

# INFLUENCIA DE ENDÓFITOS FÚNGICOS SOBRE LA ASIMILACIÓN E INCORPORACIÓN DE NUTRIENTES A LA BIOMASA EN *Trifolium subterraneum*

EFFECT OF FUNGAL ENDOPHYTES ON THE ABSORPTION AND ACCUMULATION OF MINERALS IN *Trifolium subterraneum* BIOMASS

S. LLEDÓ, O. SANTAMARÍA, S. RODRIGO, T. GARCÍA-WHITE Y N. HERNÁNDEZ

Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal (U. de Extremadura). Escuela de Ingenierías Agrarias. Avda. Adolfo Suárez s/n, 06007. Badajoz. e-mail: [osantama@unex.es](mailto:osantama@unex.es)

## RESUMEN

El trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), que produce abundante forraje de gran calidad, presenta una gran diversidad fúngica creciendo en su interior. En este trabajo se evaluó la influencia de la especie endofítica sobre la producción (biomasa aérea y radicular) de *T. subterraneum* y sobre la absorción y acumulación de minerales en su forraje. En condiciones de invernadero, se inocularon plantas de *T. subterraneum* de dos meses de edad con cada uno de 18 endófitos. Se hicieron cinco repeticiones incluyendo controles sin endófito. A los dos meses de la inoculación, se determinó el peso seco de la biomasa aérea y radicular y la concentración de los minerales: Al, B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn, mediante ICP-OES. El hongo endófito influyó en la producción y concentración de minerales del forraje. *Boeremia exigua* incrementó la biomasa aérea y radicular de las plantas de *T. subterraneum* en torno a un 37% y 16% respectivamente. Este mismo endófito, y otros tres más limitaron o redujeron la acumulación de metales tóxicos (Cd y Pb) en el forraje. Estos resultados evidencian el interés que puede tener el uso de hongos endófitos en la mejora de la producción forrajera y de su valor nutritivo.

**Palabras clave:** trébol, microflora, biomasa, minerales tóxicos, nutrientes esenciales.

## SUMMARY

Subterranean clover (*Trifolium subterraneum*), which produces abundant and high-quality forage, presents a great fungal diversity growing inside. In this work the effect of the endophytic species on *T. subterraneum* yield (above and belowground dry matter) and on the absorption and later accumulation of minerals in its forage was evaluated. In a greenhouse experiment, two month-old seedlings were inoculated with each one of 18 endophytes. Five replicates per treatment, including controls without endophytes, were established. Two months after inoculation, dry weight of aerial and root biomass was determined, as well as the mineral concentration by ICP-OES. The endophytic fungi significantly affected forage yield and mineral concentration. *Boeremia exigua* increased the aerial and root biomass of *T. subterraneum* plants around 37% and 16%, respectively. This endophyte, and another three more, were able to reduce the accumulation of toxic metals (Cd and Pb) in the forage. In summary, these results give evidence of the interest in using endophytic fungi for the improvement of forage production and nutritive value.

**Key words:** clover, mycoflora, biomass, toxic minerals, essential nutrients.

## INTRODUCCIÓN

El trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) aparece espontáneamente en pastizales y pastos de dehesa de suelos silíceos del cuadrante suroeste peninsular y produce un pasto relativamente abundante, de buena palatabilidad y calidad nutritiva. Por ello, es una especie muy utilizada en mezclas de praderas para implantación de praderas. Los hongos endófitos, que se desarrollan en el interior de los vegetales, incluido el trébol subterráneo durante todo o parte de su ciclo vital, en numerosas ocasiones provocan un efecto beneficioso sobre las plantas hospedantes, aumentando su valor adaptativo, particularmente en condiciones de estrés (Zabalgogezcoa et al., 2006) y/o protegiéndolas ante diferentes organismos (Clarke et al., 2006). Según la bibliografía, parece clara la influencia de la micoflora endofítica sobre la producción del forraje de la especie hospedante, aunque dicha influencia y su intensidad no es consistente ni ocurre en todos los sistemas. En algunos casos, como con *Festuca arundinacea* y ciertos genotipos de *Neotyphodium coenophialum* (Oliveira et al., 1996), se produce una mayor cantidad de biomasa herbácea sobre las plantas infectadas. No obstante, en otros estudios (Zabalgogezcoa et al., 2006) también se ha encontrado falta de influencia del endófito, en este caso *Epichloë festucae*, sobre el crecimiento de *Festuca rubra* en campo.

