



HONGOS ENDÓFITOS *Epichloë* EN PASTOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Beatriz R. Vázquez de Aldana*, Milton-Carlos Soto-Barajas, Iñigo Zabalgozcoa

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC); Cordel de Merinas 40-52; 37008 Salamanca (España)

Epichloë ENDOPHYTES IN PASTURES OF THE IBERIAN PENINSULA

Historial del artículo:

Recibido: 22/12/15

Revisado: 15/03/16

Aceptado: 04/04/16

Disponible online: 20/04/16

* Autor para correspondencia:

beatriz.dealdana@irnsa.csic.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Palabras clave:

Gramíneas, alcaloides, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, simbiosis.

RESUMEN

Los hongos endofíticos del género *Epichloë* infectan de forma asintomática numerosas especies de gramíneas. Las plantas infectadas por estos hongos contienen alcaloides tóxicos para herbívoros, y además son más resistentes a diversos factores de estrés biótico y abiótico. Este trabajo es una revisión sobre la incidencia de endófitos *Epichloë* y producción de alcaloides en gramíneas de pastos de la península Ibérica. Además, se consideran los principales efectos que produce *Epichloë* en *Festuca rubra* como gramínea hospedadora (incremento del contenido de nutrientes, efecto en la germinación, efecto en el potencial alelopático y resistencia a patógenos).

Keywords:

Grasses, alkaloids, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, symbiosis.

ABSTRACT

Epichloë fungal endophytes infect asymptotically several grass species. Infected plants produce alkaloids toxic to herbivores and are more resistant to several biotic and abiotic stress factors. In this paper, we review the incidence of *Epichloë* endophytes in grasses from pastures of the Iberian Peninsula and their alkaloid contents. In addition, we address the main effects of *Epichloë* in the host grass *Festuca rubra* (increase in nutrient content, effect on germination, effect on allelopathic potential and pathogen resistance).

INTRODUCCIÓN

En su hábitat natural, las plantas crecen asociadas a un complejo microbioma compuesto principalmente por hongos y bacterias que viven en el interior y exterior de los tejidos vegetales. Los microorganismos patógenos son los mejor conocidos dentro de este grupo, debido a los síntomas que producen en las plantas y al perjuicio que suponen en la agricultura. Sin embargo, los patógenos representan solo un pequeño subconjunto dentro de la totalidad de especies

fúngicas y bacterianas asociadas a plantas (Sánchez Márquez *et al.*, 2012). Otro grupo de microorganismos asociados a plantas que está adquiriendo gran relevancia son los endófitos, hongos y bacterias capaces de infectar el tejido interno de plantas sin causar síntomas aparentes (Hyde y Soyong, 2008; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011). Se han detectado hongos endófitos en todas las especies vegetales que han sido analizadas (Rodríguez *et al.*, 2009). La diversidad de estos hongos es muy elevada; por ejemplo, en la gramínea *Holcus lanatus* L. se han llegado a identificar 134 especies diferentes (Sanchez Márquez *et al.*, 2010).

A pesar de la carencia de síntomas visibles en las plantas, algunas especies endófitas son beneficiosas para sus hospedadores. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el de los hongos *Epichloë*, que infectan varias especies de gramíneas de interés forrajero colonizando el espacio intercelular de hojas, tallos y semillas (Clay y Schardl, 2002; Leuchtmann *et al.*, 2014). Las plantas infectadas por endófitos *Epichloë* contienen alcaloides tóxicos para herbívoros (Bush *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 2000; Scharld *et al.*, 2013a). Además, la asociación con *Epichloë* puede alterar el estado nutricional de la planta y mejorar su competitividad con otras especies vegetales (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b), así como aumentar la resistencia a factores de estrés abiótico como la sequía o la presencia de metales pesados (Malinowski y Belesky, 2000b; Clay y Schardl, 2002). Debido a los beneficios que estos hongos proporcionan a la planta huésped hay un interés creciente en la utilización de endófitos para la mejora de gramíneas, tanto forrajeras como de uso en céspedes (Oliveira, 1996; Johnson *et al.*, 2013).

El objetivo general de este trabajo de revisión es aportar conocimientos sobre hongos endófitos *Epichloë* que establecen asociaciones con gramíneas, concretamente (1) sobre aspectos generales y características de la asociación entre gramíneas y *Epichloë*, (2) la incidencia de infección por *Epichloë* y contenido de alcaloides en pastos de la península Ibérica y (3) los principales efectos que produce *Epichloë* en *Festuca rubra* como especie hospedadora.

CICLO DE VIDA DE ENDÓFITOS *Epichloë*

La clasificación actual agrupa dentro del género *Epichloë* (Ascomycota) a 34 especies y varias subespecies, incluidos algunos taxones anteriormente clasificados dentro del género *Neotyphodium* (Leuchtmann *et al.*, 2014). Las hifas de *Epichloë* colonizan el espacio intercelular de hojas y tallos, y la planta no muestra ningún síntoma de infección durante su fase vegetativa (Figura 1). Al comenzar la fase reproductiva de la planta, el hongo coloniza el tallo y posteriormente los óvulos, dando lugar a semillas infectadas por el endófito. Resulta así un tipo de transmisión clonal y asexual en la que el mismo genotipo fúngico que infecta a una planta se transmite verticalmente a sus semillas (Figura 2). Las plantas infectadas de esta manera son totalmente asintomáticas durante todo su ciclo de vida. Este tipo de transmisión es muy efectivo, casi todas las semillas que produce una planta están infectadas por el hongo, y al germinar darán lugar a nuevas plantas infectadas. Algunas especies de *Epichloë* como *Epichloë coenophiala* (Morgan-Jones y Gams) Bacon y Schardl (= *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones y Gams) Glenn, Bacon y Hanlin) o *Epichloë festucae* var. *lolii* (Latch, Chr. y Samuels) Bacon y Schardl (= *Neotyphodium lolii* (Latch, Chr. y Samuels) son asexuales y solamente se transmiten de esta manera.

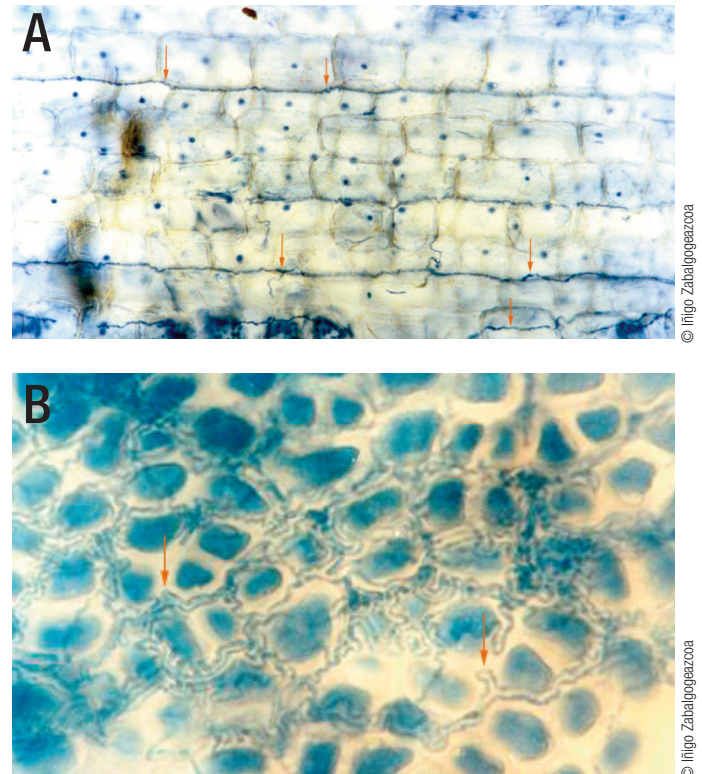


FIGURA 1. Hifas de *Epichloë coenophiala* en vaina foliar (A) y en la capa de aleurona de una semilla (B) de *Lolium arundinaceum* (*Festuca arundinacea*).
FIGURE 1. *Epichloë coenophiala* hyphae in a leaf sheath (A) and in the aleurone layer of a seed (B) of *Lolium arundinaceum* (*Festuca arundinacea*).

