

GERMINACIÓN DE FESTUCA ALTA CON ENDÓFITO SILVESTRE O SEGURO EN CONDICIONES DE SALINIDAD

Germination of tall fescue with wild or safe endophyte under salinity conditions

Thomas JI, Petigrosso LR*, Echeverría MM, Vignolio OR, Eyherabide GA, Lúquez JE

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

*E-mail de contacto: lpetigrosso@mdp.edu.ar

RESUMEN

Un experimento fue realizado en una cámara de germinación con el objetivo de evaluar uno de los posibles mecanismos que explicarían el aumento de la proporción de plantas de festuca alta (*Festuca arundinacea*) infectada con endófito silvestre *Epichloë coenophiala* en pasturas y pastizales de suelos salinos de la pampa deprimida (Buenos Aires, Argentina): la tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones en el tiempo, con un arreglo factorial. Los factores que definieron los doce tratamientos experimentales fueron: i) genotipos de festuca alta, con cuatro niveles: población naturalizada libre (SE-) y población naturalizada infectada con endófito silvestre (SE+); cv. Taita libre (TE-) y cv. Taita infectado (TE+) con endófito seguro AR584, y ii) condición salina, con tres niveles: 0 mM (control), 120 mM y 200 mM NaCl. Se colocaron las semillas en rollos de papel embebidos en la solución salina correspondiente y se evaluaron variables asociadas a la germinación: energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), longitud de coleoptilo (LC) y de radícula (LR), peso fresco (PF) y seco (PS) de plántulas y plantas jóvenes. También se verificó la viabilidad del endófito en las plantas jóvenes luego de los tratamientos salinos. Se observó un marcado efecto detrimental en la condición salina 200 mM sobre la mayoría de las variables medidas asociadas a la germinación. Solo se halló interacción significativa entre el genotipo de festuca alta y la condición salina para la EG. Así, el endófito silvestre aumentó 14% y 48% la EG de las semillas en los niveles de salinidad 120 mM y 200 mM, respectivamente. No se detectaron diferencias en el cv. Taita para la EG. Ante el inminente cambio climático global, los resultados del presente trabajo adquieren particular importancia considerando que las predicciones indican una tendencia creciente de exposición de las plantas a condiciones de estrés salino. Así, la tolerancia a condiciones de salinidad en las plantas de festuca alta SE+ constituiría un atributo que otorgaría capacidad para establecerse en suelos que son restrictivos para otras especies. Estudios experimentales complementarios a campo son necesarios para corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Palabras clave. *Festuca arundinacea*, *Epichloë coenophiala*, semillas, energía germinativa, poder germinativo.

ABSTRACT

An experiment was carried out in a germination chamber with the objective of evaluating one of the possible mechanisms that could explain the increased in the proportion of tall fescue plants (*Festuca arundinacea*) infected with the wild endophyte *Epichloë coenophiala* in pastures with saline soils in the flooding pampa (Buenos Aires, Argentina): salinity tolerance during seed germination and seedling growth. A randomized complete block design with three replicates in time with factorial arrangement was used. The factors that defined the twelve experimental treatments were: i) tall fescue genotypes, four levels: a naturalized population free (SE-) and infected (SE+) with wild endophyte, and cv. Taita free (TE-) and infected (TE+) with endophyte AR584, and ii) saline condition, three levels: 0 mM (control), 120 mM and 200 mM NaCl. Seeds were placed in rolls of paper soaked in the appropriate saline solution, and the following variables associated with germination were evaluated: germination energy (GE), germination power (GP), coleoptile (CL) and radicle length (RL), fresh (FW) and dry weight (DW) of seedlings and young plants. The viability of the endophyte in young plants after saline treatments was also verified. A significant interaction was only found between the tall fescue genotype and the saline condition for GE. Thus, the wild endophyte increased GE of the seeds subjected to 120 mM and 200 mM saline treatments by 14% and 48%, respectively. No differences were detected in cv. Taita for GE. A marked detrimental effect of 200 mM saline condition was observed on most of the response variables. Given the imminent global climate change, the results of this work acquire particular importance considering the predictions indicate an increasing trend of exposure of plants to saline stress conditions. Thus, the tolerance to salinity conditions in SE+ tall fescue plants would constitute an attribute that would grants the capacity to establish itself in soils that are restrictive for other species. Futures field experiments will confirm this superiority.

Key words. *Festuca arundinacea*, *Epichloë coenophiala*, seeds, germination energy, germination power.

Recibido: Enero 2022

Aceptado: Agosto 2022

Introducción

La festuca alta (*Festuca arundinacea*) es una gramínea forrajera, de metabolismo C₃ y crecimiento otoño-inverno-primaveral, cultivada en Argentina, particularmente en la Región Pampeana (Lattanzi et al. 2007; Milne 2009; Scheneiter et al. 2016). Es una especie perenne que tolera niveles moderados de salinidad y alcalinidad y es capaz de adaptarse a un amplio rango de condiciones climáticas y edáficas (Scheneiter et al. 2016). Es valorada en los sistemas extensivos de producción ganadera por su rusticidad, plasticidad fenotípica y calidad forrajera (Lattanzi et al. 2007; Scheneiter et al. 2016). Crece espontáneamente en las comunidades vegetales de loma (pradera de mesófitas) y media loma (pradera húmeda de mesófitas) de los pastizales de la pampa deprimida argentina (Roitman y Preliasco 2018), y se la utiliza en intersiembras de pasturas degradadas (Principi et al. 2011). Festuca alta puede establecer una relación simbiótica con el hongo endófito *Epichloë coenophiala* (Leuchtmann et al. 2014). El hongo se transmite a través de semillas infectadas de su hospedante, no se dispersa por esporas ni por el polen de plantas infectadas, y no produce síntomas de enfermedad visibles desde el exterior, como tampoco forma estructuras reproductivas externas (Clay y Schardl 2002).

