

## VARIABILIDAD DEL CONTENIDO MINERAL EN *Festuca rubra* SEGÚN ENDOFITOS *Epichloë* Y PROCEDENCIA DE LA PLANTA

MINERAL CONTENT VARIABILITY IN *Festuca rubra* ACCORDING TO *Epichloë* ENDOPHYTES AND PLANT ORIGIN

B.R. VÁZQUEZ DE ALDANA<sup>1</sup>, M. HELANDER<sup>2</sup>, K. SAIKKONEN<sup>3</sup>, A. GARCÍA-CIUDAD<sup>1</sup>, B. GARCÍA-CRIADO<sup>1</sup> Y I. ZABALGOGEAZCOA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRNASA-CSIC, 37008 Salamanca, España. <sup>2</sup> Section of Ecology, Department of Biology, University of Turku, 20014 Turku, Finland. <sup>3</sup> MTT Agrifood Research Finland, Plant Production Research, 31600 Jokioinen, Finland.

### RESUMEN

*Festuca rubra* es una gramínea perenne frecuente en pastos y adaptada a diferentes condiciones ambientales, que normalmente se encuentra infectada por el hongo endofítico *Epichloë festucae*. En este trabajo se estudia la variación del contenido mineral en plantas de *Festuca rubra* infectadas y no infectadas procedentes de diferentes poblaciones de Islas Faroe, Finlandia y España, creciendo en las mismas condiciones ambientales en un ensayo experimental localizado en Salamanca (España). Tanto la presencia del hongo endofítico como la procedencia de la planta afectaron al contenido mineral de las plantas. Las plantas infectadas mostraron mayores concentraciones de P, K, Ca, S, Zn y Cu que las no infectadas. En general, las festucas nórdicas tuvieron mayor concentración en la mayoría de elementos minerales que las festucas españolas.

**Palabras clave:** gramíneas, infección endofítica, nutrición mineral, simbiosis, diferencias geográficas.

### SUMMARY

*Festuca rubra* is a common perennial pasture grass adapted to different environmental conditions. It is often asymptotically infected by the systemic fungal endophyte *Epichloë festucae*. In this work, we analyzed the mineral content of infected and uninfected *F. rubra* plants collected from Spain, Faroe Islands and Finland, and grown in an experimental field in Spain. Both the presence of endophytic fungus and the origin of the plant affected the mineral concentration of the plants. Infected plants had higher concentrations of P, K, Ca, S, Zn and Cu than non-infected. The Northern fescues had higher concentrations of most minerals than the Spanish fescues.

**Key words:** grasses, endophytic infection, mineral nutrition, symbiosis, geographical differences.

## INTRODUCCIÓN

*Festuca rubra* es una gramínea perenne frecuente en pastos y adaptada a diferentes condiciones ambientales tanto climáticas como edáficas. Los órganos aéreos de esta gramínea son infectados sistémicamente por el hongo endofítico *Epichloë festucae* que se transmite de forma eficiente por semilla. Así, se han encontrado plantas de *F. rubra* infectadas en pastos de toda Europa, desde pastos españoles en la dehesa salmantina (Zabalgogezcoa et al., 1999) y en la costa gallega (Zabalgogezcoa et al., 2006), a diversos hábitats en los países nórdicos (Wäli et al., 2007).

Las asociaciones entre endófitos *Epichloë/Neotyphodium* (E/N) y gramíneas son de tipo mutualista, debido principalmente a que el hongo no causa síntomas visibles, pero produce varios tipos de alcaloides tóxicos para herbívoros que protegen a la planta huésped (Bush et al., 1997). Además, las plantas infectadas pueden mostrar una mayor resistencia a estreses abióticos como la sequía o ciertos metales pesados (Malinowski y Belesky, 2006). Estas características beneficiosas para las plantas hacen que los endófitos puedan utilizarse para la mejora de gramíneas forrajeras y cespitosas.