La reproducción sexual de ciertas especies del género *Epichloë* se sincroniza con el desarrollo de las inflorescencias de la gramínea huésped (Figura 2). Al iniciarse este estado fisiológico, el hongo empieza a desarrollar una estructura de micelio conocida como estroma que envuelve la inflorescencia inmadura (Figura 3), causando la esterilización del tallo reproductivo (Clay y Schardl, 2002). Algunas especies como *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. y Tul. forman estromas en la mayoría de los tallos reproductivos de las plantas infectadas. Tras la fertilización del estroma por una espora asexual compatible, se

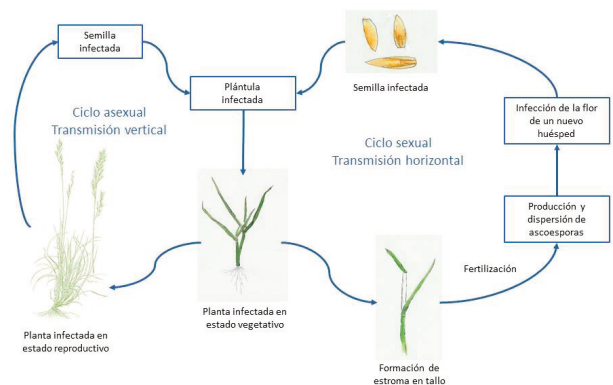


FIGURA 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. El ciclo asexual es el predominante.

FIGURE 2. Diagram of the life cycle of *Epichloë*. The asexual cycle is the predominant.

desarrollan fructificaciones que producen esporas capaces de infectar por vía externa los óvulos de otras plantas, dando lugar a semillas infectadas. En el proceso de fertilización de estromas toman parte moscas simbióticas que actúan como vectores de esporas asexuales involucradas en la fertilización (White y Bultman, 1987).



FIGURA 3. Estromas de *Epichloë* alrededor de tallos reproductivos de plantas de *Lolium perenne*. El estroma cilíndrico esteriliza el tallo e impide la emergencia de la inflorescencia.

FIGURE 3. *Epichloë* stromata around the reproductive stalks in *Lolium perenne* plants. The cylindrical stromata sterilizes the stem and prevents the emergence of the inflorescence.

INCIDENCIA DE *Epichloë* EN GRAMINEAS DE PASTOS

En un censo para la detección de endófitos *Epichloë* en 50 especies de gramíneas de pastos semiáridos de la provincia de Salamanca, se identificaron 12 especies de gramíneas huéspedes de endófitos *Epichloë* (Zabalgoeazcoa et al., 2003) (Tabla 1). Una proporción similar de especies huéspedes se ha observado en otros países (White y Baldwin, 1992; Leyronas

y Raynal, 2001; Nan y Li, 2001). La presencia de *Epichloë* es especialmente frecuente en gramíneas de los géneros *Festuca* y *Lolium* (Leyronas y Raynal, 2001). Las infecciones asintomáticas de *Epichloë* son comunes en *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbyshire (= *Festuca arundinacea* Scherb.), *Festuca rubra* L. y *Lolium perenne* L. De estas especies se han encontrado plantas infectadas en casi todas las localidades muestreadas, con elevadas tasas de infección, por ejemplo: 67% de las plantas de *Lolium arundinaceum*, (Zabalgoeazcoa et al., 2003). En una colección de semillas de esta especie procedentes del norte de España, se observaron endófitos *Epichloë* en el 90% de las localidades de origen de las muestras, con una incidencia del 7 al 100% (Oliveira et al., 1997). En especies como *Dactylis glomerata* las infecciones sintomáticas son bastante comunes (Zabalgoeazcoa et al., 2003).

Festuca rubra es una especie frecuente en los pastos mesofíticos o meso-xerofíticos españoles. En un estudio de seis poblaciones de esta gramínea en pastos de dehesa, se observó que una media del 70% de las plantas estaban infectadas por el endófito *Epichloë festucae* (Zabalgoeazcoa et al., 1999) (Tabla 2). Curiosamente, se detectó la misma tasa de incidencia (70%) en poblaciones de *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* L. en acantilados marinos de la costa gallega (Zabalgoeazcoa et al., 2006b) (Tabla 2). En este hábitat, las plantas a menudo crecen en grietas donde apenas hay suelo en paredes de roca, y están sometidas a estrés salino por la influencia del agua de mar. El hecho de que se haya encontrado el mismo porcentaje de infección en dos hábitats distintos pero estando las plantas en ambos casos sometidas a estrés abiótico, sugiere que el hongo *Epichloë* puede ser un factor importante en la adaptación de estas plantas a un hábitat adverso.

En el oeste de España la incidencia de *Epichloë* en *Lolium perenne* es menor que en *Festuca rubra* (Tabla 2). En las ocho localidades donde se muestrearon plantas de *Lolium* se detectaron endófitos *Epichloë*, con una incidencia media del 43%, oscilando entre el 32-60% (Soto-Barajas et al., 2014). En el norte de España la incidencia parece ser menor, ya que se han detectado plantas de *Lolium* infectadas en el 72% de 54 localidades muestreadas, con una incidencia media del 33% (Oliveira y Castro, 1998).

Gramínea	Endófito	Tipo de interacción	Localidades con infección	Incidencia en la población
<i>Agrostis castellana</i>	<i>Epichloë baconii</i>	Antagonista	3/12	< 5%
<i>Alopecurus arundinaceus</i>	<i>Epichloë</i> sp.	Antagonista	1/18	< 5%
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	1/4	< 5%
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	<i>Epichloë sylvatica</i>	Asintomática	1/1	
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	9/9	>40%
<i>Festuca ampla</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Mixta	1/1	
<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	Asintomática	9/9	>40%
<i>Festuca ovina</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Asintomática	1/1	
<i>Festuca rubra</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Asintomática	27/28	>40%
<i>Holcus lanatus</i>	<i>Epichloë typhina</i> subsp. <i>clarkii</i>	Antagonista	3/12	< 5%
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	3/11	< 5%
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	Asintomática	11/11	>40%

TABLA 1. Gramíneas hospedadoras de endófitos *Epichloë* en pastos de dehesa (Zabalgoeazcoa et al., 2003)

TABLE 1. Host grasses of *Epichloë* endophytes in dehesa grasslands (Zabalgoeazcoa et al., 2003).

<i>F. rubra</i> en pastos de dehesa Zabalgoageazcoa et al. (1999)		<i>F. rubra</i> subsp. <i>pruinosa</i> en acantilados marinos Zabalgoageazcoa et al. (2006)		<i>L. perenne</i> en pastos de diferentes hábitats Soto-Barajas et al. (2014)	
Código localidad	Frecuencia de infección (%)	Código localidad	Frecuencia de infección (%)	Código localidad	Frecuencia de infección (%)
MEM	80	CED	79	CRO	60
LVA	62	PAN	80	DIV	34
ZAR	76	BAR	57	LVA	56
PAL	92	TOR	64	LVE	43
MAT	76			POR	32
PEL	44			POT	44
				TAB	49
				VAF	32
Media	70	Media	70	Media	43

TABLA 2. Incidencia de endófitos *Epichloë* en *Festuca rubra*, *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* y *Lolium perenne* en pastos de diferentes hábitats.

Entre los endófitos *Epichloë* identificados en poblaciones naturales de *L. perenne* por Soto-Barajas et al. (2014), se encontraron tres morfotipos fúngicos predominantes. Dos morfotipos genéticamente cercanos a *E. festucae* var. *lolii* y con ciclo de reproducción asexual, el morfotipo M1, de desarrollo lento, cultivos de color blanco y producción de conidios; y el morfotipo M3, de desarrollo intermedio, cultivos de color marrón claro y micelio estéril (Figura 4). El otro morfotipo, designado M2, corresponde a la especie *E. typhina*, con cultivos de crecimiento rápido, con abundante micelio superficial de color blanco y textura algodonosa, y producción de conidios. En la mitad de las poblaciones estudiadas se encontraron los tres morfotipos. El morfotipo dominante entre poblaciones fue el M1, con más del 50% de los endófitos analizados pertenecientes a este grupo, una tercera parte de los aislados pertenecían al grupo M3 y una menor cantidad al morfotipo M2.

TABLE 2. Incidence of *Epichloë* endophytes in *Festuca rubra*, *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* y *Lolium perenne* in pastures from different habitats.

ALCALOIDES PRODUCIDOS POR HONGOS *Epichloë*

Una de las principales características de las asociaciones gramínea-*Epichloë* es la producción de alcaloides que proporcionan a la planta hospedadora resistencia frente a herbívoros (Bush et al., 1997; Lane et al., 2000; Schardl et al., 2013a). Los alcaloides que pueden producir los endófitos *Epichloë* en la planta huésped son de cuatro tipos: alcaloides del grupo ergot y lolitrenos, tóxicos para el ganado; y peramina y lolinas, con actividad insecticida y baja toxicidad para mamíferos (Figura 5).

