

Habilidad competitiva entre plantas de festuca alta libres e infectadas con hongo endófito bajo cosecha

Lucas Ricardo Petigrosso¹ ✉  Julieta Martínez Vernerí ✉ Osvaldo Néstor Fernández ✉

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata,
Ruta 226 km 73,5, 7620 Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Competitive ability between free and infected tall fescue plants with endophytic fungus under harvest

Abstract. Given the increased incidence of the endophyte *Epichloë coenophiala* in tall fescue pastures and the consequent risk of fescue toxicosis, it is important to understand the role played by competition between infected (E+) and endophyte-free (E-) plants in interaction with mechanical harvest, in increasing the frequency of E+ on E-. A competition experiment with substitution design was conducted in field pots. Four genotypes E+ and E- of tall fescue were used (removal with fungicide and cloning). The obtained E- and E+ clones were grown as E+E+ and E-E- monocultures, or 1:1 E+E- mixtures, at a constant density of 8 plants per pot (2 per genotype) and were combined with two levels of defoliation (without and with mechanical harvest). Aerial biomass cuts were made every 2 weeks at 3 cm from the ground level. Fescue-endophyte symbiosis did not result into higher aerial biomass of E+E+ monocultures compared to E-E-, regardless of harvest treatment. On the contrary, in the treatment without harvest, the E-E- monocultures produced higher aerial biomass than the E+E+, suggesting a net cost of the symbiotic association. When both phenotypes grew in 1:1 mixtures E+ plants behaved as dominant, according to the estimated competition and aggressivity indices. Contrary to expectations, neither the periodic harvest of aerial biomass nor the provision of growth conditions without resource restrictions, neutralized an apparently beneficial effect of the symbiosis on E+ plants, growing in a 1:1 mixture with E- plants. The incidence of infection in E+E- mixtures would tend to increase, at least under favourable conditions for plant growth, even in absence of herbivores which could be deterred by E+ plants.

Keywords: *Schedonorus arundinaceus*, *Epichloë coenophiala*, symbiosis, competition, relative yield, aggressivity index.

Resumen. Dado el aumento de la incidencia del endófito *Epichloë coenophiala* en pasturas de festuca alta y el consecuente riesgo de intoxicación del ganado por festucosis, resulta importante comprender qué papel juega la competencia entre plantas infectadas (E+) y libres de endófito (E-), en interacción con la cosecha mecánica, en el aumento de la frecuencia de E+ sobre E-. Se realizó un experimento de competencia de tipo sustitutivo en macetas a campo. Se emplearon 4 genotipos de festuca E+ y E- (remoción con fungicida y clonación). Los clones E- y E+ fueron utilizados en tres niveles de tratamiento: monoculturas E+E+, monoculturas E-E- y mezclas 1:1 E+E-, a densidad constante de 8 plantas/maceta (2 por genotipo), combinados con dos niveles de defoliación (sin y con cosecha mecánica). Las cosechas de biomasa aérea se efectuaron cada 2 semanas a 3 cm del suelo. La simbiosis festuca-endófito no se tradujo en una mayor biomasa aérea de las monoculturas E+E+ respecto a las E-E-, con independencia del tratamiento de cosecha. Por el contrario, en el tratamiento sin cosecha, las monoculturas de plantas E-E- produjeron mayor biomasa aérea que las E+E+, sugiriendo un costo neto de la asociación simbiótica. Cuando ambos fenotipos crecieron en mezclas 1:1, las plantas E+ se comportaron como dominantes, de acuerdo con los índices de competencia estimados. Contrariamente a lo esperado, ni las cosechas periódicas ni la provisión de condiciones de crecimiento sin restricciones de recursos, neutralizaron los efectos positivos de la simbiosis sobre plantas E+, creciendo en mezcla 1:1 con plantas E-. La incidencia de infección en mezclas E+E- tendería a aumentar, al menos en condiciones favorables para el crecimiento de las plantas y en ausencia de herbívoros que podrían ser disuadidos por plantas E+.

Palabras clave: *Schedonorus arundinaceus*, *Epichloë coenophiala*, simbiosis, competencia, rendimiento relativo, índice de agresividad.

Introduction

Festuca alta es la gramínea forrajera más importante en pasturas cultivadas de la Región Pampeana de Argentina debido a sus valiosas características agronómicas (Lattanzi et al., 2007; Scheneiter et al., 2016). Al igual que otras gramíneas C_3 puede establecer una relación en general simbiótica con hongos endófitos asexuales de transmisión vertical (Clay y Schardl, 2002; Selosse y Schardl, 2007). El endófito que infecta *Festuca alta* es asintomático y su dispersión se limita a semillas infectadas (Clay y Schardl, 2002) donde puede permanecer viable en el banco de semillas del suelo (Petigrosso et al., 2019). La importancia agronómica de esta asociación está dada por los efectos positivos inducidos por el hongo endófito en su hospedante, tales como mayor tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Bacon, 1993; Malinowski y Belesky, 2000) y autodefensa frente a herbívoros (Cheplick y Clay, 1988; Chen et al., 2017). Estos efectos, dependiendo del contexto ambiental, el manejo agronómico y la combinación de genotipos del endófito y el de su hospedante (Hill et al., 1990; Slaughter et al., 2019), otorgarían ventajas competitivas a las plantas infectadas (en adelante E+) respecto a las libres de endófito (en adelante E-), aumentando la frecuencia de las primeras en las pasturas implantadas y su capacidad competitiva en pastizales templados que invade (Saikkonen et al., 2002; Moore et al., 2019). Sin embargo, el endófito puede inducir la síntesis de metabolitos tóxicos (i.e. ergocaloides) para el ganado en pastoreo, originando importantes pérdidas en la producción por intoxicación con *Festuca* infectada o festucosis (Hoveland, 1993; Young et al., 2013).