La asociación endófito-gramínea generalmente es del tipo simbiótico-mutualista (White y Torres 2009). El hongo se nutre y reproduce a partir de la planta, mientras que la planta presenta mayor potencial de crecimiento y tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Petigrosso et al. 2019; Lee et al. 2021). Por otro lado, el consumo de plantas infectadas con endófito ocasiona inconvenientes en los animales debido a la presencia de alcaloides de origen fúngico que causan diversos síndromes (*festucosis*), lo que provoca importantes pérdidas económicas en la producción ganadera (Hoveland 1993; Strickland et al. 2011). Entre las estrategias para disminuir esta toxicidad se encuentra la siembra de cultivares de festuca libres de endófito o, alternativamente, el uso de cultivares que han sido inoculados con endófitos seguros o amigables (“safe” o “non-toxic endophytes”, Bouton et al. 2002). Estos cultivares producen alcaloides de la familia de las lolinas y peraminas, que otorgan resistencia a insectos, en valores similares a los observados en materiales con el endófito silvestre, y niveles significativamente reducidos o nulos de toxinas (ergoalcaloides) para el ganado (Phillips y Aiken 2009). Sin embargo, las combinaciones gramínea-endófito generadas por el hombre a través de la inoculación de hifas, al no haber estado sometidas a “filtros naturales” ambientales y genéticos, muestran distintos niveles de compatibilidad (do Valle Ribeiro 1993). La falta de compatibilidad se manifiesta a través de reacciones que pueden provocar la muerte del tejido celular del hospedante, la muerte de las hifas y/o un retraso en el crecimiento del hospedante (Koga et al. 1993).

Las cepas AR542 y AR584 han sido desarrolladas y comercializadas en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. Hopkins et al. (2010) demostraron que los cultivares inoculados con estas cepas mejoran la productividad animal. Aunque estas nuevas asociaciones de hongos endófitos seguros y distintos cultivares de festuca

alta han sido adoptadas por los consumidores, las consecuencias ecológicas de estas nuevas simbiosis siguen siendo en gran parte desconocidas (Iqbal et al. 2012). Hay evidencias de que las interacciones ecológicas, la dinámica de la comunidad vegetal y la fisiología de la planta responden de manera diferente en individuos de festuca alta infectados con los nuevos endófitos en comparación con individuos infectados con el endófito silvestre o libres de endófitos (Iqbal et al. 2012). Uno de los cultivares que ha sido inoculado con el endófito seguro AR584 es el cv. Taita. Actualmente, en la pampa deprimida, se observan dos prácticas de manejo: pastoreo continuo y pastoreo rotativo controlado por ambientes (Vaccaro et al. 2020). Los sistemas basados en pastoreo rotativo dan lugar a una estructura de mosaicos en la vegetación, lo que aumenta la riqueza y diversidad (Fuhlendorf et al. 2006; Vaccaro et al. 2020). En cambio, los sistemas basados en pastoreo continuo, homogenizan el pastizal y provocan su empobrecimiento y degradación, dando lugar generalmente a una vegetación homogénea de pastos cortos (Vaccaro et al. 2020). Además, el pastoreo continuo provoca alteraciones en las características físicas y químicas de los suelos, como por ejemplo, disminuye el contenido hídrico y aumenta la densidad aparente y conductividad eléctrica a través del ascenso de sales en superficie (Rodríguez y Jacobo 2012). El cloruro de sodio es la sal más importante causante de la salinidad en los suelos (Bahizire 2007), considerándose salinos los suelos que poseen una conductividad eléctrica (CE) superior a 4 dS m⁻¹ (Tal 1985), y dicho valor supera a los registrados en los suelos en los que festuca crece (Roitman y Preliasco 2018). La mayoría de las especies herbáceas, son más sensibles a la salinidad durante la germinación y emergencia que durante los estados posteriores de crecimiento y desarrollo (Jauregui et al. 2017; Cardamone et al. 2018). Durante la germinación, al disminuir el potencial osmótico del medio, se reduce la absorción de agua por parte de la semilla y se generan condiciones que favorecen la entrada de iones tóxicos, lo que afecta negativamente la supervivencia del embrión y el desarrollo de las plántulas (Yokoi et al. 2002; Bahizire 2007).

Dado que son escasos los trabajos que evalúan los efectos de la presencia de hongos endófitos asexuales del género *Epichloë* sobre la tolerancia a la salinidad en gramíneas templadas (Vázquez de Aldana et al. 2011; Koch et al. 2017; Soto et al. 2022), el presente trabajo tiene por objetivo evaluar uno de los posibles mecanismos que podrían explicar el aumento de la incidencia de festuca infectada con endófito silvestre en pasturas y pastizales de suelos salinos de la pampa deprimida: la tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas. Para ampliar el alcance del estudio, además de utilizar una población naturalizada en pastizales pampeanos, también se utilizó un cultivar comercial. La población naturalizada está asociada a hongos endófitos silvestres y las plantas del cultivar a un endófito seguro. La hipótesis del presente estudio es que la tolerancia a la salinidad de festuca alta en variables asociadas a la germinación depende de la interacción entre el genotipo de festuca alta asociado a su respectivo hongo endófito y la concentración de salina. En este sentido, esperamos que en

condiciones de salinidad: a) las semillas provenientes de plantas de festuca alta infectadas con endófito, tanto silvestre como seguro, sean más tolerantes a la salinidad que las libres de endófito, respectivamente y b) que dicha tolerancia sea mayor en semillas provenientes de plantas de festuca alta infectadas con endófito silvestre que aquellas infectadas con endófito seguro.

