

2

TRABAJOS CIENTÍFICOS

EFFECTO DE DOS CEPAS DEL HONGO ENDOFITO *ACREMONIUM COENOPHIALUM* SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO EN UNA POBLACIÓN DE FESTUCA ALTA 'HIMAG'

J.A. OLIVEIRA ¹, D.A. SLEPER ², C.P. WEST ³,
S.S. BUGHRARA ² y J. COUTTS ²

(1) Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.
Apartado 10. 15080 La Coruña (España).

(2) Department of Agronomy, University of Missouri.
Columbia, CO 65211 (Estados Unidos).

(3) Department of Agronomy, University of Arkansas.
Fayetteville, AR 72704 (Estados Unidos).

RESUMEN

En el presente trabajo se investiga la influencia de dos cepas del hongo endofito *Acremonium coenophialum* sobre la supervivencia de una población de festuca alta 'Himag' al déficit hídrico en suelo. Las plantas se instalaron en un invernadero, en tiesos conteniendo un medio basado en turba. Tres grupos de plantas, dos infectados (E+) con las cepas Hm32 y Hm310, y el tercero sin endofito (E-) Hm, se sometieron a un primer ciclo de acondicionamiento al estrés hídrico, tras el cual se aplicó un segundo ciclo de estrés hídrico severo. El número de tallos al final del estrés, la supervivencia de los tallos, el peso seco y la anchura de las hojas fueron significativamente superiores en el tratamiento Hm32 respecto al tratamiento sin endofito Hm ($P < 0,01$; $0,001$; $0,01$ y $0,001$ respectivamente). No hubo diferencias significativas en la anchura de las hojas entre Hm32 y Hm310, pero sí a favor de Hm32, en el número de tallos al final del estrés, la supervivencia de los tallos y el peso seco ($P < 0,05$; $0,01$ y $0,05$ respectivamente). La mayor supervivencia de los tallos de la cepa Hm32 podría conferir una ventaja adaptativa a la población 'Himag' de festuca en zonas con déficit en agua.

Palabras clave: *Festuca arundinacea*, tolerancia a la sequía, forraje.

INTRODUCCIÓN

La festuca alta 'Himag' es una población experimental seleccionada por su alto rendimiento y contenido en magnesio. El propósito de desarrollar esta población fue re-

ducir los problemas debidos a la tetania en la zona productora de festuca de Estados Unidos (Sleper *et al.*, 1980).

En el interior de la festuca habita *Acremonium coenophialum* que es un hongo endofito. Se estima que más de 14 millones de has en Estados Unidos están infectadas con este hongo, que puede causar efectos perjudiciales sobre los animales, entre los que podemos destacar la pérdida de peso, los bajos índices de fertilidad, la baja producción de leche y la elevada temperatura corporal. Sin embargo, este hongo tiene efectos beneficiosos sobre las plantas incluyendo una mayor tolerancia a los estreses abióticos (frío y sequía) y bióticos (insectos, hongos etc.).

Entre las razones que podrían explicar la mayor tolerancia de las festucas infectadas a la sequía estaría el mayor crecimiento de las raíces en las plantas infectadas (West *et al.*, 1988). Se ha observado también que las festucas infectadas expresan un mayor ajuste osmótico y mantienen una mayor turgencia sometidas a estrés hídrico (Elmi *et al.*, 1992).

El objetivo de este trabajo fue estudiar si el tipo de cepa infectante afecta a la tolerancia a la sequía de la población 'Himag'.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este ensayo se utilizaron plantas de festuca de una población 'Himag' obtenida por mejora genética en la Universidad de Columbia (Missouri), parte de ellas sin endofito (Hm) y otras con dos cepas de *Acremonium coenophialum*. Las cepas ensayadas fueron la Hm32 procedente de una *Festuca arundinacea* hexaploide y la Hm310 procedente de una *Festuca mairei* de Marruecos. Se plantaron tres plántulas de 8 semanas, para cada tratamiento, en tiestos de 3 L, conteniendo un medio basado en turba. El diseño experimental fue en dos bloques al azar (un bloque con 8 tiestos por tratamiento y el otro con 7 tiestos). La disposición de los tiestos se cambió dos veces por semana en el invernadero. Los tiestos se regaron y fertilizaron con una solución nutritiva comercial (20-20-20 N-P-K) para promover un buen crecimiento durante las siete semanas previas al estrés hídrico.