Dado el aumento de la incidencia del endófito en pasturas y pastizales de *Festuca alta* y el consecuente riesgo de intoxicación de ganado por festucosis (Elizalde y Riffel, 2015; Petigrosso et al., 2013), resulta importante poder responder las siguientes preguntas: ¿cómo afecta la simbiosis *Festuca*-endófito la habilidad competitiva de plantas E+ sobre las E-? y, ¿puede una defoliación modificar el balance competitivo entre ambas? Los métodos más utilizados para estudiar la competencia interespecífica e intraespecífica en una mezcla deben considerar la densidad, la disposición espacial y proporción de cada especie (Park et al., 2003). Los efectos de estas variables que influyen en la persistencia de las especies en competencia, pueden evaluarse y analizarse mediante experimentos de reemplazo o sustitución (de Wit, 1960; Weigelt y Jolliffe, 2003).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la habilidad competitiva entre plantas de *Festuca alta* libres e infectadas con hongo endófito bajo cosecha mecánica. Para ello, se analizó la biomasa aérea en monocultivos y en mezclas 1:1 en plantas de *Festuca* genéticamente idénticas E+ y E-, bajo dos regímenes de cosecha mecánica y se determinó el rendimiento relativo total de las mezclas y la agresividad de plantas E+ sobre E-. Esta información es imprescindible para comprender por qué puede aumentar la incidencia del endófito en pasturas con baja frecuencia inicial de plantas infectadas, y qué papel puede jugar la competencia E+ x E- en interacción con la realización de cosechas mecánicas.

Material and Methods

Lugar y conducción del experimento

Se realizó un experimento de competencia de tipo sustitutivo (Harper, 1977) en macetas de 4 L a campo en la Unidad Integrada Balcarce (Facultad de Ciencias Agrarias UNMdP - Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce, ubicada a 37°45'47,94"S, 58°17'38,82"W, 130 m s.n.m.). Se emplearon cuatro genotipos (= plantas madres) de *Festuca alta*, *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort [sinónimos: *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium arundinaceum* (Schreb.) S.J. Darbyshire, *Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub], 100 % infectados con hongo endófito *Epichloë coenophiala* (Morgan-Jones & W. Gams) C.W. Bacon & Schardl = *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones & W. Gams) Glenn, C.W. Bacon & Hanlin (Leuchtman et al., 2014), obtenidos de una pastura ubicada en un establecimiento ganadero de Balcarce (Buenos Aires, Argentina).

Las plantas de cada uno de los cuatro genotipos fueron multiplicadas vegetativamente.

Se seleccionaron por uniformidad 9 macollos de cada genotipo, los cuales no diferían ($P < 0.05$) entre ellos según el diámetro de pseudotallo medido con calibre (promedio de 3 mediciones por eje) a 5 cm del cuello de la planta (media general \pm error estándar, 3.81 ± 0.103 mm; $n=36$). Cada clon fue cultivado en una maceta individual de 200 cm³ colocada sobre bandejas plásticas, empleando un sustrato homogéneo (volúmenes iguales de arena de río y vermiculita sobre una capa de perlite de 1 cm de espesor ubicada en el fondo de la maceta para facilitar el drenaje). Las macetas fueron regadas inicialmente con solución nutritiva (Hoagland - Arnon) hasta capacidad de campo y luego sub-irrigadas con agua deionizada. Las mismas se dispusieron al azar en el invernáculo y periódicamente se cambiaron de posición a fin de

compensar la falta de uniformidad microambiental. Se las cultivó hasta que cada clon presentaba al menos 3 macollos con hojas desplegadas. Los clones de cada genotipo fueron tratados con un fungicida sistémico a base del principio activo azoxistrobina (metil (E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-ilo]fenil}-3-metoxiacrilato) formulado al 25 % en suspensión concentrada, empleando una solución acuosa al 2 0/100 i.a. El fungicida se aplicó con una pipeta de 50 ml (Eppendorf Easypet® 3) en la base de la planta, asegurando que el fungicida llegue a las vainas de las hojas de todos los macollos (tejido donde se encuentra principalmente el endófito, White et al., 1993). Para corroborar la eficacia del fungicida, se realizó el diagnóstico microscópico de la presencia o ausencia del hongo en los macollos según la técnica de Belanger (1996).

