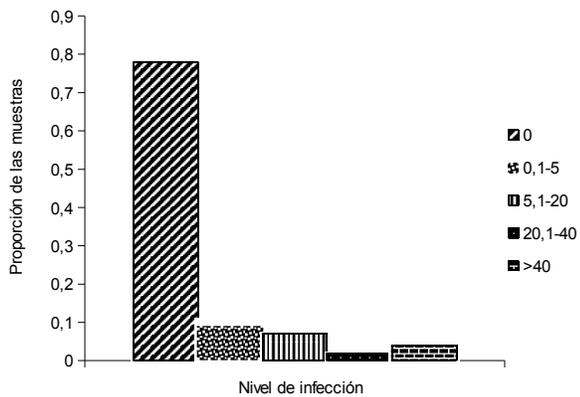


Figura 2. Histograma de frecuencia para el nivel de infección (%) con el hongo endófito *Neotyphodium coenophialum* en muestras de festuca alta.

Si se analiza la procedencia de los cultivares, puede observarse que los de Argentina presentaron nula infección con *Neotyphodium coenophialum* (Tablas 1 y 2). En cambio, no ocurrió lo mismo entre los cultivares extranjeros y los no identificados.

Desde el punto de vista de la producción ganadera, esto significaría que actualmente se comercializa una mayor proporción de semillas libres del hongo, lo que haría disminuir el potencial número de casos de toxicidad para el ganado en pastoreo. La nula infección detectada en cultivares argentinos y de origen conocido probablemente se deba a la Resolución vigente desde el año 1995 sancionada por el INASE, en la cual se expresa claramente que el porcentaje máximo de tolerancia de infección para semillas de categoría identificada es del 5%. De lo anterior cabe mencionar que aquellos lotes de semillas, ya sean argentinas o extranjeras, que superen dicho valor también pueden ser comercializados pero con la correspondiente

aclaración en el rótulo que indique que están fuera de tolerancia.

Las muestras de cultivares de origen extranjero fueron las que mostraron valores de porcentaje de infección muy variables, aún dentro del mismo cultivar, como por ejemplo el cultivar Grassland Advance, de origen neozelandés, del cual se analizaron tres muestras de diferente procedencia, las que variaron entre 0 y 14% de infección (Tabla 2). Las diferencias entre muestras del mismo genotipo podrían deberse a que se multiplicaron en ambientes diferentes. El uso de festuca infectada con endófito salvaje (tóxico) es muy recomendable y muy utilizado en Estados Unidos para situaciones donde el destino de la semilla es el césped. Es posible que algunos de los cultivares evaluados sean destinados a céspedes como por ejemplo el cultivar Tar Hell (56% de infección, Tabla 2).

Los siete cultivares sin identificar analizados presentaron niveles variables de infección del endófito (0-69%). Estos cultivares son parte de la producción de semillas no fiscalizadas reportadas por la Cámara de Semillistas de la Bolsa de Cereales, que en el 2009 han representado un 20% de la oferta total de semillas en el mercado (CSBC, 2009).

El problema de toxicidad potencial en una pastura de festuca alta puede ser evitado con el uso de semilla no infectada (De Battista, 2005). Las semillas que presentan altos niveles de infección pueden ser usadas para la siembra de la pastura siempre y cuando se tomen algunos recaudos para disminuir la viabilidad del hongo por debajo del umbral establecido. Para ello existen métodos biológicos y químicos. El almacenamiento de la semilla es un factor muy importante a tener en cuenta. Para disminuir significativamente la viabilidad del hongo, sin reducir la viabilidad de las semillas o hacerlo solo en muy baja proporción, se recomienda el almacenamiento por no más de un año, en condiciones de temperatura de 20 °C y alta humedad relativa (75%), o temperatura de 40 °C y 43 % de humedad relativa (Gundel et al., 2009). Por otra parte, una mala condición de almacenamiento como ser la alta temperatura y humedad, la presencia de endófitos afecta la calidad de la semilla tanto en su tasa de germinación como en el envejecimiento de la misma (Gundel et al., 2012). Como método químico de control, Costa & De Battista (1988) descubrieron que el uso de un fungicida sistémico (Triadimenol) baja la viabilidad de las hifas del hongo en las semillas; este método es eficiente siempre y cuando el nivel de infección sea menor al 70%.

