

## ENSAYO CON FITOTERAPICOS PARA LA ERRADICACION DEL ENDOFITO ACREMONIUM COENOPHIALUM EN SEMILLAS DE FESTUCA

L.G. BILOTTI (1,3); MIRTA B. GUGLIELMONI (2,3); G.J. SEGAL (2,3);  
MARIA E. COSSU (3); C. ROIG (3) y ALICIA E. RAMIREZ de GUGLIELMONE (3)

Recibido:09-01-89

Aceptado:03-04-89

### RESUMEN

La semilla de *Festuca alta* (*Festuca arundinacea* Schreb) infectada con *Acremonium coenophialum* produce plantas tóxicas al pastoreo directo. El control del endófito en semilla de contaminación media (60%) se ensayó según los siguientes tratamientos en dosis de p.a./kg de semilla: I-carbendazim: 16,2 g; II-benomil: 8,0 g; III- benomil: 16,0 g; IV-triadimenol: 2,4 g; V triadimenol: 4,8 g;VI- sin funguicida (testigo). Las semillas se sembraron (cada tratamiento por triplicado) en microparcelas distribuidas en bloques completos aleatorizados. Durante 2 años, en las plantas obtenidas se determinó, bimestralmente, la contaminación fúngica y, semestralmente, el contenido de alcaloides pirrolizidínicos. En semillas obtenidas de 2 cosechas consecutivas de cada tratamiento se determinó la infección endofítica. Los resultados obtenidos indican: a) Los respectivos funguicidas de los tratamientos I, II y III fueron insuficientemente efectivos en el control del endófito de semilla, cuyo desarrollo fue el esperado en el tratamiento VI. En cambio, los tratamientos IV y V pueden ser considerados exitosos para aquel objetivo. b) La constancia en el tiempo del control obtenido mediante ambos tratamientos con triadimenol sugiere que el efecto no puede ser atribuido a latencia temporaria del endófito sino a su erradicación.

**Palabras clave:** toxicidad de festuca; control del endófito de semilla de festuca.

### ASSAY WITH PHYTOTERAPIC FOR THE ACREMONIUM COENOPHIALUM ERRADICATION IN TALL FESCUE SEED

#### SUMMARY

Endophytic infection with *Acremonium coenophialum* in tall fescue seed produces toxic plants for cattle. Control of this endophyte in seed (infection about 60%) was assayed by systemic fungicides. Treatments and rates (g.a.i./kg seed) were: I-carbendazim: 16,2; II-Benomyl: 8,0; III-Benomyl: 16,0; IV-Triadimenol: 2,4; V-Triadimenol: 4,8. A control corresponding to untreated seed was included (Treatment VI). Treated and no treated seeds were sowed in plots (each treatment by triplicate) distributed in a completely randomized design. During two years, the obtained plants were analyzed every two month to determine fungal contamination and, semiannually, for the presence of pyrrolizidinic alkaloids. Seeds obtained from each treatment in two consecutive harvests were also analyzed for endophytic infection. Results indicate: a) The respective fungicides of the treatments I, II, and III failed in the proper seed fungus control, being the endophyte development as was expected in the treatment VI. Instead, treatments IV and V can be considered successful for the search purpose. b) The long term duration of the control of the seed endophyte by both triadimenol treatments suggests a fungal eradication rather than a temporary state of latency.

**Key words:** tall fescue toxicity; control of the tall fescue seed endophyte.

(1) Becario de A.A.C.R.E.A.; (2) Becario del CONICET; (3) Cátedra de Bioquímica, Dpto. de Química. Facultad de Agronomía UBA. (C. Roig realizó el análisis estadístico de los resultados).  
Avda. San Martín 4453. (1417) Buenos Aires -Argentina-

## INTRODUCCION

La gramínea forrajera perenne de más amplia difusión en la Argentina es la *Festuca alta* (*Festuca arundinacea* Schreb.). En detrimento de sus valiosas condiciones agronómicas, produce, con frecuencia indeseable, cuadros de toxicidad al pastoreo directo. Es aún discutida la naturaleza del o los principios activos responsables, pero se sabe que todas las festucas tóxicas poseen niveles elevados de alcaloides pirrolizidínicos o lolinas (Ramírez de Guglielmone et al., 1980; Bush et al., 1982), e infección fúngica endofítica con *Acremonium coenophialum*, identificado originalmente como *Epichloe typhina* por Bacon et al. (1977) y re-clasificado por Morgan-Jones y Gams, (1982). No se conoce la relación biológica entre ambos indicadores de toxicidad. *A. coenophialum* es un endófito obligado que cumple "in vivo" un ciclo biológico incompleto (Siegel, 1983). Las hifas viables contenidas en la semilla se desarrollan asintóticamente desde los primeros estadios de la germinación, invadiendo luego la inflorescencia y óvulos a los que acompañan en la fecundación. La semilla es, así, el vehículo principal, si no el único, de transmisión de la infección a nuevas plantas.