Los clones E- y E+ obtenidos fueron utilizados en tres niveles de tratamiento: monoculturas E+E+, monoculturas E-E- y mezclas 1:1 E+E-, a densidad constante de 8 plantas por maceta (2 por cada genotipo) y se combinaron con dos niveles de defoliación (sin y con cosecha mecánica). Previamente, dos macollos de cada genotipo y cada nivel de infección fueron secados y pesados para conocer la biomasa inicial al comenzar el experimento. El peso de los macollos de cada genotipo, con y sin infección, fue similar entre ellos, con una media general (\pm error estándar) de 393.3 ± 3.98 mg y 295.9 ± 2.96 mg para la parte aérea y raíz, respectivamente. Las plantas fueron cultivadas al aire libre en macetas plásticas de 17 cm de diámetro por 17 cm de profundidad, conteniendo 3 L de suelo tamizado proveniente del horizonte superficial (0-15 cm) de un Argiudol típico (17.1 ppm de P Bray I, 6.1 % MO y 17.4 ppm N NO_3^-). Las macetas fueron fertilizadas al comienzo del experimento con fosfato diamónico (dosis equivalente a 250 kg/ha) y enterradas para mantener la temperatura de las raíces en equilibrio con la del suelo. Las cosechas (4) de biomasa aérea se efectuaron cada 2 semanas a 3 cm del nivel del suelo. Durante el experimento, el suelo se mantuvo sin limitaciones ni excesos de agua, para lo cual debajo de las macetas se dispuso una cama de grava de aproximadamente 20 cm para facilitar el drenaje.

Determinaciones

Biomasa aérea acumulada por maceta y planta

Se determinó la biomasa aérea acumulada durante 8 semanas, por maceta y por planta, mediante la adición de las 4 cosechas de los tratamientos con cosechas, o mediante un corte a 5 cm desde el nivel del suelo al

final del período experimental, en los tratamientos sin cosecha. La biomasa cosechada se secó en estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso constante y se pesó. Luego de la última cosecha, las plantas se cultivaron hasta llegar a estado reproductivo.

Número de panojas por planta

Al finalizar el período experimental (1 640 °Cd acumulados, temperatura base de festuca alta 4 °C; Agnusdei y Mazzanti, 2001) se determinó el número de panojas en cada planta, incluyendo en el recuento las inflorescencias parcialmente emergidas y las que presentaban aristas visibles por encima de la lígula de la última hoja expandida.

Cálculos e interpretación de índices de competencia

Rendimiento relativo (RR)

A partir de los datos de biomasa aérea acumulada, se analizó la competencia por el uso de los recursos entre las plantas de igual o diferente nivel de infección (intra- e inter-nivel) E+ y E-. Para ello, se calcularon los rendimientos relativos (de Wit, 1960) de cada tipo como:

$$RR_{E+} = R_{E+E-} / R_{E+E+} \quad RR_{E-} = R_{E-E+} / R_{E-E-}$$

Siendo R_{E+E-} y R_{E-E+} los rendimientos medios por planta E+ y E- en las mezclas 1:1 (en este estudio, 4 plantas E+ y 4 plantas E-) respectivamente, y R_{E+E+} y R_{E-E-} el rendimiento de plantas E+ y E- creciendo en los respectivos monocultivos. Si el valor de RR es 1 se deduce que: a) no existen recursos limitantes y, por ende, no hay competencia, o b) que ambos tipos de planta capturan y emplean esos recursos con igual ritmo y eficiencia y, por lo tanto, son sustituibles. Si RR de un tipo de planta es $>$ o $<$ que 1, esas plantas son dominantes o subordinadas como consecuencia de las relaciones de competencia, intra- e inter-fenotipos respectivamente.

Tasa Relativa de Reemplazo (RRR)

Este índice, calculado como cociente RR_{E+} / RR_{E-} , es un indicador de desplazamiento competitivo o coexistencia entre genotipos, introducido por de Wit y van den Bergh (1965) para su aplicación al mejoramiento genético tradicional de cereales, calculado con base en el rendimiento reproductivo medio por planta en mezclas. En este trabajo se estimó, como proxy de tasa relativa de reemplazo para cada nivel de cosecha, el cociente RR_{E+} / RR_{E-} en biomasa aérea (RRR_{BA}).

Rendimiento Relativo Total (RRT)

De acuerdo con el balance entre relaciones de competencia intra- e inter-fenotipos E+ y E-, la producción de biomasa de mezclas de ambos puede ser igual, menor o superior a la del monocultivo más productivo (respuesta compensatoria, sub- o sobre-compensatoria, respectivamente; Harper, 1977; Fasoula y Fasoula 1997). A partir de la biomasa aérea de las plantas de cada nivel de infección en cada maceta, y considerando su número (4 en mezcla u 8 en monocultivo) y su proporción (0.5 o 1, respectivamente), se calculó para cada unidad experimental el Rendimiento Relativo Total de acuerdo a la expresión general $RRT_{ij} = pRR_{ij+} + qRR_{ji}$ (de Wit, 1960) donde i y j son los fenotipos, genotipos o especies en competencia (en este estudio E+ y E-), RR los rendimientos relativos en biomasa aérea de cada tipo en mezcla respecto a su biomasa aérea en cultivo puro, y p y q las proporciones en cada condición de cultivo (en este estudio, p = q = 0.5).

Para cada maceta se calculó el RRT como:

$$RRT = 0.5 (RR_{E+} + RR_{E-})$$

En caso de no existir competencia o que la habilidad competitiva de ambos fenotipos sea equivalente, el RRT no difiere estadísticamente de 1. Si el RRT resulta inferior o superior a la unidad, se interpreta como evidencia de sub-compensación (asociado a fenómenos de asimetría competitiva; Weiner y Freckleton 2010) o de sobre-compensación o complementariedad en el uso de recursos por aumento de la eficiencia en la captura y uso de recursos limitantes (Fasoula y Fasoula 1997).