Para acondicionar al déficit hídrico se suspendió el riego durante 10 días hasta que se produjo un enrollamiento moderado de las hojas. En el ensayo se incluyeron también tiestos control (8 tiestos por tratamiento) regados al 90% de la capacidad de campo. Una vez finalizado el acondicionamiento de las plantas se regaron todos los tiestos hasta el 100% de la capacidad de campo y se contaron los tallos. A continuación se volvió a suspender el riego, hasta que las hojas se enrollaron severamente. Una vez

terminada la fase de estrés se cortaron todas las plantas a unos 3 cm del suelo obteniéndose el peso seco (MS) después de secado a 60°C durante 24 horas. Por último, se volvieron a regar todos los tiestos y se mantuvieron al 90% de la capacidad de campo durante 21 días para evaluar el porcentaje de tallos que sobrevivieron (ST).

Se midió la conductancia estomática (g), la fotosíntesis neta (A) y la transpiración (T) de la hoja más joven completamente expandida, mediante un sistema portátil para medir la fotosíntesis (LI-6200, LICOR), siguiendo las normas de medida recomendadas para este equipo. Se midió una hoja por tiesto al sexto día del comienzo del estrés severo. Las mediciones se realizaron a partir de las 11 de la mañana. Durante las mediciones la radiación fotosintéticamente activa estuvo en el intervalo de 1500-1600 micromoles $\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La temperatura ambiente estuvo entre 15-17°C y la humedad relativa entre 16-19%. Se estimó el grado de enrollamiento de las hojas durante el acondicionamiento de las plantas (E1) y durante el estrés (E2), mediante una escala de uno (sin enrollamiento) a cinco (muy enrollado). El número de tallos en crecimiento se contó al comienzo del estrés (T1) y a las tres semanas después del estrés (T2), calculándose el porcentaje de supervivencia de los tallos por tiesto. Se transformó este valor mediante el arcoseno de la raíz cuadrada del tanto por uno de la supervivencia de los tallos, para obtener una distribución normal de esta variable (AST). Después del estrés, se midió la longitud (LH) y anchura (AH) de tres hojas por tiesto durante seis días, y se calculó el alargamiento por día (AL).

Cuando el análisis de varianza mostró resultados significativos, se utilizaron contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre los tratamientos E+ y E- y entre los dos E+.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tres tratamientos (Hm, Hm32 y Hm310) en la fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la transpiración, ni en el enrollamiento y alargamiento de las hojas. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el % de supervivencia de los tallos, el número de tallos después del estrés, el peso seco y la anchura de hojas (Tabla 1). En el caso del peso seco, el contraste E+ (Hm32+Hm310) con relación a E- (Hm) no fue significativo.

Hm32 fue el tratamiento con valores más altos y favorables para los caracteres significativos (Tabla 2), resultando los contrastes ortogonales entre Hm310 y Hm32 significativos a favor de Hm32, salvo en el caso de la anchura de hojas, carácter en el que no se observaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos.

TABLA 1

Niveles de significación y contrastes ortogonales en el análisis de varianza para los caracteres significativos: AST = Arcoseno de la raíz cuadrada del tanto por uno de la supervivencia de tallos, MS = Materia seca (g), T1 = Número de tallos por tiesto al comienzo del estrés, T2 = Número de tallos por tiesto al final del estrés, E1 = Enrollamiento de hojas en el acondicionamiento, E2 = Enrollamiento de hojas en el estrés, AH = Anchura de las hojas (mm), AL = Alargamiento de las hojas ($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$), A = Fotosíntesis neta ($\text{micromol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), g = Conductancia estomática ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), T = Transpiración ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); E+ = Hm310 + Hm32; E- = Hm; *, **, *** = Test F significativo al nivel $P < 0,05, 0,01$ y $0,001$, respectivamente; ns = Test F no significativo al nivel $P > 0,05$.

Significant levels and orthogonal contrasts in the analysis of variance for:
 AST = Arcsinus square root (tiller survival), MS = Dry matter yield (g), T1 = Tiller number at the beginning of the dry-down (tillers per pot), T2 = Tiller number at the end of the dry-down (tillers per pot), E1 = Leaf rolling in the preconditioning phase, E2 = leaf rolling in the stress, AH = Leaf width (mm), AL = Leaf elongation rate ($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$), A = Net photosynthesis ($\text{micromol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), g = Stomatal conductance ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), T = Transpiration ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); E+ = Hm310 + Hm32; E- = Hm; *, **, *** = Significant F-test at $P < 0.05, 0.01$ y 0.001 , respectively; ns = Non significant F-test at $P > 0.05$.