Materiales y Métodos

Obtención de los genotipos experimentales

Se trabajó con semillas de cuatro genotipos de festuca alta [*Festuca arundinacea* Schreb., sinónimo: *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort]: a) una población naturalizada libre de endófito (SE-), b) una población naturalizada infectada con el endófito silvestre *E. coenophiala* (SE+), c) cv. Taita libre de endófito (TE-) y d) cv. Taita infectado con el endófito seguro AR584 (TE+), este último provisto por GENTOS S.A. Grasslanz Technology Limited, Palmerston North, Nueva Zelanda. Este cultivar es de origen genético Continental, fue seleccionado a partir de colecciones de germoplasma en distintas zonas geográficas del país, y presenta una estructura de planta densa, con alto vigor de implantación y excelente producción de biomasa. Las semillas originales de festuca SE+ se obtuvieron a partir de la cosecha de semillas de festuca alta infectadas con endófito silvestre de plantas establecidas en las banquinas linderas al establecimiento Arroyo Grande, ubicado en el Partido de Mar Chiquita, Buenos Aires, Argentina (37° 32' S; 57° 55' O), cuyo nivel de infección (100%) había sido diagnosticado previamente por Petigrosso *et al.* (2013). El sitio de recolección presenta suelos con pH de 8,6; CE de 4,2 dS m⁻¹; 9,9 ppm de P; 7,5 % de MO y textura franco limosa (24,49 % arena, 56,19 % limo y 19,33 % arcilla). La semilla se sometió a dos condiciones de almacenamiento sucesivas, en heladera a 5°C para mantener la viabilidad del endófito (SE+) y a 20°C y 52 % HR durante 12 meses para eliminarlo (SE-) (Nosquese 2017). Este experimento se llevó a cabo con semillas cosechadas en el mismo año y con comprobada condición endofítica (Petigrosso *et al.* 2021). El poder germinativo de las semillas varió entre 86% y 93% (SE-: 87%, SE+: 88%, TE-: 86% y TE+: 93%).

Diseño y conducción del experimento

En el experimento se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones en el tiempo, con un arreglo factorial. Los factores que definieron los doce tratamientos experimentales fueron: i) genotipos de festuca alta, con cuatro niveles: SE-, SE+, TE- y TE+, y ii) condición salina, con tres niveles: 0 mM NaCl (control), 120 mM NaCl y 200 mM NaCl. Se utilizaron estas concentraciones salinas porque resultados previos demostraron que la asociación de festuca alta con el hongo endófito, tanto silvestre como seguro AR584, no conferiría tolerancia a la salinidad (*i.e.* 40 y 80 mM NaCl) a la población silvestre ni al cv. Taita, en variables relacionadas con la germinación (Soto *et al.* 2022). En cada repetición, se sembraron 50 semillas de cada uno de los genotipos en rollos de papel esterilizados, embebidos (aproximadamente con 20 ml aplicados con rociador) en

agua destilada (testigo), en solución 120 mM NaCl y 200 mM NaCl. Las semillas fueron esterilizadas previamente en alcohol 70% durante 15 segundos, luego se enjuagaron con agua utilizando un colador, y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% durante 10 min, enjuagando luego con abundante agua. Una vez formados los rollos, se colocaron verticalmente en un frasco de vidrio (altura: 15 cm y diámetro: 12 cm) y se sometieron a un preenfriado a 5°C durante 48 h para romper la dormición de las semillas y luego se trasladaron a una cámara de germinación donde permanecieron 14 días a 20°C con un fotoperíodo de 8 h. para que germinen.

Determinaciones

- *Energía germinativa* (EG): a los siete días se abrieron los rollos y se contaron las semillas germinadas (ISTA 2008). Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula tenía una longitud igual o mayor a 2 mm. La EG se determinó como el porcentaje de semillas germinadas con respecto al total de semillas sembradas (50).

- *Poder germinativo* (PG): a los 14 días se abrieron los rollos y las semillas y plántulas se clasificaron en semillas frescas no germinadas y semillas muertas, y en plántulas normales y anormales, de acuerdo a lo establecido en las normas ISTA (2008). El PG se determinó como el porcentaje de plántulas normales desarrolladas con respecto al total de semillas sembradas (50).

- *Longitud de coleoptilo* (LC) y *radícula* (LR): a los 14 días se midieron la LC y la LR con una regla milimetrada en una muestra aleatoria de 10 plántulas. Los análisis se efectuaron con el valor promedio del grupo de 10 plántulas.

- *Peso fresco* (PF) y *peso seco* (PS) de las plántulas: las mismas 10 plántulas en las que se efectuaron las mediciones de longitud, fueron pesadas en balanza analítica para obtener el PF. Posteriormente se colocaron en sobres de papel, se secaron en estufa a 60°C durante 48 h y se volvieron a pesar para determinar el PS.

- *Peso fresco y seco de plantas jóvenes*: Se seleccionaron al azar 15 plántulas restantes de cada tratamiento y se trasplantaron a bandejas conteniendo tierra: enmienda orgánica (3:1 v/v) compuesta por turba de musgo *Sphagnum*, perlita, estabilizantes y núcleo fertilizante de liberación controlado (humedad: 40-45 %, cenizas 1.5-3 %, relación C/N 56,6, pH: 3,7-4,2, materia orgánica: 50-55 %). Luego de 27 días de cultivo, se seleccionaron 10 plantas y se determinó el PF y PS. Las otras cinco se utilizaron para analizar la viabilidad del endófito en las plantas.

- *Viabilidad del endófito en plantas jóvenes*: en las cinco plantas jóvenes restantes de los genotipos de festuca alta infectados y no infectados, a los 30 días del trasplante se determinó la viabilidad del endófito mediante la observación microscópica de hifas entre las células parenquimáticas en las vainas de las hojas mediante coloración directa (Belanger 1996).