El principal alcaloide del grupo ergot asociado a *Epichloë* es la ergovalina. Este compuesto es causante de la festucosis, un síndrome tóxico que afecta al ganado vacuno y en menor medida al equino y ovino. Algunos de sus síntomas son el aumento de la temperatura corporal, pérdida de peso, aspereza en el pelo, disminución de la producción de leche y de la eficiencia reproductiva, vasoconstricción y en ciertos casos gangrena en las extremidades (Schmidt y Osborn, 1993; Olivier, 2005). Además en pastos infectados por *Epichloë* la ganancia media diaria de peso en vacuno puede llegar a disminuir hasta un 44% (Paterson et al., 1995).

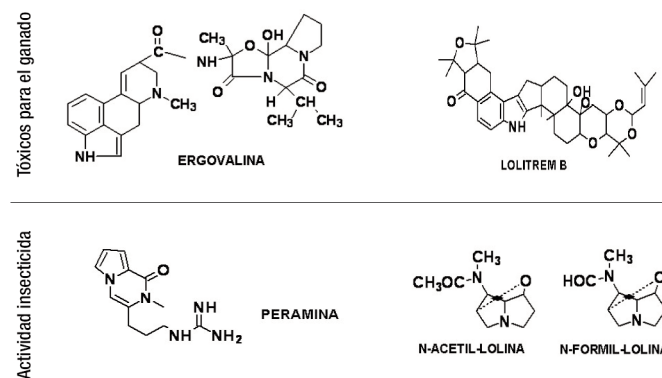


FIGURA 5. Estructura de los cuatro tipos de alcaloides encontrados en gramíneas infectadas por endófitos *Epichloë*.

FIGURE 5. Structure of the four types of alkaloids found in grasses infected by *Epichloë* endophytes.



M1 = morfotipo de desarrollo lento, cultivos de color blanco y producción de conidios. M2= morfotipo de crecimiento rápido, con abundante micelio superficial de color blanco y de textura algodonosa y producción de conidios. M3= morfotipo de crecimiento intermedio, cultivos de color marrón claro y micelio estéril.

FIGURA 4. Morfología de endófitos *Epichloë* aislados de plantas de *Lolium perenne*.

FIGURE 4. Morphology of *Epichloë* endophytes isolated from plants of *Lolium perenne*.

Las infecciones víricas son relativamente comunes en numerosas especies de hongos. A menudo, estas infecciones no están asociadas a síntomas obvios en los hongos huéspedes de virus. Este es el caso de dos virus que se han identificado en el endófito *Epichloë festucae* (Romo et al., 2007). Cerca del 80% de los aislados de *E. festucae* que infectan plantas de *Festuca rubra* en pastos de dehesa están infectados por los virus EFV1 y EFV2. Sin embargo, no se ha descubierto ningún parámetro del hongo huésped que establezca una diferencia entre aislados infectados y no infectados.

El lolitrem B, un indol-diterpeno, es una neurotoxina que produce en el ganado una serie de trastornos conocidos comúnmente como toxicosis del raigrás (*perennial ryegrass toxicosis*). Los síntomas incluyen la parálisis del raigrás (*ryegrass staggers*), un síndrome tóxico que se caracteriza por temblores agudos en el cuello y extremidades, y una disminución de la función neuromuscular (Gallagher *et al.*, 1984). Otros síntomas son choques térmicos y pérdida de productividad y mortalidad (Reed *et al.*, 2011). Afecta principalmente a ganado ovino, pero también se han detectado dichos efectos en ciervos, camellos, alpacas, cabras y rinoceronte blanco, así como en ganado vacuno y caballo (Hume, 2015).

La mayoría de los casos de toxicidad registrados en ganado por el consumo de pastos han ocurrido en países donde se cultivan praderas mono-específicas de gramíneas con elevadas tasas de incidencia de *Epichloë*. Este es el caso de *L. arundinaceum* en EEUU, donde la extensión de este cultivo llega a 14 millones de hectáreas y se producen unas pérdidas económicas anuales en la producción de ganado vacuno estimadas en 1 000-1 500 millones de dólares (Hume, 2015). En Argentina, debido a la introducción de la *Festuca arundinacea*, se producen pérdidas anuales de 54 millones de dólares (Hume, 2015). Otro caso similar es el de la infección de *L. perenne*, que ocasiona pérdidas importantes en el sector ganadero en Nueva Zelanda, Australia y Chile. Así por ejemplo, en 2002 murieron casi 100 000 cabezas de ganado, principalmente ovino, en Australia (Hume y Sewell, 2014). Este tipo de sucesos son ocasionales, pero desde 1985 se han producido tres episodios de intoxicación masiva. Las pérdidas económicas ocasionadas por la parálisis del raigrás en productores australianos de ovino y vacuno de carne han sido estimadas en 100 millones de dólares AUD (Hume y Sewell, 2014).

En Europa se conocen muy pocos casos de intoxicaciones por consumo de pastos infectados por *Epichloë*. Esto es debido (i) al mayor uso de pastos naturales, cuya diversidad florística produce un efecto de dilución de las toxinas en la dieta consumida por el ganado, (ii) a que desde hace décadas, son muy pocas las variedades comerciales de gramíneas forrajeras (i.e. *L. perenne*, *L. arundinaceum*) cuya semilla está infectada por *Epichloë*, y (iii) al poco uso de algunas especies huésped como *L. arundinaceum* en praderas artificiales en Europa (Oliveira, 1996; Zabalgogezcoa *et al.*, 1998; Zabalgogezcoa y Bony, 2008). No obstante, ciertos cultivares de *L. arundinaceum* infectados, pueden tener una elevada concentración de ergovalina en semillas (Vázquez de Aldana *et al.*, 2001). En los últimos años se han detectado casos de toxicidad en Irlanda y Francia que podrían estar relacionados con el aumento de los periodos de sequía (Zabalgogezcoa y Bony, 2008).

La peramina, un alcaloide del grupo de las pirrolopirazinas, tiene actividad insecticida pero no es tóxica para el ganado. La peramina aumenta la resistencia de las plantas infectadas

frente a numerosos insectos y nematodos (Clay y Schardl, 2002). En Nueva Zelanda la presencia de este alcaloide es crucial para la protección de los pastos de *Lolium perenne* contra el escarabajo *Listronotus bonariensis* Kuschel que ataca la base de los tallos de la planta (Rowan y Gaynor, 1986). Las lolinas tienen actividad insecticida contra varias especies de insectos y nematodos, y están directamente relacionadas con la resistencia de las plantas huéspedes a ciertas especies de pulgones (Wilkinson *et al.*, 2000; Schardl *et al.*, 2007).

El perfil de alcaloides de una planta depende de la especie de gramínea hospedadora y del hongo que la infecta, así como de factores ambientales. En una misma planta se han encontrado hasta tres alcaloides fúngicos diferentes, pero hasta la fecha no se ha descubierto ninguna con los cuatro tipos. La peramina, con actividad insecticida, es el alcaloide más frecuente en las distintas especies huéspedes, y el grupo de las lolinas el menos frecuente (Siegel y Bush, 1996; Schardl *et al.*, 2013b). *Epichloë* promueve la síntesis de lolitrem B solo en asociaciones con *L. perenne*, mientras que la ergovalina se ha detectado en plantas infectadas de *L. arundinaceum*, *L. perenne* o *F. rubra*. Recientemente se han identificado los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los cuatro alcaloides (Schardl *et al.*, 2013b; 2014).

Además de la variación del perfil de alcaloides por efecto del genotipo del hongo y de la planta, la concentración puede verse afectada por otros factores como el estado fenológico y el tipo de tejido de la planta, así como por condiciones de manejo como el abonado y disponibilidad de agua (Lane *et al.*, 2000). Cada alcaloide tiene un modelo de distribución; por ejemplo, la concentración de ergovalina tiende a aumentar con la madurez de la planta, y las concentraciones más elevadas se encuentran en las semillas (Ball *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002; Vázquez de Aldana *et al.*, 2003). En plantas de *L. perenne* la mayor concentración de lolitrem B se encuentra en la zona basal, que es consumida por ganado ovino principalmente durante los meses de verano (Ball *et al.*, 1995). Esto explicaría por qué el ganado vacuno, que no pastorea tan bajo como el ovino, no padece el síndrome de la parálisis del raigrás. Por otro lado, la acumulación de peramina, alcaloide con actividad insecticida, es mayoritaria en las hojas, la parte consumida por insectos. Esta distribución sugiere que los alcaloides se acumulan en las partes de la planta más susceptibles de ser atacadas o dañadas por herbívoros, y puede ser considerada como un sistema de protección que asegura la supervivencia y diseminación del hongo.