Los efectos de los endófitos E/N en la planta hospedadora son variables y dependen del genotipo del hongo y de la planta, así co-

mo de las condiciones ambientales (Saikkonen et al., 1998). En este trabajo se estudia el efecto del endófito *Epichloë* y la procedencia de la planta en el contenido de nutrientes de *F. rubra*. Para ello se consideraron plantas procedentes de pastos del sur de Europa (España) y del norte (Islas Faroe y Finlandia), en un ensayo experimental llevado a cabo en Salamanca (España).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron cinco localidades para el muestreo de plantas de *F. rubra* en pastos del sur y del norte de Europa: dos en España, una en Islas Faroe y dos en Finlandia. Las dos localidades de España son un pasto de dehesa (Los Valles; coordenadas 40° 58' N, 6° 7' O) en la provincia de Salamanca, y un monte rocoso de roble en el Valle del Jerte (Cáceres; coordenadas 40° 12' N, 5° 45' O). La localidad de las Islas Faroe se sitúa en una pradera (coordenadas 61° 59', 6° 48' O). Las dos localidades de Finlandia son praderas a la orilla del mar en la zona más meridional (Hanko; coordenadas 59° 50' N, 23° 13' E) y en una rivera en la zona más septentrional del país (Utsjoki, Laponia; coordenadas 69° 55' N, 27° 2' E). En cada una de las cinco localidades, se recogieron 25 plantas de *F. rubra* en tres poblaciones. Las plantas se llevaron al laboratorio y se verificó la presencia del hongo endofítico *E. festucae* por microscopía y mediante su aislamiento de tro-

zos de tallo en agar de patata y dextrosa (Bacon y White, 1994). El porcentaje de infección fue de 40-80% en España, 4-71% en Islas Faroe, 0% en el sur de Finlandia y 52-68% en el norte de Finlandia.

Se diseñó un ensayo experimental en Salamanca (España) con un total de 155 plantas infectadas (E+) y 207 plantas no infectadas (E-) procedentes de las cinco localidades. Las plantas se transplantaron en octubre de 2012, en un suelo clasificado como cambisol crómico de pH neutro en la superficie, regándose durante el primer mes de establecimiento. En junio de 2013, se cortó la biomasa aérea de todas las plantas. Las muestras secas y molidas se calcinaron (450 °C) y las cenizas se disolvieron en HCl:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (1:1:8). Se determinó la concentración de elementos minerales (P, K, Ca Mg, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Na, y Co) mediante espectroscopía de plasma ICP.

Debido a que en la localidad del sur de Finlandia todas las plantas fueron E- y no se encontró ninguna planta infectada por *Epichloë*, el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo de la siguiente forma (SPSS Statistics 19). El efecto del hongo endofítico en el contenido mineral se determinó considerando las cuatro localidades en las que se encontraron plantas E+ y E- (Dehesa, Jerte, Islas Faroe, Finlandia-norte) mediante ANOVA de una vía. El efecto de la procedencia

geográfica de la planta se determinó considerando las cinco localidades (Dehesa, Jerte, Islas Faroe, Finlandia-norte y Finlandia-sur), con independencia del estatus endofítico de la planta, mediante ANOVA de una vía. Previamente, para cada variable se comprobó la distribución normal y homogeneidad de las varianzas (test de Bartlett). Con los datos de las cuatro poblaciones en las que se encontraron plantas E+ y E-, se realizó previamente un ANOVA de dos vías con los factores infección y procedencia de la planta. Los resultados de este análisis mostraron un efecto significativo de la interacción de ambos factores solo para el Al. Por ello, se presentan y se discuten los resultados de cada uno de los factores por separado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del endófito en el contenido mineral fue significativo para varios elementos (Tabla 1). En todos los casos en los que se encontraron diferencias ( $P < 0,1$ ), la concentración de elementos minerales tiende a ser mayor en las plantas infectadas que en las no infectadas. Así, la presencia del endófito incrementó la concentración de los elementos P, K, Ca, S, Zn, Cu y Co en las plantas (Tabla 1). En el resto de elementos las diferencias no fueron significativas ( $P > 0,1$ ). Estos resultados concuerdan con los de Malinowski *et al.* (2000) y Vázquez de Aldana *et al.* (2013) y sugieren que el endófito puede

jugar un papel importante en el estatus nutricional de la planta.