Análisis estadístico

Los efectos de los factores experimentales y su posible interacción en los doce tratamientos generados sobre las variables respuesta consideradas se analizaron mediante

ANVA. Previamente al análisis, se realizó la verificación del cumplimiento de los supuestos del ANVA (normalidad de los residuos y la homogeneidad de varianzas). Las medias se compararon con la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) y se consideró significativa toda diferencia con un valor de probabilidad $P < 0,05$. Se analizó el efecto del endófito silvestre dentro de la población naturalizada y del endófito seguro en el cv. comercial de festuca mediante contrastes. Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico R (R Core Team 2021).

Resultados

En el presente experimento, la energía germinativa (EG) de las semillas varió según el genotipo de festuca alta y la condición salina, evidenciando interacción (Tabla 1). Así, la presencia del endófito silvestre (SE+) aumentó 14% y 48% la EG respecto a SE-, para los niveles de salinidad 120 mM y 200 mM, respectivamente (Figura 1). Para todos los niveles de salinidad no se observaron diferencias estadísticamente significativas debida a la presencia del endófito seguro ($P > 0,05$; Figura 1); sin embargo, se observó una tendencia favorable para las infectadas en el cv. Taita (TE+) respecto a las TE-. No se encontraron diferencias entre los genotipos de festuca alta en la condición control (Figura 1). Al analizar el poder germinativo (%PG) de las semillas, no se halló interacción significativa entre el genotipo de festuca alta y la condición salina (Tabla 1), pero sí hubo efecto de cada factor ($P < 0,001$ para la condición salina y $P < 0,05$ para el genotipo de festuca alta). Las semillas que fueron sometidas al nivel salino 200 mM presentaron menor %PG que aquellas que fueron sometidas a 0 mM y 120 mM (Tabla 1). Tanto la longitud de coleoptilo (LC) como la longitud de radícula (LR) y el peso fresco (PF) de las plántulas no fueron afectados por la interacción entre el genotipo de festuca alta y la condición salina (Tabla 1), pero sí fueron modificadas por el tratamiento salino ($P < 0,001$). Las plántulas originadas de las semillas sometidas a 200 mM presentaron menores valores de LR, LC y PF (Tabla 1). La presencia del endófito silvestre aumentó 19% el %PG en las semillas de la población naturalizada ($P < 0,05$), mientras que no se detectaron diferencias debidas a la presencia del endófito seguro en el cv. Taita ($P > 0,05$; Tabla 1). El peso seco (PS) de las plántulas no fue afectado por ninguno de los factores experimentales ni su interacción (Tabla 1). Tanto el PF como el PS de las plantas jóvenes no fueron afectados por la interacción entre el genotipo de festuca alta y la condición salina (Tabla 1), pero sí variaron según el genotipo de festuca alta ($P < 0,05$). La presencia del endófito silvestre aumentó 11% el PF y 23% el PS de las plantas jóvenes en la población naturalizada, mientras que el endófito seguro redujo 15% el PF en el cv. Taita, pero no afectó el PS (Tabla 1). Los genotipos SE+ y TE+, independientemente del tratamiento salino, dieron positivos al diagnóstico de presencia de endófito (i.e. 100% de infección, Tabla 2) cuando se las observó en el estadio de plantas jóvenes. En los genotipos SE- y TE- se corroboró la ausencia del endófito (i.e. 0 % de infección, Tabla 2).

Discusión

La tolerancia es una propiedad desarrollada por las plantas durante el proceso evolutivo, para lograr perpetuar la especie en ambientes donde ocurren estreses climáticos o edáficos constantes, o que se repiten periódicamente (González *et al.* 2002). Los individuos que no se adaptan a esas condiciones adversas no sobreviven en la población, mientras que aquellos que logran sobrevivir, desarrollan su ciclo de vida y dan descendencia, asegurando la supervivencia de la especie (González *et al.* 2002). En el presente trabajo se propuso evaluar la tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas y el inicio del crecimiento de las plántulas como uno de los posibles mecanismos que podrían explicar el aumento de la propagación de festuca infectada con endófito silvestre en pasturas y pastizales de la pampa deprimida. Esperábamos que, en condiciones de salinidad, la asociación de festuca alta con el hongo endófito, tanto silvestre como seguro, aumentara todas variables medidas (%EG, %PG, LC, LR, PF y PS de plántulas y, PF y PS de plantas jóvenes), en relación a aquellas libres de endófito y que dicha superioridad fuese mayor en aquellos individuos infectados con endófito silvestre respecto al endófito seguro. Sin embargo, se observó únicamente que la presencia del endófito silvestre en las semillas de festuca alta de la población naturalizada aumentó la energía germinativa de las semillas en altas concentraciones salinas, respecto a las libres (Figura 1). La superioridad hallada en la EG debido a la presencia del endófito en SE+ respecto a SE- en condiciones de salinidad, resulta importante por varias razones. Por un lado, la germinación y la emergencia son las dos etapas más importantes en el ciclo de vida de las plantas (Weitbrecht *et al.* 2011; Baskin y Baskin 2014), que afectan directamente el desarrollo y supervivencia de las plántulas (Forcella *et al.* 2000). Por otro lado, las gramíneas perennes de uso forrajero presentan generalmente un lento crecimiento inicial y escasas reservas en la semilla, lo que determina que el establecimiento de las plántulas sea una de las etapas más críticas en la implantación (Ruiz y Terenti 2012). Tampoco se encontraron diferencias en la EG de semillas SE+ y TE+ bajo los tratamientos de 120 y 200 mM de NaCl (Figura 1).

