

ORIGEN DE LA TOXICIDAD EN *CAREX BREVICOLLIS*: UNA ESPECIE FRECUENTE EN PASTOS MONTANOS TEMPLADOS

L. SAN EMETERIO¹, I. RUIZ DE LOS MOZOS¹, A. OREJA¹, I. ZABALGOGEAZCOA²
Y R.M. CANALS¹

¹ Dpto. de Producción Agraria. UPNA. Campus Arrosadia s/n 31006 Pamplona.

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca

RESUMEN

Carex brevicollis (DC in Lam & DC) es una ciperácea frecuente en los pastos calizos montanos del Centro y Sur de Europa. En áreas donde la especie es abundante, el ganado gestante sufre frecuentes abortos, que se asocian al consumo de alcaloides oxicólicos, principalmente brevicolina. Con el objetivo de plantear soluciones, realizamos una investigación enfocada a dilucidar el origen intrínseco (de la planta) o extrínseco (de un posible hongo asociado) del alcaloide. Para ello, 1) determinamos si había infección por hongos endófitos y realizamos su identificación, y 2) comprobamos si existía relación entre la producción de brevicolina y la presencia/ausencia de hongos endófitos, mediante la comparación del contenido de alcaloides en plantas infectadas y en plantas fumigadas. Se obtuvieron 71 aislados de hongos endófitos en *C. brevicollis*, los cuales, utilizando caracteres morfológicos y secuenciando regiones de su DNA ribosómico fueron clasificados en 21 especies distintas. Se detectó presencia de brevicolina en todas las plantas, pero los contenidos fueron significativamente menores en las plantas no infectadas.

Palabras clave: hongos endófitos, brevicolina, alcaloides tóxicos.

INTRODUCCIÓN

Carex brevicollis DC. es una ciperácea distribuida ampliamente en el centro y sur de Europa, muy común en dos hábitats naturales protegidos por la Directiva Europea (92/43/CEE): los pastos subalpinos calcícolas y los claros de hayedos desarrollados sobre sustrato calizo. En la Sierra de Urbasa y Andía (NO de Navarra) estos hábitats, junto con otras comunidades vegetales, son pastados por unas 11 750 UGM de ganado extensivo, primordialmente ovino, vacuno y equino. Los ganaderos de la zona han detectado problemas de toxicidad por consumo de *C. brevicollis*, principalmente abortos y partos prematuros en hembras jóvenes.

Estudios previos han encontrado un alto contenido de alcaloides, especialmente brevicolina y brevicarina, en las hojas de esta especie (Sharipov *et al.*, 1975). Estos alcaloides, derivados de la β -carbolina, presentan un potente efecto oxicólico que provoca contracciones en el útero, causando abortos en mamíferos gestantes (Yasnetso y Sizov, 1972). Otras consecuencias de los derivados de la β -carbolina son efectos fototóxicos en bacterias y hongos (Towers y Abramovski, 1983). También se han descrito diversas funciones farmacológicas actuando como antitumorales, antivirales y antibacteriales (Cao *et al.*, 2007).

A pesar de su interés, no hemos encontrado literatura sobre el origen de los alcaloides en *C. brevicollis*, aunque sí existe abundante bibliografía sobre toxicosis ocasionadas por alcaloides sintetizados por hongos endófitos asociados a gramíneas (hongos de los géneros *Neotyphodium*/*Epichloë* en *Festuca spp.* y *Lolium spp.*), El objeto de este estudio es dilucidar el origen intrínseco (de la planta) o extrínseco (de un posible hongo asociado) de la brevicolina. Específicamente queremos 1) determinar si existe infección de la planta por hongos endófitos y, en caso afirmativo, identificar la microbiota y 2) comprobar la existencia de una relación entre la producción de alcaloides y la presencia/ausencia de hongos endófitos, mediante la comparación del contenido de brevicolina en plantas infectadas y en plantas fumigadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

En otoño de 2006 se recolectó el material vegetal en el Parque Natural de Urbasa y Andía, localizado en el NO de la provincia de Navarra (España). Se llevaron a cabo muestreos en tres zonas diferentes: el raso Udaú (42° 50' N 2° 8' W), el raso Tximista (42° 51' N 2° 7' W) y el raso Bardoitza (42° 48' N 2° 4' W), obteniendo en cada uno cuatro plantas enteras (12 en total). El material fue trasladado a maceta y mantenido en invernadero con un régimen de riego de dos días por semana.