En cuanto al efecto sobre el contenido en nutrientes, Zabalgogezcoa et al. (2006) encontraron un incremento de los contenidos de fósforo y un descenso en los de manganeso en plantas de *F. rubra* infectadas con *E. festucae*. Ese mismo efecto sobre el fósforo también fue encontrado por Malinowsky et al. (1998) en plantas de *F. arundinacea* infectadas con *N. coenophialum*. Estos mismos autores también encontraron un aumento de calcio y magnesio en las plantas infectadas. Con respecto al cobre, se ha observado en varios sistemas planta-endófito un descenso significativo en el contenido respecto a plantas no infectadas (Zabalgogezcoa et al., 2006). Ante los pocos trabajos en esta línea, la disparidad de resultados encontrados y la mejora en la producción forrajera que se podría producir, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de 18 hongos endófitos sobre la producción (peso seco aéreo y radicular) y contenido en minerales (Al, B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn) del forraje de *Trifolium subterraneum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A finales de 2012, semillas del cultivar 'Valmoreno' de *T. subterraneum* fueron esterilizadas superficialmente y sembradas (10 semillas/tiesto) en pequeños tiestos de plástico (7 cm x 7 cm x 8 cm) que contenían un sustrato mezcla de turba y perlita al 50%. Las

plantas fueron mantenidas durante un mes creciendo en condiciones de invernadero (en las instalaciones de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz) y regadas cada 2-3 días hasta capacidad de campo. Con el fin de limitar al máximo las infecciones de otros hongos, que podrían alterar los resultados, se realizaron 3 aplicaciones (1 ml de producto/1 L de agua) del fungicida sistémico AMISTAR XTRA® (Syngenta, Madrid). Una vez transcurrido el plazo de seguridad del fungicida, un mes más tarde, se procedió a la inoculación de cada uno de los 18 hongos endófitos estudiados (Tabla 1). La selección de los hongos se realizó en base a su frecuente aislamiento como endófitos en especies de pasto, *T. subterraneum* incluido, en su ambiente natural (datos sin publicar de los autores del trabajo). Por ello se les presumía con una elevada capacidad competitiva y alguna interacción positiva con la planta. El inóculo consistió en micelio vegetativo que había crecido durante al menos 2 meses en medio líquido PDB (caldo de patata y dextrosa) y homogeneizado con una batidora. La aplicación se realizó con un atomizador manual después de haber herido las plantas para facilitar la entrada del hongo. Durante las 72 horas siguientes a la inoculación, las plantas fueron mantenidas en unas condiciones microclimáticas de alta humedad para facilitar así la entrada y establecimiento del hongo. Las inoculaciones fueron repetidas una semana más

tarde para asegurar la infección. Por cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones (cinco tiestos). Adicionalmente, cinco tiestos con plantas heridas e inoculadas con medio de cultivo PDB pero sin ningún hongo creciendo, fueron usadas como control. Todo el ensayo fue repetido de nuevo un mes después. Para asegurar que el efecto evaluado era causado por el hongo introducido, un mes después de la inoculación se procedió al re-aislamiento del endófito sobre una muestra de las plantas inoculadas.

Después de dos meses de la inoculación, las plantas fueron cortadas a 1 cm del sustrato, recogidas, etiquetadas y llevadas al laboratorio para realizar los análisis de producción y contenido en nutrientes. La producción de biomasa (materia seca aérea y radicular) de las muestras recogidas se determinó después de su secado en estufa a 70°C durante 48 h hasta pesada constante. Las muestras aéreas de una selección de 9 de los endófitos (E071, E091, E179, E202, E259, E361, E362, E581 y E631) más los controles fueron molidas en molino de cuchillas y pasadas por un tamiz de luz de 1 mm de paso. Las determinaciones de minerales fueron realizadas por el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC) en Murcia. Después de una digestión con  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , las muestras fueron procesadas mediante espectroscopía de plasma ICP-OES (plasma de acoplamiento

