

# Hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales

S. SÁNCHEZ MÁRQUEZ<sup>1</sup>, G.F. BILLS<sup>2</sup>, B. GARCÍA CRIADO<sup>1</sup> e I. ZABALGOGEAZCOA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. CSIC, Salamanca. <sup>2</sup>Centro de Investigación Básica de España. Merck, Sharp & Dohme. Madrid.

**RESUMEN:** El objetivo de este estudio es la identificación de especies de hongos asociados a gramíneas en pastos naturales de Salamanca. De trece especies de gramíneas se han obtenido aislados pertenecientes a 26 taxones, además de numerosos aislados estériles. Se han identificado patógenos de plantas como *Fusarium culmorum*, *Cochliobolus* spp., *Drechslera* spp., *Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Colletotrichum falcatum*, *Ustilago cynodontis*, *Leptosphaerulina* spp., *Epichloë baconii* o *Epichloë typhina*; patógenos de insectos como *Cordyceps* spp., *Verticillium lecanii* y *Metarrhizium anisopliae*; también se han identificado varias especies potencialmente productoras de micotoxinas y sustancias antimicrobianas: *Epichloë festucae*, *Neotyphodium coenophialum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Acremonium* spp. Exceptuando los aislados de *Epichloë*, las demás especies han sido obtenidas a partir de unas 25 plantas, lo cual indica que la diversidad de hongos existente en estos ecosistemas puede ser enorme.

*Palabras clave:* endofitos, patógenos, micotoxinas.

## *Fungi associated with wild grasses in natural pastures of western Spain*

**SUMMARY:** Fungi were isolated from plants belonging to 13 grass species from natural pastures in Salamanca. Fungi belonging to 26 taxa were identified. In addition, 102 non-sporulating isolates were also observed. Among the species identified are plant pathogens (*Fusarium culmorum*, *Cochliobolus* spp., *Drechslera* spp., *Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Colletotrichum falcatum*, *Ustilago cynodontis*, *Leptosphaerulina* spp., *Epichloë baconii*, *Epichloë typhina*) and insect pathogens (*Cordyceps* spp., *Verticillium lecanii*, *Metarrhizium anisopliae*). Some of these fungi are known to produce of mycotoxins and antimicrobial substances (*Epichloë festucae*, *Neotyphodium coenophialum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp). Excluding the *Epichloë* and *Neotyphodium* isolates, all others were obtained from a total of less than 25 plants. Information on distribution of fungi on pasture grasses in the Iberian Peninsula is sparse; this preliminary data suggests that the species richness of fungi from grasses of natural pastures may be very high.

*Key words:* endophytes, pathogen, mycotoxin.

## INTRODUCCIÓN

Las dehesas son ecosistemas permanentes de zonas semiáridas cuyos pastos están formados mayoritariamente por gramíneas. Algunos aspectos de estos ecosistemas han sido estudiados en detalle, principalmente los relacionados con los pastos y el arbolado y su relación con la producción animal; sin embargo, exceptuando algunos trabajos sobre endofitos pertenecientes a los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (Oliveira *et al.*, 1997; Zabalgogeoza *et al.*, 2003), el papel de los hongos en los pastos naturales ha recibido escasa atención en España.

En los pastos naturales los hongos desempeñan un papel importante y desarrollan múltiples funciones: intervienen en los procesos de descomposición de seres vivos, forman relaciones mutualistas con plantas, o pueden ser patógenos. Además, los hongos asociados a plantas silvestres representan una fuente de recursos para la búsqueda de posibles agentes de control biológico de patógenos y plagas de plantas, o de productos farmacológicos como sustancias antimicrobianas. Por lo tanto, el estudio de los hongos asociados a plantas en pastos naturales puede proporcionar información valiosa, directamente aplicable a áreas de conocimiento como la ecología y mejora de pastos, la fitopatología de cultivos, o la farmacología. También supone un valor añadido, hasta ahora prácticamente desconocido, para los sistemas de producción animal con pastos naturales.