Aislamiento e identificación de microbiota

Para reconocer y aislar posibles hongos endófitos, se sembraron pedazos de hoja de 1 cm², previamente esterilizados con lejía, en placas con PDA. Los hongos que lograron desarrollarse a partir de estos fragmentos se transfirieron a placas individuales. La identificación de los hongos se basó en caracteres morfológicos y moleculares. La amplificación y secuenciación de la región ITS1.5.8S rDNA-ITS2 de extractos de DNA fúngico se realizó según los métodos descritos por Sánchez-Márquez *et al* (2007).

Relación entre producción de alcaloides e infección por hongos endófitos

Para obtener individuos genéticamente idénticos se separaron y trasplantaron hijuelos de las plantas en fase de ahijamiento. De cada planta madre se aislaron un total de cuatro hijuelos que siguieron el mismo cuidado que éstas. Con el fin de eliminar los hongos endófitos, tres de los cuatro hijuelos fueron sometidos a un proceso de fumigación con fungicida Propiconazole (800µg/aplicación, tres aplicaciones con un intervalo de 10 días), dejando el cuarto hijo como control. Después de otro periodo de crecimiento para alcanzar una nueva fase de ahijamiento, se recolectaron los nuevos hijuelos. Parte del material vegetal (tejidos foliares) se estudió mediante tinción y microscopía (Latch *et al.* 1988) para evaluar la eficacia de la fumigación realizada. El resto del material se utilizó para extraer los alcaloides (Zayed y Wink, 2005) y analizar cuantitativamente el contenido de brevicolina mediante GLC-MS. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un modelo lineal general de medidas repetidas con el programa SPSS 14.0.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de microbiota

Se obtuvieron 71 aislados de hongos de las muestras de *C. brevicollis*, que fueron clasificados en 21 especies distintas en base a su morfología y principalmente a la secuencia de sus regiones ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de endófitos identificados en *Carex brevicollis* mediante secuenciación genética

Especie	Raso y planta*
<i>Microdochium phragmitis</i>	U1, U3
<i>Cladosporium</i> sp.	U1, B4
<i>Podospora decipiens</i>	U1, U2, B1
<i>Alternaria tenuísima</i>	U1
<i>Colletotrichum dematium</i>	U1
16 desconocido	U1, U2, U3, U4, B3, T2
<i>Fusarium</i> sp. A	U2
<i>Fusarium</i> sp. B	U4
<i>Glomerella graminicola</i>	U4
<i>Neotyphodium</i> sp.	U4
<i>Phaeosphaeria</i> sp.?	U3
<i>Phaeosphaeria</i> sp.1-44	U4
<i>Phaeosphaeria</i> sp.2-45	U4
<i>Hypoxylon</i> sp.	B1
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	B2
<i>Podospora</i> sp.?	B1
<i>Phaeosphaeria</i> sp.3-60	B2
Desconocido 61 (<i>Preussia</i> sp.?)	U1, U2, U4, B1, B2, B3, T1, T2
<i>Penicillium</i> sp.1-77	T1
<i>Penicillium</i> sp. 2-78	T1
<i>Biscogniauxia</i> sp.	U3, B1, B2, B3, B4, T1, T2, T3, T4

