

EL HONGO ENDÓFITO DE LA FESTUCA, *Acremonium coenophialum* MORGAN-JONES & GAMS, Y SU INCIDENCIA EN EL SUR DE CHILE¹

The tall fescue endophyte *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones and Gams, and its incidence in the South of Chile

Rafael Galdames G.²

SUMMARY

The presence of the endophyte fungi *Acremonium coenophialum* in plants and seed of tall fescue (*Festuca arundinacea*) was evaluated through microscopic analysis. Data collected from seeds lots of the varieties K-31, Fawn and Manade, showed that only 'K-31' had high infection levels (71-90%). Furthermore, 15 swards located in the IX Region of Chile (Curacautín, Victoria, Temuco and Gorbea) were studied, founded out positive plants in 12 of them with an infestation level ranging from 40 to 100%. Since 'K-31', has been the most sown variety for a long time, it is much probable that the endophyte is present in the majority of tall fescue pastures in Chile.

Finally, the *in vitro* isolation confirmed that the tall fescue endophyte present in southern Chile is *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones and Gams, which represents the first report in this country.

Key words: endophyte, *Acremonium coenophialum*, tall fescue.

INTRODUCCIÓN

El hongo endófito *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones y Gams (Morgan-Jones y Gams, 1982), inicialmente descrito como *Sphaciela typhina* (Pers.) Sac. (Telomorfo *Epichloë typhina* (Fr.) Tul.) y su asociación con la Festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) fue sugerida (Bacon *et al.*, 1977) y posteriormente demostrada como la causa de intoxicaciones en animales que consumen forraje infectado con este hongo, las que se traducen en una menor ganancia de peso, junto a la manifestación de ciertos síntomas clínicos (Hoveland *et al.*, 1980 y 1983; Pedersen *et al.*, 1986; Read y Camp, 1986).

En esta asociación, el hongo establece una relación biotrófica con la planta (Siegel, Latch y Johnson, 1987) de mutuo beneficio, la cual ha sido definida como una simbiosis de tipo mutualista (Bacon y Siegel, 1988). Donde el hongo se

nutre, protege, reproduce y disemina, en cambio, la planta aumenta su crecimiento, soporta mejor las condiciones de estrés ambiental y la herbivoría de insectos y mamíferos (Siegel *et al.*, 1985 y 1987).

En EE.UU. un alto porcentaje de las praderas de festuca son portadoras del hongo endófito (Siegel *et al.*, 1985). Al mismo tiempo se ha determinado que la variedad K-31 presenta los mayores niveles del hongo, a pesar que existen lotes de ésta y otras variedades libres de infección (Shelby y Dalrymple, 1987). En Chile, sólo a partir de 1989, se menciona la existencia de micelio similar al de *Acremonium* en el interior de la semilla de festuca; y se logra aislar *in vitro* dos tipos de *Acremonium* en otras forrajeras (Piontelli y Toro 1989). El presente trabajo permite confirmar la presencia de *Acremonium coenophialum*, y estimar su incidencia en festuca (*Festuca arundinacea*), en el sur de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento de muestreo

Praderas: Desde diciembre de 1989 hasta septiembre de 1990 se efectuó un muestreo de

¹Recepción de originales: 28 de julio de 1994.

Parte del trabajo presentado en la XV Reunión de la Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Temuco, Chile, 2 al 4 de octubre de 1990 y al XLII Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile, Chillán, Chile, 11 al 15 de noviembre de 1991.

²Centro Regional de Investigación Carillanca (INIA), Casilla 58-D, Temuco, Chile.

plantas en 15 praderas de festuca ubicadas en cuatro localidades (Curacautín, Victoria, Temuco y Gorbea) de la IX Región. Para cada sitio seleccionado se tomaron 20 tallos, cada uno de los cuales representaba plantas distribuidas al azar en el campo. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas y refrigeradas a 5 °C. El total de tallos muestreados por pradera fueron analizados en laboratorio dentro de las 48 horas.