El relevamiento de los niveles de infección del hongo endófito en semillas para la comercialización es un valioso indicador de la calidad de las semillas de esa especie que se ofrecen al mercado de forrajeras. Por lo tanto, dicho monitoreo debe seguir haciéndose en el futuro, no sólo en cultivares de festuca alta sino también en otras especies susceptibles de infección con endófitos causantes de toxicidad al ganado, como raigrás perenne. En tales estudios sería importante poder determinar la zona de origen o de multiplicación de la semilla que se va a comercializar, a fin de recabar información sobre una posible incidencia diferencial de los endófitos por región o zona de procedencia. Se reconoce como importante que los datos de los niveles de infección deben acoplarse con información de lotes,

procedencia y viabilidad del hongo para poder tomar, tanto los productores como los profesionales, decisiones que ayuden a mejorar la eficiencia de producción en los sistemas ganaderos.

Si bien el nivel de infección con endófito, tanto en incidencia como en viabilidad, es un dato muy importante como parámetro de calidad, no es el único que se debe tener en cuenta cuando se decide comprar una semilla. Bazzigalupi et al. (2009) mostraron que el 66 % de las semillas de festuca alta ofrecidas en el mercado para el norte de provincia de Buenos Aires, no eran aptas para ser comercializadas porque no cumplían con las normas de calidad establecidas por el Servicio Nacional de Semillas (SENASA, 1988) de SENASA. Estos autores mostraron que las semillas de festuca deben ser analizadas por su poder germinativo, pureza y nivel de endófito en el período comprendido entre la compra y el momento previo a la siembra.

CONCLUSIONES

El porcentaje de muestras de festuca alta de la región Pampeana Argentina, con semillas infectadas con no más del cinco por ciento del endófito, aumentó, pasando en los últimos 7 años de 68% a 87%.

Todos los cultivares de origen argentino conocido presentaron un nivel de infección con endófito en sus semillas de 0%, mientras que los cultivares de origen extranjero o desconocido, mostraron una gran variación en el porcentaje de infección (0-56%)

Este trabajo aportó como dato relevante que los controles planteados por el estado a fin de reducir la comercialización de simiente infectada con endófito en alta proporción, han sido efectivos, aumentando la proporción de lotes comercializables que cumplen con los requisitos establecidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Profesionales y Empresas que otorgaron los materiales para ser analizados, Jorge Castaño, Mercedes Echeverría, Mónica Moreno, Ana María Ibarra, como asimismo a Criadero El Cencerro SA y Semillas Biscayart SA. Del mismo modo, agradecemos a la Universidad Nacional de Mar del Plata el financiamiento de este trabajo a través de los Subsidios 15/A284 y 15/A345.

BIBLIOGRAFÍA

Assuero, S.G., J.A. Tognetti, M.R. Colabelli, M.G. Agnusdei, E.C. Petroni & M.A. Posse. 2006. Endophyte infection accelerates morpho-physiological responses to water deficit in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 49: 359-370.

Bacon, C.W., J.K. Porter, J.D. Robbins & E.S. Luttrell. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 576-581.

Bacon, C.W. & J. De Battista. 1991. Endophytic fungi of grasses. En: *Handbook of Applied Mycology*. V. 1. Soils and Plants. Arora, D.K., B. Rai, K.G. Mukerji & G.R. Knudsen (coordinadores). Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 231-257.

Bazzigalupi O., M. Arango, B. Rosso, S. Carletti, S. Re & A. Harries. 1993. Calidad de la semilla de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) en el norte de la provincia de Buenos Aires. Informe técnico N°271. INTA EEA-Pergamino. 15 p.

Bazzigalupi O., A. Font, A. Llera, O. Bertín & C. Aquilano. 2009. Diagnóstico 2008 de calidad de semilla de festuca alta (*Festuca arundinacea*) en la región norte de la provincia de Buenos Aires. *Revista Análisis de Semillas* 3: 92-95.

Bush, L.P., H.H. Wilkinson & C.L. Schardl. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* 114: 1-7.

Cámara de Semilleristas de la Bolsa de Cereales (CSBC). 2009. Mercado. Mercado local de semillas forrajeras templadas. Disponible en <http://www.csbc.com.ar/mercado.php>. Último acceso: Agosto 2012.

Cheplick, G. & K. Clay. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 52: 309-318.

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

Colabelli, M.N. & M.S. Torres. 2008. Incidencia e importancia de los endófitos en pastizales naturales y pasturas de América del Sur. Simposio. 6° Congreso Latinoamericano de Micología. Mar del Plata. pp. 66.

