

Zabalgogezcoa I., García Ciudad A., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B. (2004)

La simbiosis del hongo endofítico *Epichloë festucae* altera el contenido de fósforo en *Festuca rubra*.

En: Pastos y Ganadería Extensiva. B. García Criado, A. García Ciudad, B.R. Vázquez de Aldana, I. Zabalgogezcoa (eds.), pp. 531-534 (2004)

La simbiosis con el hongo endofítico *Epichloë festucae* altera el contenido de fósforo en *Festuca rubra*

I. ZABALGOGEAZCOA, A. GARCÍA CIUDAD, B.R. VÁZQUEZ DE ALDANA y B. GARCÍA CRIADO

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Apartado 257. 37071 Salamanca.

RESUMEN: En los pastos de dehesas de Salamanca cerca del 70% de las plantas de *Festuca rubra* están permanentemente infectadas por el hongo endofítico *Epichloë festucae*. Se realizó un experimento de campo en el cual se comparó el contenido de fósforo en cinco líneas de *F. rubra*, cada una de las cuales estaba compuesta por una versión endofítica y otra no infectada. En plantas en estado vegetativo se detectó un aumento estadísticamente significativo del contenido de P en las plantas infectadas de todas las líneas. Este efecto también se observó en plantas en estado reproductivo, pero en este caso no hubo diferencias tan pronunciadas debidas a la infección. También se ha observado una tendencia a una mayor producción de biomasa por parte de las plantas infectadas por *Epichloë festucae*.

Palabras clave: *Neotyphodium*, endofitos, composición mineral.

The symbiosis with the fungal endophyte Epichloë festucae affects the phosphorus content of Festuca rubra

SUMMARY: In the dehesa grasslands of the province of Salamanca, close to 70% of the *Festuca rubra* plants are infected by the fungal endophyte *Epichloë festucae*. An experiment was done to compare the phosphorus content in five half-sib families of *Festuca rubra*. Each family was composed by an endophyte infected and an endophyte free version of the half-sib plants. In plants in vegetative state, the P content was significantly higher for infected plants in analyses conducted at two different years. During the reproductive state of the plants, a non-significant similar trend was observed. Biomass production was also higher in infected than in non-infected plants.

Key words: Phosphorus content, endophytes, *Neotyphodium*

INTRODUCCIÓN

Varias especies de gramíneas del género *Festuca* mantienen asociaciones simbióticas con hongos endofíticos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium*. Algunas de estas especies, no muestran síntomas, a pesar de tener el espacio intercelular de las hojas colonizado por hifas del hongo simbiótico. En simbiosis gramínea-endofito, como el caso de *Festuca arundinacea*-*Neotyphodium coenophialum*, se ha observado un mejor rendimiento de las plantas en condiciones adversas, así como intoxicaciones en ganado y protección frente a otros herbívoros invertebrados. Este último efecto se debe a que las plantas infectadas contienen alcaloides tóxicos (Clay y Schardl, 2002).

En las dehesas de la provincia de Salamanca una media del 70% de las plantas de *Festuca rubra* están infectadas por el endofito *Epichloë festucae*, una especie estrechamente emparentada con el género asexual *Neotyphodium* (Zabalgoeazcoa *et al.*, 1999). En éstos y otros ecosistemas naturales, solo en raras ocasiones se han observado plantas infectadas con síntomas. Por lo tanto, extrapolando de otros estudios sobre interacciones mutualistas entre endofitos y gramíneas (Clay y Schardl, 2002), es muy posible que las elevadas tasas de infección observadas en dehesas, se deban a que este hongo aporta ventajas adaptativas a las plantas hospedadoras en las condiciones de estos ecosistemas.

A fin de identificar diferencias entre plantas infectadas y no infectadas en el contenido de diversos elementos minerales y otros factores como el contenido de fibra, se preparó en 1999 un experimento con plantas infectadas y no infectadas de *Festuca rubra*. Los primeros análisis mostraron diferencias en contenidos de algunos nutrientes, así como un mayor contenido de fibra en las plantas infectadas (Zabalgoeazcoa *et al.*, 2003).