Índice de Agresividad (A)

A fin de analizar posibles efectos de la relación endófito-festuca sobre la jerarquía competitiva de plantas E+ y E-, a partir de los cálculos de RR basados en la producción de biomasa aérea de cada fenotipo en

Biomasa aérea por maceta y por planta

No se halló interacción significativa entre el tipo de mezcla y el nivel de cosecha para la biomasa aérea por maceta ($F_{2,12} = 1.0$; $P = 0.3956$), pero sí efectos principales de cada factor. Para ambos niveles de cosecha, la mezcla E+E- produjo mayor biomasa que la monocultura E-E- y ésta que la monocultura E+E+ ($F_{1,12}=298.3$; $P < 0.0001$; $6.17 \pm 0.42 > 5.53 \pm 0.36 > 5.03 \pm 0.39$ g MS). La biomasa acumulada por maceta para los

cada unidad experimental, se calculó el índice de agresividad A propuesto por McGilchrist y Trenbath (1971), para plantas E+ sobre plantas E- en mezclas 1:1, como:

$$A_{E+,E-} = RR_{E+} - RR_{E-}$$

De acuerdo a esta ecuación, en caso que ambos tipos de plantas sean igualmente competitivos RR_{E+} es igual a RR_{E-} y $A = 0$. Si A es positivo o negativo, se inferirá que E+ es el tipo de planta dominante o la subordinada en las mezclas, respectivamente.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Las macetas se ubicaron según un diseño factorial completamente aleatorizado (DCA) con 3 repeticiones para cada combinación de tratamiento (6) resultante de dos factores experimentales: tipo de mezcla (3 niveles: monoculturas E+E+, monoculturas E-E- y mezclas 1:1 E+E-) y nivel de cosecha (2 niveles: con y sin cosecha). Además, en el análisis de las variables respuestas a nivel de planta, se incluyó el nivel de infección endófitica (E+ y E-).

Los efectos de los factores experimentales y su posible interacción sobre las variables respuesta consideradas se analizaron mediante ANOVA de dos o tres vías. Las medias se compararon con la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) y se consideró significativa toda diferencia con un valor de probabilidad $p < 0.05$. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron verificados. La variable respuesta número de panojas fue transformada mediante Ln para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico R (R Development Core Team, 2018).

Resultados

monocultivos y las mezclas fue mayor (en promedio 19.6 %) con que sin cosecha ($F_{1,12} = 89.4$; $P = 0.0012$; $6.19 \pm 0.55 > 4.97 \pm 0.49$ g MS).

La biomasa aérea por planta presentó interacción triple entre el tipo de mezcla, nivel de cosecha y nivel de infección ($F_{1,16} = 35.7$; $P < 0.0001$), por lo cual se ajustaron modelos estadísticos para cada nivel de cosecha por separado. En tratamientos sin cosecha se observó interacción significativa entre el tipo de

mezcla por el nivel de infección ($F_{1,8} = 51.9$; $P < 0.0001$). Así, mientras que, en cultivos puros, las plantas E- produjeron mayor biomasa aérea que las E+, en las mezclas no se encontraron diferencias entre nivel de infección (Tabla 1). Las plantas E+, en la mezcla E+E-, tuvieron mayor biomasa promedio que en monocultivo ($0.743 \pm 0.001 > 0.551 \pm 0.011$ g MS/planta) mientras que las E- no difirieron en su biomasa media en monocultivo (0.624 ± 0.034 g MS/planta) y en mezcla (0.637 ± 0.020 g MS/planta). En el tratamiento con cosecha, la defoliación recurrente anuló la interacción observada en los testigos sin cosecha entre el tipo de mezcla y el nivel de infección ($F_{1,8} = 1.9$; $P = 0.2051$) y esta variable presentó respuesta significativa a cada uno de esos factores. Con cosecha, las plantas E- produjeron, en promedio de los dos niveles de mezcla, mayor biomasa que las E+ ($F_{1,8} = 87.6$; $P < 0.0001$; E- = 0.830 ± 0.033 g MS/planta; E+ = 0.757 ± 0.047 g MS/planta) y en promedio de ambos niveles de infección, mayor producción media de biomasa por planta en las mezclas que en los monocultivos ($F_{1,8} = 30.7$; $P = 0.0005$; mezclas = 0.855 ± 0.030 g MS/planta; monocultivos = 0.733 ± 0.021 g MS/planta).

Tabla 1. Biomasa aérea acumulada por planta (media \pm error estándar) durante el período experimental con o sin cosechas mecánicas periódicas. Referencias: E+, plantas infectadas creciendo en cultivos puros (E+E+) o en mezclas 1:1 con plantas libres de endófito (E+E-); E-, plantas libres de endófito creciendo en cultivos puros (E-E-) o en mezclas 1:1 con plantas infectadas (E-E+). Letras diferentes (minúsculas o mayúsculas en tratamientos con o sin cosecha mecánicas, respectivamente) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tipo de mezcla \ Nivel de cosecha	Nivel de cosecha	
	Con cosecha	Sin cosecha
E+E+	0.706 ± 0.022^c	0.554 ± 0.040^B
E+E-	0.810 ± 0.022^{ab}	0.741 ± 0.058^A
E-E-	0.760 ± 0.036^{bc}	0.621 ± 0.018^{AB}
E-E+	0.910 ± 0.044^a	0.650 ± 0.063^{AB}

