

Los pastos de *Carex brevicollis* hospedan un patógeno del haya

Carex brevicollis grasslands host a potentially severe beech pathogen

I. ZABALGOGEAZCOA¹ / J. GÓMEZ² / S. SÁNCHEZ¹ / J. PEDRO² / R.M. CANALS²

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC), Apartado 257, 37071 Salamanca. i.zabalgo@irnasa.csic.es
²Departamento de Producción Agraria. UPNA, Campus Arrosadia s/n 31006 Pamplona

Resumen: *Carex brevicollis* es la única especie tóxica de su género dentro de la familia *Cyperaceae*. Este trabajo forma parte de una investigación dirigida a averiguar si la toxicidad de esta planta, debida a su contenido en el alcaloide brevicolina, está relacionada con hongos endófitos que podrían inducir, o directamente producir, el alcaloide. Con este fin se realizó un censo de especies de hongos endófitos, capaces de infectar hojas sin producir síntomas visibles, en poblaciones naturales de *C. brevicollis* ubicadas en la sierra de Urbasa (Navarra). Se detectaron y aislaron endófitos en el 43,6 % de los fragmentos de hoja analizados de cada planta. Estas infecciones correspondían principalmente a hongos pertenecientes a 14 grupos taxonómicos. La especie endofítica dominante fue *Biscogniauxia nummularia*, un patógeno y saprofito de haya (*Fagus sylvatica*), que fue aislado del 80% de las plantas analizadas. El hecho de que *B. nummularia* tenga como huésped alternativo un especie pascícola simpátrica con *Fagus sylvatica* puede tener implicaciones importantes en la epidemiología de la enfermedad causada por este hongo en hayedos, particularmente ante un escenario de cambio climático.

Palabras clave: Hongos endófitos, *Biscogniauxia nummularia*, *Fagus sylvatica*, huésped alternativo.

Abstract: *Carex brevicollis* is the only toxic species of this genus in the botanic family of *Cyperaceae*. This work is part of a research line addressed to find out whether the toxicity of this plant, related to its content in the alkaloid brevicoline, is related to the endophytic microbiota hosting the plant. A census of fungal endophytic species infecting leaves of *C. brevicollis* was carried out in the Sierra de Urbasa (Navarra). We detected and isolated endophytes in 43.6% of leaf fragments analyzed from each plant. Most of these infections belonged to 14 taxonomic groups of endophytic fungi. The dominant fungal species was *Biscogniauxia nummularia*, a beech pathogen that also behaves as saprophytic species, isolated from an 80% of the *C. brevicollis* plants. The fact that *B. nummularia* can infect as alternative host an herbaceous species frequent in temperate grasslands may have important implications in the epidemiology of the disease caused by this fungus in beech forests, particularly in a scenario of climatic change.

Key words: Endophytic fungi, *Biscogniauxia nummularia*, *Fagus sylvatica*, alternative host

INTRODUCCIÓN

Carex *brevicollis* es una ciperácea común en los pastos y hayedos de la sierra de Urbasa en Navarra. Esta planta es la única especie tóxica de su género y su consumo por parte del ganado está asociado a intoxicaciones y problemas reproductivos (Ruiz de los Mozos *et al.*, 2008). La toxicidad de esta planta se debe a su contenido en el alcaloide brevicolina (Lazurjevski y Terentjeva 1976). Se conocen varios casos de plantas que son tóxicas debido a su asociación con hongos productores de toxinas (Clay y Schardl, 2002; Kucht *et al.*, 2004), y recientes investigaciones publicadas por este equipo parecen demostrar que existe una asociación directa entre la síntesis de brevicolina en *Carex brevicollis* y la ocurrencia de poblaciones fúngicas en su interior (San Emeterio *et al.*, 2008).

En este trabajo se realiza una identificación y caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a los tejidos aéreos de *C. brevicollis*, realizando una determinación del grado de colonización endofítica en plantas desarrolladas en distintos ambientes (pasto abierto y sotobosque del hayedo) e identificando las principales especies fúngicas mediante caracteres microscópicos y moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estimar el nivel de colonización endofítica de las plantas de pasto abierto y sotobosque se analizaron ejemplares de *C. brevicollis* obtenidos en dos localidades de la Sierra de Urbasa: Udau y Bardoitza. En cada localidad se obtuvieron 20 plantas, 10 en praderas y otras 10 en sotobosque de hayedo. En cada una de estas plantas se estimó el número de fragmentos de hoja infectados por endófitos cultivables en un medio sintético de laboratorio. Fragmentos de cinco mm de cada planta se desinfectaron superficialmente con un tratamiento por inmersión durante 10 minutos en una solución de lejía comercial al 20% (1% cloro activo) seguido de un lavado con agua estéril. De cada planta analizada se depositaron 26 fragmentos en dos placas de Petri de nueve mm con agar de patata y dextrosa (PDA) modificado con 200 mg/ml de cloranfenicol. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente y se observó periódicamente la presencia de micelio emergente de los fragmentos de hoja. Cuando esto sucedía, se retiraba el fragmento de hoja de la placa cortando el agar alrededor y obteniendo un fragmento de micelio para obtener un cultivo del hongo emergente de cada fragmento infectado. Tras tres semanas de seguir este procedimiento se contó el número total de fragmentos de hoja infectados en cada planta y los datos se analizaron para estimar la proporción de fragmentos infectados sobre el total de 26 analizados.