Tabla 1. Especies de hongos endófitos utilizados en los ensayos

Código*	Especie	Código	Especie
E0	Control	E244	Pleosporal no identificado
E060	<i>Fusarium lateritium</i> Nees	E259	<i>Phaeosphaeria avenaria</i> (G.F. Weber) O.E. Erikss.
E071	<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	E269	No identificado
E091	<i>Alternaria</i> sp.	E361	No identificado
E106	<i>Leptosphaerulina trifolii</i> (Rostr.) Petr.	E362	<i>Embellisia abundans</i> Simmons
E138	<i>Embellisia leptinellae</i> Simm. & Hill	E573	<i>Dendryphiella arenariae</i> Nicot
E140	<i>Stemphylium globuliferum</i> (Vestergr.)	E581	<i>Boeremia exigua</i> (Desm.) Aveskamp,
E179	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	E631	<i>Epicoccum nigrum</i> Link
E202	<i>Chaetosphaeronema</i> sp.	E636	<i>Sporormiella pilosa</i> (Cain) Ahm. & Cain

\* Código con el que se designó a cada hongo a efectos de su representación en tablas y figuras de resultados.

inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptico) para obtener las concentraciones de los siguientes minerales: Al, B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn. Con los datos agrupados de las dos repeticiones se realizó un ANOVA de una entrada y test de comparaciones múltiples (LSD de Fisher) para ver la influencia del hongo endófito en todas y cada una de las variables de producción y minerales. Todo ello se hizo con el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS (Statistical Analysis Software v. 9.1.3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico mostró cómo el factor 'endófito' influyó significativamente en la biomasa producida por *T. subterraneum*, tanto aérea (grados de libertad  $gl = 17$ ;  $F =$

$4,22$ ;  $p < 0,001$ ) como radicular ( $gl = 17$ ;  $F = 2,51$ ;  $p = 0,002$ ). Cuando el endófito E581 *Boeremia exigua* fue inoculado, la biomasa producida por el trébol, tanto aérea como radicular, fue significativamente superior, en torno a un 37% y un 16% respectivamente, a la obtenida en los controles (Figura 1). Por el contrario, cuatro de los endófitos, E106 (*Leptosphaerulina trifolii*), E140 (*Stemphylium globuliferum*), E244 (Pleosporal no identificado) y E636 (*Sporormiella pilosa*) redujeron la producción de biomasa aérea y/o radicular.

En el caso de *L. trifolii* y *S. globuliferum* la explicación para esta reducción parece venir del hecho de que estas especies, o algunas próximas, han sido citadas como patógenos en tréboles y otras leguminosas (Booth y Pirozynski, 1967; Berg y Leath,

1996). Aunque durante el desarrollo del ensayo no se hizo evidente ninguna sintomatología en las plantas que delatara un efecto patogénico de ambos hongos, el carácter patógeno que indica la bibliografía podría haber alterado alguna de las funciones fisiológicas de la planta, dando como resultado la menor producción de biomasa. Las otras dos especies que provocaron descensos en la producción, aunque no han sido identificadas, podrían tener similar comportamiento patogénico. En el caso de *Boeremia exigua*, endófito que aumentó la biomasa, también ha sido citado como patógeno (Li *et al.*, 2012). Sin embargo en este caso, lejos de producir daños en la planta, consiguió estimular de alguna forma su crecimiento. La mayor biomasa radicular podría ser explicada con la hipótesis de que el endófito hubiera provocado un retraso en la madurez de la planta. Es perfectamente conocido que la expansión radicular se detiene en gran medida en la fase reproductiva. Por tanto, un retraso en la madurez podría provocar un alargamiento en el periodo de expansión radicular. Ese mayor volumen radicular a su vez tendría una mayor capacidad de absorción que explicaría la mayor biomasa aérea.