Según Wang *et al.* (2020), los efectos del hongo endófito *Epichloë bromicola* sobre la germinación de semillas de *Hordeum brevisubulatum* en condiciones de estrés salino, están determinados por la concentración de NaCl. Así, cuando las semillas son expuestas a una concentración de 100 mM NaCl, no se registran efectos significativos sobre variables relacionadas con la germinación (i.e. tasa de germinación y longitud de radícula y de coleoptilo), pero a concentraciones de salinidad mayores a 200 y 300 mM NaCl, la presencia del endófito aumenta significativamente la tasa de germinación y la longitud de la radícula y del coleoptilo. Por otra parte, Koch *et al.* (2017) observaron que el hongo endófito *Epichloë festucae* var. *lolii* aumenta la tolerancia a la concentración salina de 15 dS m⁻¹ en clones de *Lolium perenne* L. Sin embargo, Reza Sabzalian y Mirlohi (2010) muestran que el peso seco de las plantas de festuca alta con *E. coenophiala* no es diferente al de las plantas libres de endófito bajo condiciones de salinidad de 170 mM de NaCl.

Tabla 1. Energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), longitud de coleoptilo (LC) y de radícula (LR), peso fresco (PF) y seco (PS) de plántulas y plantas jóvenes provenientes de semillas de cuatro genotipos de festuca alta (SE-: población naturalizada libre de endófito silvestre; SE+: población naturalizada con endófito silvestre; TE-: cv. Taita libre de endófito seguro; TE+: cv. Taita con endófito seguro) sometidas a tres condiciones salinas (CS: 0, 120, 200 mM NaCl). Los valores son medias ± EE. Letras minúsculas iguales en la misma columna y para cada factor experimental (Genotipo o CS), indican diferencias no significativas según la prueba de DMS ($\alpha=0,05$).

Table 1. Germination energy (EG), germinative power (PG), coleoptile length (CL) and radicle length (LR), fresh weight (PF) and dry weight (PS) of seedlings and young plants from seeds of four genotypes of tall fescue (SE-: naturalized population free of wild endophyte; SE+: naturalized population with wild endophyte; TE-: cv. Taita free of safe endophyte; TE+: cv. Taita with safe endophyte) subjected to three saline conditions (CS: 0, 120, 200 mM NaCl). Values are means ± ES. Equal lowercase letters in the same column and experimental factor (Genotype or CS) indicate non-significant differences according to the MDS test ($\alpha=0.05$).

Tratamiento	EG (%)	PG (%)	LR (cm)	LC (cm)	PF plántula (g)	PS plántula (g)	PF planta joven (g)	PS planta joven (g)
Condición Salina								
0 mM NaCl	40,5±3,7 a	81,3±2,2 a	4,7±0,2 a	7,4±0,3 a	0,128±0,003 a	0,013±0,001 a	0,179±0,071 a	0,019±0,008 a
120 mM NaCl	41,6±5,4 a	79,5±1,9 a	4,5±0,2 a	5,5±0,2 b	0,095±0,007 b	0,015±0,001 a	0,175±0,069 a	0,020±0,018 a
200 mM NaCl	28,0±7,7 b	52,8±4,1 b	2,8±0,1 b	2,0±0,1 c	0,072±0,002 c	0,014±0,002 a	0,164±0,070 a	0,020±0,020 a
Genotipo								
SE+	39,7±5,8 a	76,2±4,6 a	3,9±1,3 a	4,9±2,5 a	0,100±0,028 a	0,014±0,001 a	0,186±0,012 a	0,023±0,004 a
SE-	30,9±9,7 c	61,5±6,5 b	3,9±1,2 a	4,9±2,4 a	0,101±0,029 a	0,014±0,001 a	0,166±0,012 bc	0,018±0,001 b
TE+	40,2±6,7 a	75,8±5,6 a	3,9±1,3 a	5,0±2,8 a	0,101±0,023 a	0,014±0,001 a	0,155±0,012 c	0,016±0,001 b
TE-	36,0±5,8 b	71,3±4,3 a	4,5±1,5 a	5,2±2,7 a	0,094±0,080 a	0,015±0,002 a	0,183±0,012 ab	0,019±0,001 b
Análisis de varianza (P-valor)								
CS	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,069	0,189	0,881
Genotipo	<0,001	0,009	0,137	0,238	0,763	0,406	0,004	0,012
CS x Genotipo	0,049	0,388	0,649	0,283	0,348	0,683	0,358	0,653