Los cultivos de hongos endófitos obtenidos de todas las plantas se agruparon en morfotipos según características macroscópicas como el color y aspecto de los cultivos en PDA. Una o varias cepas representativas de cada morfotipo se identificaron utilizando caracteres microscópicos y moleculares. El carácter molecular utilizado fue la secuencia de nucleótidos de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2, que se obtuvo tras su amplificación por PCR (Sánchez Márquez *et al.*, 2007). Las secuencias nucleótidas se analizaron buscando otras secuencias similares asignadas a taxones en la base de datos de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Para la asignación de taxones, se aceptó el género y la especie de la base de datos cuando la similitud de secuencias fue superior al 98%. Cuando la similitud estuvo entre 95-97,9% sólo se aceptó el género. Para similitudes inferiores al 95%, los hongos se consideraron no identificados.

Finalmente, se realizaron también identificaciones de estromas de hongos aislados de ramas de hayedo. Se colocó una porción de estroma de aproximadamente 1 cm² sobre una hoja de papel de filtro húmedo en una placa Petri de nueve cm, las ascosporas dispersadas por los peritecios a la tapa de la placa se transfirieron a una placa de PDA y de la germinación de éstas se obtuvieron varios cultivos, uno de los cuales fue posteriormente identificado utilizando caracteres moleculares y morfológicos (Petrini y Petrini, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colonización endofítica. Un promedio del 36,0% de los fragmentos de cada planta de Udau estaba colonizado por endófitos, y en Bardoitza el 51,2%. La diferencia en la colonización endofítica entre las plantas de ambas localidades fue estadísticamente significativa ($F_{1,36} = 6,775$, $p = 0,013$), así como el efecto del hábitat ($F_{1,36} = 7,843$, $p = 0,008$), siendo el grado de colonización mayor en las plantas de *C. brevicollis* creciendo en el pasto (51,6%) que en el sotobosque (35,3%) en ambas localidades (fig. 1). Una mayor incidencia de endófitos en plantas de pasto puede estar relacionada con una mayor presión de pastoreo en estas zonas respecto al sotobosque. Las defoliaciones causadas por los herbívoros pueden favorecer la infección de hongos transmitidos horizontalmente, como parece ser el caso de la mayoría de los endófitos no sistémicos (Sánchez *et al.*, 2011). Es posible que la colonización endofítica en las plantas estudiadas sea mayor de lo que se ha estimado, debido a la existencia de especies de hongos no cultivables en el medio sintético utilizado.

