

# INFLUENCIA DE DIVERSOS HONGOS ENDÓFITOS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL FORRAJE EN *Lolium rigidum*

INFLUENCE OF SEVERAL ENDOPHYTIC FUNGI ON *Lolium rigidum*  
FORAGE PRODUCTION AND QUALITY

O. SANTAMARÍA, S. LLEDÓ, M.J. POBLACIONES Y P.J. ROMERO

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

## RESUMEN

El vallico (*Lolium rigidum*), especie pratense de clima mediterráneo, produce forraje abundante y de buena calidad. Como el resto de gramíneas, presenta gran diversidad de micoflora endofítica creciendo en su interior. En el presente trabajo se contrasta la hipótesis de que la especie endofítica influye en la producción (peso seco aéreo y radicular) y en la calidad del forraje (proteína bruta, fibra neutro y ácido detergente, lignina y cenizas). Se diseñó un experimento en condiciones de invernadero con plantas de *L. rigidum* que se inocularon con cada una de 11 especies endofíticas, dos meses después de su siembra. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento, incluyendo controles sin endófito. A los dos meses de la inoculación se determinó el peso seco de la biomasa aérea y radicular y los parámetros de calidad. El hongo endófito influyó en la producción y calidad del forraje. *Fusarium lateritium* incrementó la biomasa radicular y los endófitos E269 (no identificado), *Embellisia leptinellae*, E244 (Pleosporal no identificado) o *Sporormiella pilosa* mejoraron la calidad del pasto en alguno de sus parámetros. El presente trabajo evidencia que el uso de endófitos puede ser una vía interesante en la mejora de la producción forrajera y de su valor nutritivo.

**Palabras clave:** Vallico, micoflora, biomasa aérea y radicular, valor nutritivo.

## SUMMARY

Rye-grass (*Lolium rigidum*), a traditional pasture species in Mediterranean climate, produces an abundant and high-quality forage. Like other grasses, it presents a high diversity of endophytic mycoflora growing inside. In the present work, the hypothesis of a significant effect of the endophytic species on forage production (aerial and root dry weight) and quality (crude protein, neutral and acid detergent fibre and lignin) was tested. Thus, two-month old *L. rigidum* plants growing under greenhouse conditions were inoculated with each one of 11 endophytic species. Five replicates per treatment were considered, including control treatment without any endophyte inoculation. Two months after inoculation, dry weight of aerial and root biomass was determined, as well as several forage quality parameters. Results highlighted the endophytic fungi influence on forage production and quality. *Fusarium lateritium* increased *L. rigidum* root biomass. Endophytes E269 (unidentified), *Embellisia leptinellae*, E244 (unidentified Pleosporal) or *Sporormiella pilosa*, improved some of the forage quality parameters. In summary, the present work showed that the use of endophytes could be an interesting way for the improvement of forage production and its nutritive value.

**Key words:** rye-grass, mycoflora, above and belowground biomass, nutritive value.

## INTRODUCCIÓN

El vallico (*Lolium rigidum* Gaud.) es una especie pratense propia de zonas con clima mediterráneo de la que se obtiene un forraje abundante y de buena calidad. Como el resto de gramíneas, *L. rigidum* presenta una gran diversidad de micoflora endofítica creciendo en el interior de sus tejidos. Los hongos endofíticos en numerosas ocasiones provocan un efecto beneficioso sobre las plantas hospedantes, aumentando su valor adaptativo, particularmente en condiciones de estrés (Malinowski y Belesky, 2000; Zabalgogezcoa et al., 2006) y protegiéndolas ante diferentes organismos fitófagos (Clarke et al., 2006).

En este sentido, se ha constatado en diversos estudios una influencia directa del hongo endofítico sobre la producción y calidad del pasto. En muchos casos se produjo un efecto positivo del endófito sobre la producción o sobre alguna característica productiva del hospedante (Oliveira et al., 1996). Sin embargo, esta influencia depende totalmente de la interacción entre endófito, hospedante y condiciones ambientales. En cuanto uno de los tres factores, o la interacción entre algunos de ellos, no sea el adecuado, la influencia puede no ser significativa, tal y como ocurrió en otros estudios (Fritz y Collins, 1991; Zabalgogezcoa et al., 2006). La influencia de los endófitos sobre la calidad del pasto puede resumirse mediante dos vías.