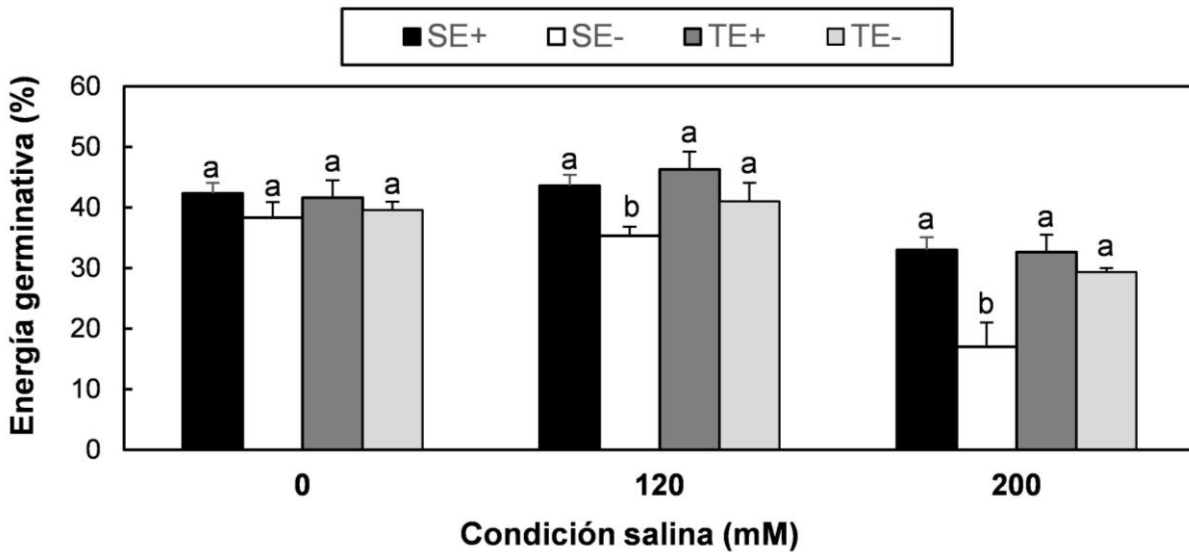


Figura 1. Energía germinativa (%) de semillas de festuca alta sometidas a distintas condiciones salinas. SE-: población naturalizada libre de endófito silvestre; SE+: población naturalizada con endófito silvestre; TE-: cv. Taita libre de endófito seguro; TE+: cv. Taita con endófito seguro. Los valores son medias ± EE. Letras iguales, para cada condición salina, indican diferencias no significativas según la prueba de DMS ($\alpha=0,05$).

Figure 1. Germination energy (%) of tall fescue seeds subjected to different saline conditions. SE-: naturalized population free of wild endophyte; SE+: naturalized population with wild endophyte; TE-: cv. Taita free from safe endophyte; TE+: cv. Taita with safe endophyte. Values are means ± ES. Equal letters, for each saline condition, indicate non-significant differences according to the MDS test ($\alpha=0.05$).

Tabla 2. Porcentaje de infección endofítica en plántulas originadas de semillas de cuatro genotipos de festuca alta (SE-: población naturalizada libre de endófito silvestre; SE+: población naturalizada con endófito silvestre; TE-: cv. Taita libre de endófito seguro; TE+: cv. Taita con endófito seguro) sometidas a tres condiciones salinas (CS): 0, 120 y 200 mM de NaCl.

Table 2. Percentage of endophytic infection in seedlings originating from seeds of four tall fescue genotypes (SE-: naturalized population free of wild endophyte; SE+: naturalized population with wild endophyte; TE-: cv. Taita free of safe endophyte; TE+: cv. Taita with safe endophyte) subjected to three saline conditions (CS: 0, 120, 200 mM NaCl).

Genotipo de festuca alta	Condición salina (mM NaCl)	Infección endofítica (%)
SE+	0	100
	120	100
	200	100
SE-	0	0
	120	0
	200	0
TE+	0	100
	120	100
	200	100
TE-	0	0
	120	0
	200	0

Soto *et al.* (2022) al comparar la tolerancia a la salinidad durante la germinación de los mismos materiales de festuca alta libres e infectados con endófito utilizados en este experimento, en concentraciones salinas menores (*i.e.* 0, 40 y 80 mM NaCl), observan que los materiales de festuca alta no difieren en la tolerancia a la salinidad, dado que las semillas presentan valores similares de EG y las plántulas de LC, LR y PF, respecto al control. Estos resultados contradictorios indican que, por un lado, el efecto del endófito en la tolerancia de la planta a la salinidad es genotipo-dependiente, es decir, que sólo en determinadas combinaciones endófito-gramínea se observa una respuesta de tipo mutualista, por lo que no se puede generalizar para todas las asociaciones y, por otro lado, que la respuesta es contexto-dependiente.

La variabilidad en la respuesta a las condiciones salinas, podría incluir componentes genéticos y ambientales, como por ejemplo, vinculadas al sitio donde fueron recolectadas las semillas (Borrajó y Alonso 2004; Jauregui *et al.* 2017). Así, en varios ensayos con especies forrajeras se muestra la existencia de variabilidad genética respecto a la tolerancia a la salinidad en poblaciones naturales provenientes de sitios con condiciones contrastantes y, en especial cuando se evalúan poblaciones provenientes de sitios con limitaciones edáficas (Bazzigalupi *et al.* 2008; Abbott *et al.* 2009; Jauregui *et al.* 2017). Se ha encontrado que poblaciones de provenientes de lugares salinos fueron más tolerantes a la salinidad mientras que poblaciones de lugares no salinos presentaron variabilidad para dicho carácter (Ashraf 1994). Así, Bazzigalupi *et al.* (2008) al evaluar el comportamiento germinativo de diez poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyron ponticum*), en la provincia de Buenos Aires, bajo estrés salino por NaCl (0, 60, 135 y 220 mM) encontraron que poblaciones provenientes de lugares salinos fueron más tolerantes a la salinidad respecto a aquellas poblaciones de lugares no salinos en las cuales se observó variabilidad para dicho carácter.

Para nuestras condiciones experimentales, es posible que la mayor tolerancia en la población SE+ se deba a una selección en su ambiente (salino, CE > 4 dS m⁻¹) respecto a TE+, y a la estructura genética de ambos genotipos. La población es genéticamente heterogénea en relación al cv. Taita, donde la selección redujo la heterogeneidad. La heterogeneidad genética de la población le permite una mayor adaptabilidad a los ambientes salinos frente al cultivar que además puede haber estado seleccionado para otro tipo de ambiente. Por otro lado, se ha demostrado que en gramíneas infectadas con hongo endófito *Epichloë*, el efecto tóxico del Na⁺ puede ser contrarrestado a través del aumento de la concentración de K⁺ y de la relación K⁺: Na⁺ en las plantas (Reza Sabzalian y Mirlohi 2010). Además, la tolerancia a la salinidad en las plantas infectadas podría deberse a que el endófito, bajo condiciones de estrés, puede reducir la acumulación de osmolitos que limitan el crecimiento (Munns y Tester 2008) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rodríguez *et al.* 2008). Esto resulta importante dado que se ha demostrado que el estrés salino afecta las relaciones planta-agua y esto podría desencadenar una mayor producción de osmolitos (Bohnert *et al.* 1995) y provocar el marchitamiento, la desecación y la muerte de las plantas (Rodríguez *et al.* 2008). De todas maneras, los mecanismos involucrados en el aumento de la tolerancia al estrés ambiental por parte del endófito son complejos y dependen de la genética del hospedante y del endófito, así como de las condiciones ambientales (Davitt *et al.* 2010; Gundel *et al.* 2010) y sus interacciones.