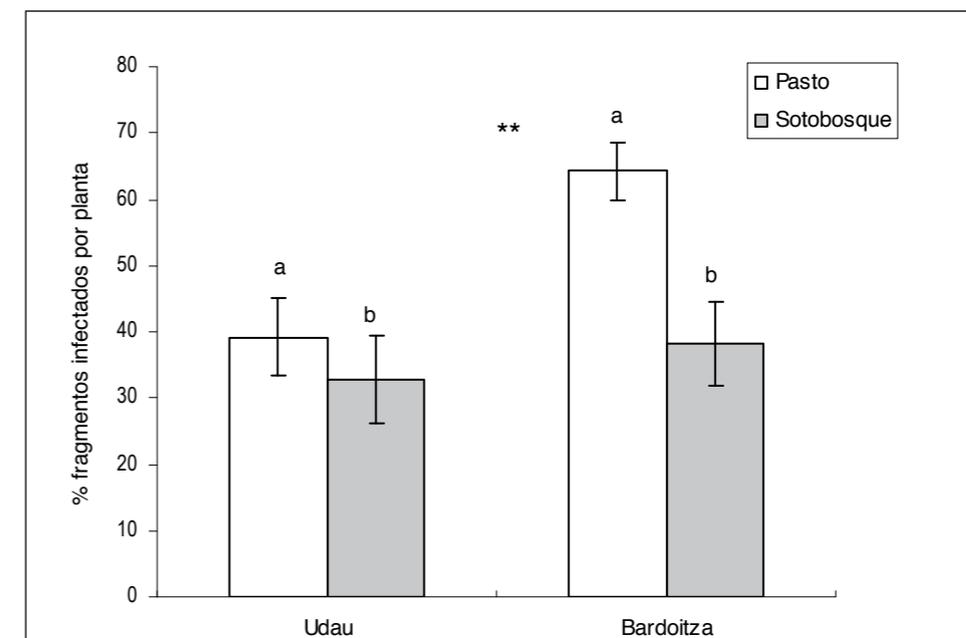


Figura 1. Colonización endofítica (media ± error estándar) en plantas de *Carex brevicollis* de pasto abierto (barras blancas) y de sotobosque de hayedo (barras grises) ($F_{1,36} = 6,775$, $p = 0,013$) en dos localidades de la sierra de Urbasa, Udau y Bardoitza ($F_{1,36} = 7,843$, $p = 0,008$). La estimación se basa en el promedio de fragmentos de hojas infectadas en cada planta.

Diversidad de especies fúngicas. A partir de las muestras de hojas de las 40 plantas analizadas se obtuvieron 347 aislados de hongos endofíticos. Estos aislados se agruparon en 104 morfotipos diferentes, 19 de estos morfotipos contenían más de un aislado y 263 aislados fueron clasificados dentro de estos morfotipos plurales. Cada uno de

los 84 morfotipos restantes estaba compuesto por un único aislado. Utilizando caracteres moleculares sólo se identificaron los morfotipos plurales. Con esta información y datos morfológicos de los cultivos que esporularon en PDA, los 19 morfotipos plurales se agruparon en 14 grupos taxonómicos (tabla 1), lo que indica que la clasificación basada en morfotipos sobreestima el número real de taxones. La mayor parte de las especies identificadas fueron ascomicetos, como es común en la micobiota endofítica de otras especies (Sánchez *et al.*, 2011).

La especie endofítica más abundante fue *Biscogniauxia nummularia*, de la que se obtuvieron 140 aislados, siendo el número de aislados obtenidos en pasto y sotobosque muy similares en cada localidad (tabla 1). *B. nummularia* es un miembro de las *Xylariaceae*, familia que incluye especies con diversos estilos de vida como saprofitos, patógenos o endófitos. Esta especie forma estromas periteciales de colores oscuros en las ramas y troncos del haya europea (*Fagus sylvatica*) y, aunque los estromas pueden aparecer en madera muerta, el hongo también es un patógeno que produce chancros en ramas y troncos de árboles en el sur de Italia e Inglaterra (Hendry *et al.*, 1998; Granatal y Sidoti, 2004).

Tabla 1. Taxones de hongos endofíticos identificados en plantas de *Carex brevicollis*. Se indica el número de aislados obtenidos y de plantas infectadas (paréntesis) en pastos (P) y sotobosques de hayedos (H) en dos localidades, Udaú (U) y Bardoitza (B). Sólo se muestran las especies endofíticas representadas por más de un aislado.

Taxón	Localidad y hábitat				TOTAL
	UP	UH	BP	BH	
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	17(6)	17(7)	52(10)	54(9)	140
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	1(1)	1(1)	4(4)	5(2)	11
<i>Colletotrichum sp.</i>	5(4)	2(1)	14(6)	-	21
<i>Alternaria spp.</i>	-	-	9(3)	-	9
<i>Cladosporium sp.</i>	3(2)	2(2)	1(1)	-	6
<i>Neofabraea alba</i>	2(1)	-	3(3)	-	5
<i>Penicillium sp.</i>	1(1)	1(1)	1(1)	2(2)	5
<i>Gibberella sp.</i>	1(4)	-	-	-	4
Ascomiceto sin identificar 1	11(1)	1(1)	2(2)	14(9)	28
Ascomiceto sin identificar 2	6(1)	-	-	5(1)	11
Ascomiceto sin identificar 3	1(1)	-	2(1)	-	3
Ascomiceto sin identificar 4	-	-	-	2(1)	2
Ascomiceto sin identificar 5	-	2(1)	-	-	2
Levaduras sin identificar	6(3)	7(4)	3(2)	-	16

