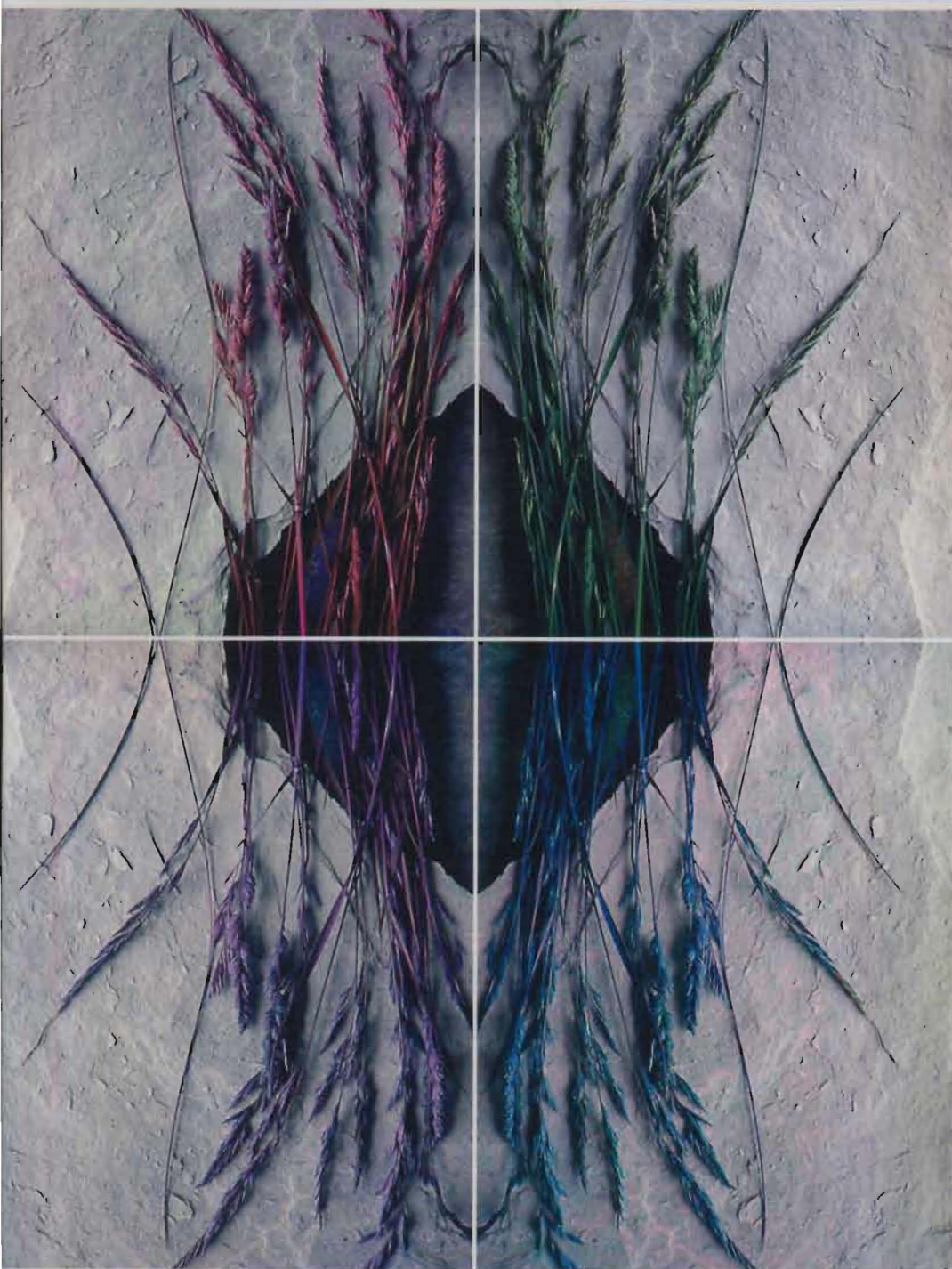


Pastos y Ganadería Extensiva



Editores:
Balbino García Criado
Antonia García Ciudad
Beatriz R. Vázquez de Aldana
Iñigo Zabalgoeazcoa

Sociedad Española para el Estudio de los Pastos

Título: Pastos y Ganadería Extensiva

Editores Científicos: B. García Criado, A. García Ciudad, B.R. Vázquez de Aldana, Í. Zabalgoeazcoa

© *de los textos*: los autores

Diseño de cubierta: Beatriz R. Vázquez de Aldana

I.S.B.N.: 84-688-6576-1

Depósito legal: SA - 620 - 2004

Gráficas Cervantes, S.A.