Número de panojas por planta

El número de panojas por planta presentó interacción triple entre el tipo de mezcla, nivel de corte y de infección ($F_{1,16} = 4.3$; $P = 0.0434$) (Tabla 2), por lo cual se ajustaron modelos de análisis de la varianza para cada régimen de cosecha por separado. En los tratamientos con cosecha, no se registró interacción entre el tipo de mezcla y el nivel de infección ($F_{1,8} = 0.2$; $P = 0.6665$), pero sí efectos principales de cada factor. Así, el número de panojas fue mayor en plantas E- ($F_{1,8} = 16.2$; $P = 0.0038$) y en los monocultivos ($F_{1,8} = 9.8$; $P = 0.0140$). Por el contrario, en los tratamientos sin cosecha dicha

interacción fue significativa ($F_{1,8} = 6.7$; $P = 0.0319$). Así, el número de panojas por planta E- no difirió entre monocultivo y mezcla, pero sí respecto a las plantas E+. En estas últimas, el número de panojas por planta, fue mayor en mezcla que en monocultivo (Tabla 2).

Tabla 2. Número de panojas (media \pm error estándar) por planta en cultivos puros (E+E+ y E-E-) y en mezclas 1:1 de plantas de festuca alta infectadas (E+) y libres de endófito (E-) con y sin cosechas. Letras (mayúsculas en tratamiento control o minúsculas en tratamiento de cosechas) diferentes, indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tipo de mezcla \ Nivel de cosecha	Nivel de cosecha	
	Con cosecha	Sin cosecha
E+E+	0.125 ± 0.037^b	0.542 ± 0.021^B
E+E-	0.333 ± 0.021^a	0.833 ± 0.056^A
E-E-	0.000 ± 0.000^c	0.833 ± 0.012^A
E-E+	0.167 ± 0.085^{ab}	0.750 ± 0.073^{AB}

Índices de competencia

El índice RR en biomasa aérea por planta presentó interacción significativa entre los niveles de cosecha y de infección ($F_{3,16} = 5.3$; $P = 0.0097$). En los testigos sin cosecha, las plantas E+ presentaron mayor RR en mezcla que las E- ($F_{1,8} = 7.8$; $P = 0.023$; Figura 1) y en esta condición el RRT_{BA} fue 20 % superior a 1 (1.205 ± 0.039). Esto último se vincula al hecho de que el mayor RR de las plantas E+ en mezcla con las E- no estuvo asociada a una menor producción de estas últimas en las mezclas respecto a sus monocultivos ya que RR_{E-} no fue inferior a 1 (Figura 2). La defoliación anuló la diferencia de RR entre plantas E+ y E- ($F_{1,8} = 0.326$; $P = 0.583$; Figura 1) y el RR no difirió de 1 para ambos niveles de infección. La superioridad de E+ en mezclas sin defoliación se tradujo en un valor de RRR_{E+E-} significativamente mayor a 1 (1.33 ± 0.1002 ; Figura 3). En macetas con cosechas, el rendimiento relativo total de las mezclas en biomasa aérea, RRT_{BA} , no difirió entre niveles de infección ni de la unidad ($RRT_{BA} = 1$; Figura 2).

La agresividad de plantas E+ sobre las E-, $A_{E+,E-}$ en términos de biomasa aérea acumulada por maceta (A_{BA}), fue significativamente superior a 0 en macetas sin cosecha (0.324 ± 0.0343 ; $F_{2,6} = 3.5$; $P = 0.0272$). Esta respuesta fue anulada en el tratamiento con cosechas donde, si bien $AE+,E-$ de E+ sobre E- fue negativa, su valor no difirió de 0 (-0.032 ± 0.045 ; $F_{2,6} = 0.4$; $P = 0.9326$). Por otro lado, cuando este índice se calculó en base al número de panojas (A_{PAN}) el valor de $A_{E+,E-}$ en macetas sin cosecha fue también positivo (0.614 ± 0.118 ; $F_{2,6} = 14.4$; $P = 0.0022$) mientras que en tratamiento con cosechas fue significativamente inferior a 0 (-0.444 ± 0.226 ; $F_{2,6} = 23.3$; $P = 0.0045$).