Se encontraron importantes diferencias en el contenido mineral de *F. rubra* entre localidades de origen de las plantas (Figuras 1 y 2). En general, las plantas procedentes del norte de Europa (Islas Faroe y Finlandia) tuvieron mayor concentración de la mayoría de elementos minerales (P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Ni, Al y Co) que las plantas del sur de Europa (España). En algunos casos como K, Ca y Fe las diferencias fueron notables (Figuras 1 y 2). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las tres localidades del norte de Europa en ninguno de los elementos, excepto en los contenidos de S y Na que fueron superiores en las plantas de Islas Faroe que en las de Finlandia (Figuras 1 y 2). De forma similar, las diferen-

cias entre las localidades españolas fueron escasas, encontrándose diferencias significativas sólo en los contenidos de Mn y Co (Figura 2).

Estas diferencias en contenido mineral entre plantas procedentes de diferentes localidades pueden ser debidas a las diferencias en la duración de la estación de crecimiento y en la temperatura entre los hábitats originales de las plantas. Así, las festucas nórdicas, adaptadas a un periodo de crecimiento corto y de días muy largos y a temperaturas más bajas, podrían exhibir una mayor absorción y acumulación de nutrientes cuando crecen durante un período más largo bajo condiciones más favorables, de forma que la concentración de nutrientes es mayor que en las festucas españolas adaptadas a las condiciones ambientales.

Tabla 1. Concentración de elementos minerales en plantas de *F. rubra* infectadas (E+) y no-infectadas (E-) por el endófito *Epichloë*.

Elemento	E+		E-		Significación
	Media	SE	Media	SE	
P (g kg <sup>-1</sup> )	3,34	0,115	3,01	0,119	<b>0,052</b>
K (g kg <sup>-1</sup> )	9,75	0,462	8,55	0,402	<b>0,065</b>
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	2,39	0,117	2,09	0,122	<b>0,090</b>
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	0,779	0,026	0,722	0,029	0,161
S (g kg <sup>-1</sup> )	1,018	0,038	0,924	0,037	<b>0,090</b>
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	208	12,0	187	13,4	0,262
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	37,5	1,65	37,4	1,71	0,962
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	20,5	0,595	18,9	0,623	<b>0,069</b>
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	5,62	0,235	4,91	0,218	<b>0,065</b>
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	2,32	0,100	2,25	0,163	0,703
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,205	0,006	0,199	0,007	0,598
Co (mg kg <sup>-1</sup> )	0,109	0,019	0,062	0,015	<b>0,079</b>

Considerando los niveles mínimos recomendados en nutrición de rumiantes (McDowell y Arthington, 2005), las festucas nórdicas proporcionarían los niveles mínimos de K, Ca y P, pero no las festucas españolas. En ningún caso se superan los mínimos recomendados para Mg, S, Zn, Cu, y en todos los casos los niveles de Fe y Na están por encima de los mínimos requeridos.

## CONCLUSIONES

El contenido mineral de plantas de *F. rubra* varía tanto con la presencia del endofito *Epichloë* como con la localidad de procedencia de las plantas. Las plantas infectadas tienden a acumular mayores concentraciones de minerales que las no infectadas. En cuanto a la procedencia de las plantas, las festucas nórdicas tienen mayor concentración de la mayoría de elementos minerales que las españolas.