La concentración de alcaloides en la planta puede variar con algunos factores ambientales. Así por ejemplo, varios trabajos han mostrado que al disminuir la disponibilidad hídrica aumenta la concentración de ergovalina (tóxico para el ganado) en plantas de *L. arundinaceum*, *L. perenne* o *F. rubra* (Belesky *et al.*, 1989; Hahn *et al.*, 2008; Vázquez de Aldana *et al.*,

Gramínea	Ergovalina (mg/kg)	Hábitat	Referencia
<i>Agrostis castellana</i>	0	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	0	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Dactylis glomerata</i>	0	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Holcus lanatus</i>	0	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca arundinacea</i>	0,1–3,2	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca ovina</i>	0,11	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca rubra</i>	0–0,47	Dehesa	Vázquez de Aldana et al., (2010)
<i>Festuca rubra pruinosa</i>	0–1,9	Acantilados	Vázquez de Aldana et al., (2007)
<i>Lolium perenne</i>	0-5,0	Oeste de la P. Ibérica (dehesa y otros)	Soto-Barajas et al., (2015)
<i>Lolium perenne</i>	0-0,55	Norte España	Oliveira et al., (2003)

TABLA 3. Concentración del alcaloide ergovalina en gramíneas infectadas por endófitos *Epichloë* procedentes de pastos.

2013a). Por tanto, en condiciones de sequía puede aumentar el riesgo de toxicidad para el ganado en pastoreo. Otro factor que puede afectar a la concentración de alcaloides en la planta es la adición de abono. Un aumento del nivel de fósforo en suelo (de 17 a 50 mg/kg) puede aumentar la concentración de ergovalina en plantas de *L. arundinaceum* (Malinowski et al., 1998b). La adición de compuestos nitrogenados también aumenta la concentración de alcaloides como ergovalina, siendo mayor el incremento producido por formas NO_3^- que por NH_4^+ (Arechavaleta et al., 1992). Igualmente, la combinación de los factores antes mencionados con incrementos de temperatura, producen un aumento en la planta de los niveles de alcaloides tóxicos para el ganado lolitrem B y ergovalina, según se ha observado en *L. arundinaceum* infectada con *E. cenophiala* y en *L. perenne* en simbiosis con *E. festucae* var. *lolii* (Ryan et al., 2015).

ALCALOIDES EN PASTOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

En gramíneas de pastos de dehesa de la provincia de Salamanca, las especies *Festuca rubra*, *Festuca ovina* L., *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne* producen ergovalina, alcaloide tóxico para mamíferos, en concentraciones variables (Vázquez de Aldana et al., 2003, 2007, 2010) (Tabla 3). La mayoría de las plantas analizadas presentaron concentraciones por debajo del nivel crítico de 0,40 mg/kg en la dieta, por encima del cual se observan síntomas clínicos de festucosis en ganado vacuno (Aldrich et al., 1993). En gramíneas como *Agrostis castellana* Boiss y Reut., *Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. y Schult., *Dactylis glomerata* y *Holcus lanatus* L., infectadas por *E. typhina*, *Epichloë typhina* subsp. *clarkii* (White) Leuchtm. y Schardl y *Epichloë baconii* White, no se detectó dicho alcaloide. Curiosamente, las concentraciones más altas de ergovalina que se han detectado ocurren en plantas de *F. rubra* subsp. *pruinosa* procedentes de acantilados marinos (Tabla 3), donde la prevalencia de *Epichloë* es del 70% (Vázquez de Aldana et al., 2007).

En poblaciones de *F. rubra* asociadas a *Epichloë*, la producción y concentración de los alcaloides ergovalina y peramina presentan variaciones importantes tanto entre plantas

TABLE 3. Concentration of ergovaline alkaloid in grasses infected by *Epichloë* endophytes from pastures.

como entre poblaciones. Así, dentro de una población no todas las plantas infectadas producen cantidades detectables de estos metabolitos secundarios. En una de las poblaciones estudiadas (PAL) se encontró que un 75% de las plantas producía ergovalina y un 33% peramina; mientras que en la otra población (SER) sucedía lo contrario, un 33% producía ergovalina y un 80% peramina (Vázquez de Aldana et al., 2010) (Figura 6). En dichas poblaciones se detectó mayor diversidad genética entre hongos *Epichloë* en plantas de distintas poblaciones que entre los de la misma población (Arroyo Garcia et al., 2002). Entre plantas infectadas con endófitos de *E. festucae* genéticamente próximos existe una tendencia a producir concentraciones similares de peramina, mientras que la variación en el contenido de ergovalina parece depender más de factores externos que de la distancia genética entre los endófitos (Vázquez de Aldana et al., 2010). El hecho de que la ruta de biosíntesis de peramina sea bastante más simple que la de ergovalina (Schardl et al., 2013b) podría explicar la mayor estabilidad de la producción del primer alcaloide.

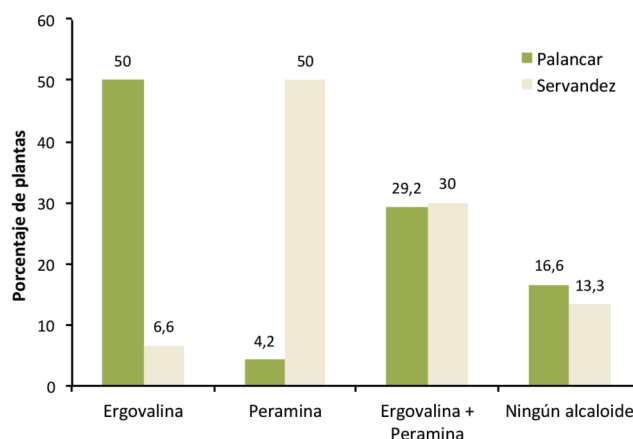


FIGURA 6. Porcentaje de plantas de *Festuca rubra* asociadas a *Epichloë festucae* que producen los alcaloides ergovalina (tóxico para ganado) y peramina (actividad insecticida), en Palancar y Servandez, dos dehesas de la provincia de Salamanca (© Wiley Library; Vázquez de Aldana et al., 2010).

FIGURE 6. Percentage of *Festuca rubra* plants infected by *Epichloë festucae* that produce the alkaloids ergovaline (toxic to livestock) and peramine (insecticide), in Palancar and Servandez, two meadows in the province of Salamanca (© Wiley Library; Vázquez de Aldana et al., 2010).

La concentración de alcaloides en *L. perenne* puede depender del grupo taxonómico de *Epichloë* (Soto Barajas *et al.*, 2015). En un análisis de plantas de diferentes hábitats, se encontró que el 80% de las plantas producía peramina y el 63% lolitrem B. En plantas con estromas característicos de *E. typhina*, (Figura 3), se detectaron las concentraciones más altas de peramina; mientras que en plantas asintomáticas con endófitos de morfotipo M1 y M3 se observaron las concentraciones más elevadas de lolitrem B (Soto Barajas *et al.*, 2015) (Figura 7). En menos del 10% de las plantas se sobrepasó el nivel crítico en la dieta de 1,80 mg/kg, a partir del cual se observan síntomas en el ganado (Turner *et al.*, 1995). En poblaciones silvestres de *L. perenne* del norte de España se han detectado concentraciones de lolitrem B de 0-7,1 mg/kg en semilla, y ergovalina en concentraciones de 0-0,55 mg/kg en planta y de 1,0-36,2 mg/kg en semilla (Oliveira *et al.*, 1997, 2003).