Controlar el endófito de semilla es, entonces, un objetivo prioritario para evitar la diseminación de su progenie. En un trabajo previo de este laboratorio (Ramírez de Guglielmone et al., 1986) se demostró que la viabilidad de *A. coenophialum* en semilla decrece, espontáneamente, durante los 15 meses posteriores al almacenamiento post-cosecha, hasta valores cercanos a cero. Otro recurso posible es el tratamiento con fitoterápicos sistémicos de la semilla joven infectada, lo que ha sido intentado con éxito, en E.E.U.U. (Williams et al., 1984) y en la Argentina (Costa y De Battista, 1986)

utilizando el principio activo triadimenol en dosis de 4,8-5 g/kg de semilla. Sin embargo, estos ensayos han sido de corta duración, lo que no permite concluir si el control del endófito obtenido fue temporario o definitivo. En un ensayo propio en microparcels (Ramírez de Guglielmone et al., 1988) la semilla, con aproximadamente 60% de contaminación viable, fue tratada con 2,4 g ó 4,8 g de triadimenol/kg, obteniéndose con cualquiera de dichas dosis y durante 3 años, plantas casi libres del endófito. En ese mismo ensayo se comprobó la ineficiencia de otros principios activos utilizados en semilla: metiltiofanato y tiabendazol.

Dado que, en la práctica a campo, los tratamientos de semilla con fitoterápicos sistémicos implican costos no despreciables (los principios activos son importados) y teniendo en cuenta que dosis innecesariamente elevadas conllevan riesgos de fitotoxicidad (Bilotti et al., 1988), en el presente trabajo se pretendió confirmar el control perdurable del endófito con triadimenol en otro lote de semilla, tratada con las mismas dosis antes probadas, e intentar tratamientos con otros fungicidas sistémicos: carbendazim y benomil.

## MATERIALES Y METODOS

### Muestra

Se utilizó semilla de festuca cosechada en diciembre/1985 de una superficie existente en el predio de la facultad de Agronomía, U.B.A. El análisis de contaminación fúngica original de la muestra (la infección contenida en la semilla) indicó un nivel de 100%.

El método utilizado se detalla en "Análisis de semilla" y es una modificación propia del original del Prof. G.B. Garner (Universidad de Columbia--Missouri, E.E.U.U.), no publicado.

### Tratamiento de las semillas

Las semillas se trataron 2 días antes de la siembra, según técnicas de contacto en seco, con cada fungicida sistémico. Los tratamientos y las dosis en g/kg fueron: I- Carbendazim: 16,2; II- Benomil: 8,0; III- Benomil: 16,0; IV- Triadimenol: 2,4; V- Triadimenol: 4,8; VI- semilla sin tratar (testigo). La dosis de fitoterápicos fueron 8 ó 16 veces superiores a las utilizadas habitualmente para curar semilla de trigo, dada la diferencia de tamaño entre ésta y la semilla de festuca y, por consiguiente, la superficie a cubrir.

### Siembra

El 16/4/86 se sembraron microparcelas de 2,0 m x 1,20 m distribuidas según un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones por tratamiento. La densidad de siembra correspondió, de acuerdo al valor cultural, a 600-800 plantas/m<sup>2</sup>.

### Análisis de plantas

1. **Infección fúngica.** A partir de la emergencia, cada 2 meses, se obtuvieron 30 plantas al azar de cada parcela, realizándose el análisis de contaminación fúngica en macollos según método de Ramírez de Guglielmone et al. (1985, b). Esencialmente, éste consiste en separar vaina basal externa de un macollo de cada planta, su tinción B.M. hirviendo, 10 minutos, con solución acuosa de azul de anilina 0,1 % - ácido láctico, 100; 50 y observación al microscopio óptico. Para cada parcela se obtuvo un valor de infección en macollos que representa el porcentaje de infectados respecto del total de analizados. Los resultados se expresan como promedios parciales de las tres repeticiones de cada tratamiento y fecha de muestreo y, además, como promedios totales de los 11 muestreos de cada tratamiento realizados hasta abril/88.