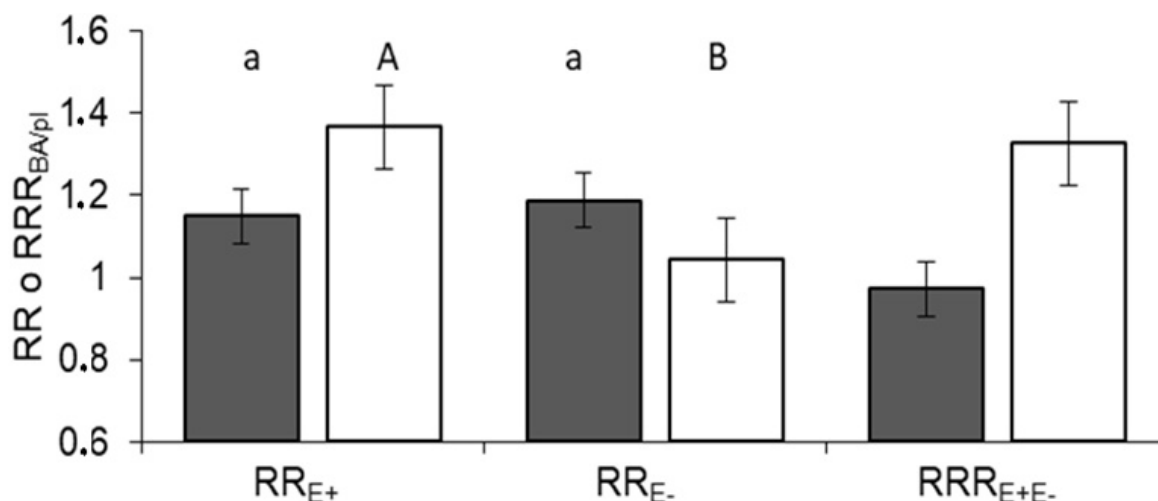


Figura 1. Rendimiento relativo (RR) de biomasa aérea media por planta y tasa relativa de reemplazo en biomasa aérea ($RRR_{BA/pl}$) de plantas de festuca alta infectadas (E+) sobre plantas libres de endófitos (E-) creciendo en mezclas 1:1, con (barras llenas) o sin cosechas mecánicas (barras vacías). Los segmentos indican \pm error estándar. Medias con letras diferentes en RR (mayúsculas en tratamiento sin cosechas, o minúsculas en tratamiento con cosechas), indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

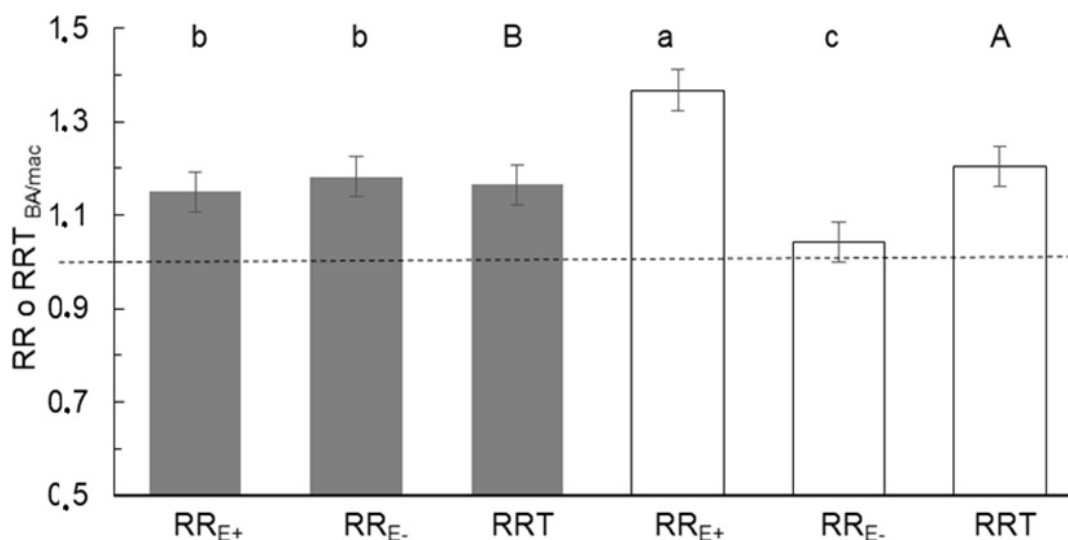


Figura 2. Rendimiento relativo en biomasa aérea acumulada por maceta ($RR_{BA/mac}$) en tratamientos con (barras llenas) y sin (barras vacías) cosecha periódica de plantas de festuca alta infectadas (E+) y libres de endófito (E-). Los segmentos indican \pm error estándar. Medias con letras diferentes en RR (minúsculas) o RRT (mayúsculas), indican diferencias significativas ($P < 0.05$). La línea punteada indica el nivel 1, correspondiente a la hipótesis de no competencia o de equivalencia competitiva.

Discusión

En festuca alta, algunos autores han destacado el papel de la simbiosis como promotora de tolerancia a estreses físicos originados por deficiencias de agua y nutrientes, así como la tolerancia o escape de depredadores mediada por metabolitos tóxicos (Arachevaleta et al., 1989; Lyons et al., 1990). Estas observaciones, basadas en atributos de tolerancia, indujeron la formulación de hipótesis sobre la capacidad invasora y de naturalización de festuca alta, así como a la resistencia o susceptibilidad a la invasión de comunidades dominadas por festuca infectada (Richardson y Pysek, 2006). Estos atributos propiciarían una mayor supervivencia de los biotipos

infectados en períodos de restricciones severas, complementarias a efectos positivos de la simbiosis sobre la defensa anti-herbivoría, alta tasa de crecimiento aéreo y producción de semillas.