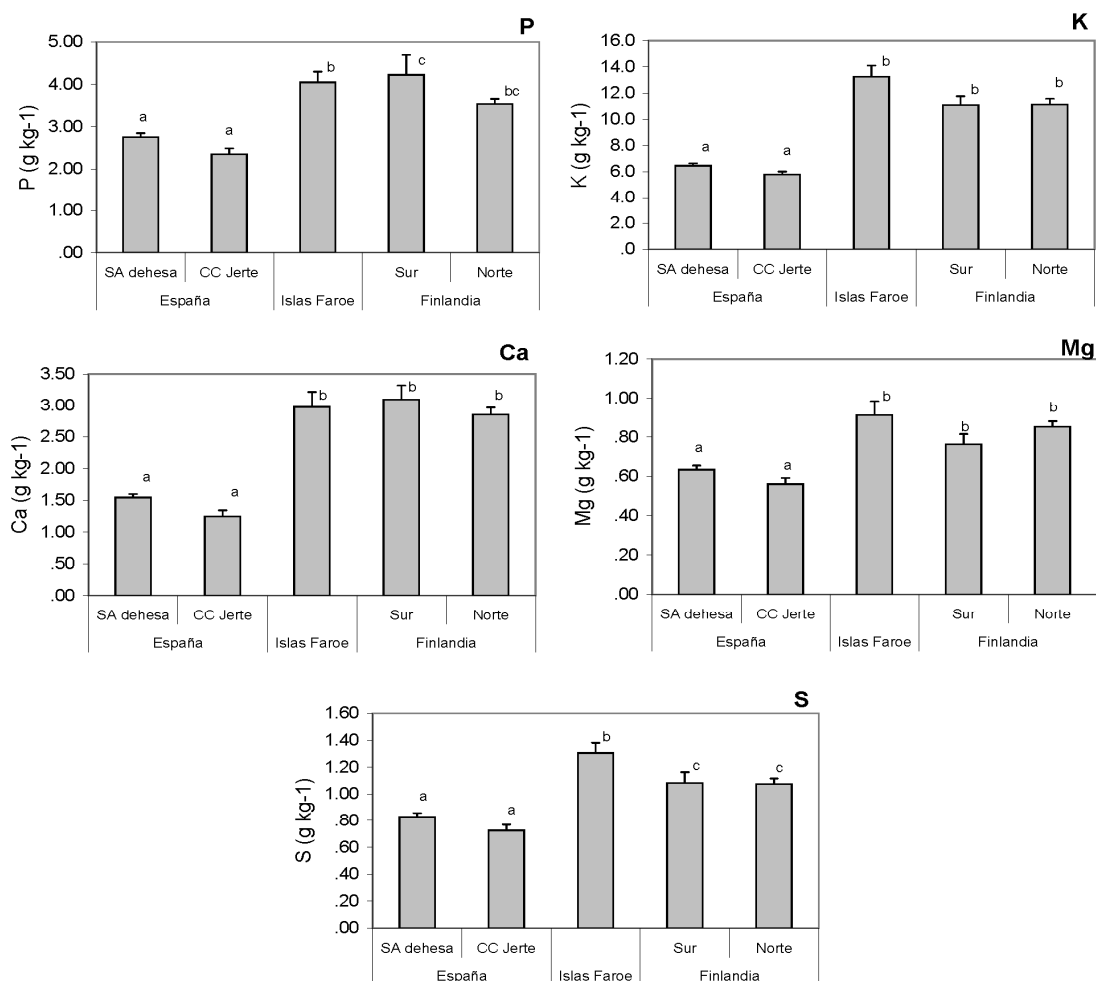


Figura 1. Concentración de P, K, Ca, Mg y S en plantas de *F. rubra* (E+ y E-) procedentes de cinco localidades, creciendo en una parcela experimental en Salamanca (España) (media + error estándar).