Ronda de Sancti-Spíritus, 9-11

37001 Salamanca

Impreso en España

Printed in Spain

Identificación de especies y relaciones interespecíficas en hongos endofíticos en poblaciones naturales de *Lolium perenne*

M. ESPADAS RESENDIZ², M. ROMO VAQUERO¹, B.R. VAZQUEZ DE ALDANA¹, A. GARCIA CIUDAD¹, B. GARCIA GRIADO¹ e I. ZABALGOGEAZCOA¹

¹Grupo de Pastos, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apdo. 257, 37008 Salamanca (España).

²Universidad Nacional Autónoma de México. DGAPA-PASPA. FESC Cuautitlan. Campo 4. Km. 2.5 Carretera Cuautitlan-Teoloyucan s/n C.P. 54712 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex

RESUMEN: Se han identificado diversas especies de hongos endofíticos que infectan a *Lolium perenne*, en los pastos de las provincias de Salamanca, Zamora y León. La incidencia media de infección fue de 55,01%. En función de su morfología se identificaron tres tipos de endofitos: Tipo A con un crecimiento lento y sin conidios; Tipo B de crecimiento rápido y sin conidios; Tipo C con crecimiento rápido y con conidios. Su identificación molecular fue realizada por medio de secuencias nucleotídicas pertenecientes a la región ITS-1/5.8 S rRNA/ITS-2; la secuenciación de las distintas muestras permitieron su agrupación en: *Neotyphodium* sp., *Epichloë festucae* y *Epichloë typhina*. Finalmente, en plantas de *Lolium perenne* se detectó ergovalina, compuesto relacionado con el síndrome de festucosis en ganado vacuno, presente en una concentración que oscila entre 0,05 y 3,90 mg g⁻¹.

Palabras clave: Endofitos, *Neotyphodium*, *Epichloë*, pastos.

Identification of endophytic fungi in natural populations of *Lolium perenne*

SUMMARY: Endophyte fungi that infect *Lolium perenne* in the provinces of Salamanca, Zamora and León were identified. Average infection incidence by endophyte was 55.01 %. Based on their morphology three groups of endophytes were identified. Type A slow growth without conidia; type B fast growth without conidia; type C fast growth with conidia. Molecular identification was done using sequences from ITS-1 / rRNA / ITS2 region, sequences samples were grouped within: *Neotyphodium* sp., *Epichloë festucae* and *Epichloë typhina*. Finally, ergovaline was detected on samples of *Lolium perenne*, in 0.05 to 3.90 mg g⁻¹ concentration. Ergovaline is related to festucosis syndrome in cattle.

Key words: Endophytes, *Neotyphodium*, *Epichloë*, grasses.

INTRODUCCIÓN

Las provincias de Salamanca, Zamora y León son áreas con pasto y arbolado de una composición florística muy diversa y en las que las gramíneas comprenden hasta un 80 % (en peso seco), siendo *Lolium perenne* una especie común en estas áreas. Esta gramínea perenne se caracteriza por un alto potencial reproductivo, un rápido establecimiento, una capacidad de persistencia en condiciones adversas y por ser una excelente especie forrajera. Algunas especies de gramíneas de zonas frías forman asociaciones mutualistas con hongos pertenecientes al género *Neotyphodium* y *Epichloë* (Clay y Schardl, 2002); *Lolium perenne*, como planta hospedadora es infectada por la especie asexual *Neotyphodium lolii* y una especie sexual *Epichloë typhina* (Schardl *et al.*, 1994), las cuales colonizan los espacios intercelulares de las diversas estructuras del hospedador, incluyendo la semilla, en el caso de las especies asexuales. Todas son asintomáticas en la fase de crecimiento vegetativo de la planta, pero durante el desarrollo de la espiga las especies sexuales pueden impedir el desarrollo de ésta y esterilizan a la planta (Moon *et al.*, 2002); *Neotyphodium* se transmite de forma vertical por semilla.