La significancia estadística de las diferencias entre promedios totales de cada tratamiento fue determinada por análisis de varianza según un modelo de parcelas divididas en el tiempo (contrastes ortogonales, Little y Hills, 1976).

El nivel de significancia en todos los casos fue  $P = 0,05$ .

2. **Presencia de alcaloides pirrolizidínicos.** Cada seis meses a partir de la emergencia, y de la parte aérea de las mismas muestras de cada parcela utilizadas para análisis de infección fúngica, se extrajo y purificó la fracción total alcaloidea, que se separó en sus componentes individuales por cromatografía monodimensional descendente, según método ya publicado (Ramírez de Guglielmone et al., 1983). La presencia de lolinas se identificó por tinción con reactivo de iodoplatinato de potasio, considerándose como positiva por la aparición de manchas de Rf 0,16-0,19.

### Análisis de semilla

Tanto la muestra a sembrar como las semillas cosechadas de plantas obtenidas de todos los tratamientos (cosecha 86/87 y 87/88) se analizaron para determinar infección fúngica según método de Ramírez de Guglielmone et al., (1985, a). Consiste, esencialmente, en el ablandamiento de 200 semillas durante 16 hs con NaOH al 3%, lavado hasta neutralidad, tinción por calentamiento directo durante 10 min. en solución acuosa de azul de anilina 0,325 g %-ácido láctico, 100: 50 y observación al microscopio óptico de 100 semillas al azar. Si bien este método no discrimina entre hongo viable o muerto, la infección con *A. coenophialum* se identifica presencia de hifas típicas en la capa aleuronífera (Clark et al., 1983). Los resultados se expresan como porcentaje de semillas infectadas del total de observadas.

Los promedios de infección endoff-

tica en semillas cosechadas de cada tratamiento en un mismo año, se analizaron mediante el test de contrastes ortogonales ( $P = 0,05$ ).

Además, se analizó estadísticamente las diferencias entre promedios en infección endofítica de semilla cosecha 86/87 y la del mismo tratamiento, cosecha 87/88 (test "t" de Student:  $P = 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1- Contaminación endofítica en plantas

De las plantas obtenidas (de semilla tratada y sin tratar) se realizaron 11 muestreos bimestrales desde junio/86 hasta abril/88.

En el cuadro N° 1 se incluyen los porcentajes promedio de infección endofítica en macollos, para las 3 repeticiones de cada tratamiento y muestreo. Puede observarse que, si bien la contaminación fúngica original de la semilla utilizada fue del 100% (ver Materiales y Métodos) las plantas obtenidas de semilla sin tratar presentaron, a lo largo del ensayo, un nivel de contaminación nunca superior al 6%. Dado el tiempo transcurrido entre la cosecha de la semilla utilizada y su siembra (4 meses), la importante pérdida espontánea de viabilidad del endófito podría explicarse si se tiene en cuenta que la muestra fue conservada, durante ese lapso, a temperatura ambiente en el laboratorio. Estas son condiciones inapropiadas puesto que el calor afecta dicha viabilidad (Williams et al., 1984; Ramírez de Guglielmone et al., 1986). También es posible que desde el momento de la formación de la semilla hasta completar su maduración, condiciones de temperatura y/o disponibilidad de agua desfavorables, hayan determinado la muerte prematura del endófito en semilla.

Las plantas obtenidas de semilla tratada presentaron en cada muestreo

promedios de contaminación que son, obviamente, el resultado del efecto del fitoterápico aplicado (Cuadro N° 1). Con cualquiera de los tratamientos se obtuvo una reducción del nivel de contaminación viable de la semilla. Sin embargo, los promedios totales de los 11 muestreos realizados, analizados estadísticamente, (Fig. 1) señalan que los tratamientos I, II y III (carbendazim o benomil) si bien redujeron significativamente la infección de semilla, la magnitud de contaminación remanente es inaceptable a los fines propuestos. En efecto, extrapolando las condiciones del ensayo a su aplicabilidad a campo, se obtendría una pradera de festuca con 35-45% de contaminación, nivel riesgoso para pastoreo directo (Bacón et al., 1977). En cambio, los tratamientos IV y V (triadimenol en dosis distintas) redujeron estadística y satisfactoriamente la viabilidad del endófito de semilla (Cuadro N° 1 y Figura 1). Las plantas obtenidas presentaron niveles de infección compatibles con una respuesta animal sin problema.