En este trabajo, mostramos resultados adicionales de este experimento, que aportan evidencia sólida de que en las condiciones experimentales del estudio, similares a las del hábitat natural, el contenido de fósforo es superior en plantas infectadas por *Epichloë festucae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento se realizó con cinco líneas medio-hermanas de *Festuca rubra*: CAB, VIT, SAN, PEN y RAB. Cada una de estas cinco líneas está constituida por una versión infectada por *Epichloë festucae* y otra libre de infección. Las plantas a partir de las cuales se produjeron estas líneas, fueron obtenidas en pastos de dehesas de la provincia de Salamanca. Las semillas de ambas versiones han sido producidas por clones cuya única diferencia es la infección endofítica o su ausencia. Para verificar la infección o su ausencia en plantas de cada línea, las semillas se germinaron en placas Petri con agar de patata y dextrosa y se seleccionaron como infectadas aquellas plantas en las cuales se observó micelio en la zona del mesocotilo. Estas plantas se transplantaron en la primavera de 1999 a una finca experimental en la cual se han mantenido desde entonces. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con seis réplicas; cada réplica contiene una planta infectada y otra libre de endofito de cada una de las cinco líneas. La distancia entre plantas es de 60 cm. Las plantas se regaron solamente durante la primavera y verano del año de transplante. Al inicio del experimento se aplicó una dosis de fertilizante de 48 kg N/ha, 90 kg P₂O₅/ha y 90 kg K₂O/ha.

La producción de biomasa se estimó en cortes realizados en cuatro fechas: Marzo 2000, Julio 2001, Julio 2002 y Abril 2003. El contenido de fósforo se estimó según el procedimiento descrito por Duque Macias (1971) en muestras obtenidas en Marzo de 2000, Julio de 2001 y Abril de 2003. Las plantas cosechadas en Marzo y Abril (estado vegetativo) están compuestas exclusivamente por hojas verdes, mientras que en Julio (estado reproductivo) la biomasa está formada mayoritariamente por tallos reproductivos maduros, con semillas ya formadas. Para el análisis de muestras en estado reproductivo se utilizaron solo tallos, no se incluyeron semillas. Se utilizó análisis de la varianza para detectar efectos atribuibles a la infección o diferencias entre líneas.

RESULTADOS

Producción de biomasa

El peso de cada planta se midió en cuatro fechas: dos en estado vegetativo y dos en estado reproductivo (Tabla 1). En estos cuatro periodos, las medias de peso siempre fueron superiores para las plantas infectadas, sin embargo, esta diferencia de peso sólo fue estadísticamente significativa en Abril de 2003, cuando la media de las plantas infectadas fue un 10% superior a la de las libres de infección.

Los dos primeros años se detectaron diferencias significativas entre variedades en la producción de biomasa, y a lo largo del experimento las líneas CAB y PEN destacan sobre el resto por su producción superior. La gran diferencia de peso entre las plantas de marzo de 2000 y las de abril de 2003 se debe a que las últimas fueron cortadas en el invierno de 2002.

Contenido de fósforo

El contenido de fósforo de las plantas se analizó en plantas de tres cosechas, dos en estado vegetativo y una en reproductivo (Tabla 2). En el análisis del corte en estado reproductivo la diferencia de contenido no fue estadísticamente significativa ($p=0,2639$), aunque con la excepción de una línea, SAN, en todas la demás el contenido de fósforo fue mayor en plantas infectadas. Sin embargo, con las muestras en estado vegetativo, en ambos años se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas infectadas y no infectadas (Marzo 2000: $p < 0,01$; Abril 2003: $p < 0,05$). Los resultados de los análisis de ambos años son consistentes, en todas las líneas y en ambos años, las plantas infectadas muestran un contenido de superior de fósforo.

Con respecto a las diferencias detectadas entre líneas, destaca la línea RAB, que en los análisis de estado vegetativo mostró un contenido de fósforo significativamente superior a las demás en ambos años.

Tabla 1. Producción de biomasa (g peso seco/ planta) en plantas infectadas (E+) y no infectadas (E-) de cinco líneas medio-hermanas de *Festuca rubra*

Línea	Marzo 2000			Julio 2001		
	E+	E-	Media	E+	E-	Media
CAB	74,17	75,67	74,92 ab	76,33	60,33	68,33 a
VIT	62,50	62,33	62,42 a	53,33	58,33	55,83 a
SAN	44,17	60,00	52,08 a	32,17	36,67	34,41 b
PEN	107,17	92,33	99,75 b	54,00	50,00	52,00 ab
RAB	65,17	58,33	61,75 a	52,00	59,33	55,66 a
Media ^a	70,64ns	69,73ns		53,57ns	52,93ns	

Línea	Julio 2002			Abril 2003		
	E+	E-	Media	E+	E-	Media
CAB	109,50	79,17	94,33	10,50	9,17	9,83
VIT	100,33	94,67	97,50	9,08	7,08	8,08
SAN	62,33	81,50	71,92	8,83	9,50	9,17
PEN	97,83	111,83	104,83	11,17	9,83	10,50
RAB	92,83	83,33	88,08	10,83	8,58	9,71
Media	92,57ns	90,10ns		10,08*	8,83*	