Semillas: Durante la temporada 1990 y 1991, se colectaron muestras que representaban lotes o partidas de semillas de las variedades K-31, Manade y Fawn, producidas por distintos semilleros comerciales de la VIII y IX regiones. Se analizó un total de 100 semillas por muestra.

Detección del hongo

La presencia del hongo endófito se determinó a partir de análisis microscópicos, de acuerdo a la técnica descrita por Clark (Clark, White y Patterson, 1983), usando como variante principal el empleo de la tinción de rosa de bengala (Saha, Jackson y Johnson-Cicalese, 1988). En plantas, la muestra se preparó a partir de la zona basal de la vaina de cada macollo, para lo cual se cortó longitudinalmente una sección de la vaina de unos 5 mm de ancho. Posteriormente, con un bisturí, se eliminó la epidermis interna y se colocó la sección de tejido en un portaobjeto, exponiendo la epidermis externa hacia abajo. Inmediatamente después se aplicó una gota de tinción (solución estándar de rosa de bengala 0,5% (p/v) disuelta en solución acuosa de alcohol etílico 5%), la que se mantuvo a temperatura ambiente por 1 minuto y se observó al microscopio.

En semillas, se sometió alrededor de 5 gramos por muestra a digestión en NaOH (5%) por 16 horas, al cabo de lo cual se lavaron directamente con agua para eliminar el excedente de NaOH. Cada semilla, una vez desglumada, se colocó sobre un portaobjeto y se depositó sobre ella una gota de solución acuosa de rosa de bengala 0,25% (p/v). Transcurrido alrededor de 1 minuto, la semilla se presionó con un cubreobjeto y observó al microscopio.

Se consideraron positivas o portadoras del hongo, aquellas plantas que presentaban en la vaina de las hojas, hifas de crecimiento intercelular, raramente ramificadas, septadas, de aspecto enroscado y que recorrían en forma paralela las células del tejido parenquimático. En la semilla, hifas de similares características morfológicas, pero con abundante micelio entrelazado asociado a las células de la capa de aleurona (figuras 1 y 2).



FIGURA 1. Hifas del hongo endófito *Acremonium coenophialum* en la vaina de una hoja de festuca (400X). Muestra teñida con rosa de bengala.

FIGURE 1. Hyphae of *Acremonium coenophialum* in a leaf sheath of tall fescue stained with rose bengal (400X).

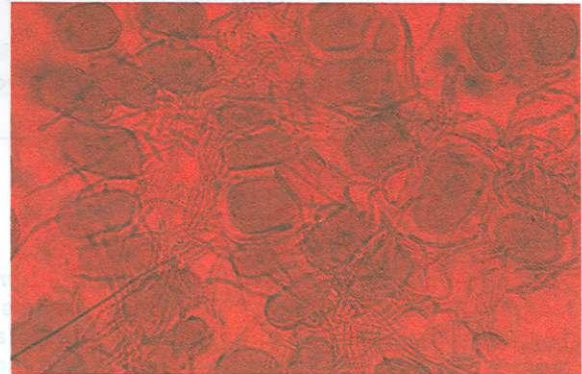


FIGURA 2. Micelio de *Acremonium coenophialum* asociado a las células de la capa de aleurona de semilla de festuca (400X).

FIGURE 2. Mycelium of *Acremonium coenophialum* associated to aleurone cells layer of tall fescue seed (400X).

Aislamiento

Se utilizó semilla cosechada tres meses antes de hacer el aislamiento, la cual de acuerdo a análisis previos presentó altos niveles de infestación por el hongo. La semilla una vez desglumada fue sometida a un tratamiento con ácido sulfúrico (50% v/v) durante 20 minutos, posteriormente fue lavada con agua destilada estéril, enseguida se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y nuevamente se lavó en agua estéril, para finalmente ser transferida asépticamente a medio agar papa-dextrosa (APD). La incubación se realizó bajo condiciones de oscuridad a 21 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la técnica de detección empleada, de las 15 praderas examinadas, en 12 se detectaron plantas positivas o portadoras del hongo,

con niveles de infestación que fluctuaron entre 40 y 100% (Cuadro 1). Del análisis de la semilla sólo la variedad K-31 fue portadora del hongo y en niveles de infestación que fluctuaron entre 71% y 90%. 'Fawn' y 'Manade' no mostraron signos del hongo (Cuadro 2).