La primera sería la potencial producción de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para el ganado, o al menos disminuir la palatabilidad del pasto, y la segunda sería un efecto sobre los principales parámetros de calidad del pasto (contenido en proteína, fibra, lignina y digestibilidad de la materia orgánica). En esta segunda vía, con la presencia de algunos endófitos en el interior de plantas de *Festuca rubra* L., *F. arundinacea* Schreb. o *Lolium perenne* L., ya se ha constatado el incremento de la digestibilidad del forraje (Vázquez de Aldana et al., 2000; Zabalgogezcoa et al., 2006). Aun así, y a pesar de que los trabajos en este campo no son muy numerosos, es frecuente no encontrarse ningún efecto significativo del endófito sobre estos parámetros de calidad. 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 11 hongos endófitos sobre la producción (peso seco aéreo y radicular) y calidad (proteína bruta, fibra neutro y ácido detergente y lignina) de forraje de *L. rigidum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A finales de 2012, semillas del cultivar Wimmera de *L. rigidum* 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) en cuanto a la luz y a la temperatura y regadas cada 2-3 días hasta capacidad de campo. Con el fin de limitar al máximo las infecciones de otros hongos en las plantas que pudieran alterar los resultados, se realizaron tres aplicaciones (1 ml de producto/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 11 hongos endófitos estudiados (Tabla 1), que habían sido previamente aislados de plantas de *L. rigidum*. El inóculo consistió en micelio vegetativo que había crecido durante al menos dos 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 en tallos y hojas para facilitar la en-

trada 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. La aplicación del inóculo se repitió 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 hongo, fueron usadas como control. Todo el ensayo fue repetido de nuevo un mes después.

Después de dos meses desde las inoculaciones las plantas fueron cortadas a 1 cm del sustrato, recogidas, etiquetadas y llevadas al laboratorio para realizar los análisis de producción y de calidad. 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. Posteriormente fueron molidas en molino de cuchillas y pasadas

Tabla 1. Especies de hongos endófitos utilizados en los ensayos

Código	Especie	Código	Especie
E0	Control	E202	<i>Chaetosphaeronema</i> sp
E060	<i>Fusarium lateritium</i> Nees	E244	Pleosporal no identificado
E071	<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	E269	No identificado
E138	<i>Embellisia leptinellae</i> Simm. & Hill	E361	No identificado
E140	<i>Stemphylium globuliferum</i> (Vestergr.)	E631	<i>Epicoccum nigrum</i> Link
E179	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	E636	<i>Sporormiella pilosa</i> (Cain) Ahm. & Cain

por un tamiz de luz de 1 mm de paso. Las determinaciones de calidad fueron llevadas a cabo mediante los siguientes métodos. Proteína Bruta (PB): según el método oficial: RD 2257/1994 n°6, según el método Kjeldahl. Para la fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) se utilizó el analizador de fibra ANKOM 8-98, cuyo procedimiento consta en el método oficial AOAC Ba 6a-05 (2005) y que se basa en los métodos de Goering y Van Soest (1970). Para las cenizas se siguió el método oficial AOAC Ba 5a-C49 (2005). El análisis estadístico de los datos consistió en ANOVAs de dos entrada y test de comparaciones múltiples (LSD de Fisher) para ver la influencia del hongo endófito y de la repetición en todas y cada una de las variables de producción y calidad. Todo ello se hizo con el procedimiento GLM (General Linear Mo-

del) de SAS (Statistical Analysis Software v. 9.1.3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANOVA mostró que la variable endófito no tuvo una influencia significativa sobre la biomasa aérea obtenida, pero si sobre la biomasa radicular (Tabla 2). En ambos casos, la repetición, es decir que el ensayo se hiciera con un mes de diferencia, si que influyó significativamente en la producción obtenida. No obstante, como la interacción entre ambas variables no fue significativa, para ver el efecto de cada endófito se agruparon los datos de ambas repeticiones. Con la inoculación de dos de los hongos, E060 (*F. lateritium*) y E361 (no identificado), se obtuvieron plantas con mayor biomasa radicular que la observada en los controles (Fig. 1).