En las dehesas, es común que más de la mitad de la biomasa del pasto esté compuesta de especies de la familia *Poaceae* (García Criado *et al.*, 1994). El objetivo de este trabajo es identificar hongos asociados a

gramíneas silvestres de pastos naturales de la zona de Salamanca. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en los primeros meses de funcionamiento de este proyecto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Muestreo de plantas*

La recogida de gramíneas se realizó en 12 localidades de la provincia de Salamanca, una de Zamora y una de Ávila. Siempre que fue posible debido al buen estado de las plantas, éstas fueron transplantadas en macetas. Exceptuando la mayoría de las plantas infectadas por endoñitos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium*, que han sido recolectadas a lo largo de los últimos cinco años, las otras muestras se recogieron en los meses de Junio, Julio, Octubre, y Diciembre de 2003.

### *Aislamiento de hongos*

El aislamiento de hongos, a partir de fragmentos de plantas asintomáticas o de tejidos con lesiones, se llevó a cabo en placas Petri con agar de patata y dextrosa (PDA), una vez hecha la desinfección superficial del material vegetal con una solución de lejía al 20% (Bacon y White, 1994). Las placas fueron incubadas en la oscuridad a temperatura ambiente y según fueron emergiendo hongos de los fragmentos de plantas, estos aislados fueron transferidos a placas de PDA.

El medio utilizado para hacer los aislamientos primarios fue PDA. Los aislados en los que no se indujo esporulación en PDA fueron plaqueados en otros 3 medios de cultivo: agar de agua (WA) al 3%, agar extracto de malta (MEA), y agar de agua al 3%, suplementado con hojas de *Lolium perenne* autoclavadas. A todos estos medios se añadió cloranfenicol (200mg/l).

### *Identificación de hongos*

Las cepas aisladas fueron identificadas mediante la observación microscópica de sus caracteres morfológicos, y en algunos casos por secuenciación de la región ITS 1/5.8SrRNA/ ITS 2 del DNA ribosómico. Para la extracción de DNA se utilizó el kit REExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma), incluyéndose una modificación: antes de preparar las reacciones de PCR, se realizó una limpieza adicional del ADN con fenol, seguida de una extracción con cloroformo. La amplificación por PCR del DNA ribosómico se llevó a cabo con los cebadores ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) y el producto de PCR fue secuenciado utilizando los mismos oligonucleótidos. Con ayuda del programa FASTA se buscaron secuencias homólogas a las obtenidas para cada muestra en la base de datos de secuencias nucleotídicas del European Molecular Biology Laboratory.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies de hongos identificados en gramíneas aparecen en la Tabla 1. Los resultados presentados están basados en análisis de muestras pertenecientes a 13 especies de gramíneas. También se ha obtenido un número substancial de aislados a partir de 12 gramíneas que no ha sido posible identificar, al no estar espigadas en el momento de la recolección. La mayoría de estas plantas fueron transplantadas a tiestos y en un futuro será posible identificarlas.

Respecto a los aislados de hongos obtenidos, se han identificado 29 taxones distintos. Estas especies fueron identificadas en base a caracteres morfológicos y en algunos casos con la ayuda adicional de secuencias nucleotídicas de la región ITS 1/5.8SrRNA/ITS 2. Solo tres especies cuyo micelio no esporuló en ningún medio de cultivo fueron identificadas en base a su secuencia nucleotídica (*Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis* y *Cordyceps* spp.). Se han obtenido otros 102 aislados que no esporulan en ninguno de los medios de cultivo utilizados y por lo tanto aun no ha sido posible identificarlos.

Se han identificado varios patógenos importantes de gramíneas como *Fusarium culmorum*, *Cochliobolus* spp., *Drechslera* spp., *Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Colletotrichum falcatum*, *Ustilago cynodontis*, *Leptosphaerulina* spp., *Epichloë baconii* o *Epichloë typhina*. Algunos de estos hongos (*F.*

Tabla 1. Gramíneas hospedadoras, sintomatología observada y número de cepas aisladas.