Con respecto a la absorción de nutrientes (Tabla 2), el hongo endófito influyó significativamente en la absorción y posterior acumulación en la planta del Ca ( $gl = 9; F = 2,58; p = 0,019$ ), Cd ( $gl = 9; F = 3,95; p =$

$0,001$ ), Cr ( $gl = 9; F = 2,46; p = 0,025$ ), Mo ( $gl = 9; F = 3,23; p = 0,001$ ), Ni ( $gl = 9; F = 2,54; p = 0,021$ ) y Pb ( $gl = 9; F = 8,48; p < 0,001$ ). En un estudio similar, pero con un sistema endófito-hospedante diferente (Zabalgogazcoa *et al.*, 2006), el hongo endófito también afectó la concentración de Ca en la planta. Aunque en dicho estudio, y a diferencia del nuestro, el endófito también influyó en el Mn y en el Cu. Esto probaría que se tiene que dar la combinación apropiada endófito-hospedante-ambiente para que el efecto se produzca. En el momento en el que uno de los tres factores no sea el adecuado, la interacción no se produce. Este hecho explicaría la falta de consistencia y la disparidad de resultados encontrados en la bibliografía y nos indicaría la importancia de analizar cada sistema específicamente. En nuestro caso, ninguno de los endófitos logró acumular una concentración significativamente mayor de ningún mineral con respecto al observado en los controles (Tabla 2). En el caso de los endófitos que redujeron la concentración de los nutrientes considerados como esenciales en la alimentación animal (Ca, Cr, Mo y Ni), este hecho podría ser considerado como claramente negativo al reducir el valor nutritivo del forraje. No obstante, en la mayor parte de los casos no habría ningún problema porque la concentración obtenida, incluso cuando el endófito la redujo, superaría con creces la requerida por los animales

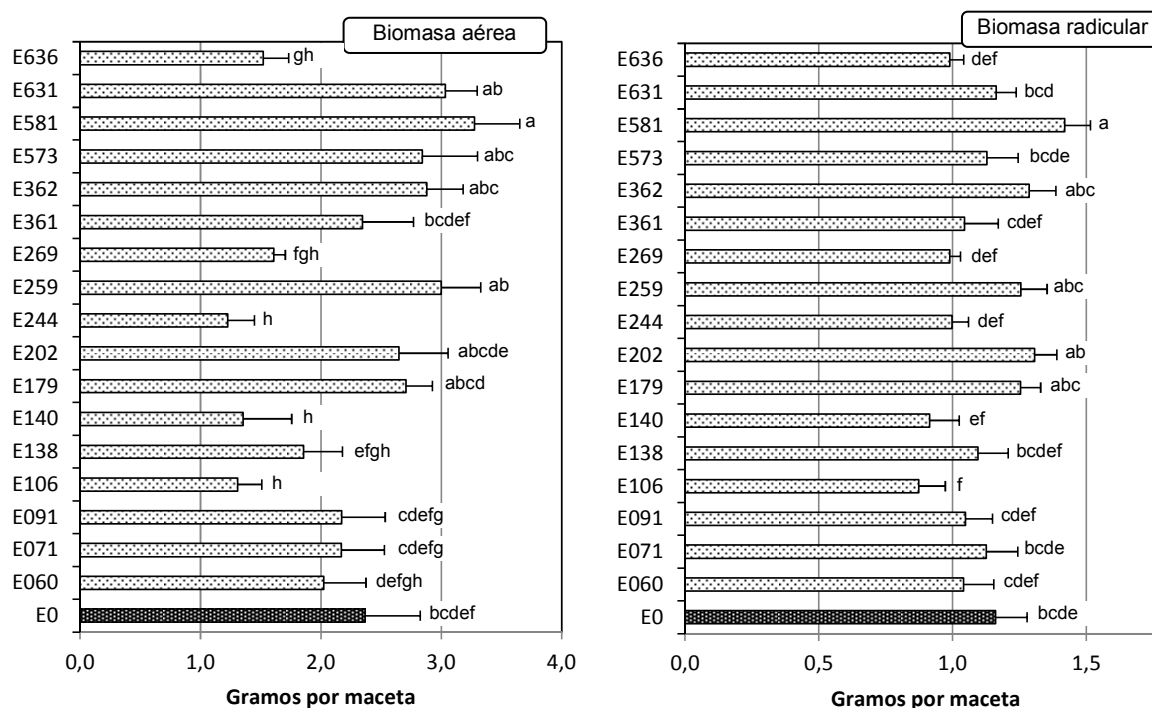


Figura 1. Materia seca aérea y radicular, de *T. subterraneum* según el endófito inoculado (ver codificación en tabla 1). Las líneas horizontales indican el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

(Underwood y Suttle, 1999).