Tabla 2. Resultados del ANOVA sobre el efecto de la especie endofítica, de la repetición y su interacción en los parámetros de producción (MS) y calidad evaluados.

Factor	Gl	MS aérea		MS radicular		PB		FND	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Endófito (E)	11	1,26	0,260	2,13	0,025	2,33	0,022	3,08	0,003
Repetic. (R)	1	17,05	<0,001	17,23	<0,001	0,06	0,803	19,41	<0,001
E*R	11	1,53	0,133	1,44	0,166	0,59	0,828	1,67	0,111

Factor	Gl	FAD		LAD		Cenizas	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Endófito (En)	11	2,04	0,045	13,14	<0,001	1,60	0,130
Edad (Ed)	1	25,17	<0,001	1,44	0,236	0,11	0,741
En*Ed	11	0,63	0,791	3,77	<0,001	2,24	0,028

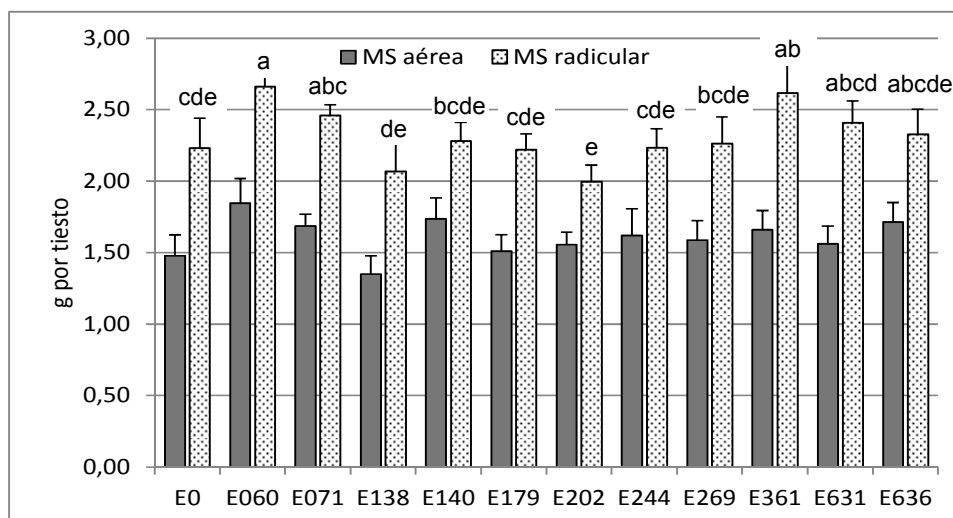


Figura 1. Materia seca (MS), aérea y radicular, de *L. rigidum* según el endófito inoculado (ver codificación en Tabla 1). Las líneas verticales indican el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas en la biomasa radicular.

Obviamente una mayor biomasa radicular le puede suponer a la planta una clara ventaja adaptativa al ampliar el volumen de exploración de las raíces y por tanto ser capaz de absorber más nutrientes. Este hecho, aunque según los resultados obtenidos no le ha servido a la planta para incrementar la biomasa aérea, sí que puede suponer una mejora cualitativa de la biomasa producida en términos de mayor contenido en nutrientes esenciales para los animales. Nuevos estudios que evalúen el efecto de estos hongos en el contenido en nutrientes del forraje serían necesarios para corroborar este aspecto. *Fusarium lateritium* ha sido citado como patógeno de diversas plantas (Yun *et al.*, 2013), aunque también produce metabolitos con aptitudes antifúngicas (John *et al.*, 2005). No se ha encontrado referencia en la bibliografía que lo cite como inductor del creci-

miento radicular en ninguna planta hospedante.