CUADRO 1. Porcentaje de plantas infectadas con endófito en 15 praderas examinadas provenientes de cuatro localidades de la IX Región

TABLE 1. Percentage of endophyte-infected plants in 15 pastures from four localities of the IX Region, of Chile

Localidad	Número de muestras examinadas ¹	Infestación de endófito, %	
		Promedio	Rango
Curacautín	1	70,0	-
Victoria	10	73,5	0 - 100
Temuco	2	65,0	40 - 90
Gorbea	2	25,0	0 - 50

¹En 20 plantas analizadas por pradera examinada.

Los altos niveles de incidencia del endófito en praderas son consecuentes con la información obtenida en semillas, porque al menos hasta 1990, la variedad K-31 seguía siendo la más empleada en el país. Además, los resultados concuerdan con lo indicado por Águila (1979), quien señala que probablemente la festuca llegó a Chile desde EE.UU. En ese país, se ha estimado que sobre el 90% de las praderas contienen festuca con el hongo endófito y con promedios de infestación en plantas y semilla de 58 y 54%, respectivamente (Siegel *et al.*, 1985). Al mismo tiempo se ha determinado que la variedad con mayores niveles de hongo correspondía a K-31 (Shelby y Dalrymple, 1987). En contraste con lo anterior, Latch, Porter y Tyler (1987), indican que las variedades o líneas comerciales de origen europeo, en su mayoría, están libres de infección, a pesar de que se ha sugerido a Europa como lugar de origen del endófito (Siegel *et al.*, 1985).

Características del aislamiento: colonia blanca, compacta, de aspecto aterciopelado, de lento crecimiento (9 mm/20 días), micelio aéreo ausente a escaso. Conidias hialinas, no septadas, elipsoides de 4 a 6 μ de largo, producidas en filidies simples de 13,6 a 18 μ de largo, características similares a lo descrito por Morgan-Jones y Gams (1982). La identificación de *A. coenophialum* fue confirmada por el CMI, siendo registrada con el N° 346.965, lo cual representa el primer antecedente de esta especie en *Festuca arundinacea* en Chile.

CUADRO 2. Porcentaje de semillas infectadas con endófito en diferentes lotes de variedades comerciales de *Festuca arundinacea*

TABLE 2. Percentage of endophyte-infected seeds from commercial lots of *Festuca arundinacea*

Variedad	País de origen	Procedencia (Región)	Año	Lotes examinados	Endófito ¹ , %	
					Promedio	Rango
K-31	EE.UU.	VIII	1990	1	82,0	-
		VIII	1991	5	75,4	71 - 80
		IX	1991	1	90,0	-
Manade	Francia	VIII	1990	2	0,0	-
		VIII	1991	2	0,0	-
Fawn	EE.UU.	VIII	1990	2	0,0	-
		VIII	1991	2	0,0	-

¹Promedio de 100 semillas analizadas por lote.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a la técnica empleada en la detección del hongo endófito, los resultados permiten establecer que la mayoría de las

praderas de festuca en la IX Región están infectadas.

- La semilla de la variedad K-31 fue la única portadora del hongo. Considerando que de las

variedades evaluadas ha sido, por muchos años, la más difundida en el país, se presume que el endófito estaría diseminado en la mayoría de las praderas que contengan festuca en Chile.

- El aislamiento y cultivo *in vitro* permitió confirmar que el hongo endófito corresponde a *Acremonium coenophialum*, representando el primer antecedente de esta especie para festuca en Chile.