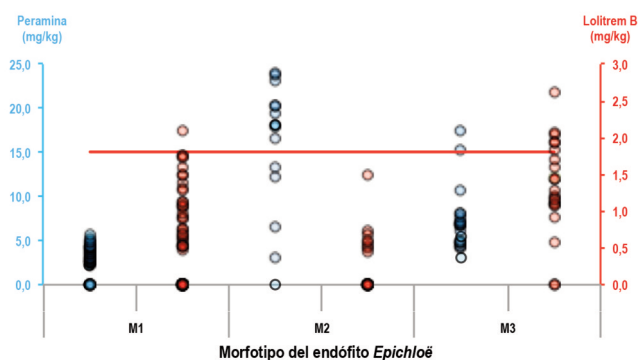


FIGURA 7. Concentración de los alcaloides peramina (insecticida) y lolitrem B (tóxico para ganado) en plantas de *Lolium perenne* infectadas por *Epichloë*, procedentes de pastos del oeste español, en función del morfotipo (M1, M2 y M3) del endófito (Soto-Barajas *et al.*, 2015).

FIGURE 7. Concentration of alkaloids peramine (insecticide) and lolitrem B (toxic to cattle) in *Lolium perenne* plants infected by *Epichloë*, from pastures of Western-Spain, as affected by the taxonomic group of the endophyte (Soto-Barajas *et al.*, 2015).

LA SIMBIOSIS MUTUALISTA ENTRE *Festuca rubra* Y *Epichloë festucae*

Varios trabajos han mostrado que las plantas infectadas por *Epichloë*, además de la resistencia a herbívoros que confieren los alcaloides, también tienen mayor resistencia a factores de estrés abiótico como la sequía o la presencia de metales pesados (Malinowski y Belesky, 2000b; Clay y Schardl, 2002). El hecho de que en los pastos semiáridos de dehesas de la provincia de Salamanca, un 70% de las plantas de *F. rubra* estén infectadas por el endófito *E. festucae* indica la posibilidad de que el hongo produzca algún beneficio a la planta, ya que el coste metabólico que le supone mantener al hongo en su interior puede ser elevado en dicho hábitat. Algunas plantas infectadas de *F. rubra* contienen

alcaloides como ergovalina o peramina, aunque la concentración detectada del alcaloide ergovalina es muy baja y con variaciones interanuales que pueden llegar a concentración cero (Vázquez de Aldana *et al.*, 2010). Estas bajas concentraciones de alcaloides detectadas en poblaciones silvestres de *F. rubra* con una alta incidencia de *Epichloë*, podrían indicar que la selección natural que favorecería una alta prevalencia del hongo, no opera exclusivamente sobre plantas con resistencia a herbívoros por su contenido de alcaloides, sino que otros aspectos pueden verse afectados, como se explica en los siguientes apartados.

Epichloë incrementa el contenido de nutrientes en *Festuca rubra*

Varios estudios llevados a cabo con diferentes ecotipos silvestres de *F. rubra* han mostrado que la presencia de *Epichloë* puede incrementar de forma significativa el contenido de fósforo en la planta. Un ensayo de campo con cinco ecotipos de *F. rubra* mostró durante tres años consecutivos un aumento significativo del 11,2% en la concentración de P en las plantas asociadas a *Epichloë* (Figura 8), aunque las diferencias en producción de biomasa entre plantas simbióticas y plantas no infectadas no fueron significativas (Zabalgogezcoa *et al.*, 2006a). En un ensayo en invernadero con dos ecotipos de *F. rubra* y varios tratamientos de disponibilidad de agua, se detectó un incremento en la concentración de P (62%) y de Zn (58%) en plantas con *Epichloë*; dicho aumento fue significativo en todos los tratamientos hídricos (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013a) (Figura 9). Estos resultados sugieren que, aunque *Epichloë* coloniza el tejido aéreo de la planta pero no la raíz, el hongo puede modificar procesos que impliquen una mayor absorción de nutrientes. Alternativamente, este efecto podría deberse a

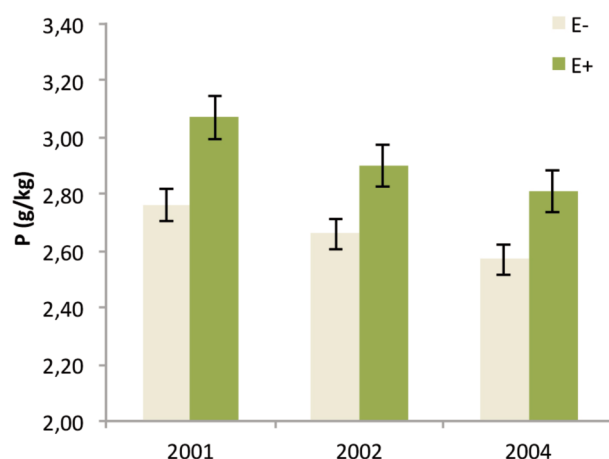


FIGURA 8. Contenido de fósforo en plantas de *Festuca rubra* infectadas por *E. festucae* (E+) y no infectadas (E-), en un ensayo de campo, durante tres años (© Elsevier, Zabalgogezcoa *et al.*, 2006).

FIGURE 8. Phosphorus content in plants of *Festuca rubra* infected by *E. festucae* (E+) and non-infected (E-), in a field trial during three years (© Elsevier, Zabalgogezcoa *et al.*, 2006)

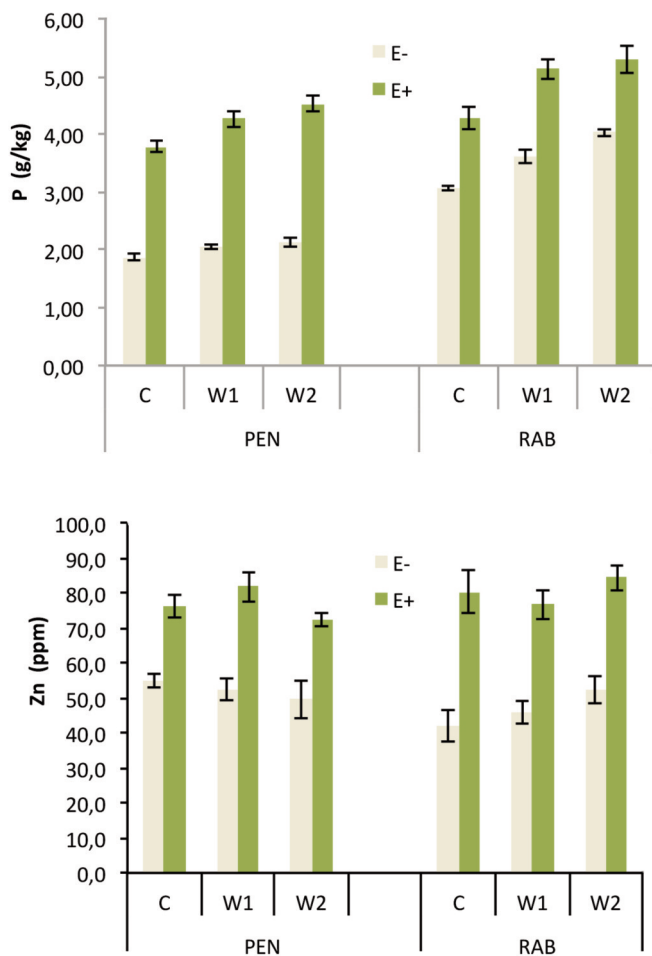


FIGURA 9. Contenido de P y Zn en dos ecotipos (PEN y RAB) de *Festuca rubra* infectados por *Epichloë* (E+) y sin *Epichloë* (E-) creciendo con distinta disponibilidad de agua (C = control, riego regular; W1 = riego una vez por semana; W2 = riego una vez cada dos semanas). (© PLoSOne, Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

FIGURE 9. P and Zn content in two ecotypes (PEN and RAB) of *Festuca rubra* infected by *Epichloë* (E+) and without *Epichloë* (E-) growing with different water availability regimes (C = control, regular watering; W1 = watering once a week; W2 = watering once every two weeks). (© PLoSOne, Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

un aumento de la acumulación de P en tejido foliar de plantas infectadas. En las raíces de las plantas del ensayo de invernadero no se detectó colonización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), lo que indica que el efecto podría atribuirse a *Epichloë*. En las raíces de las plantas de campo se detectaron HMA, tanto en las infectadas por *Epichloë* como en las no asociadas a *Epichloë*. Varios trabajos sobre *L. perenne* y *L. arundinaceum* han mostrado que la colonización de HMA es menor en raíces de plantas asociadas a *Epichloë* que en las no infectadas (Guo *et al.*, 1992; Omacini *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios con gramíneas del género *Bromus* han mostrado lo contrario: una mayor frecuencia de colonización en raíces de plantas infectadas con *Epichloë* que en las no infectadas (Novas *et al.*, 2005).