Ante el inminente cambio climático global, los resultados del presente trabajo adquieren particular importancia considerando que las predicciones indican una tendencia creciente en la frecuencia de exposición de las plantas a condiciones de estrés salino (Taleisnik *et al.* 2021; IPCC 2022). Así, la tolerancia a condiciones de salinidad en las plantas de festuca alta SE+ constituiría un atributo que le otorga capacidad para establecerse en suelos que son

restrictivos para otras especies. Futuros experimentos deberían realizarse a campo y extenderse a un mayor número de poblaciones o cultivares de festuca alta para determinar los efectos del genotipo como así también, deberían llevarse a cabo en estados más avanzados de desarrollo de las plantas que incluyan la producción de semillas. Además, se deberían realizar otras determinaciones en planta para ver los efectos de la salinidad sobre los procesos metabólicos (*i.e.* contenido de osmolitos solubles como azúcares solubles en agua y azúcares totales, Chauhan *et al.* 1980).

Conclusiones

En altas concentraciones salinas, la presencia del endófito silvestre en las semillas de festuca alta de la población naturalizada aumenta la energía germinativa. Esto sugiere que, en suelos con alta salinidad, los genotipos infectados con endófito silvestre tendrán mejor comportamiento en la germinación que los cultivares comerciales y genotipos silvestres y sin endófitos. Futuros experimentos son requeridos para corroborar la superioridad observada.

Agradecimientos

El presente estudio se desarrolló en el marco del Proyecto de Investigación en el marco del Proyecto de Investigación PI-INICIAL "Tolerancia a la salinidad de festuca alta libre e infectada con endófito silvestre o seguro" (RR 4929/2021) correspondiente a la Universidad Nacional de Mar del Plata. Agradecemos a la empresa Gentos S.A. por la provisión de semillas de festuca alta cv. Taita y a los revisores por los aportes que mejoraron el manuscrito.

Bibliografía

- Abbott L, Pistorale S, Andrés A (2009) Evaluación de los componentes del rendimiento en semilla mediante coeficientes de sendero en poblaciones de agropiro alargado. *Agriscientia* **26**, 55-62.
- Ashraf M (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 17-42
- Bahizire FB (2007) 'Effect of salinity on germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.)'. Master of Agricultural Sciences thesis, University of Stellenbosch, Sudáfrica.
- Baskin C, Baskin JM (2014) 'Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination'. (Academic Press: San Diego, USA).
- Bazzigalupi O, Pistorale S, Andrés A (2008) Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Ciencia e Investigación Agraria* **35**, 277-285.
- Belanger FC (1996) A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Science* **36**, 460-462.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**, 1099.
- Borrajo CI, Alonso SI (2004) Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropiro alargado. *Revista Argentina de Producción Animal* **24**, 29-40.
- Bouton JR, Gates R, Hill N, Hoveland C (2002) Agronomic traits with MaxQ tall fescue. In 'SERAIRG-8. Proceedings of Tall Fescue Toxicosis Workshop'. SERAIRG-8, Wildersville, TN. Pp. 40-41. (Missouri Forage and Grassland Council).
- Cardamone L, Cuatrín A, Grunberg K, Tomás MA (2018) Variability for salt tolerance in a collection of *Panicum coloratum* var. makarikariense during early growth stages. *Tropical Grasslands* **6**, 134-147.
- Chauhan RPS, Chauhan CPS, Kumar D (1980) Free proline accumulation in cereals in relation to salt tolerance. *Plant and Soil* **57**, 167-175.
- Clay K, Schardl C (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**, 99-127.
- Davitt AJ, Stansberry M, Rudgers JA (2010) Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist* **188**, 824-834.
- Do Valle Ribeiro MAM (1993) Transmission and survival of *Acremonium* and the implications for grass breeding. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **44**, 195-213.
- Forcella F, Benesch-Arnold RL, Sanchez RA, Ghera CM (2000) Modeling seedling emergence. *Field Crops Research* **67**, 123-139.
- Fuhlendorf SD, Harrell WC, Engle DM, Hamilton RG, Davis CA y Leslie Jr DM (2006) Should heterogeneity be the basis for conservation? Grassland bird response to fire and grazing. *Ecological Applications* **16**, 1706-1716.
- González LM, González MC, Ramírez R (2002) Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos Tropicales* **23**, 27-37.
- Gundel PE, Omacini M, Sadras VO, Ghera CM (2010) The interplay between the effectiveness of the grass-endophyte mutualism and the genetic variability of the host plant. *Evolutionary Applications* **3**, 538-546
- Koga H, Christensen MJ, Bennett RJ (1993) Incompatibility of some grass/*Acremonium* endophyte associations. *Mycological Research* **97**, 1237-1244.
- Hopkins AA, Young CA, Simpson WR, Panaccione DG, Mittal S, Bouton JH (2010) Agronomic performance and lamb safety of tall fescue novel endophyte combinations in the south central USA. *Crop Science* **50**, 1552-1561.
- Hoveland CS (1993) Economic importance of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**, 3-12.
- IPCC (2022) Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. (Eds. HO Pörtner *et al.*). (Cambridge University Press: Cambridge, UK).
- Iqbal J, Siegrist JA, Nelson JA, McCulley RL (2012) Fungal endophyte infection increases carbon sequestration potential of southeastern USA tall fescue stands. *Soil Biology and Biochemistry* **44**, 81-92.
- ISTA (2008) International Rules for Seed Testing. (International Seed Testing Association: Bassersdorf, Suiza).
- Jauregui CG, Ruiz MA, Ernst RD (2017) Tolerancia a la salinidad en plántulas de agropiro criollo (*Elymus*