La asociación entre endofitos asintomáticos y gramíneas es de carácter mutualista, el hongo se beneficia de la planta al encontrar en su interior un hábitat, obtención de nutrientes y un medio de dispersión en el interior de la semilla; por su parte las plantas infectadas se benefician al obtener protección contra mamíferos e insectos herbívoros, resistencia a nematodos y patógenos fúngicos, así como tolerancia a estrés abiótico (Schardl *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1994); éstos beneficios obtenidos son debidos la síntesis de alcaloides. Sin embargo, estos alcaloides también son responsables de la baja productividad del ganado en régimen de pastoreo provocando el síndrome de "ryegrass stager" y la toxicosis de festuca estos síndromes están usual-

mente asociados a pastos infectados; Clay y Schardl, (2002) han estudiado la presencia de endofitos en festuca alta y "ryegrass"; estas toxicosis son responsables de grandes pérdidas económicas en la producción ovina en Nueva Zelanda debido a la presencia de endofitos en praderas de *L. perenne*; del mismo modo sucede para la producción de ganado de carne en Estados Unidos debido a praderas de *Festuca arundinacea* infectadas. En consecuencia hay un considerable interés en ampliar el conocimiento en algunas relaciones endofito - pasto. Por lo tanto se hace necesaria la identificación de las especies de endofitos que infectan a las poblaciones naturales de *Lolium perenne*. Se ha propuesto que el origen de las especies endofíticas asexuales es por hibridación de las especies sexuales (Tsai *et al.*, 1994; Shardl y Wilkinson, 2000; Clay y Shardl, 2002).

Los objetivos del presente trabajo son: aislar, identificar, determinar la incidencia de infección y la clasificación de las especies de hongos endofíticos que infectan a poblaciones naturales de *Lolium perenne* en pastos naturales, así como la detección y cuantificación de los alcaloides que aparecen como consecuencia de esta asociación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas asintomáticas

Se recogieron plantas asintomáticas de *Lolium perenne* en 17 poblaciones de pastos naturales de las provincias de Salamanca, Zamora y León (Tabla 1).

Aislamiento

A partir de plantas asintomáticas de *Lolium perenne* se tomaron fragmentos desinfectados de tallo y de hoja que fueron paqueados en agar de patata y dextrosa (PDA) con cloranfenicol con una concentración final de 200 mg/ml. Se determinó la presencia de hongos endofíticos, por observación de micelio intercelular en preparaciones de vainas foliares o médula del tallo.

Identificación y clasificación

El DNA de cultivos puros se aisló siguiendo el protocolo para la extracción del DNA con el kit DNeasy Plant (Quiagen). La región ITS-1/5.8S rRNA/ITS-2 fué amplificada usando los primers ITS 4, ITS 5 (White *et al.*, 1990) y su producto PCR secuenciado. Las secuencias resultantes fueron comparadas con el método de alineamientos Fasta en la base de datos de European Molecular Biology Laboratory, con el fin de identificar las secuencias. Para la clasificación de los aislados según sus secuencias nucleotídicas de la región (ITS-1/5.8S rRNA/ITS-2), se construyó un dendograma por el método de "Neighbor - joining" con el programa Mega I (Zabalgogea *et al.*, 2002).

Detección y cuantificación de ergovalina

Fue realizada a partir de muestras de plantas infectadas y liofilizadas, mediante HPLC con detección de fluorescencia (Hill *et al.*, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia de infección endofítica en plantas asintomáticas de Lolium perenne

Se definió como planta infectada por endofitos, a las plantas en cuyas vainas foliares o médula del tallo se observó micelio intercelular, o bien aquellas en cuyos fragmentos de tallos y hojas se observó el crecimiento de éstos en PDA; la infección endofítica está presente en un 55,01% de las plantas asintomáticas. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Incidencia de infección endofítica en 17 poblaciones de *Lolium perenne*.