Bajo las condiciones del presente experimento, es decir favorables para el crecimiento de las plantas, la simbiosis festuca-endófito no se tradujo en una mayor producción de biomasa aérea de las monoculturas E+E+ respecto a las E-E-, con independencia del tratamiento de cosecha. Por el contrario, en el tratamiento sin cosecha, las monoculturas de plantas E-E- produjeron mayor biomasa aérea que las E+E+,

sugiriendo un costo neto de la asociación simbiótica. Sin embargo, cuando ambos fenotipos crecieron en mezclas 1:1, las plantas E+ se comportaron como dominantes, de acuerdo con los índices de competencia estimados (RRT_{BA} y A_{BA} de plantas E+ sobre las E-) aunque sin afectar a la biomasa aérea de las E-. Esto último puede explicar que la producción de biomasa aérea de las mezclas en ambos tratamientos de cosecha haya superado a la de los monocultivos, tal como lo indicaron los valores de rendimiento relativo total (RRT) de esas mezclas. Asumiendo la competencia por algún recurso esencial limitante entre plantas E+ y E-, un RRT superior a 1 se ha interpretado como evidencia de una mayor eficiencia de captura y uso de ese factor, una sobrecompensación a una eventual merma provocada en el componente subordinado por el dominante y un mecanismo estabilizante de la productividad a escala poblacional (Allard y Bradshaw, 1964; Fasoula y Fasoula, 1997). Si bien estos conceptos fueron aplicados originalmente a mezclas de genotipos en una población monoespecífica y luego extendido a mezclas de especies en policulturas, los valores de RRT registrados en este trabajo en mezclas de plantas E+ y E- ponen en evidencia la diferenciación en la captura y en el uso de recursos.

El mayor número de panojas en plantas E+ concuerda con lo observado por varios autores. Rice et al. (1990) al comparar los mismos genotipos con y sin infección y Moore et al. (2019) en experimentos de largo plazo a campo concluyen que la infección endofítica favorece la reproducción de festuca y puede incrementar la frecuencia de infección en sus poblaciones, o su capacidad invasiva en pastizales nativos degradados, dificultando la restauración de los mismos.

La superioridad competitiva de plantas de festuca E+ creciendo en ambientes productivos fue reportado también en estudios de campo (Saikkhonen et al., 2016; Moore et al., 2019), tanto en términos de producción de biomasa aérea como de inflorescencias. Sin embargo, en poblaciones nativas de *Festuca arizonica* en pastizales de EEUU, donde la asociación con endófito

presentó un costo neto para el hospedante, resultando en una interacción de parasitismo (Faeth y Sullivan, 2003).

Faeth et al. (2010) observaron en poblaciones de un pasto nativo en EEUU, que la ventaja adaptativa conferida por la simbiosis con *Neotyphodium* se vinculó con una mayor tolerancia a estrés por bajas temperaturas y sequías en etapas juveniles de plantas originadas de semillas infectadas. Aunque, el crecimiento y la reproducción se asoció en forma negativa con la concentración de alcaloides, reduciendo la habilidad competitiva de los biotipos infectados (Faeth et al., 2004). No obstante, aún en poblaciones nativas persisten ambos fenotipos, lo cual sugiere que una superioridad en crecimiento y/o reproducción en condiciones de alta productividad no necesariamente otorga ventajas en términos de supervivencia a las plantas E+.

En síntesis, los efectos positivos atribuibles a la simbiosis endófito-gramínea se tradujeron no solo en la dominancia de plantas E+ sobre las E-, sino además en un aumento en la biomasa aérea de las mezclas respecto a los monocultivos, evidenciando complementariedad y aumento de eficiencia en la captura y uso de recursos. La mayor agresividad de plantas E+ se tradujo en menores rendimientos de los cultivos puros E+ que de los de plantas E-. La mayor producción de biomasa aérea de plantas E+ en las mezclas se asoció con un mayor número de panojas por planta al final del período experimental. Los resultados del presente experimento sugieren que la incidencia de infección en mezclas E+E- tendería a aumentar, al menos en condiciones favorables para el crecimiento de las plantas y en ausencia de herbívoros que podrían ser disuadidos por plantas E+. En otras palabras, la simbiosis generaría ventajas competitivas solo en presencia de estreses físicos y bióticos. No obstante, cabe advertir que el aumento de incidencia del endófito en pasturas y pastizales puede involucrar diferencias en aspectos de dinámica poblacional no consideradas en el presente estudio, tales como la producción y dispersión de semillas, el establecimiento y supervivencia de festuca bajo pastoreo.

Conclusiones

En ausencia de cosechas periódicas, las plantas de festuca alta E+ presentaron menor crecimiento en cultivos puros respecto a las E-, indicando un posible costo neto de la asociación endófito-festuca. En esta misma condición, las plantas E+ creciendo en mezcla con E-, presentaron mayor habilidad competitiva, aun

cuando las plantas E- fueron más productivas en cultivos puros. Estos resultados sugieren que la incidencia de infección en mezclas E+E- tendería a aumentar, al menos en condiciones favorables para el crecimiento de las plantas y en ausencia de cosechas periódicas.

Conflicto de interés. Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Reconocimientos

Agradecemos a la Ing. Agr. Mabel N. Colabelli (DEA) por su colaboración en el análisis microscópico del hongo endófito en las semillas de festuca alta

utilizadas. Este trabajo fue financiado por la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Literatura citada