***Biscogniauxia nummularia* en hayas.** Los resultados de este estudio nos llevaron, posteriormente, a muestrear en la misma zona de estudio, buscando árboles de haya afectados por *B. nummularia*. Únicamente se encontraron estromas oscuros en ramas muertas o debilitadas de haya, que fueron analizados por microscopía, observándose peritecios con ascoporas ovaladas de color marrón, típicas de *B. nummularia*. Los cultivos obtenidos a partir de ascoporas presentaron en PDA un color marrón claro y un aspecto muy similar a los obtenidos de *C. brevicollis*. Las secuencias nucleotídicas de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de cultivos de *C. brevicollis* y de haya fueron idénticas y con alta homología con un aislado tipo de *B. nummularia* (fig. 2). Estos resultados muestran que ambos aislados pertenecen a la misma especie y que, por tanto, las ascoporas lanzadas al exterior por los estromas de *B. nummularia* existentes en hayas podrían penetrar e infectar de manera asintomática *C. brevicollis*. Todavía desconocemos si *B. nummularia* puede producir esporas de algún tipo en plantas de *C. brevicollis*. Si así fuese, esta planta herbácea sería un reservorio de inóculo de un grave patógeno del haya.

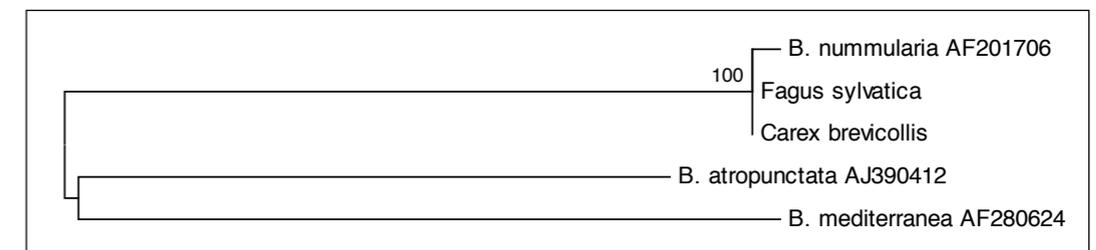


Figura 2. Filograma basado en el alineamiento de secuencias de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de aislados de *Biscogniauxia nummularia* obtenidos de muestras de *Carex brevicollis* y *Fagus sylvatica*. La secuencia AF201706 corresponde a la cepa ATCC 36666 de *B. nummularia*, obtenida de *Fagus sp.* Prueba Bootstrap con 1000 réplicas.

CONCLUSIONES

Un censo de la micobiota endofítica de hojas de *C. brevicollis* en la sierra de Urbasa ha mostrado que hay unas 75 especies distintas de hongos, principalmente ascomicetos, que infectan de manera asintomática las hojas de esta planta herbácea. La densidad de endófitos en hoja fue mayor en plantas de pasto que en plantas de sotobosque, lo que podría deberse a la mayor cantidad de daños por pastoreo en plantas de pasto, lo que facilitaría vías de entrada para el inóculo fúngico. La especie endofítica más común fue *Biscogniauxia nummularia*, presente en el 80% de las plantas analizadas. Esta especie es un patógeno del haya, cuya severidad de síntomas causados parece estar directamente relacionada con factores como la sequía y las altas temperaturas (Hendry *et al.*, 2002; Granatal y Sidoti, 2004), factores que incrementarían ante un escenario de cambio climático. Por lo tanto en este trabajo se describe una nueva especie huésped de *B. nummularia* que

resulta ser simpátrica de haya. En el caso de que el hongo pudiera esporular en *Carex*, esta planta sería un reservorio de inóculo del patógeno y podría tener un papel importante en la epidemiología de la enfermedad causada en haya por *B. nummularia*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLAY K. Y SCHARDL C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, **160**, 99-127.
- GRANATA G.Y SIDOTI A. (2004). *Biscogniauxia nummularia*: pathogenic agent of a beech decline. *Forest Pathology*, **34**, 363-367.
- HENDRY S.J., BODDY L. Y LONSDALE D. (2002) Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist*, **155**, 449-460.
- HENDRY S.J., LONSDALE D. Y BODDY L. (1998) Strip-cankering of beech (*Fagus sylvatica*): pathology and distribution of symptomatic trees. *New Phytologist*, **140**, 549-565.
- KUCHT S., GROß J., HUSSEIN Y., GROTHE T., KELLER U., BASAR S., KÖNIG W., STEINER U. Y LEISTNER E. (2004) Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) with fungicides. *Planta*, **219**, 619-625.
- LAZURJEVSKI G. Y TERENTJEVA I (1976) 1,4-substituted betacarbolines from *Carex brevicollis*. *Heterocycles*, **4**, 1783-1816
- PETRINI L.E. Y PETRINI O. (1985). Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia*, **38**, 216-234.
- RUIZ DE LOS MOZOS I., OREJA A., SAN EMETERIO L., ZABALGOGEAZCOA I. Y CANALS R.M. (2008) Troublesome plants in species-rich grasslands: can we maintain the toxic plant *Carex brevicollis* and alleviate its risk to livestock? *Grassland Science in Europe*, **13**, 66-68
- SAN EMETERIO L., RUIZ DE LOS MOZOS I., OREJA A. ZABALGOGEAZCOA I. Y CANALS R. (2008) Origen de la toxicidad en *Carex brevicollis*, una especie frecuente en pastos montanos templados. *Pastos, clave en la gestión de los territorios: integrando disciplinas*. pp. 255-260. Córdoba.
- SÁNCHEZ S., BILLS G.F., HERRERO N. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2011) Non Systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology* doi:10.1016/j.funeco.2010.12.001.(en prensa)
- SÁNCHEZ S., BILLS G. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2007) The endophytic mycobiota of *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, **27**, 171-195.