Población	Número de plantas Infectadas / total	% Infección
Montalvo de la Estrella	4/7	57,1
Servández -1	6/12	50,0
Servández -2	17/30	56,7
Zarzoso	6/12	50,0
Cabaco -1	5/12	41,7
Cabaco -2	8/12	66,7
Tordelalosa	6/12	50,0
Aldeagordo	4/12	33,3
Cristo de Cabrera -1	5/12	41,7
Cristo de Cabrera -2	16/30	53,3
Membribe	6/12	50,0
Calzadilla de Mendigos	7/12	58,3
Los Valles -1	14/30	46,7
Los Valles -2	12/15	80,0
Sierra de la culebra	14/22	63,6
Tábara	22/30	73,3
Sagos	8/12	66,7
	Media	55,01

Identificación y clasificación de hongos endofíticos

Identificación morfológica

De los cultivos puros obtenidos, se observaron tres tipos diferentes de colonias:

Tipo A: Colonias de crecimiento lento, superficie rugosa y sin conidios.

Tipo B: Colonias de crecimiento rápido, superficie lisa en el centro de la colonia y sin conidios.

Tipo C: Colonias de crecimiento rápido, superficie algodonosa y con conidios.

Identificación molecular

Los 26 aislados secuenciados de la región ITS-1/5.8S rRNA/ITS-2 mostraron una similitud a los géneros *Epichloë* o *Neotyphodium*.

Se definieron tres especies de endofitos que infectan a *L. perenne*: *Epichloë typhina*, *Epichloë festucae* y *Neotyphodium* sp.

La clasificación de aislados de hongos endofíticos de *Lolium perenne* fue realizada a partir de las secuencias nucleotídicas de la región antes señalada. El dendrograma construido se muestra en la Figura 1.

Los aislados estériles del tipo A y B son asintomáticos y aparecen clasificados en el grupo *Neotyphodium* sp., mientras que los aislados que corresponden al tipo C son clasificados como *Epichloë typhina*, éstos producen conidios, experimentan un crecimiento rápido en PDA y es común que causen síntomas en la planta hospedadora; *E. typhina* algunas veces puede comportarse como patógeno, siendo el agente causal de la enfermedad del estrangulamiento de la espiga en pastos.

Los aislados que no producen conidios son clasificados como *Neotyphodium* sp. /*Epichloë festucae*; el criterio morfológico para diferenciar a A y B los cuales fue en función de la forma de la colonia y su velocidad de crecimiento. *Neotyphodium* sp. presenta un crecimiento lento y la morfología de la colonia se asemeja a un "cerebro" y de apariencia cerosa. *Epichloë festucae* muestra un crecimiento rápido y la morfología, de la colonia es de apariencia algodonosa. Por el contrario, hay algunos aislados que presentan crecimiento rápido y formación de conidios, que al hacer la identificación molecular corresponde a *E. festucae*, como en los aislados LpTA21 y LpP6; este último aislado de *L. perenne* (hospedador común en las poblaciones donde se