HOSPEDADOR	SÍNTOMAS	HONGO	AISLADOS OBTENIDOS
<i>Agrostis castellana</i>	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë baconii</i> *	2
<i>Alopecurus arundinaceus</i>	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë</i> spp.	1
<i>Alopecurus</i> spp.	Planta asintomática	Micelio estéril	1
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë typhina</i> *	1
	Lesiones en hojas	<i>Epicoccum nigrum</i> *	1
		<i>Alternaria</i> spp.	1
		Micelio estéril	1
		<i>Cochliobolus</i> spp. *	1
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	Planta asintomática	<i>Epichloë</i> spp.	1
<i>Cynodon dactylon</i>	Planta asintomática	<i>Fusarium culmorum</i> *	4
		<i>Alternaria</i> spp.	3
		<i>Metarrhizium anisopliae</i>	1
		<i>Acremonium</i> spp.	1
	Lesiones en hojas	<i>Cochliobolus</i> spp. *	1
		<i>Leptosphaerulina</i> spp. *	1
		<i>Ustilago cynodontis</i> *	1
		Micelio estéril	1
<i>Dactylis glomerata</i>	Planta asintomática	<i>Cladosporium</i> spp.	2
		<i>Alternaria</i> spp.	2
		<i>Acremonium</i> spp.	1
		<i>Ulocladium</i> spp.	1
		<i>Nigrospora</i> spp.	1
		Micelio estéril	7
		<i>Cordyceps</i> spp. *	1
	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë typhina</i> *	11
	Lesiones en hojas	<i>Alternaria</i> spp.	1
		Micelio estéril	4
		<i>Epicoccum</i> spp.	2
		<i>Cladosporium</i> spp.	3
		<i>Colletotrichum falcatum</i>	1
<i>Festuca ampla</i>	Planta asintomática	<i>Epichloë festucae</i> *	1
	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë festucae</i> *	1
<i>Festuca arundinacea</i>	Planta asintomática	<i>Neotyphodium coenophialum</i>	13
	Lesiones en hojas	<i>Cladosporium</i> spp.	2
		Micelio estéril	27
		<i>Aspergillus terreus</i>	1
		<i>Acremonium</i> spp.	1
		<i>Epicoccum</i> spp.	3
<i>Festuca ovina</i>	Planta asintomática	<i>Epichloë festucae</i> *	2
<i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Planta asintomática	<i>Epichloë festucae</i> *	120
		Micelio estéril	3
		<i>Coniothyrium</i> spp. *	1
		<i>Phaeosporia nodorum</i> *	1
	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë festucae</i> *	9
<i>Holcus lanatus</i>	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë clarkii</i> *	2
<i>Lolium perenne</i>	Planta asintomática	<i>Epichloë typhina</i> *	5
		<i>Epichloë festucae</i> *	2
		<i>Neotyphodium</i> spp. *	16
		<i>Verticillium lecanii</i> *	1
	Estromas cilíndricos en tallo	<i>Epichloë typhina</i> *	13
		<i>Cladosporium</i> spp.	1
		Micelio estéril	6
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Planta asintomática	<i>Alternaria</i> spp.	2
		<i>Acremonium</i> spp.	2
		<i>Fusarium culmorum</i> *	1
		Micelio estéril	4
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Planta asintomática	<i>Alternaria</i> spp.	2
		Micelio estéril	3
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Planta asintomática	<i>Dreschlera</i> spp.	1
		<i>Alternaria</i> spp.	2
		<i>Ulocladium</i> spp.	1
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Planta asintomática	<i>Acremonium</i> spp.	1
		<i>Penicillium</i> spp.	1
		Micelio estéril	4
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Planta asintomática	<i>Gaeumannomyces graminis</i> *	2
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	<i>Alternaria</i> spp.	1
		<i>Cladosporium</i> spp.	1
		Micelio estéril	1
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	<i>Cladosporium</i> spp.	3
		<i>Epicoccum</i> spp.	1
		Micelio estéril	4
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	<i>Cladosporium</i> spp.	1
		Micelio estéril	5
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	Micelio estéril	4
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	<i>Cladosporium</i> spp.	1
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	Micelio estéril	8
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	Micelio estéril	4
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	Micelio estéril	2
Gramínea sin identificar <sup>1</sup>	Lesiones en hojas	Micelio estéril	4

<sup>1</sup> Gramíneas recogidas en época en que no están espigadas, no pudiendo ser identificadas hasta la fecha.