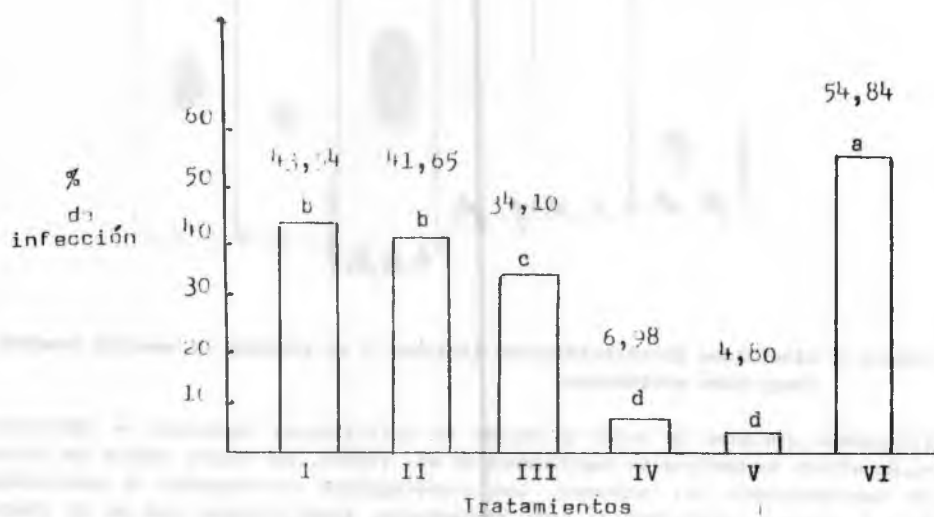
Este resultado confirma los hallazgos previos (Ramírez de Guglielmone et al., 1988) e indica que la mitad de la dosis aconsejada por otros autores (Williams et al., 1984; Costa y De Battista, 1986) es también efectiva para tratamiento de semilla cuyo nivel de infección endofítica viable sea 60% o menos, lo que implica ventajas, por menor costo y fitotoxicidad.

Teniendo en cuenta la duración del ensayo y la constancia de los resultados parciales obtenidos en las plantas de los tratamientos IV y V (triadimenol, Cuadro N° 1) puede suponerse que el fitoterápico ha producido muerte del endófito en semilla, más que inhibición temporaria de su desarrollo. Como consecuencia obvia, la semilla infectada y convenientemente curada, asegura la obtención de praderas de pastoreo con expectativas satisfactorias a largo plazo.

**Cuadro N° 1: Infección con Acremonium coenophialum en plantas obtenidas de semilla de festuca tratadas con fungicidas sistémicos.**

N° de muestreo y fecha (mes y año)	TRATAMIENTOS					
	I	II	III	IV	V	VI
	(% de infección en plantas)					
1° (06/86)	42,20	37,80	36,10	4,43	1,70	58,90
2° (08/86)	37,77	37,76	35,53	5,53	6,67	47,23
3° (10/86)	57,76	43,36	34,43	8,90	1,10	55,57
4° (12/86)	36,67	34,43	40,00	9,97	4,43	51,10
5° (02/87)	46,67	38,90	34,47	8,86	3,33	56,57
6° (05/87)	46,67	46,67	33,30	7,77	6,66	57,77
7° (07/87)	40,00	41,10	28,90	5,57	8,87	53,33
8° (09/87)	39,97	42,23	35,57	8,87	5,57	57,77
9° (11/87)	38,90	45,57	25,57	3,33	6,67	57,57
10° (02/88)	43,43	41,66	34,00	6,90	4,55	54,56
11° (04/88)	46,70	48,77	37,23	6,67	3,33	54,93

Los principios activos y dosis en g/kg de semilla de los tratamientos fueron: I-Carbendazim: 16,2; II- benomil: 8,0; III- benomil: 16,0; IV- triadimenol: 2,4; V- triadimenol:4,8; VI- sin fungicida (testigo). El análisis de macollos se realizó según Materiales y Métodos. Cada resultado es el promedio de las tres repeticiones de cada tratamiento y fecha de muestreo y representa el porcentaje de plantas infectadas respecto del total de analizadas.