Por otra parte, la reducción significativa que algunos endófitos produjeron en la concentración de Cd y Pb en el forraje es positiva puesto que estos minerales son considerados como tóxicos para el ganado. Para ambos minerales, los hongos E259 (*Phaeosphaeria avenaria*), E362 (*Embellisia abundans*), E581 (*Boeremia exigua*) y E631 (*Epicoccum nigrum*) provocaron este efecto. Por tanto, la introducción de estos endófitos en el sistema podría resultar beneficiosa para la producción forrajera, sobre todo en zonas con niveles altos de esos minerales tóxicos, al limitar o reducir su acumulación por parte de la planta. Habría que evaluar no obstante si la inoculación con esos endófitos puede

tener otros efectos no deseados, como descensos en la palatabilidad o en la calidad del pasto en términos de proteína y digestibilidad de la materia orgánica.

## CONCLUSIONES

La presencia de micoflora endofítica en el interior de la planta tiene una influencia clara sobre la producción y acumulación de minerales en el forraje de *Trifolium subterraneum*, aunque depende de qué especie endofítica se trate para que sea más o menos patente. En nuestro caso, en condiciones de invernadero, plantas con el endófito *Boeremia exigua* en su interior incrementaron su biomasa aérea y radicular y redujeron la acumulación de minerales tóxicos como Cd y

**Tabla 2. Concentración  $\pm$  error estándar de los minerales Ca, Cd, Cr, Mo, Ni y Pb en la biomasa aérea según el hongo endófito inoculado.**

Endófito	Al (mg/kg)	B (mg/kg)	Ca (g/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)
E0	145,69 $\pm$ 61,8	18,86 $\pm$ 2,3	19,85 $\pm$ 1,4 ab	0,06 $\pm$ 0,04 ab	1,28 $\pm$ 0,6 ab	7,83 $\pm$ 1,4
E071	154,30 $\pm$ 19,5	18,41 $\pm$ 1,9	20,09 $\pm$ 0,7 ab	0,08 $\pm$ 0,02 a	1,41 $\pm$ 0,2 a	8,46 $\pm$ 1,2
E091	175,07 $\pm$ 98,4	19,39 $\pm$ 1,7	19,89 $\pm$ 0,8 ab	0,05 $\pm$ 0,02 abc	1,97 $\pm$ 1,0 a	9,32 $\pm$ 1,6
E179	64,97 $\pm$ 15,1	19,11 $\pm$ 1,3	18,48 $\pm$ 0,5 bc	0,06 $\pm$ 0,01 ab	0,20 $\pm$ 0,1 bc	7,81 $\pm$ 0,4
E202	62,49 $\pm$ 3,2	17,21 $\pm$ 1,9	16,38 $\pm$ 0,9 c	0,07 $\pm$ 0,03 ab	0,99 $\pm$ 0,2 abc	7,00 $\pm$ 0,7
E259	104,73 $\pm$ 12,5	15,34 $\pm$ 1,1	18,92 $\pm$ 1,2 b	0,00 $\pm$ 0,00 c	1,05 $\pm$ 0,3 abc	5,53 $\pm$ 0,7
E361	81,76 $\pm$ 3,5	17,84 $\pm$ 2,2	20,19 $\pm$ 1,5 ab	0,03 $\pm$ 0,03 bc	1,95 $\pm$ 0,5 a	7,21 $\pm$ 1,0
E362	57,27 $\pm$ 5,0	17,19 $\pm$ 0,9	21,90 $\pm$ 0,7 a	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,12 $\pm$ 0,0 c	7,59 $\pm$ 0,5
E581	98,13 $\pm$ 26,6	16,37 $\pm$ 1,2	19,63 $\pm$ 0,8 ab	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,90 $\pm$ 0,4 abc	6,47 $\pm$ 0,7
E631	74,11 $\pm$ 10,7	16,30 $\pm$ 1,2	19,93 $\pm$ 0,6 ab	0,00 $\pm$ 0,00 c	1,13 $\pm$ 0,4 abc	6,39 $\pm$ 0,5
Endófito	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Mo (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
E0	139,76 $\pm$ 45,8	160,94 $\pm$ 34,0	0,51 $\pm$ 0,2 ab	1,00 $\pm$ 0,2 abc	0,36 $\pm$ 0,1 ab	47,34 $\pm$ 8,3
E071	146,64 $\pm$ 13,7	178,15 $\pm$ 17,8	0,44 $\pm$ 0,1 ab	0,66 $\pm$ 0,2 cd	0,35 $\pm$ 0,0 ab	50,06 $\pm$ 6,1
E091	164,45 $\pm$ 76,3	163,06 $\pm$ 23,0	0,58 $\pm$ 0,2 a	1,43 $\pm$ 0,5 a	0,42 $\pm$ 0,1 a	48,64 $\pm$ 6,8
E179	77,99 $\pm$ 4,1	146,15 $\pm$ 9,7	0,44 $\pm$ 0,1 ab	0,33 $\pm$ 0,1 d	0,29 $\pm$ 0,0 b	43,16 $\pm$ 3,7
E202	87,80 $\pm$ 3,4	171,43 $\pm$ 24,5	0,26 $\pm$ 0,1 bc	0,80 $\pm$ 0,1 bcd	0,37 $\pm$ 0,0 ab	48,38 $\pm$ 8,3
E259	93,59 $\pm$ 9,8	134,78 $\pm$ 11,2	0,02 $\pm$ 0,0 c	1,01 $\pm$ 0,2 abc	0,14 $\pm$ 0,0 c	41,81 $\pm$ 5,2
E361	84,87 $\pm$ 4,3	169,94 $\pm$ 25,6	0,15 $\pm$ 0,1 c	1,26 $\pm$ 0,2 ab	0,28 $\pm$ 0,0 b	42,45 $\pm$ 6,8
E362	79,55 $\pm$ 5,6	176,39 $\pm$ 8,9	0,06 $\pm$ 0,0 c	0,55 $\pm$ 0,2 cd	0,12 $\pm$ 0,0 c	44,70 $\pm$ 2,3
E581	96,41 $\pm$ 18,0	144,18 $\pm$ 13,1	0,07 $\pm$ 0,0 c	0,67 $\pm$ 0,2 bcd	0,14 $\pm$ 0,0 c	43,99 $\pm$ 4,9
E631	79,81 $\pm$ 8,2	157,61 $\pm$ 2,8	0,09 $\pm$ 0,0 c	0,84 $\pm$ 0,3 abcd	0,07 $\pm$ 0,0 c	39,65 $\pm$ 3,3