Respuesta del maíz (*Zea mays*) en suelos contaminados por metales pesados después de crecer una comunidad de pasto

Response of corn (*Zea mays*) to polluted soils by heavy metals after the growth of a grass community

J. PASTOR¹ / M. J. GUTIÉRREZ-GINÉS² / A. J. HERNÁNDEZ²

¹Departamento de Biología Ambiental, MNCN, CSIC. C/Serrano 115 bis. 28006 Madrid (España). jpastor@cma.csic.es

²Departamento de Ecología. Edificio de Ciencias. Universidad de Alcalá. Ctra. Madrid-Barcelona km 33,6. 28871 Alcalá de Henares, Madrid (España). mjesus.gutierrezg@uah.es; anaj.hernandez@uah.es

Resumen: En la actualidad existen comunidades de pasto afectadas por un conjunto de metales pesados existentes en la capa superficial de los suelos como consecuencia de antiguas explotaciones mineras abandonadas. Algunas de ellas están siendo sustituidas por cultivos forrajeros. El estudio llevado a cabo en este trabajo trata de conocer la respuesta del maíz a este tipo de situaciones, mediante un bioensayo realizado en mesocosmos en condiciones controladas durante 3 meses, con suelos procedentes del tipo de sistemas aludidos. El maíz fue sembrado después de dos años en que se cosecharon a ras del suelo las plantas de pasto existentes en el banco de semillas de los mesocosmos utilizados. Los resultados obtenidos del análisis químico de parte aérea y radicular de plantas de maíz crecidas en un total de 30 suelos con más de un metal pesado por encima de los niveles admitidos (22 suelos ácidos y 8 básicos), y con 3 réplicas de cada uno de ellos, muestran la capacidad de extracción que el maíz tiene de los metales todavía presentes en los mismos. Se valoran los resultados como especie acumuladora de Al, Mn, Zn, As y Cd (altas concentraciones en parte aérea), por las consecuencias que tiene esta especie utilizada como forrajera si se cultiva en emplazamientos con suelos contaminados por metales.

Palabras clave: bioacumulación, fitoestabilización, salud animal.

Abstract: Nowadays some grassland communities are affected by a set of heavy metals from the topsoil layer. These are consequences of mining operations that were abandoned long time ago. Some of them are being replaced by forage crops. The study presented here attempts to know the response of corn crop to those situations, by means of a bioassay carried out for 3 months in mesocosms under controlled conditions, with soils from these mentioned type of sites. Grass from seedbank grown in mesocosms was harvested for two years before corn was sown. The results of chemical analysis of shoot and root of corn plants grown in a total of 30 soils with more than a heavy metal above accepted levels (22 acidic and 8 basic soils), and 3 replicates of each, showed the extraction capacity of this plant of metals still present in them. Results were assessed as an accumulator species of Al, Mn, Zn, As and Cd (high concentrations in shoots), due to the consequences of the use of this species as forage when is grown on sites with soils polluted by metals.

Key words: bioaccumulation, phytostabilization, animal health.

INTRODUCCIÓN

El reciente informe de la FAO 2010-11 sobre “El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura”, alude a que una cuarta parte de las tierras del planeta presenta un elevado estado de degradación, siendo una de sus principales causas la contaminación por metales pesados procedentes de la minería. El impacto que estas actividades producen sobre ecosistemas, paisajes y poblaciones es evidente (Pastor y Hernández, 2009; Hernández y Pastor, 2011). Además, la pobreza en países en desarrollo lleva a la gente a cultivar en lugares no apropiados. Este es el caso del cultivo de maíz para alimentación humana y del ganado (Hernández