Con respecto a los parámetros de calidad, la variable endófito tuvo un efecto significativo sobre el contenido en PB, FAD, FND y LAD. La repetición sólo influyó en ambas fibras y la interacción en la lignina y cenizas (Tabla 2). Las plantas inoculadas con el endófito E269 (hasta la fecha no identificado) mostraron un contenido de PB mayor que el observado en los controles. Con respecto a FND, FAD y LAD, hubo tres hongos endófitos que disminuyeron notable y significativamente su contenido en las plantas con respecto a los controles (Fig. 2). Estos endófitos fueron E138 (*E. leptinellae*), E244 (Pleosporal no identificado) y E636 (*S. pilosa*). Este descenso en los contenidos de fibra y lignina, y por consiguiente aumento en el ni-

vel de digestibilidad de la materia orgánica ha sido también descrito para otros sistemas endófito\*hospedante (Zabalgogezcoa *et al.*, 2006). Tal y como discuten estos autores, ese hecho podría ser debido a que el endófito podría provocar un retraso en la madurez de la planta. Obviamente, como la planta según avanza en su ciclo va aumentando los niveles de fibra y disminuyendo los de proteína, ese retraso derivaría en esos menores valores de fibra y mayores de proteína. Esta misma hipótesis valdría para explicar la mayor biomasa radicular observada en el endófito E269, ya que es perfectamente conocido que la expansión radicular en gramíneas se

detiene en gran medida en la fase reproductiva. Un retraso en la madurez podría provocar por tanto un alargamiento en el periodo de expansión radicular. No obstante, se deberían realizar nuevos experimentos diseñados específicamente con estos endófitos para corroborar esa hipótesis.

Tanto de *E. leptinellae* como de *S. pilosa* hay muy poca información en la literatura. Nunca habían sido citadas afectando los parámetros de calidad de una especie pratense, como en este caso es *L. rigidum*. El género *Embellisia* ha sido especialmente citado como patógeno de diversas especies vegetales (Koike y Rooney-Latham, 2012). Otras espe-