RESUMEN

A través de exámenes microscópicos, se evaluó la presencia del hongo endófito *Acremonium coenophialum*, en semillas y plantas de festuca (*Festuca arundinacea*). Los resultados en semillas indicaron, al evaluar diferentes lotes de las variedades K-31, Fawn y Manade (VIII y IX Región), que sólo 'K-31' es portadora del hongo y en altos niveles (71-90%). Al examinar plantas provenientes de 15 praderas localizadas en la IX Región, en 12 de ellas se detectaron plantas positivas y con porcentajes de infestación que fluctuaron entre 40 y 100%.

Dado que la variedad K-31 presentó altos niveles de infestación en la semilla, y ha sido por muchos años la más difundida en el país, se presume que este hongo endófito estaría presente en la mayoría de las praderas que contengan festuca en Chile.

Finalmente, este estudio, a partir del aislamiento y cultivo *in vitro* del hongo, permite confirmar que el hongo endófito corresponde a *Acremonium coenophialum*.

Palabras claves: hongo endófito, *Acremonium coenophialum*, festuca.

LITERATURA CITADA

- ÁGUILA, H. 1979. Pastos y empastadas. Cuarta Edición. Editorial Universitaria. Chile. 319 p.
- BACON, C.W., PORTER, J.K., ROBBINS, J.D., and LUTTRELL, E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. Applied Environment Microbiology 34: 576-581.
- BACON, C.W., and SIEGEL, M.R. 1988. Endophyte parasitism of tall fescue. Journal Production Agriculture 1: 45-55.
- CLARK, E.M., WHITE, J.F., and PATTERSON, R.M. 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium* in tall fescue and methods of *in vitro* culture of the fungus. Journal of Microbiological Methods 1: 149-155.
- HOVELAND, C.S., HAALAND, R.L., KING, C.C. Jr., ANTHONY, W.B., McGUIRE, J.A., SMITH, L.A., GRIMES, H.W., and HOLLIMAN, J.L. 1980. Association of *Epichloë typhina* fungus and steer performance on tall fescue pasture. Agronomy Journal 72: 1.064-1.065.
- HOVELAND, C.S., SCHMIDT, S.P., KING, C.C., Jr. ODOM, J.W., CLARK, E.M., McGUIRE, J.A., SMITH, L.A., GRIMES, H.W., and HOLLOWAN, J.L. 1983. Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pasture. Agronomy Journal 75: 821-824.
- LATCH, G.C.M., PORTER, L.R. and TYLER, B.F. 1987. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. Annual Applied Biology 111: 59-64.
- MORGAN-JONES, G., and GAMS, W. 1982. Notes on Hypomyces, XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. Mycotaxon 15: 311-318.
- PEDERSEN, J.F., McGUIRE, J.A., SCHMIDT, S.P., KING, C.C., Jr.; HOVELAND, C.S. and SMITH, L.A. 1986. Steer performance as affected by tall fescue cultivar and level of *Acremonium coenophialum*. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 14: 307-312.
- PIONTELLI, E. y TORO, M.A. 1989. Asociación de endófitos fúngicos-pastos forrajeros en suelos Chilenos. Estudio preliminar. I. Boletín Micológico 4(2): 101-107.
- READ, J.C. and CAMP, B.J. 1986. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance toxicity and stand maintenance. Agronomy Journal 78: 848-850.
- SAHA, D.C., JACKKSON, M.A. and JOHNSON-CICALESE, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophyte fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78(2): 237-239.
- SHELBY, R.A. and DALRYMPLE, W. 1987. Incidence and distribution of the tall fescue endophyte in the United States. Plant Disease. 71(9): 783-786.
- SIEGEL, M.R., LATCH, G.C. and JOHNSON, M.C. 1985. *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Significance and control. Plant Disease 69(2): 179-183.
- SIEGEL, M.R., LATCH, G.C. and JOHNSON, M.C. 1987. Fungal endophytes of grasses. Annual Review of Phytopathology 25: 293- 315.