- Agnusdei, M.G. and A. Mazzanti. 2001. Frequency of defoliation of native and naturalized species of the Flooding Pampas (Argentina). *Grass and Forage Science* 56: 344-351.
- Allard, R.W. and A.D. Bradshaw. 1964. Implications of genotype-environmental interactions in applied plant breeding. *Crop Science* 4: 503-508.
- Arachevaleta, M., C.W. Bacon, C.S. Hoveland, and D.E. Radcliffe. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant responses to environmental stress. *Agronomy Journal* 81: 83-90.
- Bacon, C.W. 1993. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 44: 123-141.
- Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Science* 36: 460-462.
- Chen, W., H. Liu, W. Yubao Gao, S.D. Card and A. Ren. 2017. The advantages of endophyte infected over uninfected tall fescue in the growth and pathogen resistance are counteracted by elevated CO₂. *Scientific Reports* 7: 6952. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07183-y>.
- Cheplick, G.P. and K. Clay. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 3: 309-318.
- Clay, K. and C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160: 99-127. <https://doi.org/10.1086/342161>
- De Wit, C.T. 1960. On competition. *Agricultural Research Reports* 66.8, Pudoc, Wageningen, 82 pp.
- De Wit, C.T. and J.P. van den Bergh. 1965. Competition between herbage plants. *Neth. Journal of Agricultural Science* 13: 212 – 221.
- Elizalde, J. y Riffel, S. 2015. Alertan sobre festucosis en la Cuenca del Salado. [en línea] <http://www.valorcarne.com.ar/alertan-sobre-festucosis-en-la-cuenca-del-salado/> [consulta: 20 de febrero de 2015].
- Faeth, S.H., C.J. Hayes and D.R. Gardner. 2010. Asexual Endophytes in a Native Grass: Tradeoffs in Mortality, Growth, Reproduction, and Alkaloid Production. *Microbial Ecology* 60: 496–504.
- Faeth, S.H., M.L. Helander and K.T. Saikkonen. 2004. Asexual Neotyphodium endophytes in a native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters* 7: 304–313.
- Faeth, S.H. and T.J. Sullivan 2003. Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist* 161: 310-325.
- Fasoula, D.A. and V.A. Fasoula. 1997. Competitive ability and plant breeding. *Plant Breeding Review* 14: 89-138.
- Harper, J.L. 1977. *Population Biology of Plants*, Academic Press, 892 p. New York.
- Hill, N. S., W. C. Stringer, G. E. Rottinghaus, D. P. Belesky, W. A. Partot, and D. D. Pope. 1990. Growth, morphological and chemical component responses of tall fescue to *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 30: 156-161.
- Hoveland, C.S. 1993. Economic importance of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44: 3-12.
- Lattanzi, F.A., A. Mazzanti, and M.H. Wade. 2007. Seasonal animal production of temperate and Mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 203-213.
- Leuchtman, A., C.W. Bacon, C.L. Schardl, J.F. Jr. White and M. Tadych. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycology* 106: 202–215.
- Lyons, P. C., J. J. Evans, and C. W. Bacon. 1990. Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue. *Plant Physiology* 92: 726-732.
- Malinowski, D. and D. Belesky. 2000. Adaptations of endophyte infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40: 923-940.
- McGilchrist, C.A. and B.R. Trenbath. 1971. A revised analysis of plant competition experiments. *Biometrics* 27: 659–671.
- Moore, J.D., A.E. Carlisle, J.A. Nelson and R.L. McCulley. 2019. Fungal endophyte infection increases tall fescue's survival, growth, and flowering in a reconstructed prairie. *Restoration Ecology* 27: 1000-1007. <https://doi.org/10.1111/rec.12960>.

- Park, S.E., L.R. Benjamin and A.R. Watkinson. 2003. The Theory and Application of Plant Competition Models: an Agronomic Perspective. *Annals of Botany* 92: 741-748.
- Petigrosso, L.R.; Laboranti, M.A.; Vignolio, O.R.; Echeverría, M.M. y Castaño, J.A. 2018. Impacto de diferentes tratamientos de remoción de la vegetación en pasturas de festuca alta infectada con endófito asexual. *Revista Argentina de Producción Animal*. 38(2): 49-61.
- Petigrosso, L.R., M.N. Colabelli, O.N. Fernández, V. Ispizúa, and M.G. Cendoya. 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.
- R. Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>
- Rice, J.S., B.W. Pinkerton, W.C. Stringer and D.J. Undersander. 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. *Crop Science* 30: 1303-1305.
- Richardson, D.M. and P. Pysek. 2006. Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invisibility. *Progress in Physical Geography* 30: 409-431.
- Saikkonen, K., T.D. Phillips, S.H. Faeth, R.L. McCulley, I. Saloniemi and M. Helander. 2016. Performance of endophyte infected tall fescue in Europe and North America. *PLoS ONE* 11(6): e0157382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157382>.
- Saikkonen, K., D. Ion and M. Gyllenberg. 2002. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 269, 1397-1403.
- Scheneiter, J.O., I.I.; Kaufmann, A.R. Ferreyra, and R.T. Llorente. 2016. 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.
- Selosse, M.A. and C.L. Schardl. 2007 Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytology* 173: 452-458.
- Slaughter, L.C., J.A. Nelson, A.E. Carlisle, M. Bourguignon, R.D. Dinkins, T.D. Phillips and R.L. McCulley. 2019. Tall Fescue and *E. coenophiala* Genetics Influence Root-Associated Soil Fungi in a Temperate Grassland. *Frontiers in Microbiology* 10: 2380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02380>
- Weiner, J. and R.P. Freckleton. 2010. Constant Final Yield. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 41: 173-192.
- Weigelt, A. and P. Jolliffe. 2003. Indices of plant competition. *Journal of Ecology* 91: 707-720.
- White, J.F. Jr., G. Morgan-Jones and A.C. Morrow. 1993. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44: 13-37.
- Young, C.A., D.E. Hume and R.L. McCulley. 2013. Fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Pasture friend or foe? *Journal of Animal Science* 91: 2379-2394.