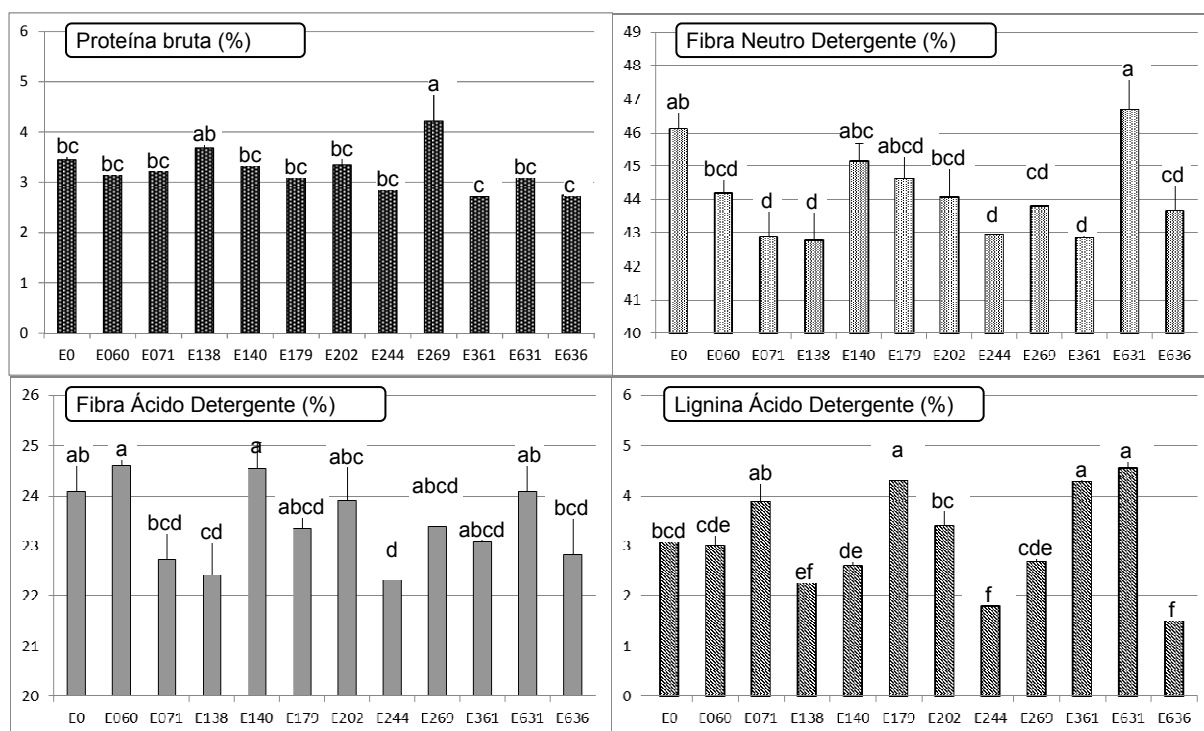


Figura 2. Proteína bruta, fibra neutro y ácido detergente y lignina ácido detergente según el endófito inoculado (ver codificación en Tabla 1). Las líneas verticales indican el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas.

cies del género *Sporormiella* han sido utilizadas como control biológico frente a otros patógenos ya que parece producir sustancias con propiedades antibióticas (Chakravarty et al., 1994).

## CONCLUSIONES

La micoflora endofítica que presenta la planta tiene una influencia clara sobre la producción y calidad del pasto, si bien es cierto que dicha influencia se hace más patente cuando la combinación endófito-hospedante es la adecuada para unas condiciones determinadas. En este sentido, para la especie *L. rigidum* en condiciones de invernadero, plantas con el endófito *F. lateritium* en su interior incrementaron su biomasa radicular; y plantas con los endófitos E269 (no identificado), *E. leptinellae*, E244 (Pleosporal no identificado) o *S. pilosa* mejoraron su calidad bromatológica. Por tanto el presente trabajo evidencia que el uso de endófitos puede ser una vía muy interesante 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

AOAC (2005) *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Arlington, USA.

CHAKRAVARTY P., TRIFONOV L., HUTCHISON L.J., HIRATSUKA T. Y AYER W.A. (1994) Role of *Sporormiella similis* as a potential bioprotectant of *Populus tremuloides* wood against the blue-stain fungus *Ophiostoma piliferum*. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, 2235-2239.

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.

FRITZ J.O. Y COLLINS M. (1991) Yield, digestibility, and chemical composition of endophyte free and infected tall fescue. *Agronomy Journal*, 83, 537-541.

GOERING H.K. Y VAN SOEST P.J. (1970) *Forage fiber analysis*. Agricultural Handbook No. 379. USDA-ARS, Washington, DC.

JOHN S., WICKS T.J., HUNT J.S., LORIMER M.F., OAKLEY H. Y SCOTT E.S. (2005) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34, 569-575.

KOIKE S.T. Y ROONEY-LATHAM S. (2012) First report of *Embellisia allii* causing

skin blotch and bulb canker on garlic in California. *Plant Disease*, 96, 291.

MALINOWSKI D.P. Y BELESKY D.P. (2000) Adaptations of endophyte-infected cool season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40, 923–40.

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

VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA-CIUDAD A., ZABALGOGEAZCOA I. Y GARCÍA-CRIADO B. (2000) Effect of fungal endophyte infection on nutritional quality in *Festuca arundinacea*. En: Soegaard K. et al. (Eds) *Grassland Farming. Balancing Environmental and Economic Demands*, pp 176-178. Grassland Science in Europe 5. Tjele: European Grassland Federation.

VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA-CIUDAD A., PÉREZ-CORONA M.E. Y GARCÍA-CRIADO B. (2000) Nutritional quality of semi-arid grassland in western Spain over a 10-year period: changes in chemical composition of grasses, legumes and forbs. *Grass and Forage Science*, 55, 209-220.

YUN H.Y., LEE Y.W. Y KIM, Y.H. (2013) Stem canker of giant dogwood (*Cornus controversa*) caused by *Fusarium lateritium* in Korea. *Plant Disease*, 97, 1378.

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.