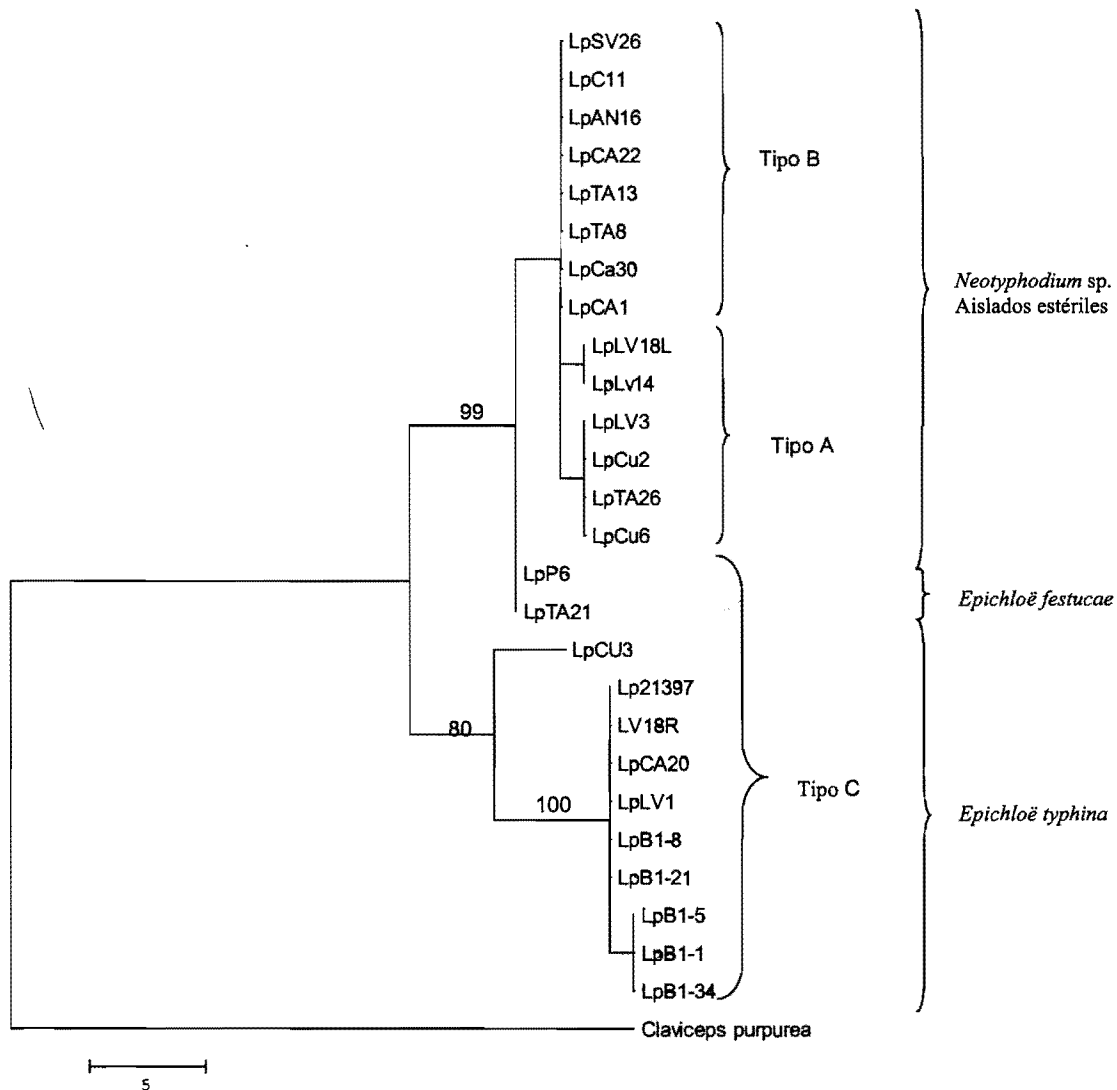


Figura 1.—Clasificación de endofitos de *Lolium perenne*: Según su tipo de crecimiento (velocidad de crecimiento en PDA y presencia de conidios) y las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la región ITS-1/5.8 rRNA/ITS-2.

realizó este estudio); está infectado por dos virus que infectan a aislados de *E. festucae* obtenidos de plantas de *F. rubra*, lo que indica que *E. festucae* podría haber “saltado” de otra especie hospedadora (*F. rubra*) a *L. perenne*.

Se detectó y analizó el contenido de ergovalina (mg/g materia seca); en plantas con los tres tipos de endofitos: A, B y C (Tabla 2). Las concentraciones obtenidas oscilan entre 0,05 y 3,90 mg g⁻¹. No obstante, en algunas poblaciones no se encontró este alcaloide, la ergovalina está asociado directamente al síndrome de la festucosis del ganado vacuno.

CONCLUSIONES

En las poblaciones naturales estudiadas de *Lolium perenne*, una media de 55,01% de las plantas resultaron estar infectadas por hongos endofíticos.