Fuentes de variación	AST	MS	T1	T2	E1	E2	AH	AL	A	g	T
Tratamiento	***	*	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Contraste											
E+ vs E-	***	ns	ns	*	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
Hm310 vs Hm32	**	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Hm32 vs E-	***	**	ns	**	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo no apoyan la idea de que la conductancia estomática y la transpiración sean más bajas en las plantas infectadas respecto a las no infectadas (Elbersen *et al.*, 1994). Los valores bajos de conductancia estomática y de transpiración en condiciones de estrés para las plantas infectadas podrían conferir una ventaja

TABLA 2

Valores medios y errores estándar (e.s.) para: ST = Porcentaje de supervivencia de tallos, MS = Materia seca (g), T1 = Número de tallos por tiesto al comienzo del estrés, T2 = Número de tallos por tiesto al final del estrés, E1 = Enrollamiento de hojas en el acondicionamiento (uno = sin enrollamiento, cinco = muy enrollado), E2 = Enrollamiento de hojas en el estrés, AH = Anchura de las hojas (mm), AL = Alargamiento de las hojas (mm/día), A = Fotosíntesis neta (micromol CO₂ * m² * s⁻¹), g = Conductancia estomática (mol * m⁻² * s⁻¹), T = Transpiración (mol * m⁻² * s⁻¹) en la población Himag sin endofito (Hm) y con dos cepas de endofito (Hm310 y Hm32).

Mean values and standard errors for: ST = % tiller survival, MS = Dry matter yield (g), T1 = Tiller number at the beginning of dry-down (tillers per pot), T2 = Tiller number at the end of the dry-down (tillers per pot), E1 = Leaf rolling in the preconditioning phase (one = no rolling, five = tightly rolling), E2 = leaf rolling in the stress, AH = Leaf width (mm), AL = Leaf elongation rate (mm*d-1), A = Net photosynthesis (micromol CO₂ * m² * s⁻¹), g = Stomatal conductance (mol * m⁻² * s⁻¹), T = Transpiration (mol * m⁻² * s⁻¹) on the Himag population without endophyte (Hm) and with two strains of endophyte (Hm310 and Hm32).

	Hm310	Hm32	Hm	e.s.
ST	51,34	72,73	37,90	2,66
MS	10,79	13,85	10,37	0,70
T1	91,80	80,33	107,80	3,73
T2	48,60	75,47	40,67	5,21
E1	3,03	2,93	2,76	0,07
E2	3,04	3,04	3,49	0,07
AH	6,19	6,46	5,00	0,13
AL	52,88	58,96	36,90	2,18
A	11,13	13,42	13,08	0,52
g	0,14	0,17	0,19	0,02
T	0,005	0,005	0,006	0,0003

adaptativa (mayor supervivencia a la sequía y condiciones limitantes) sobre las plantas sin endofito o especies competidoras en ambientes con recursos de agua y nutrientes limitados (Belesky *et al.*, 1987). Richardson *et al.* (1993) tampoco encontraron un efecto

en la conductancia en dos genotipos sometidos a estrés hídrico. Tampoco se encontró un efecto del endofito en el enrollamiento de las hojas en los tres tratamientos al igual que White *et al.* (1992). Arachevaleta *et al.* (1989) mostraron que plantas de un genotipo de festuca alta no infectadas exhibían enrollamiento de hojas antes que las plantas infectadas, en un genotipo de festuca alta sometido a estrés hídrico. Normalmente la tardanza en enrollarse las hojas se asocia con una mayor tolerancia a la sequía en la festuca alta (West y Gwinn, 1993), aunque el valor del enrollamiento de las hojas como predictor de la tolerancia a la sequía es dudoso (West, 1994). La presencia de endofito incrementó los rendimientos en materia seca en un mismo genotipo de festuca tras ser sometidos a estrés hídrico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Elmi *et al.* (1992). Las medidas del alargamiento y anchura de las hojas después de un estrés hídrico muestran la capacidad de estos genotipos para recuperar su área foliar tras un estrés fuerte. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el alargamiento de las hojas por día pero sí en la anchura de las mismas. Thomas (1990) observó que la tasa de alargamiento foliar tras un estrés hídrico estaba correlacionada positivamente con el ajustamiento osmótico y la acumulación de prolina en raigrás inglés. Hill *et al.* (1990) apreciaron que los genotipos infectados producían menos tallos pero más anchos que los no infectados en un ensayo realizado en invernadero con 4 clones seleccionados del cultivar de festuca alta 'Kentucky 31'. Al igual que en trabajos realizados con el cultivar 'Kentucky 31' en invernadero (Elmi, 1992) y en campo (West *et al.*, 1993), en el presente estudio se asoció una mayor supervivencia de tallos con la presencia del endofito. Elmi y West (1995) encontraron correlaciones positivas entre el ajuste osmótico basal y el porcentaje de tallos sobrevivientes de un estrés hídrico severo en un genotipo de festuca y en el cultivar 'Kentucky 31'.