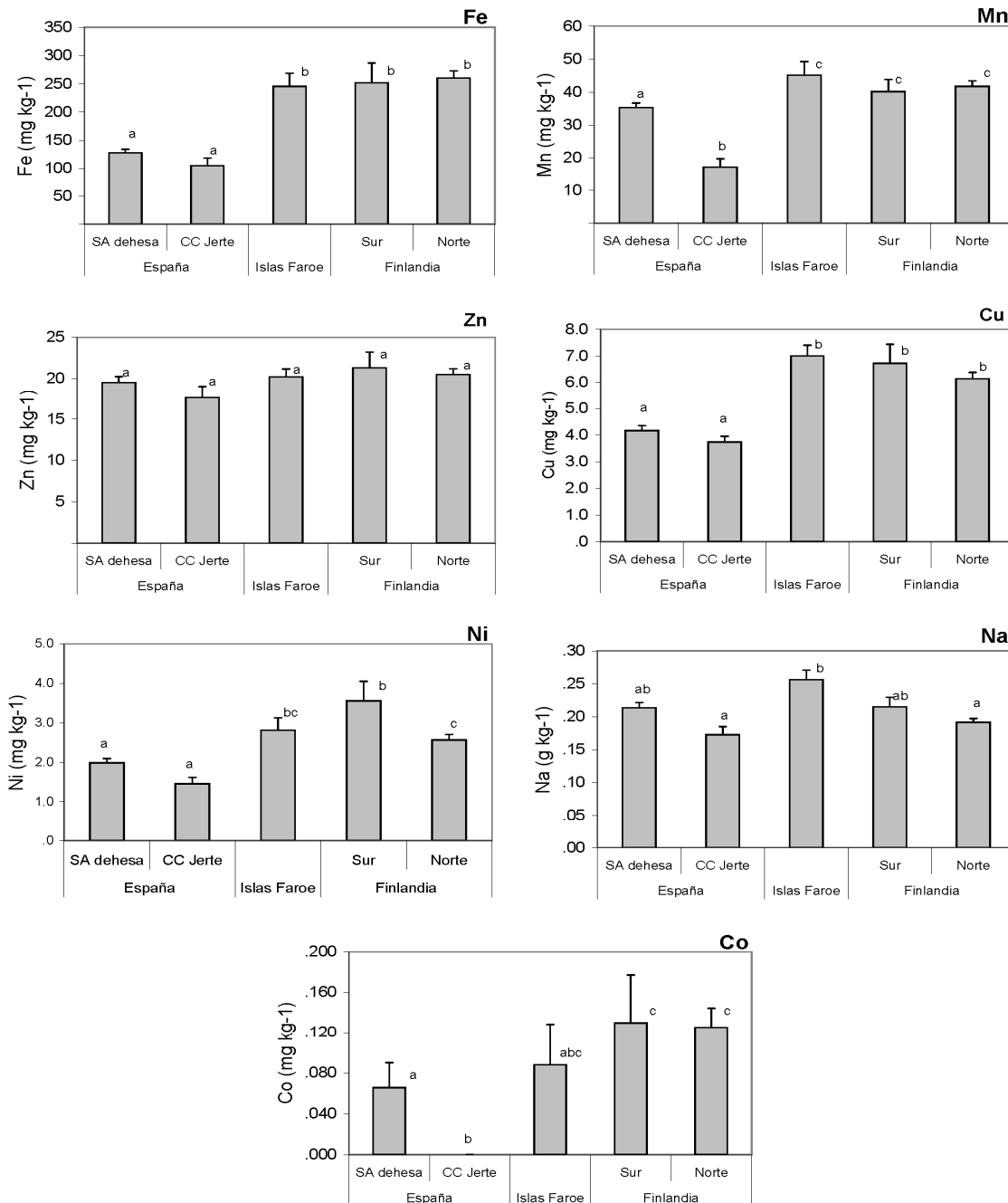


Figura 2. Concentración de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Na, Al, y Co en plantas de *F. rubra* (E+ y E-) procedentes de cinco localidades, creciendo en una parcela experimental en Salamanca (España) (media + error estándar).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de colaboración ha sido financiado con el proyecto International Network for Terrestrial Research and Monito-

ring in the Arctic (INTERACT), el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto AGL2011-22783) y Academy of Finland (proyecto 137909).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACON C.W. Y WHITE J.F. (1994) Stains, media and procedures for analyzing endophytes. En: Bacon C.W. y White J.F. (eds) *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 47-56. Boca Raton, FL: CRC Press.
- BUSH L.P., WILKINSON H.H. Y SCHARDL C.L. (1997) Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114, 1-7.
- MALINOWSKI D.P., ALLOUSH G.A. Y BELESKY D.P. (2000) Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant and Soil*, 227, 115-126.
- MALINOWSKI D.P. Y BELESKY D.P. (2006) Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. *Grassland Science*, 52, 1-14.
- MCDOWELL L.R. Y ARTHINGTON J.D. (2005) *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*. 4ª edición, Florida, USA: University of Florida.
- SAIKKONEN K., FAETH S.H., HELANDER M. Y SULLIVAN T.J. (1998) Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319-343.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA CRIADO B., VICENTE TAVERA S. Y ZABALGOGÉAZCOA I. (2013) Fungal endophyte (*Epichloë festucae*) alters the nutrient content of *Festuca rubra* regardless of water availability. *Plos One*, 8(12), e84539.
- WÄLI P.R., AHLHOLM J.U., HELANDER M. Y SAIKKONEN K. (2007) Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloë festucae* in fine fescue populations. *Microbial Ecology*, 53, 20-29.
- ZABALGOGÉAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CRIADO B. Y GARCÍA CIUDAD A. (1999) The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, 54, 91-95.
- ZABALGOGÉAZCOA I., GARCÍA CIUDAD A., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R. Y GARCÍA CRIADO B. (2006) Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *European Journal of Agronomy*, 24, 374-384.