Tabla 2. Concentración de ergovalina en plantas infectadas, tipo de hongo y población donde se recolectó la planta; nd: no detectado y donde 0,20 mg g⁻¹ es el nivel considerado tóxico para ganado vacuno.

Identificación	Población	Morfología del hongo	Ergovalina (µg g ⁻¹)
CU8	S. Culebra	A	nd
CU12	S. Culebra	A	nd
CU15	S. Culebra	A	nd
LV3	Los Valles	A	nd
TA10	Tábara	A	3,90
AN12	Ancares	B	nd
AN27	Ancares	B	0,23
AN5	Ancares	B	nd
AN8	Ancares	B	0,22
CA2	Ancares	B	0,12
TA1	Tábara	B	0,05
C11	Cabrera	B	0,42
B7	Servández	C	nd
B8	Servández	C	0,10
B26	Servández	C	0,16
B27	Servández	C	nd
CA12	Cabaco	C	nd
CU3	S.C ulebra	C	0,57
LV1	Los Valles	C	nd
LV18	Los Valles	C	0,28
P6	Servández	C	0,09
21397	Servández	C	nd

Cuatro grupos de endofitos fueron identificados: *Neotyphodium* sp., con dos grupos A y B. El tipo A es de crecimiento lento, no forma conidios y no induce síntomas en las especies que infecta; el tipo B infecta a la planta, no provoca síntomas, es de crecimiento rápido y no forma conidios; el grupo considerado como *Epichloë festucae* no provoca síntomas, es de crecimiento rápido, forma conidios y mientras que los pertenecientes a *Epichloë typhina* induce síntomas, forma conidios, es de crecimiento rápido y es el agente causal de la enfermedad del estrangulamiento de la espiga.

Los resultados indican la posible existencia de interconexiones entre las distintas especies de endofitos en poblaciones naturales. Algunos aislados identificados poseen características morfológicas y moleculares que indican que podrían ser híbridos.

Se ha detectado el alcaloide ergovalina en los diferentes tipos de endofitos en un 50% de las plantas analizadas, en concentraciones que oscilan entre 0,05 y 3,90 mg g⁻¹. La concentración de ergovalina en las plantas infectadas de *L. perenne* no muestra relación con el tipo morfológico del endofito.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de la Junta de Castilla y León (CSI 6/01).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLAY, K.; SCHARD, C. L., 2002. Evolucionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, **160**, S99-S127.
- HILL, N.S.; ROTTINGHAUS, G. E.; AGEE, C. S.; SCHULT, L. M., 1993. Simplified sample preparation for HPLC analysis of ergovaline in tall fescue. *Crop Science*, **54**, 365-370.
- MOON, D.C.; MILES, O.C.; JÄRLFORS, U.; SCHARDL, C.L., 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous the Southern Hemisphere. *Mycologia*, **94** (4), 694-711.
- SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.; TSAI, H.F.; COLLET, M. A.; SCOTT, D.B., 1994. Origin of a fungal Symbiont of Perennial Ryegrass by Interestpecific Hibridization of a Mutualist with the Ryegrass Choke Pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, **136**, 1307-1317.
- SCHARDL, C.L.; WILKINSON, H., 2000. Hybridization and Cospeciation Hypotheses for the Evolution of Grass Endophytes. En: *Microbial Endophytes*, 63-83. Ed. C.W. BACON; J. F. WHITE. Marcel Dekker Inc. New York-Basel.
- TSAI, H.F.; LIU, J.S.; STABEN, C.; CHRISTENSEN, M.J.; LATCH, G.C.M.; SIEGEL, M.R.; SCHARDL, C.L., 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceeding of the National Academy of Sciencies of the USA*, **91**, 2542-2546.
- WHITE, J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J., 1990. Ampification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-321. Ed. M.A. INNIS; D.H. GELFAND; J.J. SNINSKY; T.J. WHITE Academic Press, San Diego, CA.
- ZABALGOGEAZCOA I.; VÁZQUEZ DE ALDANA B.R.; ROMO VAQUERO M.; GARCÍA CIUDAD, A.; GARCÍA CRIADO, B., 2002. Diversidad de hongos endofitos en *Lolium perenne*. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Almería. p. 142.