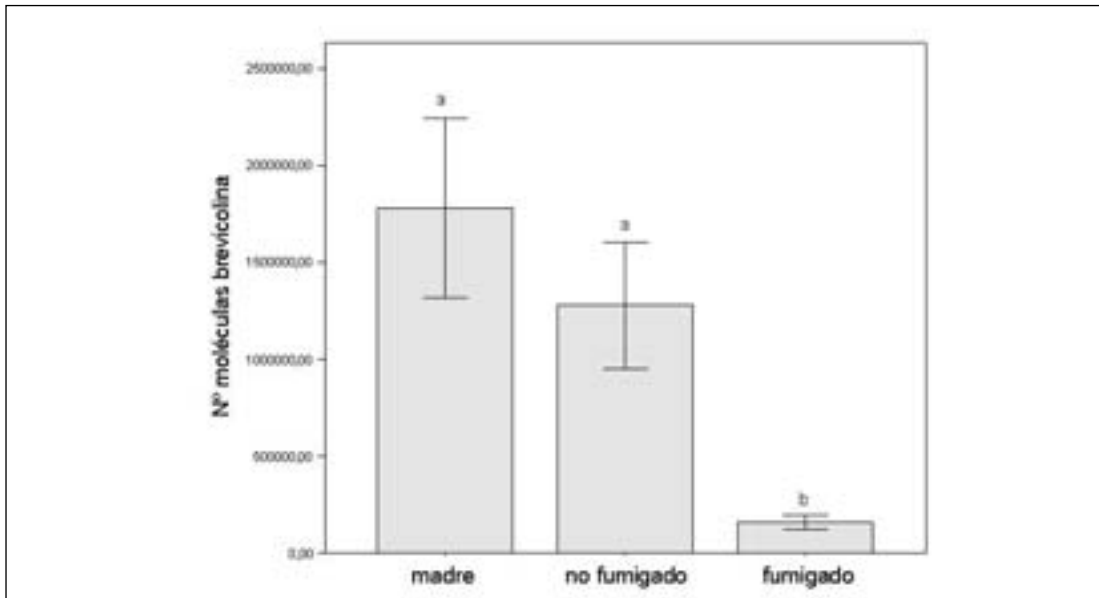
* U, Udaú; B, Bardoitxa; T, Tximista

Relación entre la producción de alcaloides y la infección por hongos endófitos

El tratamiento fungicida fue eficaz, aunque no eliminó completamente las infecciones de hongos endófitos. Antes del tratamiento el 37,5% de las plantas madre analizadas en el microscopio presentaban infección por hongos endófitos. Tras la fumigación, los valores de infección se redujeron al 8,3%.

El contenido de alcaloides no varió significativamente entre las plantas provenientes de distintos rasos ($F=2,139$, $p=0,188$). En cambio, el tratamiento con fungicida tuvo un efecto significativo ($F=7,522$, $p=0,029$) ya que las plantas fumigadas presentaron un menor contenido en brevicolina que las plantas no fumigadas y que las plantas madre (Figura 1).

Figura 1. Contenido de brevicolina en plantas de *Carex brevicollis* fumigadas y no fumigadas



DISCUSIÓN

Aunque en décadas pasadas se pensó que la presencia de hongos endófitos estaba limitada a algunas especies de gramíneas y que se trataba de una relación de simbiosis mutualista, en los últimos años se está evidenciado que las asociaciones de hongos endófitos con vegetales son un hecho común en la naturaleza. Estos hongos endófitos son abundantes, se encuentran muy diversificados desde el punto de vista taxonómico (Sánchez-Márquez *et al.*, 2007) y pueden cumplir distintas funciones en el vegetal, no siempre mutualistas (Faeth, 2002; Saikkonen *et al.*, 2006). Algunos de los hongos endófitos identificados en *C. brevicollis* (Tabla 1), son saprófitos latentes, con capacidad para, tras la muerte del vegetal, invadir rápidamente los tejidos, y reproducirse.

El alcaloide brevicolina se encuentra presente en todas las plantas de *C. brevicollis*, fumigadas y no fumigadas, aunque en las primeras en una concentración seis veces menor y menos variable (Figura 1). La drástica disminución del contenido de brevicolina en plantas fumigadas indica un importante papel de los hongos endófitos en la producción de este compuesto, que puede ser explicado de dos maneras opuestas: o bien la brevicolina es sintetizada por la planta pero su producción es inducida por la presencia de hongos endófitos, o bien es sintetizada por los hongos y su presencia en las plantas fumigadas es residual y proviene de su traslocación desde la planta madre.