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre endófitos según test LSD, para cada mineral.

Pb. Estos resultados evidencian el interés que puede tener el uso de hongos endófitos en la mejora de la producción forrajera y de su valor nutritivo.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y por fondos FEDER, a través del proyecto de

investigación de referencia AGL2011-27454.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERG C.C. Y LEATH K.T. (1996) Responses of red clover cultivars to *Stemphylium* leaf spot. *Crop Science*, 36, 71-73.

BOOTH C. Y PIROZYNSKI K.A. (1967) *Leptosphaerulina trifolii*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, Vol. 146.

Wallingford, UK: CAB International.

CLARKE B.B., WHITE J.F., HURLEY H., TORRES M.S., SUN S. Y HUFF D.R. (2006) Endophyte mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90, 994-998.

LI Y.P., YOU M.P., FINNEGAN P.M., KHAN T.N., LANOISELET V., EYRES N. Y BARBETTI M.J. (2012) First report of black spot caused by *Boeremia exigua* var. *exigua* on field pea in Australia. *Plant Disease*, 96, 148-149.

MALINOWSKY D.P., BELESKY D.P., HILL N.S., BALIGAR V.C. Y FEDDERS J.M. (1998) Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Plant Soil*, 198, 53-61.

OLIVEIRA J.A., SLEPER D.A., WEST C.P., BUGHRARA S.S. Y COUTTS J. (1996) Efecto de dos cepas del hongo endofito *Acremonium coenophialum* sobre la respuesta al estrés hídrico en una población de *Festuca* alta "Himag". *Pastos*, 26, 177-184.

UNDERWOOD E.J. Y SUTTLE N.F. (1999) *The Mineral Nutrition of Livestock*. Wallingford, UK: CABI Publishing.

ZABALGOGEAZCOA 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.