Efecto de *Epichloë* en la germinación

El efecto de *E. festucae* en la germinación de semillas de *F. rubra* se ha estudiado considerando diferentes temperaturas (12°C y 25°C) y potencial hídrico (0 y 0,5 Mpa) (Gundel *et al.*, 2011). En general el porcentaje de germinación fue más alto en el caso de las semillas E- que en las infectadas (E+). Sin embargo, se encontró un efecto positivo del endófito en la supervivencia de las semillas E+, especialmente en los tratamientos menos favorables para la germinación. Así en el tratamiento más restrictivo para esta especie, según se indica en el trabajo, (25°C y -0,5 MPa) la supervivencia de semillas fue superior en las E+ (44%) que en las E- (39%).

La presencia de *Epichloë* puede afectar el rendimiento de algunos genotipos de *F. rubra* que crecen en suelos que contienen metales pesados como el arsénico. Aunque la germinación de semillas en suelos con distintas concentraciones de As no se ha visto afectada por la presencia de *Epichloë*, el crecimiento de la radícula de las plántulas E+ es mayor que el de las plantas E- en todos los niveles de As (Vázquez de Aldana *et al.*, 2014).

La presencia de endófitos *Epichloë* puede modificar el potencial alelopático de *Festuca rubra*

La alelopatía es la ciencia que estudia cualquier proceso que involucre compuestos químicos (preferentemente metabolitos secundarios) de origen vegetal o microbiano, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos. Se trata de un tipo de interacción entre plantas que tiene interés tanto desde el punto de vista básico (estructura dinámica de comunidades vegetales) como aplicado, ya que determinadas plantas con actividad alelopática pueden considerarse como herbicidas naturales (Macías *et al.*, 2007).

La presencia de *Epichloë* puede modificar el potencial alelopático en la planta hospedadora. Estudios realizados con extractos acuosos de distintos tejidos de *F. rubra* con *Epichloë* (E+) y sin *Epichloë* (E-) mostraron que el crecimiento de plántulas de especies pratenses como *Lotus corniculatus* L., *Plantago lanceolata* L., *Trifolium pratense* L. o *Trifolium repens* L., sufre una mayor inhibición cuando los extractos proceden de raíces de plantas E+ (Vázquez de Aldana *et al.*, 2011). En los extractos de plantas E+ se encontró una mayor concentración de compuestos fenólicos, cuya actividad alelopática es conocida (Inderjit, 1996). Posteriormente, en un ensayo con mezclas binarias de *F. rubra* y *Trifolium pratense* se detectó que el crecimiento de *Trifolium* era significativamente menor en compañía de *F. rubra* asociada a *Epichloë* (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b) (Figura 10). Esta disminución en el crecimiento de la leguminosa no fue debida a diferencias en el desarrollo de *F. rubra* (E+ versus E-). Todos estos resultados muestran que *Epichloë* incrementa el potencial alelopático de

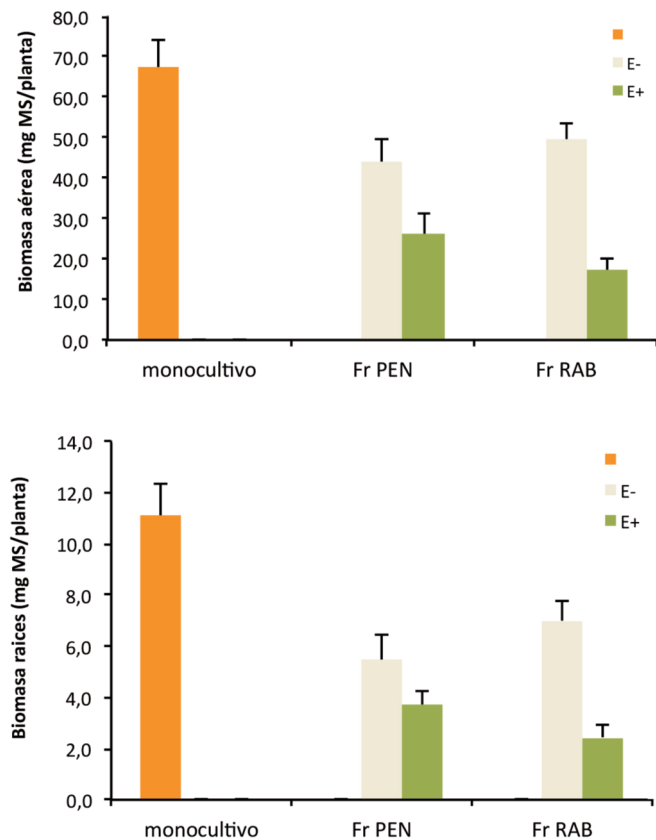


FIGURA 10. Producción de biomasa aérea y subterránea de plantas de *Trifolium pratense* en monocultivo y en mezcla con *Festuca rubra* infectada por *Epichloë* (E+) y no infectada (E-) de dos ecotipos diferentes (PEN y RAB). La inhibición del crecimiento de *T. pratense* es mucho mayor en co-cultivo con plantas infectadas de *F. rubra*. © Springer; Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

FIGURE 10. Aboveground and belowground biomass production of plants of *Trifolium pratense* in monoculture and mixed with *Festuca rubra* *Epichloë* (E+) -infected and not infected (E-) of two different ecotypes (PEN and RAB). The inhibition of the growth of *T. pratense* is much greater when mixed with infected plants of *F. rubra* (© Springer; Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

F. rubra, y que la producción de compuestos fenólicos puede estar implicada en este incremento (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b).

Además de la actividad alelopática, los compuestos fenólicos pueden incrementar la absorción de fósforo en la planta mediante la formación de complejos con Al, Fe y Mn. Por tanto, la mayor concentración de P encontrada en plantas con *Epichloë*, tanto en *F. rubra* como *L. arundinaceum* (Malinowski *et al.*, 2000a; Zabalgoagezcoa *et al.*, 2006a; Vázquez de Aldana *et al.*, 2013a) podría deberse a una mayor secreción de exudados por la raíz, incluyendo compuestos fenólicos (Malinowski *et al.*, 1998a; Vázquez de Aldana *et al.*, 2011). Así, la presencia de *Epichloë* en el tejido aéreo de las plantas podría afectar a varios procesos del ecosistema (Figura 11). Una modificación cualitativa o cuantitativa de exudados por la raíz, además de los efectos alelopáticos, puede implicar modificaciones en la microbiología del suelo (Omacini *et al.*, 2012). Los cambios en la concentración de nutrientes

en las plantas podría alterar la calidad de hojarasca producida por tejidos senescentes y por tanto las tasas de descomposición (Omacini *et al.*, 2004).

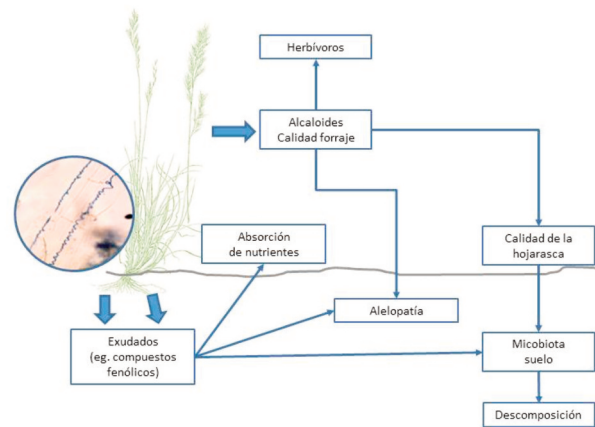


FIGURA 11. Esquema de los impactos potenciales que los endófitos *Epichloë* pueden producir en el funcionamiento del ecosistema.

FIGURE 11. Scheme of the potential impacts that *Epichloë* endophytes may have in the functioning of the ecosystem.

Resistencia a patógenos asociada a endófitos *Epichloë*

La asociación de gramíneas con endófitos *Epichloë* afecta a varios aspectos relacionados con la respuesta de las plantas frente a factores de estrés biótico y abiótico. Los posibles beneficios obtenidos por plantas simbióticas frente a ataques de patógenos han sido estudiados en varios patosistemas (Zabalgoagezcoa, 2008).