**Figura 1: Promedios totales de infección con Acremonium coenophialum en plantas obtenidas de semillas de festuca tratada con fitoterápicos sistémicos.**

El tratamiento de las semillas y la valoración de infección fúngica en plantas se realizaron según Materiales y Métodos. Los principios activos y las dosis en los tratamientos fueron según se indicó en el Cuadro N° 1. En la parte superior de las barras figuran los promedios totales de los 11 muestreos bimestrales realizados para cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según análisis indicado en Materiales y Métodos.

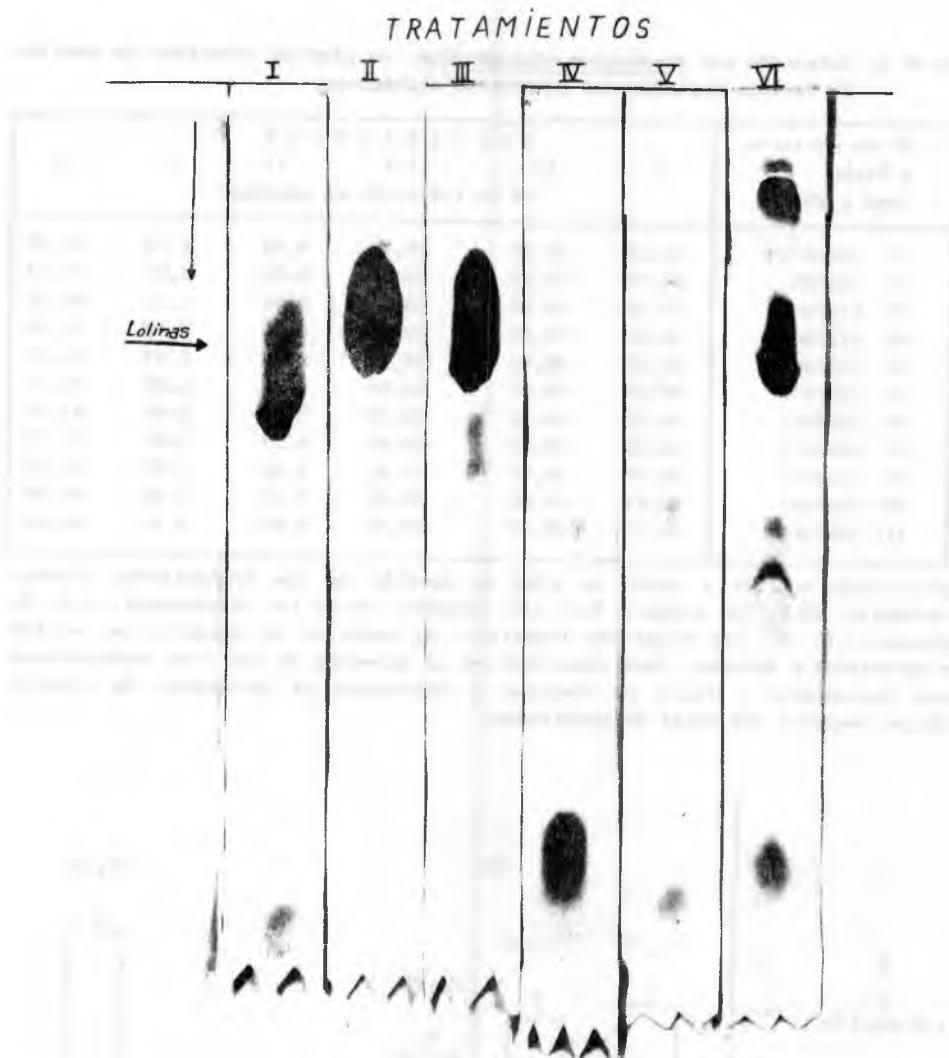


Figura 2: Alcaloides pirrolizidínicos (lolinas) en plantas de semilla tratada con fungicidas sistémicos.

Alcaloides aislados de hojas y tallos se purificaron, separaron e identificaron según método de Ramírez de Guglielmone et al. (1983). La flecha indica la dirección de desplazamiento del solvente. Los cromatogramas corresponden a alcaloides de último muestreo (abril/88) de cada tratamiento, identificados como en el Cuadro N° 1. Se indica la posición de las lolinas.