CONCLUSIÓN

Se encontraron variaciones en las asociaciones hospedador-endofito en la respuesta a la sequía y estas variaciones fueron dependientes de la cepa de endofito. Esta variabilidad se podría utilizar para mejorar la supervivencia de los tallos de la población 'Himag' en zonas con déficit en agua, mediante la utilización de la cepa Hm32.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica (OCDE) en el programa: Biological Resource Management for Sustai-

nable Agricultural Systems (1995 Postdoctoral Fellowship Programme). El trabajo experimental se realizó en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Missouri-Columbia y fue coordinado por el Dr. D.A. Sleper.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARACHEVALETA, M.; BACON, C.W.; HOVELAND, C.S.; RADCLIFFE, D.E., 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron. J.*, **81**, 83-90.
- BELESKY, D.P.; DEVINE, O.J.; PALLAS, J.E. Jr.; STRINGER, W.C., 1987. Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. *Photosynthetica*, **21**, 82-87.
- ELBERSEN, H.W.; BUCK, G.W.; WEST, C.P.; JOOST, R.E., 1994. Water loss from tall fescue leaves is decreased by endophyte. *Arkansas Farm Research*, **43(5)**, 8-9.
- ELMI, A.A.; WEST, C.P.; TURNER, K.E.; OOSTERHUIS, D.M., 1992. *Acremonium coenophialum* effects on tall fescue water relations. En: *Proc. Int. Symp. on Acremonium/Grass Interactions*, 137-140. Ed. S.S. QUINSENBERRY, R.E. JOOST. La. Agric. Exp. Stn. Baton Rouge. New Orleans (Estados Unidos).
- ELMI, A.A., 1992. *Physiological effects of endophyte and nematodes on water relations in tall fescue*. PhD Diss. Abstr. Order no.9237355. University of Arkansas, Fayetteville (Estados Unidos).
- ELMI, A.A.; WEST, C.P., 1995. Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment and drought recovery of tall fescue. *New Phytol.* **131**, 61-67.
- HILL, N.S.; STRINGER, W.C.; ROTTINGHAUS, G.E.; BELESKY, D.P.; PARROT, W.A.; POPE, D.D., 1990. Growth, morphological and chemical component responses of tall fescue to *Acremonium coenophialum*. *Crop Sci.*, **30**, 156-161.
- RICHARDSON, M.D.; HOVELAND, C.S.; BACON, C.W., 1993. Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and non-symbiotic tall fescue. *Crop. Sci.*, **33**, 145-149.
- SLEPER, D.A.; GARNER, G.B.; NELSON, C.J.; SEBAUGH, J.L., 1980. Mineral concentration of tall fescue genotypes grown under controlled conditions. *Agron. J.*, **72**, 720-722.
- THOMAS, H., 1990. Osmotic adjustment in *Lolium perenne*: its heritability and the nature of solute accumulation. *Annals of Botany*, **66**, 521-530.
- WEST, C.P.; GWINN, K.D., 1993. Role of *Acremonium* in drought, pest and disease tolerances of grasses. En: *Proc. 2nd Int. Symp. on Acremonium/Grass Interactions*, 131. Eds. C.E. HUME, G.C.M. LATCH; H.S. EASTON. AgResearch. Grasslands Research Centre. Palmerston North (Nueva Zelanda).
- WEST, C.P.; IZEKOR, E.; OOSTERHUIS, D.M.; ROBBINS, R.T., 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil*, **112**, 3-6.
- WEST, C.P.; IZEKOR, E.; TURNER, K.E.; ELMI, A.A., 1993. Endophyte effects on growth and persistence of tall fescue along a water supply gradient. *Agronomy Journal*, **85**, 264-270.
- WEST, C.P., 1994. Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. En: *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*, 87-99. Ed. C.W. BACON; J.F.Jr. WHITE. CRC Press Inc. Boca Raton (Estados Unidos).
- WHITE, R.H.; ENGELKE, M.C.; NORTON, S.J.; JOHNSON-CICALEASE, J.M.; RUEMMELE, B.A., 1992. *Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance. *Crop Science*, **32**, 1392-1396.

**EFFECT OF TWO STRAINS OF THE ENDOPHYTE FUNGUS
ACREMONIUM COENOPHIALUM ON 'HIMAG' TALL
FESCUE DROUGHT STRESS.**

SUMMARY

The influence of two strains of *Acremonium coenophialum* on drought survival of the selected 'Himag' (Hm) tall fescue population was investigated. Endophytes-infected (E+) Hm32 and Hm310, and endophyte-free (E-) Hm tall fescues were exposed to one drought stress cycle. Tiller number at the end of the dry-down, tiller survival, dry weight and leaf width were significantly greater in the endophyte-infected Hm32 than in the endophyte-free Hm ($P < 0.01, 0.001, 0.01$ and 0.001 respectively). There was no differences in leaf width between Hm32 and Hm310. However, significant differences were found in tiller number at the end of the dry-down, tiller survival and dry weight ($P < 0.05, 0.01$ and 0.05 respectively). Increased drought survival of Hm32 infected plants may confer a competitive advantage to the 'Himag' population in water deficit environments.

Key words: *Festuca arundinacea*, drought survival, forage.