La primera hipótesis se apoya en que 1) se ha comprobado la inducción de la producción de β -carbolinas en distintas especies vegetales en presencia de elicitores fúngicos (Bais *et al.*, 2003; Pauw *et al.*, 2004), 2) diversos estudios han comprobado el efecto antifúngico de las β -carbolinas (Cao *et al.*, 2007) y específicamente de la brevicolina (Towers y Abramowski, 1983), y 3) pocas especies de hongos se repiten en todos los individuos analizados (*Preussia* sp., *Biscogniauxia* sp. y especie 16 desconocida) y no se tiene conocimiento de que éstas sean capaces de producir alcaloides β -carboxílicos tóxicos. Respecto a la segunda hipótesis, ésta se sustenta en 1) la extensa información sobre el origen fúngico de los alcaloides responsables de diversas toxicosis en *Festuca* spp., *Lolium* spp., y en otras especies menos conocidas (Váldez Barillas *et al.* 2007) y 2) en la elevada solubilidad de la brevicolina que podría favorecer su traslocación a otras partes vegetales. Nos inclinamos a pensar que la primera hipótesis (síntesis vegetal e inducción fúngica) se sustenta en argumentos más sólidos, pero su comprobación requiere continuar investigando en la misma línea.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Vicente Ferrer su colaboración en la recolección del material vegetal en campo. El Servicio de Apoyo a la Investigación de la UPNA y Pablo Pujol realizaron la compleja cuantificación de la brevicolina. El personal del laboratorio del Dpto. de Producción Vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC ofrecieron enseñanzas y apoyo en técnicas de secuenciación del ADN fúngico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; VIVANCO, J.M., 2003. Root specific elicitation and exudation of fluorescent beta-carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (4), 345-353.
- CAO, R.H.; PENG, W.L.; WANG, Z.H.; XU, A.L., 2007. Beta-carboline alkaloids: Biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14 (4), 479-500.
- FAETH, S.H., 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 98 (1), 25-36.
- LATCH, G.C.M.; CHRISTENSEN, M.J.; HICKSON, R.E., 1988. Endophytes of annual and hybrid ryegrasses. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 31, 57-63.
- PAUW, B.; VAN DUJN, B.; KIJNE, J.W.; MEMELINK, J., 2004. Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 55 (6), 797-805.
- SAIKKONEN, K.; LEHTONEN, P.; HELANDER, M.; KORICHEVA, J.; FAETH, S.H., 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science*, 11 (9), 428-433.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOA, I.A. 2007. The endophytic mycobiota of *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, 27, 171-195.
- SHARIPOV, I.N.; CHEBAN, N.N.; KONDRATENKO, B.S.; TEREENT'EVA, I.V.; LAZUR'EVSKII, G.V., 1975. Alkaloid accumulation in cultivated and naturally growing *Carex brevicollis*. *Izvestiya AN Mold SSR, Ser. Bio. I Khim.* N, 6. 63-67.
- TOWERS, G.H.N.; ABRAMOWSKI, Z., 1983. UV-Mediated genotoxicity of furanoquinoline and of certain tryptophan-derived alkaloids. *Journal of Natural Products*, 46 (4), 576-581.
- VALDEZ BARILLAS, J.R.; PASCHKE, M.W.; RALPHS, M.H.; CHILD, R.D., 2007. White locoweed toxicity is facilitated by a fungal endophyte and nitrogen-fixing bacteria. *Ecology*, 88 (7), 1850-1856.
- YASNETSO, V.S.; SIZOV, P.I., 1972. Mechanism of brevicolline, thalictimine and pachycarpine action on uterus. *Farmakologiya I Toksikologiya*, 35 (2), 201.
- ZAYED, R.; WINK, M., 2005. Beta-carboline and quinoline alkaloids in root cultures and intact plants of *Peganum harmala*. *Z.f.Naturforschung*, 60, 451-458.

ORIGIN OF THE TOXICITY OF CAREX BREVICOLLIS: A FREQUENT SPECIES IN MONTANE TEMPERATE GRASSLANDS

SUMMARY

Carex brevicollis (DC in Lam. & DC) is a sedge naturally distributed over the Central and Southern mountains of Europe, on limestone, species-rich grasslands. In areas where the species is abundant, frequent abortions associated to the consumption of the oxicotic alkaloid brevicolline occur

in livestock. In order to bring up solutions, we undertook a research focused on the elucidation of the intrinsic (from the plant itself) or extrinsic origin (from a potential endophyte) of brevicolline. Therefore, 1) we made a survey of the endophytic mycobiota, and 2) we evaluated the relationship between brevicolline production and the presence or absence of endophytes, comparing the alkaloid content in endophyte-infected and fungicide-treated plants. We obtained 71 fungal isolates which belonged to 21 different species. The alkaloid brevicolline was detected in both infected and non-infected plants. However, its concentration was much lower in fumigated, non-infected plants.

Key words: fungal endophytes, brevicoline, toxic alkaloids.