## 2- Alcaloides pirrolizidínicos en plantas

El análisis cualitativo del contenido de alcaloides pirrolizidínicos en plantas de cada tratamiento, se reali-

zó, según Materiales y Métodos, en 4 fechas: octubre/86, mayo/87, noviembre/87 y abril/88. En la Figura 2 se muestran cromatogramas de alcaloides extraídos y purificados del último muestreo de cada tratamiento. De las

Cuadro N° 2: Infección endofítica en semillas cosechadas de plantas de semilla tratada con fungicidas sistémicos.

El análisis de semillas cosechadas se realizó según Materiales y Métodos. Los tratamientos I al VI fueron como se indicó en el Cuadro N° 1. Los resultados se expresan como porcentaje promedio - desvío muestral de la infección endofítica de semilla cosechada de las tres repeticiones de cada tratamiento y año. Letras entre paréntesis corresponden al análisis por contrastes ortogonales entre promedios de un mismo año y, cuando son distintas, indican diferencias significativas ( $P = 0,05$ ).

Tratamientos	% de infección en semillas cosechadas	
	Año 1986	Año 1987
I	47,33 ± 8,08 (a)	60,00 ± 12,17 (a)
II	29,33 ± 2,31 (b)	56,00 ± 8,72 (a)
III	26,00 ± 2,00 (b)	44,67 ± 9,45 (a)
IV	6,67 ± 4,16 (c)	9,33 ± 4,16 (b)
V	3,33 ± 5,77 (c)	2,00 ± 0,00 (b)
VI	38,00 ± 2,00 (d)	59,33 ± 13,32 (a)

plantas de semilla testigo (tratamiento IV) y de las provenientes de los tratamientos con carbendazim o cualquier dosis de benomil (tratamientos I, II y III) se obtuvieron, invariablemente, perfiles cromatográficos que indican niveles importantes de lolinas. Si bien no está demostrado que estos alcaloides sean tóxicos para mamíferos, sí se conoce que son indicadores de toxicidad de festuca (Ramírez de Guglielmo *et al.*, 1980; Kennedy y Bush, 1983).

Estos alcaloides parecen ser sólo biosintetizados como respuesta a la infección con *A. coenophialum*, lo que se corrobora con estos resultados, pues en los mencionados tratamientos la infección endofítica en plantas fue elevada (Figura 1). Resultados preliminares de S.G. Yates *et al.* (1987) indican que las lolinas son los alcaloides más tóxicos para algunos insectos

depredadores. Por consiguiente la infección con *A. coenophialum* otorgaría a festuca, un mecanismo de defensa que aseguraría su supervivencia y, consecuentemente, la del propio endofito. Surge así un nuevo concepto de la relación festuca *A. coenophialum* más propia de una simbiosis que de un parasitismo (Bacon y Siegel, 1988).

Los tratamientos de semilla con cualquiera de las dosis de triadimenol (tratamientos IV y V) produjeron plantas que, por lo menos según la metodología aplicada no mostraron cantidades detectables de alcaloides pirrolizidínicos (Figura 2). Esto concuerda con el control efectivo del endofito alcanzado en los mismos tratamientos e implica que la semilla curada con triadimenol permite obtener, a largo plazo, plantas libres de ambos indicadores de toxicidad y, presuntamente, inocuas.

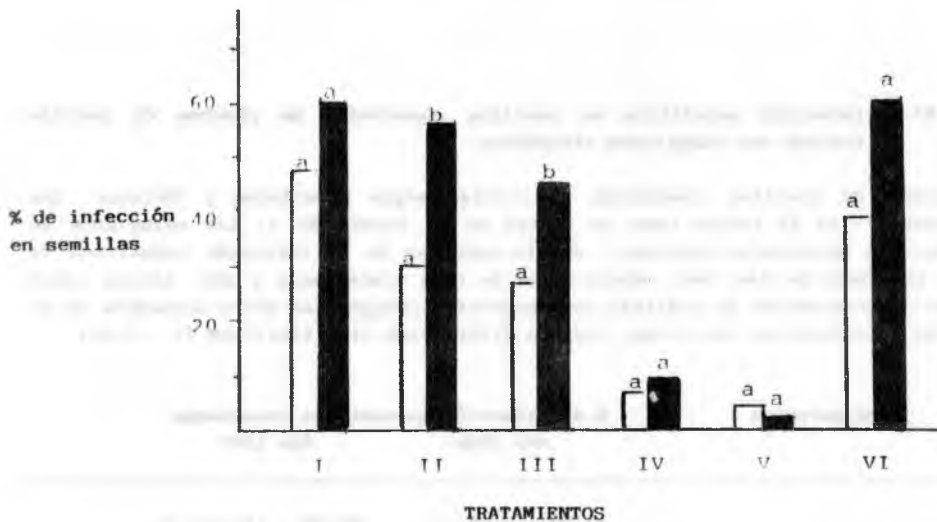


Figura 3: Comparación de la infección fúngica endofítica en semilla cosechada del mismo tratamiento en dos años consecutivos.