\* Taxones de hongos identificados mediante secuenciación de las regiones ITS 1 e ITS 2.

*culmorum*, *G. graminis*, *Drechslera*) han sido aislados de plantas asintomáticas. Las especies silvestres que albergan a estos patógenos podrían actuar como hospedadores alternativos asintomáticos donde se produce inóculo primario capaz de infectar cultivos cercanos, como cereales susceptibles.

También se han identificado especies potencialmente productoras de micotoxinas y productos antimicrobianos como *Epichloë festucae*, *Neotyphodium coenophialum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Acremonium* spp.; así como varias especies de patógenos de insectos: *Cordyceps* spp., *Verticillium lecanii* y *Metarrhizium anisopliae*.

Por último, de casi todas las gramíneas analizadas se obtuvo un número muy elevado de aislados pertenecientes a géneros cosmopolitas como *Cladosporium*, *Alternaria*, o *Epicoccum*.

Debido a la técnica de esterilización superficial utilizada para procesar las muestras de plantas, es posible considerar como endofíticos a la mayoría de los aislados obtenidos. También cabe suponer que otras especies adicionales hubiesen podido ser aisladas si se hubiesen utilizado métodos de limpieza superficial menos agresivos.

Si se exceptúan los aislados de *Neotyphodium* y *Epichloë*, que fueron obtenidos en muestreos específicamente dirigidos a la obtención de estas especies (Zabalgogazcoa *et al.*, 2003), resulta que el resto de los aislados se han obtenido a partir de menos de 25 plantas. En vista del interés de las especies fúngicas identificadas, este reducido número de plantas utilizadas da una idea del enorme potencial, tanto para investigación básica como aplicada, que encierra el estudio de los hongos asociados a gramíneas silvestres en pastos naturales.

## CONCLUSIONES

A partir de un reducido número de muestras de gramíneas pertenecientes a 13 especies, se han podido identificar hongos pertenecientes a 26 distintos grupos taxonómicos. Sin embargo, una fracción importante de los aislados obtenidos son de especies que no esporulan en cuatro medios de cultivo distintos.

Entre las especies identificadas hay patógenos de plantas (*Fusarium culmorum*, *Cochliobolus* spp., *Drechslera* spp., *Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Colletotrichum falcatum*, *Ustilago cynodontis*, *Leptosphaerulina* spp., *Epichloë baconii*, *Epichloë typhina*) y de insectos (*Cordyceps* spp., *Verticillium lecanii*, *Metarrhizium anisopliae*), así como especies potencialmente productoras de micotoxinas y sustancias antimicrobianas (*Epichloë festucae*, *Neotyphodium coenophialum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Acremonium* spp.).

Estos resultados preliminares están basados en análisis de un número bastante reducido de plantas, y sugieren que el número de especies fúngicas asociadas a gramíneas es muy elevado. En vista de la importancia que tienen algunas de estas especies para el hombre, debido a sus características y actividades que desempeñan, el estudio de los hongos asociados a gramíneas en pastos naturales parece encerrar un alto potencial científico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACON C.W., WHITE J.F. 1994. Stains, media and procedures for analysing endophytes. In: *Biotechnology of endophytic fungi grasses*. (eds. Bacon CW, White JF), pp 47-56. CRC Press Boca Raton.
- GARCÍA CRIADO, B., GARCÍA CIUDAD, A., RUANO RAMOS, A., PÉREZ CORONA, E., VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R., 1994. Producción de pastos semiáridos: variaciones interanuales. *Actas de la XXXIV Reunión de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos*.
- OLIVEIRA J.M., CASTRO V. 1997. Incidente an viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue accessions from North Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:519-522.
- WHITE T.M., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. En *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-321. Ed/Co. M.A. INNIS, D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY, T.J. WHITE. Academic Press. San Diego. EE.UU.
- ZABALGOGAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA CRIADO B., 2003. Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Science*, 58, 94-97.