Medias seguidas de la misma letra no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$),

ns: diferencia no significativa

*: diferencia significativa ($F_{1,50} = 4,06$; $p < 0,05$)

Tabla 2. Contenido de fósforo (g/kg materia seca) en plantas infectadas (E+) y no infectadas (E-) de cinco líneas medio-hermanas de *Festuca rubra*

Línea	Marzo 2000		
	E+	E-	Media
CAB	2,85	2,73	2,79 a
VIT	3,18	2,72	2,95 a
SAN	2,97	2,45	2,71 a
PEN	2,82	2,68	2,75 a
RAB	3,55	3,23	3,39 b
Media	3,07**	2,76**	

Línea	Abril 2003		
	E+	E-	Media
CAB	2,71	2,46	2,59 a
VIT	2,73	2,42	2,58 a
SAN	2,68	2,52	2,60 a
PEN	2,77	2,34	2,55 a
RAB	3,60	3,57	3,58 b
Media	2,89*	2,66*	

Línea	Julio 2001		
	E+	E-	Media
CAB	0,30	0,21	0,25 a
VIT	0,48	0,36	0,42 b
SAN	0,19	0,22	0,20 a
PEN	0,48	0,47	0,47 b
RAB	0,40	0,38	0,39 b
Media	0,37 ns	0,32 ns	

Medias seguidas de la misma letra no son estadísticamente significativas (lsd 0,95),

ns: diferencia no significativa

* diferencia significativa con $p < 0,05$; ** diferencia significativa con $p < 0,01$

DISCUSIÓN

Los estudios en los cuales se han detectado ventajas en plantas de *Festuca arundinacea* o *Lolium perenne* infectadas por *Neotyphodium coenophialum* o *N. lolii* son relativamente abundantes (Malinowski y Belesky, 2000; Clay y Schardl, 2002), pero este no es el caso con los estudios sobre gramíneas infectadas por *Epichloë festucae*. En plantas de *Festuca rubra* asociadas a *E. festucae* se han detectado ventajas como protección contra pulgones (Wilkinson *et al.*, 2000), o mayor tolerancia a dosis elevadas de aluminio en suelos (Zaurov *et al.*, 2001). En este trabajo se muestra que en las condiciones de bajo mantenimiento utilizadas en nuestro experimento, similares a las de las plantas en pastos naturales, las plantas infectadas por *E. festucae* tienen un mayor contenido de fósforo. Este efecto es especialmente pronunciado en la primavera, cuando las plantas están en una fase de desarrollo vegetativo,

Esta no es la primera vez que se detecta en una asociación gramínea endofito un mayor contenido de fósforo; Malinowski y Belesky (2000) han demostrado este efecto en plantas de *F. arundinacea* infectadas por *N. coenophialum*. En esta asociación las raíces de plantas infectadas producen exudados de material fenólico que podrían estar relacionados con una mejor absorción de fósforo en condiciones en las cuales este elemento es escaso.

CONCLUSIONES

Las plantas de *F. rubra* infectadas por *E. festucae* resultaron tener un mayor contenido de fósforo que las plantas no infectadas. Este efecto se observó en cinco líneas medio hermanas y en dos análisis realizados en distintos años. También se observó una tendencia a una mayor producción de biomasa en las plantas infectadas.

Estos resultados apoyan la interpretación de que en los pastos de dehesa la simbiosis con *E. festucae* es ventajosa para *F. rubra*.