Respecto a ataques de hongos patógenos, se ha observado una reducción considerable de la severidad de la enfermedad de la mancha del dólar, causada por *Sclerotinia homoeocarpa*, en diversas variedades de *F. rubra* infectadas por *E. festucae*. El efecto beneficioso del endófito se detectó durante varios años consecutivos en experimentos de campo (Clarke *et al.*, 2006). La simbiosis endofítica también redujo la severidad de la enfermedad del hilo rojo, causada por *Laetisaria fuciformis* (Bonos *et al.*, 2005). Algunos estudios también han mostrado una mejora de la resistencia a varias especies de nematodos en plantas de *Lolium arundinaceum* infectadas por *Epichloë coenophiala* (West *et al.*, 1988; Kimmons *et al.*, 1990). Los endófitos *Epichloë* no infectan raíces de plantas, y por tanto se ha atribuido la mejora del rendimiento de estas plantas simbióticas a la translocación de compuestos antiherbívoros de origen fúngico (i.e. alcaloides). Sin embargo, aún queda por concretar qué compuesto o mecanismo es responsable de esta mejora del rendimiento frente a nematodos. Indirectamente, a través de la interferencia con insectos vectores, las gramíneas asociadas a endófitos también podrían beneficiarse frente a la transmisión de virus (Lehtonen *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Los hongos endofíticos *Epichloë* son frecuentes en varias gramíneas de pastos de la península ibérica. Se han identificado hongos *Epichloë* en un 24% de las especies de gramíneas analizadas, y las frecuencias de infección son elevadas en poblaciones naturales de *Festuca rubra*, *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne*. En plantas infectadas por *Epichloë* procedentes de pastos, se han detectado los alcaloides ergovalina y lolitrem B (tóxicos para ganado) y peramina (actividad insecticida), en concentraciones que varían entre poblaciones para una misma especie de gramínea. Hasta la fecha no se han diagnosticado en España casos de intoxicación en ganado vacuno u ovino producidos por el consumo de pastos infectados por *Epichloë*. Hay un gran interés en el uso de endófitos para la mejora de gramíneas forrajeras, que se basa en la selección de aislados con una baja producción de ergovalina y lolitrem B, pero que contengan peramina. Varios estudios han mostrado que la asociación con *Epichloë* es beneficiosa para las plantas, y en determinadas condiciones de crecimiento puede aumentar su contenido en nutrientes (ej. fósforo), aumentar su potencial alelopático o la resistencia a patógenos, en relación a las plantas no infectadas por *Epichloë*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos del Plan Nacional I+D+i (AGL2011-22783) y del Plan Regional de la Junta de Castilla y León (CSI231U14). Agradecemos a todo el personal del Grupo de Pastos del IRNASA-CSIC que ha trabajado en los diferentes proyectos y ensayos cuyos resultados se presentan aquí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH C.G., PATERSON J.A., TATE J.L. Y KERLEY M.S. (1993) The effects of endophyte-infected tall fescue consumption on diet utilization and thermal regulation in cattle. *Journal of Animal Science*, 71, 164-170.
- ARECHAVALETA M., BACON C.W., PLATTNER R.D., HOVELAND C.S. Y RADCLIFFE D.E. (1992) Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 857-861.
- ARROYO GARCIA R., MARTINEZ ZAPATER J.M., GARCIA CRIADO B. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2002) Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichloë festucae* in semiarid grasslands. *Molecular Ecology*, 11, 355-364.
- BALL O.J.P., MILES C.O. Y PRESTIDGE R.A. (1997) Ergopeptide alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychus* arator (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, 90, 1382-1391.
- BALL O.J.P., PRESTIDGE R.A. Y SPROSEN J.M. (1995) Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1527-1533.
- BELESKY D.P., STRINGER W.C. Y PLATTNER R.D. (1989) Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. II. Pyrrolizidine and ergopeptide alkaloids. *Annals of Botany*, 64, 343-349.
- BONOS S.A., WILSON M.M., MEYER W.A. Y FUNK C.R. (2005) Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science*, 2, doi:10.1094/ATS-2005-0725-01-RS.
- BUSH L.P., WILKINSON H.H. Y SCHARDL C.L. (1997) Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114: 1-7.
- 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.
- CLAY K. Y SCHARDL C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160, S99-S127.
- GALLAGHER R.T., HAWKES A.D., STEYN P.S. Y VLEGGAR R. (1984) Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorders of livestock. Structure elucidations of lolitrem B. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 9, 614-616.
- GUNDEL P.E., ZABALGOGEAZCOA I. Y VÁZQUEZ DE ALDANA B.R. (2011) Interaction between plant genotype and the symbiosis with *Epichloë* fungal endophytes in seeds of red fescue (*Festuca rubra*). *Crop and Pasture Science*, 62, 1010-1016.
- GUO B., HENDRIX J., AN Z. Q. Y FERRISS R. (1992) Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 84, 882-885.
- HAHN H., MCMANUS M.T., WARNSTORFF K., MONAHAN B.J., YOUNG C.A., DAVIES E., TAPPER B.A. Y SCOTT B. (2008) *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 183-199.
- HUME D.E. (2015) Utilising *Epichloë*-grass associations to benefit livestock production systems. En: 9th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses. Agrobio, La Trobe University, pp 39. Bundoora Melbourne Victoria, Australia.
- HUME D.E. Y SEWELL J.C. (2014) Agronomic advantages conferred by endophyte infection of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in Australia. *Crop and Pasture Science*, 65, 747-757.
- HYDE K.D. Y SOYTONG K. (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163-173.
- INDERJIT (1996) Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review*, 62, 186-202.

- JOHNSON L.J., DE BONTH A.C.M., BRIGGS L.R., CARADUS J.R., FINCH S.C., FLEETWOOD D.J., FLETCHER L.R., HUME D.E., JOHNSON R.D., POPAY A.J., TAPPER B.A., SIMPSON W.R., VOISEY C.R. Y CARD S.D. (2013) The exploitation of epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Diversity*, 60, 171-188.
- KIMMONS C.A., GWINN K.D. Y BERNARD E.C. (1990) Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease*, 74, 757-761.
- LANE G.A., CHRISTENSEN M.J. Y MILES C.O. (2000) Co-evolution of fungal endophytes with grasses: The significance of secondary metabolites. En: Bacon C.W.Y. y White, J.F. (Eds.) *Microbial Endophytes*. pp. 341-388. York, : Marcel Dekker.
- LEHTONEN P.T., HELANDER M., SIDDIQUI S.A., LEHTO K. Y SAIKKONEN K. (2006) Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*). *Biological Letters*, 2, 620-623.
- LEUCHTMANN A., BACON C., SCHARDL C., WHITE JR J.F. Y TADYCH M. (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106, 202-2015.
- LEYRONAS C. Y RAYNAL G. (2001) Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. *Annals of Applied Biology*, 139, 119-127.
- MACIAS F.A., MOLINILLO J.M.G., VARELA R.M. Y GALINDO J.C.G. (2007) Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63, 327-348.
- MALINOWSKI D.P., ALLOUSH G.A. Y BELESKY D.P. (1998a) Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil*, 205, 1-12.
- 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. (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40, 923-940.
- MALINOWSKI D.P., BELESKY D.P., HILL N.S., BALIGAR V.C. Y FEDDERS J.M. (1998b) Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil*, 198, 53-61.
- NAN Z.B. Y LI C.J. (2001) *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophytes/host interactions. En: Proceedings of the 4th International Neotyphodium/Grass interactions Symposium, pp 41-50. Soest, Alemania.
- NOVAS M.V., CABRAL D. Y GODEAS A.M. (2005) Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*, 40, 23-30.
- OLIVEIRA J.A. (1996) Nuevas tendencias en la mejora de praderas: los endófitos. *Pastos*, 26, 3-22.
- OLIVEIRA J.A. Y CASTRO V. (1998) Incidence of *Neotyphodium* endophytes in Spanish perennial (*Lolium perenne* L.) ryegrass accessions. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 113, 1-3.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E., COLLAR J. Y CASTRO P. (1997) Perennial ryegrass endophytes in Galicia, Northwest Spain. *Journal of Agricultural Science*, 129, 173-177.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E. Y GONZALEZ E. (2003) Ergovaline concentration in perennial ryegrass infected with a lolitrem B-free fungal endophyte in north-west Spain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 46, 117-122.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E., PREGO C. Y GONZALEZ E. (2002) Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del norte de España infectadas con los hongos endófitos *Neotyphodium*. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 17, 247-256.
- OLIVIER J.W. (2005) Pathophysiological response to endophyte toxins. En: Roberts C.A. et al. (Eds.) *Beotyphodium in Cool-Season Grasses*, pp 291-304. Iowa, EEUU: Blackwell Publishing.
- OMACINI M., CHANETON E.J., GHERSA C.M. Y OTERO P. (2004) Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos*, 104, 581-590.
- OMACINI M., EGGERS T., BONKOWSKI M., GANGE A.C. Y JONES T.H. (2006) Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology*, 20, 226-232.
- OMACINI M., SEMMARTIN M., PÉREZ L.I. Y GUNDEL P.E. (2012) Grass-endophyte symbiosis: A neglected above-ground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology*, 61, 273-279.
- PATERSON J., FORCHERIO C., LARSON B., SAMFORD M. Y KERLEY M. (1995) The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *Journal of Animal Science*, 73, 889-898.
- REED K.F.M., NIE Z.N., WALKER L.V., MACE W.J. Y CLARK S.G. (2011) Weather and pasture characteristics associated with outbreaks of perennial ryegrass toxicosis in southern Australia. *Animal Production Science*, 51, 738-752.
- REINHOLD-HUREK B. Y HUREK T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435-443.
- RODRIGUEZ R.J., WHITE JR J.F., ARNOLD A.E. Y REDMAN R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314-330.
- ROMO M., LEUCHTMANN A., GARCÍA B. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2007) A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Virus Research*, 124, 38-43.
- ROWAN D.D. Y GAYNOR D.L. (1986) Isolation of feeding deterrents against Argentine stem weevil from ryegrass

- infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 647-658.
- RYAN G. D., RASMUSSEN S., PARSONS A. J. Y NEWMAN J. A. (2015) The effects of carbohydrate supply and host genetic background on *Epichloë* endophyte and alkaloid concentrations in perennial ryegrass. *Fungal Ecology*, 18, 115-125.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ S.S., BILLS G.F., ACUÑA L.D. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2010) Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity*, 41, 115-123.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ S., BILLS G.F., HERRERO N. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2012) Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5, 289-297.
- SCHARDL C.L., FLOREA S., PAN J., NAGABHYRU P., BEC S. Y CALIE P.J. (2013a) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 480-488.
- SCHARDL C.L., GROSSMAN R.B., NAGABHYRU P., FAULKNER J.R. Y MALLIK U.P. (2007) Loline alkaloids: Curricencies of mutualism. *Phytochemistry*, 68, 980-996.
- SCHARDL C.L., YOUNG C.A., HESSE U., AMYOTTE S.G., ANDREEVA K., CALIE P.J., FLEETWOOD D.J., HAWS D.C., MOORE N., OESER B., PANACCIONE D.G., SCHWERI K.K., VOISEY C.R., FARMAN M.L., JAROMCZYK J.W., ROE B.A., O'SULLIVAN D.M., SCOTT B., TUDZYNSKI P., AN Z., ARNAOUDOVA E.G., BULLOCK C.T., CHARLTON N.D., CHEN L., COX M., DINKINS R.D., FLOREA S., GLENN A.E., GORDON A., GÜLDENER U., HARRIS D.R., HOLLIN W., JAROMCZYK J., JOHNSON R.D., KHAN A.K., LEISTNER E., LEUCHTMANN A., LI C., LIU J.G., LIU J., LIU M., MACE W., MACHADO C., NAGABHYRU P., PAN J., SCHMID J., SUGAWARA K., STEINER U., TAKACH J.E., TANAKA E., WEBB J.S., WILSON E.V., WISEMAN J.L., YOSHIDA R. Y ZENG Z. (2013b) Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the Clavicipitaceae Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. *PLoS Genetics*, 9.
- SCHARDL C.L., YOUNG C.A., MOORE N., KROM N., DUPONT P.-Y., PAN J., FLOREA S., WEBB J.S., JAROMCZYK J., JAROMCZYK J.W., COX M.P. Y FARMAN M.L. (2014) Genomes of Plant-Associated Clavicipitaceae. *Advances in Botanical Research*, 70, 291-327.
- SCHMIDT S.P. Y OSBORN T.G. (1993) Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 44, 233-262.
- SIEGEL M.R. Y BUSH L.P. (1996) Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. *Recent Advances in Phytochemistry*, 30, 81-120.
- SOTO-BARAJAS M., ALVAREZ PASCUA A., ZABALGOGEAZCOA I. Y VÁZQUEZ-DE-ALDANA B.R. (2015) Efecto de la diversidad taxonómica de hongos endófitos *Epichloë* en la producción de alcaloides en *Lolium perenne*. En: Cifre J. et al. (Eds.) *Pastos y Forrajes en el siglo XXI*, pp 23-29. Palma de Mallorca, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- SOTO-BARAJAS M., VÁZQUEZ-DE-ALDANA B.R. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2014) Diversidad taxonómica de hongos endófitos *Epichloë/Neotyphodium* en *Lolium perenne* de distintos habitats. En: Busqué J. et al. (Eds.) *Pastos y PAC*, pp 193-200. Potes, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- TURNER B., CONKLIN F., CARROLL D., DELCURTO T. Y CROSS T. (1995) Feeding Oregon's grass straw to livestock: economic and nutritional considerations. Special Report 952. Pp 719-22. Agricultural Experimental Station Oregon State University, Oregon.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA CRIADO B., VICENTE TAVERA S. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2013a) Fungal endophyte (*Epichloë festucae*) alters the nutrient content of *Festuca rubra* regardless of water availability. *PLoS ONE*, 8.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., ZABALGOGEAZCOA I. Y GARCÍA CRIADO B. (2001) Ergovaline levels in cultivars of *Festuca arundinacea*. *Animal Feed Science and Technology*, 93, 169-176.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GUNDEL P.E., GARCÍA CRIADO B., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA SÁNCHEZ A. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2014) Germination response of endophytic *Festuca rubra* seeds in the presence of arsenic. *Grass and Forage Science*, 69, 462-469.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ROMO M., GARCÍA-CIUDAD A., PETISCO C. Y GARCÍA-CRIADO B. (2011) Infection with the fungal endophyte *Epichloë festucae* may alter the allelopathic potential of red fescue. *Annals of Applied Biology*, 159, 281-290.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2003) Ergovaline occurrence in grasses infected by fungal endophytes of semi-arid pastures in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 347-353.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2007) Fungal alkaloids in populations of endophyte-infected *Festuca rubra* subsp *pruinosa*. *Grass and Forage Science*, 62, 364-371.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2013b) An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant and Soil*, 362, 201-213.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., RUBIO DE CASAS R., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2010) Relationships between the genetic distance of *Epichloë festucae* isolates and the ergovaline and peramine contents of their *Festuca rubra* hosts. *Annals of Applied Biology*, 156, 51-61.
- WEST C.P., IZEKOR E., OOSTERHUIS D.M. Y ROBBINS R.T., 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil* 112, 3-6.

- WHITE J.F. Y BALDWIN N.A. (1992) A preliminary enumeration of grass endophytes in west central England. *Sydowia*, 44, 78-84.
- WHITE J.F. Y BULTMAN T.L. (1987) Endophyte-host associations in forage grasses. VIII. Heterothallism in *Epichloë typhina*. *American Journal of Botany*, 74, 1716-1721.
- WILKINSON H.H., SIEGEL M.R., BLANKENSHIP J.D., MALLORY A.C., BUSH L.P. Y SCHARDL C.L. (2000) Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 1027-1033.
- ZABALGOGÉAZCOA I. (2008) Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 138-146.
- ZABALGOGÉAZCOA I. Y BONY S. (2008) *Neotyphodium* research and application in Europe. En: Roberst *et al.* (Eds.) *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*, pp 23-33. Iowa, EEUU: Blackwell Publishing.
- ZABALGOGÉAZCOA I., GARCÍA CIUDAD A., Y GARCÍA CRIADO B. (1998) *Neotyphodium coenophialum* en semillas de variedades forrajeras de *Festuca arundinacea*. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 13, 167-172.
- ZABALGOGÉAZCOA I., GARCÍA CIUDAD A., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R. Y GARCÍA CRIADO B. (2006a) 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.
- ZABALGOGÉAZCOA I., ROMO M., KECK E., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (2006b) The infection of *Festuca rubra* subsp *pruinosa* by *Epichloë festucae*. *Grass and Forage Science*, 61, 71-76.
- ZABALGOGÉAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (1999) A survey of grass species infected by fungal endophytes in dehesa pastures. *Options Méditerranéennes*, 39, 247-250.
- ZABALGOGÉAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (2003) Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Science*, 58, 94-97.