- scabrifolius*) y agropiro alargado (*Thinopyron ponticum*). *Pastos y Forrajes* **40**, 29-36.
- Koch ED, Honig J, Vaiciunas J, Meyer WA, Bonos SA (2017) Effect of endophyte on salinity tolerance in perennial ryegrass. *International Turfgrass Society Research Journal* **13**, 459-465.
- Lattanzi FA, Mazzanti A, Wade MH (2007) Seasonal animal production of temperature and Mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**, 203-213.
- Lee K, Missaoui A, Mahmud K, Presley H, Lonnee M (2021) Interaction between grasses and *Epichloë* endophytes and its significance to biotic and abiotic stress tolerance and the rhizosphere. *Microorganisms* **9**, 2186-2213.
- Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White JF, Tadych M (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycology* **106**, 202-215.
- Milne GD (2009) Management in New Zealand, Australia and South America. In 'Tall fescue for the Twenty-first Century'. (Eds. HA Fribourg, DB Hannaway, CP West CP) pp. 101-108. (Agronomy Monographs. ASA, CSSA, and SSSA: Madison, WI).
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Nosquese MA (2017) Efectividad de diferentes métodos de remoción de hongo endófito asintomático en semillas de festuca alta. Tesis de grado, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Petigrosso LR, Colabelli MN, Fernández ON, Ispizúa V, Cendoya MG (2013) Incidence of the endophyte fungus *Neotyphodium coenophialum* in pastures of tall fescue differing in age and soil characteristics. *African Journal of Agricultural Research* **8**, 2655-2662.
- Petigrosso LR, Gundel P, Colabelli MN, Fernández ON, Assuero SG (2019) Hongos endófitos en festuca alta: del problema a las soluciones. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **45**, 292-303.
- Petigrosso LR, Spagnuolo G, Vignolio OR, Monterubbianessi MG, Assuero SG (2021) Emergencia y crecimiento de festuca alta libre e infectada con endófitos silvestres o seguros. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata* **120**, 1-11.
- Phillips TD, Aiken GE (2009) Novel endophyte-infected tall fescues. *Forage & Grazinglands* **7**, 1-6.
- Principi MA, Mattana RR, Cardinali OP, Colodro JL (2011) Diseño y prestaciones de un prototipo de siembra directa para intersemebra de pasturas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **37**, 54-61.
- Reza Sabzalian M, Mirlohi A (2010) *Neotyphodium* endophytes trigger salt resistance in tall and meadow fescues. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**, 952-957.
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria).
- Rodríguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y-O, Redman RS (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *Journal of the International Society for Microbial Ecology* **2**, 404-416.
- Rodríguez A, Jacobo E (2012) Manejo de pastizales naturales para una ganadería sustentable en la Pampa Deprimida. Buenas prácticas para una ganadería sustentable del pastizal. (Fundación Vida Silvestre Argentina; Aves Argentinas: Buenos Aires, Argentina).
- Roitman G, Preliasco P (2018) Guía de reconocimiento de herbáceas de la Pampa Deprimida. Buenas prácticas para una ganadería sustentable de pastizal. Características para su manejo. (FAUBA y Fundación Vida Silvestre: Buenos Aires, Argentina).
- Ruiz M, Terenti, O (2012) Evaluación comparativa de cuatro especies forrajeras bajo condiciones de estrés hídrico y salino durante la germinación. *Agriscientia* **29**, 91-97.
- Scheneiter JO, Kaufmann II, Ferreyra AR, Llorente RT (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.
- Soto MB, Echeverría MM, Lúquez JE, San Martino S, Assuero SG, Petigrosso LR (2022) Tolerancia a la salinidad de festuca alta, naturalizada y comercial, libre e infectada con endófitos durante la germinación. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata* **121**, 1-15.
- Strickland JR, Looper ML, Matthews JC, Rosenkrans CF, Flythe Jr. MD, Brown KR (2011) St. Anthony's Fire in livestock: Causes, mechanisms, and potential solutions. *Journal of Animal Science* **89**, 1603-1626.
- Tal M (1985) Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant and Soil* **89**, 199-226.
- Taleisnik E, Rodríguez AA, Bustos DA, Luna DF (2021) Plant tolerance mechanisms to soil salinity contribute to the expansion of agriculture and livestock production in Argentina. In 'Saline and Alkaline Soils in Latin America.' (Eds. E Taleisnik, RS Lavado) pp. 381-397. (Springer, Cham: Switzerland).
- Vaccaro AS, Dodyk L, Lapido R, De Miguel A, Grilli P (2020) ¿Cómo contribuye la alianza del pastizal a la conservación de las aves en la Pampa Deprimida? *El Hornero* **35**, 95-109.
- Vázquez de Aldana BR, Álvarez Martín A, García Ciudad A, Zabalgoceazcoa I, García Criado B (2011) El hongo endofítico *Epichloë festucae* y la tolerancia al estrés salino en *Festuca rubra*. En 'Pastos, paisajes culturales entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI'. (Eds. C López Carrasco Fernández, MP Rodríguez Rojo, A San Miguel Ayanz, S Roig González) pp. 183-188. (SEEP: Toledo, España).
- Wang Z, Li C, White J (2020) Effects of *Epichloë* endophyte infection on growth, physiological properties and seed germination of wild barley under saline conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* **206**, 43-51.
- Weitbrecht K, Muller K, Leubner-Metzger G (2011) First off the mark: Early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62**, 289-330.
- White JF Jr, Torres M (2009) Defensive mutualism in microbial symbiosis. (CRC Press: Boca Raton, FL, USA).
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM (2002) Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report, 25-33.