Los tratamientos fueron como en el Cuadro N° 1. Cada barra representa el promedio de la infección endofítica de semilla cosechada de las tres repeticiones de cada tratamiento y sus valores numéricos son los del Cuadro N° 2. Barras blancas corresponden a la cosecha/86 y barras negras a la cosecha/87. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,05$ ).

### 3- Contaminación endofítica en semillas cosechadas

De las plantas obtenidas en cada tratamiento se cosechó semilla en dos temporadas consecutivas: diciembre/86 y diciembre/87. Los promedios de infección de las repeticiones para cada tratamiento y cosecha se indican en el Cuadro N° 2. Puede observarse que las plantas infectadas produjeron, en ambas cosechas, semillas infectas (tratamientos I, II, III y VI). Aunque ambos tratamientos con benomil redujeron significativamente el endófito viable en la semilla de la primera cosecha, en la segunda la semilla mostró niveles de infección estadísticamente similares a la obtenida del tratamiento VI (testigo). Por ello, los promedios de infección en semillas cosechadas en 1986 de los tratamientos II y III, respecto de esos mismos en la cosecha 1987, indican que el porcentaje de infección aumentó significativamente el segundo año (Figura 3).

Un comportamiento similar se observó en los tratamientos I y VI, aunque las diferencias no fueron significativas. Cabe aclarar que la primera cosecha se obtuvo de plantas adultas de 19 meses. No puede saberse si ésta es la causa de las diferencias observadas en contaminación en ambas cosechas, o bien que con el tiempo la tendencia sería a la encañazón de macollos infectados.

Cualquiera de los tratamientos con triadimenol (IV y V) al afectar profundamente la viabilidad del endófito de la semilla sembrada y, por consiguiente, su capacidad invasiva en plantas, determinaron la producción de semilla con niveles de infección significativamente disminuidos (Cuadro N° 2), aunque su calidad sanitaria es, cuanto menos, dudosa. Conviene, por ello, sugerir que, si se desea implantar semilla de cosecha propia, progrese de una semilla tratada, sólo sería eventualmente aconsejable previo análisis de la semilla cosechada.



## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos y resultados obtenidos se concluye:

- I) El control de *Acremonium coenophialum* en semilla de festuca mediante fitoterápicos sistémicos es un recurso factible.
- II) La semilla con nivel de contaminación viable de 60% ó menos, destinada a obtener praderas consociadas para pastoreo, requiere una dosis no mayor de 2,4 g de triadimenol/kg de semilla. Esta dosis implica ventajas en cuanto a fitotoxicidad y, en la práctica a campo, en la reducción de costos de aplicación. Para semilla con mayor contaminación viable se requieren nuevos ensayos.
- III) No es aconsejable utilizar semilla proveniente de un cultivo de semilla tratada.
- IV) La constancia de resultados a lo largo de dos años indica que el control con triadimenol sería por pérdida definitiva de la viabilidad del endófito más que un efecto temporario.
- V) Carbendazim o benomil no deben ser utilizados para el control de *A. coenophialum* en semilla de festuca.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subsidiado por CONICET (PID N° 3001800/85); Universidad de Buenos Aires (Proyecto N° AG-005); A.A.C.R.E.A. y C.A.F.P.T.A. (Plan N° 161/86). Los autores agradecen a las siguientes firmas la provisión sin cargo de fitoterápicos sistémicos utilizados: Productos OSA, S.A.C.I.I.F.I.A. (Bencarb S); Ducilo S.A. (Benlate); Bayer Argentina S.A.C.I.F.I. y de M. (Baytan). Se agradece, asimismo, la colaboración técnica de la Ing. Agr. María M. Zubillaga.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) BACON, C.W.; J.F. PORTER; J.D. ROBBINS and E.S. LUTTRELL. 1977. *Epichloe tiphina* form toxic tall Fescue Grasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:576-581.
- 2) BACON, C.W. and M.R. SIEGEL. 1988. Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.*, 1:45-55.
- 3) BILOTTI, L.G.; A.T. NOUGUES; G.J. SEGAL; M.B. GUGLIELMONI; M.E. COSSU y A.E. RAMIREZ de GUGLIELMONE. 1988. Toxicidad de festuca: Estudio de la dosis mínima efectiva de triadimenol para el control de *Acremonium coenophialum* en semilla. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 8(1):113-114.
- 4) RUSH, L.P.; P.C. CORNELIUS; R.C. BUCKNER; D.R. VARNEY; R.A. CHAPMAN; P.R. BURRUS; C.W. KENNEDY; T.A. JONES and M.J. SAUNDERS. 1982. Association of N-acetyl loline and N-formyl loline with *Epichloe typhina* in tall fescue. *Crop. Sci.*, 22: 941-943.
- 5) CLARK, E.M.; J.F. WHITE and R.M. PATTERSON. 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. *J. Microbiol. Methods*, 1:149-155.
- 6) COSTA, M.C. y J.P. DE BATTISTA. 1986. Tratamiento de semilla para el control del hongo endofítico en festuca. *Boletín Técnico Serie Producción Vegetal* N° 30, EEA, INTA Concepción del Uruguay.