Costa, M.C. & J.P. De Battista. 1988. Tratamiento de semilla para el control de *Acremonium coenophialum* en *Festuca arundinacea*. *Revista Argentina de Producción Animal* 8 (4): 289-294.

De Battista, J.P. 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. In: Roberts, C.; West, C.; Spiers, D. (eds.). *Neotyphodium* in Cool Season Grasses. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp. 63-69.

De Battista, J., M. Fernández Osuna, J. Medvescigh & M. Costa. 2006. Efecto del endófito fúngico *Neotyphodium occultans* sobre la producción de semilla de *Lolium multiflorum*. *Revista Argentina de Producción Animal*, Vol. 26 (Supl. 1), CD Rom.

De Battista, J., A. Peretti, M. Sala, I. Schultz, M. Costa, E. Picardi, A. Salvat, J. Medvescigh & O. Bazzigalupi. 2001. Evolution of the incidence of *Neotyphodium coenophialum* infection on tall fescue seed market in Argentina. Period 1995-2000. Proceedings on the Seed Symposium of the ISTA 26th Congress. Angers, Francia. pp. 4.

De Battista, J., N. Altier, D.R. Galdames & M. Dall'Agnol. 1997. Significance of endophyte toxicosis and current practices in dealing with the problem in South America. En: *Neotyphodium/Grass Interactions*. Bacon, C.W. & N.S. Hill (coordinadores). Ed. Plenum Press, New York. pp. 383-388.

De Battista, J., A. Peretti, S. Carletti, A. Ramirez, M. Costa & I. Schultz. 1995. Evolución de la incidencia de la infección de *Acremonium coenophialum* en la oferta de semilla de festuca alta en Argentina. Período 1987-1994. *Revista Argentina de Producción Animal* 15: 300-302.

Fletcher, L.R & I.C. Harvey. 1981. An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *The New Zealand Veterinary Journal* 29: 185-186.

- Glenn, A.E., C.W. Bacon, R. Price & R.T. Hanlin.** 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88: 369-383.
- Gundel, P.E., M.A. Martínez- Ghera, L.A. Garibaldi & C.M. Ghera.** 2009. Viability of *Neotyphodium* endophytic fungus and endophyte-infected and noninfected *Lolium multiflorum* seeds. *Botany* 87: 88-96.
- Gundel, P.E., M.A. Martínez- Ghera & C.M. Ghera.** 2012. Threshold modelling *Lolium multiflorum* seed germination: effects of *Neotyphodium* endophyte infection and storage environment. *Seed Science and Technology* 40: 51-62.
- Infante Gil, S. & G. Zárate de Lara.** 1990. Métodos Estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. 2^{da} ed. Ed. Trillas. México. pp. 304-307.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE).** 1995. Resolución 067/95. Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA). Febrero 1995, 4 p.
- Malinowski, D.P. & D.P. Belesky.** 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40: 923-940.
- Malinowski, D.P., D.P. Belesky, N.S. Hill, W.C. Baligar & J.M. Fedders.** 1998. Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil* 198: 53-61.
- Peretti, A.** 1994. Manual para análisis de semillas. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 281 pp.
- R Core Team.** 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. Disponible en: <http://www.R-project.org>. Último acceso: Agosto 2012.
- Rice, J., B. Pinkerton, W. Stringer & D. Undersander.** 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. *Crop Science* 30: 1303-1305.
- Saha, D.C., M.A. Jackson & J.M. Johnson-Cicalese.** 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. *Phytopathology* 78: 237-239.
- Schmid, J. & M.J. Christensen.** 1999. Ryegrass endophyte: host fungus interactions. En: *Ryegrass Endophyte: An Essential New Zealand Symbiosis*. Grassland Research and Practice Series 7: 101-106.
- Servicio Nacional de Semillas (SENASA).** 1988. Resolución 12/88. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Junio 1988. 19p.
- Siegel, M.R., G.C.M. Latch & M.C. Johnson.** 1987. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Phytopathology* 25: 293-315.
- Sullivan, T.J., J. Rodstrom, J. Vandop, J. Librizzi, C. Graham, C.L. Schardl & T.L. Bultman.** 2007. Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytologist* 176: 673-679.
- TePaske, M.R., R.G. Powell & S.L. Clement.** 1993. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2299-2303.
- Vila Aiub, M.M., P.E. Gundel & C.M. Ghera.** 2005. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology* 30: 49-57.
- White, J.F., Jr.** 1987. The widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. *Plant Disease* 71: 340-342.