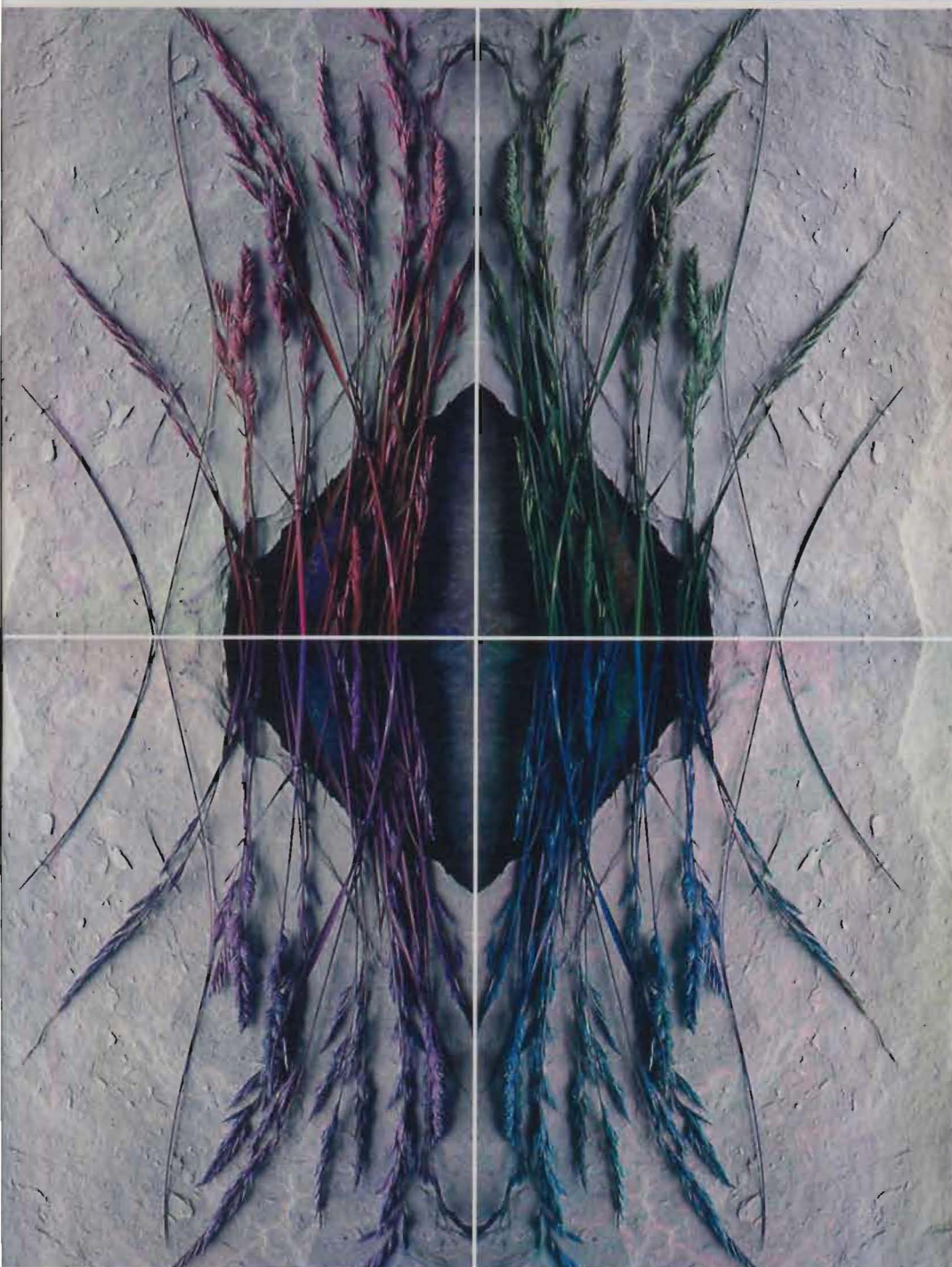
AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con el proyecto AGL 2002-02766 del Plan Nacional I+D. Agradecemos la colaboración de María Romo, Yolanda Arnaiz y Carlos Estévez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLAY, K.; SCHARDL, C., 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, **160**, S99-S127.
- DUQUE MACÍAS, F., 1971. Determinación conjunta de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn en plantas. *Anales de Edafología y Agrobiología*, **30**, 207-229.
- MALINOWSKI, D.P.; BELESKY, D., 2000. Adaptations of endophyte infected cool season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, **40**, 923-940.
- WILKINSON, H.; SIEGEL, M.; BLANKENSHIP, J.; MALLORY, A.; BUSH, L.; SCHARDL, C., 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**, 1027-1033.
- ZABALGOGEAZCOA, I.; VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R.; GARCÍA CRIADO, B.; GARCÍA CIUDAD, A., 1999. The infection of *Festuca rubra* by the endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, **54**, 91-95.
- ZABALGOGEAZCOA, I.; GARCÍA CIUDAD, A.; VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R.; GARCÍA CRIADO, B., 2003. Producción de biomasa y composición química de *Festuca rubra* en relación a su asociación con el hongo endofítico *Epichloë festucae*. En Pastos, Desarrollo y Conservación. Junta de Andalucía.
- ZAUROV, D.E.; BONOS, S.; MURPHY, J.A.; RICHARDSON, M.; BELANGER, F., 2001. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science*, **41**, 1981-1984.

Pastos y Ganadería Extensiva



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

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