- 7) KENNEDY, C.W. and L.P. BUSH. 1983. Effects of environmental and management factors on the accumulation of N-acetyl and N-formyl loline alkaloids in tall fescue. *Crop. Sci.*, 23:547-552.
- 8) LITTLE, T.M. and F.J. HILLS. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas, Méjico, pág. 70.
- 9) MORGAN-JONES, G. and W. GAMS. 1982. Notes on hyphomycetes XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloe typhina*, new taxa in one of the new Sections of *Acremonium*. *Mycotaxon*, 15:311-318.
- 10) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E.; M.B. GUGLIELMONI; M.A. CARABELLI; G.J. SEGAL y R.M. BUNGE. 1985 a. *Festuca* c.v. "El Palenque": Una incógnita. *Rev. CREA*, 115:52-57.
- 11) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E.; M.B. GUGLIELMONI; G.J. SEGAL; L.G. BILOTTI y A.T. NOUGUES. 1988. Fungicidas sistémicos para el control del endófito de festuca en semilla. *Rev. CREA*, 129:47-53.
- 12) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E. y A.M. SAENZ. 1980. Determinación de alcaloides de *Festuca arundinacea* (Schreb.) en relación con toxicidad. *Memorias del III Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias*: 204-214.
- 13) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E.; A.M. SAENZ; M.A. CARABELLI; M.B. GUGLIELMONI; E.O. BASILE y M.C. PEREYRA. 1983. Influencia del suelo y la fertilización nitrogenada sobre el contenido cuali-cuantitativo de alcaloides de festuca c.v. "El Palenque". *Rev. Fac. Agronomía*, 4(1):69-77.
- 14) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E.; A.M. SAENZ; M.B. GUGLIELMONI; M.A. CARABELLI; G.J. SEGAL y M.C. PEREYRA CARDOZO. 1985 b. *Festuca*: indicadores de toxicidad en cultivares y muestras sin identidad genética. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 5(5-6):323-330.
- 15) RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E.; G.J. SEGAL; M.B. GUGLIELMONI; L.G. BILOTTI; R.M. BUNGE; A. NOUGUES; M.A. COSSU y A. ROMAT. 1986. Pérdida de la viabilidad del endófito de festuca *Acremonium coenophialum* en semilla almacenada. *TECNICREA*, 6:26-31.
- 16) SIEGEL, M.R. 1983. Mode of transmission of the fescue endophyte. *Proceedings Tall Fescue Toxicosis. Workshop, Atlanta, Georgia*. 48-51.
- 17) WILLIAMS, M.J.; P.A. BACKMAN; E.M. CLARK and J.F. WHITE. 1984. Seed treatment for control of the tall fescue endophyte *Acremonium coenophialum*. *Plant Dis*, 68:49-52.
- 18) YATES, S.G.; J.C. FENSTER; R.G. BARTELT and R.G. POWELL. 1987. Toxicity assay of tall fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large Milkweed Bug. *Proceedings Tall Fescue Endophyte Meeting*. Memphis, Tennessee.